

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



APUNTES PARA UNA HISTORIA
DE LA BIOQUIMICA:
EL METABOLISMO INTERMEDIARIO
(MONOGRAFIA)

^{o man}
CARLOS RAMON VILLENA LOZANO
QUIMICO

MEXICO, D.F.

1 9 8 1



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

APUNTES PARA UNA HISTORIA
DE LA BIQUIMICA:
EL METABOLISMO INTERMEDIARIO
(MONOGRAFIA)

CARLOS RAMON VILLENA LOZANO

QUIMICO

MEXICO, D. F.

1981

Jurado asignado originalmente según el tema.

PRESIDENTE: GUADALUPE VELEZ PRATT
VOCAL: PAULINA J. CASTRO ARDON
SECRETARIO: MAGDALENA OLIVA C. GALEZ
1er. SUPLENTE: ANDREA GARAYZI MARTIN
2do. SUPLENTE: MA. DOLORES LASTRA AZPILICUEVA

Sitio donde se desarrolló el tema: Bibliotecas de la I.N.A.M.

Nombre completo y firma del sustentante:

Carlos Ramón Villena Lozano



Nombre completo y firma del asesor del tema:

Guadalupe Vélez Pratt



A mis Padres:

Con cariño y agradecimiento.

A mi querida Universidad
y a la Facultad de Química.

A todos mis Maestros.

CONTENIDO

	<u>INTRODUCCION</u>	1
CAPITULO I	<u>METABOLISMO</u>	
	1. Generalidades.	5
	2. Vías Metabólicas.	18
	3. Regulación Metabólica.	21
CAPITULO II	<u>METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS</u>	
	1. Fermentación Alcohólica.	30
	2. Glucólisis.	38
	3. Ciclo del Acido Tricarboxílico.	53
	4. Vía de los Fosfatos de Pentosa.	58
	5. Gluconeogénesis.	63
	6. Biosíntesis de Polisacáridos.	66
CAPITULO III	<u>METABOLISMO DE LIPIDOS</u>	
	1. Degradación de Acidos Grasos.	72
	2. Biosíntesis de Acidos Grasos.	83
	3. Biosíntesis de Otros Lípidos.	89
CAPITULO IV	<u>METABOLISMO DE AMINOACIDOS</u>	
	1. Vías Degradativas de Aminoácidos.	94
	2. Degradaciones Individuales de los Aminoácidos.	99
	3. Ciclo de la Urea.	114
	4. Biosíntesis de Aminoácidos.	119
CAPITULO V	<u>METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS</u>	
	1. Degradación de los Acidos Nucleicos.	138
	2. Degradación de los Nucleótidos de Purina.	140
	3. Degradación de los Nucleótidos de Pirimidina.	145
	4. Biosíntesis de los Nucleótidos de Purina.	152
	5. Biosíntesis de los Nucleótidos de Pirimidina.	159

CAPITULO VI

METABOLISMO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

A. Síntesis del DNA.

1. Identificación del DNA como portador de Información Genética. 156
2. La Elucidación de la Vía Biosintética para el DNA. 171
3. Etapas en la replicación del DNA. 179

B. Síntesis del RNA.

1. Introducción. 191
2. Las Primeras Investigaciones. 191
3. La RNA polimerasa. 194
4. Etapas para la Síntesis del RNA. 197

CAPITULO VII

SINTEISIS DE PROTEINAS Y CODIGO GENETICO

A. Síntesis de Proteínas.

1. Los Estudios Iniciales. 203
2. Los Componentes que Participan en la Síntesis de Proteínas. 209
3. Etapas para la Síntesis de proteínas. 230

B. Código Genético.

1. Las Primeras Investigaciones. 234
2. Las Aportaciones Decisivas. 235
3. Dirección de Lectura del Código Genético. 237
4. Nuevas Evidencias Experimentales. 239
5. Naturaleza del Código Genético. 241

APENDICE

- Cronología de la Bioquímica. 243

BIBLIOGRAFIA

248

Una serie de preguntas han inquietado al hombre desde el inicio mismo de su existencia, ¿Quién soy? ¿Cómo soy? ¿De qué estoy hecho? ¿Cómo funciona mi organismo?, entre muchas otras éstas son algunas de tales interrogantes; de manera que la historia de la Ciencia viene a ser el inacabado relato en la búsqueda continua de la Humanidad por una respuesta que resulte satisfactoria, en caso de que no haya una contestación definitiva.

Comunmente se considera que la Bioquímica es una rama relativamente nueva dentro de la Biología pero en realidad sus antecedentes son remotos y se hallan ligados desde sus orígenes con otras ciencias como la Química y la Medicina, a través de las investigaciones iniciales de Paracelso (1493-1541) de aquellos que siguieron su línea de pensamiento como Jan Baptist van Helmont (1577-1644), quienes nombraron a su campo de estudio la Iatroquímica o química-médica. En el siglo XVII, Johann Rudolph Glauber (1604-1670), Robert Boyle (1627-1691) y otros investigadores establecieron las bases científicas de la química, tales contribuciones abrieron el camino para la "revolución en la química" ocurrida en la segunda mitad del siglo XVIII. En este periodo surgieron las bases propiamente científicas de la ciencia que vendría a ser la bioquímica a partir de los trabajos de investigadores como Karl Wilhelm Scheele (1742-1786), quien en el curso de sus estudios logró el aislamiento de numerosas sustancias como los ácidos cítrico, láctico, tartárico, málico y úrico de fuentes naturales; en tanto que, F. J. Rouelle realizó el aislamiento de la urea partiendo de la orina (1768). Sin embargo, estos logros permanecieron como curiosidades de la naturaleza hasta que hubo nuevos avances como fueron el concepto de la oxidación propuesto por Antoine Lavoisier en 1760 y la enunciación de la teoría atómica por John Dalton en 1804. Como la mayor parte de los investigadores de la época Lavoisier creía que la digestión de las sustancias alimenticias tenía lugar en los pulmones, Liebig sostenía que este proceso ocurría en la sangre, pero estudios posteriores de Eduard Flüger (1829-1910) mostraron claramente que tal proceso ocurría en los tejidos.

Además del proceso respiratorio otro fenómeno fisiológico, la digestión, llamó la atención de los pioneros de la bioquímica. Los conocimientos iniciales en este campo provienen de los trabajos de van Helmont quien elaboró una teoría química acerca de la digestión animal pero las aportaciones decisivas surgieron de las investigaciones de René de Réaumur (1683-1757) y de Lazzaro Spallanzani (1729-1799), quien mostró que la digestión era un proceso más químico que mecánico. Estos hallazgos llevaron al estudio de las enzimas digestivas por Theodor Schwann (1810-1882), Willy Kühne (1837-1900) y otros investigadores.

En el siglo XIX, el desarrollo de métodos cuantitativos de análisis por Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) y Justus von Liebig (1803-1873), y la aplicación de estas técnicas a los sistemas biológicos por Liebig y otros, permitieron identificar la mayor parte de los componentes químicos de los organismos. Este proceso llegó a su punto más alto con los trabajos de Emil Fischer (1852-1919), quien aplicó exitosamente las técnicas de la química orgánica en la obtención de sustancias simples, partiendo de sustancias complejas de estructura desconocida, determinando su estructura por degradación y confirmando la por síntesis química. Finalmente, dentro de los organismos los compuestos químicos no se encuentran como en los tubos y matraces de laboratorio sino que están perfectamente organizados

en el interior de las células y éstas mismas son altamente organizadas, por lo que se hizo necesario recurrir a otras ramas de la Biología: Histología y Fisiología, para poder estudiar muchos procesos fisiológicos. Esto se logró a través de las aportaciones de Francois Magendie (1784-1855), Claude Bernard (1813-1878), Karl Ludwig (1816-1895) y sus discípulos, quienes describieron los aspectos químicos de los procesos fisiológicos en el curso de sus investigaciones. A fines de este siglo, la cirugía experimental alcanzó un alto grado de desarrollo en manos de Ivan Petrovich Pavlov (1849-1936). De este modo, la química de los organismos vivos empezó a adquirir una fisonomía propia, convirtiéndose así en la química de la vida: la Bioquímica.

A principios del siglo XX ya se tenía prácticamente completo el concepto de la catálisis enzimática y comenzaba a estudiarse el papel de las vitaminas en el metabolismo. La técnica y la instrumentación ya muy avanzadas en esta época hicieron posible el aislamiento y caracterización de un número de sustancias con funciones biológicas específicas dentro de los organismos, entre las que pueden contarse los citocromos (MacMunn, 1886), la epinefrina (Takamine y Alorich, Abel, 1901-1904) y la coenzima NAD (Harden y Young, 1905). Otro proceso biológico cuyo estudio ejerció un impacto decisivo para el desarrollo de la bioquímica fue la fermentación, siendo en 1912 cuando Carl Neuberg propuso el primer esquema químico para esta vía metabólica. De aquí en adelante, se siguieron describiendo las series de transformaciones que experimentan los nutrientes en el interior del organismo, es decir, las distintas vías metabólicas. El descubrimiento de nuevas enzimas y coenzimas, así como el estudio de su cinética y mecanismo de acción, fue desarrollándose paralelamente con el de otras sustancias naturales; la década de 1920 fue especialmente rica en logros pues se aislaron y caracterizaron muchas sustancias con actividad biológica como los carotenos, el ácido ascórbico, el ATP y la fosfocreatina. En este periodo se destacan dos hechos relevantes para el desarrollo de la bioquímica; el primero es la invención de la ultracentrífuga (Svedberg, 1925-1930), con lo cual la determinación de velocidades de sedimentación habría de ser de capital importancia para la caracterización de muchas moléculas en el futuro; el segundo es la cristalización de la ureasa por Sumner (1926), quien confirmó la naturaleza proteica de esta enzima.

Otro periodo sumamente fructífero fue la década de los años 1930. En 1933, Krebs y Henseleit descubrieron el ciclo de la urea, en este mismo año Embden y Meyerhof señalaron los metabolitos importantes que tienen en común la vía glucolítica y la fermentación. En 1935, Schoenheimer y Rittenberg usaron por primera vez los isótopos como rastreadores para el estudio del metabolismo y dos años después, Krebs postuló el ciclo original del ácido cítrico. Las investigaciones sobre la función biológica del ATP resultaron exitosas al inicio de la década 1940, en la cual hubo nuevas aportaciones importantes. En 1942, Bloch y Rittenberg observaron que una molécula de dos átomos de carbono, el acetato, actuaba como precursora en la síntesis del colesterol, el año siguiente Leloir y Muñoz indicaron que los ácidos grasos eran oxidados por preparaciones hepáticas libres de células; en el curso de sus estudios Leloir descubrió el papel de los nucleótidos de uridina en el metabolismo de los carbohidratos. En estudios paralelos Kenney y Lehninger (1946-1950) mostraron que las mitocondrias son el sitio celular preciso donde se llevan a cabo la oxidación de los ácidos grasos, el ciclo del ácido tricarbóxico y la fosforilación oxidativa. En este mismo periodo se lo-

ran avances en las técnicas analíticas con el desarrollo de la cromatografía de partición por Martin y Synge, quienes aplican este método al análisis de aminoácidos; en tanto que Chance introduce el empleo de métodos espectrofotométricos al estudio de las reacciones enzimáticas. Stein y Moore realizan el análisis completo de la secuencia aminoácida de una proteína, la beta-lactoglobulina, empleando la cromatografía de partición; Hogeboom, Schneider y Palade (1948) desarrollan con gran precisión el método de centrifugación diferencial y en 1950, Sanger contribuye con el método del 2,4-dinitrofluorobenceno para la identificación de los residuos amino-terminales de las cadenas peptídicas, en tanto que Edman desarrolla un método alternativo, el del fenil-isotiocianato, para lograr la misma determinación.

Los métodos tan precisos para el análisis de proteínas permitieron en la década siguiente la determinación de la estructura tridimensional de las proteínas (Pauling y Corey, 1950; Sanger y Thompson, 1953; Anfinsen y White, 1956; Stein, Moore y Spackman, 1958). El gran avance en las técnicas experimentales hizo posible realizar uno de los hallazgos más destacados de este periodo; la proposición de Watson y Crick, en 1953, de la estructura de doble hélice para el DNA. Este hecho marcó el inicio de una serie de fascinantes descubrimientos que revolucionaron la ciencia, entre los que pueden considerarse decisivos están la identificación de las enzimas implicadas en la síntesis de DNA (Ochoa y Brunberg-Manago, 1955; Kornberg, 1956) y RNA (Weiss y Hurwitz, 1959), la determinación de la estructura del mapa genético de un microorganismo (Benzer, 1955), la confirmación experimental de que el DNA se replica semiconservativamente según el modelo de Watson y Crick (Meselson y Stahl, 1958) y la enunciación del dogma central de la genética molecular por Crick en 1958. De manera simultánea siguió creciendo el conocimiento sobre la estructura y biosíntesis de las proteínas, en 1958, Anfinsen y White completaron sus estudios que les llevaron a concluir que la estructura tridimensional de las proteínas se halla determinada por la secuencia aminoácida de la cadena polipeptídica, en tanto que Volpel y Magasanik describieron la represión de la síntesis proteica. En este mismo año, Hoagland, Zamenick y Stephenson aislaron el RNA de transferencia y postularon su función metabólica.

En 1956, Umberger había descubierto que la isoleucina inhibe su propia síntesis a partir de treonina, este tipo de inhibición por producto final abrió las puertas para ampliar rápidamente los conocimientos de las vías metabólicas y su regulación, siendo éste un concepto relativamente nuevo pues hasta el año siguiente se describió la represión de la síntesis enzimática ya mencionada. En realidad este año podría marcar la mitad de un periodo de quince años en el cual se logró elucidar las etapas principales de las síntesis y degradaciones de un número de biomoléculas como ácidos grasos, aminoácidos, carbohidratos complejos, lípidos, pirimidinas y purinas gracias a las contribuciones de Ames, Baddley, Bloch, Buchanan, Cantoni, Coon, S.D. Davis, D.E. Green, G.P. Greenberg, Gunsalus, Gurin,andler, Hayaishi, Horecker, Kalckar, Kennedy, A. Kornberg, Lyner, Magasanik, Meister, Neuberger, Racker, Shemin, Sprinson, Strominger y Weinhouse, entre muchos más.

A principios de la década de los años 1960, Nirenberg y Matthaei mostraron que el ácido poliuridílico podía codificar la secuencia aminoácida de un polipéptido, la polifenilalanina, con lo cual quedó abierto el camino para la elucidación del código genético; en el periodo de 1961-1965 los laboratorios de Niren-

berg, Khorana y Ochoa lograron la identificación de todos los vocablos del código genético. Puede considerarse que esta aportación fue uno de los últimos grandes logros dentro de la bioquímica en años recientes.

En la actualidad, al disponerse de técnicas y métodos analíticos muy refinados, que en algunos casos han llegado a una gran sofisticación, las investigaciones bioquímicas se han orientado hacia el estudio detallado de los procesos metabólicos que tienen lugar en los organismos eucariotas, partiendo de las generalizaciones deducidas de los estudios con organismos procariotas. Estos esfuerzos ya han rendido sus primeros frutos y paulatinamente se va disponiendo de una visión más detallada y completa de los esquemas metabólicos muy generalizados que surgieron en las primeras investigaciones bioquímicas; sin embargo, el día en que se tenga una respuesta definitiva a cada interrogante que pueda plantearse el hombre con respecto a sí mismo y al universo que le rodea aún parece distante pero de ninguna manera inalcanzable.

El objetivo primordial del presente trabajo es revisar los antecedentes históricos de los diversos temas incluidos en el curso de Bioquímica II que se imparte en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta revisión es importante ya que durante los cursos de bioquímica comunmente se pierde de vista el hecho de que la naturaleza y mecanismo de los procesos bioquímicos se ha descubierto paulatinamente, y que las investigaciones metabólicas aún continúan por la línea trazada desde los primeros estudios.

Los estudiantes de bioquímica de esta Facultad podrán aplicar de diferente manera los conocimientos adquiridos en esta materia según sea la orientación de su carrera, por ello se quiere hacer notar que si bien la mayor parte de la historia narrada aquí ha sido motivada por el interés de conocer el metabolismo en el hombre no obstante una parte de la revisión también incluye los patrones metabólicos generales de plantas y microorganismos. Así mismo, al principio de este trabajo se resumen los aspectos esenciales del metabolismo como son la digestión, absorción y transporte de los nutrientes; las distintas vías metabólicas conocidas y los mecanismos de regulación metabólica más importantes. Como se señala en su oportunidad, algunas vías metabólicas son muy semejantes en mamíferos, plantas y microorganismos pero existen numerosas vías metabólicas secundarias que no se han considerado aquí, ya que por sí solas podrían ser materia de un trabajo similar; pero puede decirse que las investigaciones narradas en la presente historia constituyen un punto de referencia para el estudio del metabolismo en organismos no mamíferos.

Con el deseo de que este trabajo contribuya en algún modo a incrementar el interés por el estudio de la bioquímica, se tiene la esperanza de que el material comprendido aquí halle aceptación y que logre difundirse entre los estudiantes de esta Facultad como un complemento para sus cursos de bioquímica universitaria.

Capítulo I

METABOLISMO

1. Generalidades.

a) Digestión. Es el proceso que trata y acondiciona los alimentos para que puedan ser utilizados por las células que componen el organismo. Este evento implica la descomposición de las sustancias alimenticias hasta formas más simples que son tomadas por cada una de las células (1,9).

Las grandes moléculas que constituyen el alimento son degradadas mediante hidrólisis. En su mayor parte los nutrientes utilizados por los organismos consisten de carbohidratos, lípidos y proteínas, siendo desdoblada cada una de estas macromoléculas por una clase especial de enzimas digestivas que aceleran el proceso hidrolítico. Los alimentos también incluyen moléculas pequeñas como agua, minerales y vitaminas.

El proceso digestivo se realiza dentro y fuera de las células. Un gran número de microorganismos y ciertas plantas inferiores secretan enzimas al medio circundante con las cuales digieren el alimento fuera de sus células, mediante un proceso de digestión extracelular. El moho del pan, por ejemplo, secreta enzimas que difunden al exterior y digieren los alimentos; posteriormente, los productos resultantes son absorbidos. Algunas plantas, como las carnívoras, tienen la capacidad de capturar insectos en cavidades especiales formadas por las hojas, digiriéndolos mediante la acción de enzimas secretadas por las células y vertidas en tales formaciones. Una vez que han sido digeridas las grandes moléculas y partículas sólidas, las pequeñas moléculas resultantes pasan al interior de las células donde son metabolizadas.

Los organismos multicelulares tienen sistemas digestivos especializados. En los animales multicelulares, desde los más simples hasta el hombre, las sustancias alimenticias deben ser transportadas desde el exterior hasta ciertos órganos especializados del cuerpo donde se efectúa la digestión; un proceso que no ocurre en los microorganismos y la mayoría de las plantas puesto que carecen de órganos digestivos. Los organismos multicelulares simples, como la hidra, secretan enzimas en la cavidad especializada para digerir el alimento, absorbiendo los productos resultantes a través de las células del cuerpo. Puesto que la cavidad o tubo digestivo de la hidra tiene sólo una abertura, el material no digerido sale por el mismo orificio utilizado para tomar el alimento. La cavidad digestiva de algunos platelmintos, como la planaria, es más compleja pero también tiene un sólo orificio bifuncional.

En los animales superiores la cavidad digestiva tiene dos orificios, el alimento entra por un extremo del tubo digestivo y el material no digerido sale en el otro extremo. Para su estudio puede dividirse el tubo digestivo del hombre y los animales superiores en cinco regiones: boca, esófago, estómago (o su equivalente), intestino delgado (o su equivalente) e intestino grueso.

BOCA. La boca del hombre y los animales cuadrúpedos tiene dientes que son empleados para la masticación del alimento, así como glándulas salivales que secretan saliva para ayudar en la masticación (9,15).

La saliva contiene materia inorgánica en forma de carbonatos, cloruros y fosfatos de sodio, potasio, calcio, magnesio; y materia orgánica que incluye a la mucina (una glucoproteína), la cual proporciona a la saliva su consistencia característica. La saliva del hombre, cerdo y cucaracha contiene una enzima desdobladora del almidón, la amilasa. La función fundamental de la saliva es cooperar en la masticación de los componentes insolubles, humedeciendo el alimento, y disolver los componentes solubles.

ESOFAGO. Es un tubo muscular que conecta la boca con el estómago o su equivalente. En las aves y en muchos insectos hay una dilatación del esófago, el buche, que se emplea para almacenar los alimentos. Las tres primeras partes del "estómago" de los rumiantes son realmente dilataciones del esófago.

Durante la deglución en el hombre, el movimiento de los músculos de la garganta hace que la epiglotis cierre el tubo respiratorio, impidiendo que el alimento penetre a la tráquea. De manera que los alimentos pasan directamente al estómago.

ESTOMAGO. En el hombre y los animales superiores no rumiantes el estómago es un simple saco de paredes relativamente delgadas en la región amplia del fondo, con paredes gruesas en el píloro. La pared interior del estómago está tapizada de células parietales (que producen ácido clorhídrico) y células principales (productoras de proenzimas o zimógenos). La secreción mezclada de estas células, junto con la mucina producida por las células mucosas, recibe el nombre de jugo gástrico.

El jugo gástrico contiene aproximadamente 99% de agua, 0.5% de HCl, 0.3% de materia orgánica y 0.2% de sales inorgánicas. Las sales inorgánicas son similares a las que se encuentran en la saliva, mientras que la materia orgánica consta de mucina, las proenzimas pepsinógeno y prorenina, y una enzima, la lipasa gástrica. El ácido clorhídrico se elabora a partir de la sangre que baña las células mediante la absorción selectiva de iones cloruro e hidrógeno, y la reacción es inversa a la de neutralización del

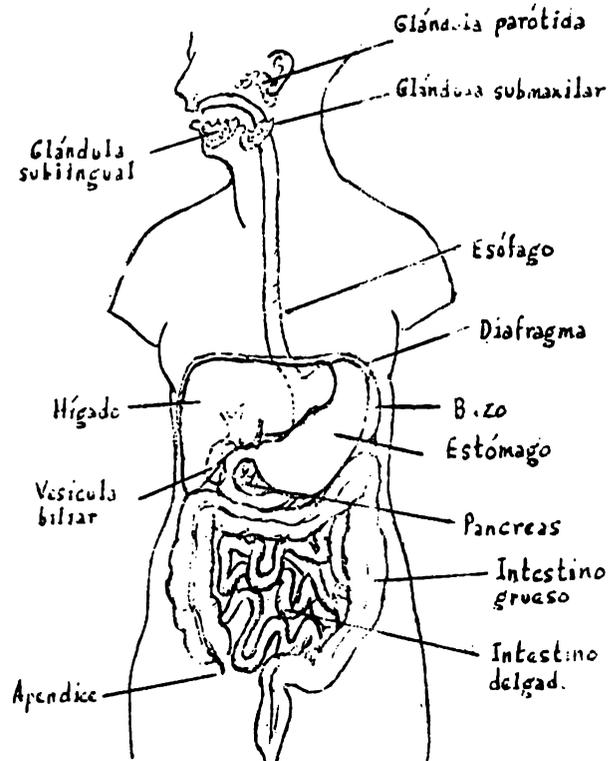
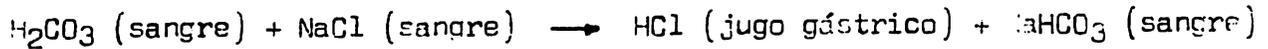


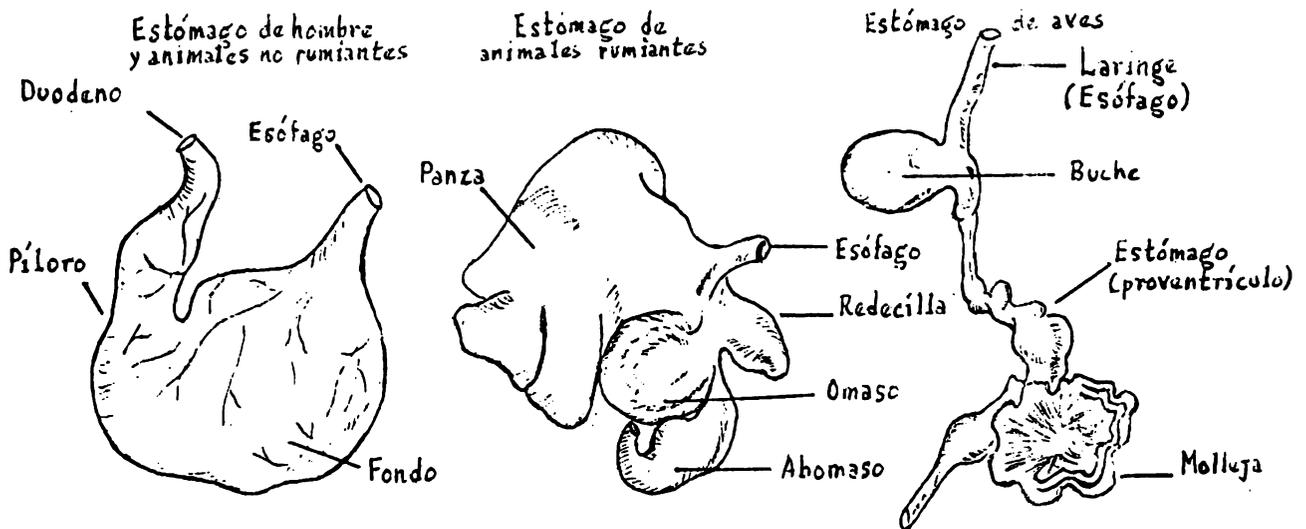
Diagrama del sistema digestivo en el hombre. El tubo digestivo humano es un conducto continuo con regiones especializadas.

bicarbonato de sodio con HCl.



Las células parietales secretan una solución de HCl con una concentración aproximada de 0.15 N y un pH de 1.0, el cual se eleva por dilución con las secreciones de las células mucosas y principales, de manera que el pH final del jugo gástrico es de 1.5 a 2.0, (10).

En los rumiantes, el estómago se compone de cuatro partes, panza (o rumen), redecilla (o bonete), libro y cuajar (o abomaso), pasando el alimento del esófago a la panza llega al cuajar a través de la redecilla y el libro. Los alimentos pueden regurgitarse desde la panza y la redecilla para una masticación posterior. El abomaso (cuajar) o cuarto estómago de los rumiantes corresponde al simple saco estomacal del hombre y los animales no rumiantes, siendo aquí donde se secreta el jugo gástrico.



Comparación de los estómagos de distintos animales superiores como el hombre y varios mamíferos, los animales rumiantes y las aves.

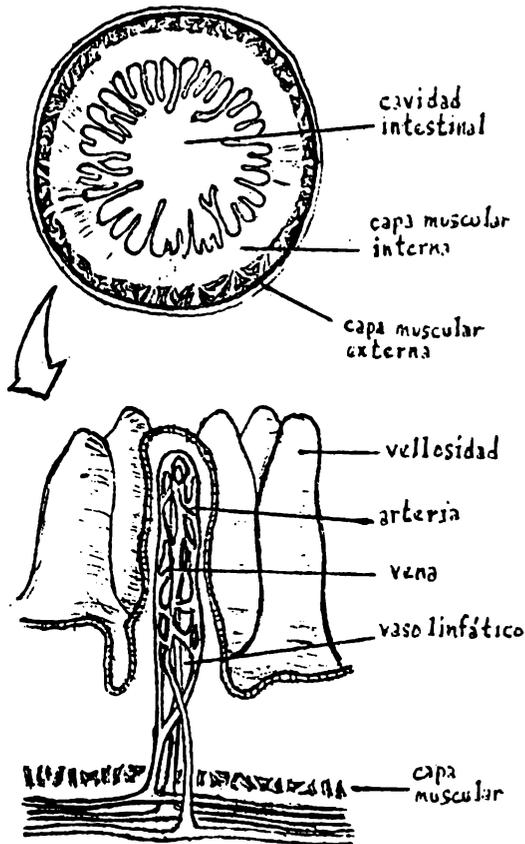
En las aves el estómago es pequeño y no tiene capacidad de almacenamiento, por lo que el alimento, humedecido con jugo gástrico, pasa de inmediato a la molleja. En ésta por acción muscular, con la ayuda de piedrecillas o arena (previamente tragadas por el ave), se trituran los alimentos hasta un estado fino de subdivisión y son digeridos parcialmente por el jugo gástrico. El estómago del pez es un simple saco con una región pilórica en cuyas paredes hay un gran número de segmentos ciegos, los ciegos pilóricos, que pueden considerarse como parte de la estructura intestinal; mientras que en muchos insectos la región estomacal está formada por una molleja y por ciegos gástricos que secretan jugo digestivo (9).

INTESTINO DELGADO. El intestino delgado del hombre, los cuadrúpedos y las aves puede dividirse en tres regiones: duodeno, yeyuno e ileon (9,10).

Las paredes internas del intestino se hallan revestidas de las llamadas glándulas de Brunner y Lieberkuhn que secretan jugo intestinal. Estas glándulas son especialmente abundantes en el duodeno y en la primera parte

del yeyuno.

El jugo intestinal es un líquido parecido a la saliva con un contenido de 99% de agua, 0.5% de materia orgánica y 0.5% de sales inorgánicas, similares a las que se encuentran en la saliva. Los componentes de la materia orgánica son mucina, aminopeptidasas, dipeptidasas, enteroquinasa, nucleasas, nucleotidasas, nucleosidasas, fosfatasas, lactasa, maltasa y sacarasa. La presión mecánica sobre la pared del intestino estimula la secreción y se considera que la presencia de la masa alimenticia produce tal estímulo.



Sección transversal del intestino delgado que muestra la disposición de las vellosidades intestinales, a través de las cuales son absorbidos los productos de la digestión.

0.5% de materia orgánica y 0.5% de materia inorgánica. Las sales inorgánicas son similares a las de la saliva y los componentes de la materia orgánica son mucina, las proenzimas tripsinógeno, quimotripsinógeno y las enzimas carboxipeptidasa, amilasa pancreática y lipasa pancreática. La secreción del jugo pancreático se halla bajo control, tanto del sistema nervioso como del sistema hormonal. Las paredes del duodeno secretan la prohormona prosecretina, que por la acidez del ácido quimo del estómago, se convierte en la hormona secretina; la cual entra en la corriente sanguínea y estimula al tejido acinoso para que secrete el jugo pancreático. En tanto que la pancreozimina aumenta el contenido enzimático del jugo sin aumentar el volumen

Además del jugo intestinal, en la primera parte del intestino (duodeno) se vierten otras dos secreciones. Una de ellas es la bilis, que después de ser elaborada en el hígado se almacena en la vesícula biliar, de la cual pasa al duodeno. La bilis producida por el hígado es más diluida que la de la vesícula, que contiene un 86% de agua y 14% de sólidos, debido a que se elimina parte del agua en ésta última. Los sólidos están formados de un 8% de sales biliares (glicolato y taurocolato de sodio), 3% de colesterol y otros lípidos, 2% de pigmentos biliares y mucina, además del 1% de sales inorgánicas. Los efectos disolventes y emulsificantes de la bilis favorecen la digestión de los lípidos de la dieta.

La segunda secreción vertida al intestino delgado es el jugo pancreático elaborado por el tejido acinoso del páncreas. Esta secreción fluye hacia la primera porción del duodeno por el conducto pancreático, o por el conducto ordinario de la bilis en el hombre y algunos animales.

El jugo pancreático es parecido a la saliva y contiene un 99% de agua,

de la secreción.

Vellosidades intestinales. El intestino delgado se halla revestido de una serie de minúsculas terminaciones, denominadas vellosidades intestinales, que absorben los productos finales de la digestión. La red de vasos capilares de estas formaciones absorbe un alto porcentaje de los productos de la digestión de proteínas y carbohidratos, mientras que el vaso quilífero o linfático absorbe la mayor parte de los productos derivados de los lípidos.

En los peces el intestino delgado se encuentra formado por un racimo de ciegos pilóricos o segmentos ciegos del intestino. Estos segmentos están revestidos de vellosidades que absorben los productos digeridos. En la mayoría de los insectos no existe un intestino delgado bien definido y probablemente, el intestino medio corresponde al intestino delgado de los animales superiores. La pared intestinal no está revestida con vellosidades por lo que los nutrientes disueltos se difunden a través de la membrana peritrófica y son absorbidos directamente por las células epiteliales de la pared intestinal (9,10).

INTESTINO GRUESO. Las tres regiones del intestino grueso, ciego, colon y recto, sirven principalmente como conductos para absorber agua del material fecal en la mayoría de las especies.

Digestión de los carbohidratos (1,9,10).

Los carbohidratos de los alimentos son la principal fuente de energía química que entra al cuerpo de los distintos organismos, sin embargo, tal energía no puede ser utilizada por las células hasta que las moléculas del almidón y los azúcares complejos hayan sido descompuestas.

En el hombre, la digestión de los carbohidratos se realiza en dos regiones del tubo digestivo, la boca y el intestino delgado. El proceso comienza en la boca con la acción de la amilasa salival, que como todas las enzimas digestivas, actúa mediante un proceso de hidrólisis rompiendo los enlaces del almidón para producir maltosa. La cucaracha y el cerdo también secretan una amilasa salival (una mezcla de amilasas alfa y beta), muy semejante a las enzimas de plantas y bacterias, capaz de degradar la amilosa y la amilopectina hasta maltosa. Otros animales como el perro, buey, rata y aves no secretan amilasa salival.

La secreción estomacal de los animales superiores no contiene enzimas desdobladoras de carbohidratos pero las bolsas ciegas (ciegos gástricos) de la cucaracha secretan las disacaridasas lactasa, maltasa y sacarasa. La panza (rumen), o primer estómago de los rumiantes, contiene microorganismos que secretan una mezcla eficaz de celulosa, hemicelulosa y enzimas degradadoras del almidón. La digestión de los carbohidratos continúa entonces en el intestino delgado, ahí la maltosa producida por la amilasa salival es descompuesta en glucosa por la maltasa intestinal. En tanto que las disacaridasas sacarasa y lactasa, secretadas por la pared intestinal de los animales superiores, descomponen la sacarosa y la lactosa en glucosa; el almi-

dón que no ha sido descompuesto en la boca de los animales superiores es digerido en el intestino por la amilasa pancreática que lo desdobra hasta maltosa.

El resultado final de la digestión de carbohidratos en todas las especies son los tres monosacáridos glucosa, galactosa y fructosa, siendo la glucosa el monosacárido que las células utilizan durante la respiración. La fermentación microbiana, como la que ocurre en el tracto digestivo de los animales superiores, descompone los carbohidratos en ácido láctico, acético, propiónico, butírico y gases, como el CO₂ y metano.

Digestión de los lípidos.

Los ácidos grasos y el glicerol son una fuente alterna de energía química utilizada por los distintos organismos cuando no hay un abastecimiento adecuado de carbohidratos.

En el hombre y los animales superiores, los lípidos son digeridos en el intestino delgado pero a diferencia de los carbohidratos y proteínas, los lípidos no se mezclan con el agua. Por lo que es necesario que las grandes gotas de lípidos sean convertidas en partículas más pequeñas antes de que las enzimas puedan actuar sobre ellos, siendo las sales biliares las que producen tal descomposición. Las pequeñas gotas de lípidos son atacadas entonces por la lipasa pancreática que produce ácidos grasos y glicerol. En los insectos omnívoros la lipasa es producida por las células que revisten el intestino medio y los triglicéridos son degradados de manera similar, aunque la falta de bilis puede disminuir la proporción de lípidos emulsificados.

Las plantas no emplean fuentes externas de lípidos ya que los sintetizan de acuerdo con sus necesidades y solamente en las semillas en germinación es donde se efectúa la digestión de los lípidos alimenticios almacenados. Durante la germinación las lipasas desdoblan los triglicéridos almacenados para formar di y monoglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol. Los microorganismos secretan lipasas al medio circundante para degradar los triglicéridos, después de lo cual, son absorbidos los glicéridos más simples, el glicerol y los ácidos grasos.

Digestión de las proteínas.

La digestión de las proteínas es un proceso gradual en todos los organismos, incluyendo las semillas en germinación. El embrión depende durante la germinación de una fuente externa para obtener los aminoácidos necesarios, por lo que las enzimas degradadoras de proteínas que se localizan en el endospermo, las proteasas, se mezclan con las proteínas almacenadas descomponiéndolas en péptidos simples y aminoácidos que se difunden en el embrión.

Los microorganismos se parecen a las semillas en germinación en este aspecto, ya que no pueden sintetizar todos los aminoácidos que requieren, y deben obtenerlos a partir de una fuente externa, que en la mayoría de los

casos es una proteína de origen vegetal o animal. Debido a que las proteinas no pueden pasar a través de la pared celular, los microorganismos las descomponen previamente secretando proteasas al medio exterior y absorben los productos resultantes.

En el hombre y los animales superiores, la digestión proteica es un proceso que se realiza en dos sitios, el estómago y el intestino delgado. Cuando el alimento entra al estómago es de naturaleza básica debido a la secreción de las glándulas salivales pero la descomposición de las moléculas de proteína requiere de un medio ácido. El ácido clorhídrico secretado por la pared estomacal aporta tal medio, preparando el alimento para la acción de las enzimas desdobladoras de proteínas. Ahora bien, la enzima que hidroliza los enlaces peptídicos es secretada en forma inactiva, el pepsinógeno, pero el ácido clorhídrico la convierte en la forma activa, la pepsina. Esta enzima rompe una parte de los enlaces peptídicos formando polipeptidos pero es necesaria una digestión posterior en el intestino para romper todos los enlaces.

El alimento proveniente del estómago entra al duodeno donde se mezcla con el jugo pancreático, que lo transforma de ácido en básico, para que puedan actuar las enzimas intestinales. Al mezclarse el jugo pancreático con las secreciones del intestino, las tres proenzimas que contiene (tripsinógeno, quimotripsinógeno y procarboxipeptidasa) son transformadas en las correspondientes enzimas. El tripsinógeno es convertido en tripsina por la enteroquinasa intestinal, y después, la tripsina convierte el quimotripsinógeno en quimotripsina y la procarboxipeptidasa en carboxipeptidasa. La tripsina y la quimotripsina hidrolizan las proteínas naturales y la caseína cálcica para formar proteosas, peptonas y distintos polipeptidos. La carboxipeptidasa degrada los productos resultantes de la digestión hecha por la pepsina, tripsina y quimotripsina convirtiéndolos en dipéptidos y aminoácidos.

El jugo intestinal también contiene enzimas capaces de degradar las proteínas. Las aminopeptidasas hidrolizan los productos resultantes de la digestión de las endopeptidasas para producir dipéptidos y aminoácidos, en tanto que las dipeptidasas desdoblan los dipéptidos remanentes rindiendo aminoácidos libres. Los microorganismos que habitan en el intestino grueso de los animales superiores, o su equivalente en los insectos, secretan enzimas que hidrolizan las proteínas en aminoácidos, y algunos microorganismos de esta región también secretan desaminasas y descarboxilasas. Como resultado de la acción de las descarboxilasas se originan productos de tipo putrefactivo a partir de los aminoácidos, por ejemplo, la descarboxilación del triptofano produce indol y metilindol; la histidina produce histamina; la tirosina, tiramina; la lisina, cadaverina y la arginina, putrescina. Además, se producen sulfuro de hidrógeno y mercaptanos a partir de la cistina y metionina, así como metano de varios aminoácidos.

Digestión de los ácidos nucleicos.

El jugo intestinal del hombre y los animales superiores también con-

tiene una serie de enzimas que degradan los ácidos nucleicos. Las ribo y desoxirribonucleasas desdoblan los ácidos nucleicos para rendir los respectivos nucleótidos. Las fosfatasas convierten los nucleótidos en los correspondientes nucleósidos y liberan ácido fosfórico; finalmente, las nucleosidasas hidrolizan los nucleósidos para rendir el azúcar y la purina o pirimidina respectivas. Los microorganismos también poseen una serie de enzimas similares para degradar los ácidos nucleicos.

Digestión de las vitaminas y minerales.

La mayor parte de las vitaminas en las plantas, animales y microorganismos se encuentran formando parte de sistemas enzimáticos, comúnmente en la porción coenzima de la holoenzima, aunque también pueden hallarse unidas con proteínas, nucleótidos o grupos fosfato. Otras se encuentran en estado libre en los alimentos. Las vitaminas ligadas en los alimentos son liberadas por la acción de enzimas digestivas presentes en el estómago y los intestinos de insectos y animales superiores.

En adición, algunos elementos minerales son esenciales en la dieta de animales, plantas y microorganismos, que en la mayoría de los casos requieren de los mismos elementos. El jugo gástrico de las especies animales es muy efectivo para disolver los minerales insolubles como el carbonato de calcio y el fosfato de calcio; en tanto que los elementos minerales unidos a proteínas, lípidos o carbohidratos son liberados en forma soluble durante la digestión de los compuestos de carbono a los que se encuentran enlazados.

b) Absorción. Conforme procede la digestión de las grandes moléculas alimenticias los productos resultantes son absorbidos por las vellosidades intestinales y pasan a la corriente sanguínea, la cual se encarga de transportar los nutrientes hasta las células. En el interior de éstas, las sustancias digeridas son descompuestas para obtener energía, o bien, son utilizadas para la síntesis de nuevos tejidos, para el crecimiento y reparación en el organismo. Los microorganismos absorben sus nutrientes directamente del entorno y los emplean con fines semejantes.

Absorción de los carbohidratos (1,9,10).

Los monosacáridos resultantes de los carbohidratos son absorbidos a través de las vellosidades intestinales en los animales superiores y el hombre, o a través de la membrana peritrófica en los insectos.

En los animales superiores, la mezcla de monosacáridos absorbidos es transportada por la corriente sanguínea y la vena porta hasta el hígado, donde se sintetiza el glucógeno posteriormente. Una fracción menor de monosacáridos penetra en el vaso quilífero o linfático para ser transportada por el sistema linfático hasta el hígado.

Absorción de los lípidos.

En el hombre los productos derivados de los lípidos son absorbidos en el intestino principalmente a través de los vasos linfáticos, y en menor proporción por los vasos capilares. Las sales biliares colaboran en la

absorción de los ácidos grasos que son transportados por el sistema linfático del organismo.

En los rumiantes, los productos de la fermentación bacteriana son absorbidos por las vellosidades a través de los vasos quilíferos pero también por los capilares sanguíneos y la vena porta. Los ácidos grasos superiores son convertidos en grasas en el hígado, mientras que los depósitos grasos y los ácidos como el acético, láctico y propiónico son transformados en glucógeno en este sitio. Los productos de la digestión de lípidos en los insectos pasan a través de la membrana peritrófica y son absorbidos por las células eciteliales que revisten el intestino medio.

Absorción de las proteínas.

Los aminoácidos obtenidos de las proteínas en el estómago y el intestino delgado de los animales superiores, son absorbidos por las vellosidades intestinales y pasan a los vasos capilares. Una vez que entran en la corriente sanguínea pasan a formar parte del "depósito (pool) de aminoácidos" del organismo animal. En los insectos, los aminoácidos atraviesan la membrana peritrófica y son absorbidos en el intestino medio.

Absorción de las vitaminas y minerales.

Las vitaminas son absorbidas en todas las especies principalmente en forma libre. En los animales superiores las vitaminas hidrosolubles son absorbidas en el intestino a través de los vasos capilares, mientras que en los insectos ocurre un proceso similar en el intestino medio. Las vitaminas liposolubles son absorbidas en los animales superiores a través de los vasos quilíferos con ayuda de la bilis, siendo transportadas por el sistema linfático a todo el cuerpo.

Las sales minerales solubles se incorporan a las corrientes sanguínea y linfática después de ser absorbidas en el intestino de los animales superiores. En los insectos las sales solubles pasan a través de la membrana peritrófica.

c) Transporte. El transporte interno de los productos de la digestión hacia todas las regiones del cuerpo es un requisito previo a la utilización metabólica de tales sustancias por las células del organismo. Cuando se efectúa el movimiento de materiales a través de una capa de células que separa dos regiones fluidas del cuerpo ocurre un transporte transcelular, mientras que el paso de sustancias hacia dentro y fuera de las células implica transporte homocelular (3,6).

Pueden distinguirse cuatro etapas en el proceso de transporte de los metabolitos. 1) En primer lugar, los nutrientes deben ser absorbidos por el organismo, a partir del medio externo por las plantas, o bien, de la cavidad digestiva o del interior de una vacuola digestiva, en los animales. 2) A continuación, los metabolitos son transportados desde el sitio de absorción a todo el organismo por medio de los fluidos orgánicos. Este transporte fluido se realiza por difusión simple, aunque puede ser acelera-

do por algunos medios de propulsión y circulación de los fluidos del organismo. 3) Una vez que han sido distribuidos los nutrientes a todo el organismo deben pasar al interior de las células para ser metabolizados. Esta etapa, al igual que la absorción inicial, requiere que los nutrientes atraviesen la membrana plasmática hasta el citoplasma, lo que se realiza mediante un proceso de transporte a través de membranas. 4) Finalmente, en el interior de las células tiene lugar un transporte intracelular adicional, como el que ocurre en los fluidos del retículo endoplasmático y en el transporte a través de las membranas de varios organelos.

Transporte a través de membranas.

De los cuatro tipos de transporte interno, el transporte a través de membranas es el que implica los mecanismos más universales ya que la estructura básica y fisiología de las membranas celulares son similares en todos los organismos (2,6,11,16,22).

Transporte pasivo.

El transporte pasivo de solutos se efectúa por difusión, o sea, debido a la tendencia de cualquier sustancia a dispersarse dentro de un volumen de espacio disponible. La difusión se origina en el movimiento de las moléculas y la velocidad con que se realiza la dispersión depende de la cantidad de actividad térmica; si durante los movimientos de dispersión una partícula atraviesa la membrana plasmática ocurre un transporte de tipo pasivo, ya que la célula no gasta energía en tal proceso. Las moléculas neutras tienden a seguir su propio gradiente de concentración, dentro o fuera de la célula, durante el transporte pasivo, en tanto que los iones se desplazan según la distribución relativa de aniones y cationes.

La membrana plasmática es una membrana permeable diferencialmente que dirige el intercambio de materiales entre la célula y su ambiente. El transporte pasivo del agua a través de tal membrana se denomina ósmosis, y la tendencia de las moléculas del agua a seguir su propio gradiente de concentración crea una presión osmótica que se refleja en la velocidad a la que el agua penetra o abandona las células. Mientras que la ósmosis es la fuerza del movimiento de difusión de las moléculas del agua, el transporte pasivo de pequeñas moléculas de soluto recibe el nombre de diálisis. Si debido a un flujo masivo del disolvente el transporte pasivo de solutos se realiza contra un gradiente de concentración o electroquímico, el proceso se denomina arrastré por el disolvente.

Transporte activo.

Para que las moléculas de una sustancia sean transportadas en contra de un gradiente de concentración o electroquímico se requiere un mecanismo distinto al de difusión, o complementario, además de una fuente de energía. Si el paso de una sustancia a través de la membrana plasmática requiere un gasto de energía por parte de la célula, se efectúa un proceso de transporte activo.

Las células utilizan el transporte activo para obtener nutrientes, pa-

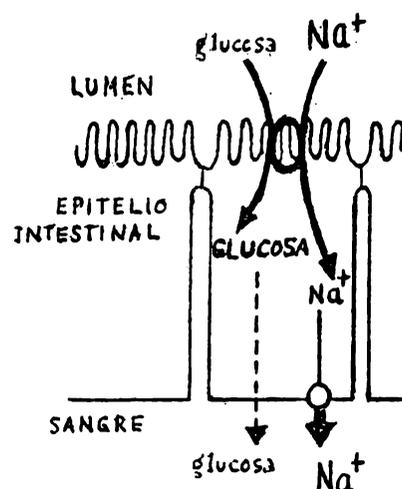
ra eliminar los desechos metabólicos y en el mantenimiento de su contenido de iones y solutos. Durante este proceso las moléculas neutras pueden ser desplazadas contra gradientes de concentración y los iones en contra de potenciales electroquímicos. El proceso de difusión puede ser acelerado por este mecanismo de modo que la sustancia difunda más rápidamente de lo que podría hacerlo por difusión simple; la difusión facilitada tiene el mismo resultado final de la difusión ordinaria pero se requiere menor tiempo para alcanzar el equilibrio de concentración de soluto en ambos lados de la membrana.

Puesto que el transporte activo requiere energía ésta debe ser aportada por el metabolismo celular, de manera que los mecanismos de transporte se encuentran acoplados directamente con reacciones productoras de energía, como la oxidación de sustratos y la hidrólisis del ATP. Existen mecanismos de transporte específicos para los distintos sustratos y un mecanismo dado sólo trabaja en una dirección al introducir o sacar una sustancia a través de la membrana plasmática, pero nunca ocurren los dos eventos simultáneamente. La velocidad del transporte activo es independiente del gradiente de concentración pero resulta favorecida por una concentración óptima de sustrato en el lado de la membrana en que se inicia el transporte y se establece una inhibición competitiva por ciertos iones o moléculas relacionados químicamente con el sustrato, independientemente de que tales sustancias sean o no transportadas.

Permanecen dudosos los mecanismos exactos de transporte activo. Algunos de ellos están acoplados y transportan simultáneamente dos sustancias diferentes en la misma dirección o en direcciones opuestas. El transporte de sodio y potasio generalmente se encuentra acoplado en las células que acumulan potasio expulsando selectivamente al sodio; proceso que recibe el nombre de bomba de sodio. El ATP es hidrolizado por una ATP-asa durante el transporte acoplado de sodio y potasio, utilizándose la energía liberada por cada molécula de ATP para movilizar aproximadamente tres iones sodio y dos iones potasio.

En varios tejidos la energía requerida para el transporte de distintas sustancias también se obtiene a partir de los gradientes iónicos generados por la ATP-asa. La absorción de carbohidratos y aminoácidos en el intestino y el riñón depende de la presencia del sodio en el medio externo, lo que se logra por efecto de la bomba de sodio. Puesto que en el interior de la célula la concentración de sodio es inferior a la que existe afuera, el sodio tiende a entrar por difusión pero al penetrar en la membrana plasmática se une a una molécula portadora, incrementando la afinidad de esta última hacia los carbohidratos o aminoácidos.

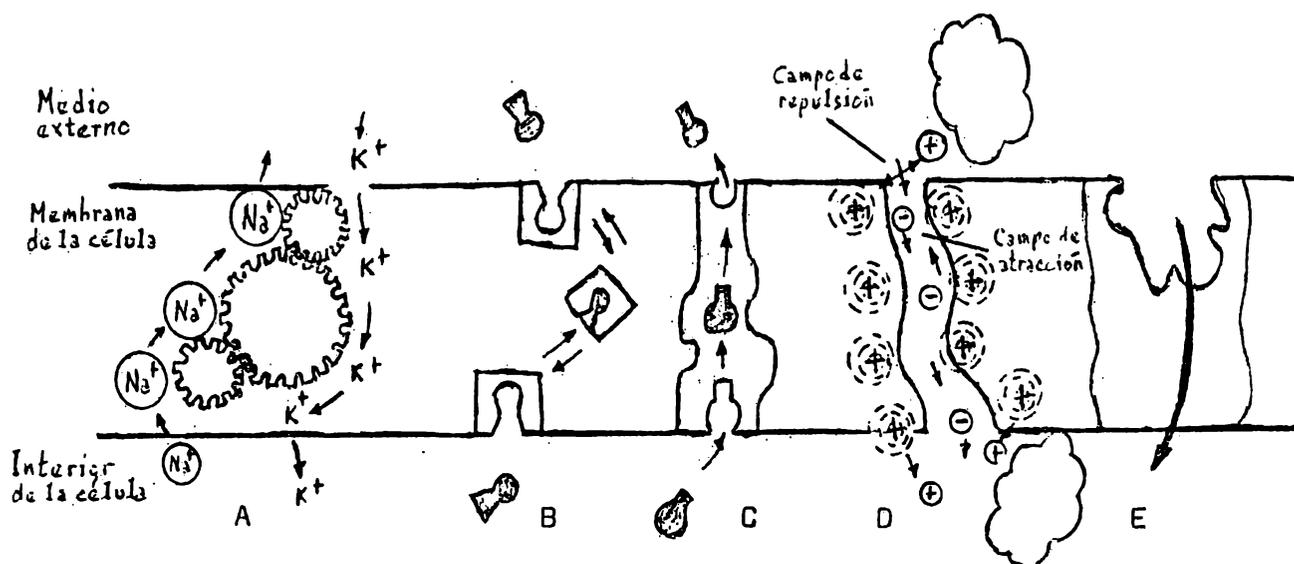
Este complejo triple, sodio-portador-glucosa



Mecanismo del transporte acoplado, vía portador, del sodio y los azúcares o aminoácidos.

sa (aminoácido), puede entonces atravesar la membrana celular debido al gradiante de concentración de sodio generado por la actividad de la ATP-asa.

En el interior de la célula, donde existe una alta concentración de potasio, éste desplaza al sodio reduciendo la afinidad del portador por la glucosa o los aminoácidos que se incorporan entonces al citoplasma, siendo fosforilada la glucosa; puesto que la membrana es prácticamente impermeable a la glucosa fosforilada ésta no puede salir de la célula. Una vez libre, el portador se difunde hasta la superficie externa de la membrana -en el caso de una molécula móvil-, o bien, gira sobre sí mismo si se trata de un portador fijo; cuando vuelve a combinarse con un ion sodio que difunde al interior de la célula, recoge otra molécula de azúcar o aminoácido y se repite el ciclo.



Diferentes modelos acerca del modo en que las sustancias atraviesan las membranas celulares. A) El transporte acoplado permite el desplazamiento de dos sustancias diferentes en direcciones opuestas. B) Los transportadores móviles llevan sustratos en cualquier dirección. C) Los sustratos son movilizados en una sola dirección por los portadores fijos. D) Difusión. E) Transporte en masa.

Se han propuesto diversas sustancias como portadores móviles pero actualmente se sabe que suelen ser proteínas muy específicas respecto al sustrato. El transporte mediante portadores depende de energía metabólica, la que se obtiene por acoplamiento enzimático de las proteínas portadoras con fosfatos de alta energía. El sistema portador resulta ser bastante complejo formado hasta por tres componentes proteicos en algunos casos, como se encontró en la proteína donadora de energía, llamada HPr, relacionada con el transporte de distintos azúcares. Algunos portadores son constitutivos ya que existen en las células de manera permanente pero también pueden ser inducidos por exposición al sustrato, como ocurre en los microorganismos.

Los portadores fijos, como las enzimas denominadas 'permeasas', se localizan en la membrana plasmática de distintas células donde se encuentran fijados o al menos íntimamente asociados con la membrana; aunque es más factible lo primero puesto que cada mecanismo de transporte específico es uni-

direccional, efectuándose el transporte de sustancias a través de la membrana en sólo una dirección.

Obviamente se requiere que el sistema de portadores fijos esté acoplado con donadores de energía puesto que las proteínas involucradas no tienen actividad de ATP-asa. Se ha postulado la existencia de permeasas para diversos sustratos y *E. coli* probablemente posee de 30 a 60 sistemas de este tipo, como el empleado para el transporte de la lactosa; en las células animales y vegetales también existen proteínas portadoras similares. Pero independientemente de que el transporte activo se realice por un portador fijo o uno móvil se establece una competencia entre varios sustratos por el transporte, como ocurre durante la absorción selectiva de los aminoácidos. Además de las proteínas de la membrana, los fosfolípidos también están involucrados en algunos tipos de transporte activo.

La permeabilidad de las membranas celulares también está bajo control hormonal; por ejemplo, la insulina secretada por el páncreas facilita la absorción de la glucosa y otros monosacáridos, de ácidos grasos y aminoácidos. La aldosterona regula el transporte de sodio y potasio en los riñones, glándulas de la sal y otros tejidos implicados en la absorción o excreción de tales iones; en tanto que la vasopresina (factor antidiurético) promueve la reabsorción de iones y agua de la orina de los animales superiores.

Transporte en masa.

Las células también poseen mecanismos que favorecen el transporte activo y pasivo de líquidos y sólidos cuyo tamaño les impide pasar a través de la membrana plasmática. Este transporte en masa implica los mismos cambios en el comportamiento de las membranas y se distinguen tres procesos fundamentales, pinocitosis, fagocitosis y exocitosis (3,6).

PINOCITOSIS. Implica la ingestión celular de materiales líquidos, iniciándose cuando son adsorbidas determinadas moléculas en lugares específicos de enlace situados en el exterior de la membrana plasmática. La adsorción de los materiales disueltos induce la invaginación de la membrana en ese punto para englobarlos, pudiendo formar las células un gran número de invaginaciones (canales pinocíticos) en cada lugar de enlace que esté ocupado. Los canales se dilatan hacia dentro formando vesículas pinocíticas cerradas (pinosomas) que pasan al interior del citoplasma con su contenido.

La pinocitosis puede ser inducida por los aminoácidos, proteínas y algunas sales pero no por carbohidratos o ácidos nucleicos. Entre las proteínas inductoras más eficaces en *Amoeba* están la albúmina, beta-lactoglobulina, ribonucleasa y lisozima. Los iones de las sales deben tener carga positiva para provocar la pinocitosis, de manera que los cationes resultan más eficaces que los aniones; por ejemplo, las sales de sodio, potasio y magnesio inducen más fácilmente el fenómeno que el calcio. El mecanismo pinocítico es especialmente importante para la absorción intestinal de lípidos, proteínas y gluconoproteínas a través de los vasos capilares.

FAGOCITOSIS. Se inicia cuando el material que induce la invaginación de la membrana está en forma de partículas, cerrándose la invaginación una vez que el objeto está completamente rodeado por la membrana plasmática para producir una vacuola libre o vesícula fagocítica en la que tiene lugar la digestión. Pueden formarse un gran número de vacuolas en el citoplasma lo que representa un incremento en la superficie de la membrana celular.

La fagocitosis es una etapa importante de la digestión en los protozoarios pero en la mayor parte de los animales representa, principalmente, un mecanismo de defensa contra organismos invasores como las bacterias. Aunque las células fagocíticas de los animales, los fagocitos, también pueden eliminar los restos celulares en tejidos enfermos o dañados, además de sustancias extrañas. Los fagocitos poseen lipasas y proteasas que les permite digerir lípidos y proteínas, así como lisozima con la que destruyen las paredes celulares de las bacterias.

EXOCITOSIS. Involucra la expulsión de sustancias de la célula más que la toma de materiales, siendo la secreción el proceso de exocitosis más distribuido.

Las células secretoras deben liberar grandes cantidades de macromoléculas como proenzimas, hormonas, lípidos, leche y otras, que pueden secretarse ni por diálisis ni por mecanismos usuales de transporte activo. Tales sustancias son sintetizadas y retenidas dentro de las células hasta que es estimulada su liberación por acción nerviosa u hormonal; por ejemplo, el flujo de saliva obedece estímulos nerviosos en tanto que la secreción y salida de la leche está controlada por las hormonas prolactina y oxitocina.

Se conocen tres clases de procesos secretores en las células glandulares de los mamíferos denominados merocrino, apocrino y holocrino. La secreción merocrina no implica una ruptura visible de la membrana celular, siendo la mayoría de las glándulas exocrinas y endocrinas secretoras merocrinas. La membrana plasmática de la superficie de salida resulta muy dañada, debiendo regenerarse, durante la secreción apocrina que realiza la liberación de grandes cantidades de materiales de peso molecular elevado. Cuando la célula acumula sus secreciones y es necesario que la membrana se rompa, destruyendo la célula, para liberar los productos ocurre secreción holocrina.

2. Vías Metabólicas.

a) Metabolismo. Comprende el conjunto de procesos por medio de los cuales la célula intercambia materia y energía con el medio circundante, siendo cuatro las finalidades básicas de este intercambio (6,7).

1) Obtener energía química para las funciones celulares, a partir de las sustancias nutritivas o bien, de la luz solar. 2) Convertir los componentes nutritivos en compuestos más simples que sirvan como precursores de los componentes celulares. 3) Reunir los precursores para formar

ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y proteínas, así como otros compuestos requeridos por la célula. 4) Formar y degradar las sustancias empleadas en funciones celulares especializadas.

La conversión de los nutrientes en sustancias más simples se realiza a través del metabolismo desasimilador o catabolismo. Durante los distintos procesos catabólicos ocurre la degradación enzimática (principalmente por reacciones de oxidación) de los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, procedentes del exterior o de las reservas alimenticias, que son transformados en moléculas más sencillas que incluyen CO₂, agua, ácido láctico, ácido acético, amoníaco y compuestos nitrogenados de desecho. La degradación de las moléculas nutritivas va acompañada de la liberación de energía, que se recupera y almacena en forma de los enlaces fosfato del ATP y otros compuestos de alta energía. El metabolismo asimilador o anabolismo, a su vez, incluye los procesos (generalmente por reacciones reductoras) que dan como resultado la síntesis enzimática de componentes celulares a partir de los precursores respectivos, obteniéndose la energía requerida en la biosíntesis celular de los enlaces fosfato del ATP.

Los intermediarios químicos formados en el catabolismo y anabolismo se denominan metabolitos, en tanto que la serie de reacciones en las cuales intervienen se conoce como el metabolismo intermediario. Asociado a cada una de las reacciones químicas del metabolismo intermediario tiene lugar un cambio de energía característico llamado acoplamiento energético.

Las etapas del metabolismo.

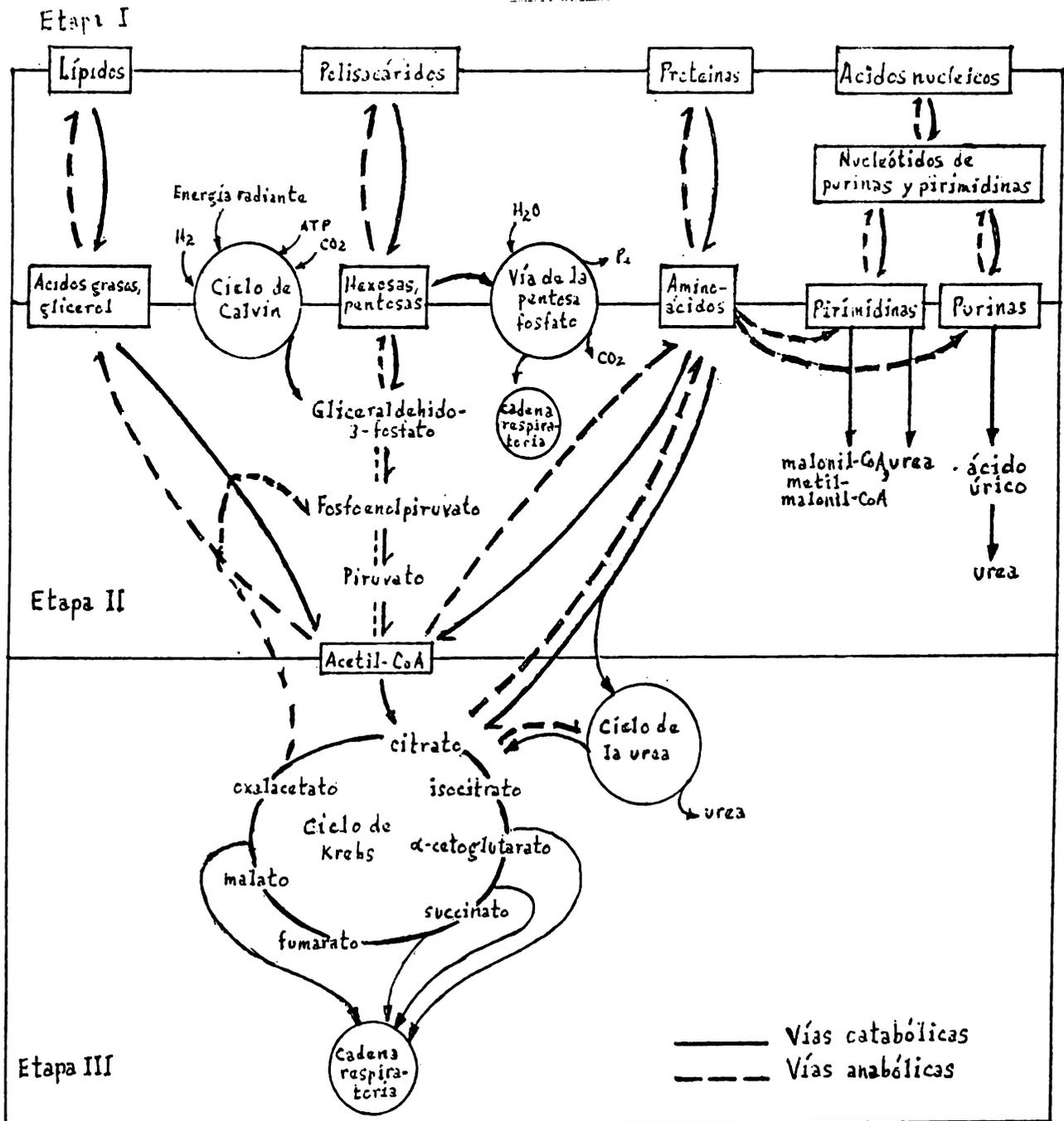
El catabolismo y anabolismo son dos procesos simultáneos e interdependientes que pueden estudiarse por separado, estando constituido cada uno de ellos por secuencias de reacciones enzimáticas mediante las cuales se degrada o sintetiza la estructura covalente de los metabolitos.

Para su estudio, el catabolismo o degradación enzimática de las sustancias nutritivas puede dividirse en tres etapas. En la primera, las macromoléculas alimenticias son degradadas hasta sus componentes básicos, los polisacáridos a pentosas y hexosas, los lípidos a glicerol y ácidos grasos, las proteínas a sus veinte aminoácidos constituyentes, los ácidos nucleicos a nucleótidos, y éstos últimos a bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) y pentosa fosfatos.

A continuación, los productos formados en la primera etapa son convertidos en un conjunto reducido de moléculas más sencillas, las hexosas, pentosas y glicerol son degradados hasta gliceraldehido-3-fosfato y después, hasta un compuesto de dos átomos de carbono, el grupo acetilo del acetil-CoA. Los distintos aminoácidos también son transformados en unos pocos productos finales: acetil-CoA, alfa-cetoglutarato, succinato, fumarato y oxalacetato; en tanto que las purinas son degradadas a ácido úrico y las pirimidinas a urea y otros productos. Por último, los productos de este evento pasan a una tercera etapa común donde son oxidados a CO₂ y agua.

A su vez, la síntesis de los componentes celulares o anabolismo también tiene lugar en tres etapas, iniciándose en los pequeños precursores formados durante la tercera etapa del catabolismo.

Por tanto, aunque las secuencias del catabolismo y anabolismo no son las mismas, la tercera etapa constituye una ruta común para ambos procesos y recibe el nombre de senda anfibólica. Esta ruta puede emplearse indistintamente para la degradación de las pequeñas moléculas de la segunda etapa catabólica, o bien, para aportar los precursores requeridos en la segunda etapa del anabolismo.



Las tres etapas del catabolismo y el anabolismo. La etapa III es anfibólica y sirve lo mismo para degradar los nutrientes que para proporcionar los precursores del anabolismo.

3. Regulación Metabólica.

Una de las características sobresalientes en los distintos organismos es su funcionamiento ordenado y altamente integrado, lo cual indica que las células poseen mecanismos para coordinar los procesos catabólicos y anabólicos. Siendo la reacción catalizada enzimáticamente la unidad funcional del metabolismo, resulta claro que el control de esta unidad permite la regulación del metabolismo celular.

La regulación de las vías metabólicas en las células de los organismos procariotas y eucariotas puede ejercerse a distintos niveles de complejidad creciente (4,5,7).

a) Compartimentación enzimática. Una primera forma de regular los procesos metabólicos en las células consiste en la segregación, o separación física, de los diferentes sistemas enzimáticos, o sea, a través de la compartimentación (7,19).

En los procariotas, como las bacterias, existe una organización estructural del metabolismo bastante simple pero que permite el funcionamiento normal de las principales vías metabólicas, como ocurre en la membrana celular donde se localizan las enzimas de la respiración, fosforilación y biosintéticas; o bien, en el citoplasma que contiene varias enzimas importantes.

La separación física y funcional de los procesos metabólicos en los eucariotas se efectúa a distintos niveles, más refinados y con fines específicos. Un primer nivel de compartimentación funcional consiste en la utilización de organelos con membranas (núcleo, mitocondrias, cloroplastos, lisosomas, peroxisomas, vacuolas) y capaces de realizar funciones altamente especializadas. En ausencia de organelos, la separación funcional se logra por medio de complejos multienzimáticos estables que ofrecen una serie de ventajas cinéticas y químicas durante los procesos metabólicos. Pero en ambos casos, la compartimentación de los sistemas enzimáticos permite controlar e integrar el total de las actividades celulares.

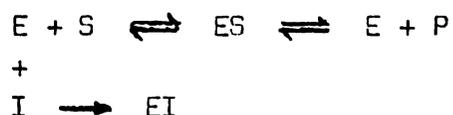
b) Inhibición enzimática. El segundo mecanismo general de regulación metabólica comprende el control de las propiedades intrínsecas de las enzimas, esto es, de sus actividades catalíticas (8,12,13,20,21).

Se sabe que ciertos compuestos pueden combinarse de manera reversible u irreversible con las enzimas bloqueando su actividad catalítica; tales sustancias, que incluyen drogas, antibióticos, venenos, antimetabolitos o productos de las reacciones enzimáticas, reciben el nombre de inhibidores.

Inhibición irreversible.

El inhibidor de la acción enzimática se une covalentemente a un sitio específico de la enzima, que puede ser el sitio activo o alguno muy cercano a él, formando un derivado estable cuya concentración aumenta en proporción a la del inhibidor; esto trae como resultado una disminución en la veloci-

dad de la reacción involucrada y finalmente, la inhibición irreversible.



El diisopropil-fluorofosfato (DFP) se une covalentemente al grupo hidroxilo de la serina presente en el sitio activo de algunas enzimas como la acetilcolinesterasa, quimotripsina y otras,

formando un éster fosfórico estable, con lo cual resulta inhibida la reacción catalizada por tales enzimas.

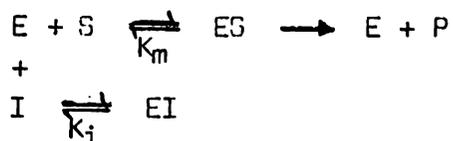
Los agentes alquilantes, como la yodoacetamida ($\text{ICH}_2\text{CONH}_2$), también pueden formar derivados covalentes estables con ciertas enzimas inhibiendo su actividad catalítica; como ocurre cuando tal sustancia se une al grupo $-\text{SH}$ de la triosafosfato-deshidrogenasa. En general, la inhibición irreversible produce la destrucción o modificación de uno o más grupos funcionales de las enzimas implicadas.

Inhibición reversible.

Si la unión del compuesto inhibidor y cierta enzima trae como resultado el establecimiento de un equilibrio entre el producto formado y los reactivos, se dice que la inhibición es reversible. Este tipo de inhibición es importante en la regulación celular debido a que los equilibrios establecidos permiten controlar la concentración intracelular de los compuestos implicados, que a su vez, pueden servir como sustratos para otras enzimas.

Inhibición competitiva.

Ciertos compuestos que poseen alguna relación estructural, o ninguna, con el sustrato natural de una enzima también pueden combinarse reversiblemente a su sitio activo o cerca de él; de manera que en presencia de la enzima, se establece una competencia activa por el mismo sitio entre el sustrato y tales sustancias. La inhibición puede ser invertida aumentando la concentración del sustrato.

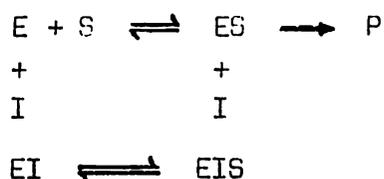


La succinato-deshidrogenasa cataliza la oxidación del succinato hacia fumarato pero puede ser inhibida por el malonato y otros ácidos dicarboxílicos,

cuya estructura es similar a del sustrato natural, que no son deshidrogenados por la enzima. Sin embargo, la inhibición puede ser invertida aumentando la concentración del succinato.

Inhibición no competitiva.

En caso de que el inhibidor de una enzima se una reversiblemente en un sitio distinto del sitio activo, o de unión del sustrato, la inhibición ya no puede ser invertida mediante un simple incremento en la concentración del sustrato, con lo cual la enzima resulta inhibida no competitivamente. Los inhibidores no competitivos se combinan con la enzima libre, con el complejo ES o con ambos, pero en todos los casos, los productos formados son inactivos.



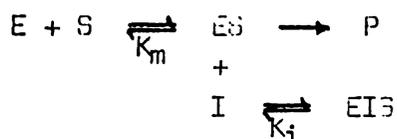
Los iones metálicos pesados inhiben la actividad catalítica de algunas enzimas combinándose con los grupos -SH, de los restos de cisteína, esenciales para tales enzimas.



Mientras que las enzimas que requieren iones metálicos para su actividad resultan inhibidas por compuestos que se unen al metal, por ejemplo, el ion CN inhibe a las enzimas que dependen del Fe^{2+} ó Fe^{3+} . En tanto que el EDTA se une reversiblemente con el Mg^{2+} y otros cationes divalentes, inhibiendo a las enzimas que utilizan tales iones.

Inhibición incompetitiva.

Otras sustancias se combinan únicamente con el complejo ES pero no con la enzima libre, de manera que esta última resulta inhibida incompetitivamente.

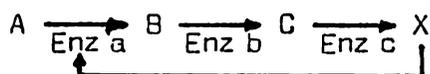


Resulta claro que la inhibición incompetitiva no puede ser invertida por altas concentraciones del sustrato.

Retroinhibición.

Existen numerosos sistemas enzimáticos que poseen la capacidad de autoregular su velocidad global de reacción. En estos sistemas el producto de una secuencia lineal de reacciones puede inhibir directamente a alguna de las enzimas que participan en la vía, con lo cual resulta que la velocidad de toda la secuencia se halla determinada por la concentración de tal producto. Este tipo de inhibición recibe el nombre de retroinhibición cuando el inhibidor es el producto final de la secuencia.

Si en los sistemas autorregulables la primera enzima de la secuencia es la que resulta inhibida por el producto final se trata de una enzima reguladora o alostérica, en tanto que el inhibidor es un efector o modulador. Si este último es un inhibidor se trata de un efector o modulador negativo pero también existen moduladores positivos específicos que, comunmente, son los propios sustratos de las enzimas. Usualmente los inhibidores no guardan ninguna relación estructural con el sustrato de la enzima a la cual regulan, y la inhibición cesa cuando disminuye la concentración del modulador.



Las enzimas reguladoras son oligoméricas y se les denomina monovalentes cuando sólo poseen un modulador, o

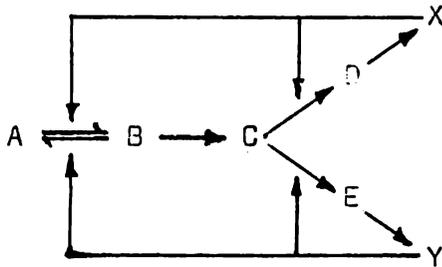
bien, polivalentes cuando responden a más de una sustancia moduladora; lo cual indica que esta clase de enzimas poseen sitios catalíticos y reguladores separados.

El control de la primera enzima de una secuencia lineal de reacciones es un mecanismo de retroinhibición bastante simple, sin embargo, la regula

ción de las vías ramificadas requiere de algunas modificaciones a este esquema. Puesto que la primera etapa de la vía ramificada es común a todos los productos finales, la retroinhibición ejercida por cualquiera de ellos interferiría con la formación de los demás; para evitar esta situación las células han desarrollado diferentes mecanismos de control.

Control por isoenzimas.

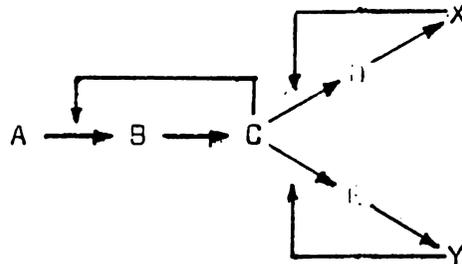
La regulación de una vía ramificada puede ejercerse mediante la elaboración de formas múltiples de una enzima capaces de catalizar la misma reacción pero que son inhibidas por distintos productos finales de la secuencia.



Un ejemplo muy conocido de este tipo de control lo constituye la familia del ácido aspártico en E. coli, donde tres aspartoquinasas isofuncionales son reguladas de manera independiente por la lisina, treonina y metionina. La síntesis de los aminoácidos aromáticos en E. coli y B. subtilis también se halla bajo control de isoenzimas.

Retroinhibición secuencial.

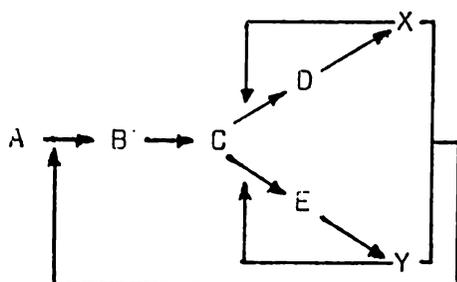
En este mecanismo, el primer paso de la secuencia es catalizado por una sola enzima que no es regulada por ninguno de los productos finales de la vía; pero como cada uno de los productos finales inhibe a la enzima que los sintetiza a partir del precursor común, éste se acumula en el medio e inhibe a la primera enzima de la secuencia.



La biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en B. subtilis constituye un ejemplo de regulación secuencial, así como la síntesis de treonina e isoleucina en Rhodopseudomonas capsulatus.

Retroinhibición concertada.

La enzima que cataliza la primera reacción de la vía no es inhibida por ninguno de los productos finales solos pero cuando todos se hallan presentes en exceso, actúan de manera conjunta para inhibir su actividad. En adición, cada producto final regula de manera independiente a la enzima que lo sintetiza



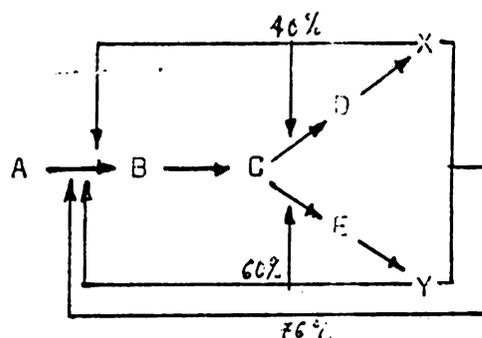
La aspartoquinasa en Rhodopseudomonas capsulatus y Bacillus polymyxa re

sulta inhibida por la treonina y lisina cuando ambos aminoácidos se hallan presentes en exceso pero no cuando sólo actúa uno de ellos. En Salmonella typhimurium existe un mecanismo similar.

Retroinhibición acumulada.

En este caso cada producto final, en condiciones de saturación, sólo causa una inhibición parcial de la primera enzima, en tanto que si todos los productos finales se hallan presentes simultáneamente, se observa un efecto acumulado.

Por ejemplo, si en condiciones de saturación uno de los productos inhibe a la enzima de manera que su actividad residual sea de 60%, y si el otro inhibe en un 40%, la actividad residual será de un 0.6×0.4 ó 24% de la actividad total, con lo que la inhibición producida es de un 76%. Un ejemplo de esta inhibición se encuentra en la regulación de la glutamín-sintetasa de E. coli y diversos microorganismos.



c) Otras formas de regulación.

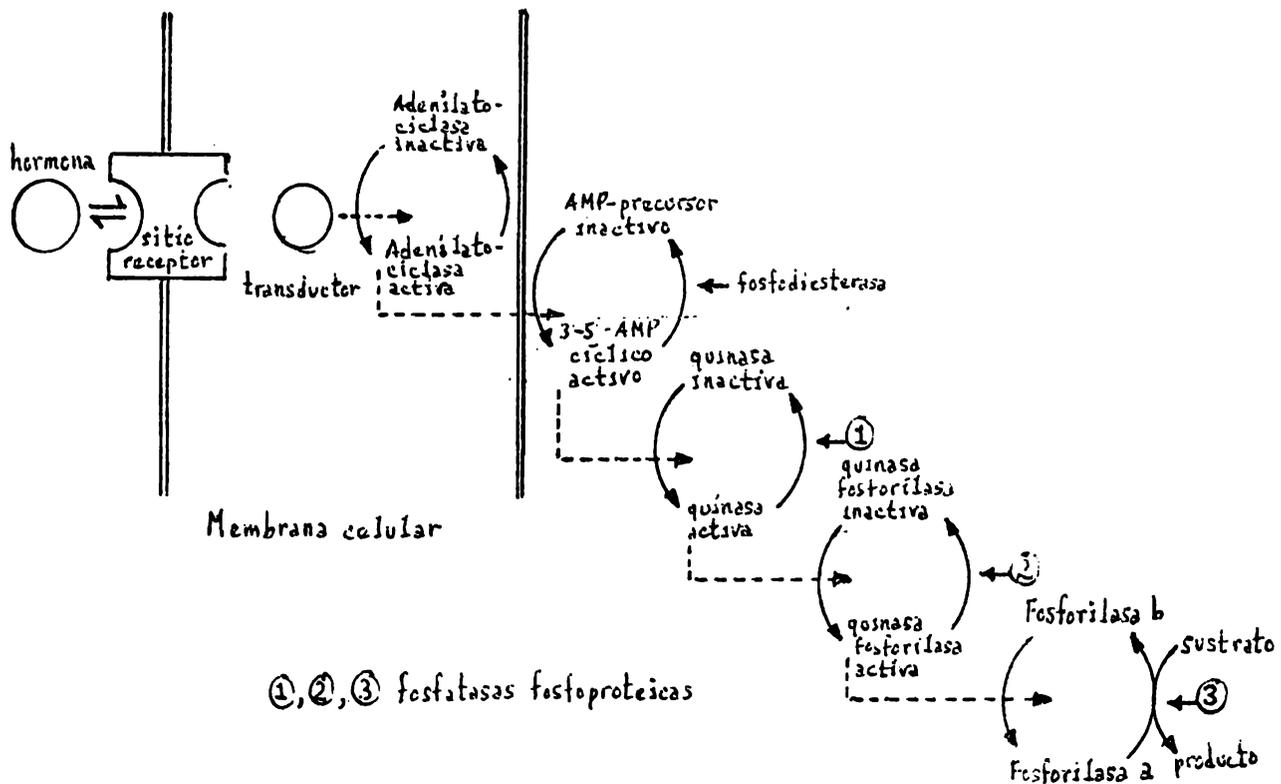
Modificación química.

El control alostérico de algunas enzimas importantes se halla reforzado por un segundo nivel de regulación, que implica la modificación covalente de las enzimas reguladoras. Esta modificación química ocurre cuando son adicionados o eliminados ciertos grupos funcionales específicos de las enzimas reguladoras, lo que produce además una serie de cambios en las estructuras primaria y terciaria de las moléculas proteicas (14).

La forma específica en que es convertida la enzima reguladora es estable y permanece en tal estado aun después de que el modulador ha sido eliminado del medio, por lo que es necesaria la acumulación del efector que promueve la modificación inversa para restaurar la actividad catalítica original. Las actividades de la fosforilasa, glucógeno sintetasa y piruvato-deshidrogenasa están controladas por la acción de quinasas específicas que catalizan la fosforilación de algunos residuos de serina en tales enzimas; la glutamín-sintetasa de E. coli se encuentra regulada por la adenililación de los residuos tirosínicos en cada subunidad de la enzima.

Sistemas en cascada.

El mecanismo básico de estos sistemas consiste en el acoplamiento de varias reacciones, donde la enzima que cataliza la primera reacción es activada de alguna manera para que actúe sobre otra enzima, la que a su vez puede activar a otra, con lo que el resultado final consiste en una amplificación de la primera señal a través de una cascada de reacciones.



Sistema en cascada para la conversión de la fosforilasa b en fosforilasa a. El primer mensajero es una hormona (adrenalina, glucagon, epinefrina), en tanto que el segundo mensajero es el AMP cíclico.

Un ejemplo de este tipo de control lo constituye la conversión de la fosforilasa b en fosforilasa a. La cascada de reacciones se inicia cuando la primera molécula mensajera, una hormona (glucagon, adrenalina, epinefrina), activa a la adenilato-ciclase para que sintetice un segundo mensajero, el AMP cíclico. Este compuesto se requiere para lograr la activación de una quinasa general, la que a su vez activa a una quinasa específica, siendo ésta última la que cataliza la fosforilación de la forma b de la fosforilasa hacia la forma a, (21,15,17,18).

d) Control de la síntesis enzimática. Los mecanismos utilizados por las células para regular las vías metabólicas son de dos tipos. En primer término, el control del metabolismo se logra a través de la regulación de la actividad enzimática, como ocurre en la interacción alostérica de los metabolitos y las enzimas reguladoras (retroinhibición), o bien, por modificación covalente promovida enzimáticamente (modificación química). En adición, las células poseen otra clase de mecanismos para lograr un control de la síntesis enzimática (5,7,8).

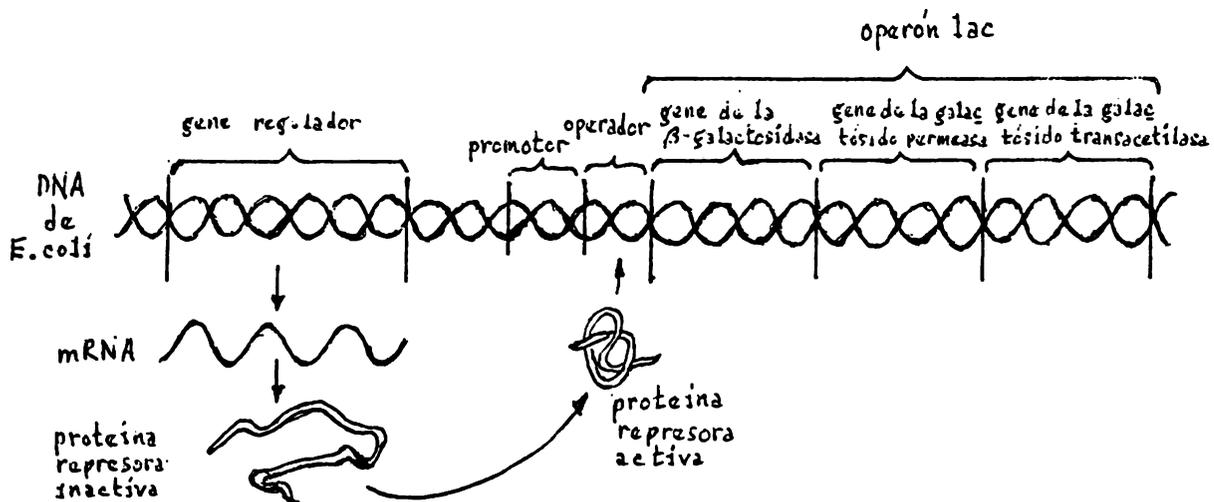
Uno de estos mecanismos es la represión, donde el producto final (corepresor) de una secuencia de reacciones no sólo inhibe la actividad de la primera enzima de la vía sino que, además, inhibe la síntesis de las enzimas requeridas para su propia biosíntesis. En tanto que en la inducción

el sustrato de una enzima puede, bajo ciertas condiciones, estimular la síntesis de dicha enzima. El sustrato recibe el nombre de inductor y la enzima cuya síntesis resulta estimulada es una enzima inducible.

Puesto que en la represión la célula disminuye o interrumpe la síntesis de un metabolito, este mecanismo se encuentra asociado con el anabolismo celular; mientras que el fenómeno de inducción, donde la célula emplea la enzima inducible para degradar al inductor, está relacionado con los procesos catabólicos.

El operón.

Como resultado de sus investigaciones con el sistema inducible de la beta-galactosidasa de E. coli, F. Jacob y J. Monod propusieron el modelo del Operón lac para tratar de explicar los fenómenos de represión e inducción. De acuerdo con tal modelo, los genes que especifican un sistema enzimático dado se expresarán espontáneamente a menos que se los prohíba la presencia de un represor, que puede definirse como cualquier sustancia que inhibe la síntesis de una enzima particular. En tanto que la función del inductor, de acuerdo con el mismo modelo, es la de interactuar con el represor para evitar su acción de manera que los genes se puedan expresar. Por lo que, según el mismo modelo, existen dos tipos principales de genes. Los que especifican la secuencia aminoácida de las proteínas celulares, el operón; y aquellos que controlan la actividad de los genes estructurales (el operón), los genes reguladores y operadores.

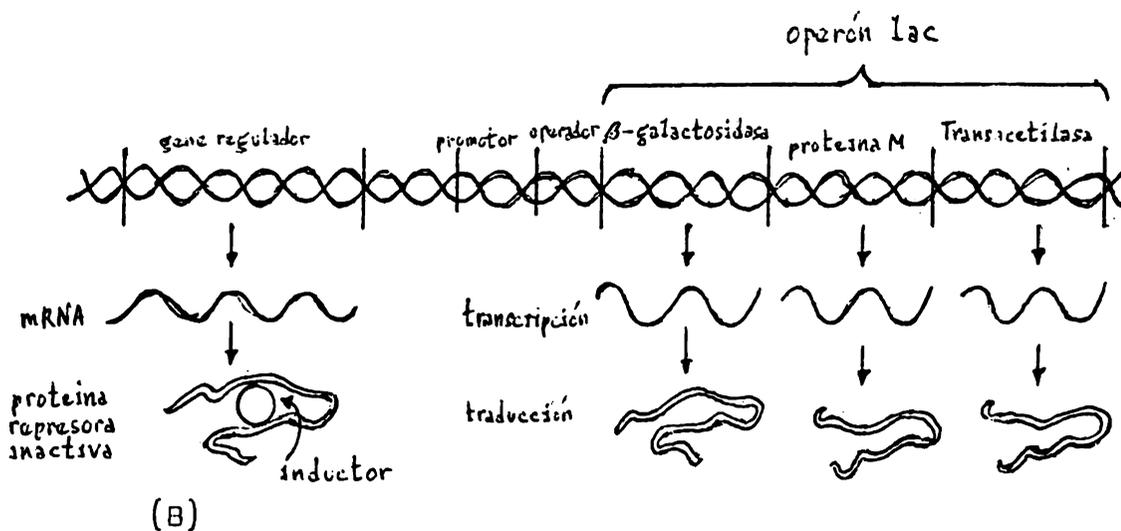
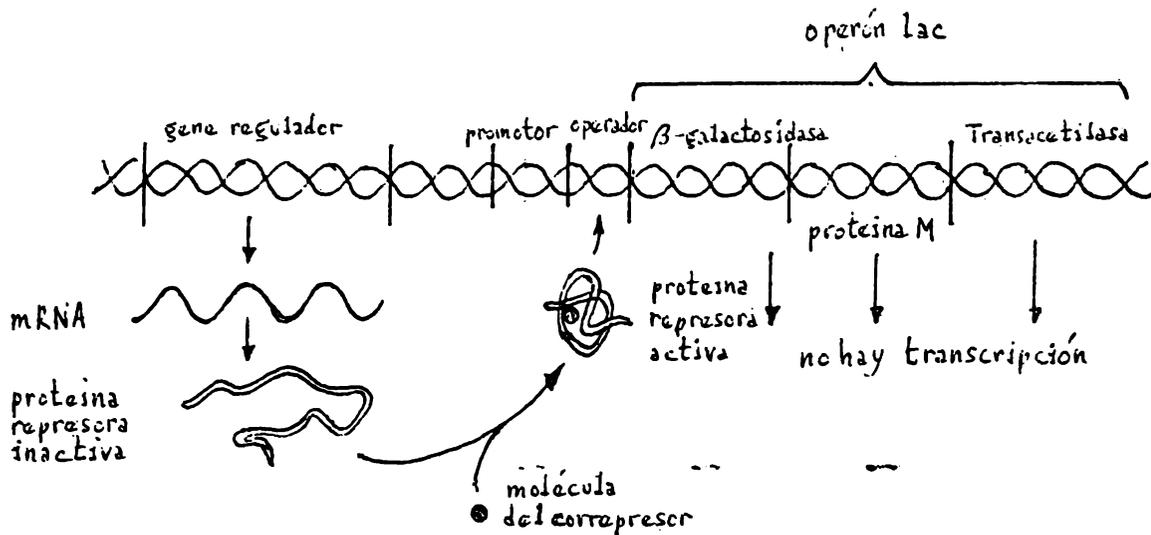


El Modelo del Operón lac de E. coli propuesto por Jacob y Monod. La expresión de los genes del operón lac es controlada por la proteína represora codificada por el gene regulador.

El operón lac de E. coli y su gene regulador comprenden cuatro regiones del DNA : 1) El gene regulador. 2) La región del promotor (P) compuesta de dos subregiones, la primera es llamada CAP y representa el sitio de unión de la proteína activadora del gene catabólico; la segunda subregión es el sitio de interacción de la RNA-polimerasa. 3) La región del gene operador (O), adyacente a la región promotora. 4) La región del operón lac que comprende los genes estructurales que codifican las tres enzimas inducibles, requeridas para la degradación de la lactosa.

El modelo del operón permite explicar con claridad los fenómenos de represión e inducción. Durante la represión enzimática la molécula represora, formada por la combinación de la proteína codificada por el gene regulador y una molécula pequeña (tal como el producto final de una vía metabólica) de correosor, se une en la región del operador e impide la transcripción de la información contenida en el operón. De manera que la sobreproducción del producto final de una vía metabólica conduce a la activación del represor y, consecuentemente, a una disminución en la síntesis de las enzimas de tal vía.

En presencia del inductor, la proteína represora no puede unirse con la región del operador, por lo que la RNA polimerasa se une a esta región e inicia la transcripción del operón lac. Las moléculas del mRNA sintetizado sirven, posteriormente, como patrones para sintetizar las tres proteínas codificadas por el operon lac.



(A) En ausencia del inductor la proteína represora inhibe la transcripción del operón lac. (B) Cuando está presente el inductor la proteína represora resulta inhibida, con lo cual tiene lugar la transcripción y traducción de la información contenida en el operón lac de E. coli.

El control del operón lac ejercido a través de la proteína represora es un control de tipo negativo, pero también puede ejercerse un control positivo mediante el fenómeno conocido como represión por catabolito. Este tipo de control se encuentra, por lo general, en enzimas que participan en procesos de utilización alterna de varias fuentes energéticas.

La adición de glucosa al medio de cultivo de E. coli detiene la síntesis de las enzimas utilizadas para degradar la lactosa, pero al agregar AMP cíclico se restablece tal síntesis. El AMP cíclico se une a la proteína CAP y ésta se asocia fuertemente con la región promotora, esto conduce a la desestabilización del DNA dúplex que forma un complejo abierto; después de lo cual, la RNA polimerasa se asocia fácilmente e inicia la transcripción del operón lac.

Las mutaciones en el gene regulador conducen a la síntesis de proteínas represoras inactivas, incapaces de unirse al sitio operador, siendo conocidos tales organismos mutantes con el nombre de mutantes constitutivos (I^+). Las enzimas sintetizadas por estos organismos se denominan enzimas constitutivas. También pueden ocurrir mutaciones en el gene operador, de manera que las proteínas represoras formadas tampoco pueden unirse a esta región, lo que conduce a la síntesis de enzimas constitutivas nuevamente. Estos son los llamados mutantes constitutivos del operador. En adición, se conoce otro tipo de mutantes cuyas proteínas represoras se unen firmemente al operador, pero debido a una mutación en el gene regulador que lleva a la pérdida del sitio de unión del inductor, éste último no puede unirse a tales proteínas. Estos son los mutantes superreprimidos.

Capítulo II

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

1. Fermentación Alcohólica.

a) Introducción. La historia de la fermentación alcohólica es una materia fascinante que despierta un profundo interés conforme se recorre el sendero que va desde los primeros estudios conocidos hasta llegar a la teoría actualmente aceptada para explicar esta vía metabólica.

Desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado el proceso que se conoce hoy en día con el nombre de "fermentación" (del latín *fervere*, hervir), por ejemplo, las tribus de nómadas deben haber sabido que bajo ciertas condiciones la leche se agriaba o se convertía en un material sólido, o semisólido, el queso. De igual forma, por siglos se ha estado fermentando el jugo de frutas para obtener bebidas alcohólicas.

A fines del siglo XVIII fue cuando comenzaron a desarrollarse los concimientos propiamente químicos acerca de la fermentación, pues antes de que Antoine Laurent Lavoisier iniciara sus estudios en este campo en 1784, se sabía muy poco sobre la naturaleza de este proceso. Se creía en esta época que para que ocurriera la fermentación sólo se requería la presencia de un material azucarado y un "fermento"; suponiéndose que el dióxido de carbono y el alcohol formados durante el proceso se originaban por colisiones rápidas entre las moléculas de azúcar, lo que conducía a la literación de ciertas partes esenciales que al combinarse daban lugar a los productos finales. Fue Lavoisier, en 1789, quien hizo el primer análisis químico dellado de los cambios que ocurren durante la fermentación alcohólica. Al determinar el contenido de carbono, hidrógeno y oxígeno en el material de partida para la fermentación (azúcar) y en los productos finales (alcohol, dióxido de carbono, ácido acético), Lavoisier encontró que existía una relación cuantitativa entre la cantidad de azúcar utilizada y la cantidad de productos formados. Este descubrimiento, que la fermentación podía explicarse cuantitativamente de manera similar a otras reacciones químicas, fue el punto de partida de numerosas investigaciones cuya finalidad era la de tratar de explicar el modo en que podría ocurrir esta transformación.

En este mismo periodo se consideraba que las levaduras no eran organismos vivos sino simples compuestos orgánicos. En 1803, L.J. Thénard observó que al terminar la fermentación las levaduras perdían peso y que eran incapaces de efectuar alguna acción posterior; en tanto que Joseph Louis Gay-Lussac (1810) trabajando con jugo de uva en conserva demostró que la fermentación sólo ocurría en presencia del aire. Como resultado de estudios microscópicos en las levaduras, durante los cuales se observó la reproducción y otras propiedades celulares, F. Kützing (1837) y C. Cagniard-Latour (1838) llegaron a la conclusión de que las levaduras (los llamados "fermentos") eran en realidad seres vivos, atribuyendo la fermentación alcohólica a la actividad vital de estos organismos. Theodor Schwann (1837) hizo observaciones similares que confirmaron que las levaduras son organismos vivos.

La teoría de que las levaduras tienen las propiedades de la materia viva fue rechazada por algunos de los químicos eminentes de la época, como Friedrich Wöhler (1839), Jöns Jakob Berzelius (1839) y Justus von Liebig (1839), quienes creían que la fermentación era un fenómeno puramente químico. Esto motivó una serie de debates sobre la posible relación entre las reacciones químicas y los seres vivos, surgiendo dos escuelas de pensamiento. La primera sostenía la teoría de Liebig, según la cual, la fermentación era provocada por una sustancia altamente inestable y sin vida, la que al descomponerse impartía su inestabilidad a las moléculas de azúcar; terminando la fermentación al concluir la descomposición de tal sustancia. La otra escuela sostenía que la fermentación del azúcar era realizada por organismos vivos.

Los clásicos estudios de Louis Pasteur realizados en el periodo de 1857 a 1875 permitieron dar fin a esta controversia. Pasteur demostró que la fermentación alcohólica no depende del oxígeno atmosférico, es decir, que se trata de un proceso anaerobio, pero sí es necesaria la participación de organismos vivos. En otras palabras, Pasteur reconoció claramente que las células vivas emplean el oxígeno para crecer y funcionar normalmente, pero que además, poseen la capacidad de obtener energía de la glucosa degradándola en condiciones anaerobias tal como ocurre en la fermentación; la cual puede considerarse como "la vie sans air" (la vida sin aire). En adición, los estudios de Pasteur mostraron que la fermentación no sólo produce alcohol y dióxido de carbono sino también otras sustancias como los ácidos láctico, succínico, butírico, así como glicerol.

Durante sus trabajos con las células de levadura Pasteur se interesó también en estudiar el origen de la vida. J.J. Berzelius creía en la teoría de la generación espontánea según la cual la vida podía surgir espontáneamente a partir de la materia inerte, tal como lo había propuesto Aristóteles varios siglos atrás. Esta creencia estaba en contra de las conclusiones obtenidas por Lazzaro Spallanzani (1768) quien calentando caldos vegetales en frascos de vidrio sellados no detectó ningún signo de vida después de transcurridos varios días. Sin embargo, los vitalistas, como E.H. Haeckel, sostenían que al calentar el aire existente sobre el caldo vegetal Spallanzani había destruido algún principio vital, sin el cual no podían desarrollarse los microorganismos; una opinión que también había sostenido John Needham con anterioridad (1748). Esta objeción resultó muy difícil de superar, de manera que la controversia continuó durante varios años. En 1860 Pasteur pudo, finalmente, descartar la teoría de la generación espontánea; utilizando su famoso experimento de los "matraces con cuello de cisne" Pasteur demostró que la vida sólo puede surgir en la materia inerte por contaminación con los microorganismos presentes en el medio ambiente.

En los años siguientes surgió una controversia acerca de la necesidad absoluta de un organismo vivo para que se realice la fermentación. J.J. Berzelius sugirió un proceso catalítico (enzimático) para explicar este fenómeno; en tanto que M. Traube (1877) sostenía que cierta clase de sustancias químicas, como las enzimas, formadas en el interior de las células vivas eran las verdaderas responsables de la fermentación. Aunque no se ofrecieron pruebas experimentales para apoyar estas aseveraciones, varios

investigadores estaban a favor de esta hipótesis.

b) El descubrimiento de la "fermentación sin células". Hans Buchner (1892), uno de los pioneros en el campo de la inmunología, sostenía la creencia de que las toxinas y antitoxinas se originaban en el protoplasma bacteriano, siendo este concepto erróneo el que condujo al descubrimiento de la "fermentación sin células".

Para tratar de aislar las proteínas bacterianas Hans Buchner recurrió a su hermano Eduard, que era un químico, para que la ayudase en el desarrollo de un método adecuado; después de analizar el problema, ambos concluyeron que las células bacterianas tenían que ser "abiertas" utilizando medios mecánicos. Habiendo trabajado con anterioridad en la fermentación, Eduard Buchner decidió emplear células de levadura como material de partida en sus intentos por "abrir" las células; observando durante el curso de estos experimentos que las levaduras y otros microorganismos podían molerse fácilmente con arena fina, con la ayuda de un mortero.

En 1894, Hans Buchner fue enviado a Munich para impartir la cátedra de Higiene, volviendo a su intento por aislar las proteínas bacterianas en 1896. Por sugerencia suya uno de sus asistentes, M. Hahn, comprimió en una prensa hidráulica la masa resultante de la molienda de levaduras y arena, obteniendo un "jugo de levaduras" libre de células; quedando retenidos los fragmentos celulares en el kieselguhr adicionado a la masa de compresión. En esta época continuaba la discusión sobre el papel que juega la vida en la fermentación alcohólica. Varios investigadores, como Schwann y otros, habían aislado "fermentos" demostrando que podían trabajar en un tubo de ensayo tal como los reactivos químicos ordinarios; sin embargo, los vitalistas argumentaban que tales "fermentos" (enzimas), como la pepsina de Schwann, participaban en procesos que tienen lugar fuera de las células como es el caso de la digestión. En adición, los vitalistas sostenían que los procesos que ocurren dentro de las células, como la fermentación, eran inseparables de la vida y que no podían efectuarse en sistemas compuestos por materiales inertes. W. Kühne había sugerido en 1876 el nombre especial de "enzimas" (del griego: en la levadura) para los fermentos encontrados fuera de las células, como la tripsina descubierta por él o la pepsina descubierta por T. Schwann (1837).

En 1896, Eduard Buchner llegó a Munich procedente de Tübingen, donde era profesor, para pasar aquí sus vacaciones. Al continuar las investigaciones iniciadas por M. Hahn, Eduard Buchner se preguntó si sería posible demostrar experimentalmente que la fermentación alcohólica es inseparable de la vida. Para hacer su demostración decidió triturar células de levadura con arena hasta que todas estuvieran muertas, pensando que al utilizarlas en la fermentación se detendría la producción de alcohol. Con objeto de prever la contaminación bacteriana del jugo de levaduras adicionó glucosa al 40%, cuyo efecto preservativo era bien conocido, para su sorpresa comenzaron a desprenderse burbujas de dióxido de carbono. Buchner tuvo que admitir que el jugo de levaduras, completamente muerto, fermentaba rápidamente la glucosa para formar alcohol y dióxido de carbono, exactamente como

lo hacen las células vivas. Hans Buchner sugirió que esta fermentación se debía a la presencia de fragmentos celulares; aunque el fenómeno también se presentaba en los extractos tratados con antisépticos.

Después de someter los extractos celulares a tratamientos como la filtración, evaporación, precipitación con alcohol o adición de antisépticos (cloroformo, benceno, arsenato de sodio), Hans y Eduard Buchner encontraron los extractos aún mantenían su actividad; además de que podían fermentar otros azúcares como maltosa y sacarosa. El descubrimiento de la "fermentación sin células" vino a derrumbar el último baluarte de los vitalistas, pues pudo verse con claridad que los procesos químicos que ocurren en el interior de las células no se efectúan con la ayuda de una "fuerza vital" sino que se realizan en presencia de "fermentos" asociados con los procesos celulares.

En la primavera de 1897, Eduard Buchner publicó su descubrimiento el cual motivó el interés de los lectores, puesto que afirmaba en él que la "fermentación sin células" era producida por una "enzima" intracelular soluble a la que denominó "zimasa". Sin embargo, pronto hubo objeciones de parte de varios investigadores que no pudieron repetir los experimentos; en tanto que los fabricantes de cerveza argumentaron que la existencia de la "zimasa" estaba "en completa contradicción con la teoría de Pasteur". Paradójicamente, el apoyo más activo para la "zimasa" vino de los discípulos de Pasteur, como E. Duclaux director del Instituto Pasteur, quien recibió el descubrimiento con entusiasmo. En 1907, Eduard Buchner recibió el Premio Nobel de Química, estableciéndose en Würzburg en 1911; permaneció en este lugar hasta que fue herido mortalmente en 1917, durante la Primera Guerra Mundial.

El descubrimiento de la "fermentación sin células" abrió nuevos caminos para la investigación, contribuyendo al desarrollo de uno de los conceptos más importantes de la bioquímica: la teoría enzimática del metabolismo. Además, inició una ruptura con el pasado permitiendo aproximarse al conocimiento del todo biológico a través del estudio de sus componentes celulares.

c) La "coenzima" de la fermentación alcohólica. Se había observado durante las investigaciones con levaduras que éstas perdían su poder fermentativo después de un periodo prolongado de almacenamiento, atribuyéndose este hecho a la acción de enzimas proteolíticas que actuarían sobre la "zimasa" disminuyendo su actividad.

En 1903, Arthur Harden descubrió que en presencia de suero las levaduras aumentaban notablemente su capacidad de fermentación, concluyendo que este incremento era consecuencia de una inhibición de las enzimas proteolíticas. Una manera de inhibir la actividad de las enzimas proteolíticas consiste en ponerlas en presencia de sus productos de hidrólisis (los aminoácidos), así que para probar su hipótesis Harden adicionó jugos de levaduras autofermentados (hervidos y filtrados previamente) a las mezclas fermentables. Efectivamente los jugos con autólisis incrementaron la fermentación pero Harden y W. Young (1904) encontraron que los jugos frescos y hervidos también producían el mismo efecto.

La inhibición de la proteasa por los aminoácidos evidentemente no era la causa del estímulo en la fermentación, por lo que Harden concluyó que debía ser un factor específico del jugo de levaduras el responsable del aumento en la actividad de la "zimasa". Harden y Young lograron aislar tal factor en 1904, reportando sus resultados durante el Congreso celebrado por la Sociedad Fisiológica en ese año. Los investigadores señalaron que la "coenzima" de la fermentación alcohólica era una sustancia estable al calor, dializable, precipitable con alcohol y absolutamente necesaria para la actividad de la "zimasa". Al publicar un trabajo más detallado sobre la "coenzima" en 1906, Harden y Young indicaron que el fosfato también ejercía un efecto estimulante en la fermentación, confirmando observaciones previas de Eduard Buchner (1903).

d) La esterificación de fosfato y la ecuación de Harden y Young.

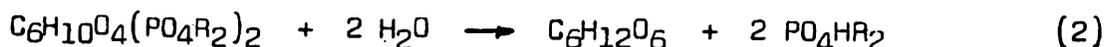
Durante sus estudios sobre la fermentación Arthur Harden y W. Young (1905-1906) descubrieron que el fosfato inorgánico adicionado al jugo de levaduras desaparecía rápidamente, siendo reemplazado por una forma que no era precipitable con citrato de magnesio. De acuerdo con los ensayos preliminares, consideraron que tal sustancia podría ser un éster fosfórico de glucosa (el éster de Harden y Young).

En 1905, apareció un escrito de L. Ivanov en el que señalaba que las levaduras vivas convertían el fosfato inorgánico en derivados orgánicos celulares; confirmando este investigador en 1906, que el fosfato inorgánico adicionado al jugo de levaduras se convertía en una forma orgánica no precipitable con acetato de uranilo. Ivanov fue el primero en aislar este compuesto, en forma de la sal de cobre, asignándole la fórmula empírica $C_3H_5O_2PO_4H_2$ pero lo identificó erróneamente como un fosfato de triosa. En 1907, W. Young demostró que este compuesto era en realidad un fosfato de hexosa y pudo aislarlo en forma de la sal de cobre; posteriormente encontró que el llamado "éster de Harden y Young" era un difosfato de hexosa (1908-1911).

Habiendo observado que el fosfato inorgánico era consumido rápidamente al principio de la fermentación, y que por cada molécula utilizada se formaba una molécula de dióxido de carbono, Harden y Young (1908) propusieron una teoría para tratar de explicar este fenómeno. De acuerdo con tal teoría la incorporación del fosfato ocurría de la manera siguiente :



Al disminuir la velocidad de fermentación ocurría un rápido aumento en la cantidad de fosfato libre, el cual era liberado del fosfato de hexosa:



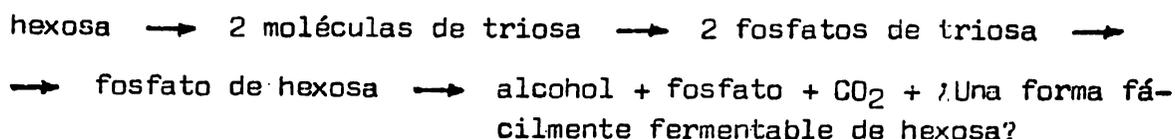
En este esquema, la incorporación del fosfato y la fermentación se presentan como dos eventos independientes pero acoplados. Puesto que Harden proponía que la fosforilación de una molécula de glucosa aportaba la fuerza requerida para degradar una segunda molécula de azúcar, la cual era fermentada produciendo dióxido de carbono y alcohol (reacción número 1). El fos

fato de hexosa sería hidrolizado posteriormente para liberar dos moléculas de fosfato que se utilizarían nuevamente (reacción número 2).

Además, Harden consideraba que los ésteres fosfóricos no eran intermedios en la fermentación sino que formaban parte de una reacción preparatoria inicial que permitía a la glucosa (el verdadero intermediario) entrar en la vía metabólica. Cuando recibió el Premio Nobel de Química en 1929, en una época en que era ampliamente reconocida la naturaleza intermediaria de los fosfatos de hexosa, Harden aún sostenía su opinión de que la fosforilación de una molécula de glucosa conducía a la fermentación de una segunda molécula no fosforilada. La teoría propuesta por Harden permaneció durante varios años como un obstáculo para la correcta interpretación del significado biológico de la fosforilación. Sin embargo, sus investigaciones fueron de gran valor ya que abrieron paso al método de la simplificación progresiva para el estudio del metabolismo celular.

e) Los intermediarios metabólicos y las primeras teorías sobre la fermentación alcohólica. Habiendo detectado con cierta frecuencia pequeñas cantidades de ácido láctico (0.2%) en las mezclas fermentables, Eduard Buchner y J. Meisenheimer (1904-1905) propusieron que tal compuesto podría ser un intermediario en la fermentación. De acuerdo con su hipótesis, en presencia de la "zimasa" las moléculas de azúcar serían convertidas en ácido láctico, siendo degradado éste último por una "lactacidasa" para formar alcohol y dióxido de carbono. Pero después de una serie de experimentos más detallados, en los cuales se evitó la contaminación bacteriana, Buchner y Meisenheimer (1906) llegaron a la conclusión de las levaduras vivas no producían ni fermentaban el ácido láctico. Por lo que A. Sator (1908) sugirió que probablemente este compuesto era un subproducto de la fermentación.

Al continuar la búsqueda de productos fermentables que pudieran servir como precursores del ácido láctico, Buchner y Meisenheimer (1909) consideraron al gliceraldehído y la dihidroxiacetona como posibles intermediarios en la conversión después de observar la gran fermentabilidad de estas sustancias, especialmente la dihidroxiacetona. Además, la simetría de la dihidroxiacetona permitía explicar porque se producía la forma racémica del ácido láctico en la fermentación sin células. En 1911, Alexander von Lebedev vió que durante la fermentación de la dihidroxiacetona se formaba el mismo fosfato de hexosa (éster de Harden y Young) presente en la degradación de la glucosa; basándose en este hecho propuso un esquema para la fermentación alcohólica en el cual intervenían los fosfatos de triosa como intermediarios :

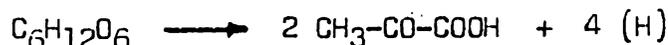


Estudiando la fermentación del gliceraldehído Lebedev (1912) concluyó que el fosfato no participaba en la degradación puesto que su concentración permanecía invariable durante tal evento, un hecho que también ocurría con el ácido glicérico. Como resultado de estas observaciones, Alexander von

Lebedev modificó el esquema para la fermentación alcohólica que había propuesto con anterioridad. En su nueva hipótesis consideró que la molécula de azúcar era escindida inicialmente para formar cantidades equivalentes de gliceraldehído y dihidroxiacetona, siendo degradada ésta última a través de las etapas postuladas en su primera teoría. Por su parte, el gliceraldehído sería transformado en ácido pirúvico y después en dióxido de carbono y acetaldehído, el que finalmente es reducido por el hidrógeno liberado junto con el ácido pirúvico, formando alcohol. De acuerdo con esto, la función del fosfato en la fermentación sería la de eliminar la dihidroxiacetona para evitar que ésta inhibiera la conversión posterior de más hexosa. Pero esta última consideración no concordaba con los resultados obtenidos por Harden y Young (1912) quienes habían mostrado que la fermentación alcohólica no es inhibida por la dihidroxiacetona.

Basándose en resultados obtenidos por él mismo, en los trabajos de Lebedev y en observaciones previas de varios investigadores, en 1912 Serguei Kostychev propuso un nuevo esquema para la fermentación alcohólica que comprendía tres etapas :

(1) Producción de piruvato a partir de las hexosas, con eliminación simultánea de hidrógeno,



(2) Descomposición del ácido pirúvico en presencia de la carboxilasa para formar dióxido de carbono y acetaldehído,



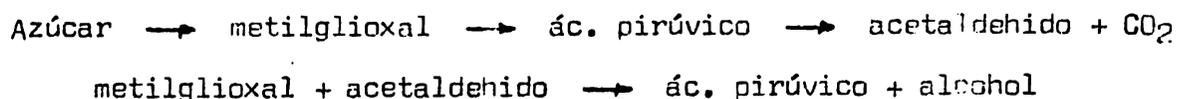
(3) Reducción del acetaldehído por el hidrógeno liberado en la primera etapa para producir alcohol etílico,



Serguei Kostychev (1912) comprobó experimentalmente la participación del acetaldehído en la fermentación al descubrir que en presencia de $ZnCl_2$ se acumulaban cantidades significativas de este compuesto, mientras que esto no ocurría en condiciones normales; en estudios posteriores Kostychev confirmó plenamente la formación intermedia del acetaldehído (S. Kostychev y A. Scheloumoff, 1913; S. Kostychev, 1914). Finalmente, Carl Neuberg y colaboradores aportaron pruebas concluyentes en este sentido al lograr el aislamiento del acetaldehído en forma del derivado bisulfítico (C. Neuberg y J. Kerb, 1914; C. Neuberg y J. Hirsch, 1919; C. Neuberg y E. Reinfurth, 1919 y 1920). Por otra parte, la fermentación del ácido pirúvico era conocida desde 1911, cuando O. Neubauer y H. Wastenson demostraron que este compuesto era degradado fácilmente por las levaduras. En tanto que A. Fernbach y M. Schoen confirmaron la producción del ácido pirúvico a partir de las hexosas, aislándolo en forma de la sal de calcio (1913).

El concepto de una vía metabólica que involucraba al piruvato y acetaldehído como intermediarios en la fermentación se extendió rápidamente, viniendo a tener la aceptación general. Pero Carl Neuberg (1913), que aceptaba la existencia de este esquema, sostenía que también debía incluirse al metilglioxal como un intermediario entre la glucosa y el ácido pirúvico,

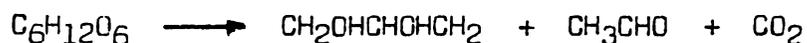
por lo que propuso el siguiente esquema para la fermentación alcohólica :



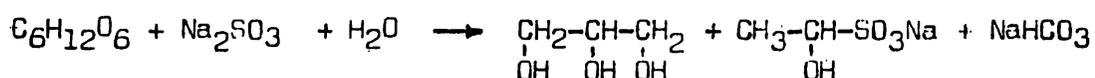
La teoría de Neuberg no hacía referencia a la intervención del fosfato en el curso normal de la fermentación, ya que él pensaba que la fosforilación solamente ocurría en los extractos de levaduras pero no en las células vivas, de acuerdo con la opinión de Harden y Young; esta teoría tuvo gran aceptación durante varios años.

f) Otros tipos de fermentación. De acuerdo con una clasificación hecha por Carl Neuberg, que consideraba la fermentación alcohólica como la primera forma de fermentación, se identificaron tres tipos más de fermentaciones.

La segunda forma de fermentación. W. Connstein y K. Lüdecke (1915-1919), así como C. Neuberg y E. Reinfurth (1918), observaron que cuando las levaduras fermentaban azúcares en presencia de sulfito de sodio disminuía la cantidad de alcohol, incrementándose la producción de acetaldehido y glic^ucerol. Investigaciones posteriores de C. Neuberg y E. Reinfurth (1919) re^uvelaron que no sólo se forman cantidades equivalentes de acetaldehido y glic^ucerol sino que tal relación se mantiene durante todo el proceso. De acuer^udo con Neuberg la fermentación puede escribirse de la manera siguiente :



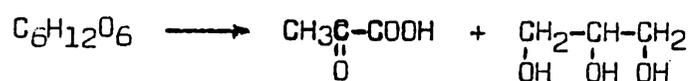
Incluyendo el sulfito de sodio la ecuación total es,



La tercera forma de fermentación. Carl Neuberg y colaboradores (1917-1920) investigaron en detalle los productos formados en el curso de la fer^umentación de los azúcares en presencia de álcalis. Según Neuberg, el ace^utaldehido formado en estas condiciones no es reducido hacia etanol sino que experimenta una dismutación para rendir cantidades equivalentes de alcohol y ácido acético :



La cuarta forma de fermentación. En 1930, Carl Neuberg, M. Kobel y M. Scheuer reportaron la existencia de otro tipo de fermentación en el cual se forman cantidades equivalentes de ácido pirúvico y glicerol a partir de la glucosa :



En investigaciones paralelas, y en estudios posteriores, se identifica^uron otros tipos de fermentación en los distintos microorganismos.

2. Glucólisis.

a) Las investigaciones iniciales. En 1859, E. du Bois Reymond pudo detectar que en condiciones de fatiga muscular y en el estado de rigor mortis se producía cierta cantidad de ácido láctico. Considerando el posible origen del ácido láctico, Liebig, Bernard y el propio du Bois, pensaron que tal vez podría derivar del glucógeno muscular. La producción de ácido láctico en las condiciones estudiadas por du Bois fue confirmada por W.M. Fletcher y F.G. Hopkins (1907) mediante cuidadosos experimentos cuantitativos; en tanto que Jacob Parnas y R. Wagner, adoptando los mismos cuidados en la manipulación de los tejidos, mostraron que el ácido láctico efectivamente provenía del glucógeno (1914).

Una vez que se aceptó la noción de que en varios órganos y tejidos los carbohidratos pueden ser degradados produciendo ácido láctico, Gustav Embden y colaboradores (1912) trataron de reproducir experimentalmente esta conversión para lo cual recurrieron al empleo de carbohidratos adicionados a jugos obtenidos de músculo prensado; una técnica inspirada en el éxito logrado por Eduard Buchner con el jugo de levaduras. Así que después de moler músculos de perro, la masa resultante se mezcló con kieselguhr para comprimirla en una prensa hidráulica, obteniéndose un jugo muscular sin células. Al adicionar bicarbonato de sodio para tamponar la solución Embden notó un incremento en la producción de ácido láctico, en tanto que la glucosa o el glucógeno no produjeron ningún efecto; esto sugirió a los investigadores que el jugo muscular contenía un precursor desconocido del ácido láctico al que llamaron "lactacidógeno". Se pensaba en esta época que el fosfato debía estar muy relacionado con la producción de ácido láctico porque en condiciones de fatiga muscular aumentaba la excreción urinaria de tal compuesto inorgánico; al estudiar esta relación, Embden y colaboradores (1914) detectaron en varias instancias la producción de cantidades equivalentes de ácido láctico y fosfato. Basados en este hecho, los investigadores concluyeron que el "lactacidógeno" no sólo era precursor del ácido láctico muscular sino que también el fosfato derivaba de él; para determinar la naturaleza de este precursor se ensayaron varios fosfatos orgánicos (ácido ribonucleico, fitina, ácido inosínico), obteniéndose resultados negativos en todos los casos.

La formación de cantidades equimoleculares de fosfato y ácido láctico puede interpretarse como una relación 1:1 de fosfato/unidad C_3 , similar a la que existe (2 fosfatos/2 unidades C_3) en el difosfato de hexosa descubierto por Harden y Young; adicionando éste último compuesto al jugo muscular se incrementó la cantidad de fosfato y ácido láctico, por lo que Embden consideró que su "lactacidógeno" estaba relacionado químicamente con el difosfato de hexosa. Al preparar una osazona idéntica con la obtenida del difosfato de hexosa de las levaduras, Embden (1924) concluyó que el "lactacidógeno" y el éster de Harden y Young eran en realidad un mismo compuesto. Puesto que incubando músculos desmenuzados en presencia de glucógeno ocurría la formación de ácido láctico en cantidades equivalentes al polisacárido utilizado, Embden postuló que el precursor metabólico de su "lactacidógeno" era precisamente el glucógeno (1926).

Aunque la teoría del "lactacidógeno" de Embden nació en el concepto erróneo de que el fosfato es producido simultáneamente con el ácido láctico, sus investigaciones aportaron las primeras evidencias acerca de la similitud entre las reacciones que ocurren en las células animales y las que se efectúan en las levaduras, mostrando que el difosfato de hexosa de la fermentación alcohólica podía ser utilizado por los extractos musculares.

b) La glucólisis en el músculo. Otro argumento convincente a favor de la existencia de reacciones e intermediarios comunes en las células animales y de levaduras fue aportado por los trabajos de Otto Meyerhof.

Moliendo músculo esquelético de rana con agua (o soluciones isotónicas de KCl) a -1 ó -2 °C, Otto Meyerhof (1926) logró obtener extractos musculares sin células con los que procedió a realizar una serie de estudios. En sus primeras investigaciones Meyerhof halló que la adición de fosfato a extractos musculares incubados con bicarbonato era seguida por la degradación total del glucógeno presente en solución; el ácido láctico también podía formarse empleando otros polisacáridos como almidón, amilopectina, amilosa, dihexosano y trihexosano. Continuando con sus trabajos, Meyerhof vió que los extractos hervidos de músculo fresco contenían una sustancia desconocida, "la miozimasas", que podía reemplazar a la "cozimasas" en la fermentación alcohólica; agregando esta "coenzimasas" a los extractos musculares "envejecidos" era posible restaurar la actividad glucolítica.

En otra serie de estudios con extractos de levaduras maceradas, o levaduras sometidas a plasmolisis, Meyerhof (1927) descubrió que además de la cozimasas los extractos contenían otra sustancia, que al ser adicionada a los extractos musculares les permitía degradar las hexosas fermentables con el doble de rapidez que al glucógeno. A este activador o enzimasas se le dió el nombre de "hexoquinasa". Estos trabajos de Meyerhof, mostrando que la misma "coenzimasas" era activa tanto en la fermentación alcohólica como en la glucólisis del músculo, enfatizaron la similitud existente entre ambos procesos.

c) El ATP y el descubrimiento de los "enlaces de alta energía".

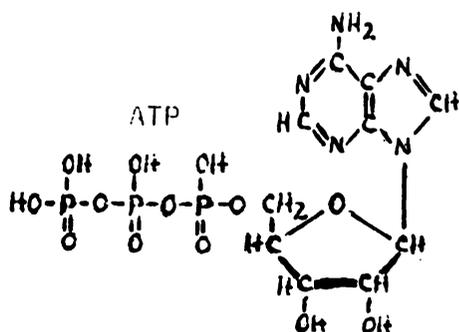
Otra de las aportaciones importantes de Gustav Embden fue su descubrimiento de que en los músculos se forman fosfatos de adenosina. En 1927, Embden y M. Zimmermann detectaron la presencia de un monofosfato de hexosa y un compuesto de purina desconocido; después de separar ésta última sustancia con sales de plomo, los investigadores eliminaron el fosfato adicionando sales de bario para extraer con acetona la solución resultante, logrando obtener finalmente el compuesto en forma cristalina. Las pruebas químicas preliminares indicaron que esta sustancia se hallaba muy relacionada con el ácido adenílico encontrado en las levaduras. Después de estudios más detallados Gustav Embden y G. Schmidt (1929) confirmaron la similitud de las dos sustancias.

En investigaciones contemporáneas, Jacob Karol Parnas (1929) mostró que el 96% de la purina muscular se hallaba presente en forma de nucleótidos extraíbles y que sólo el 4% estaba constituido por ácidos nucleicos.

Además, Parnas descubrió que la purina total del músculo que originalmente se encontraba en una proporción de 82% de adenina y 18% de hipoxantina, se modificaba después de dos minutos de una lesión muscular para rendir un 23% de adenina y 77% de hipoxantina. Aislando una porción de estos nucleótidos, Parnas vió que en el estado inmediato al fallecimiento y en la fatiga muscular, el ácido adenílico era convertido en ácido inosínico.

Habiéndose demostrado la presencia del ácido adenílico en los extractos musculares; en 1928 Karl Lohmann decidió estudiar más detalladamente los ésteres fosfóricos del músculo; para lograrlo, Lohmann introdujo un nuevo método de análisis basado en determinar las velocidades de hidrólisis de tales ésteres, en soluciones normales de ácido clorhídrico y temperaturas de 100°C. Empleando este método, Lohmann pudo detectar la presencia de un éster fosfórico con una constante de hidrólisis de 250×10^{-3} , el cual resultó ser un pirofosfato. Al estimular el músculo hacia un estado de fatiga o rigidez disminuyó la cantidad de pirofosfato, aumentando la producción de ortofosfato.

Karl Lohmann (1928) procedió a aislar el pirofosfato haciendo uso del método de incubación desarrollado por Embden en sus estudios del "lactacidoγόeno"; de inmediato, Lohmann descubrió que este pirofosfato y el ácido adenílico aislado por Embden y Zimmermann eran artificios resultantes del método de extracción con soluciones alcalinas de bario o calcio, que producían condiciones hidrolizantes. En 1929, en el XIII Congreso Internacional de Fisiología Karl Lohmann reportó el aislamiento de un nuevo compuesto que podía escindirse produciendo una molécula de ácido adenílico (AMP) y una molécula de pirofosfato (PP_i), este compuesto se conoció más tarde como el ácido adenosín-trifosfórico ó ATP. Sin embargo, el descubrimiento de Lohmann no produjo ninguna reacción importante en los medios científicos de la época.



Como lo hizo notar Karl Lohmann en 1931, el ATP es necesario para la actividad glucolítica en los extractos musculares pero no se halla presente en los extractos que han experimentado autólisis; sin embargo, la adición de ATP restaura la actividad de éstos últimos.

La importancia del ATP como un constituyente celular sólo se apreció a fines de los años treinta, principalmente como resultado de la publicación de varios trabajos de Lohmann, quien descifró la estructura química del ADP y ATP en el periodo de 1932 a 1935.

En 1927, P. Eggleton y G.P. Eggleton habían descubierto que la denominada "fracción de fosfato inorgánico" de los primeros investigadores era en realidad una mezcla de fosfato y un éster fosfórico muy lábil al que llamaron "fosfágeno". Esta sustancia fue aislada en forma de la sal de calcio por Cyrus H. Fiske y Yellapragada Subbarow (1927), quienes la identificaron como fosfato de creatina en 1929. Habiendo estudiado la distribución del

"fosfágeno" en los tejidos animales, P. Eggleton y G.P. Eggleton (1927) descubrieron que estaba presente en los músculos voluntarios de todos los vertebrados pero que no se encontraba en los invertebrados; en 1928, Otto Meyerhof y Karl Lohmann demostraron que en éstos últimos su lugar era ocupado por el fosfato de arginina.

Meyerhof y Lohmann (1927) procedieron a determinar el ΔH de hidrólisis del fosfato de creatina encontrando un valor de 150 cal/g ($\pm 14,800$ cal/mol) y para el fosfato de arginina obtuvieron un valor de 11,000-12,000 cal/mol (1928). Al continuar sus investigaciones Meyerhof y Lohmann (1932) señalaron que la producción de una molécula de ácido adenílico y dos de fosfato inorgánico, a partir del ATP, era una reacción exotérmica con un ΔH de -- 25,000 cal, o sea, 12,500 cal/mol.

Fue Lohmann (1934) el primero en reconocer la importancia de los "enlaces de alta energía" de los ésteres fosfóricos al sostener que podían ser utilizados en el metabolismo aportando la energía requerida en las reacciones biosintéticas pero sin producir calor. Además, Lohmann indicó que el enlace éster formado durante la esterificación del fosfato en la glucólisis puede ser convertido metabólicamente en un nuevo tipo de enlace, el "enlace fosfato de alta energía" del ATP, que permite acumular gran parte de la energía liberada en el catabolismo. En el periodo de 1935-1936, H. Lehmann descubrió que la hidrólisis de los fosfatos de creatina y arginina era una reacción sujeta a la ley de acción de masas; esta observación, unida a los resultados de Karl Lohmann, permitió deducir el mecanismo empleado en el músculo para aprovechar la energía acumulada en los "enlaces fosfato de alta energía" :



La llamada "reacción de Lohmann" tiene lugar en los extractos musculares en presencia del Mg^{2+} y es catalizada por la enzima fosfoguanidina-transfosforilasa.

d) El NAD y la "coenzima" de la fermentación alcohólica. Para tratar de establecer la naturaleza química de la "cozimasa" Hans von Euler -- (1927) procedió a realizar una serie de investigaciones con extractos de levadura, logrando aislar un producto activo, un mononucleótido semejante al ácido adenílico, al que identificó como la "coenzima de la fermentación alcohólica" (1934). Sin embargo, su proposición no coincidía con los resultados obtenidos por Karl Lohmann, quien había mostrado que el ATP es un constituyente de la coenzima de Harden pero no el ácido adenílico.

En el curso de sus investigaciones sobre las reacciones de deshidrogenación, Otto Heinrich Warburg y W. Christian (1935) encontraron que un cofermento aislado por ellos de los glóbulos rojos contenía nicotinamida; estudiando en detalle este compuesto determinaron que se hallaba formado de adenina, nicotinamida, pentosa y fosfato (1:1:2:3), originándose su actividad catalítica en una alternación de los estados de oxidación de la porción piridínica de la nicotinamida. A partir de este cofermento, Warburg y

Christian (1936) lograron separar otra sustancia que resultó ser muy similar a la "cozimasa" aislada por von Euler pero que contenía dos grupos fósforo por cada adenina, en vez de tres. Los investigadores denominaron a los dos compuestos el "trifosfopiridín-nucleótido" (TPN) y "difosfopiridín-nucleótido" (DPN), respectivamente.

Una vez que se estableció que estas dos sustancias eran los cofactores generales en las deshidrogenaciones, Hans von Euler (1936) sugirió que el compuesto difosfato (su "cozimasa") debía llamarse la "codeshidrogenasa I" y que el cofermento de Warburg sería la "codeshidrogenasa II". Durante cierto tiempo se emplearon las denominaciones "Cozimasa I" (la vieja cozimasa) y "Cozimasa II" (la nueva cozimasa), así como las abreviaturas DPN y TPN pero fueron reemplazados posteriormente por los términos NAD y NADP, una vez que se estudió en detalle su estructura química.

e) La Vía de Embden-Meyerhof para la Glucólisis. La identificación del ácido 3-fosfoglicérico en preparaciones de levadura tratadas con fluoruro, la acumulación de fructosa-difosfato y fosfatos de triosa en extractos musculares inhibidos con yodoacetato, entre otros descubrimientos importantes, fueron el punto de partida para una serie de investigaciones decisivas realizadas en la década de los años 1930, que culminaron con el establecimiento de un esquema de reacciones único para los procesos implicados en el metabolismo de carbohidratos y los que ocurren en el músculo durante la actividad del músculo en estado activo.

1937

(3)

1937

11

1937

1937

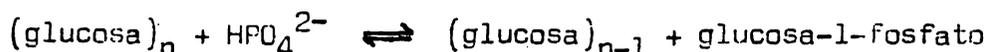
1937

11

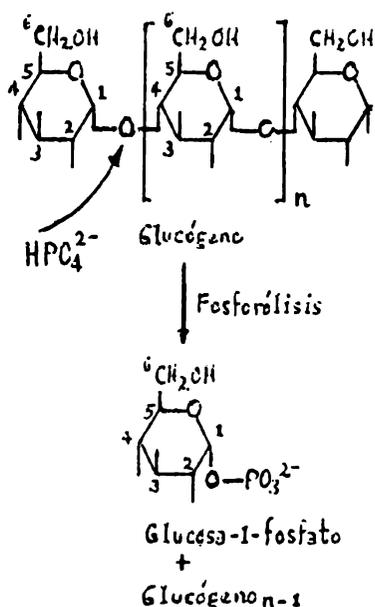
1937

Fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato.

Carl F. Cori y Gerty T. Cori, en 1936, observaron que en preparaciones de músculo desmenzado, que contenían ATP y un buffer isotónico de fosfato, la degradación del glucógeno conducía a la acumulación de un éster fosfórico desconocido; las propiedades químicas del compuesto sugirieron que podía tratarse de la glucosa-1-fosfato. El año siguiente, los Cori y S.P. Colowick (1937) confirmaron esta observación mostrando que el glucógeno era fosforilado en presencia de una enzima, a la que llamaron "fosforilasa", para producir unidades de glucosa-1-fosfato. Jacob K. Parnas (1937) señaló que la reacción entre el glucógeno y el fosfato no implicaba la participación del agua, proponiendo el nombre de "fosforólisis" para este proceso.



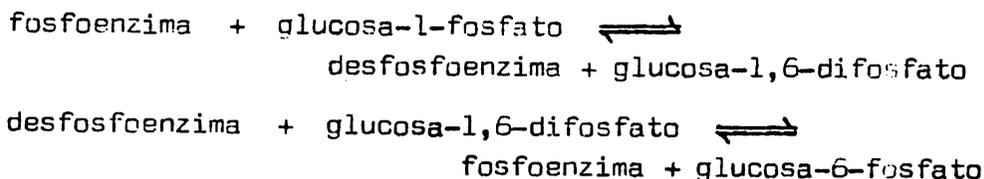
Actualmente se sabe que las unidades de D-glucosa del glucógeno penetran en la vía glucolítica por acción de dos enzimas. En primer término,



Fosforólisis del glucógeno por acción de la glucógeno-fosforilasa.

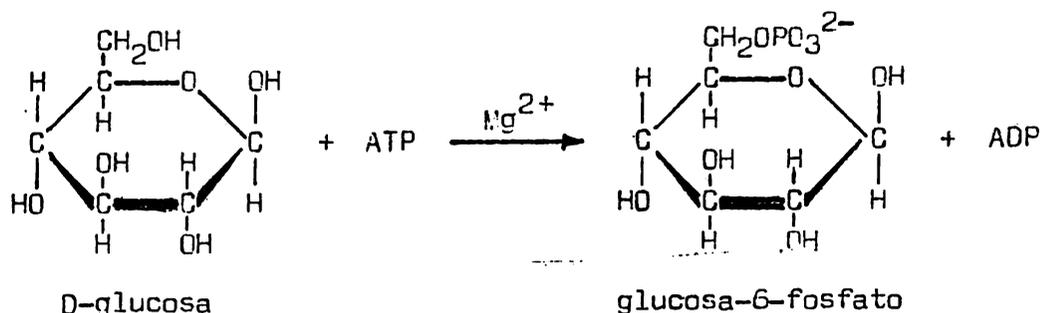
la glucógeno-fosforilasa cataliza la fosforilación del glucógeno para liberar unidades de glucosa-1-fosfato (A.A. Green y G.T. Cori, 1943; B.A. Illingworth y G.T. Cori, 1953; P.J. Keller y G.T. Cori, 1953 y 1955; C.F. Cori y B.A. Illingworth, 1957), mientras que en las plantas es la fosforilasa del almidón la que cataliza esta reacción (C.S. Hanes, 1940).

Para que la glucosa-1-fosfato ingrese a la senda glucolítica necesita ser convertida en glucosa-6-fosfato, lo cual se logra por acción de la enzima fosfoglucomutasa descubierta por los Cori en 1937. En esta transformación la forma fosforilada de la fosfoglucomutasa cede su grupo fosfato a la glucosa-1-fosfato para formar glucosa-1,6-difosfato; a continuación, la enzima sin fosforilar reacciona con éste último compuesto produciendo glucosa-6-fosfato (E.W. Sutherland et al., 1949; C.E. Cardini et al., 1949)

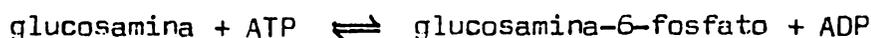
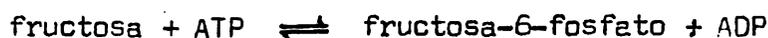


La fosfoglucomutasa requiere del Mg^{2+} , Mn^{2+} ó Co^{2+} y se ha obtenido de las levaduras y varios tejidos (G.T. Cori et al., 1938; V.A. Najjar, 1948; V.A. Najjar y M.E. Pullman, 1954). La glucosa-1,6-difosfato también puede formarse mediante fosforilación de la glucosa-1-fosfato por el ATP en presencia de la enzima fosfoglucoquinasa, aislada del músculo y las levaduras (A.C. Paladini et al., 1949).

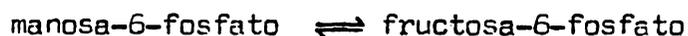
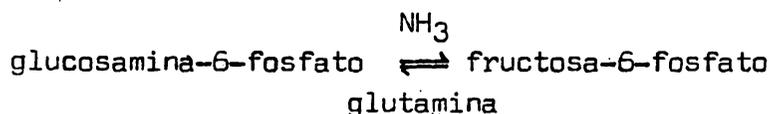
La glucosa-6-fosfato también puede formarse por fosforilación de la glucosa libre en presencia del ATP, la reacción es catalizada por la hexoquinasa, descubierta en extractos dializados de levadura por Otto Meyerhof en 1927.



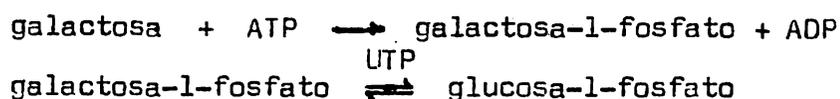
La hexoquinasa requiere del Mg^{2+} y es la enzima empleada normalmente en las células para fosforilar la glucosa libre (S.P. Colowick y H.M. Kalckar, 1943; L. Noda y S.A. Kuby, 1957). Además de la glucosa, la hexoquinasa también cataliza la fosforilación de otras hexosas como fructosa, manosa y glucosamina, rindiendo las correspondientes hexosas-6-fosfato (L. Berger et al., 1946; M. Kunitz y M.R. McDonald, 1946; J.L. Gamble Jr. y V.A. Najjar, 1954-1955; H. Boser, 1955).



La fructosa-6-fosfato es un intermediario de la glucólisis, en tanto que la manosa-6-fosfato no lo es por lo que debe ser convertida en un intermediario de la vía; esto se logra por acción de la fosfomanoisomerasa, aislada inicialmente de extractos musculares (M.W. Slein, 1950), que cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. La glucosamina-6-fosfato es desaminada enzimáticamente a fructosa-6-fosfato (D.G. Comb y S. Roseman, 1956; J.B. Wolfe et al., 1956).

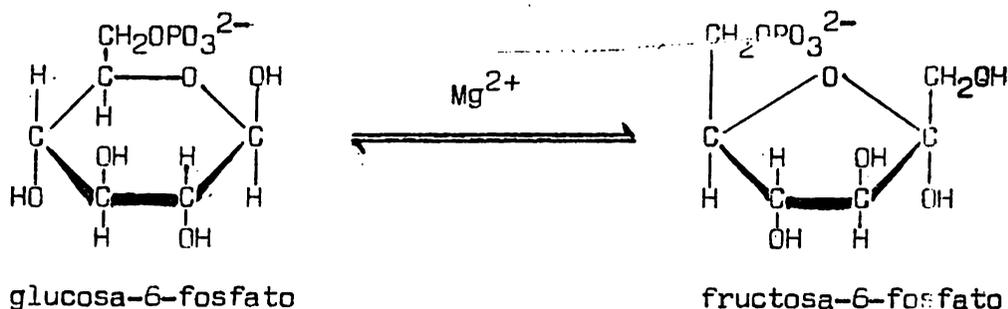


La galactosa es fosforilada por el ATP en reacción catalizada por la galactoquinasa, rindiendo galactosa-1-fosfato (R.E. Truco et al., 1948); a continuación la galactosa-1-fosfato es convertida en su epímero en el átomo C-4, la glucosa-1-fosfato, a través de una secuencia de reacciones reversibles que requieren del trifosfato de uridina (UTP) como cofactor (L.F. Leloir, 1953; E.S. Maxwell, 1956; H.M. Kalckar y E.S. Maxwell, 1956; H.M. Kalckar et al., 1956 y 1958).



Conversión de la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato.

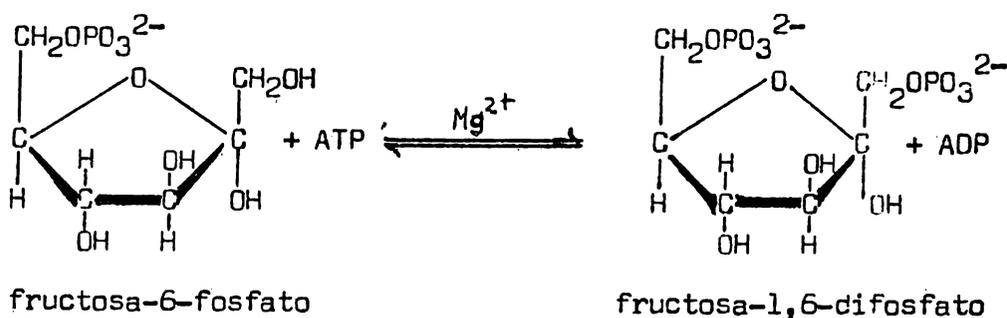
En el curso de sus investigaciones con extractos musculares Karl Lohmann (1933) identificó la presencia de una enzima, a la que llamó fosfohexoisomerasa, que catalizaba el establecimiento de un equilibrio entre la glucosa-6-fosfato y la fructosa-6-fosfato. Empleando extractos de levadura Otto Meyerhof (1934) concluyó que en la fermentación se formaba inicialmente la glucosa-6-fosfato, que a continuación era convertida por la fosfohexoisomerasa de Lohmann en fructosa-6-fosfato; posteriormente la enzima recibió el nombre de fosfoglucoisomerasa.



La fosfoglucoisomerasa requiere del Mg^{2+} ó Mn^{2+} y se ha obtenido de las levaduras, plantas y extractos musculares (C.S. Hanes, 1940; G.F. Somers y E.L. Cosby, 1945).

Fosforilación de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato

La segunda de las reacciones iniciales de la glucólisis, la conversión de fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-difosfato, fue descubierta inicialmente por H. von Euler y E. Adler (1935), así como por G. Lutwak-Mann y T. Mann (1935).

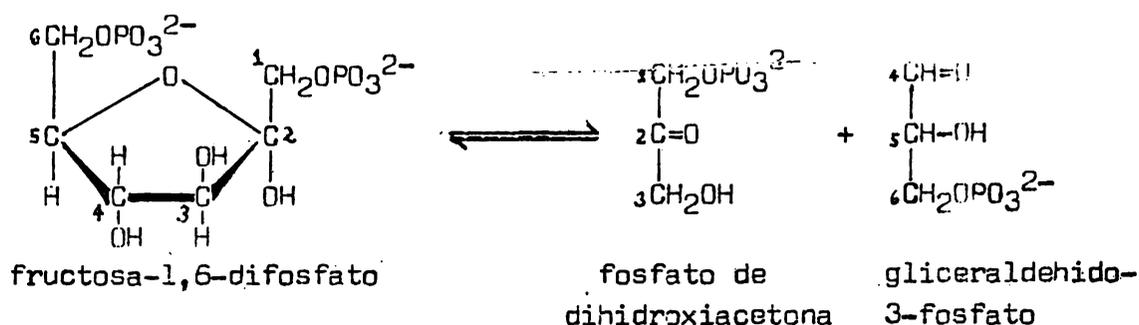


La reacción ocurre en presencia de la fosfofructoquinasa que transfiere el fosfato terminal del ATP a la fructosa-6-fosfato en presencia del Mg^{2+} (P. Ostern, J.A. Guthke y J. Terszakowec, 1936).

Escisión de la fructosa-1,6-difosfato a gliceraldehído-3-fosfato y fosfato de dihidroxiacetona.

En 1931, Ragnar Nilsson detectó que la adición de fluoruro a una mezcla de incubación formada por levadura seca, fructosa-difosfato y acetaldehído era seguida por la acumulación un ácido fosfoglicérico, al que se identificó como el ácido 3-fosfoglicérico. Gustav Embden y colaboradores (1932) descubrieron que este mismo compuesto se acumulaba en extractos musculares tratados con fluoruro. Estas observaciones dirigieron la atención hacia los eventos que pueden ocurrir en la conversión de la fructosa-difos-

fato al ácido 3-fosfoglicérico. Fue en 1933, cuando Gustav Embden, H.J. - Deuticke y G. Kraft publicaron su famoso trabajo en el que formularon el primer esquema coherente de los eventos que ocurren en las primeras etapas de la glucólisis. De acuerdo con Embden y colaboradores la fructosa-difosfato es un intermediario en la vía glucolítica, produciéndose cantidades equimoleculares de gliceraldehido-3-fosfato y fosfato de dihidroxiacetona como resultado de su escisión enzimática. El año siguiente Otto Meyerhof y Karl Lohmann (1934), empleando extractos musculares, confirmaron plenamente las conclusiones de Embden.



Meyerhof y Lohmann descubrieron que en los extractos dializados de músculo y de levaduras la fructosa-difosfato era escindida reversiblemente en presencia de una enzima, a la que llamaron "zimohexasa", para dar dos moléculas de triosa-fosfato. Dos años después, Meyerhof, Lohmann y P. Schuster (1936) mostraron que la triosa-fosfato era un mezcla de fosfato de dihidroxiacetona y gliceraldehido-3-fosfato; posteriormente, la "zimohexasa" recibió el nombre de aldolasa (O. Meyerhof y R. Junowicz-Kocholaty, 1942). La aldolasa se ha aislado del músculo y no requiere iones metálicos para desarrollar su actividad (T. Baranowski y T.R. Niederland, 1949; O. Meyerhof, 1951; G. Beisenherz et al., 1953).

En el curso de estas investigaciones Meyerhof y colaboradores detectaron que sólo el gliceraldehido-3-fosfato era degradado directamente por las reacciones posteriores de la glucólisis (O. Meyerhof y R. Junowicz-Kocholaty, 1942); en tanto que el fosfato de dihidroxiacetona puede convertirse reversiblemente en gliceraldehido-3-fosfato por acción de la triosafosfato-isomerasa (P. Desper y O. Meyerhof, 1950; E. Meyer-Arendt et al., 1953).



Con esta reacción termina la primera fase de la glucólisis, donde la molécula de glucosa ha sido preparada para la segunda fase mediante dos etapas de fosforilación seguidas de escisión.

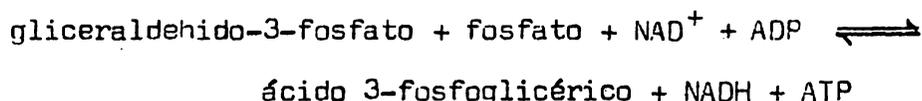
Segunda fase de la Glucólisis.

En esta fase ocurren las etapas de fosforilación y óxido-reducción mediante las cuales se genera el ATP.

Oxidación del gliceraldehido-3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato.

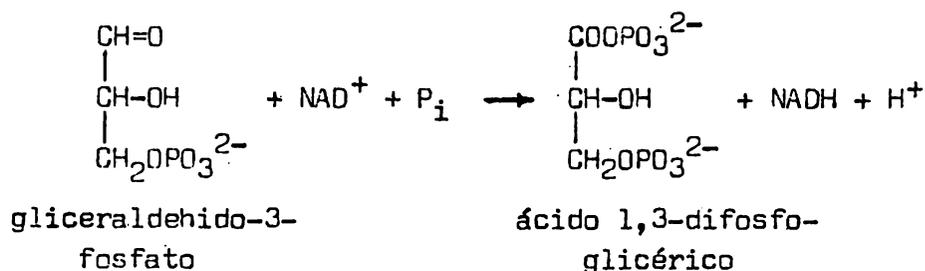
El destino inmediato del gliceraldehido-3-fosfato fue investigado por Dorothy M. Needham y R.K. Pillai (1937) quienes empleando extractos muscula

res observaron la acumulación de ácido fosfoglicérico y ATP después de adicionar gliceraldehído-3-fosfato; Otto Meyerhof y colaboradores (1937-38), de manera independiente, también estudiaron la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato en extractos musculares y de levadura, deduciendo una ecuación para esta conversión.



Meyerhof señaló que el primer paso de la fase de óxido-reducción comprendía la reducción del NAD^+ por el gliceraldehído-3-fosfato, y que esto era seguido por la producción de ATP a partir del ADP; aunque los investigadores no pudieron explicar el mecanismo de esta fosforilación.

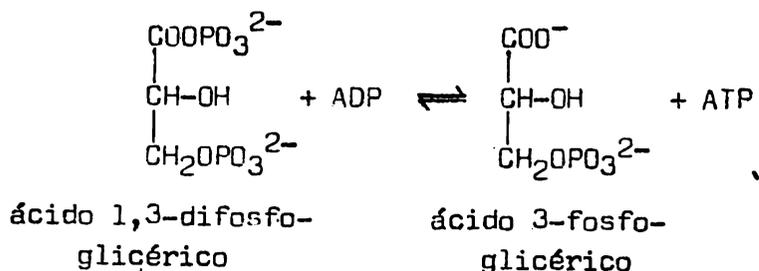
En un estudio más detallado de la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato E. Negelein y H. Brömel mostraron que este proceso tiene lugar en dos pasos. En el primero, el gliceraldehído-3-fosfato es oxidado por el NAD^+ , en presencia del fosfato, produciendo ácido 1,3-difosfoglicérico (1939).



Otto Warburg y W. Christian (1939) lograron aislar la enzima involucrada en esta oxidación, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, a partir de las levaduras. La enzima se ha obtenido del músculo (G.T. Cori et al., 1948; J.F. Taylor et al., 1948) y ha sido ampliamente estudiada (S.F. Velick y S. Udenfriend, 1953; S.F. Velick et al., 1953; J.B. Fox Jr. y W.B. Dandliker, 1956), al igual que el mecanismo implicado en la conversión (E. Racker e I. Krimsky, 1952; J. Harting y S.F. Velick, 1954; I. Krimsky y E. Racker, 1955; O. Warburg et al., 1957).

Transferencia de fosfato al ADP.

E. Negelein y H. Brömel (1939), así como O. Warburg y W. Christian (1939), mostraron que en el segundo paso de oxidación del gliceraldehído-3-fosfato el ácido 1,3-difosfoglicérico cede su grupo 1-fosfato al ADP, produciendo ácido 3-fosfoglicérico y ATP.

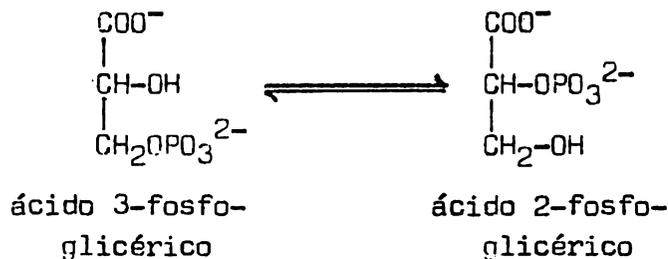


La reacción se efectúa en presencia de Mg^{2+} y es catalizada por la enzima fosfogliceratoquinasa aislada de las levaduras por Theodor Bücher (1942-47) y del músculo por G. Beisenherz et al. en 1953. Fritz Lipmann

(1941) y Hermann Moritz Kalckar (1941) fueron los primeros en reconocer que la energía liberada en la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato puede recuperarse en forma del enlace fosfato del ATP.

Del 3-fosfoglicerato al 2-fosfoglicerato.

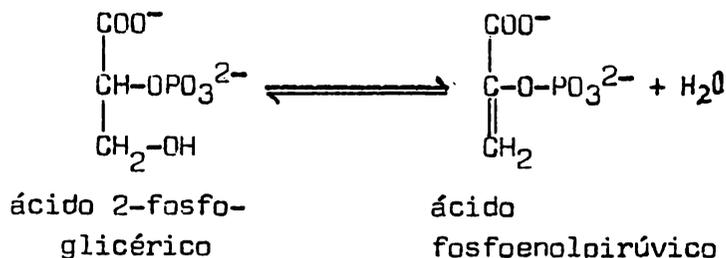
En investigaciones realizadas en el periodo de 1934-36, Otto Meyerhof, Karl Lohmann y W. Kiessling encontraron que al adicionar ácido 3-fosfoglicérico a extractos musculares o de levadura se producía un nuevo compuesto fosfato al que identificaron como el ácido fosfoenolpirúvico. Puesto que en esta conversión el grupo fosfato era desplazado de la posición 3 a la 2, fue necesario postular la existencia de otro intermediario, ácido 2-fosfoglicérico, cuya presencia en las mezclas de incubación se reconoció rápidamente. La isomerización de la forma 3- a la forma 2- del fosfoglicerato ocurre en presencia de la enzima fosfogliceromutasa, aislada por Meyerhof y W. Kiessling en 1935.



La enzima ha sido aislada de las levaduras (R.W. Cowgill y L.I. Pizer, 1956; V.W. Rodwell et al., 1956) y requiere cantidades catalíticas del ácido 2,3-difosfoglicérico (E.W. Sutherland et al., 1949; S. Rapoport y J. Luebering, 1950).

Deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato.

La siguiente etapa consiste en la deshidratación del átomo C-3 del ácido 2-fosfoglicérico para producir ácido fosfoenolpirúvico, en una reacción promovida por la enzima enolasa, aislada inicialmente por Meyerhof y W. Kiessling en 1935.

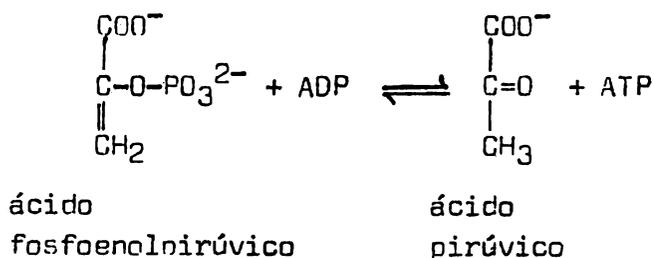


La enolasa fue obtenida en forma pura por Otto Warburg y J. Christian en 1942, quienes mostraron que requiere del Mg^{2+} ó Mn^{2+} . Se sabía de un tiempo atrás que en presencia de Mg^{2+} y fosfato la fermentación resultaba fuertemente inhibida por el fluoruro, Meyerhof, Lohmann y Kiessling (1935) mostraron que esta acción del fluoruro era ejercida directamente sobre la enolasa mediante la eliminación de su activador normal, el Mg^{2+} , en forma del fluorofosfato de magnesio, un compuesto poco disociable (O. Meyerhof y W. Schulz, 1938).

Transferencia de fosfato desde el fosfoenolpiruvato al ADP.

Estudiando la liberación de amoniaco en el músculo Jacob K. Parnas y colaboradores (1934) vieron que después de moler el músculo con solución de fosfato no se desprendía más amoniaco, de lo que propusieron que la fuente del gas, el ácido adenílico, probablemente era fosforilado para formar ATP. Al continuar sus trabajos Parnas y colaboradores hallaron que también los ácidos fosfoglicérico y pirúvico inhibían la producción de amoniaco.

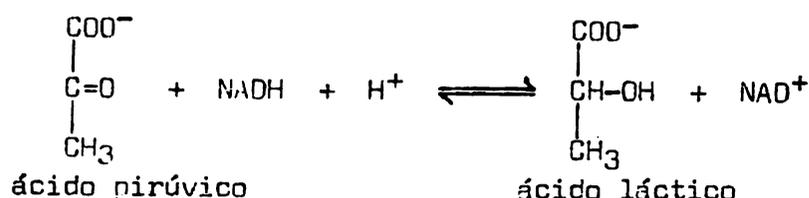
En investigaciones paralelas P. Ostern, T. Baranowski y J. Reis (1935) así como D.M. Needham y W.E. van Heyningen (1935) mostraron que el ácido fosfoglicérico sólo era desfosforilado en presencia del ácido adenílico, siendo utilizado después para la síntesis de ATP el grupo fosfato transferido. Este hecho fue descubierto simultáneamente por Otto Meyerhof y colaboradores (1935). De estas observaciones, Needham y van Heyningen (1935) concluyeron que la función coenzimática de los compuestos adenílicos se originaba en su capacidad para actuar no sólo como donadores de fosfato sino también como aceptores del mismo. H. Lehmann (1935) indicó que en este caso el grupo fosfato era transferido desde el fosfoenolpiruvato al ADP para formar ATP, con lo cual se recupera la energía liberada en esta etapa.



La reacción de transfosforilación es promovida por la enzima piruvato-quinasa, aislada inicialmente por Jacob K. Parnas y colaboradores (1935-1936), que requiere del Mg^{2+} ó Mn^{2+} . La enzima también se ha obtenido del músculo (C. Lutwak-Mann y T. Mann, 1935; P. Oesper y O. Meyerhof, 1950).

Reducción del piruvato a lactato.

En la última etapa de la glucólisis el piruvato es reducido a lactato por la enzima lactato-deshidrogenasa, estudiada inicialmente por O. von Fürth y F. Lieben (1922) y por Otto Meyerhof (1919).



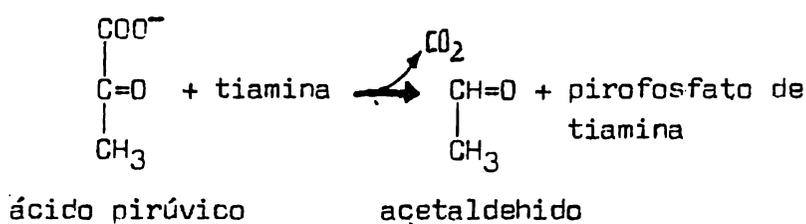
La reacción se estudió inicialmente en la dirección oxidativa y después de estudios más bien confusos acerca de la coenzima involucrada, A. von Zsent-Györgyi (1925) y B. Andersson (1933-34) aportaron los primeros datos que permitieron identificar la participación del NAD^+ ; en investigaciones posteriores se confirmó esta proposición (H. von Euler et al., 1937; O. Meyerhof y P. Ohlmeyer, 1937). En condiciones anaerobias el lactato es el producto final de la glucólisis como lo demostraron numerosas investigacio-

nes (E.L. Tatum et al., 1936; S. Kaufman et al., 1951; J.B. Neilands et al., 1952; D.M. Gibson et al., 1953; M.T. Hakala et al., 1956).

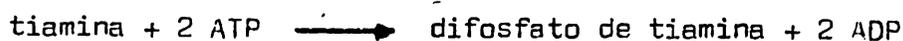
Fermentación alcohólica.

En las células de levadura, la ruta de la fermentación es idéntica a la glucólisis, excepto que la etapa terminal es catalizada por un par de enzimas que convierten el ácido pirúvico en etanol y dióxido de carbono.

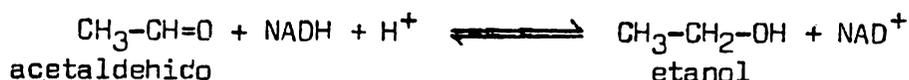
En la primera etapa, el piruvato es descarboxilado por la enzima piruvato-descarboxilasa produciendo acetaldehído y dióxido de carbono; esta reacción se conoce desde las primeras investigaciones de Carl Neuberg (1911) quien, además, logró demostrar la participación del gliceraldehído "atrapándolo" en forma del derivado bisulfito (C. Neuberg y E. Reinfurth, 1918).



En 1932, E. Auhagen descubrió que las células de levadura lavadas perdían su capacidad para producir acetaldehído, estableciendo que era necesaria la presencia del Mg^{2+} y de un factor difusible, una coenzima, que recibió el nombre de "cocarboxilasa". Karl Lohmann y P. Schuster (1937) obtuvieron esta coenzima de las células de levadura, identificándola como el difosfato de tiamina. Los investigadores señalaron que la formación de la cocarboxilasa puede ocurrir por fosforilación química o enzimática, en presencia del ATP.



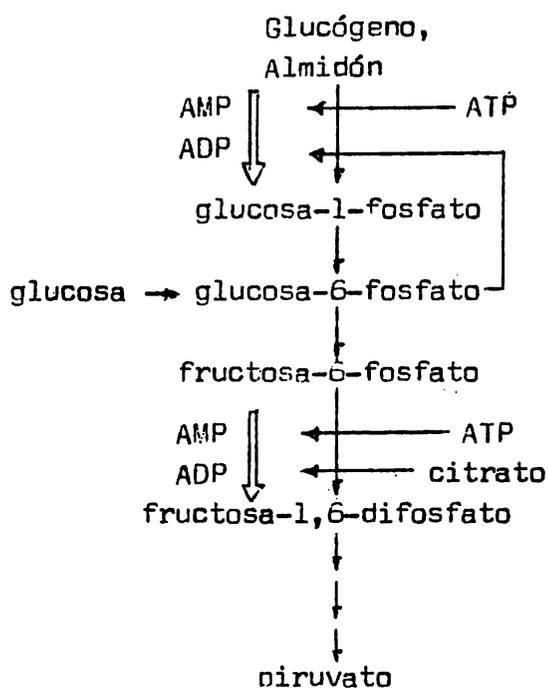
En la etapa final de la fermentación alcohólica el acetaldehído es reducido en una reacción catalizada por la alcohol-deshidrogenasa, estudiada inicialmente por E. Buchner y J. Meisenheimer (1903).



La alcohol-deshidrogenasa requiere del Zn^{2+} (B.L. Vallee e I.L. Hoch, 1956; K. Wallenfels et al., 1957) y se ha obtenido de las levaduras (E. Negelein y H.J. Wulff, 1937; E. Racher, 1950), del músculo (F. Batelli y L. Stern, 1909-1910), del hígado (R.K. Bonnicksen, 1950), y ha sido ampliamente estudiada (H. Theorell y B. Chance, 1951; R.M. Burton y N.O. Kaplan, 1954; J.E. Hayes Jr. y S.F. Velick, 1954; A.P. Nygaard y H. Theorell, 1955).

Regulación de la glucólisis.

En 1861, Louis Pasteur observó que la cantidad de glucosa utilizada por las células de levadura en condiciones anaerobias era considerablemente mayor que la consumida por los mismos organismos en condiciones aerobias. Empleando preparaciones de distintos tejidos también pudo identificarse este hecho, además, al iniciarse la respiración se detenía la acumulación de lactato. Este fenómeno, que inhibe el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico en condiciones aerobias, recibió el nombre de "efecto Pasteur".



Principales puntos de control en la glucólisis.

quienes mostraron que la enzima era fuertemente inhibida por el ATP, sugiriendo que este tipo de inhibición representaba una forma de controlar el metabolismo de los carbohidratos. T.E. Mansour y J.M. Mansour (1962) aportaron nuevas evidencias acerca de la regulación molecular de la fosfofructoquinasa señalando que la enzima podía ser activada por el AMP cíclico; a su vez, J.V. Passonneau y O.H. Lowry (1962), así como T.E. Mansour (1963), mostraron que las preparaciones enzimáticas obtenidas del músculo y del tejido cardíaco eran estimuladas por el AMP. En adición, la fosfofructoquinasa puede ser inhibida por el citrato con lo cual se ejerce un control coordinado sobre los procesos anaerobios (glucólisis) y aerobios (ciclo del ácido tricarbónico) que conducen a la degradación de los carbohidratos (A. Parmeggiani y R.H. Bowman, 1963; P.B. Garland et al., 1963; A. Ramaich et al., 1964; A.H. Underwood y E.A. Newsholme, 1965).

La fosfofructoquinasa es una enzima alostérica multivalente que resulta estimulada por los efectores positivos AMP, AMP cíclico, ADP, fructosa-6-fosfato, fructosa-difosfato y fosfato (O.H. Lowry y J.V. Passonneau, 1964) pero que es inhibida por los moduladores negativos ATP y citrato.

Aunque esta enzima representa el principal punto de regulación en la

El "efecto Pasteur" se halla asociado con decrementos en la concentración celular de glucosa, glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, y con un aumento simultáneo en las concentraciones de fructosa-difosfato y los siguientes intermediarios de la vía glucolítica. Estudiando este fenómeno, W.A. Engelhardt y N.E. Sakov (1943) concluyeron que probablemente se originaba en la inhibición por el oxígeno de la fosfofructoquinasa, tal como lo había sugerido Carl F. Cori en 1941.

Al continuar las investigaciones en este campo A.C. Aisenberg y V.R. Potter (1957) descubrieron que la fosfofructoquinasa era inhibida por un intermediario de la fosforilación oxidativa; esta observación fue confirmada por H.A. Lardy y R.E. Parks Jr. (1959),

además también existen sitios secundarios de control de la actividad de la hexoquinasa por la glucosa-6-fosfato constituida en el citosol. Este mecanismo de regulación fue descubierto originalmente por H. Crane y J. G. G. (1957), encontrándose en esudios posteriores que la hexoquinasa es una enzima alostérica multivalente (R. de la Fuente y A. G. 1964). Esta actividad es estimulada por los moduladores positivos ATP (H.J. G. y J. G. 1964), glucosa (E.A. Newsholme, 1963) y fosfato (L.A. Rose et al., 1964).

Puesto que la glucosa-1-fosfato es un precursor del glicérido y el producto inmediato de su degradación resulta claro que debe existir algún mecanismo que regule la velocidad de degradación del glucógeno. Al descubrirse que la glucógeno-fosforilasa se encuentra en dos formas isoméricas (G. T. Cori y A.A. Green, 1943; G.T. Cori, 1945) que son interconvertibles (A. A. Green y G.T. Cori, 1943; E.G. Krebs y F.H. Fisher, 1954) se especuló sobre la posible función reguladora de esta enzima. En investigaciones posteriores se confirmó que la interconversión de la fosforilasa a (forma activa) y la fosforilasa b (menos activa) efectivamente constituye un mecanismo de control para regular el metabolismo del glucógeno (C. Stetten Jr. Stetten, 1960; E.W. Sutherland y J.V. Roll, 1960; E.F. Neufeld y V. Ginsburg, 1965).

Las formas a y b de la glucógeno fosforilasa constituyen otro ejemplo de una enzima reguladora multivalente. La fosforilasa a es estimulada por los efectores positivos ATP (O.H. Lowry et al., 1954), fosfoenolpiruvato (H.E. Morgan y A. Parmeggiani, 1964), glucosa y glucógeno (H.H. Van der Vliet, 1965), siendo inhibida por los moduladores negativos UDPG, uracilo, GTP, GMP, GDP y A. Parmeggiani, 1964), glucosa-6-fosfato y ATP (A. H. Morgan, 1952). A su vez, la fosforilasa b es activada por los efectores positivos AMP (D. Brown y G.F. Cori, 1951; E. Helmerich y G.F. Cori, 1964), glucosa-1-fosfato (N.G. Maclean, 1964) pero es inhibida por los moduladores negativos ATP (A. Parmeggiani y H.E. Morgan, 1964), GTP, UDPG, GDPG y uracilo (H.E. Morgan y A. Parmeggiani, 1964).

3. Ciclo del ácido tricarboxílico.

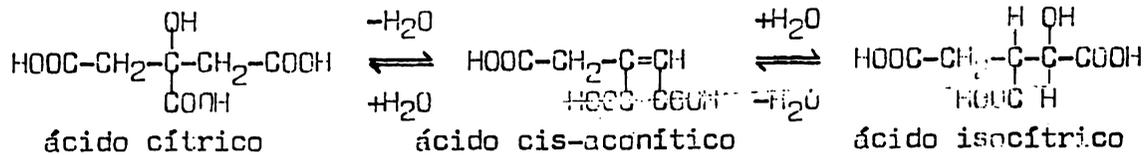
a) Introducción. En el llamado "efecto Pasteur" se observa que al contraerse un músculo aislado en condiciones aerobias disminuye apreciablemente la producción de ácido láctico pero esto no significa que la vía metabólica para la degradación del glucógeno a ácido láctico sea distinta de la vía glucolítica. El hecho de que la glucólisis resulte modificada en presencia del oxígeno es consecuencia de dos factores, en primer lugar el NADH necesario para la reducción del piruvato a lactato se oxida nuevamente produciendo NAD^+ y simultáneamente, el piruvato es degradado a CO_2 y agua. La degradación aerobia del ácido pirúvico en el músculo y en distintos sistemas biológicos constituye la vía metabólica más importante para la oxidación completa de los carbohidratos a CO_2 y agua. A continuación se esbozarán las investigaciones más decisivas que permitieron establecer la secuencia cíclica de reacciones para la oxidación total de las moléculas combustibles, secuencia que se conoce con el nombre de Ciclo del ácido tricarboxílico.

Los trabajos de Frederic Fattelli y L. Stern (1911-1914) y los de Torsten L. Thunberg (1918 y 1923) mostraron que las preparaciones de tejidos animales triturados contenían enzimas como la succinato-deshidrogenasa, fumarasa y malato-deshidrogenasa que podían oxidar los respectivos ácidos dicarboxílicos, transfiriendo sus átomos de hidrógeno al colorante azul de metileno, convirtiendo a éste último en su forma reducida o incolora. En estudios paralelos se vió que los músculos frescos contenían succinato y fumarato (H. Einbeck, 1913-1914), y que aumentaba la producción de estos ácidos dicarboxílicos al agregar glutamato o aspartato a preparaciones de músculo desmenuzado (D. Moyle Needham, 1924-1930).

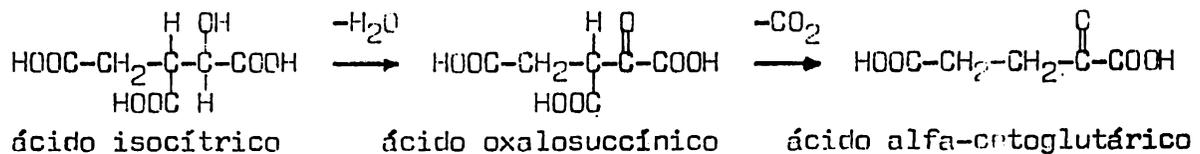
En 1935, Albert Szent-Györgyi y colaboradores iniciaron sus investigaciones sobre la respiración celular para lo cual recurrieron al empleo de suspensiones musculares obtenidas del pecho de paloma, una elección basada en la alta velocidad de respiración de estos tejidos. Los investigadores encontraron que el consumo de oxígeno disminuía gradualmente al pasar el tiempo pero que la adición de pequeñas cantidades de succinato, fumarato, malato u oxalacetato restauraba la velocidad original de la respiración; otro hecho notable era que las preparaciones musculares consumían cantidades de oxígeno mucho mayores que las requeridas para oxidar completamente al ácido dicarboxílico agregado. Szent-Györgyi llegó a la conclusión de que cada uno de los ácidos dicarboxílicos promovía la oxidación de algún sustrato presente en el músculo, posiblemente el glucógeno, y que este efecto era catalítico, puesto que una molécula de succinato era capaz de inducir la oxidación de muchas moléculas del sustrato muscular. Además, la oxidación del succinato debe formar parte de la corriente principal del metabolismo oxidativo en vista de que la adición de malonato no sólo inhibía la reacción catalizada por la succinato-deshidrogenasa, sino que detenía la respiración celular, suspendiendo el efecto catalítico de los ácidos dicarboxílicos (B. Gószy y A. Szent-Gyorgyi, 1934; A. Szent-Gyorgyi et al., 1935 y 1936; K. Laki, F.B. Straub y A. Szent-Gyorgyi, 1937; K. Laki, 1937).

Estudiando la respiración celular en preparaciones musculares Torsten

Thunberg (1911) había descubierto que el ácido cítrico también ejercía un efecto estimulante sobre este proceso pero no pudo explicar satisfactoriamente la acción del citrato. En 1937, Carl Martius halló la respuesta, mostrando que el ácido cítrico era oxidado para formar ácido alfa-cetoglutarico y posteriormente, ácido succínico. Según Martius, la oxidación del citrato se realizaría en dos etapas; en una primera fase anaerobia el ácido cítrico sería deshidratado formando cis-aconitato y éste se hidrataría nuevamente para rendir ácido isocítrico.



En la fase oxidativa, los ácidos cis-aconítico o isocítrico serían deshidratados produciendo ácido oxalosuccínico, el que espontáneamente perdería CO_2 dando ácido alfa-cetoglutarico. Como se sabía en esta época, el ácido alfa-cetoglutarico se convierte en succinato por deshidratación y des-carboxilación.



Las proposiciones de Martius fueron confirmadas por F.L. Breusch (1937) quien indicó que la respiración celular resultaba estimulada en la misma proporción por cualquiera de los ácidos tricarbóxicos citrato, cis-aconitato e isocitrato.

b) El ciclo del ácido cítrico de Krebs y Johnson. Basándose en las observaciones conocidas en la época Hans Adolph Krebs (1937) decidió estudiar el efecto de distintos ácidos orgánicos sobre la respiración, empleando suspensiones de músculo pectoral de paloma, que poseen una velocidad de respiración elevada. Sus resultados pueden resumirse de la manera siguiente:

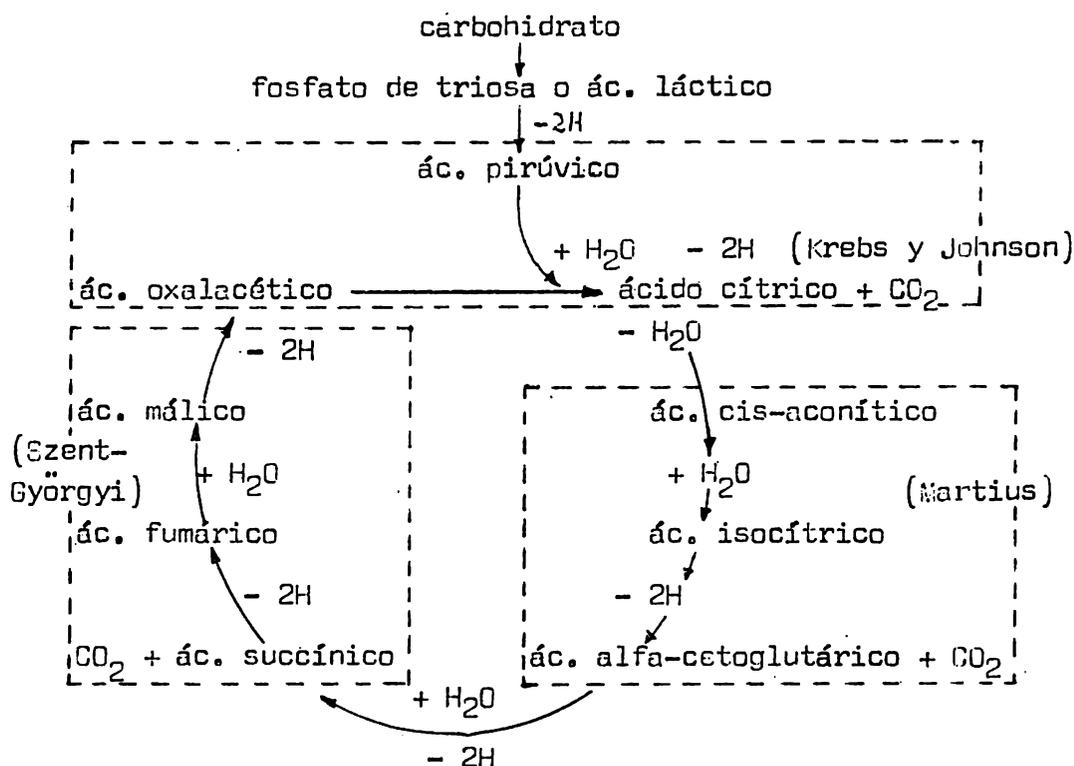
1. La respiración no sólo era estimulada por los ácidos dicarboxílicos como el succinato, fumarato, malato, oxalacetato o alfa-cetoglutarato sino que también los ácidos tricarbóxicos como el citrato, isocitrato o cis-aconitato producían el mismo incremento en el ritmo respiratorio.

2. Los ácidos tricarbóxicos, de manera similar a los ácidos dicarboxílicos, también estimulaban catalíticamente la oxidación de los carbohidratos musculares, así como la del piruvato añadido a las preparaciones musculares.

3. Puesto que la inhibición de la succinato-deshidrogenasa por el malonato detenía por completo la acción estimulante de los ácidos di- y tricarbóxicos, se llegó a la conclusión de que la conversión del succinato en fumarato debía formar parte de una cadena de reacciones que implicaría a todos los ácidos carboxílicos que estimulan la respiración.

4. Incubando suspensiones musculares en condiciones anaerobias se detectó la producción de ácido cítrico al agregar oxalacetato y piruvato, Krebs señaló que la conversión de un compuesto de cuatro carbonos en uno de seis átomos de carbono evidentemente requería la adición de dos átomos más provenientes de alguna otra sustancia, la cual podría ser el ácido pirúvico.

Este último descubrimiento vino a ser el eslabón de unión que faltaba para poder disponer en un ciclo las distintas reacciones enzimáticas que se conocían en esta época para los ácidos di- y tricarboxílicos. En 1937, Hans Adolph Krebs y W.A. Johnson propusieron el llamado "Ciclo del ácido cítrico" como la vía principal para la oxidación de los carbohidratos en el músculo.



El "Ciclo original del ácido cítrico" de Krebs y Johnson (1937).

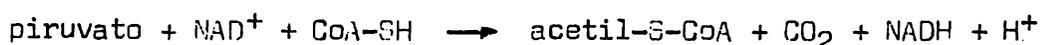
c) La coenzima para la acetilación: Coenzima A. Una vez que se postuló el ciclo del ácido cítrico hubo muchas discusiones acerca de su validez general, entre otras la ruta de formación del citrato a partir del piruvato y oxalacetato fue objeto de muchas especulaciones, que se resolvieron finalmente al terminar la década de los años 1940.

Estudiando el efecto Pasteur, Fritz Lipmann (1945) descubrió que para la oxidación del piruvato en Lactobacillus delbrückii se requería la presencia del fosfato, que se combinaba con el acetato formando un derivado acetil-fosfato ($CH_3CO-OPO_3^{2-}$); este hecho se había observado previamente en Clostridium butylicum (H.J. Koepsell y M.J. Johnson, 1942) y en E. coli (M. F. Utter y C.H. Werkman, 1942). De acuerdo con este hallazgo, Lipmann concluyó que probablemente el acetil-fosfato era un intermediario en la vía oxidativa del piruvato a acetato y CO_2 ; pero habiendo sintetizado este compuesto e incubándolo con tejidos animales no pudo demostrarse su participa-

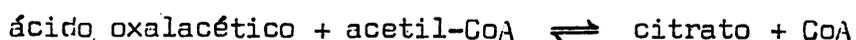
ción en la degradación del piruvato.

Lipmann decidió entonces continuar su búsqueda de un intermediario para la conversión del piruvato en acetato, estudiando la acetilación enzimática de la sulfanilamida en preparaciones hepáticas; una elección basada en experimentos previos de J.R. Klein y J.S. Harris (1938), quienes habían mostrado que esta acetilación estaba acoplada con la respiración celular. En el curso de sus investigaciones, Lipmann descubrió que la acetilación de la sulfanilamida ocurría con gran rapidez en preparaciones hepáticas de paloma si se hallaba presente una coenzima termoestable; puesto que tal coenzima se combinaba con el acetato formando un donador activo de grupos acetilo, en su ausencia no podía efectuarse la transferencia de tales grupos. La coenzima probablemente era un derivado de la vitamina B, al confirmarse este hecho por aislamiento de la sustancia, se propuso el nombre de "Coenzima para la acetilación" para este compuesto (F. Lipmann et al., 1947). Estudios posteriores confirmaron que la Coenzima A (CoA) efectivamente actúa como transportadora de grupos acetilo.

d) El ciclo del ácido tricarboxílico. Una vez que se identificó la participación de la coenzima A en la oxidación aerobia del piruvato Severo Ochoa y colaboradores (1951) lograron aislar dos fracciones enzimáticas (A y B) de E. coli, las cuales podían catalizar la reacción siguiente (S. Korke, A. del Camillo, I.C. Gunsalus y S. Ochoa, 1951) :

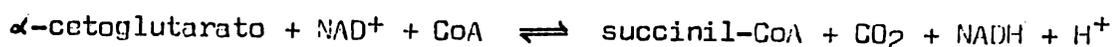


La descarboxilación oxidante del piruvato a acetil-CoA y CO₂ requiere tres enzimas diferentes y cinco coenzimas distintas, que organizadas en un complejo multienzimático constituyen el sistema de la piruvato-deshidrogenasa (S. Korke et al., 1952; I.C. Gunsalus et al., 1956). De acuerdo con el esquema propuesto por Krebs y Johnson a continuación la acetil-CoA (la unidad de dos carbonos proveniente del piruvato) se condensa con el oxalacetato para formar ácido cítrico:



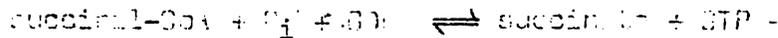
La reacción de condensación ocurre en presencia de la citrato-sintasa, designada originalmente como la "enzima condensadora" por Severo Ochoa, J. R. Stern y M.C. Schneider (1951) quienes lograron aislarla del corazón de cerdo, confirmándose posteriormente la participación de esta enzima en la síntesis del citrato (J.R. Stern, S. Ochoa y F. Lynen, 1952).

De manera simultánea a los trabajos de Lipmann, Lynen y Ochoa, quienes mostraron la función de la coenzima A en la descarboxilación oxidante del ácido pirúvico, se halló que otro derivado de tal coenzima, la succinil-CoA, era un intermediario en la descarboxilación del ácido alfa-cetoglutarico (D.R. Sanadi y J.W. Littlefield, 1951). La oxidación del ácido alfa-cetoglutarico se efectúa en dos etapas, en la primera el ácido es descarboxilado oxidativamente para formar succinil-CoA y CO₂ :



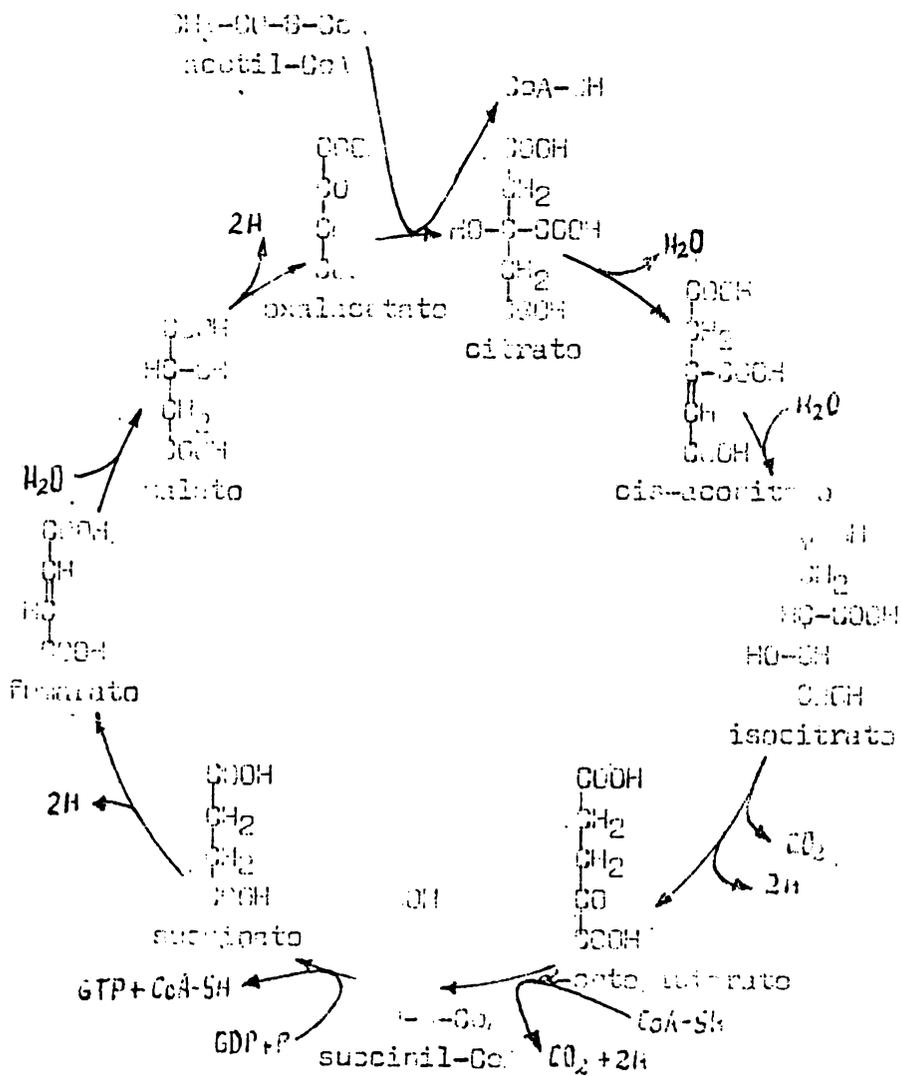
Esta reacción, catalizada por la alfa-cetoglutarato-deshidrogenasa, es

may similar a la descarboxilación oxidante del piruvato y no produce el mismo mecanismo, requiriendo la presencia del pirrofosfato, tiamina, lipoica, NAD^+ y F_4P (P. Berg et al., 1953). A continuación, la succinil-CoA reacciona con el oxígeno molecular, liberando su elemento sulfidrilado por la enzima A:



La enzima que cataliza esta reacción, succinil-coenzima A succinil-CoA-sintetasa, se ha obtenido de los tejidos del músculo (P. Berg et al., 1956). El grupo amino de la reacción está en su grupo fosfato terminal al $5'$ para rendir ATP, en presencia de la nucleósido-difosforinasa (P. Berg y W.K. Joklik, 1954).

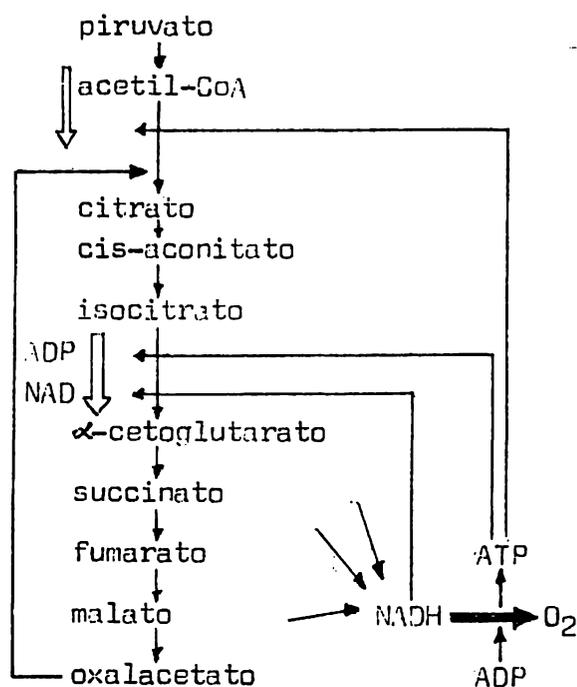
El esclarecimiento de los mecanismos implicados en la síntesis del citrato y en la conversión del alfa-cetoglutarato a succinil-CoA permitió completar el esquema del "ácido cítrico" formulado originalmente por Krebs en 1937, como una secuencia para describir las etapas intermedias de la oxidación de los carbohidratos en los tejidos animales".



Ciclo del ácido tricarboxílico.

Regulación del ciclo del ácido tricarboxílico.

La reacción catalizada por la citrato-sintasa es el punto de control primario del ciclo del ácido tricarboxílico en el hígado y corazón de los vertebrados. En estos tejidos la enzima resulta inhibida por los moduladores negativos ATP (J.A. Hathaway y D.E. Atkinson, 1965; H.O. Jangaard y D.E. Atkinson, 1966) y acil-graso-CoA (R.S. Kallen y J.M. Lowenstein, 1962; P.K. Tubbs, 1963; O. Wieland y L. Weiss, 1963; O. Wieland et al., 1964; W. M. Bortz y F. Lynen, 1963) que reducen su afinidad por la acetil-CoA y por el oxalacetato, respectivamente.



Puntos de control en el ciclo del ácido tricarboxílico.

Aunque la reacción de la citrato-sintasa es el punto de control primario en los tejidos hepáticos y en otros tejidos de los mamíferos, la reacción catalizada por la isocitrato-deshidrogenasa también constituye un mecanismo regulador importante en estos tejidos.

La isocitrato-deshidrogenasa NAD-específica localizada en las mitocondrias es una enzima reguladora que resulta modulada positivamente por el ADP y NAD^+ , que incrementan su afinidad por el isocitrato (R.F. Chen y G.W.E. Plaut, 1963; R.F. Chen et al., 1964).

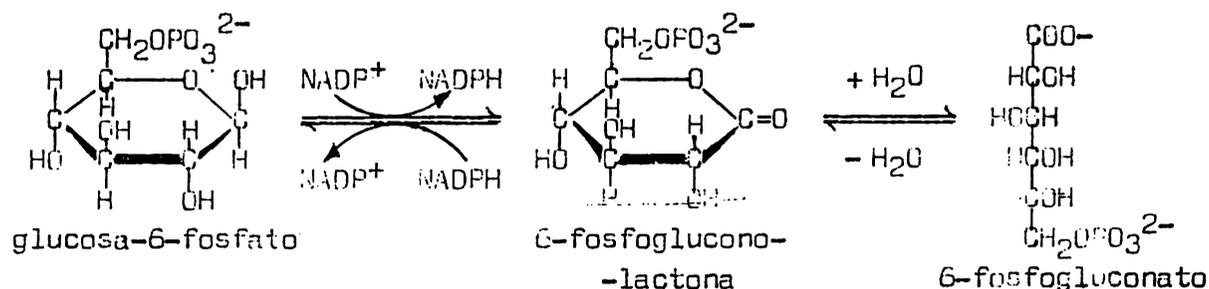
Las correspondientes isocitrato-deshidrogenasas de las levaduras (J.A. Hathaway y D.E. Atkinson,

1963; D.E. Atkinson et al., 1965) y de *Neurospora crassa* (B.D. Sanwal et al., 1963-1965; B.D. Sanwal y C.S. Stachow, 1965) poseen patrones de regulación similares, siendo estimuladas por los efectores positivos ADP, NAD^+ e isocitrato pero inhibidas por los moduladores negativos ATP y NADH.

4. Vía de los fosfatos de pentosa.

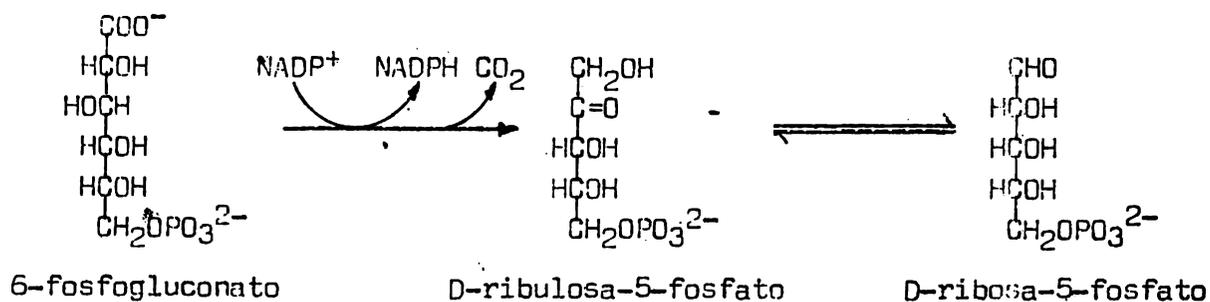
La vía glucolítica y el ciclo del ácido tricarboxílico constituyen las vías principales para la degradación anaerobia y aerobia de la glucosa pero esto no significa que sean las únicas rutas metabólicas que lleven a cabo tal transformación. La existencia de vías alternas para esta conversión quedó de manifiesto al observarse que algunas de las sustancias que bloquean la vía glucolítica no inhibían por completo la utilización de glucosa. Una de estas vías alternas para el metabolismo de la glucosa es la llamada vía de los fosfatos de pentosa cuya primera reacción implica la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato; la secuencia de reacciones de esta vía metabólica se conoce con otros nombres: "Vía de Warburg-Dickens", "Desviación del monofosfato de hexosa" y "Ruta del fosfogluconato".

a) Etapas enzimáticas en la vía de las pentosas. La primera reacción de esta vía consiste en la deshidrogenación enzimática de la glucosa-6-fosfato por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, conocida también como el Zwischenferment (fermento intermedio) de Warburg, para formar la respectiva lactona, la 6-fosfoglucono- δ -lactona (O. Cori y F. Lipmann, 1952; A.F. Brodie y F. Lipmann, 1955).



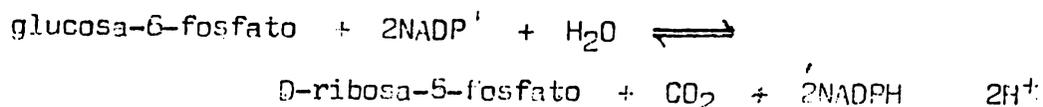
B.L. Horecker y P.Z. Smyrniotis (1953) demostraron la reversibilidad de la reacción que implica a la glucosa-6-fosfato y la 6-fosfogluconolactona. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se ha identificado en varios tejidos animales como la corteza adrenal (G.E. Plock y P. McLean, 1954; T.L. Kelly et al., 1955), en las plantas superiores, levaduras y numerosos microorganismos, requiriendo en todos los casos del NADP como aceptor electrónico (A.H. Weisler et al., 1948). La lactona se hidroliza fácilmente rindiendo 6-fosfogluconato pero la hidrólisis puede ser acelerada por la enzima lactonasa (H.J. Strecker y S. Korke, 1952; N.S. Brink, 1953).

En la etapa siguiente el 6-fosfogluconato experimenta una descarboxilación oxidativa catalizada por la 6-fosfogluconato-deshidrogenasa para producir D-ribulosa-5-fosfato.



La 6-fosfogluconato-deshidrogenasa requiere Mg^{2+} ó Mn^{2+} y NADP^+ como cofactor, habiendo sido estudiada en detalle por Bernard L. Horecker y colaboradores (B.L. Horecker et al., 1951; S. Pontremoli et al., 1961). Por acción de la fosfopentosa-isomerasa (ribosa-5-fosfato isomerasa) la D-ribulosa-5-fosfato es convertida reversiblemente en su isómero aldo, la D-ribosa-5-fosfato (B.L. Horecker et al., 1951; B. Axelrod y R. Jang, 1954). En adición, la ribulosa-5-fosfato puede isomerizarse a su epímero en el átomo C-3, la D-xilulosa-5-fosfato, por la enzima pentosa-epimerasa que se ha identificado en tejidos animales, vegetales y numerosos microorganismos (P. A. Srere et al., 1955; J. Hurwitz y B.L. Horecker, 1956; F. Dickens y D.H. Williamson, 1956; G. Ashwell y J. Hickman, 1957).

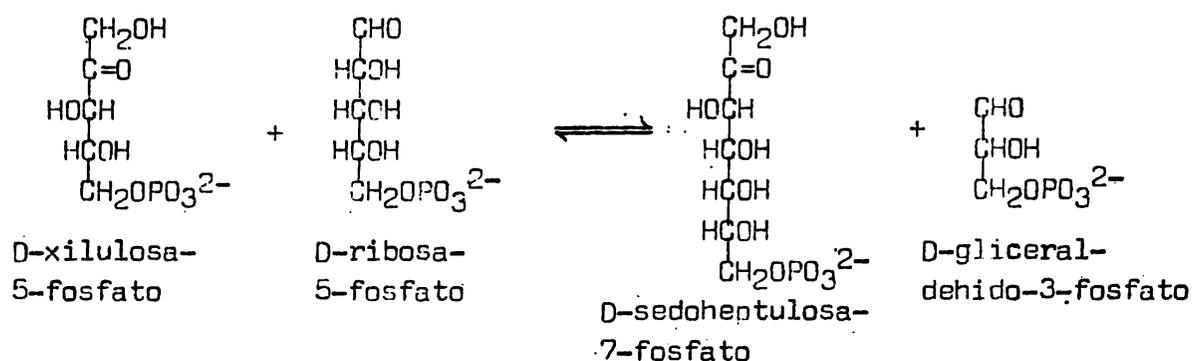
Bajo ciertas circunstancias la vía de las pentosas finaliza con la formación de la D-ribosa-5-fosfato, por lo que la ecuación global para el proceso es la siguiente :



El resultado neto de esta transformación enzimática consiste en la producción de NADPH, que se emplea para la biosíntesis reductora del citoplasma extramitocondrial y en la formación de D-ribosa, precursora para la biosíntesis de nucleótidos.

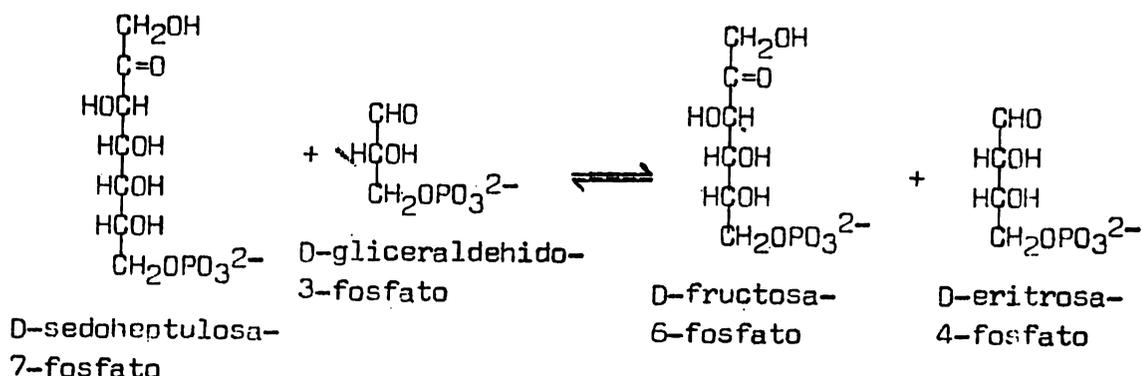
Conversión de los fosfatos de pentosa en fosfatos de hexosa.

Existe una vía metabólica para regenerar los fosfatos de hexosa partiendo de los fosfatos de pentosa. La resíntesis del fosfato de hexosa se inicia con la escisión de la D-xilulosa-5-fosfato por la enzima ampliamente distribuida transcetolasa.



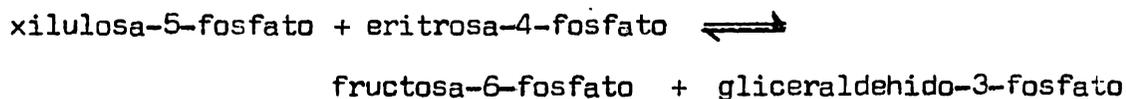
La enzima se ha obtenido de las levaduras y requiere Mg^{2+} y pirofosfato de tiamina (B.L. Horecker et al., 1953; G. de la Haba et al., 1955); como su nombre lo indica, la transcetolasa cataliza la transferencia de un grupo glicolaldehído ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-$) desde la xilulosa-5-fosfato hacia un aceptor adecuado, la ribosa-5-fosfato, para rendir D-sedoheptulosa-7-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (B.L. Horecker et al., 1953 y 1956). El fosfato de sedoheptulosa es un intermediario de la fotosíntesis (A.T. Wilson y M. Calvin, 1955) y el gliceraldehído-3-fosfato interviene en la glucólisis.

B.L. Horecker y P.Z. Smyrniotis (1955) y C.E. Ballou et al. (1955) descubrieron que en presencia del gliceraldehído-3-fosfato, el fosfato de sedoheptulosa era escindido por la enzima transaldolasa para formar fructosa-6-fosfato y D-eritrosa-4-fosfato.

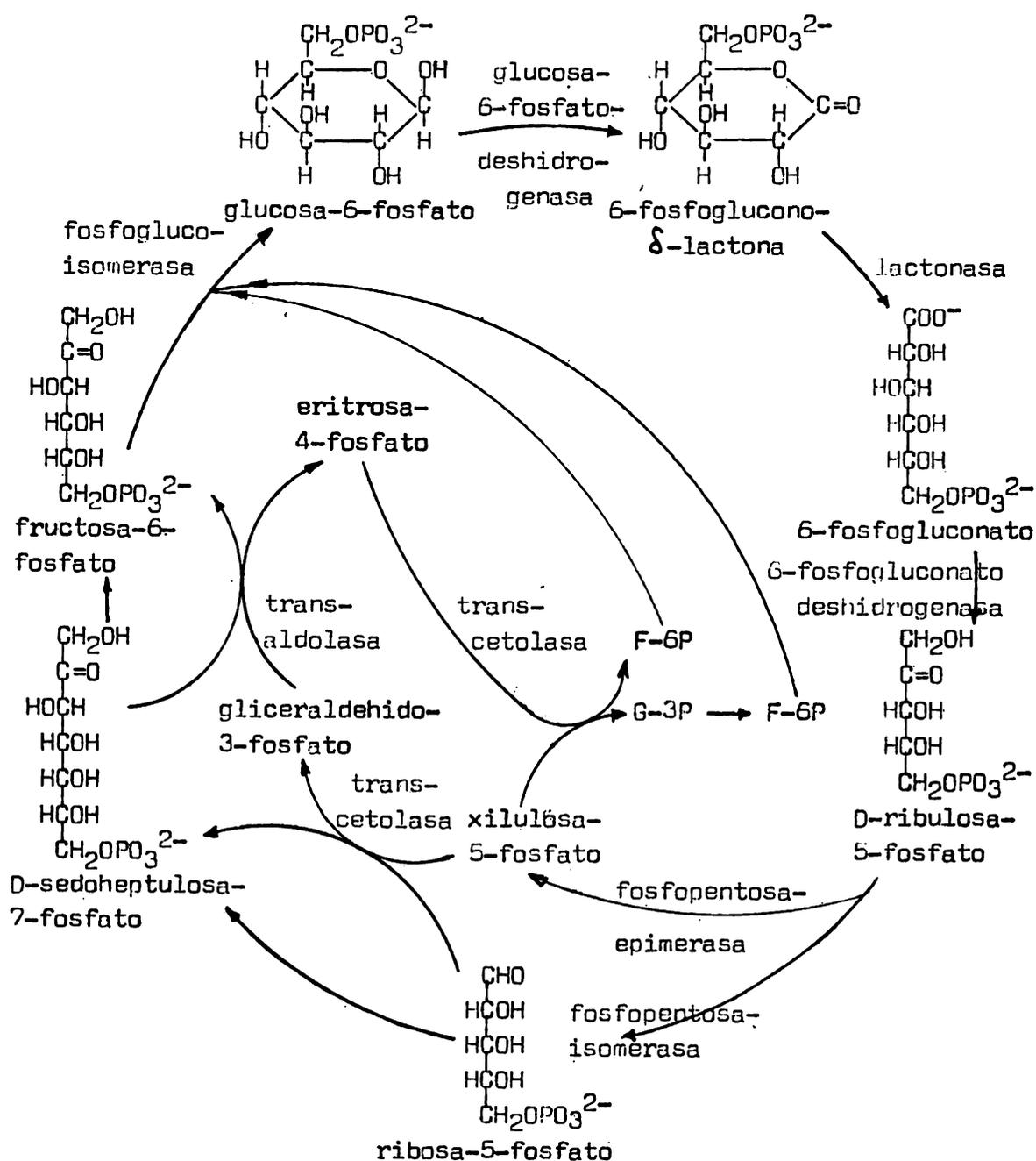


Puesto que la fructosa-6-fosfato puede convertirse en glucosa-6-fosfato por acción de la fosfohexoisomerasa se obtiene un ciclo completo en la

conversión de los fosfatos de pentosa a fosfatos de hexosa. Además, la transcetolasa cataliza una reacción entre la eritrosa-4-fosfato y la D-xilulosa-5-fosfato, dos intermediarios de la vía de las pentosas, para formar fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, dos intermediarios de la vía glucolítica :



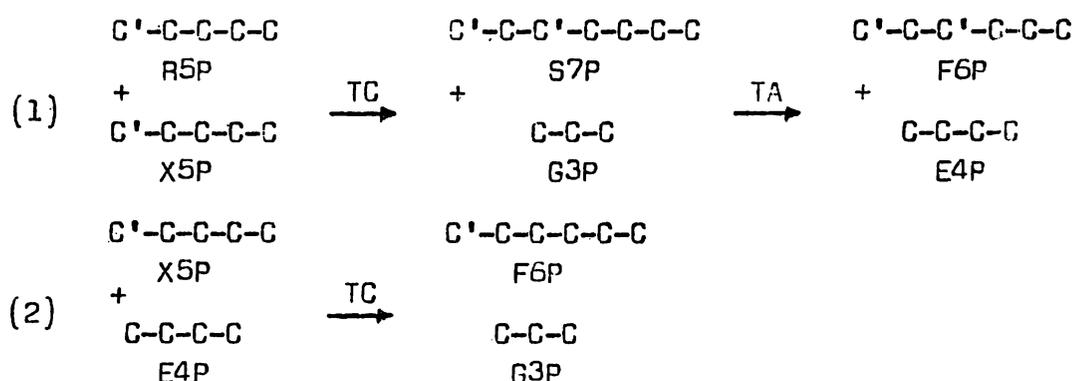
De manera que la ecuación global para la vía de las pentosas queda de la manera siguiente:



La vía de los fosfatos de pentosa

b) Bases experimentales de la vía de las pentosas. La validez de la vía de los fosfatos de pentosa encuentra su soporte principal en los experimentos isotópicos realizados por Bernard L. Horecker y colaboradores. Los investigadores incubaron ribosa-1-C¹⁴ marcada con preparaciones hepáticas o de tejido de chícharo y procedieron a determinar la distribución isotópica en los átomos de la glucosa sintetizada (M. Gibbs y B.L. Horecker, 1954; B.L. Horecker et al., 1954).

Se encontró que el C¹⁴ se hallaba localizado principalmente en los átomos C-1 y C-3 de la glucosa y que la radiactividad específica del carbono 1 era alrededor de tres veces mayor que la del carbono 3, estos resultados se interpretaron de la manera siguiente:



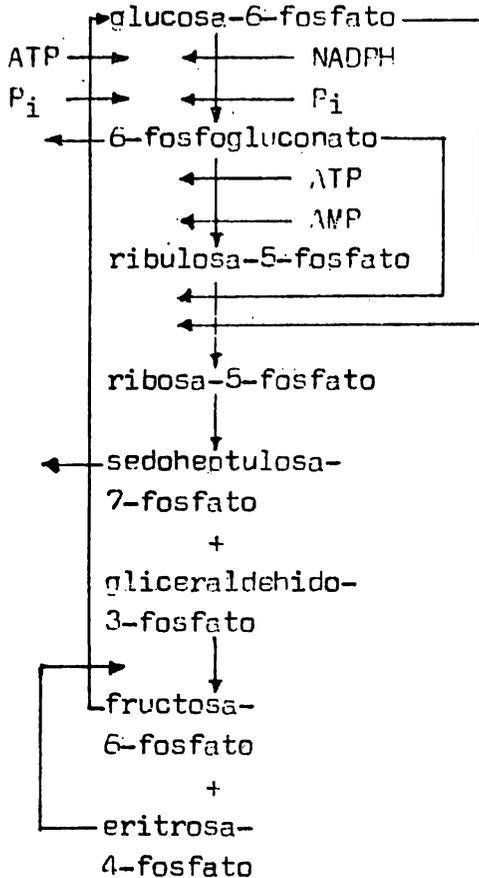
En la reacción (1) la acción sucesiva de la transcetolasa (TC) y la transaldolasa (TA) conduce a la formación de fructosa-6-fosfato marcada por igual en los átomos C-1 y C-3. En la reacción (2) sólo se produce fructosa-6-fosfato marcada en el átomo C-1 a partir de la xilulosa-5-fosfato y eritrosa-4-fosfato, lo cual permite explicar la mayor radiactividad específica del carbono 1 de la glucosa aislada del medio de reacción.

c) Función metabólica de la vía de las pentosas. La vía de los fosfatos de pentosa no es una ruta principal de oxidación de la glucosa pero en la mayor parte de las células que la emplean su objetivo primordial es obtener energía en el citoplasma extramitocondrial en forma de NADPH y ATP. Esta función es muy notable en los tejidos que realizan la síntesis de ácidos grasos y esteroides como son el hígado, la glándula mamaria, los tejidos adiposo o graso, los leucocitos y la corteza adrenal (S. Abraham et al. 1954; R.V. Coxon y R.J. Robinson, 1956).

Además de proporcionar energía una segunda función de esta ruta metabólica es producir pentosas para la síntesis de nucleótidos (M.C. Lanning y S.S. Cohen, 1954; I.A. Bernstein, 1956). Otra función destacada de la vía de las pentosas es participar en la formación de glucosa a partir de CO₂ en la fase oscura de la fotosíntesis, la cual se conoce como "vía reductora de los fosfatos de pentosa" ó "ciclo de Calvin" (J.A. Bassham et al., 1954; A.T. Wilson y M. Calvin, 1955; B. Axelrod y H. Beevers, 1956).

Regulación de la vía de las pentosas.

La hexosa-isomerasa, que cataliza la interconversión de la glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, es inhibida por los moduladores negativos ATP y ortofosfato (S.E. Kahana et al., 1960), así como por algunos de los intermediarios de la vía que son el 6-fosfogluconato (C.W. Parr, 1957; S.E. Kahana et al., 1960), sedoheptulosa-7-fosfato (E. Grazi et al., 1960) y eritrosa-4-fosfato (R. Venkataraman y E. Racker, 1961).



Sitios de control en la vía de los fosfatos de pentosa.

a ribosa-5-fosfato, se halla bajo control de los efectores negativos glucosa-6-fosfato, fructosa-difosfato y 6-fosfogluconato (C.W. Parr, 1951 y 1956) y se ha propuesto que esta inhibición puede regular la producción de ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos (W.J. Dobrogosz y R.D. DeMoss, 1963).

5. Gluconeogénesis.

La conversión de la glucosa en piruvato, catalizada por las enzimas glucolíticas, es la vía principal para degradar los carbohidratos en la mayor parte de las células; igualmente, el proceso inverso, la conversión del piruvato en glucosa, es por lo general la ruta empleada en la biosíntesis de monosacáridos y polisacáridos.

a) Etapas enzimáticas en la gluconeogénesis. Carl F. Cori y Gerty T. Cori (1929) en el curso de sus investigaciones descubrieron que la síntesis

La reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa resulta inhibida por el efector negativo ortofosfato (H. Theorell, 1935; E.A. Kravitz y A.J. Guarino, 1957). Efraim Racker (1965) hizo notar que este tipo de control constituye un medio para coordinar la glucólisis y la vía de las pentosas, ya que el ortofosfato se requiere en la glucólisis pero no en la oxidación de la glucosa por la vía del fosfogluconato. La enzima también reduce su actividad en presencia de los moduladores estearil-CoA (I. Eger-Neufeldt et al., 1965), nucleósido-fosfatos (G. Avigad, 1966; J.V. Passonneau et al., 1966; R.N. Horne et al., 1970) y NADPH (L. Glaser y D.H. Brown, 1955).

Los moduladores negativos ATP (G.E. Glock y P. McLean, 1953), G'-AMP (M. Rippon et al., 1970) y fructosa-difosfato (J.E.D. Dyson y R.E. D'Orasio, 1973) disminuyen la actividad catalítica de la enzima 6-fosfogluconato-deshidrogenasa.

La fosfopentosa-isomerasa, que cataliza la conversión de ribulosa-5-fosfato

sis de glucosa a partir del piruvato o lactato era un proceso fisiológico importante pero esta observación no produjo ningun impacto debido a la creencia de que en su mayoría las reacciones enzimáticas eran reversibles y que, por tanto, la síntesis de tal monosacárido ocurriría por simple inversión de la secuencia glucolítica.

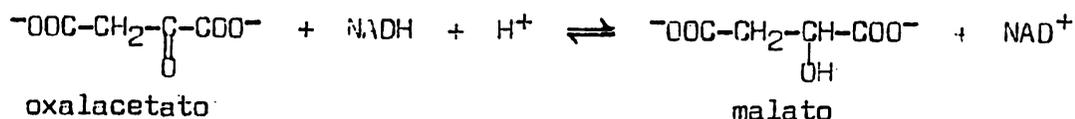
Aunque esto último es válido en un sentido estrictamente termodinámico, Hans A. Krebs y H.L. Kornberg (1957) mostraron que tres reacciones de la vía glucolítica, las catalizadas por la hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato-quinasa, son altamente exergónicas y que esto representa una barrera energética para que se efectue una inversión significativa de la glucólisis. Este problema se resolvió finalmente al descubrirse que la gluconeogénesis se realiza mediante una secuencia que va a través de las etapas fácilmente reversibles de la glucólisis pero que sustituye las tres reacciones endergónicas por reacciones alternas que resultan sumamente exergónicas en la dirección de síntesis de glucosa. Así, en la conversión del piruvato a fosfoenolpiruvato se utiliza un mecanismo que requiere la formación intermedia de oxalacetato, en tanto que la síntesis de fructosa-6-fosfato y glucosa, a partir de la fructosa-difosfato y glucosa-6-fosfato, se consigue por acción de fosfatasas específicas.

Empleando preparaciones mitocondriales del hígado de pollo Merton F. Utter y colaboradores reportaron el aislamiento de una enzima que podía catalizar la carboxilación directa del piruvato produciendo oxalacetato, tal enzima recibió el nombre trivial de piruvato-carboxilasa (M.F. Utter y D.B. Keech, 1960 y 1963).

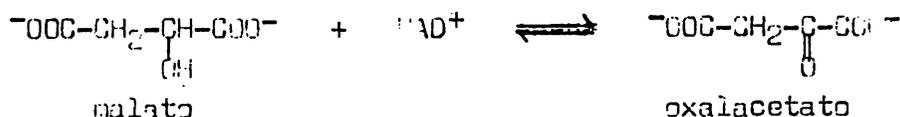


Los investigadores mostraron que la enzima exhibe un requerimiento absoluto por Mg^{2+} y acetyl-CoA (M.F. Utter et al., 1964; M.C. Scrutton et al., 1965). Estudios posteriores revelaron que esta enzima se halla muy distribuida en los sistemas biológicos, en los tejidos de los mamíferos la máxima actividad catalítica se encuentra en el hígado, corteza del riñón y tejido adiposo (F.J. Ballard, 1970; J.W. Anderson, 1970); la enzima también se ha detectado en el hígado de los anfibios (M.C. Scrutton, 1971).

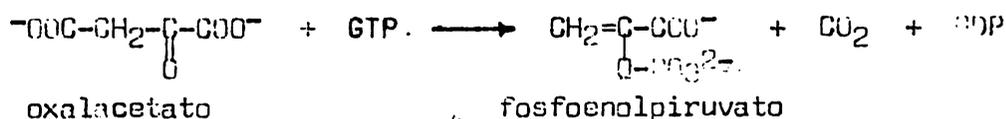
El oxalacetato formado en la reacción anterior es reducido en las mitocondrias a malato, en reacción que necesita del NADPH (R.C. Haynes, 1965; H.A. Lardy et al., 1966).



Entonces, el malato formado en el interior de las mitocondrias difunde al citoplasma extramitocondrial donde es reoxidado por la malato-deshidrogenasa citoplásmica para rendir oxalacetato (L. Siegel y S. England, 1962; P. Walter et al., 1966; J.H. Anderson et al., 1971; R.N. Zahlen et al., 1974).

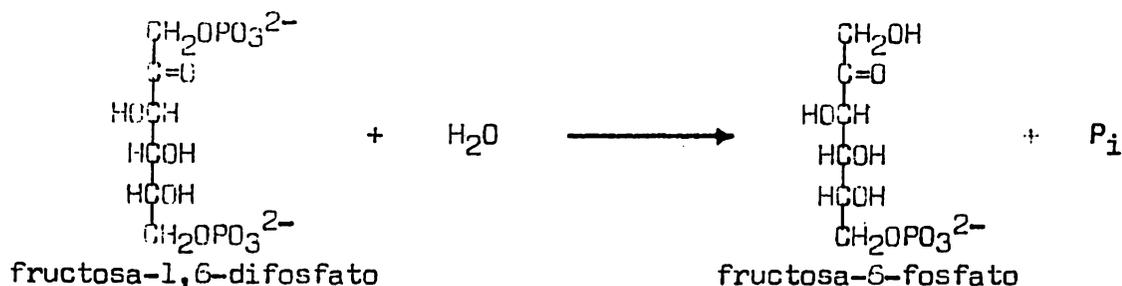


En el curso de sus trabajos con preparaciones hepáticas de pollo Mer-ton F. Utter y K. Kurahashi descubrieron una enzima que promovía la forma-ción de fosfoenolpiruvato por reacción entre el oxalacetato y el GTP (ITP) (1953).

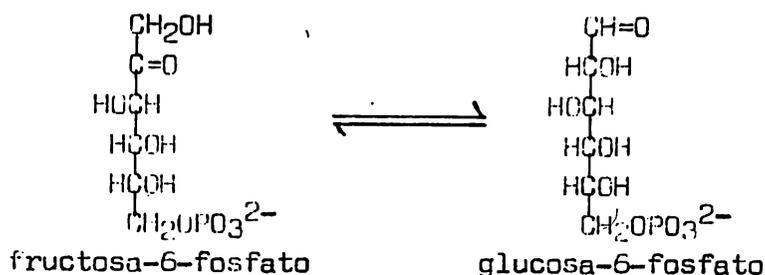


El descubrimiento inicial de la enzima, la fosfoenolpiruvato-carboxi-quinasa, se interpretó como una respuesta al problema de fijación biológi-ca del CO₂ y a la síntesis de ácidos dicarboxílicos pero investigaciones posteriores revelaron que su función primaria es catalizar la síntesis de fosfoenolpiruvato como parte de la vía biosintética de los carbohidratos (H.A. Lardy et al., 1965; P. Walter et al., 1966; H.A. Krebs et al., 1967). El fosfoenolpiruvato sintetizado en el citoplasma se convierte fácilmente en fructosa-1,6-difosfato por inversión de las reacciones de la vía gluco-lítica que empiezan en la enolasa y terminan en la aldolasa.

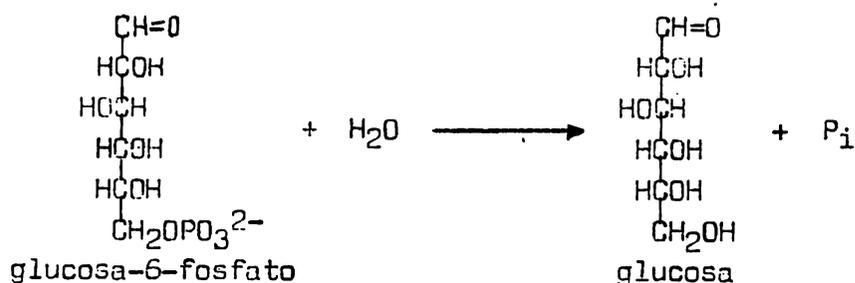
La segunda reacción de la glucólisis que no se emplea en la dirección de síntesis, la catalizada por la fosfofructoquinasa, queda sustituida por una reacción alterna que requiere de la enzima difosfofructosa-fosfatasa, más conocida como fructosa-difosfatasa.



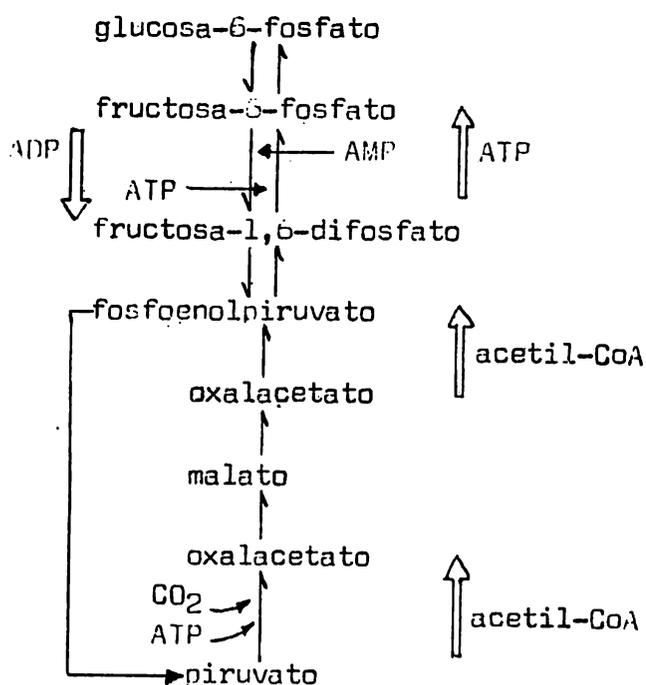
La fructosa-difosfatasa fue descubierta en 1943 por G. G. Somori quien lo gró separarla de las distintas fosfatasa que se encuentran presentes en te jidos como el hígado y riñón; la enzima hidroliza específicamente el grupo 1-fosfato de la fructosa-difosfato produciendo fructosa-6-fosfato (J. Roche, 1950; B.M. Pogell, 1952; H.G. Hers y T. Kusaka, 1953). En la etapa si-guiente, la fructosa-6-fosfato es convertida reversiblemente en glucosa-6-fosfato por acción de la fosfohexoisomerasa (K. Lohmann, 1933; G. Tankó, 1936; G.F. Somers y F.L. Crosby, 1945).



En la mayor parte de las células la glucosa-6-fosfato derivada de la gluconeogénesis se emplea en la biosíntesis de polímeros de reserva, como son almidón y glucógeno, de monosacáridos distintos de la glucosa, disacáridos y polímeros estructurales. En otras células, como el hígado, riñón y epitelio intestinal de los vertebrados, la glucosa-6-fosfato es convertida en glucosa libre. Estudiando la hidrólisis de distintos ésteres fosfóricos por extractos hepáticos de conejo P. Fantl y M.N. Rome (1945) descubrieron que los tejidos de este mamífero contenían una enzima, a la que llamaron glucosa-6-fosfatasa, capaz de catalizar la escisión de la glucosa-6-fosfato a glucosa libre y fosfato inorgánico.



La enzima ha podido separarse de las distintas fosfatasas ácidas y alcalinas que se localizan en el citoplasma, habiéndose demostrado que su actividad se halla asociada con la fracción microsomal (C. de Duve et al., 1949; M.A. Swanson, 1950; H.G. Hers et al., 1951; R.E. Langdon y D.R. Weakley, 1957).



Puntos de control en la gluconeogénesis.

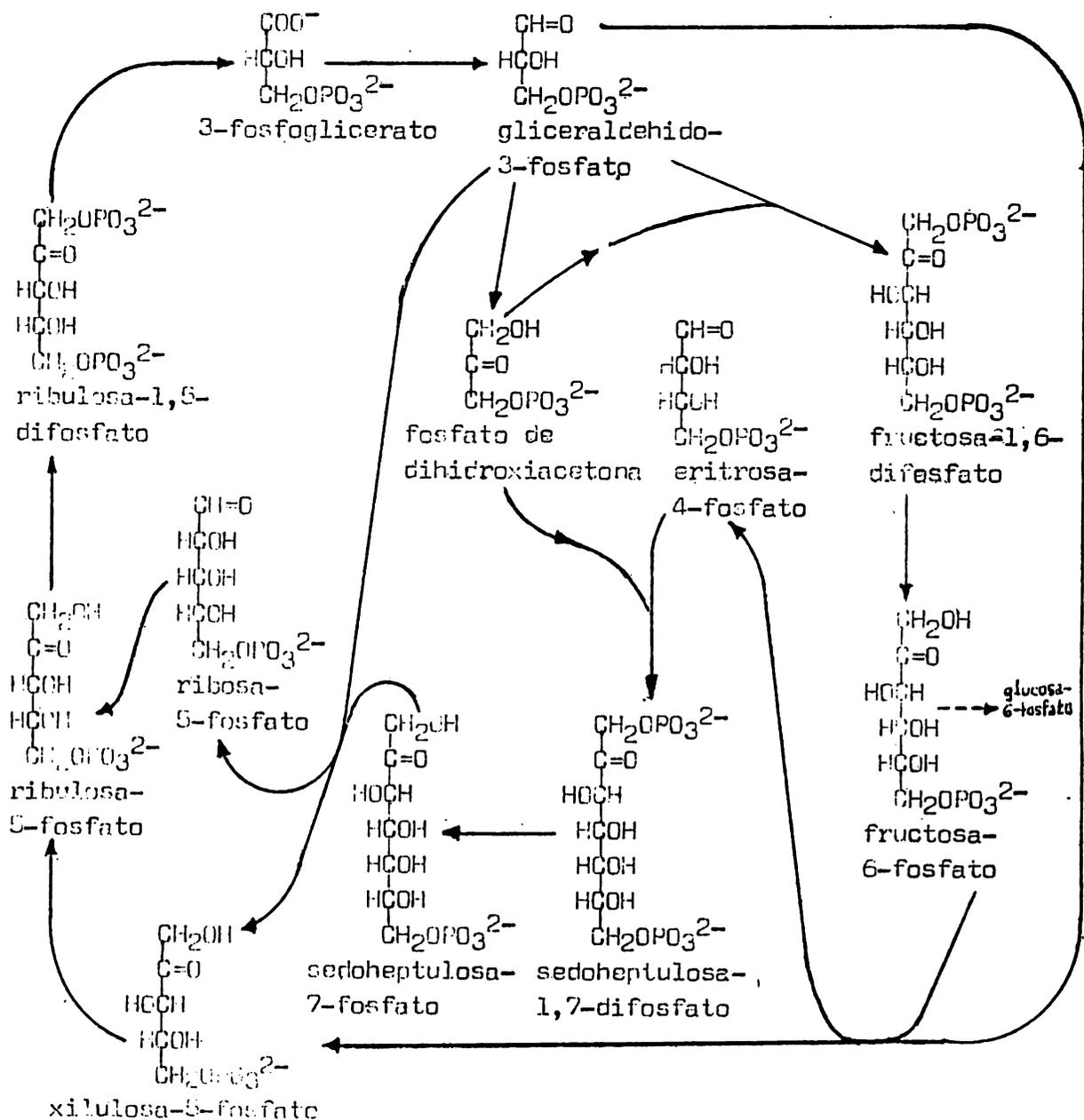
Regulación en la gluconeogénesis.

El punto de control primario en la secuencia que va del piruvato a la glucosa-6-fosfato es la reacción mitocondrial de la piruvato-carboxilasa. La enzima es activada por el modulador positivo acetil-CoA que promueve la fijación del CO₂ (D.B. Keech y M. Utter, 1963; H.A. Krebs, 1963 y 1964; M.V. Henning, 1964; E. Utter et al., 1964), en tanto que los efectores negativos malonil- y succinil-CoA (M. Utter y M.C. Scrutton, 1969), acetoacetil-CoA (G.H. Fung y M. Utter, 1970) y la relación ATP/ADP (D.B. Keech y M. Utter, 1963; P. Walter et al., 1966; W.R. McClure y H.A. Lardy, 1971) inhiben la actividad de la enzima.

La reacción de la fructosa-difosfatasa es el punto secundario de control en la gluconeogénesis, la enzima es fuertemente inhibida por el AMP y altas concentraciones de fructosa-difosfato (J. Mendicino y F. Vasarhely,

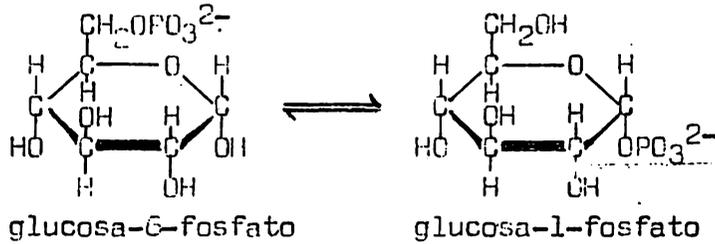
1963; H. Galas et al., 1964; A.H. Underwood y E.A. Newsholme, 1965; K. Taketa y B.M. Pogell, 1965; J. Fernando et al., 1968; S. Pontremolli et al., 1968; W.J. Black et al., 1972; C.F. Jones, 1972), resultando inactivada reversiblemente en presencia de ADP o ATP (K. Taketa y B.M. Pogell, 1963). Los fosfolípidos ejercen un efecto estimulante sobre la enzima (B.M. Allen y J. McD. Blair, 1972).

b) Formación de hexosas por reducción del dióxido de carbono. Empleando dióxido de carbono marcado ($C^{14}O_2$) Melvin Calvin y colaboradores (1947-1957) estudiaron la secuencia de reacciones que se efectúan en la fase oscura de la fotosíntesis. Los investigadores mostraron que en esta fase seis moléculas de CO_2 pueden convertirse finalmente en glucosa por funcionamiento de un sistema cíclico para la síntesis de hexosa, integrado por reacciones de la ruta del fosfogluconato y de la glucólisis, al que se conoce con el nombre de Ciclo de Calvin.



6. Biosíntesis de polisacáridos.

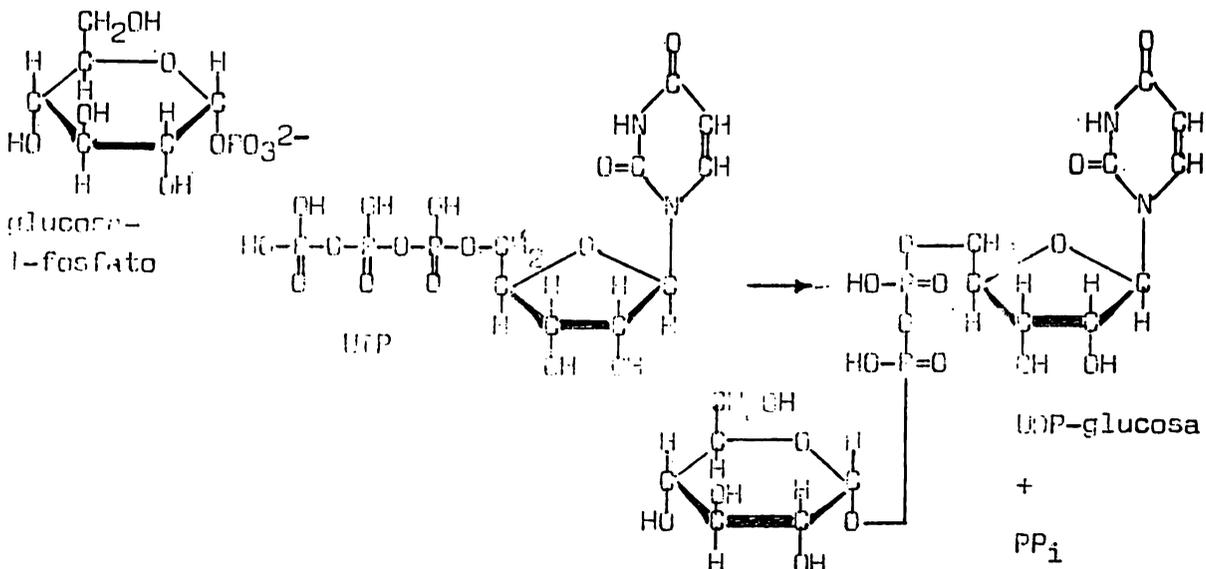
a) Síntesis del glucógeno. La ruta biosintética que conduce a la formación de glucógeno se inicia con la conversión de la glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato, en reacción catalizada por la fosfoglucomutasa (O. Meyerhof y W. Kiessling, 1935; C.F. Cori y G.T. Cori, 1936-1938).



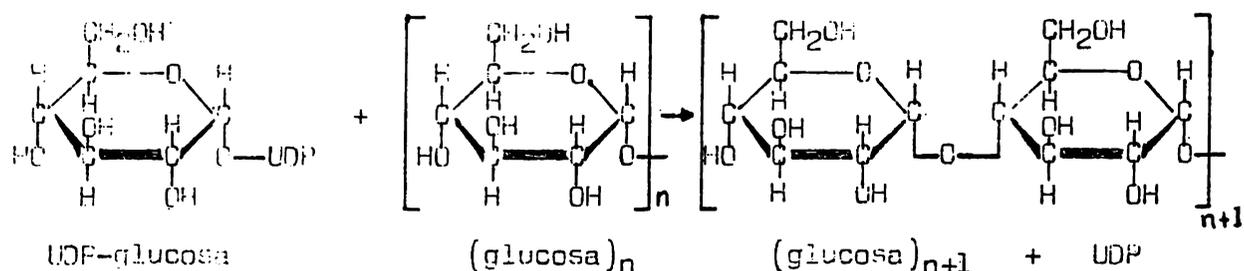
Se pensó durante cierto tiempo que la glucógeno-fosforilasa era la enzima responsable tanto de la síntesis como de la degradación del glucógeno pero se

acumularon suficientes evidencias experimentales que mostraron que la síntesis, a partir de la glucosa-1-fosfato, de los enlaces α -(1 \rightarrow 4) de la cadena del glucógeno no podía ser catalizada in vivo por esta enzima (E.W. Sutherland y C.F. Cori, 1951; G.F. Cahill et al., 1957; J. Larner y C. Villar-Palasi, 1959; C. Villar-Palasi y D.J. Richman, 1960; D.L. Friedman y J. Larner, 1962); concluyéndose que la función de la fosforilasa se halla limitada exclusivamente a la degradación del glucógeno.

Para que la glucosa-1-fosfato se convierta en glucógeno existe una senda metabólica específica que comprende una serie de reacciones ampliamente utilizadas en la síntesis de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. En el Sexto Congreso Internacional de Bioquímica Luis Federico Leloir (1964) presentó las bases de lo que constituye el esquema actualmente aceptado para la síntesis del glucógeno, en los animales superiores el proceso se inicia con la formación de la UDP-glucosa a partir de la glucosa-1-fosfato y el uridín-trifosfato (UTP) en presencia de la enzima UDP-glucosa-pirofosforilasa (A. Munch-Petersen, 1953; L.F. Leloir y C.E. Cardini, 1957).

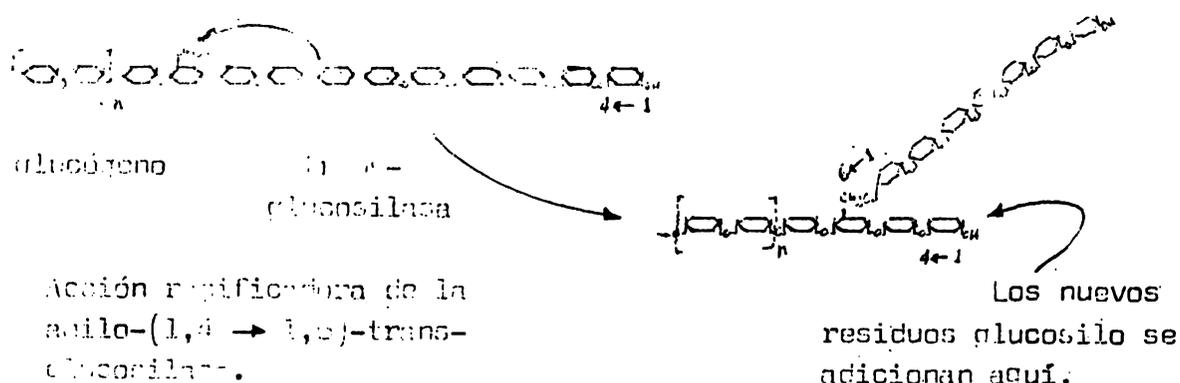


glucosilo adicionado y el grupo hidroxilo en el átomo C-4 de la glucosa terminal de la cadena, la reacción es catalizada por la glucógeno-sintetasa.



La enzima fue descubierta por Luis F. Leloir y G.E. Garavito en 1957 y se ha aislado en los tejidos de varios mamíferos (M. Rosell-Pérez et al., 1962; R.R. Traut y F. Lipmann, 1963; M. Rosell-Pérez y J. Larner, 1964), en invertebrados (T.A. Murphy y G.R. Wyatt, 1965), en las levaduras (I.D. Agrawal y E. Cabib, 1961-1962) y en ciertas especies bacterianas (W.Z. Hassid y S.F. Kaufeld, 1962; R.R. Traut y F. Lipmann, 1963). Estudiando el requerimiento de iniciador, L.F. Leloir (1964) llegó a la conclusión de que la enzima ejerce su máxima actividad en presencia de iniciadores constituidos por largas cadenas de glucosa.

La glucógeno-sintetasa no puede formar los enlaces α -(1 \rightarrow 6) que se encuentran en los puntos de ramificación de las cadenas del glucógeno, esta función es desempeñada por la enzima ramificadora amiló-(1,4 \rightarrow 1,6)-transglucosilasa. En la presencia de oligosacáridos terminales, de unos 10 residuos glucosilo, desde el extremo terminal de la cadena principal de glucógeno hacia el grupo hidroxilo de un resto de glucosa de la nueva cadena de glucógeno (o viceversa), formando un enlace α -(1 \rightarrow 6), con lo que se produce la ramificación.



Regulación de la síntesis del glucógeno.

La síntesis y la degradación del glucógeno no sólo están catalizadas por enzimas diferentes sino que son controladas de manera independiente pero coordinada. Tal como ocurre con la glucógeno-fosforilasa, la glucógeno-sintetasa también presenta en dos formas; fosforilada y desfosforilada. La forma fosforilada (D) resulta estimulada enormemente por el modulador positivo glucosa-6-fosfato (L.F. Leloir et al., 1959), siendo inhibida por el efector negativo UDP (D.F. Steiner et al., 1965); la forma desfosforilada (I) es activa en ausencia de la glucosa-6-fosfato (M. Rosell-Pérez

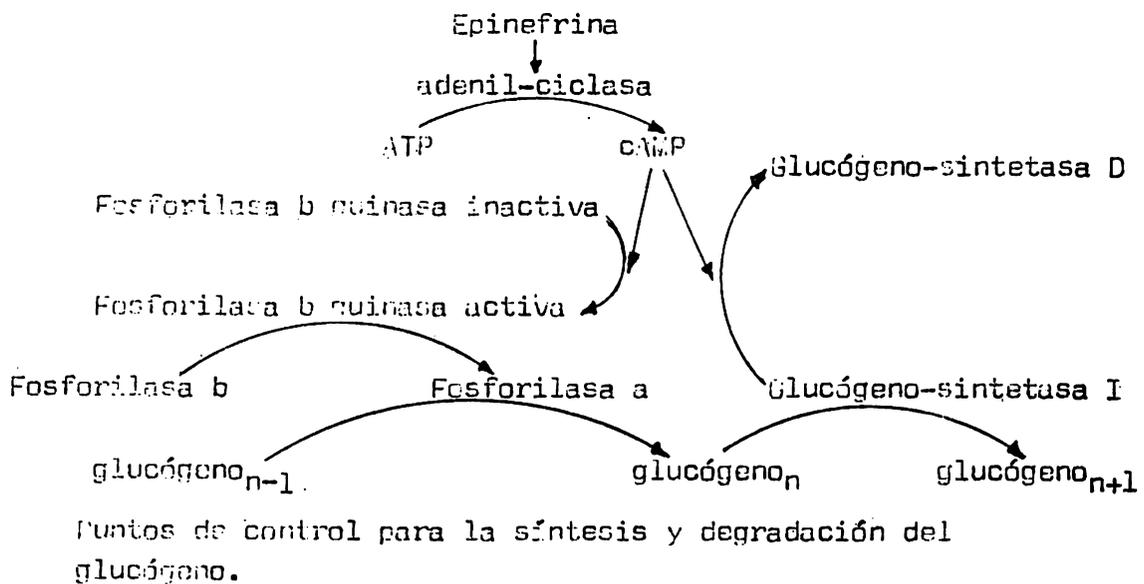
et al., 1962). La forma D puede ser desfosforilada a la I por la enzima glucógeno-sintetasa-fosfatasa (D.L. Friedman y J. Larner, 1963).



A su vez, la conversión de la forma I a la forma D es catalizada por la glucógeno-sintetasa-quinasa (D.L. Friedman y J. Larner, 1963).



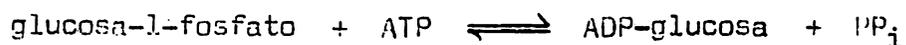
La glucógeno-sintetasa-quinasa también existe en dos formas, una activa y otra inactiva. La forma inactiva es modulada positivamente por el 3'-5'-AMP cíclico (H. Rosell-Percot y J. Larner, 1964), cuya síntesis a partir del ATP es promovida por la hormona epinefrina (E.W. Sutherland y T.W. Hall, 1960; J.S. Posner et al., 1965). Dado que el AMP cíclico funciona como modulador positivo de la glucógeno-sintetasa-quinasa, la que a su vez genera la forma inactiva (D) de la glucógeno-sintetasa, el efecto global de pequeñas cantidades de epinefrina trae como resultado la inhibición de la síntesis del glucógeno puesto que la forma D no ejerce su máxima actividad en ausencia de concentraciones relativamente altas de glucosa-6-fosfato. El control de la síntesis y degradación del glucógeno no sólo se ejerce por acción hormonal sino también por otros medios como la cantidad de calcio liberado por el retículo sarcoplásmico (W.L. Meyer et al., 1964; S. Ebashi, 1965; S. Ebashi y M. Endo, 1968) o por estimulación eléctrica (R. Staneloni y R. Piras, 1969).



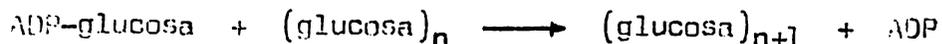
b) Síntesis del almidón. Como ocurrió en el caso del glucógeno, durante largo tiempo se creyó que el almidón era sintetizado por la fosforilasa del almidón, pero en 1961 Luis Federico Leloir observó que la concentración de fosfato en las células de las plantas es tal que la reacción catalizada por la fosforilasa se halla desplazada en dirección de la degradación más que de síntesis de almidón. En 1952, C.R. Stocking había señalado que la fosforilasa se encuentra en la porción soluble del citoplasma en tanto que el almidón es sintetizado en los plastidios, por lo que se concluyó que la síntesis del almidón no es catalizada por esta enzima.

El descubrimiento de la glucógeno-sintetasa llevó a la búsqueda de una enzima similar en las plantas y tal enzima fue descubierta por Luis Federico Leloir y colaboradores en 1961, asociada con los gránulos de almidón obtenidos de las matas jóvenes del frijol, maíz y jitomate; esta preparación enzimática catalizaba la síntesis de almidón a partir de la UDP-glucosa. Pronto hubo reportes acerca de otros sistemas enzimáticos, también aislados de gránulos de almidón, que podían realizar la transferencia de glucosa ya fuera de la ADP-glucosa o UDP-glucosa (T. Akazawa et al., 1964; T. Murata y T. Akazawa, 1964); pero como habían observado en 1961 E. Recondo y Luis F. Leloir, la transferencia de la D-glucosa es diez veces más rápida a partir de la ADP-glucosa.

Actualmente se sabe que la síntesis del almidón empieza con la formación de la ADP-glucosa a partir del ATP y la glucosa-1-fosfato en reacción catalizada por la enzima ADP-glucosa-pirofosforilasa (J. Espada, 1962).



La enzima también se ha detectado en las algas como *Chlorella* (H. Kausz en granos de arroz (T. Murata et al., 1963) y de maíz (E. Recondo et al., 1963). En la segunda etapa de síntesis del almidón, la amilosa-sintetasa promueve la transferencia de la D-glucosa desde la ADP-glucosa hacia una cadena de amilosa o un residuo de amilopectina, que actúan como iniciadores, para formar un enlace glucosídico α -(1 \rightarrow 4) (R. Kornfeld y D.H. Brown, 1962; H.P. Ghosh y J. Preiss, 1965).



En algunas plantas tanto la ADP-glucosa como la UDP-glucosa actúan como donadores activos de glucosa (R.S. Frydman y C.E. Cardini, 1964).

Capítulo III

METABOLISMO DE LIPIDOS

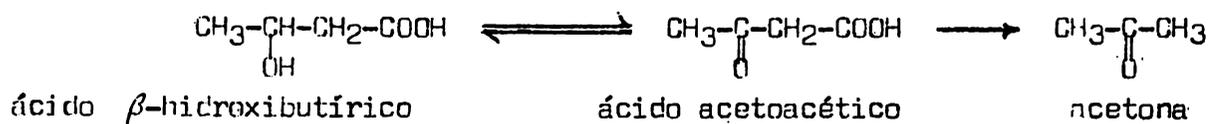
1. Degradación de ácidos grasos.

a) Introducción. El catabolismo de los ácidos grasos recibió considerable atención en los nuevos círculos bioquímicos que surgieron poco después de los primeros estudios sobre la glucólisis y la fermentación alcohólica.

Pero las primeras investigaciones acerca de la degradación de los ácidos grasos no se iniciaron por un verdadero interés en este aspecto de la química fisiológica, sino que surgieron como resultado de observaciones hechas en pacientes diabéticos, es decir, por un interés meramente clínico.

De tiempo atrás se sabía que los diabéticos producen grandes cantidades de orina, y habiendo detectado un sabor azucarado en la orina de pacientes que padecían esta enfermedad, Thomas Willis (1647) estudió los aspectos clínicos de este adelgazamiento. W. Petters (1857) identificó a la acetona como la sustancia responsable del olor característico en la respiración de los pacientes diabéticos en estado de coma; alimentado perros con sales sódicas de ácidos grasos G. Schotten (1882) descubrió la presencia de grandes cantidades de bicarbonato de sodio en la orina de tales animales. Una vez que G. Gerhardt (1865) identificó al ácido acetoacético en la orina de los diabéticos, V. Arnold (1900) señaló que este compuesto era un precursor de la acetona, lo cual planteó una interrogante: ¿Cuál es el origen bioquímico del ácido acetoacético?

En 1897, H.C. Geelmuyden había señalado en su trabajo titulado "Ueber Aceton als Stoffwechselprodukt" ("Sobre la acetona como producto del metabolismo") que los llamados "cuerpos cetónicos" acetona, ácido acetoacético y ácido β -hidroxibutírico eran productos derivados del metabolismo de los ácidos grasos. Esta proposición se confirmó en estudios posteriores de A. Magnus-Levy (1899), R. Waldengel (1899) y L. Schwartz (1900).



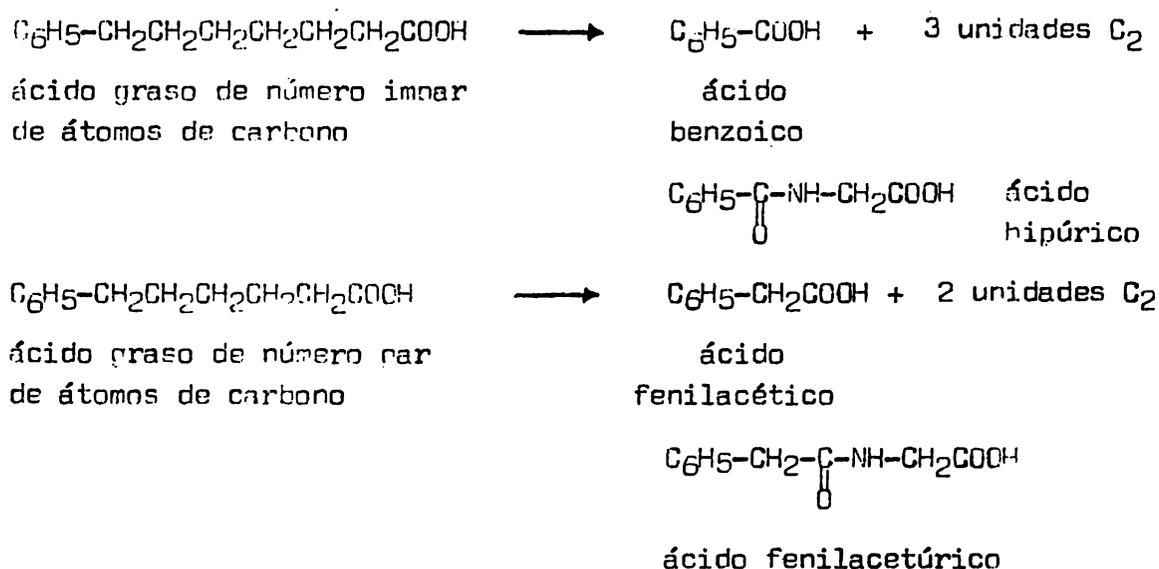
Así que a principios de este siglo el mérito de cualquier mecanismo propuesto para explicar la degradación de los ácidos grasos debía juzgarse en términos de su habilidad para explicar la formación de los "cuerpos cetónicos"

b) La teoría de Knoop de la β -oxidación. En su escrito de 1905 sobre la β -oxidación, Franz Knoop señala explícitamente la conclusión anterior. Como él mismo indica, otro hecho que se había observado era que los cuerpos cetónicos podían formarse a partir de los ácidos grasos con número par de átomos de carbono, como los contenidos en la leche, pero no se sabía que algún cuerpo cetónico derivaba de los ácidos grasos con número impar de átomos de carbono.

Las observaciones anteriores llevaron a Franz Knoop a tratar de esclarecer el mecanismo implicado en la degradación metabólica de los ácidos grasos, a la vez, Knoop desarrolló un método experimental para investigar esta transformación.

Con el fin de lograr la identificación de los metabolitos en la orina, Knoop decidió introducir un "marcador" químico que permitiera seguir la degradación de las cadenas de ácido graso en el cuerpo de animales alimentados con ácidos grasos de cadena no ramificada; así que se procedió a administrar a los perros ácidos grasos de C_1 a C_5 que portaban un grupo fenilo en el átomo de carbono del metilo terminal.

Knoop encontró que los fenil-derivados de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono eran degradados produciendo ácido benzoico que se excretaba en la orina, unido a la glicina, en forma de ácido hipúrico; a su vez, los ácidos grasos de número par de átomos de carbono eran metabolizados rindiendo ácido fenilacético que se recuperaba en la orina, acoplado con la glicina, como ácido fenilacetúrico.



Sobre la base de estos resultados Franz Knoop formuló una teoría para la degradación de los ácidos grasos, de acuerdo con esta proposición la transformación metabólica de los ácidos grasos ocurre mediante la eliminación sucesiva de unidades de dos átomos de carbono, una vez que los grupos β -metileno han sido oxidados a grupos β -ceto. La teoría de la β -oxidación fue formulada por Knoop en un trabajo publicado en 1904, apareciendo una presentación más concisa en 1905.

La degradación de los ácidos grasos por pérdida simultánea de dos átomos de carbono se encontró con la oposición de los químicos, como E. Friedmann (1909), pero esta objeción se descartó sobre la base de experimentos de oxidación in vitro, con H_2O_2 a 90° , en los que se demostró la formación de pequeñas cantidades de β -cetoácidos por oxidación de sales de amonio de ácidos grasos (H.D. Dakin, 1908).

c) Las investigaciones de Gustav Embden con hígado perfundido. Los estudios pioneros de Franz Knoop hallaron su continuación en los trabajos de Gustav Embden y colaboradores, quienes decidieron utilizar fracciones de hígado perfundido en lugar de organismos enteros.

Emden y colaboradores (1906-1908) descubrieron que la adición de ácidos grasos aumentaba la producción de acetona durante la perfusión, con sangre defibrinada, de fracciones de hígado fresco. Pero lo más sorprendente fue que sólo los ácidos grasos con número par de átomos de carbono producían un incremento en la cantidad de cuerpos cetónicos, en tanto que los ácidos grasos de número impar de carbonos no originaban acetona u ácido acetoacético.

En un intento por explicar la aparición de los cuerpos cetónicos a partir de los ácidos grasos pares, Emden recurrió a la teoría de la β -oxidación; Gustav Emden señaló que la eliminación sucesiva de dos átomos de carbono en los ácidos grasos pares daría lugar a la producción de una unidad residual de cuatro carbonos, apareciendo tal unidad en forma de ácido acetoacético o de uno de sus productos de conversión acetona o ácido β -hidrobutírico. Por otra parte, la β -oxidación de un ácido graso impar, según Emden, rendiría una unidad de tres átomos de carbono (p.ej., ác. propiónico) como producto residual. Un resultado importante de estas consideraciones fue la conclusión de que únicamente se formaría una molécula de ácido acetoacético por cada molécula de ácido graso par, además, se postuló que el ácido acetoacético era un producto intermedio en el catabolismo de los ácidos grasos.

Experimentos con animales diabéticos (J. Gaer y L. Blum, 1906) dieron apoyo a las conclusiones de Emden, mostrando que la administración de sales de los ácidos butírico o isovalérico a estos animales aumentaba la producción de los cuerpos cetónicos, en tanto que los ácidos propiónico o valérico no traían ningún incremento en la cantidad de tales sustancias.

d) Teorías para la formación del acetoacetato. En 1909, H.O. Dakin propuso una teoría para tratar de explicar el catabolismo de los ácidos grasos, su proposición constituía una aplicación directa de los conceptos de Franz Knoop sobre la β -oxidación y de la teoría de Gustav Emden, quien sostenía que los cuerpos cetónicos eran intermediarios obligados en la degradación de los ácidos grasos.

Dakin consideraba que también los ácidos α,β -insaturados constituían una etapa intermedia en la β -oxidación de los ácidos grasos saturados, pero su teoría daba poca atención a la unidad de dos átomos de carbono que se separa en el proceso de degradación; de hecho, en esa época se pensaba que tal unidad tenía una función misteriosa puesto que no se había detectado en los tejidos animales. Según Dakin, los átomos de carbono eliminados durante la β -oxidación debían contribuir a la formación de dióxido de carbono pero no a la producción de cuerpos cetónicos, los que de acuerdo con su teoría provenían únicamente de los cuatro últimos carbonos de la cadena del ácido graso.

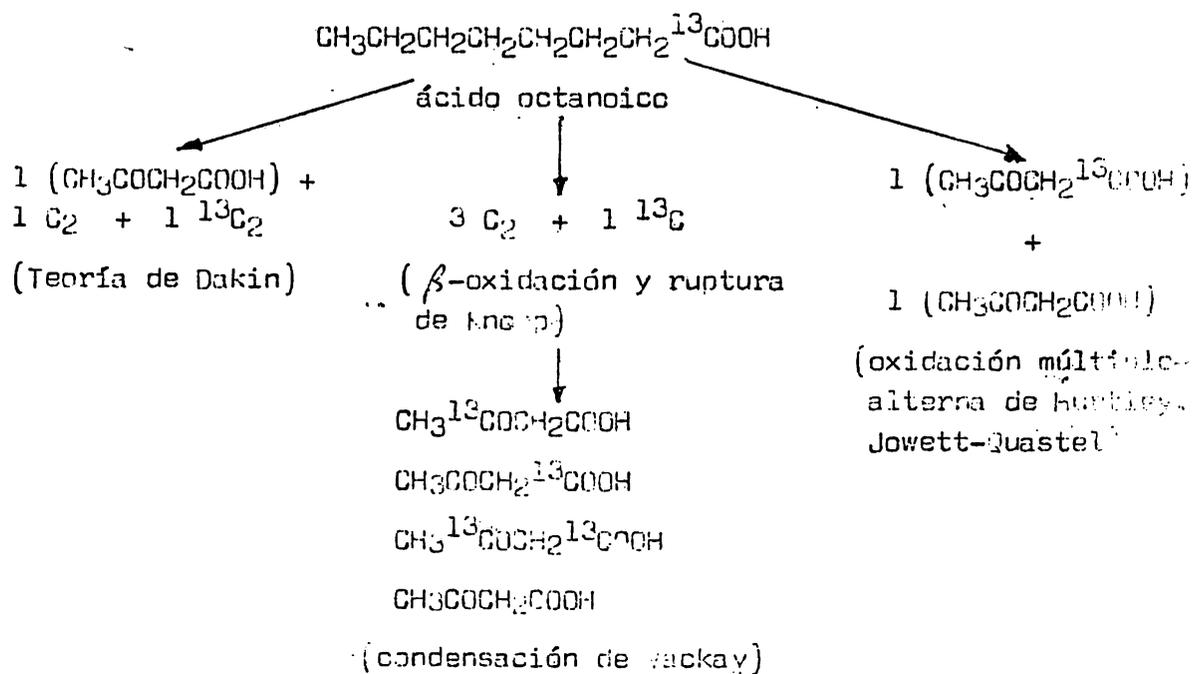
El argumento principal de la teoría de Dakin, que se aceptó hasta 1945, era que sólo se producía una molécula de acetoacetato por cada molécula de ácido graso administrado. Pero una serie de investigaciones mostraron que esta proposición no podía explicar cuantitativamente la producción de acetoacetato, ya que el ácido hexanoico rendía más acetoacetato que el ácido butírico (H.J. Deuel et al., 1936; L.F. Leloir y J.M. Muñoz, 1939; R.F. Witter et al., 1950-1952).

Otro argumento en contra de esta teoría fue el descubrimiento de que el acetoacetato podía formarse a partir del ácido valérico (C₅) (J.H. Quastel y A.H.M. Wheatley, 1933; E.M. Mackay et al., 1940; R.P. Geyer et al., 1950), ya que de acuerdo con el esquema de Dakin un ácido graso impar produciría un residuo de tres carbonos (CH₃CH₂CO-) y no el residuo de cuatro carbonos (CH₃CO-CH₂CO-) del cual se supone que deriva el acetoacetato.

En 1915, W.H. Hurttley había sugerido que la cadena de los ácidos grasos podía ser oxidada en carbonos alternos, para fragmentarse totalmente en unidades de cuatro carbonos que actuarían como precursoras del acetoacetato. M. Jowett y J.H. Quastel (1935) revivieron esta teoría con el nombre de "teoría de la oxidación múltiple alterna", empleando fracciones hepáticas los investigadores demostraron que la oxidación de los ácidos grasos de seis, ocho u diez átomos de carbono producía más acetoacetato del que se esperaría según la teoría de la β -oxidación; además, los ácidos grasos de cinco, siete o nueve átomos de carbono al ser oxidados también originaban cuerpos cetónicos.

Para tratar de explicar estas observaciones E.M. Mackay y colaboradores (1940) sugirieron que los ácidos grasos se escindían en fragmentos de dos carbonos, los que se condensarían posteriormente para formar ácido acetoacético. Esta teoría, que permitía explicar la cantidad de acetoacetato formado a partir de los ácidos grasos, recibió el nombre de "teoría de la β -oxidación-condensación".

En 1912, A. Loeb había detectado la producción de acetoacetato después de perfundir al hígado con acetato pero como lo señaló H.D. Dakin (1912) los intentos por aislar el acetato de los tejidos animales habían sido infructuosos. Fue en 1944, cuando S. Weinhouse y colaboradores hicieron una gran aportación experimental al introducir el método de marcado isotópico para estudiar la oxidación de los ácidos grasos. Los investigadores procedieron a incubar por semanas de hígado de rata con ácido octanoico marcado en el grupo carboxílico (C₇H₁₅C¹³OOH), después de aislar el ácido acetoacético formado de la mezcla de incubación Weinhouse y colaboradores hallaron que el isótopo únicamente se había incorporado en los carbonos carboxílico y carbonílico.



Los resultados obtenidos por Mel House y colaboradores permitieron descartar la teoría de Dakin, pues de acuerdo con tal esquema no debía encontrarse ningún isótopo en el acetoacetato. También quedó excluido el esquema de W.H. Bentley, según el cual, sólo debía encontrarse el isótopo en el carbono carboxílico del ácido acetoacético. Como puede verse, la incorporación isotópica estaba a favor de la hipótesis de la β -oxidación-condensación propuesta por E.M. Mackay.

Samuel Gurin y D.I. Crandall (1948) sugirieron la posibilidad de que inicialmente se formase acetoacetato marcado únicamente en el grupo carboxilo por fragmentación de los ácidos grasos en unidades de cuatro carbonos las que posteriormente se disociarían en unidades de dos carbonos para reorganizarse nuevamente formando acetoacetato marcado simétricamente. J.M. Buchanan y colaboradores (1947) incubaron preparaciones hepáticas con acetoacetato marcado en el carboxilo pero no pudieron observar ninguna redistribución isotópica al azar que condujera a la producción de acetoacetato marcado simétricamente.

Esto llevó a D.I. Crandall y col. a señalar que existían dos tipos diferentes de unidades de dos carbonos formadas en la degradación de los ácidos grasos: una de ellas era el tipo omega, proveniente de los dos átomos de carbono terminales y la otra, el tipo carboxílico, derivada de los demás átomos. Pero I.L. Naikoff y col. (1951) no pudieron detectar a ninguna de tales "unidades".

No obstante, Samuel Gurin y D.I. Crandall (1948) indicaron que los experimentos isotópicos, tomados en conjunto, mostraban que la fragmentación de los dos átomos de carbono de los ácidos grasos ocurría antes de la formación del acetoacetato.

Ahora bien, aunque los experimentos con isótopos permitieron identificar la naturaleza química de los fragmentos separados de las cadenas de ácido graso, la unidad de dos carbonos no se identificó como tal hasta que se detectó su presencia in vivo, mediante un experimento ideado por K. Bernhard (1940) y que consistía en capturar tal fragmento en forma de un compuesto fácilmente excretable.

Alimentando un perro con una amina extraña al organismo y ácido acético marcado con deuterio Bernhard observó la excreción de derivados deuterio-acetilados, y lo concluyó que en condiciones fisiológicas debía ocurrir la acetilación de las sustancias introducidas al organismo. Konrad Bloch y David Rittenberg (1944) demostraron que los ácidos grasos marcados con deuterio tal como el butírico, n-valérico, iso-valérico y mirístico eran fuente de grupos deuterio-acetilados, en tanto que los ácidos propiónico y undecílico no producían derivados de este tipo.

Estos resultados sugirieron claramente que la β -oxidación y la eliminación de los grupos acetilo a partir de los β -cetoácidos eran etapas importantes para el metabolismo de los ácidos grasos (K. Bloch, 1947).

en el primeros métodos de investigación. Una gran dificultad que se encontró en las primeras investigaciones acerca de los mecanismos enzimáticos involucrados en la degradación de los ácidos grasos fue la imposibilidad de obtener preparaciones activas libres de células.

Aunque en 1907, Gustav Embden había descubierto la producción de dióxido de carbono y agua a partir de los ácidos grasos, se había logrado muy poco progreso experimental desde esa fecha pero en 1939, J.M. Muñoz y Luis Federico Leloir describieron una nueva vía a las investigaciones al lograr la oxidación total de un ácido graso, el ácido butírico, mediante un sistema sin células obtenido del hígado del cerdo de quinea. Los investigadores mostraron que las partículas aisladas por ellos, una vez lavadas, eran capaces de oxidar los ácidos grasos después de adicionar ciertos componentes accesorios como la adenosina-5'-fosfato, fosfato inorgánico, Mg^{2+} ó Mn^{2+} , citocromo c y alguno de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico p.ej., succinato o fumarato. Pero los homogenados hepáticos de Muñoz y Leloir eran sumamente inestables, además de que no podían oxidar los ácidos grasos superiores como el esteárico, oleico u palmítico.

Después Claude desarrolló el método de centrifugación diferencial para obtener preparaciones mitocondriales libres de células, mostrando que tales partículas son las "plantas de poder" en la célula, W.C. Schneider y V.R. Potter (1949) así como Albert Lester Lehninger y E.P. Kennedy (1949), de manera independiente, identificaron con las mitocondrias a las partículas activas de la preparación hepática de Leloir y Muñoz. En 1945, Albert L. Lehninger también había observado que la oxidación de los ácidos grasos en las preparaciones mitocondriales de Leloir y Muñoz sólo tenía lugar cuando ocurría la oxidación simultánea de otros metabolitos, un acoplamiento innecesario en presencia del ATP, lo cual sugirió que la oxidación acoplada debía producir ATP.

En 1948, W.E. Knox y col. hallaron que en presencia de fosfato inorgánico, Mg^{2+} , AMP, ADP ó ATP las preparaciones mitocondriales eran capaces de oxidar a cualquier componente del ciclo de Krebs, produciendo dióxido de carbono y agua; pero las preparaciones mitocondriales no efectuaban la degradación de los ácidos grasos a menos que estuviese presente un intermediario del ciclo del ácido cítrico, cuya oxidación iniciaba la de los ácidos grasos.

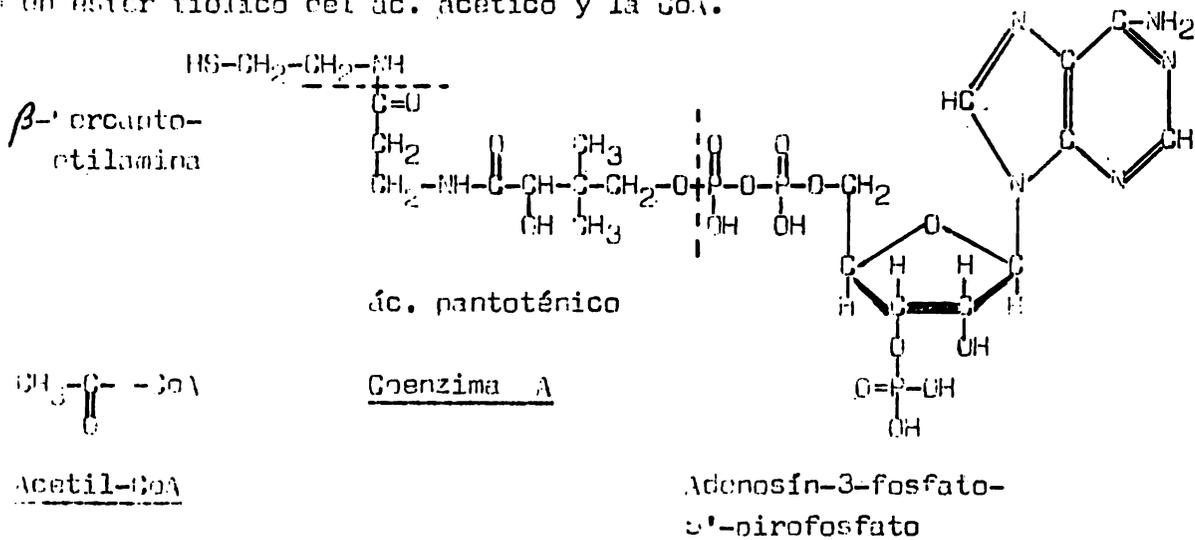
Empleando preparaciones mitocondriales obtenidas del riñón o del tejido cardíaco, A.L. Grafflin y David Ezra Green (1948) descubrieron que tales partículas oxidaban los ácidos grasos pares formando dióxido de carbono y agua, en tanto que los ácidos grasos impares o ramificados rendían ácido propiónico. En investigaciones posteriores, David E. Green (1954) mostró que la oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias ocurría de acuerdo con el esquema de β -oxidación, indicando además que las preparaciones mitocondriales del hígado también formaban acetoacetato.

En suma, las investigaciones con preparaciones mitocondriales no aportaron mucha información con respecto al mecanismo implicado en la degradación de los ácidos grasos pero permitieron establecer que tal proceso se efectúa de acuerdo con el esquema de Knorr de la β -oxidación; en adición, estos trabajos mostraron la relación que existe entre el sistema oxidante de los ácidos grasos y el ciclo del ácido tricarboxílico.

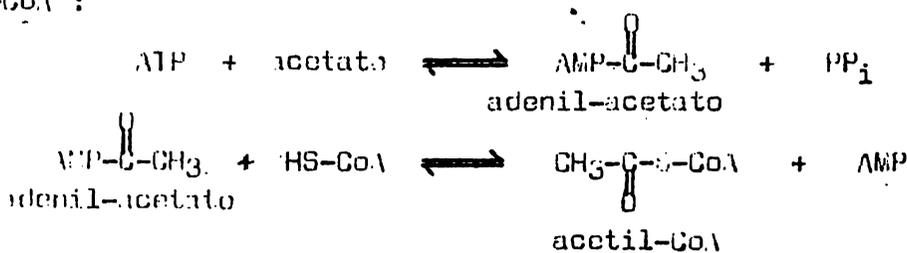
El papel de la Acetil-CoA durante la oxidación de los ác. grasos.— Una vez se entendió que el metabolismo del acetato se efectúa a través del Ciclo de Krebs, ya no se volvió a considerar al acetoacetato como un intermediario obligatorio, durante el catabolismo de los ác. grasos.

Ya se sabía en esa época (1950) que la oxidación del acetato y del acetoacetato ocurría mediante el Ciclo de Krebs y, aunque no se había descubierto a la fecha, había algunas evidencias de que la sustancia que reacciona durante la oxidación de los carbohidratos con el oxalacetato, para dar citrato, no es el piruvato mismo sino un derivado acetilado que se forma vía una descarboxilación oxidativa del piruvato (E.R. Stadtman, 1950; J.R. Stern, S. Ochoa y F. Lynen, 1952; S. Kornberg, J.R. Stern, I.C. Gunsalus y S. Ochoa, 1950; S. Kornkes, A. Del Campillo, I.C. Gunsalus y S. Ochoa, 1951).

sin embargo, los intentos de aislar a la acetil-CoA habían sido infructuosos durante varios años. Hasta que, en 1951, Feodor Lynen y E. Reichert lograron aislarla a partir de las levaduras y pudieron resolver el problema del mecanismo involucrado en la formación del intermediario activo de 2 carbonos, demostrando que el grupo tiol de la CoA es el grupo activo; y, reconociendo a la acetil-CoA, como un éster tiólico del ác. acético y la CoA.



Y, T. Chou y Fritz Lipmann (1952), demostraron que la activación del acetato, para formar la acetil-CoA, requiere de la energía del ATP. Por lo que Paul Berg, en 1953, propuso un mecanismo en dos pasos para explicar la formación de la acetil-CoA:



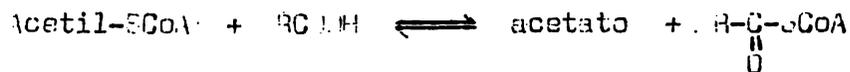
En tal esquema, la energía del ATP se conserva en un intermediario, el adenil-acetato y, se transfiere posteriormente a la acetil-CoA. En 1958, M.B. -- y col. indicaron que la activación de los ác. grasos sigue el mecanismo anterior, siendo la CoA el receptor del grupo activo de 2 carbonos, el grupo acilo.

Activación de los ác. grasos.- En 1956, M.S. Hoopland y col. indicaron que la activación de los ác. grasos sigue el mecanismo anterior, siendo la CoA el centro del grupo activo de 2 carbonos, el grupo acilo.

En los mamíferos la activación de los ác. grasos ocurre de la manera siguiente:



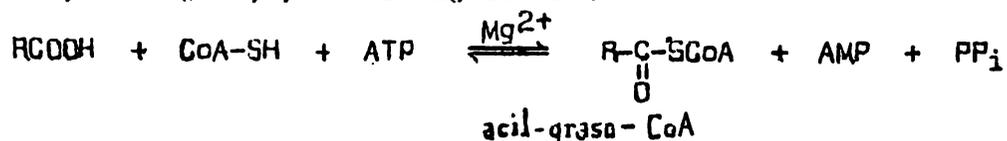
Mientras que en las bacterias la acetil-CoA puede activar directamente al ácido graso, sin emplear ATP. Esto se debe a la presencia de la acetil-CoA-transferasa, identificada por E.R. Stadtman en 1953:



En varios laboratorios se investigaron las diferentes enzimas involucradas en la formación de los ésteres acil-CoA grasos y, de estos trabajos, se logró la identificación plena de tres de ellas. Las enzimas reciben el nombre de enzimas activantes o de tiorquininas de ácido graso.

I. Rose y col., en 1954, aislaron a la acetato-tiorquinasa (acetil-CoA sintetasa) a partir de *S. haemolyticus* y de *E. Coli*; la enzima activa al acetato, propionato y acrilato. M.G. Jones y col. (1953) aislaron una enzima similar de los ejidos animales y vegetales, de las levaduras y de *Rhodospirillum rubrum*. En 1953, H.S. Mahler y col. pudieron aislar a la tiorquinasa de ácido graso de cadena media (butiril-CoA sintetasa) a partir de las mitocondrias del hígado de ratón. La enzima activa a los ác. grasos de cadena corta (C_4-C_{11}). La tiorquinasa de ácido graso de cadena larga (acil-CoA sintetasa), aislada por Arthur Kornberg y I.E. Pricer en 1953, a partir de extractos del hígado del cerdo de guinea, activa a los ác. grasos de cadena larga (C_8-C_{20}). Las dos últimas tiorquininas activan a los ác. grasos saturados así como a los no saturados; también activan los α - y β -hidroxiácidos.

La reacción global catalizada por las tiorquininas en los mamíferos requiere el ATP y del Mg^{2+} , y es la siguiente:



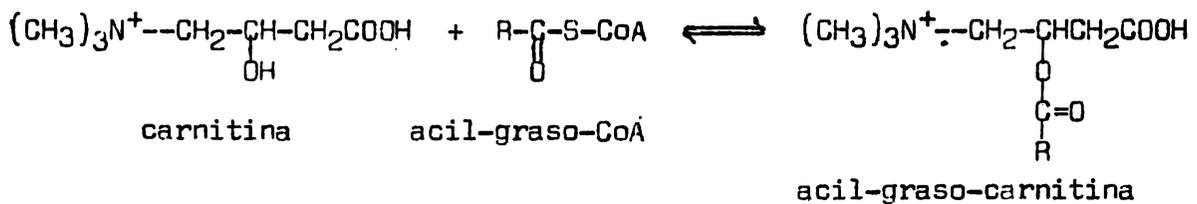
El papel de la carnitina.- Los grupos acil-graso-CoA se forman fuera de la membrana mitocondrial y la β -oxidación tiene lugar en la matriz de las mitocondrias; por otra parte, los grupos acil-graso-CoA tienen una capacidad limitada para atravesar la membrana mitocondrial interna pero su entrada es estimulada por la carnitina (ác. γ -trimetilamonio- β -hidroxibutírico), de la que se sabía de tiempo atrás que se halla ampliamente distribuida en los organismos pero se desconocía su función metabólica.

Se sugirió la importancia metabólica de la carnitina al observar que es un

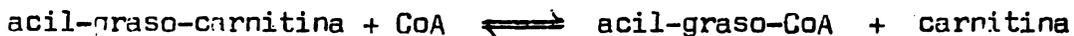
componente obligado en la dieta de los insectos, los que han perdido la capacidad de sintetizarla.

Ahora bien, el papel desempeñado por la carnitina en el metabolismo de los ácidos grasos consiste en la transferencia de grupos acilo entre dos pozas mitocondriales de coenzima A; la interna, que está en contacto con las enzimas de la β -oxidación en la matriz mitocondrial, y la externa que es accesible a los ácidos grasos, o a los acil-graso-CoA, que son incapaces de atravesar la membrana mitocondrial interna. (E. Lundsgaard, 1950; I.B. Fritz, 1955).

La acil-CoA graso: carnitín-transferasa de ácido graso cataliza la transferencia del grupo acilo graso desde su enlace tioéster con la CoA hacia un enlace éster oxidado con el grupo hidroxilo de la carnitina (S. Friedman y C. Fraenkel, 1955).



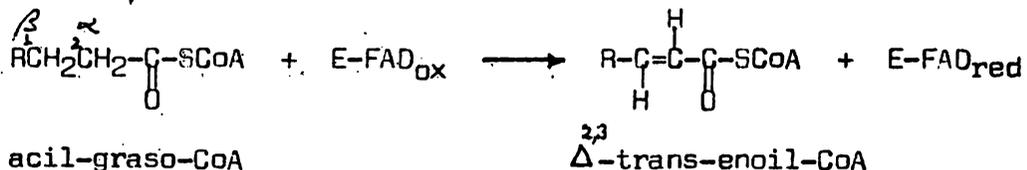
La acil-graso-carnitina atraviesa fácilmente la membrana mitocondrial interna para que, finalmente, el grupo acil-graso sea transferido de la carnitina a la coenzima A intramitocondrial por acción de la carnitín-transferasa de ácido graso intramitocondrial.



Una vez activada la molécula del ácido graso, las reacciones de oxidación que conducen a su degradación se efectúan en los compartimientos intramitocondriales (F. Lynen y S. Ochoa, 1953; H. Beinert, R.M. Bock, D.S. Goldman, D.E. Green, H.R. Mahler, S. Mii, P.G. Stansly y S.J. Wakil, 1953).

f) Etapas enzimáticas para la oxidación de los ácidos grasos.

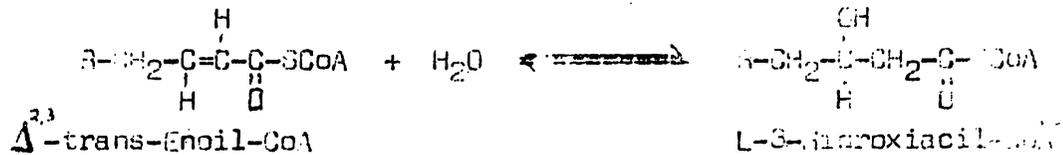
1) Una α, β -deshidrogenación del acil-graso-CoA.



Una deshidrogenasa de acil-graso-CoA fue aislada inicialmente por David E. Green y col. en 1954, habiéndose identificado desde entonces cuatro tipos diferentes de tales enzimas, las cuales son específicas para una determinada longitud de cadena de ácido graso (F.L. Crane y col., 1956; F.L. Crane y H. Beinert, 1956; G. Hauge, F.L. Crane y H. Beinert, 1956).

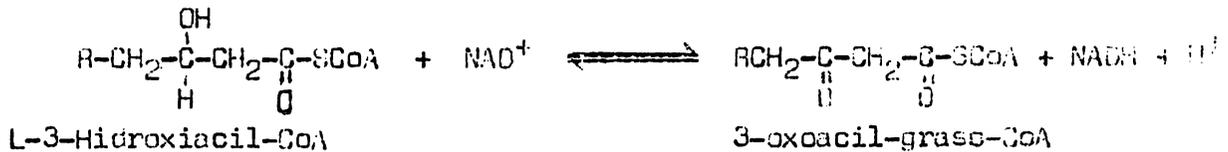
Las deshidrogenasas son flavoproteínas que ceden dos electrones a la cadena respiratoria a través de una segunda flavoproteína, la cual está unida al citocromo b de la cadena respiratoria por medio de la coenzima Q (F.L. Crane, J.G. Hauge y H. Beinert, 1955; P.B. Garland y col., 1967).

2) Hidratación del acil-graso-CoA α,β -insaturado



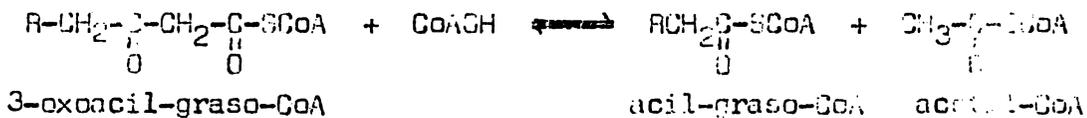
La enoil-hidratasa (3-hidroxiacil-CoA-hidrolasa) cataliza la hidratación reversible del doble enlace de los ésteres $\Delta^{2,3}$ -enoílicos para formar β -hidroxiacil-CoA. La enzima fue aislada inicialmente, en forma cristalina, por J.R. Stern y col. (1953) a partir del hígado de res y por S.J. Wakil y H.R. Lester (1954).

3) Oxidación del 3-hidroxiacil-CoA



La L-3-hidroxiacil-CoA es oxidada en presencia del NAD^+ por la L-3-hidroxiacil-graso-CoA-deshidrogenasa para formar el correspondiente β -cetoacil-graso-CoA: 3-oxoacil-graso-CoA. La enzima fue purificada inicialmente, a partir del hígado de la oveja, por F. Lynen y col. (1952); y, posteriormente, a partir de las mitocondrias del hígado de res por S.J. Wakil y col. (1954). La enzima no es muy específica con respecto a la longitud de cadena del ácido graso pero es completamente específica para el isómero L.

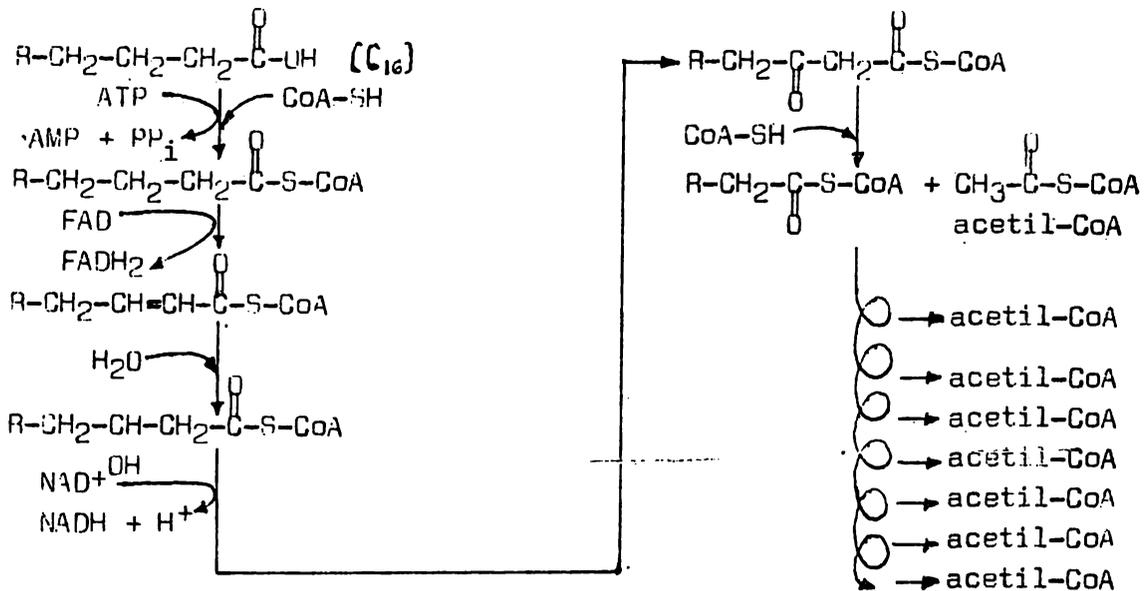
4) Ruptura tiolítica del β -cetoacil-graso-CoA



Finalmente, el 3-oxoacil-graso-CoA experimenta una escisión en presencia de una molécula de CoA libre para producir un fragmento de dos carbonos, el acetil-CoA, y un nuevo acil-graso-CoA cuya cadena ha perdido dos átomos de carbono.

La reacción es catalizada por la β -oxotiolasa o tiolasa la cual fue descubierta independientemente por F. Lynen y S. Ochoa (1953) quienes la llamaron 'tiolasa'; por D.S. Goldman (1954) quien la llamó la β -cetoacil-CoA-asa y por J.R. Stern et al. (1956) quienes la llamaron 3-cetoacil-CoA-tiolasa. La tiolasa fue cristalizada por W. Seubert y col. (1968) y mostró una gran especificidad de sustrato.

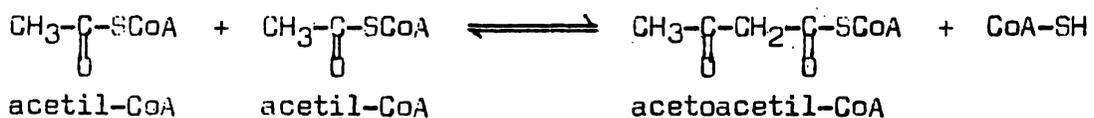
El resultado neto después de los cuatro pasos de la β -oxidación consistió en la eliminación de dos átomos de carbono, en forma de la acetil-CoA, del acil-graso-CoA y la formación de un nuevo acil-graso-CoA con dos átomos de carbono menos. El ciclo se repite hasta que la cadena del ácido graso es degradada por etapas hacia unidades de acetil-CoA, las cuales pueden incorporarse ahora al ciclo de Krebs.



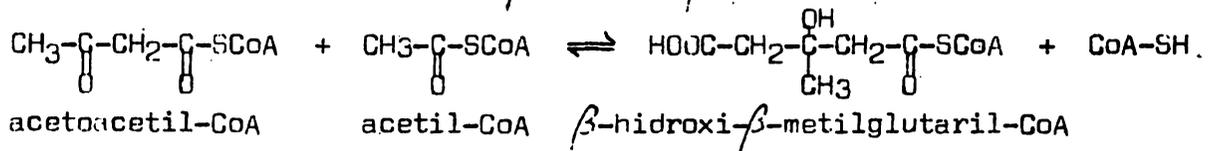
β -oxidación de los ácidos grasos.

g) Oxidación de los cuerpos cetónicos. Parte de la acetil-CoA formada en a β -oxidación de los ácidos grasos puede ser utilizada en el hígado de algunos vertebrados para producir acetoacetato libre y β -hidroxibutirato, estas dos sustancias reciben el nombre de "cuerpos cetónicos" y son transportadas por la corriente sanguínea hacia otros tejidos donde ocurre su degradación por medio del ciclo del ácido tricarboxílico.

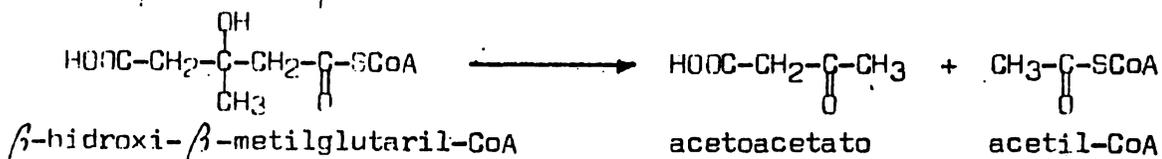
Feodor Lynen y col. (1952), así como J.R. Stern y col. (1953), descubrieron a producción de acetoacetil-CoA en preparaciones hepáticas y de inmediato se demostró que tal derivado podía formarse de dos maneras; cierta cantidad procede e la β -oxidación del fragmento terminal de los ácidos grasos de cadena larga, ero la mayor parte se origina en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, eacción que cataliza una tiolasa (D.E. Green y col., 1953).



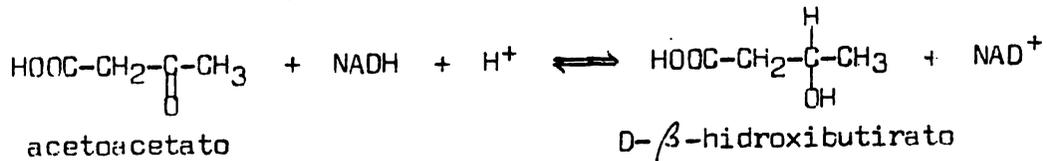
El acetoacetil-CoA se convierte en acetoacetato por medio de un proceso conocido como desacilación, el cual es catalizado por dos enzimas (F. Lynen y col., 1958; I.C. Caldwell y G.J. Drummond, 1963). La primera enzima, aislada del hígado por H. Rudney en 1957, promueve la condensación del acetoacetil-CoA con otra molécula de acetil-CoA para rendir β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA.



La otra enzima, obtenida por B.K. Bachhawat y col. (1955), cataliza la escisión del β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA para producir acetoacetato y acetil-CoA.



El acetoacetato formado es reducido a D- β -hidroxibutirato por la D- β -hidroxibutirato-deshidrogenasa ligada al NAD (E. Friedmann y C. Maase, 1910; A.J. Akeman y H.D. Dakin, 1919).



La mezcla de acetoacetato y β -hidroxibutirato es transportada por el torrente sanguíneo hacia otros tejidos para que ambas sustancias sean degradadas por el ciclo del ácido tricarboxílico. Se conocen dos mecanismos para lograr la oxidación del acetoacetato, en el primero se emplea el ATP en una reacción muy semejante a la activación de un ácido graso.



En el segundo mecanismo, la coenzima A es transferida desde el succinil-CoA hacia el acetoacétato, de acuerdo con la reacción siguiente (J.R. Stern y col., 1956).



Esta reacción es promovida por la succinil- β -cetoacil-CoA transferasa ó CoA-transferasa que fue obtenida en forma pura por J.R. Stern y col. (1956) a partir del corazón de cerdo. La enzima activa la mayor parte del acetoacetato que interviene en el ciclo del ácido tricarboxílico realizado en los tejidos periféricos como el corazón y riñón, simultáneamente el ciclo de Krebs aporta la succinil-CoA necesaria para la oxidación del acetoacetato a través de la degradación del α -cetoglutarato.

R.J. Bing y col. (1954) mostraron que el acetoacetato también es metabolizado en el corazón humano, en tanto que E.T. Waters y col. (1938) estudiaron el metabolismo del acetoacetato en el corazón de perro; R.H. Barnes y col. (1938) obtuvieron conclusiones similares.

2. Biosíntesis de ácidos grasos.

a) Introducción. Una vez que se identificó plenamente la vía metabólica para la degradación de los ácidos grasos, la β -oxidación, y que se tuvo conocimiento del papel que desempeña la coenzima A en tal proceso, se llegó a la conclusión de que la biosíntesis de los ácidos grasos podría efectuarse por la simple inversión de las etapas enzimáticas implicadas en la β -oxidación; esta opinión surgió debido a que las enzimas que participan en las reacciones de la vía oxidativa se habían aislado en un estado de alta pureza, habiéndose demostrado que cada etapa catalizada era reversible.

Este concepto fue aceptado por la comunidad bioquímica en general, llegando a considerarse en los libros de texto, no obstante de que se carecía de evidencias experimentales concluyentes (F. Lynen, 1953; P.G. Stansly y H. Beinert, 1953; Seubert y col., 1957; F. Lipmann, 1950; F. Lynen y E. Reichert, 1951); sin embargo, pronto se acumularon una serie de observaciones que no coincidían con este punto de vista.

b) Las primeras investigaciones. Los trabajos de Samuel Gurin y col. reportaron las primeras evidencias sobre la posible existencia de un sistema distinto a la β -oxidación para lograr la síntesis de los ácidos grasos.

Empleando un sistema compuesto por homogenados o extractos sin células obtenido del hígado de pichón, Gurin y col. (1950-1953) mostraron que estas preparaciones podían catalizar la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (C_{10}) a partir del acetato- C^{14} marcado. Después de tratar los extractos hepáticos con carboxión activado los investigadores encontraron que se requería la presencia de ATP, ADP y CoA para restaurar la actividad enzimática original, además, el citrato y Mg^{2+} ejercían un efecto estimulante sobre las preparaciones hepáticas (R.O. Brady y S. Gurin, 1950-1952; F. Daturi y S. Gurin, 1953; J. Van Baalen y S. Gurin, 1953). G. Popják y A. Tietz (1954) obtuvieron resultados similares utilizando extractos solubles, aislados de glándulas mamarias de conejas o ratas en periodo de lactancia, que promovían la conversión del acetato en ácidos grasos con longitudes de cadena de C_{10} a C_{18} .

Estas observaciones fueron confirmadas por J.W. Porter y A. Tietz (1957), quienes haciendo uso de preparaciones purificadas del hígado de pichón mostraron que el ácido graso sintetizado en mayor proporción era el ácido palmítico (60%-70%), en tanto que los ácidos esteárico y mirístico constituían los otros productos de síntesis; no se detectó la acumulación de ácidos grasos de cadena corta (C_4 - C_{10}) durante el proceso de síntesis. En adición, Porter y Tietz descubrieron que los ácidos grasos formados por los extractos hepáticos eran ácidos libres no ésteres de la coenzima A.

c) Las aportaciones decisivas de Salih J. Wakil. Las investigaciones de Salih J. Wakil y col. (1957-1958) proporcionaron las evidencias experimentales decisivas para confirmar que la síntesis de los ácidos grasos se efectúa a través de un esquema distinto a la mera inversión de la β -oxidación.

En 1957, Salih J. Wakil, J.W. Porter y D.M. Gibson reportaron el aislamiento y purificación de un sistema enzimático, obtenido del hígado de pichón, capaz de realizar la síntesis de novo de ácidos grasos de cadena larga a partir de la acetyl-CoA. En otra publicación del mismo año, Wakil y col. indicaron que el ATP, ADH, NADPH, la CoA, el isocitrato y un compuesto sulfhidrilo tal como el glutatión o cisteína, eran absolutamente necesarios para que se efectuara la síntesis de ácidos grasos, unos cofactores muy distintos de los que se utilizarían si realmente ocurriera la inversión de la β -oxidación. Pero la observación más sorprendente que hicieron los investigadores fue que el dióxido de carbono, o el bicarbonato, eran esenciales para la síntesis de los ácidos grasos; sin embargo, como lo señalaron Wakil y col., la función del bicarbonato no era la de promover la incorporación de CO_2 a la cadena de ácido graso en crecimiento puesto que el carbono marcado del $H^{14}CO_3$ no se encontró en la cadena del ácido palmítico aislado (D.M. Gibson, E. Titchener y S.J. Wakil, 1958).

Esta observación vino a sumarse a los reportes iniciales acerca del efecto estimulante que ejercen los buffers de bicarbonato y el CO_2 gaseoso sobre la síntesis de ácidos grasos en sistemas con fracciones hepáticas (R.O. Brady y S. Gurin, 1950) y en extractos sin células obtenidos de las levaduras (H.P. Klein, 1957), que aún permanecían sin explicación.

La participación de la proteína acarreadora de grupos acilo en la síntesis de los ácidos grasos había sido observada inicialmente por P.R. Vagelos y col. (1963), quienes lograron demostrar la formación del acetoacetil-ACP y la conversión posterior de este derivado en ácidos grasos de cadena larga.

Se pudo ver entonces que los pasos intermedios en la síntesis de los ácidos grasos involucran la transferencia de los grupos acilo del acetil-CoA y malonil-CoA hacia la ACP para rendir los respectivos derivados acetil-ACP y malonil-ACP, que son los verdaderos intermediarios que se condensan durante el proceso de síntesis, y no los derivados acilo de la Coenzima A como se había creído alguna vez (A.W. Alberts, P.W. Majerus, S. Talamo y P.R. Vagelos, 1964).

e) La sintetasa de los ácidos grasos. La inhibición de la síntesis de los ácidos grasos por agentes que bloquean los grupos sulfhidrilo (S.J. Wakil y col., 1957; R.O. Brady, 1960; M.G. Horning y col., 1961), así como la gran facilidad que exhiben las enzimas implicadas en este proceso para unirse a los grupos acil-CoA (R.O. Brady y col., 1960; R. Bressler y S.J. Wakil, 1961), llevaron a F. Lynen y M. Tada a sugerir la formación de intermediarios del tipo acil-S-enzima durante la biosíntesis de los ácidos grasos.

Esta hipótesis se confirmó cuando Feodor Lynen (1962), estudiando el complejo enzimático que sintetiza los ácidos grasos en *E. coli*, descubrió que el producto de condensación entre la acetil-CoA y la malonil-CoA era el complejo acetoacetil-S-enzima; basado en esta observación, Lynen propuso un esquema para el proceso que conduce a la síntesis de los ácidos grasos. En tal esquema se postulaba la transferencia de un grupo malonilo hacia una enzima-SH, lo cual era seguido por condensación entre la malonil-S-enzima formada y el acetil-CoA para rendir el complejo acetoacetil-S-enzima; éste último, después de pasar por dos etapas de reducción con NADPH y una deshidratación, daría un acil-S-enzima saturado, el butiril-S-enzima. A continuación el complejo butiril-S-enzima reaccionaría con la coenzima A para formar un derivado acil-CoA, el butiril-CoA, quedando libre nuevamente la enzima-SH; este esquema requería la presencia de un "complejo de enzimas" que sería el responsable de la secuencia completa de reacciones que llevan a la síntesis de los ácidos grasos.

Después de mostrar la presencia de siete grupos NH_2 -terminales en el complejo enzimático que sintetiza los ácidos grasos en *E. coli* -lo que indicaba la presencia de siete enzimas diferentes-, Lynen (1962) propuso que las siete enzimas de esta "sintetasa" de ácidos grasos debían hallarse dispuestas en torno a un grupo sulfhidrilo central; de tal forma que los grupos acilo intermediarios (unidos covalentemente al grupo sulfhidrilo central) se encontraran siempre junto a los sitios activos de las enzimas participantes. Casi de inmediato se reportó el aislamiento de la sintetasa de los ácidos grasos a partir de varias fuentes como el hígado (R. Bressler y S.J. Wakil, 1961; J.D. Brodie y col., 1958), las bacterias (A.W. Alberts, 1964; P.W. Majerus y P.R. Vagelos, 1964) y las células de levadura (F. Lynen, 1961; R.Y. Hsu y col., 1965), mostrándose también que este complejo enzimático cataliza la siguiente reacción global, en la que se condensan una molécula de acetil-CoA y siete moléculas de malonil-CoA, para formar una molécula de ácido palmítico.

Este descubrimiento, junto con el conocimiento de que el acetaldehído es un mejor precursor que el acetato (R.O. Brady y S. Gurin, 1951) y que la adición de malonato provoca un marcado incremento en la síntesis de ácidos grasos (G. Popják y A. Tietz, 1955), llevó a Wakil a sugerir que el requerimiento de bicarbonato estaba ligado con la síntesis, a partir de la acetil-CoA, del malonil-CoA y que éste último desempeñaría el papel de donador de unidades C₂ durante el alargamiento de las cadenas de ácido graso (S.J. Wakil, 1958). La participación del malonil-CoA como un intermediario en la síntesis de los ácidos grasos también fue sugerida por R.O. Brady (1958) quien propuso que tal derivado podía formarse a partir de la acetil-CoA, ATP y CO₂, mediante una reacción parecida a la carboxilación del propionil-CoA que rinde metil-malonil-CoA.

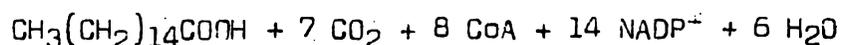
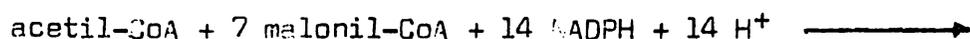
En 1958, Salih J. Wakil pudo demostrar experimentalmente su hipótesis de que el malonil-CoA es el primer intermediario en la síntesis de los ácidos grasos al lograr el aislamiento e identificación de tal compuesto. D.M. Gibson, E. Titcher y S.J. Wakil (1958) observaron la formación de malonil-CoA por carboxilación de la acetil-CoA, en presencia de ATP, Mn²⁺ y de una fracción enzimática rica en biotina, obtenida de extractos hepáticos de pichón.



A continuación, la malonil-CoA era convertida fácilmente en ácidos grasos por otra fracción enzimática en presencia del NADPH. O sea que la fracción enzimática I (dependiente de biotina) promovía la carboxilación del acetil-CoA rindiendo malonil-CoA, en tanto que la fracción enzimática II catalizaba la condensación, con desprendimiento de CO₂, de las unidades de malonil-CoA para producir las cadenas de ácido graso, empleando el NADPH como agente reductor. En 1959, Salih J. Wakil y J. Ganguly propusieron un esquema para tratar de explicar la función del malonil-CoA en la ruta biosintética de los ácidos grasos, los investigadores postularon la existencia de un derivado acil-dicarboxílico de la coenzima A, el acetomalonil-CoA, que experimentaría sucesivamente una reducción, deshidratación y una nueva reducción antes de que se efectuase la descarboxilación. R.O. Brady, R.M. Bradley y E.G. Trams (1960) también propusieron un esquema para la reducción de palmitato a partir de la malonil-CoA, en el cual sostenían que el palmitato se formaba de una mol de acetil-CoA y siete moles de malonil-CoA. En 1939, F. Lynen había sugerido un mecanismo en el que la malonil-CoA se formaba por carboxilación del acetil-CoA, ocurriendo la condensación posterior de los dos acil-derivados de la coenzima A.

En vista de lo anterior, surgió una serie de controversias con respecto al papel que desempeñan tanto la malonil-CoA como los grupos acilo durante la síntesis de los ácidos grasos.

d) El descubrimiento de la proteína acarreadora de grupos acilo (ACP). De manera independiente Salih J. Wakil y col. (1964) así como P.W. Majerus, A.W. Roberts y P.R. Vagelos (1964), descubrieron que en *E. coli* los grupos acilo que actúan como intermediarios en la síntesis de los ácidos grasos no se hallaban unidos a la coenzima A como se pensaba entonces, sino que estaban ligados por medio de un enlace tioéster a una proteína de bajo peso molecular que funcionaba como transportadora de tales grupos. La proteína recibió el nombre de Proteína Acarreadora de Acilos (ACP) por sugerencia de K. Bloch, P. Stumpf y S.J. Wakil.



Actualmente se acepta que la síntesis de los ácidos grasos de cadena larga tiene lugar solamente en la fracción soluble del citoplasma y que se halla catalizada por el complejo de siete enzimas, al que se ha denominado complejo sintetasa de ácidos grasos (F. Lynen, 1967).

f) Etapas enzimáticas para la síntesis de los ácidos grasos. El mecanismo enzimático completo para la síntesis de los ácidos grasos pudo conocerse finalmente por medio del estudio de las enzimas individuales aisladas a partir del complejo sintetasa de *E. coli*.

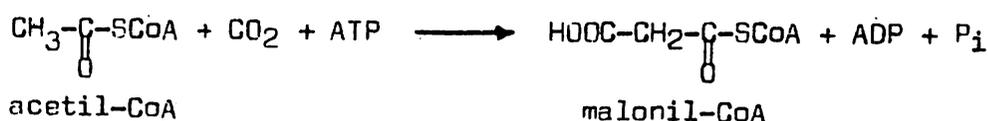
Formación del malonil-CoA. Aunque se conocen cuatro vías principales para la transferencia de acetil-CoA intramitocondrial, que es la fuente esencial de todos los átomos de carbono del palmitato sintetizado en el citoplasma, pronto se acumularon evidencias en el sentido de que la escisión del citrato es la fuente principal de la acetil-CoA citoplásmica.

Empleando preparaciones enzimáticas obtenidas de las glándulas mamarias de hembras en periodo de lactancia o preparaciones hepáticas, A.F. Spencer y J.M. Lowenstein (1962), A. Bhaduri y P.A. Frere (1963), así como J.V. Formica (1962), descubrieron que los ácidos grasos podían ser sintetizados a partir del citrato por medio de una reacción promovida por la enzima escisora del citrato.



Los investigadores observaron que sólo la porción acetilo del citrato se incorporaba rápidamente a las cadenas de ácido graso sintetizado. Numerosas investigaciones confirmaron este hecho (J. Bartley y col., 1965; A. Spencer y col., 1964; M.S. Kornacker y J.M. Lowenstein, 1965; M.S. Kornacker y E.G. Ball, 1965; J. Howanitz y H.R. Levy, 1965; S. Murad y R.A. Freedland, 1965; J. Brown y P. Clean, 1965) y actualmente se sabe que el citrato es utilizado para el transporte de grupos acetilo desde el interior de las mitocondrias hacia el citoplasma extramitocondrial.

A continuación la acetil-CoA-carboxilasa promueve la formación de malonil-CoA por condensación del acetil-CoA del citoplasma y el CO_2 , en presencia del ATP (D.M. Gibson y col., 1958; S.J. Wakil y J. Ganguly, 1959; M. Waite y S.J. Wakil, 1962).



Las transacilinasas. Seguidamente, los grupos acilo del acetil-CoA y malonil-CoA son transferidos hacia el grupo tiol (4'-fosfopanteteína) de la ACP por acción de las enzimas acetil-transacilasa y malonil-transacilasa, aisladas de *E. coli* por A.W. Alberts y col. (1964) y por I.P. Williamson y S.J. Wakil (1966).



h) Síntesis de ácidos grasos insaturados. En 1960, D.K. Bloomfield y Konrad Bloch reportaron el hallazgo de que los ácidos grasos saturados podían ser convertidos en los correspondientes ácidos grasos insaturados, en presencia de un nucleótido reducido de piridina y del oxígeno; el sistema enzimático implicado en este proceso fue aislado inicialmente de los microsomas por K. Bernard, J. von Eilow-Köster y H. Wagner en 1959.

Pueden encontrarse mayores detalles acerca del mecanismo de esta transformación, así como de los avances recientes, en J.A. Erwin "Lipids and Biomembranes of eucaryotic microorganisms", Academic Press, N.Y., 1973 y en los volúmenes corrientes del Annual Review of Biochemistry.

3. Biosíntesis de otros lípidos.

a) Biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos. Para mayor información con respecto a las primeras investigaciones sobre la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos consultar H.J. Deuel "The lipids" (1951-1957), vol. III, Cap. II.

Una vez que S.B. Weiss y E.P. Kennedy (1956), G.C. Buell y R. Reiser (1959), así como S.B. Weiss, E.P. Kennedy y J.Y. Kiyasu (1960), demostraron que el L- α -glicerol-fosfato era un intermediario en la síntesis de los triglicéridos, se logró el aislamiento de las enzimas implicadas en este proceso.

El L- α -glicerol-fosfato puede formarse a partir de la dihidroxiacetona por acción de la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (T. Baranowski, 1949), o bien, por fosforilación del glicerol en presencia de la enzima glicerol-quinasa y del ATP (G. Publitz y E.P. Kennedy, 1954; O. Wieland y M. Suyter, 1957). A su vez, E.M. Lands y P. Hart (1964), así como W.E. Lands (1965), empleando preparaciones microsomales obtenidas del cerdo de guinea, descubrieron la producción de un acil-glicerol-fosfato, el ácido fosfatídico, a partir del L- α -gliceril-fosfato: la glicerol-fosfato-acil-transferasa promueve las reacciones de acetilación implicadas en esta transformación.

En 1956, S.B. Weiss y E.P. Kennedy habían observado que el D- α,β -diglicérido reducido por la desfosforilación del ácido fosfatídico, era un precursor de los triglicéridos, y en el mismo año, Weiss y Kennedy hallaron que tal compuesto también era un precursor de los fosfolípidos fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina.

Para ampliar la información con respecto a los mecanismos enzimáticos involucrados en la síntesis de los triglicéridos y fosfolípidos, y para conocer los avances recientes, consultar las referencias que se citan en la bibliografía.

b) Biosíntesis del colesterol. En 1888, F. Reinitzer publicó una fórmula empírica correcta para el colesterol, en tanto que J. Wislicenius y W. Moldenauer, en 1868, habían indicado que la molécula del colesterol contiene un doble enlace.

Una fórmula tentativa para la molécula del colesterol propuesta por A. Winhaus en 1919 fue reemplazada en 1932, por sugerencia de D. Rosenheim y H. King, por una nueva estructura. Esta proposición estaba basada en los estudios con rayos X de J.D. Bernal (1932) y en los trabajos de D. Diels y W. Gädke (1927).

La fórmula definitiva se estableció después de los trabajos de A. Windaus (1932) y de H. Wieland y E. Dane (1932); y se estableció, así mismo, que contiene 3 centros asimétricos.

S. Dezani (1913) y S. Dezani y F. Gattoretto (1914) demostraron que el colesterol era sintetizado por ratas alimentadas con una dieta libre de colesterol. La síntesis del colesterol también se observó en los niños (J.L. Gamble y K.D. Blackfan, 1920), en los humanos adultos (J.A. Gardner y F.W. Fox, 1921), en los pollos (H. Dam, 1929), en las gallinas cluecas (R. Schoenheimer, 1929) pero no en los insectos (R.P. Hobson, 1935).

Los trabajos iniciales de Konrad Bloch y D. Rittenberg (1944) demostraron que el ác. acético era un precursor efectivo del colesterol en las ratas. Después de incubar ác. acético doblemente marcado ($C^{13}H_3C^{14}OOH$ y $C^{14}H_3C^{13}OOH$) con rebanadas de hígado, de aislar el colesterol formado y de someterlo a degradación química para determinar la posición de los isótopos en la molécula del colesterol, los resultados demostraron que todos los átomos de carbono del colesterol estaban marcados; de los 27 átomos de carbono del colesterol, 15 derivaban del carbono metílico del ác. acético y 12 derivaban del carbono carboxílico (H.N. Little y K. Bloch, 1950; J. Wuersch et al., 1952). Los estudios posteriores de R.B. Woodward y K. Bloch (1955) y J.W. Cornforth et al. (1953 y 1957) permitieron conocer el origen metabólico de cada uno de los 27 átomos de carbono del colesterol.

I.D. Frantz, Jr. y H.L.R. Bucher (1954) así como H.L.R. Bucher y K. McGarran (1956) demostraron que también los homogenados y extractos sin células del hígado podían incorporar el acetato marcado al colesterol.

Las investigaciones de I. Zabin y K. Bloch (1950 y 1951) demostraron que el grupo isopropilo del ác. isovalérico era mejor precursor del colesterol en las ratas. Y este hecho, junto con el conocimiento de que las rebanadas de hígado pueden sintetizar al colesterol a partir del ác. acetoacético (G.L. Curran, 1951; J.O. Brady et al., 1951), llevaron a la conclusión de que un compuesto isoprenoide de cinco carbonos podía ser un intermediario en la síntesis del colesterol. En este punto se llamó la atención sobre la sugerencia hecha en 1934 por R. Robinson de que el compuesto isoprenoide escualeno podía proporcionar el esqueleto carbonado del colesterol, por medio de un supuesto doblamiento de la molécula lineal del mismo. I.A. Heilbron, E.D. Kamm y W.M. Owens (1926) así como H.J. Hannon (1926) habían demostrado que aumentaba la cantidad de colesterol en los tejidos de ratas alimentadas con escualeno.

Pronto hubo evidencias experimentales sobre la conversión metabólica del acetato en escualeno y de éste en colesterol (R.S. Langdon y K. Bloch, 1953); J.W. Cornforth y S. Popják (1954) proporcionaron más evidencias al demostrar que la distribución del C^{14} del escualeno biosintético estaba en completo acuerdo con la del colesterol biosintético.

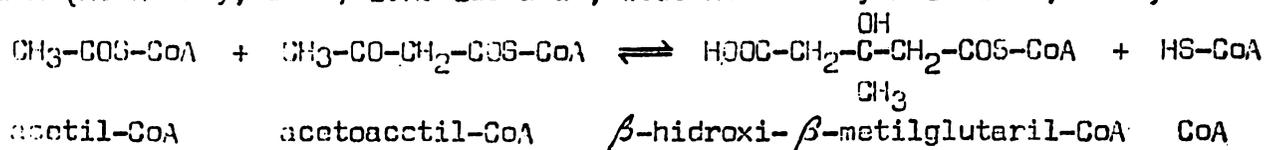
El papel del lanosterol como precursor del colesterol fue sugerido por Leopold Ruzicka en 1953 y las investigaciones posteriores demostraron la formación del lanosterol a partir a partir del acetato en las ratas intactas (P.B. Schneider et al., 1957), la conversión del escualeno en lanosterol hecha por un sistema enzimático obtenido del hígado de rata (T.T. Tchen y K. Bloch, 1957) y la

conversión del lanosterol en colesterol, por preparaciones del hígado de rata (R.B. Clayton y K. Bloch, 1956).

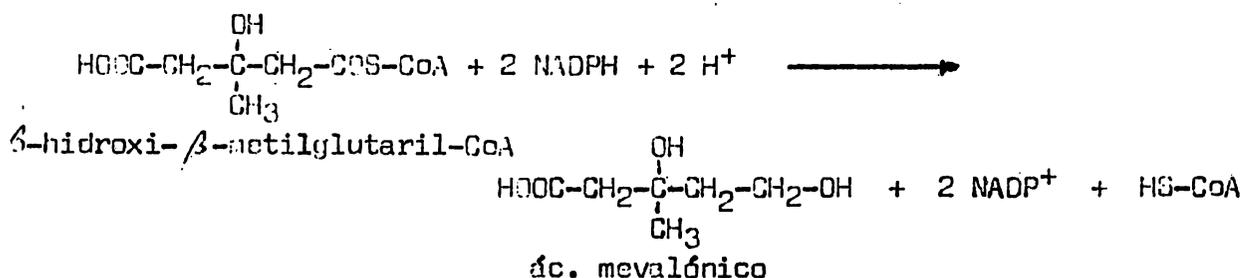
Y, aunque en 1956 estaba bien establecida la formación del escualeno a partir del acetato (Acetil-CoA), aun no se conocía el mecanismo enzimático involucrado en la transformación. Pero la situación cambió cuando se reconoció al ácido mevalónico como un intermediario y precursor del colesterol (P.A. Tavormina et al., 1956).

La δ -lactona del ácido mevalónico fue aislada de fuentes naturales, durante los estudios para identificar al factor de crecimiento que reemplazaba al acetato en *Lactobacillus acidophilus* (D.E. Wolf et al., 1956); y pronto se demostró que el ácido mevalónico es utilizado por las levaduras y por las preparaciones del hígado para sintetizar al escualeno (B.H. Amdur et al., 1957; F. Dituri et al., 1957; J.J. Cornforth et al., 1958).

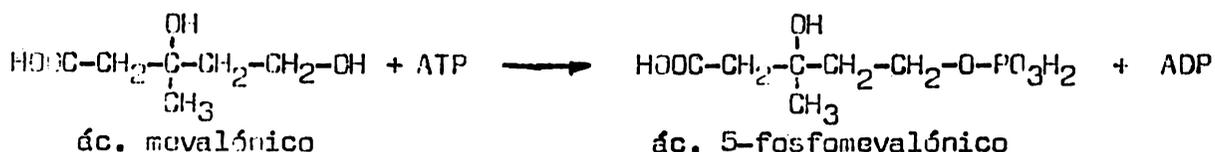
Etapas enzimáticas para la síntesis del colesterol.— La síntesis se inicia con la formación del ácido mevalónico a partir del acetil-CoA y del acetoacetil-CoA (H. Rudney, 1954; B.K. Bachawat, W.G. Robinson y M.J. Coon, 1955) :



Y, a continuación, el β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA es reducido por la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA-reductasa para formar el ácido mevalónico (J.L. Rabinowitz y S. Gurin, 1954; F.D. Florapcarl et al., 1956) :

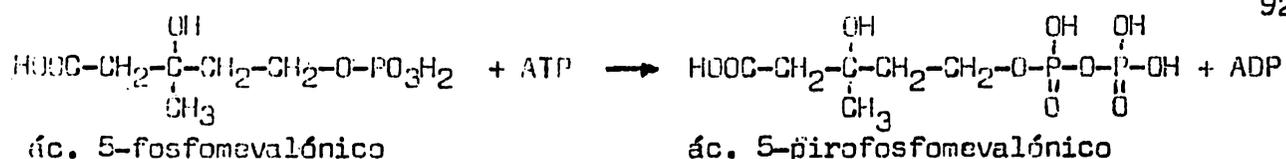


A continuación el ácido mevalónico se convierte en escualeno. La transformación se inicia con la fosforilación del ácido mevalónico por el ATP (T.T. Tchen, 1957; S. Chaykin et al., 1958; U. Henning et al., 1958; A. de Waard y G. Popják, 1959) para formar el ácido 5-fosfomevalónico:



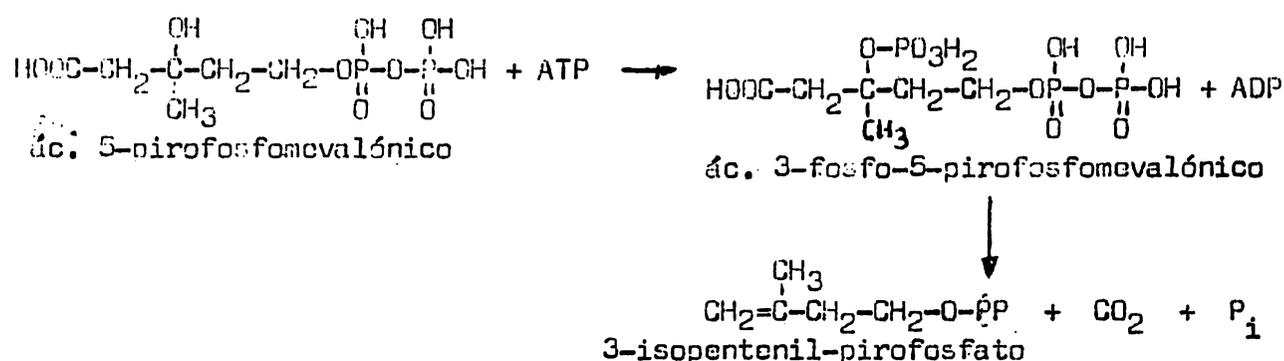
La reacción es catalizada por la enzima mevalonato quinasa, aislada del hígado de cerdo (H.R. Levy y G. Popják, 1960) y de las levaduras (T.T. Tchen, 1958).

Utilizando extractos de levaduras (S. Chaykin et al., 1958); B.W. Agranoff et al., 1959) y preparaciones del hígado de rata (A. de Waard y G. Popják, 1959) se demostró la formación del ácido 5-pirofosfomevalónico, por la fosforilación del ácido 5-fosfomevalónico en presencia del ATP:



La reacción es catalizada por la fosfomevalonato-quinasa (H.B. Levy y G. --- Popják, 1960; U. Henning et al., 1959; K. Bloch et al., 1959).

Una tercera fosforilación en el carbono 3 forma un producto muy inestable, que pierde ác. fosfórico y experimenta una descarboxilación para formar 3-isopentenil-pirofosfato (S. Chaykin et al., 1958; F. Lynen et al., 1958; L.A. Witting y M.V. Porter, 1959) :

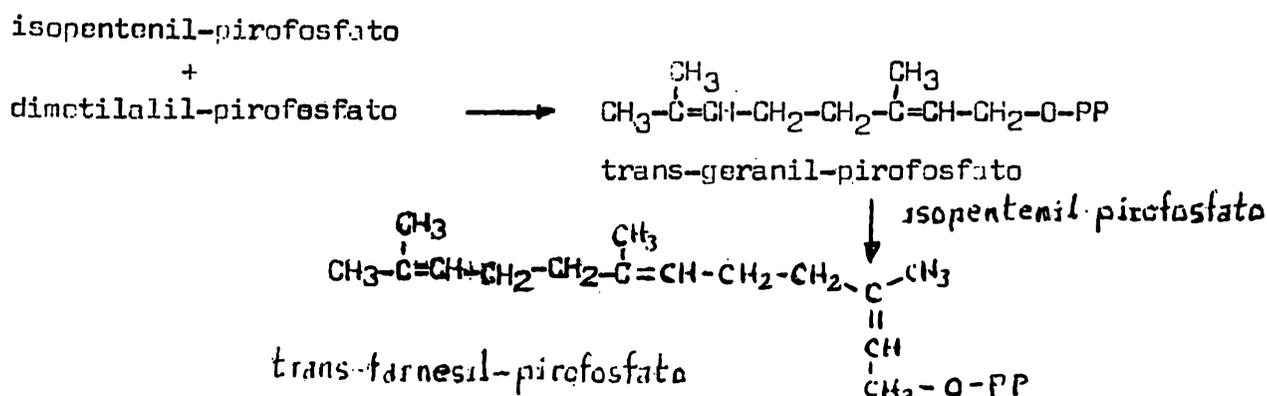


La reacción de descarboxilación es catalizada por la pirofosfomevalonato descarboxilasa (K. Bloch et al., 1959).

El 3-isopentenil-pirofosfato puede isomerizarse hacia el 3-3'-dimetil-alil-pirofosfato, reacción catalizada por la isopentenil-pirofosfato Δ -isomerasa (B.W. Agranoff et al., 1960) :

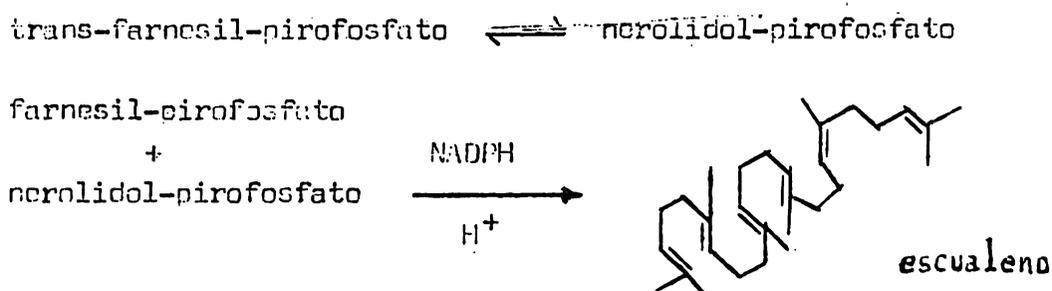


La formación del escualeno.- Entonces, los dos isoprenil-pirofosfatos se condensan entre sí para formar el trans-geranil-pirofosfato (K. Bloch et al., 1959; F.B. Lynen et al., 1959); la reacción es catalizada por la isopentenil-pirofosfato-isomerasa :

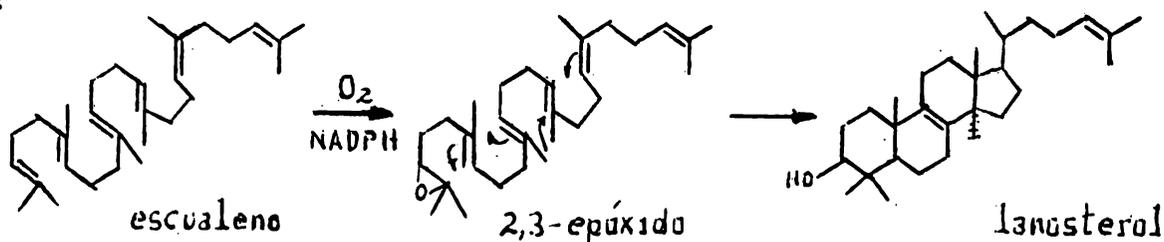


El trans-geranil-pirofosfato reacciona con otro isopentenil-pirofosfato para formar el trans-farnesil-pirofosfato (DeW. S. Goodman y G. Popják, 1960). En 1965, C.R. Benedict, J. Kett y J.W. Porter aislaron a la enzima involucrada, la geranil-transferasa.

El trans-farnesil-pirofosfato se condensa entonces con su isómero dimetil-alílico, el nerolidol-pirofosfato, para formar el escualeno (F. Lynen et al., 1958; J.W. Cornforth y G. Popják, 1959; H. Alling y K. Bloch, 1959; G. Popják et al., 1961) :

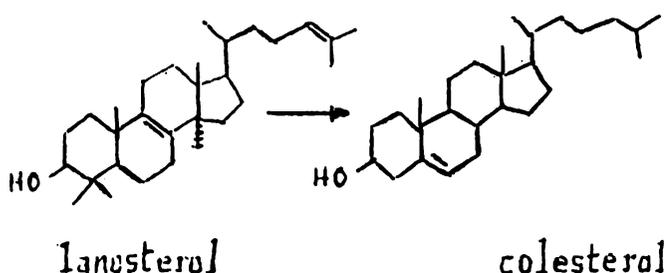


La formación del lanosterol.- El escualeno formado en el paso anterior experimenta entonces el ataque del oxígeno molecular para formar el 2,3-epóxido del escualeno (R.R. Clayton y K. Bloch, 1956; E. Schwenk y G.F. Baker, 1953; E. Schwenk et al., 1954; L. Ruzicka, 1953; A. Eschenmoser et al., 1955). La reacción es catalizada por la escualeno-monooxigenasa (E.J. Corey et al., 1966; T.T. Chen y K. Bloch, 1957; E.E. van Tamelen et al., 1966; S. Yamamoto y K. Bloch, 1970) :



Seguidamente, el 2,3-epóxido del escualeno se cicliza para formar el lanosterol. La reacción es catalizada por la 2,3-oxidoscualeno lanosterol-ciclasa (P.D.G. Dean et al., 1967).

Y, finalmente, el lanosterol se convierte en colesterol (G. Popják y J.W. Cornforth, 1960; S. Bagley y D.E. Nicholson, 1970).



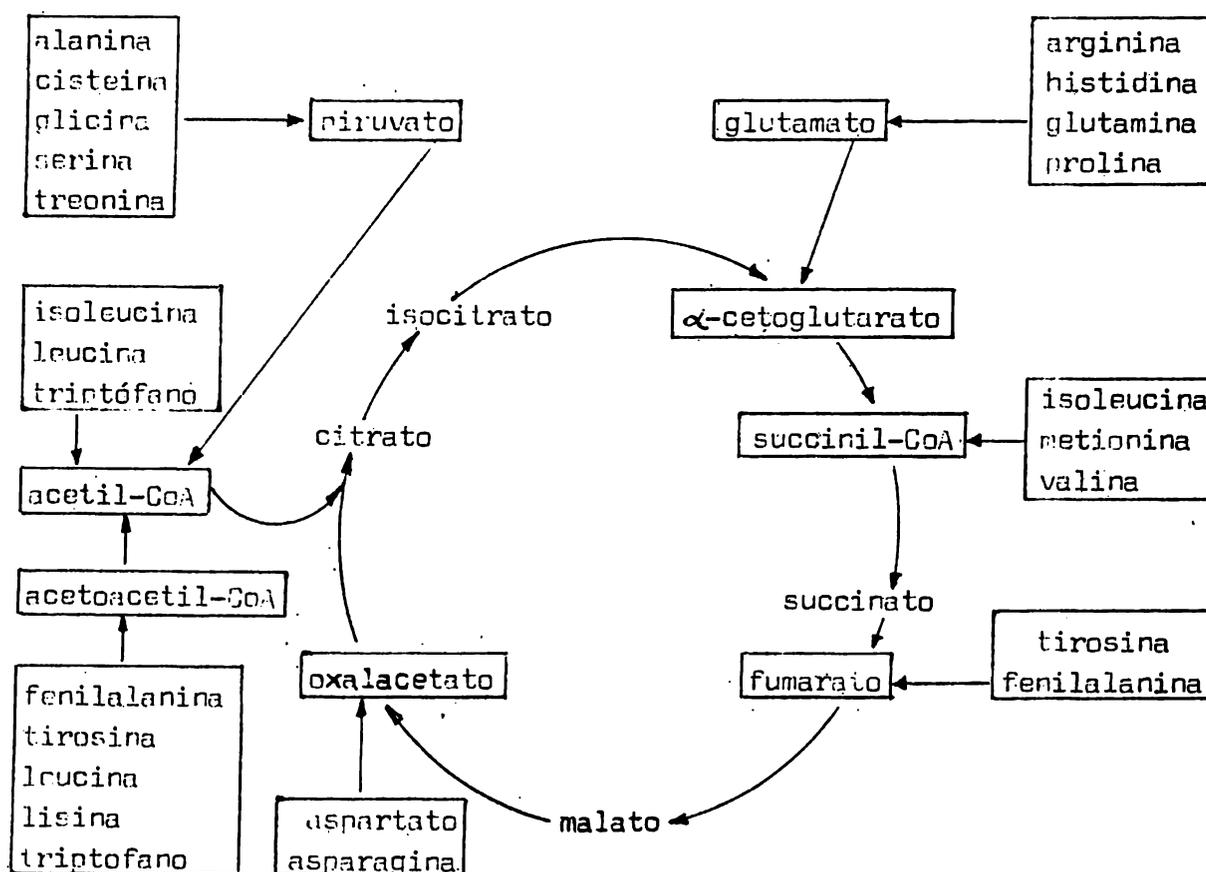
CAPITULO IV

METABOLISMO DE AMINOACIDOS

1. Vías degradativas de aminoácidos.

a) Introducción. Para que se lleve a cabo la oxidación de los 20 diferentes aminoácidos se conocen vías multienzimáticas distintas, pero en última instancia todas estas vías convergen en el ciclo del ácido tricarboxílico, sólo que entran en varios puntos a lo largo de su trayectoria.

De este modo, los esqueletos carbonados de 10 de los aminoácidos se convierten en acetil-CoA, ya sea por la vía del acetoacetyl-CoA o por la vía del piruvato; cinco se convierten en α -cetoglutarato; tres en succinil-CoA y dos en oxalacetato.

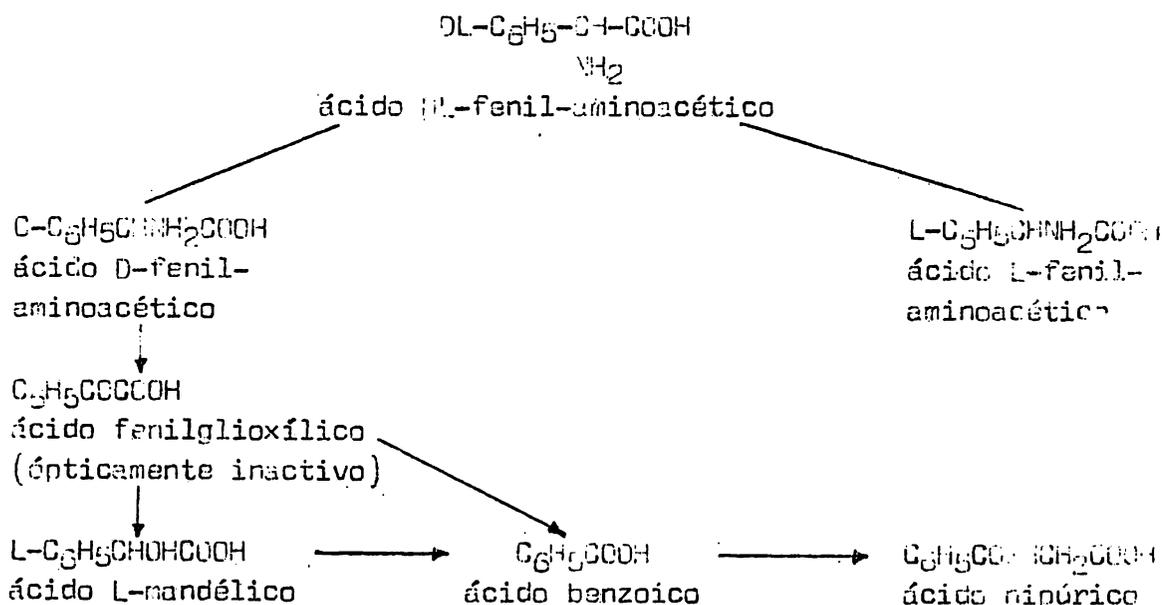


Rutas de entrada de los esqueletos carbonados de los aminoácidos en el ciclo del ácido tricarboxílico.

Generalmente la primera etapa en el catabolismo de los aminoácidos consiste en la separación del grupo α -amino, por lo que se examinarán en primer término los mecanismos enzimáticos implicados en este proceso: la transaminación y la desaminación oxidativa. Posteriormente se considerará un proceso secundario de degradación, la descarboxilación.

b) Desaminación. El primer paso en el catabolismo de los aminoácidos implica la eliminación del grupo α -amino a través de un mecanismo enzimático que es muy similar en los distintos casos.

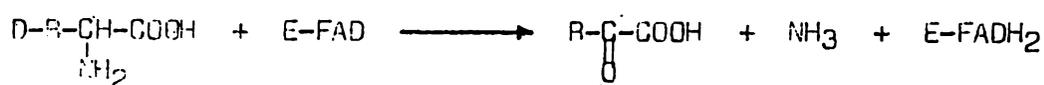
En 1908, Gustav Embden decidió aplicar el método del hígado perfundido al estudio del catabolismo de los aminoácidos, en el curso de sus investigaciones. Él observó que el destino de los α -aminoácidos era muy similar al del correspondiente ácido graso con un átomo de carbono menos, p.ej., tanto la leucina como el ácido isovalérico rendían acetacetato por oxidación en la posición alfa. Pero el primer avance significativo en este campo vino de los trabajos de Otto Neubauer (1910) quien detectó la presencia de un ácido α -cetónico durante el proceso oxidativo de los aminoácidos en el cuero animal. Habiendo ~~investigado~~ investigado a un perro ácido DL-fenil-aminoacético, Neubauer identificó en la orina al ácido fenil-aminoacético junto con un exceso del componente levo (el ácido levo-mandélico), así como al ácido fenil-glioxílico y al benzoato en forma del derivado ácido nítrico. La conclusión fue que el componente levo era oxidado con menor facilidad que el componente dextro, así que de acuerdo con Neubauer la oxidación del ácido fenil-aminoacético ocurría de la manera siguiente:



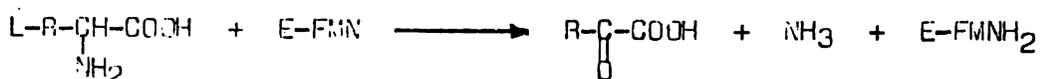
En este esquema el ácido α -cetónico, el ácido fenilglioxílico, es el intermediario importante, en tanto que el hidroxiácido, el ácido mandélico, es un producto secundario de reacción. Lo cual se confirmó una vez que Neubauer reunió los resultados de sus investigaciones relacionadas con los errores prenatales del metabolismo. Neubauer observó que al administrar tirosina y ácido p-hidroxifenilpirúvico a un paciente alcaptonúrico se producía ácido homogentísico en grandes cantidades, pero éste último ácido no se obtenía después de administrar ácido p-hidroxifenil-láctico; lo cual indicaba que los ácidos α -cetónicos no derivan de los hidroxiácidos, una observación que se confirmó posteriormente cuando W. W. C. (1910) administró m-hidroxifenil-alanina (m-tirosina), m-cloro-fenil-alanina y fenil-alanina a los conejos, descubriendo la excreción de un ácido homogentísico en los casos. De estos resultados surgió la idea de que los α -cetóácidos son intermediarios obligados en la oxidación directa de los distintos aminoácidos y que los hidroxiácidos no derivan directamente de los aminoácidos.

La contribución más decisiva para entender el mecanismo a través del cual los tejidos de los mamíferos logran la desaminación de los distintos aminoácidos proviene de los trabajos de Hans Adolph Krebs. Empleando homogenados y fracciones sobrevivientes de hígado y riñón Krebs demostró que el sitio principal para la oxidación de los aminoácidos era el hígado pero que el riñón era igualmente activo; al comparar las velocidades relativas de desaminación de los L- y D-aminoácidos en preparaciones de riñón Krebs (1933) halló que algunos miembros de la serie D eran desaminados más rápidamente que los de la serie L. O. Loewi (1898) y H. Jacoby (1900) habían descubierto una enzima capaz de liberar amoníaco, y Krebs detectó la presencia de una enzima en el riñón que promovía la conversión de los L-aminoácidos en los correspondientes α -cetoácidos:

En 1935, H. Borsook y G.E.P. Jeffreys, utilizando tejidos supervivientes de rata, confirmaron las observaciones de Krebs en el sentido de que el riñón y el hígado son los órganos que realizan la desaminación de los aminoácidos; en el mismo año, Krebs indicó que el hígado y riñón contenían dos sistemas enzimáticos, uno que desaminaba los D-aminoácidos no-naturales (la D-aminoácido oxidasa) y otro que realizaba la desaminación de los L-aminoácidos naturales (la L-aminoácido oxidasa). O. Warburg y W. Christian (1938) mostraron que la D-aminoácido oxidasa era una flavoproteína que contenía al isoaloxazín-adenín-dinucleótido (FAD) como grupo prostético y catalizaba la reacción siguiente.

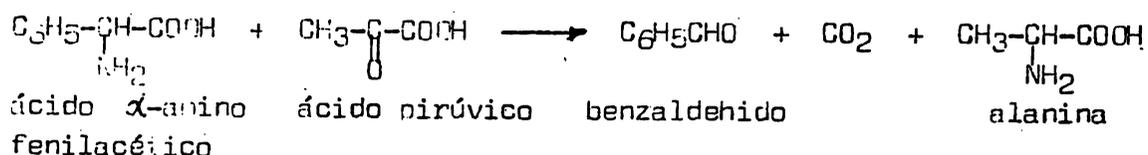


En 1945, M. Blanchard y col. lograron el aislamiento de la L-aminoácido oxidasa a partir de los microsomas de hígado y riñón; la enzima es una flavoproteína que contiene al FMN como grupo prostético y promueve la desaminación siguiente.



c) Transaminación. Durante cierto tiempo se pensó que la desaminación oxidativa era el mecanismo principal para la desaminación de los aminoácidos, pero más tarde se vió que este proceso ocupa un papel secundario en el metabolismo de los aminoácidos, como resultado del descubrimiento de las transaminasas.

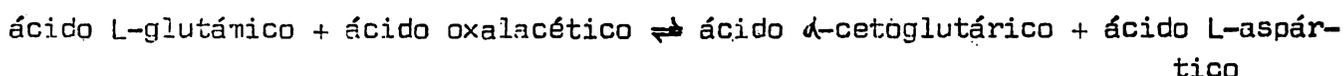
En 1934, R.M. Herbst y L.L. Engel observaron que al calentar una solución acuosa del ácido α -amino-fenilacético y del ácido pirúvico ocurría la producción de alanina, benzaldehído y dióxido de carbono.



Esta fue la primera reacción de transaminación que se observó experimentalmente, pero la primera evidencia sobre la presencia de enzimas capaces de catalizar las reacciones de transaminación en los tejidos animales fue aportada por E. Braunstein y M.G. Kritzman en 1937. Los investigadores descubrieron que en preparaciones de tejidos musculares la desaparición del glutamato era seguida por la aparición de alanina en el medio de reacción, además de que el piruvato

aceleraba la desaminación del glutamato; Braunstein y Kritzmann concluyeron que debía ocurrir una reacción entre el glutamato y los α -cetoácidos, pues éstos podían reemplazar al piruvato, en adición se observó que cualquier aminoácido, excepto la glicina, podía ceder su grupo amino al ácido α -cetoglutárico para rendir L-glutamato o al ácido oxalacético, produciendo ácido L-aspartico. M.G. Kritzmann logró preparar un extracto muscular que contenía una transaminasa específica para el ácido glutámico pero que era inactiva para el ácido aspártico (1938), mostrando posteriormente la presencia de una transaminasa aspártica en los extractos musculares y una coenzima termoestable (1939).

Una vez que P.P. Cohen (1939) desarrolló un método para determinar cuantitativamente el ácido glutámico fue posible determinar la actividad de las transaminasas; los experimentos indicaron que el aspartato, y en menor grado la alanina, reaccionaba fácilmente con el α -cetoglutarato, en tanto que los aminoácidos restantes reaccionaban con velocidades mucho menores de diferentes órdenes de magnitud. Cohen señaló la presencia de únicamente dos sistemas transaminantes en el músculo cardíaco del cerdo, que promovían las siguientes conversiones.



Empleando preparaciones hepáticas de cerdo, David E. Green y col. (1945) lograron preparar dos fracciones enzimáticas que promovían las dos reacciones mencionadas; una fracción catalizaba la primera reacción y se le llamó transaminasa glutámico-aspartica (o transaminasa glutámico-oxalacética), la otra fracción promovía la segunda reacción y se le dió el nombre de transaminasa alanín-glutámica (transaminasa glutámico-pirúvica).

Los trabajos de H.C. Lichstein y col. (1945) mostraron que la transaminasa glutámico aspártica se hallaba compuesta por una fracción proteica y el cofactor fosfato de piridoxal, un derivado de la vitamina B₆. Esmond E. Snell (1945) descubrió que a temperaturas elevadas el piridoxal reaccionaba con el glutamato produciendo piridoxamina y ácido α -cetoglutárico; Snell relacionó esta observación con los trabajos de Braunstein sobre las transaminasas, y junto con F. Schenk, mostró que las ratas con deficiencias en vitamina B₆ disminuían su actividad de transaminación. Este hecho fue confirmado por M. Kritzmann y O. Samarina (1946) quienes indicaron que la adición de fosfato de piridoxal restauraba la actividad normal de transaminación en las células de *S. fecalis* cultivadas en un medio deficiente en vitamina B₆. Estudios posteriores de M. Bria y col. (1959) corroboraron estas observaciones.

La glutamato-deshidrogenasa. En 1957, A.E. Braunstein señaló que la desaminación oxidante de los L-aminoácidos ocurría por medio de la acción acoplada de las L-aminoácido- α -cetoglutarato transaminasas y la glutamato-deshidrogenasa, es decir, a través de una trans-desaminación.

De manera que inicialmente se efectúa una transaminación entre el aminoácido implicado y el ácido α -cetoglutárico para formar ácido glutámico y el respectivo α -cetoácido; a continuación, el ácido glutámico es desaminado oxidativamente por la glutamato-deshidrogenasa para rendir NH₃, regenerándose el α -cetoglutarato.



Los estudios de E.V. Rowsell (1956) pusieron de manifiesto que en las fracciones tisulares la velocidad de transaminación entre los distintos L- α -aminoácidos y el α -cetoglutarato es comparable con la velocidad de síntesis de la urea y el amoníaco, lo cual señala la importancia del proceso de trans-desaminación para la desaminación oxidante de los aminoácidos.

Se acepta actualmente que los grupos amino que se originan durante la transaminación de los diferentes aminoácidos, aparecen finalmente en forma del grupo amino del ácido glutámico. Además, se sabe que la glutamato-deshidrogenasa ocupa un papel central en la desaminación de los aminoácidos que efectúan muchos organismos; por otra parte, los sistemas de la L- y D-aminoácido oxidasa son rutas secundarias para la desaminación oxidativa.

d) Descarboxilación. Las reacciones arriba mencionadas sólo implican a los grupos α -amino de los L-aminoácidos pero también se conocen sistemas enzimáticos capaces de convertir el grupo carboxilo de los L-aminoácidos en CO_2 , produciéndose simultáneamente una amina; estas enzimas reciben el nombre de descarboxilasas.



Se ha identificado un gran número de descarboxilasas (H. Blaschko, 1945; E. J. Gale, 1946; O. Schales, 1951; D.L. Dewey y col., 1954; R.F. Denman y col., 1955; L. Ekladius y H.K. King, 1956), y aunque se sabe que algunas de las aminas producidas por las bacterias tienen actividad farmacológica (O. Schales y col., 1945; O. Schales y S.S. Schales, 1949; W.J. Wingo y J. Awapara, 1950; E. Roberts y S. Frankel, 1951; J.F. Thomson y col., 1953; L. Fowden y J. Done, 1953; C.T. Clarke y col., 1954; W.J. Hartman y col., 1955; H.T. Graham y col., 1956), la vía descarboxilativa es una ruta metabólica secundaria para el metabolismo de los aminoácidos, por lo que no se tratará con amplitud.

Para obtener mayor información con respecto a esta vía metabólica, y para conocer los avances recientes en el metabolismo de los aminoácidos, consultar la bibliografía que se cita al final de capítulo, así como los volúmenes corrientes del Annual Review of Biochemistry.

2. Degradaciones individuales de los aminoácidos.

Las diferentes vías metabólicas para la degradación de los 20 aminoácidos se considerarán por separado pero se les ha agrupado, de acuerdo con su punto de entrada al ciclo del ácido tricarboxílico, dentro de cinco grandes rutas generales que son las siguientes: La ruta del acetyl-CoA; la ruta del α -cetoglutarato; la ruta del succinato; la ruta del fumarato y la ruta del oxalacetato.

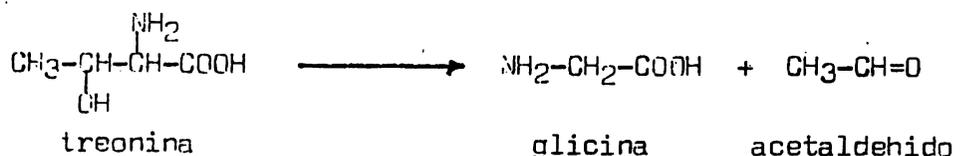
No se hará una descripción detallada de todas las enzimas ni de todos los intermediarios involucrados y únicamente se estudiarán las reacciones más importantes desde el punto de vista biológico. Para obtener mayor información con respecto a las enzimas y mecanismos implicados en la degradación de los aminoácidos consultar dos obras que son fundamentales en este campo: Meister, A.: "Biochemistry of the Amino Acids". 2a. ed., vols. 1 y 2, Academic Press, Inc., N.Y., 1965; así como: Greenberg, D.M. (ed): "Metabolic Pathways". 3a. ed., vol. 3, Academic Press, Inc., N.Y., 1969.

a) Ruta de la acetyl-CoA. El principal punto de entrada al ciclo del ácido tricarboxílico es por la ruta de la acetyl-CoA; cinco aminoácidos se degradan a acetyl-CoA por la vía del piruvato y cinco por la del acetoacetato.

Vía del piruvato.

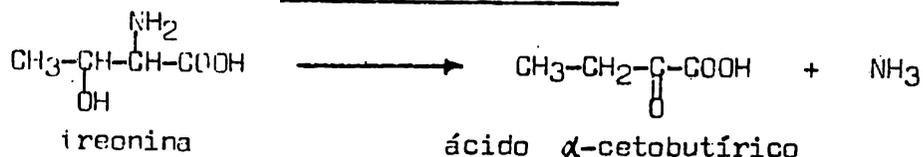
Los cinco aminoácidos que utilizan la vía del piruvato son la treonina, glicina, serina, cisteína y alanina.

(1) Treonina.- En 1949, A.E. Braunstein y G.Y. Vilenkina reportaron la existencia de una reacción enzimática que producía la escisión de la treonina para formar glicina y acetaldehído:



La existencia de esta reacción, que conduce a la acetyl-CoA a través del acetaldehído, fue confirmada por H.L. Meltzer y D.B. Sprinson en 1952. La reacción es catalizada por la enzima treonín-aldolasa, que depende del fosfato de pirodoxina (S.C. Lin y D.M. Greenberg, 1954; M.A. Karasek y D.M. Greenberg, 1957).

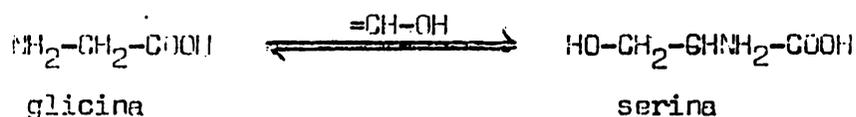
Se conoce otra vía metabólica para la degradación de la treonina la que lleva al ciclo del ácido tricarboxílico por medio de la succinil-CoA. La vía comienza con la conversión de la treonina en ácido α -cetobutírico y amoníaco, en reacción promovida por la treonín-deshidratasa.



La treonín-deshidratasa se ha obtenido en forma muy pura (E. Chargaff y D.B. Sprinson, 1943; F.W. Mayre y D.M. Greenberg, 1956; J. Nishimura, 1959). El ácido α -cetobutírico experimenta una descarboxilación oxidante a propionil-CoA,

a que se convierte en metilmalonil-CoA y, finalmente, en succinil-CoA.

(2) **Glicina.**— La principal vía metabólica para la degradación de la glicina consiste en la conversión del aminoácido en serina, por la adición enzimática de un grupo hidroximetilo cedido por la coenzima N¹⁰-hidroximetil-tetrahidrofolato (D.P. Sprinson, 1949; H.N. Farnet y A.N. Wick, 1950) :

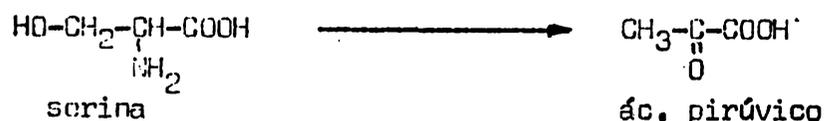


La reacción reversible entre la glicina y la serina es catalizada por la enzima serín-hidroximetil-transferasa (F.M. Huennekens y W.J. Osborn, 1959; J.C. -- abinowitz, 1960).

Los trabajos de R.D. Sagers e I.C. Gunsalus (1961) y de S.M. Klein y R.D. -- agers (1962), sobre la fermentación de la glicina hecha por *Peptococcus glycinohylus*, han permitido conocer los pasos intermedios involucrados en la conversión de la glicina así como el papel del tetrahidrofolato.

En los tejidos animales, la glicina participa en otras reacciones metabólicas como son la formación de ácido hipúrico (F. Lipmann, 1949); la formación de -- lutación (J.E. Snake y K. Bloch, 1952 y 1955; S. Mandales y K. Bloch, 1955; A. -- owalsky et al., 1956); en la formación de creatina (K. Bloch y R. Schoenheimer, 1940; D. Stetten, Jr. y B. Bloom, 1956); la formación de porfirinas (D. Shemin y . Rittenberg, 1946; D. Shemin y J. Wittenberg, 1950, y 1951; H.M. Muir y A. Neuberger, 1950); en la formación de purinas (D.A. Goldthwait et al., 1956; S.C. -- artman et al., 1956) y en la formación de los ácidos biliares (J. Bremer, 1956; .H. Elliot, 1956 y 1957; H.D. Siperstein y A.L. Murray, 1956).

(3) **Serina.**— La serina es deshidratada y desaminada por la serín-deshidrataza, una enzima que depende del fosfato de piridoxal, para formar piruvato (A.B. -- irdoo y L.G. Prestidge, 1955; H.E. Umbarger y D. Brown, 1957; C. Yanofsky, 1952; E. Metzler y E.E. Snell, 1952) :

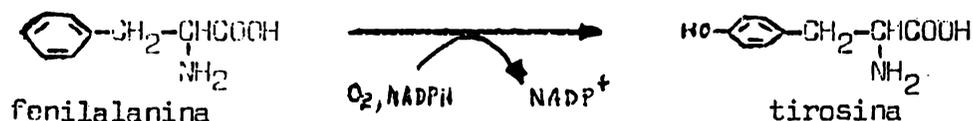


O.G. Lien y D.W. Greenberg (1952) aportaron pruebas experimentales de esta -- transformación al observar que la serina-C₃¹⁴ era transformada en alanina isotópica, por preparaciones mitocondriales, mediante una transaminación que involucra -- al piruvato formado.

(4) **Cistina y Cisteína.**— La cistina y la cisteína son convertidas en pi -- vato por la vía del ácido cisteinsulfínico (H.R.V. Arnstein y J.C. Crawhall, 1953; Bergeret y F. Chatagner, 1954; F. Chapeville y P. Fromageot, 1955).

P.P. Cohen (1940) y E.B. Kearney y T.P. Singer (1953 y 1954) demostraron que -- ácido cisteinsulfínico era convertido en β-sulfínilpiruvato por la acción de la glutamato-aspartato transaminasa, mediante una reacción de transaminación.

La conversión de la fenilalanina en tirosina es catalizada por la fenilalanín-hidroxilasa, que fue aislada inicialmente por S. Udenfriend y J.R. Cooper (1952) y por S. Kaufman (1957), a partir de preparaciones hepáticas :



S. Kaufman y S. Levenberg (1959) y S. Kaufman (1958) demostraron que la fenilalanín-hidroxilasa está formada en realidad por dos enzimas, que requieren a la biópterina y del NADPH, respectivamente. En tanto que G. Bitoma (1956) demostró que un átomo del O₂ se incorpora al grupo -OH del anillo bencénico y el otro es reducido por el NADPH para formar H₂O.

(2) Tirosina.- La degradación de la tirosina y de la fenilalanina produce cetoacetato libre, el cual es activado por el ATP y la CoA para formar acetoacil-CoA; esta última entra al ciclo del ácido tricarbóxico en forma de acetil-CoA.

La degradación de la tirosina y la fenilalanina involucra la formación intermedia del ácido homogentísico, y termina con la formación de los ácidos acetoacético y fumárico. Los pasos intermedios involucrados en esta vía metabólica se han identificado a partir de estudios con isótopos (S. Weinhouse y R.H. Millington, 1948 y 1949; E. Schepartz y S. Gurin, 1949; A.B. Lerner, 1949; R.G. Ravdin y J.I. Grandall, 1951), del estudio de los defectos genéticos del metabolismo como en la fenilcetonuria, caracterizada por un exceso de ác. fenilpirúvico debido a que el paciente fenilcetonúrico no puede convertir a la fenilalanina en tirosina a la velocidad normal -lo cual provoca retraso mental- (D.Y. Hsia et al., 1956; Bitoma et al., 1957; W.H. Stein et al., 1954); así como del estudio de la alcaptonuria, que se caracteriza por el ennegrecimiento de la orina del paciente alcaptonúrico debido a la formación de pigmentos oscuros de melanina como consecuencia de la oxidación del ác. homogentísico excretado en la orina.-debido a la deficiencia genética de la oxigenasa del ác. homogentísico- (M. Wolkow y E. Humann, 1891; W. Falta y L. Langstein, 1903; O. Neubauer, 1909). El aislamiento y purificación de las enzimas involucradas, permitió reconstruir la vía metabólica en su totalidad y permitió definir cada paso enzimático.

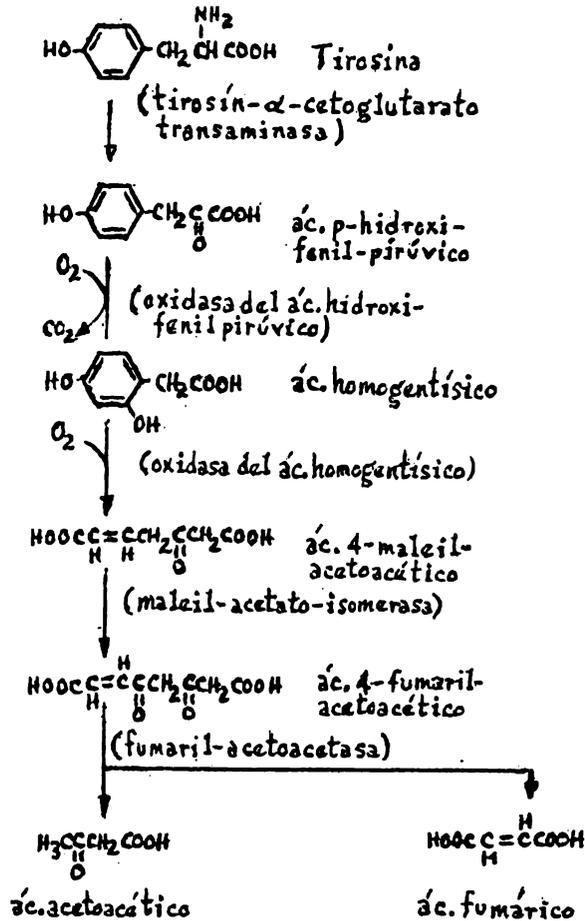
La tirosín- α -cetoglutarato-transaminasa cataliza la transaminación de la tirosina con el ác. α -cetoglutarico para formar ác. p-hidroxi-fenilpirúvico. Esta enzima requiere del fosfato de piridoxal como cofactor y es estimulada por el ác. α -cetoglutarico (B.N. LaDu y D.M. Greenberg, 1951; B.N. LaDu y V.G. Zannoni, 1961).

La oxidasa del ácido hidroxifenilpirúvico, que cataliza la oxidación del ácido p-hidroxifenilpirúvico hacia el ác. homogentísico, fue aislada por B.N. LaDu y G. Zannoni (1961) y por W.E. Knox y M. LeMay-Knox (1951). B.N. LaDu et al., 1958, demostraron que esta es la enzima faltante que provoca la alcaptonuria.

La homogentísico-oxidasa cataliza la apertura del anillo benzénico del ácido homogentísico para formar al ácido 4-maleil-acetoacético y fue obtenida a partir del hígado de conejo por M. Suda e Y. Takoda en 1950. También se ha obtenido en forma pura del hígado de res (K. Tokuyama, 1959) y del hígado de ternera (W.G. -- Flamm y D.I. Grandall, 1963). D.I. Grandall (1955) demostró que el Fe^{2+} es un componente de la enzima.

La maleil-acetato-isomerasa convierte al ác. 4-maleil-acetoacético en su isómero trans, el ác. 4-fumaril-acetoacético y fue aislada del hígado de rata por J.E. Knox y S.W. Edwards en 1955.

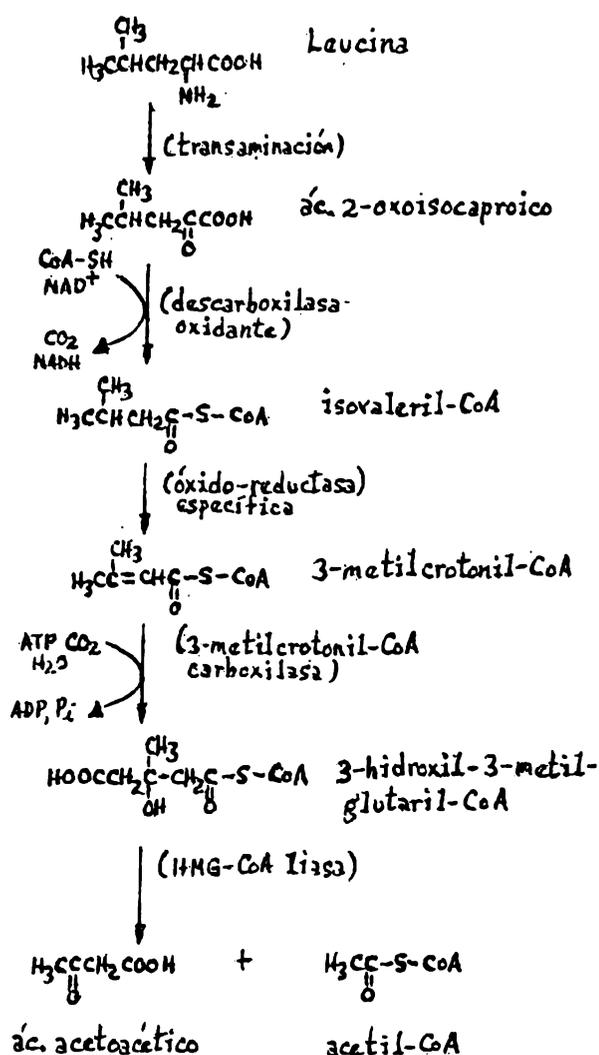
La fumaril-acetoacetasa cataliza la hidrólisis del ác. 4-fumaril-acetoacético para formar ác. acetoacético y ác. fumárico. La enzima fue aislada inicialmente a partir del hígado de rata por R.G. Ravdin y D.I. Grandall en 1951; aunque su acción ya había sido descrita por W.M. Connors y E. Stotz en 1949.



Conversión de la tirosina y la fenilalanina en ácido acetoacético y ácido fumárico.

(3) **Leucina.**— Después de una serie de observaciones iniciales sobre el metabolismo de la leucina (G. Embden et al., 1906; K. Bloch, 1944; M.J. Coon y S. -- Jurin, 1949; L.Zabin y K. Bloch, 1950; M.J. Coon, 1950; G.W.E. Plaut y H.A. Lardy, 1951), M.J. Coon et al. (1955 y 1956) así como F. Lynen et al. (1963) pudieron

elucidar la naturaleza enzimática de los pasos involucrados en la degradación de la leucina.



Conversión de la leucina en acetil-CoA y en ácido acetoacético.

El primer paso de la vía degradativa consiste en una transaminación, que produce el correspondiente α -oxoácido - el ác. 2-oxoisocaproico,

La descarboxilación oxidativa del ác. 2-oxoisocaproico conduce a la formación del isovaleril-CoA (M.-J. Coon et al., 1955). Y, después de la deshidratación del isovaleril-CoA, para formar 3-metilcrotonil-CoA (M.J. Coon et al., 1955; K. Tanaka et al., 1966), la adición de un grupo carboxilo conduce al 3-metilglutaconil-CoA (A. del Campillo-Campbell et al., 1959; F. Lynen et al., 1961; R.H. Himes et al., 1963).

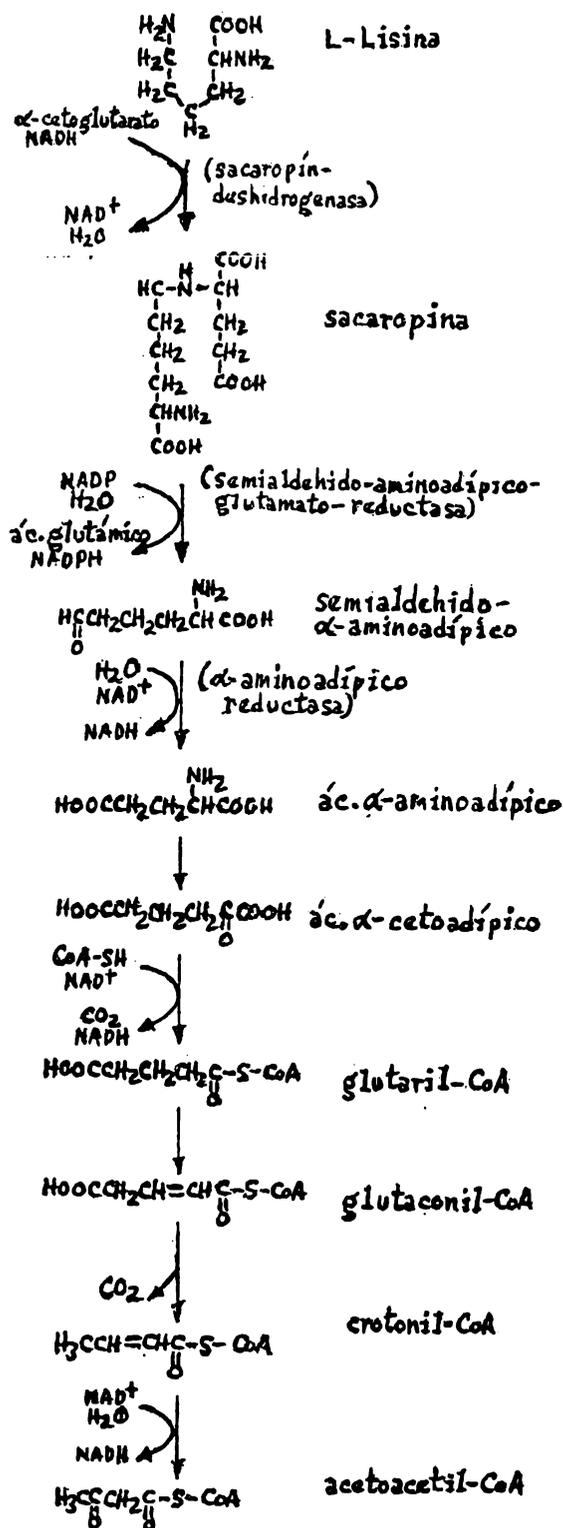
El 3-metilglutaconil-CoA se convierte en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA y este último compuesto es escindido por la hidroxi-metilglutaril-liasa, para formar ác. acetoacético y acetil-CoA (M.J. Coon, 1950; G.W.E. Plaut y H.A. Lardy, 1951; B.-K. Bachhawat et al., 1955; J. Knappe y F. Lynen, 1959 y 1960).

(4) **Lisina.**- Los estudios iniciales sobre el metabolismo de la lisina utilizando el método isotópico (R. Schoenheimer y D. Rittenberg, 1940; N. Weissman y R. Schoenheimer, 1941), la lisina marcada con homogenados hepáticos del cerdo de quinea (H. Borsook et al., 1948), los estudios con perros (K.I. Altman et al., 1950) y con ratas (M. Rothstein y L.L. Miller, 1954), junto con el aislamiento e identificación del ác. piperólico a partir de las plantas superiores (R.M. Zacharius et al., 1952; N. Grobbelaar y F.C. Steward, 1955) condujeron a la formulación de una vía degradativa para la lisina que involucraba al ác. piperólico como intermediario entre la lisina y el ác. α -aminoadípico.

Pero los estudios de P. Foulanger et al. (1964), administrando lisina- C^{14} , o. Δ^1 -piperidín-2-carboxílico- C^{14} y ác. piperólico- C^{14} a las ratas estériles, así como los de K. Higashino et al. (1965), quienes descubrieron que el hígado de rata

enzimática la formación de la sacaropina a partir de la lisina, cuestionaron la participación del ác. pipercolico como un intermediario en el metabolismo de la lisina.

La formación de la sacaropina a partir de la lisina, es la inversión de uno de los pasos de la biosíntesis de la lisina en *Neurospora*, como lo demostraron H.P. Bronquist et al. (1965 y 1966). Y, después de que K. Higashino et al. (1965) aislaron a la sacaropín-deshidrogenasa del hígado de rata; Higashino y colaboradores consideraron a la vía de la sacaropina como la vía principal para la degradación de la lisina en los mamíferos.



Conversión de la lisina en acetoacetil-CoA

Actualmente se considera que la vía del pipercolato es una vía extinguida.

(5) **Triptofano.**— El estudio del metabolismo del triptofano en los mamíferos se inició en 1853 cuando J. von Liebig pudo aislar, a partir de la orina de perro, a un compuesto al que llamó ác. quinurénico (el ác. 4-hidroxiquinolín-2-carboxílico).

En 1904, V. Ellinger pudo aislar al ác. quinurénico de la orina de perros alimentados con triptofano; y, este descubrimiento, inició las investigaciones para tratar de encontrar un mecanismo que explicara la formación de este derivado de la quinolina a partir del triptofano.

Debido a que los experimentos posteriores demostraban que el ácido quinurénico era excretado por unas especies y por otras no (S. Lepkovsky et al., 1943; J.M. rice y L.W. Dodge, 1956; H. Takahashi et al., 1956), pronto hubo la idea de que el ácido quinurénico no era un intermediario en el metabolismo del triptofano.

Pero el problema se resolvió cuando Z. Matsouka y N. Yoshimatsu (1925) así como Y. Kotake y J. Iwao (1931), después de alimentar a los conejos con triptofano, observaron la presencia en la orina no sólo del ácido quinurénico sino también la de un compuesto desconocido al que llamaron quinurenina, a la cual asignaron una estructura incorrecta. Y, después de que A. Butenandt et al. (1942) establecieron la estructura correcta de la quinurenina, pronto hubo reportes que indicaban la participación de la quinurenina como un intermediario en la degradación del triptofano.

G.K. Dalglish et al. (1951 y 1952), mediante experimentos con ratas deficientes en piridoxina, demostraron que la 3-hidroxi-quinurenina era un intermediario en el metabolismo del triptofano. Los experimentos de R.K. Gholson et al. (1959), utilizando 3-hidroxi-antranilato- C_1^{14} , demostraron que el ácido 3-hidroxi-antranílico es un intermediario en la llamada vía quinurenín-antranílica. En 1965, S. Mishizuka et al., propusieron la secuencia que va del ácido 3-hidroxi-antranílico a la glutaril-CoA; después de que observaron la descarboxilación del ácido α -cetoadípico para formar glutaril-CoA, en el hígado de los mamíferos. Se identificó la trayectoria que sigue la glutaril-CoA, del conocimiento de la β -oxidación de los ácidos grasos. En 1960, E.R. Tustanoff y J.R. Stern habían demostrado la formación enzimática de la glutaconil-CoA por carboxilación de la crotonil-CoA.

Y, como en el caso de otras vías metabólicas, el aislamiento y purificación de las enzimas involucradas permitió la identificación de la secuencia completa.

La triptofano-oxigenasa, originalmente llamada triptofán-pirrolasa (Y. Kotake y T. Masayama, 1936), cataliza la formación de la N-formilquinurenina a partir del triptofano en el hígado de los mamíferos (W.E. Knox y A.H. Mehler, 1950; W.E. Knox, 1954).

La reacción es catalizada por el H_2O_2 y requiere la presencia del oxígeno molecular, que se incorpora a la N-formilquinurenina (O. Hayaishi et al., 1957). La triptofano-oxigenasa es una enzima porfirínica que contiene hierro y estimula a por el triptofano (N.D. Lee, 1956).

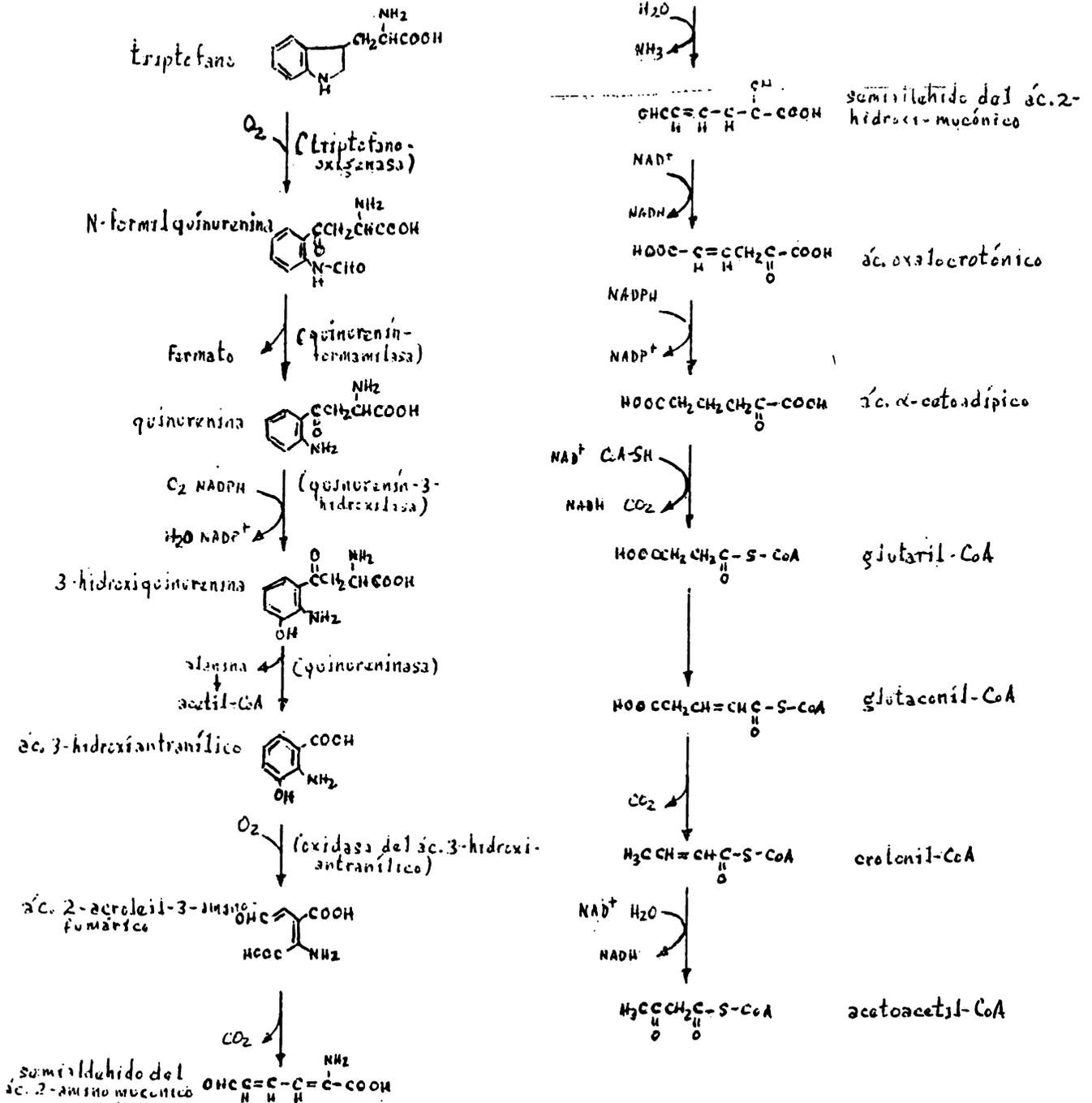
La quinurenín-formilasa hidroliza a la N-formilquinurenina para formar a la quinurenina. La enzima ha sido aislada a partir de *Pseudomonas* (O. Hayaishi y Y. Stanier, 1951) y también de *Neurospora* (W.B. Jakoby, 1954).

La quinurenín-3-hidroxilasa convierte a la quinurenina en 3-hidroxiquinurenina en el hígado y el riñón de los mamíferos (F.T. de Castro et al., 1956). La enzima fue purificada parcialmente por Y. Saito et al. (1957) quienes demuestran que requiere la presencia del oxígeno molecular y del NADPH como cofactor.

La quinureninasa cataliza la formación del ácido 3-hidroxi-antranílico a partir de la 3-hidroxiquinurenina y requiere del fosfato de piridoxal como cofactor (A.E. Braunstein, 1949).

La oxidasa del ác. 3-hidroxiantranílico cataliza la apertura del anillo benzenico del 3-hidroxiantranilato para formar al ác. 2-acroleil-3-aminofumárico (M. Greenberg, 1969).

La descarboxilación enzimática del ác. 2-acroleil-3-aminofumárico conduce al semialdehido del ác. 2-amino-mucónico; éste último es convertido, de manera no enzimática, en el semialdehido del ác. 2-hidroxi-mucónico.



La conversión del triptofano en acetoacetil-CoA y acetil-CoA.

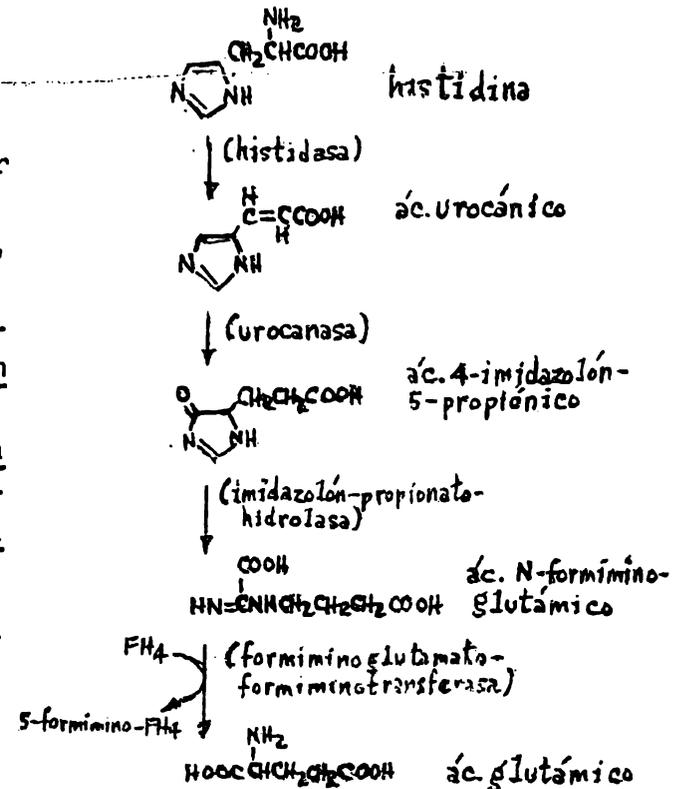
Los trabajos de R.K. Gholson et al. (1960), administrando 3-hidroxiantranilato-C₁₄¹⁴, triptofano-C₇¹⁴ y 3-hidroxiantranilato-H³ a las ratas, han aportado evidencias a favor de la vía quinurenin-antranflica.

(3) **Histidina.**- Las investigaciones con preparaciones enzimáticas del hígado de los mamíferos y de varios microorganismos como Pseudomonas fluorescens, Clostridium tetanomorphum y Aerobacter aerogenes han permitido esclarecer la ruta metabólica para la degradación de la histidina.

La histidina es desaminada inicialmente para formar ácido urocánico y la reacción es catalizada por la histidasa (Y. Sera y S. Yada, 1939); la enzima ha sido aislada de las bacterias (H. Tabor y O. Hayaishi, 1952; R.L. Wickremasinghe y B.-A. Fry, 1954) y de preparaciones hepáticas de conejo, rata y gato (D.A. Hall, -1952; A.H. Mehler y H. Tabor, 1953).

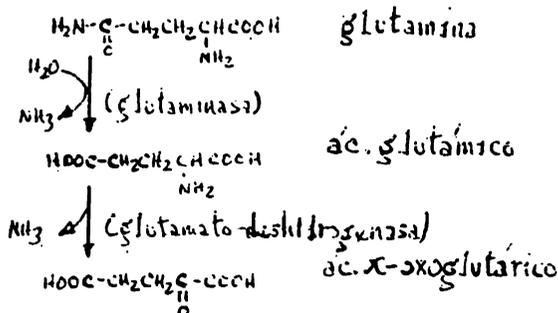
El ácido urocánico formado es convertido en ácido 4-imidazolón-5-propiónico por la acción de la urocanasa (B.A. Borek y H. Waelsch, 1953; H. Tabor y A.H. Mehler, 1954). A continuación, la imidazolón-propionato-hidrolasa transforma al ácido 4-imidazolón-5-propiónico en el correspondiente ácido de cadena abierta, el ácido 4-formiminoglutámico (A.H. Mehler y O. Hayaishi, 1955; R.H. Feinberg y D.M. Greenberg, 1958 y 1959; H.R.B. Revel y B. Magasanik, 1958).

Finalmente, el ácido N-formiminoglutámico es convertido en ácido glutámico por la acción de la formiminoglutamato formiminotransferasa (H. Tabor y J.C. Rabinovitz, 1956; A. Miller y H. Waelsch, 1957).



La conversión de la histidina en ácido glutámico.

(4) **Glutamina.**- En 1904, S. Lang demostró que la glutamina era desaminada por varios tejidos animales para formar ácido glutámico.



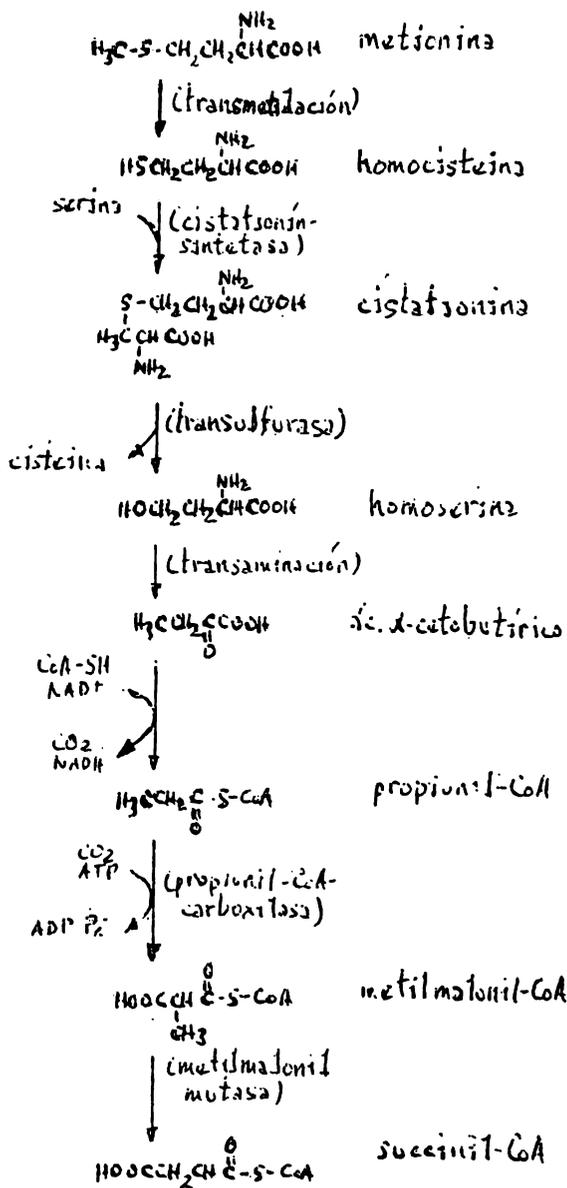
La conversión de la glutamina y el ácido glutámico en α -oxo-glutarato.

La reacción es catalizada por la glutamasa, la cual ha sido aislada y purificada a partir de homogenizados del riñón del cerdo y del perro (J.D. Klingman y P. Handler, 1958; J.A. Shepherd y G. Kalnitsky, 1951; F.W. Jayre y E. Roberts, 1958).

(5) **Acido glutámico.**- El ácido glutámico es desaminado por la glutamato-deshidrogenasa para formar amoníaco y al ácido α -cetoglutarico, el cual es un punto de entrada al ciclo del ácido tricarboxílico (J.A. Olsen y C.B. Anfinsen, 1953; B.L. Valleó et al., 1955; H.J. Sallach y L.A. Fahien, 1969).

c) La ruta del succinato. Los aminoácidos que son degradados por la vía del succinato, a través de la propionil-CoA y de la metilmalonil-CoA, son la metionina, isoleucina y la valina.

(1) Metionina.— La vía degradativa de la metionina comienza con la conversión del aminoácido en homocisteína (ác. α -amino- γ -tiolbutírico) mediante una reacción de transmetilación.



La conversión de la metionina en succinil-CoA.

W.G. Robinson et al. (1956) confirmaron las observaciones de Coon y sus colaboradores y, pudieron aislar a las enzimas involucradas en la vía degradativa, a partir del hígado de rata y del corazón del cerdo.

La degradación de la isoleucina se inicia con la conversión del aminoácido en el ácido α -ceto- β -metilvaleriano mediante una reacción de transaminación, la cual es catalizada por preparaciones del corazón de cerdo, de E. Coli y de las

A continuación, la homocisteína se combina con la serina para formar cistationina (β - β -amino- β -carboxietil/-L-homocisteína); en los homogenados y fracciones hepáticas de la rata, así como en la rata intacta, la reacción es catalizada por la cistationín-sintetasa (M. Tabachnick y H. Tarver, 1955; F. Binkley et al., 1952; D.E. Metzler et al., 1954).

La cistationina es hidrolizada por la transulfurasa para liberar cisteína y formar homoserina (J.R. Bachele et al., 1950). La homoserina es convertida, mediante una transaminación, en el ácido α -cetobutírico por los extractos hepáticos de rata (W.R. Carroll et al., 1949; Y. Matsuo y D.M. Greenberg, 1956 y 1958).

La vía degradativa se completa con la conversión, mediante una descarboxilación oxidativa, del ácido α -cetobutírico en propionil-CoA (R.L. Kisliuk et al., 1956), la cual es degradada hacia succinil-CoA por la misma ruta que utiliza la isoleucina.

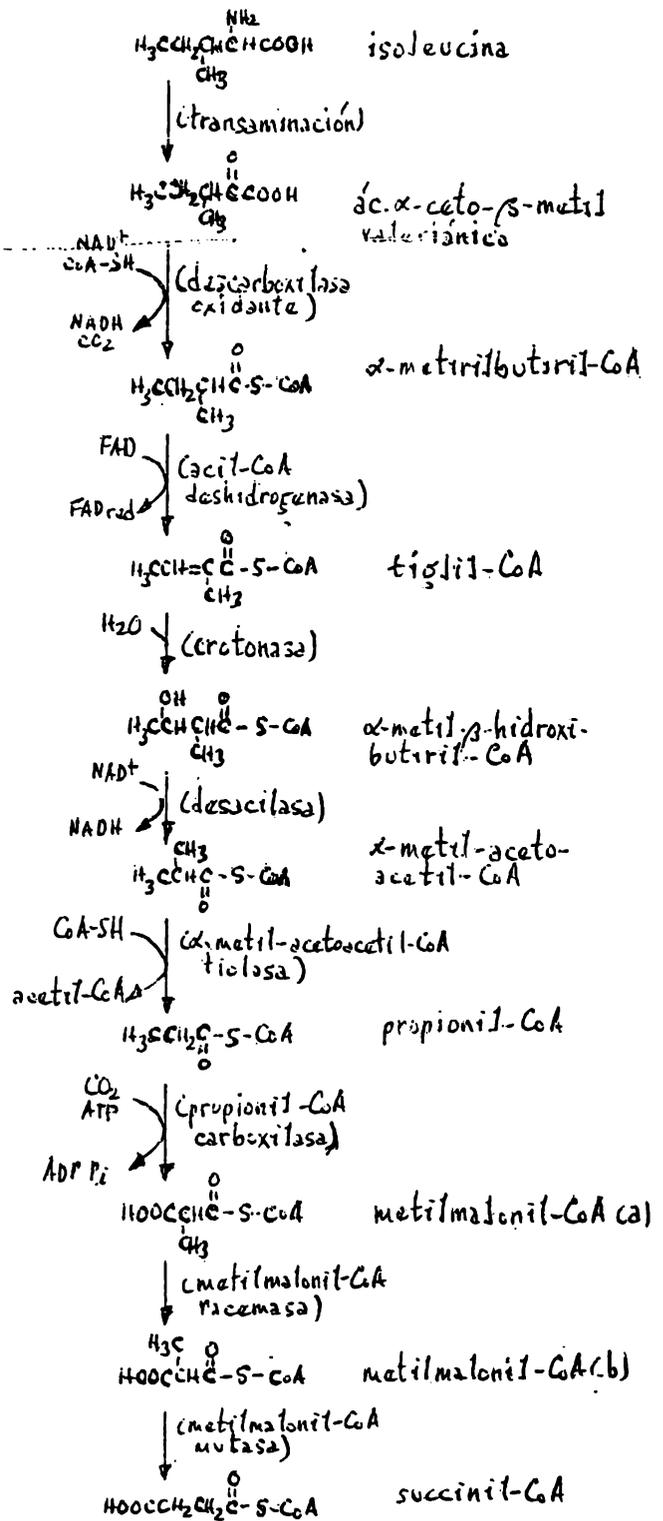
(2) Isoleucina.— M.J. Coon y N.S. E. Abrahamsen (1952) y M.J. Coon et al., (1952), utilizando ácido α -metilbutírico- C_{14}^{14} , demostraron que las fracciones hepáticas de la rata podían convertir a la isoleucina en acetato y propionato.

bacterias lácticas (A. Meister, 1954). El ácido α -ceto- β -metilvaleriánico es descarboxilado oxidativamente para formar α -metilbutiril-CoA por una descarboxilasa oxidante, que es la misma enzima que interviene en el metabolismo de la leucina y de la valina. (M.J. Coon et al., 1955).

A continuación, la acil-CoA-deshidrogenasa convierte al α -metilbutiril-CoA en tiglil-CoA, mediante una reacción de deshidrogenación (M.J. Coon et al., 1955); y, la tiglil-CoA es hidratada por la crotonasa para formar α -metil- β -hidroxibutiril-CoA (W. B. Robinson et al., 1956).

Este último compuesto, después de una oxidación y una desacilación, es convertido en propionil-CoA. La propionil-CoA carboxilasa convierte a la propionil-CoA en metilmalonil-CoA (a), en presencia del ATP (M. Flavin y J. Ochoa, 1957). Después de lo cual, la metilmalonil-CoA racemasa transforma a dicho compuesto en su isómero óptico, la metilmalonil-CoA (b) (R. Mazumder et al., 1961 y 1962).

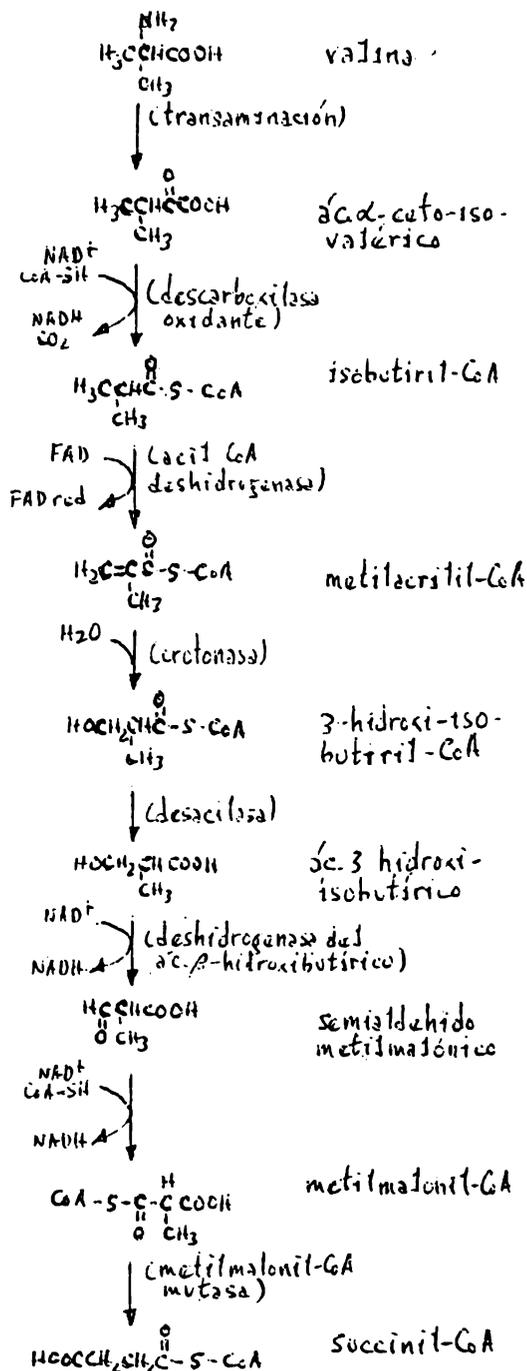
Finalmente, la metilmalonil-CoA se isomeriza hacia succinil-CoA en presencia de la metilmalonil-CoA mutasa (R. Stjernholm y H.G. Wood, 1961).



La conversión de la isoleucina en succinil-CoA.

La vía degradativa se inicia con la transaminación de la valina con el ácido α -cetoglutarico para formar al ácido α -cetoisovalérico, el cual es descarboxilado

oxidativamente para formar isobutiril-CoA (W.A. Atchley, 1948; I. Gray et al., 1950; O.S. Kinnury et al., 1950).



La conversión de la valina en succinil-CoA,

La conversión de la isobutiril-CoA en metilacrilil-CoA es catalizada por la acil-CoA deshidrogenasa (W.G. Robinson et al., 1957); la deshidrogenasa ha sido obtenida en forma muy pura por F.L. Crane et al. (1956). El metilacrilil-CoA se hidrata para formar 3-hidroxi-isobutiril-CoA; la reacción puede ser catalizada por la crotonasa (M.J. Coon et al., 1955; W.G. Robinson et al., 1957).

A continuación, una desacilasa cataliza la conversión del 3-hidroxi-isobutiril-CoA hacia el ácido 3-hidroxi-isobutírico (W.G. Robinson et al., 1957; G. Rendina y M.J. Coon, 1957).

La 3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa cataliza la oxidación del ácido 3-hidroxi-isobutírico para formar al semialdehído metilmalónico en las fracciones del corazón de cerdo; enzima requiere del NAD. (W.G. Robinson et al., 1957; H. Den et al., 1959).

Después de la oxidación del semialdehído metilmalónico hacia metilmaloni-CoA, ésta última es convertida en succinil-CoA por la metilmaloni-CoA mutasa, que depende de la cobamida (Y. Kaziro y S. Ochoa, 1964).

d) La ruta del fumarato. Esta es la ruta que siguen cuatro de los átomos de carbono de la fenilalanina y la tirosina, para convertirse en ácido fumárico que es un intermediario del ciclo del ácido tricarbóxico.

e) La ruta del oxalacetato. Esta es la ruta que siguen la asparagina y el ácido aspártico para incorporarse al ciclo del ácido tricarbóxico en forma de c. oxalacético.

(1) Asparagina.- La asparagina es hidrolizada por la asparaginasa para formar ácido aspártico y amoníaco.

3. Ciclo de la urea.

a) Introducción. Debido a que la urea es la vía principal para la eliminación de cierta parte del amoníaco que proviene de la degradación de los aminoácidos, esta vía metabólica ha recibido considerable atención lo que ha permitido el esclarecimiento del mecanismo enzimático implicado.

La urea fue aislada en forma impura por F.M. Rouelle (1783) mediante extracción alcohólica a partir del residuo dejado por la evaporación de la orina. En 1797, A.F. Fourcroy y N. Vauquelin también lograron obtener urea por evaporación de orina, extracción alcohólica y recuperación de la sustancia por evaporación de la solución alcohólica. Los investigadores describieron al compuesto cristalino, aún impuro, como una sustancia delicuescente, amarilla y de olor característico, asignándole el nombre de urea. En 1808, Fourcroy y Vauquelin pudieron obtener preparaciones más puras de la urea y en 1820, J.L. Proust aisló a esta sustancia en forma pura.

b) Identificación del sitio para la síntesis de urea. Varios investigadores trataron de descubrir el sitio de formación de la urea comparando el contenido de urea en la sangre periférica con el de la vena hepática (J.L. Söllman y col., 1824), o bien, comparando el contenido de urea de los diferentes tejidos (G. Meissner, 1860); pero fueron los trabajos de M. Nencki (1893) los que indicaron que el hígado es el sitio donde se efectúa la biosíntesis de la urea a partir del amoníaco metabólico. En tanto que permaneció oscuro el mecanismo de síntesis, se confirmó que los aminoácidos eran los precursores del amoníaco, o del ácido carbámico, que participan en el proceso (M. Hahn y col., 1893). W. von Schröder había descubierto en 1885 que el hígado sobreviviente sometido a perfusión era capaz de realizar la síntesis de urea a partir del carbonato de amonio, una observación que se confirmó posteriormente (W. Löffler, 1918), pero fue S. Salkin (1898) el primero en demostrar que el hígado sobreviviente, sometido a perfusión con sangre que contenía glicina o ácido aspártico, verdaderamente efectuaba la síntesis de urea.

M. Nencki y O. Schultzen (1872), en un intento por determinar el destino de los aminoácidos en el cuerpo de los animales, inyectaron aminoácidos a los perros, observando que prácticamente todo el nitrógeno era eliminado en forma de urea, y en menor cantidad, como amoníaco; el carbono de los aminoácidos era oxidado eventualmente rindiendo CO_2 . Investigaciones posteriores indicaron que en el organismo de los mamíferos en condiciones normales, los aminoácidos eran metabolizados totalmente produciendo urea (K. Stolte, 1903; A. Loewy y C. Neuberg, 1904; E. Abderhalden y col., 1911). A su vez, D.D. van Slyke y G.M. Mayer (1913-1914) encontraron que los aminoácidos inyectados en la corriente sanguínea de los perros eran absorbidos por los tejidos, pero que desaparecían con mayor rapidez en el hígado; además, la utilización hepática de los aminoácidos era seguida por un aumento en la concentración sanguínea de urea.

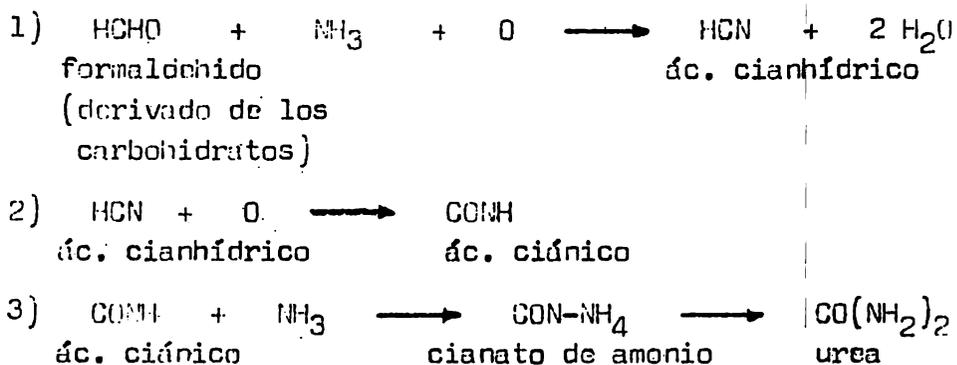
c) Primeras teorías para la formación de urea.

De manera que los experimentos con órganos perfundidos y con organismos en-

teros demostraron que el hígado de los mamíferos es el sitio exclusivo para la síntesis de la urea; por lo cual, pronto se propusieron varios mecanismos para tratar de explicar la formación de la urea a partir de los aminoácidos.

W. von Schröder (1882 y 1885) propuso la formación de la urea a partir del carbamato de amonio; en tanto que, E. Drechsel (1875) había sugerido que el carbamato de amonio era un paso intermedio entre el carbonato de amonio y la urea. Pero estas teorías fueron desechadas por W. Löffler (1916) sobre la base de que la urea se formaba en el hígado perfundido en presencia de soluciones ácidas. F. Hofmeister (1894) había propuesto una teoría para la formación de la urea por medio de un proceso oxidativo; su teoría se basaba en la observación de que en presencia del amoniaco, las proteínas y los aminoácidos eran oxidados por el permanganato para formar urea. F. Hoppe-Seyler propuso una teoría similar, después de observar que la adición de amoniaco a una solución fría de ác. ciánico, era seguida por la producción de urea (1871). Las dos últimas teorías tuvieron una gran aceptación.

En 1920, R. Fosse, combinando la teoría del ác. ciánico de Hoppe-Seyler con la teoría de oxidación de Hofmeister propuso un esquema para la formación de la urea :



Pero se siguió aceptando la teoría del carbamato, puesto que se consideraba que los experimentos de W. von Schröder con el hígado perfundido la apoyaban. Por lo que puede verse, estas teorías tuvieron una mayor o menor aceptación en los diferentes círculos bioquímicos, pero se descartaron después del descubrimientos del ciclo de la ornitina.

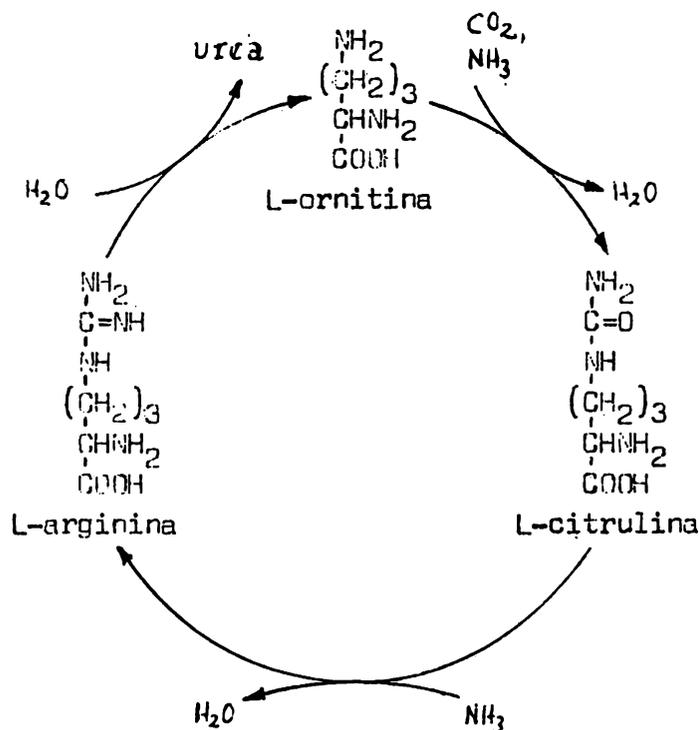
d) Las aportaciones decisivas de Krebs. En 1930, Hans Adolf Krebs decidió utilizar la técnica de las fracciones sobrevivientes de tejidos, desarrollada por O. Warburg en 1923, para estudiar la biosíntesis de la urea en el hígado de los mamíferos.

Y así, en 1932, después de adaptar métodos rápidos para la determinación de urea a las condiciones del método manométrico, H.A. Krebs y K. Henseleit hicieron determinaciones de la velocidad de formación de la urea en las fracciones del hígado de rata, para lo cual utilizaron varias mezclas de iones amonio y distintos aminoácidos; y, durante el curso de sus observaciones pudieron constatar que

ocurría un gran incremento en la biosíntesis de la urea cuando estaban presentes los iones amonio y la ornitina (el llamado "efecto de la ornitina"). Este notable descubrimiento fue el punto de partida de una serie de determinaciones que condujeron al esclarecimiento de esta vía metabólica.

Probando bajas concentraciones de ornitina, Krebs y Henseleit descubrieron que la sustancia seguía ejerciendo el mismo efecto estimulante que cuando estaba presente en concentraciones más elevadas; más aun, observaron que la concentración de la ornitina no disminuía durante el proceso y que la cantidad de urea formada podía explicarse por la disminución en la concentración de las sales de amonio. De lo cual resultó obvio el papel de la ornitina como un catalizador y, al mismo tiempo, como un intermediario.

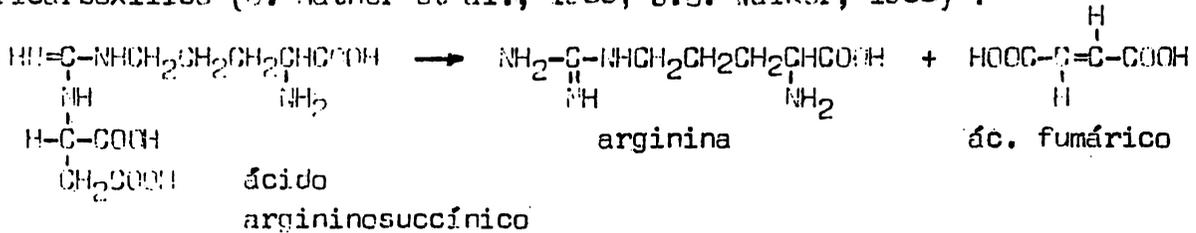
Después de observar que la arginina también ejercía un efecto estimulante, Krebs trató de detectar a algún posible intermediario entre la ornitina y la arginina. Y, de un análisis de la estructura química de los dos compuestos, Krebs sugirió la posible participación de un compuesto que había sido aislado recientemente a partir de la sandía (*Citrullus*) (M. Wada, 1930) y de la fermentación bacteriana de la arginina (D. Ackerman, 1931), la citrulina. Y, una vez que se demostró la rápida formación de la urea en presencia de la citrulina y de las sales de amonio; Krebs formuló un proceso cíclico para la formación de la urea a partir del dióxido de carbono y el amoniaco, con la participación de la citrulina y de la arginina como intermediarios. El ciclo recibió el nombre de "Ciclo de la ornitina".



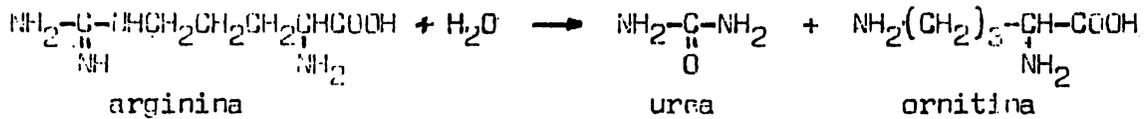
El ciclo de la ornitina de Krebs.

Los trabajos posteriores en los que se utilizaron fracciones de hígado de mamíferos y anfibios como la *Rana esculenta*, *R. temporaria* y *Bufo vulgaris* (H. Manderscheid, 1933; P. Münzel, 1938) demostraron la operación del ciclo.

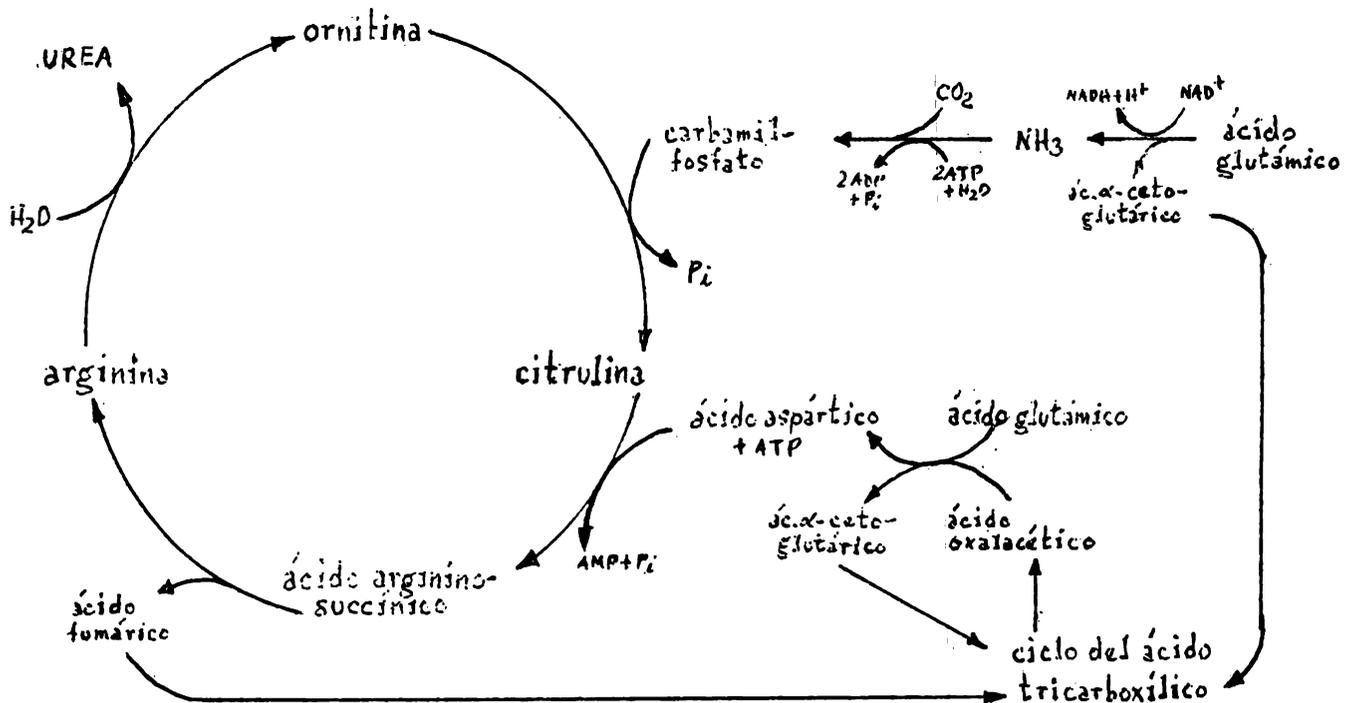
La argininasuccinasa cataliza, a continuación, la escisión del argininosuccinato para formar arginina y ác. fumérico, el cual penetra al ciclo del ácido tricarboxílico (S. Ratner et al., 1953; J.S. Walker, 1953) :



Finalmente, en los organismos que excretan urea, la arginasa cataliza la escisión de la arginina para formar urea y regenerar la ornitina (A. Kossel y H.D. Dakin, 1904) :



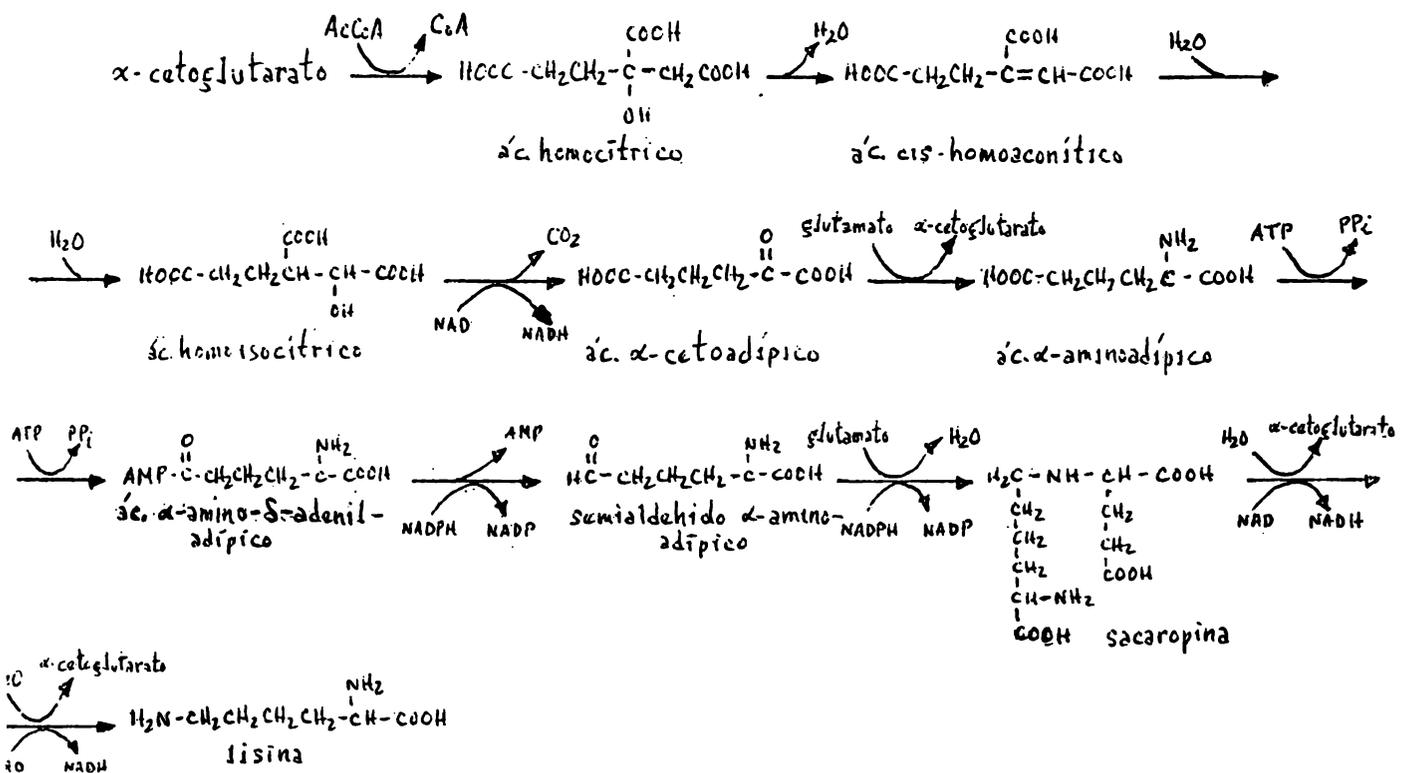
A continuación se muestra al ciclo de la urea, tal como opera en los organismos ureotéticos, y su relación con el ciclo del ácido tricarboxílico.



de sustrato, la cinética, la inhibición y el mecanismo de acción de la enzima (J.L. Peers et al., 1970; G.A. Woolfolk et al., 1966; D. Mecke y H. Holzer, 1966; D. Mecke et al., 1966; G.A. Woolfolk y E.R. Stadtman, 1967; A. Ginsburg y E.R. Stadtman, 1973; J.B. Anderson y E.R. Stadtman, 1970; B.B. Henning et al., 1970; M.S. Brown et al., 1972; J.H. Mangum et al., 1973).

Los estudios con Pseudomonas fluorescens, A. aerogenes y Erwinia carotovora (J.L. Peers y D.J. Tempest, 1970), con Neurospora crassa (M. Kapoor y D. Bray, 1968) y las investigaciones de J.S. Hubbard y E.R. Stadtman (1971), utilizando varios microorganismos, han confirmado y ampliado la importancia metabólica de la glutamín-sintetasa.

(3) Lisina.- Existen dos vías diferentes para la biosíntesis de la lisina. Los hongos utilizan una vía que pasa a través del ácido α -aminoadípico y en la cual se emplea al α -cetoglutarato como precursor; en tanto que, las bacterias y las plantas superiores, utilizan la vía que va a través del ácido diaminopimélico y en la que se parte del precursor aspartato. La vía del ácido diaminopimélico se discutirá posteriormente.



La ruta del ácido α -aminoadípico para la biosíntesis de la lisina en los hongos.

Los trabajos iniciales de H.K. Mitchell y M.B. Houlahan (1948), quienes observaron que ciertos mutantes de Neurospora podían utilizar al ácido α -aminoadípico en lugar de la lisina como factor de crecimiento; así como la demostración de E. Windsor (1951) de que dicho compuesto se podía convertir en lisina. Junto con los experimentos isotópicos en los que se utilizaban $\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{COOH}$ y $^{14}\text{CH}_3\text{-COOH}$ (C. Gilberg y K. Bloch, 1951; M. Strassman y S. Weinhouse, 1952 y 1953) y la observación de H.P. Broquist y A.V. Stiffey (1959) sobre la conversión de los

ácidos α -cetoadipico y α -aminoadipico hacia lisina en Torula utilis, permitieron conocer los pasos iniciales que se hallan involucrados en la degradación de la lisina.

En tanto que, los trabajos de N. Good et al., (1950) y los de T. Yura y H.J. Vogel (1957) y H.J. Vogel (1955) han permitido conocer los pasos finales de la vía biosintética.

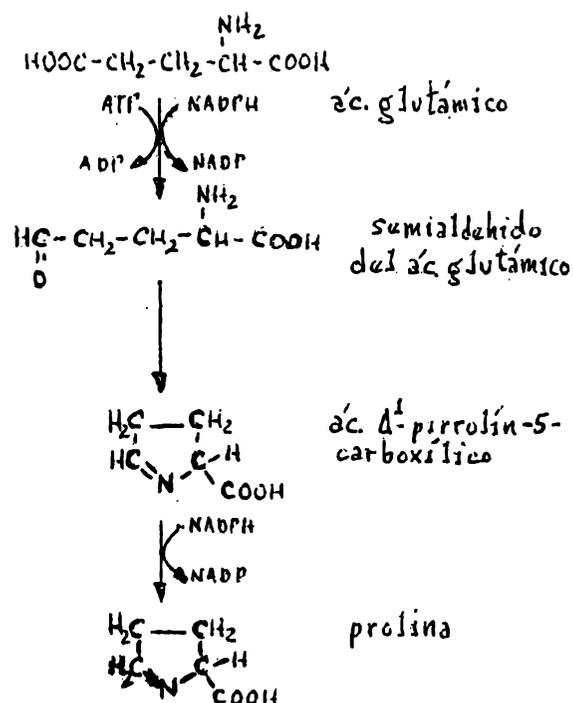
(4) **Prolina.**— De los trabajos con distintos microorganismos y con preparaciones enzimáticas se sabe que la síntesis de la prolina se efectúa por la inversión de la ruta seguida durante su degradación—(H.J. Vogel y B.D. Davis, 1952; H.J. Vogel, 1953; H.J. Strecker, 1957; H.J. Strecker y P. Pala, 1955; P.F. — Smith, 1957).

En tanto que, la ác. Δ^1 -pirrolín-5-carboxílico-reductasa cataliza la reducción de ese compuesto hacia prolina. La enzima se ha obtenido en forma pura a partir de varios tejidos de los mamíferos (M.E. Smith y D.M. Greenberg, 1957; A. Meister et al., 1957; D.M. Greenberg, 1961), de *Neurospora* (T. Yura y H.J. Vogel, 1955 y 1959) y de otros microorganismos (H.J. Vogel y B.D. Davis, 1952; A. Meister et al., 1957; T. Yura y H.J. Vogel, 1955 y 1959).

(5) **Arginina y ornitina.**— En las bacterias y en las plantas la arginina se sintetiza a partir de la ornitina.

H.J. Vogel descubrió que la biosíntesis de la ornitina a partir del ácido glutámico involucra la participación del N-acetilglutamato (1953 y 1955). Y, de sus investigaciones con *E. Coli* y *Neurospora*, descubrió que la llamada vía la del ácido N-acetilglutámico es la ruta principal para biosíntesis de la ornitina. (H.J. Vogel, 1956).

La síntesis comienza con la acetilación del ácido glutámico para formar el N-acetilglutamato (H.J. Vogel, 1953); la reacción es catalizada por una acetilasa (J.K. Maes et al., 1953). Después de la formación del N-acetilglutamato sigue una fosforilación por el ATP para formar al N-acetil- γ -glutamil-fosfato, el cual es reducido hacia el semialdehído del ácido N-acetilglutámico por el NADPH (H.J. Vogel, 1953). A continuación, una transaminasa cataliza la formación de la N-acetilornitina a partir del semialdehído del ácido N-acetilglutámico y el ácido glutámico (H.J. Vogel, 1953).

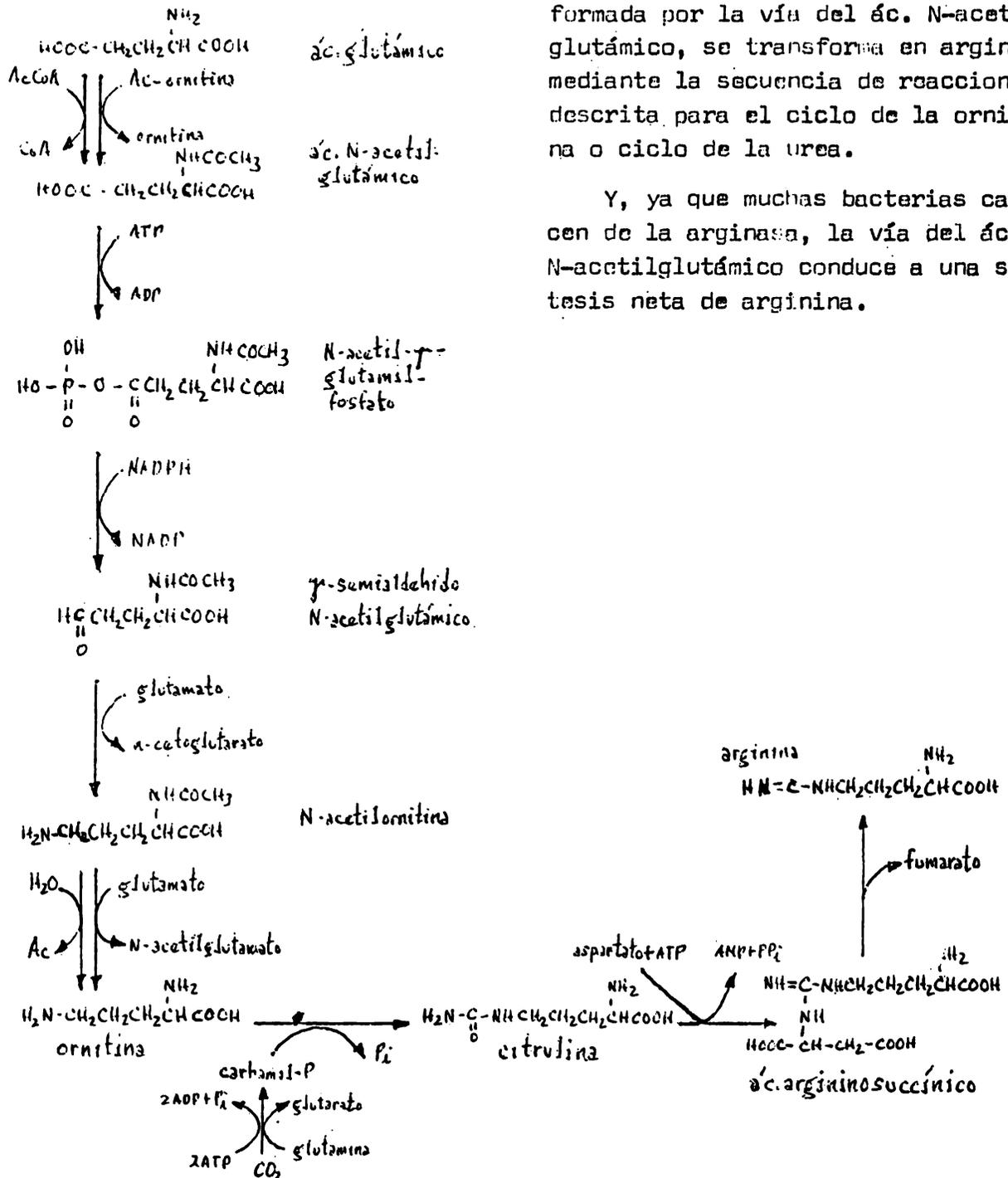


La biosíntesis de la prolina a partir del ácido glutámico.

Finalmente, en *E. Coli* la N-acetilornitina es hidrolizada por la acetil-ornitinasasa para formar ornitina libre y ác. acético (H.J. Vogel, 1953; H.J. Vogel y D.L. Bonner, 1956); mientras que en otros microorganismos como Micrococcus glutamicus, Pseudomonas aeruginosa y las algas azul-verdes (D.S. Hoare y S.L. Hoare, 1967), Blastocladiella emersonii (D.F. Smith y R.A. Holmes, 1970) y Chlamydomonas reinhardtii (A. Farago y G. Denes, 1969) la N-acetilglutamato quinasa cataliza la transferencia del grupo acétilo de la N-acetilornitina hacia el ác. glutámico, para formar ornitina libre y regenerar al N-acetilglutamato.

En las bacterias, la ornitina formada por la vía del ác. N-acetilglutámico, se transforma en arginina mediante la secuencia de reacciones descrita para el ciclo de la ornitina o ciclo de la urea.

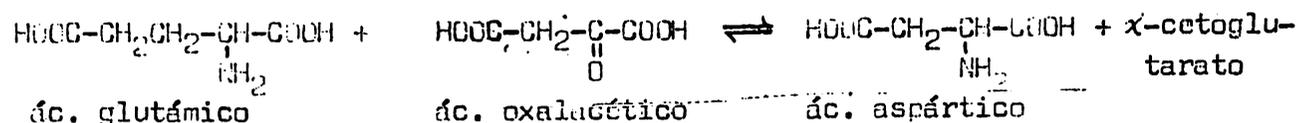
Y, ya que muchas bacterias carecen de la arginasa, la vía del ác. N-acetilglutámico conduce a una síntesis neta de arginina.



La vía del ác. N-acetilglutámico para la síntesis de la arginina.

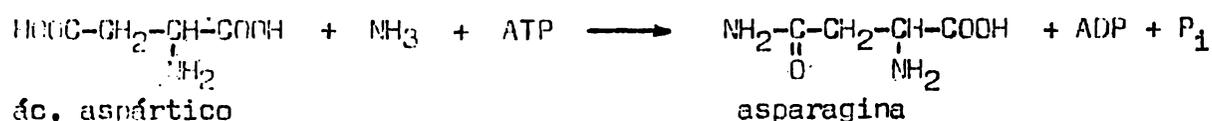
b) La familia del oxalacetato o familia del aspartato. Los aminoácidos que tienen como su precursor biosintético al ác. oxalacético son el ác. aspártico, la asparagina, la metionina, la treonina y la isoleucina. La vía del ác. diaminoimérico para la síntesis de la lisina también parte del ác. oxalacético.

(1) **Acido aspártico.**- El ác. aspártico se forma mediante una reacción de transaminación entre el ác. glutámico y el ác. oxalacético en la mayoría de los organismos:



La reacción es catalizada por la transaminasa glutámico-aspártica, la cual se ha obtenido de preparaciones de tejido muscular (A.E. Braunstein y M.G. Kritzman, 1937 y 1939), del músculo cardiaco del cerdo (P.P. Cohen, 1939; D.E. Green et al., 1945) y de *E. Coli* (D. Rudman y A. Meister, 1953; R.H. Collier y G. Kohlman, 1972).

(2) **Asparagina.**- En la mayoría de los organismos la asparagina se forma a partir del ác. aspártico y el amoniaco :



La asparagin-sintetasa se ha obtenido del germen de trigo (G.C. Webster y J.E. Varner, 1955), de *Lactobacillus arabinosus* (J.M. Ravel et al., 1962), de *Streptococcus bovis* (J.J. Burchall et al., 1964) y de *E. Coli* (H. Cedar y J.H. Schwartz, 1969).

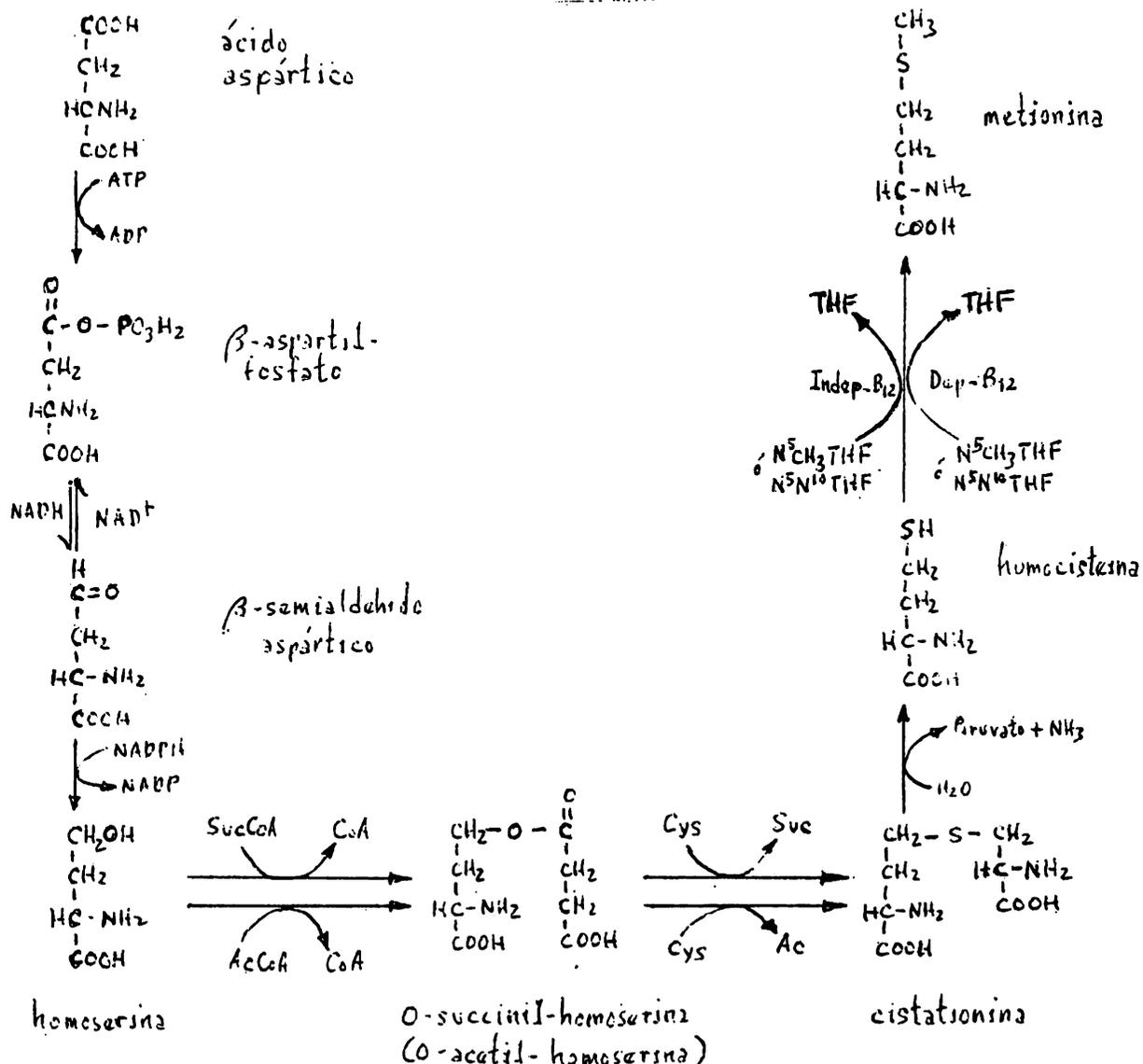
(3) **Metionina.**- La metionina y la treonina se sintetizan mediante una vía común que parte de la homoserina, la que a su vez deriva del ác. aspártico.

Los trabajos de H.J. Teas et al. (1948) y de M. Fling y N.H. Horowitz (1951), con mutantes de *Neurospora*, demostraron que la homoserina era el precursor de la metionina y de la treonina.

Las investigaciones posteriores de A.M. Delluva (1953), quien descubrió que el aspartato- C_3^{14} se incorporaba al C-3 de la treonina en *E. Coli*; las investigaciones de M.L. Hirsch y G.N. Cohen (1953), quienes observaron la acumulación de homoserina después de adicionar aspartato a suspensiones de mutantes de *E. Coli*; y el descubrimiento de S. Black y N.G. Wright (1955), sobre la incorporación del aspartato- C_3^{14} , a la treonina formada en los extractos sin células de levadura, demostraron que el aspartato era el precursor de la homoserina.

Los estudios con levaduras (S. Black y N.G. Wright, 1955), con *Neurospora* (H.J. Teas y N.H. Horowitz, 1948), con *E. Coli* (G.N. Cohen y M.L. Hirsch, 1953 y 1954; E.H. Normser y A.B. Pardee, 1958) y con las plantas superiores (E. Bilinski y W.B. McConell, 1957), han permitido establecer la vía para la formación de la homoserina a partir del ác. aspártico.

La fosforilación del ácido aspártico para formar β -aspartil-fosfato es catalizada por la aspartil-quinasa. La enzima ha sido aislada, y ampliamente estudiada, a partir de E. Coli y S. typhimurium (G.N. Cohen, 1969; A.L. Taylor y C.D. Trotter, 1972; G. Stuttard, 1973; M. Jeron et al., 1972; F. Falcoz-Kelly et al., 1972; M.L. Starnes et al., 1972; D.E. Wampler, 1972; R.B. Clark y J.H. Ogilvie, 1972; M. Freundlich, 1963; F. Falcoz-Kelly et al., 1969; R.L. Cafferata y M. Freundlich, 1969; J.C. Patte et al., 1967; P. Truffa-Bachi y G.N. Cohen, 1966; D.E. Wampler y E.W. Vesthead, 1968; J.C. Patte et al., 1972; N.W. Lee et al., 1966).



La ruta de la homoserina para la síntesis de la metionina.

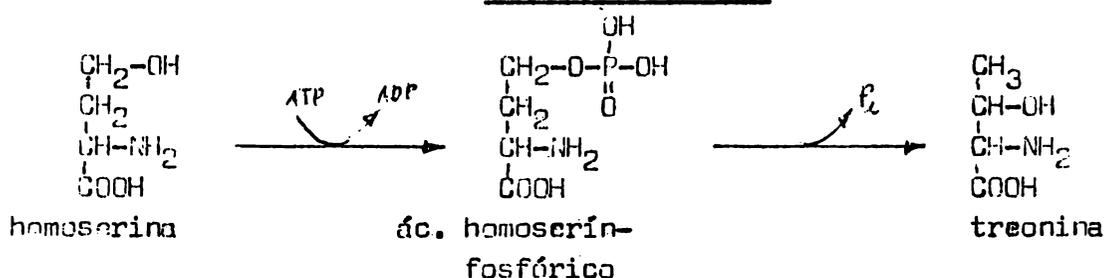
La β -semialdehído-aspártico deshidrogenasa cataliza la reducción del β -aspartil-fosfato para formar, reversiblemente, al β -semialdehído aspártico en presencia del NADH o del NADPH (S. Black y N.G. Wright, 1955; M.J. Holland y E.W. Vesthead, 1973).

A continuación la homoserin-deshidrogenasa cataliza la reducción del β -semialdehído aspártico hacia homoserina; la enzima requiere del NADPH como cofactor. La conversión de la homoserina en metionina ha sido estudiada ampliamente por

varios investigadores. La conversión se inicia con la formación de la O-succinil-homoserina en E. coli y S. typhimurium; mientras que, en los hongos (M.A. Savin y M. Flavin, 1972) y en B. subtilis (A. Grush y H. Paulus, 1971), se forma la O-acetil-homoserina.

A continuación, la O-succinil(ó acetil)-homoserina se condensa con la cisteína para formar cistationina, en la mayoría de los organismos (M.A. Savin y M. Flavin, 1972; D.S. Kerr y M. Flavin, 1970). La cual es hidrolizada hacia la homocisteína por una sulfhidrilasa en N. Crassa (D.S. Kerr y M. Flavin, 1970) y en las levaduras (H. Cherest et al., 1969). Finalmente, en E. coli y S. typhimurium, la metilación de la homocisteína conduce a la formación de la metionina. La reacción es catalizada por dos transmetilasas, una que depende de la vitamina B₁₂ y otra que es independiente; algunos organismos solamente poseen a una de las dos transmetilasas (A.R. Salem y M.A. Foster, 1972).

(4) Treonina.- La conversión de la homoserina en treonina ha sido estudiada ampliamente por Y. Watanabe et al. (1955, 1956 y 1957). La conversión se inicia con la fosforilación de la homoserina para formar ác. homoserín-fosfórico; la reacción es catalizada por la homoserín-quinasa :



A continuación, el ác. homoserín-fosfórico se convierte en treonina por la acción de la treonín-sintetasa, que requiere del fosfato de piridoxal (M. Flavin et al., 1960).

(5) Isoleucina.- Las rutas para la biosíntesis de la isoleucina y de la valina son muy similares y, comunmente, se estudian juntas.

El descubrimiento de los precursores dihidroxilados, el ác. α,β -dihidroxi-sovalérico y el ác. α,β -dihidroxi- β -metilvalérico (E.A. Adelberg y E.L. Tatum, 1950; J.R. Sjolander et al., 1954); así como la transaminación de los oxo derivados de estos ácidos con el ác. glutámico (D. Rudman y A. Meister, 1953); y los resultados del marcado isotópico, demostraron que la biosíntesis de la valina se iniciaba con la condensación del ác. pirúvico y el acetaldehído, en tanto que la biosíntesis de la leucina se iniciaba con la condensación del ác. α -cetobutírico y el ác. pirúvico (M. Strassman et al., 1953; P.H. Abelson, 1954; P.H. Abelson y H.J. Vogel, 1955).

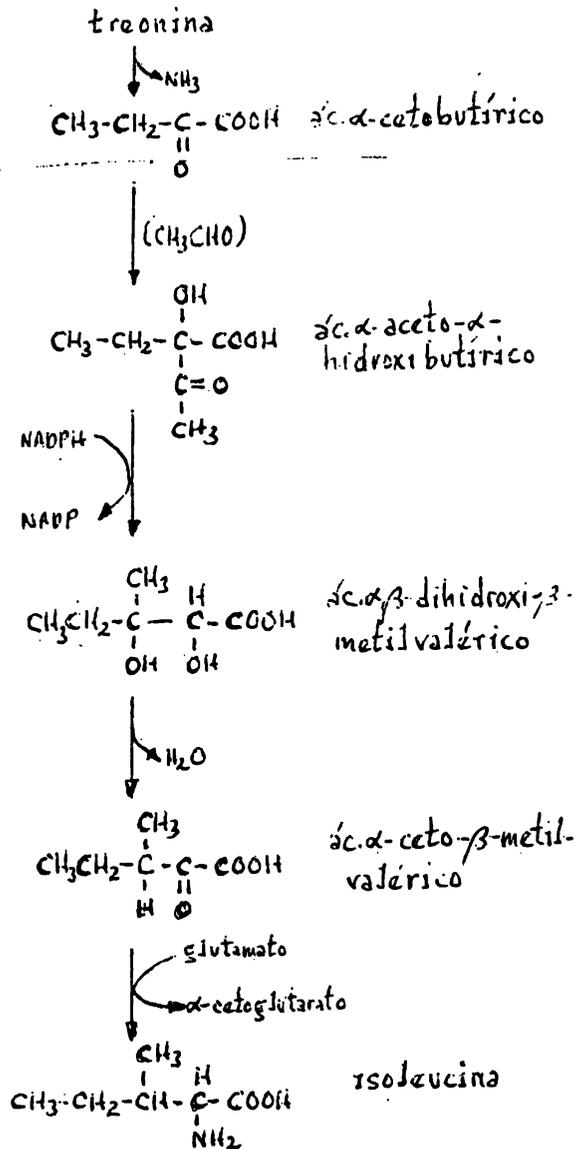
Se especulaba que la reacción de condensación era seguida de un arreglo piridoxal (M. Strassman et al., 1954; E.A. Adelberg, 1954). Y, en tanto que E.A. Adelberg et al. (1953) demostraron que la biosíntesis de la isoleucina y la valina eran independientes, D. Rudman y A. Meister (1953) y J.W. Myers y E.A. Adelberg (1954) demostraron que una dihidroxiácido deshidratasa y una transaminasa catalizaban reacciones comunes en ambas síntesis, en ciertos mutantes de Neurospora y E. coli.

La biosíntesis de la isoleucina se inicia con la formación del α -ceto- β -hidroxibutírico a partir de la treonina como lo demostraron los experimentos con mutantes de varios microorganismos (H.E. Umbarger y E.A. Adelberg, 1951), los experimentos de competición isotópica (P.H. Abelson, 1954 y 1955) y los de marcado isotópico (R.L. Herrmann y J.R. Fairley, 1957). La reacción es catalizada por la treonina-desaminasa.

El α -ceto- β -hidroxibutírico se condensa con el acetaldehído activo, derivado del piruvato, para formar al α -aceto- α -hidroxibutírico (M. Strassman et al., 1954; K.F. Lewis y S. Reinhouse, 1958; R.P. Wagner et al., 1959; Y. Watanabe et al., 1959). A continuación, el α -aceto- α -hidroxibutírico experimenta un rearrreglo, seguido de una reducción, para formar al α,β -dihidroxi- β -metilvalérico tal como lo demostraron los experimentos con Neurospora (R.P. Wagner et al., 1958) y con E. coli (H.E. Umbarger, 1958).

El α,β -dihidroxi- β -metilvalérico es deshidratado para formar al α -ceto- β -metilvalérico; la reacción es catalizada por una deshidratasa (R.P. Wagner et al., 1958; H.E. Umbarger, 1958; J.W. Myers y E.A. Adelberg, 1954).

Finalmente, una transaminasa cataliza la formación de la isoleucina a partir del α -ceto- β -metilvalérico y del α -glutámico. La enzima ha sido aislada de E. coli (D. Rudman y A. Meister, 1953; E.A. Adelberg y H.E. Umbarger, 1953) y de Neurospora (J.R.S. Fincham y A.B. Boulter, 1956; R.L. Soecof y R.P. Wagner, 1959).

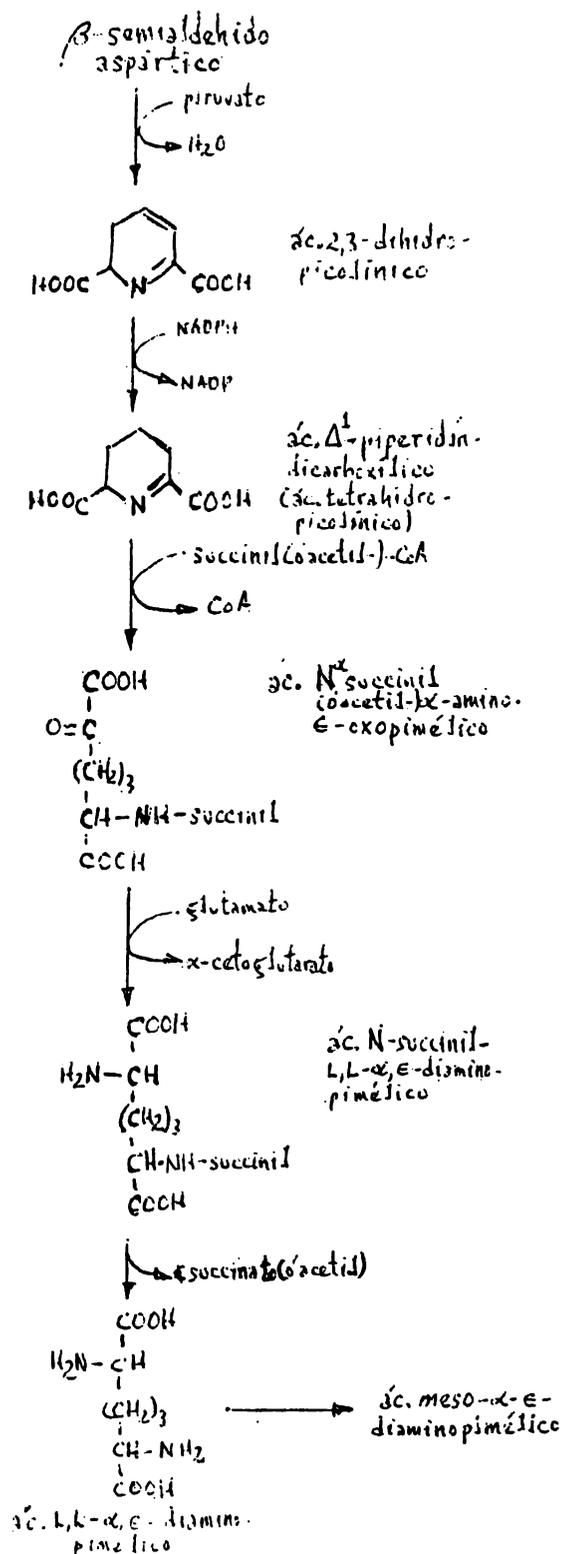


La biosíntesis de la isoleucina a partir de la treonina.

Lisina : La vía del α,ϵ -diaminopimélico.- El α,ϵ -diaminopimélico fue descubierto, durante sus estudios con Corynebacterium diphtheriae, por E. Work en 1949. Posteriormente, E. Work y D.L. Dewey (1953) demostraron que se hallaba ampliamente distribuido en las bacterias y en las algas azul-verdes; y, en 1952, mediante estudios nutricionales con auxotrofos de E. coli, B.D. Davis sugirió que el α,ϵ -diaminopimélico podría ser un precursor de la lisina.

Pronto, los experimentos con isótopos demostraron que el α,ϵ -diaminopimélico era el precursor de cuatro de los siete átomos de carbono del α,ϵ -diaminopimélico (R. B. Roberts et al., 1955); en tanto que, las preparaciones enzimáticas obtenidas

de E. coli, eran capaces de sintetizar al ác. diaminopimélico a partir del ác. pi
rúvico y del ác. aspártico (L.E. Rhuland y G. Mannister, 1956; C. Gilvarg, 1957 y
1958). P. Meadow y E. Work (1959) descubrieron que el C^{14} del piruvato o del as
partato podían incorporarse al ác. diaminopimélico intracelular y a la lisina de
E. coli. Estas investigaciones, por tanto, demostraron que las bacterias dife
rían de las levaduras y los hongos en la ruta para sintetizar a la lisina.



La ruta del ác. diaminopimélico co
mienza con la condensación del β -semialde
hído aspártico y el ác. pirúvico para for
mar al ác. 2,3-dihidropicolínico (J.J. -
Perry y J.W. Foster, 1956; E. Work, 1955).
El cual es reducido por el NADPH para for
mar el correspondiente ác. Δ^1 -piperidín-
dicarboxílico.

La reacción de este compuesto con la
succinil-CoA en E. coli (S.H. Kindler y
C. Gilvarg, 1960) o con la acetil-CoA en
B. megaterium (S. Sundharadas y C. Gil
varg, 1967) conduce a la formación del ác.
N^s-succinil(ó acetil) α -amino- ϵ -oxopiméli
co (P. Meadow y E. Work, 1958). La trans
aminación de este compuesto con el ác. glu
támico produce al ác. N-succinil(ó acetil)
 α , ϵ -diamino-pimélico (C. Gilvarg, 1957, -
1958, 1959 y 1960).

A continuación se remueve el grupo
succinil o acetil para formar al ác. L,L-
 α , ϵ -diaminopimélico; este es convertido
en la forma meso, el ác. meso- α , ϵ -diamino
pimélico, por una racemasa (M. Antia et
al., 1957). Y, finalmente, la ác. diami
nopimélico-descarboxilasa cataliza la des
carboxilación del compuesto meso para for
mar a la L-lisina en E. coli (D.L. Dewey
y E. Work, 1952; D.L. Dewey et al., 1954;
D.S. Hoare y E. Work, 1955).

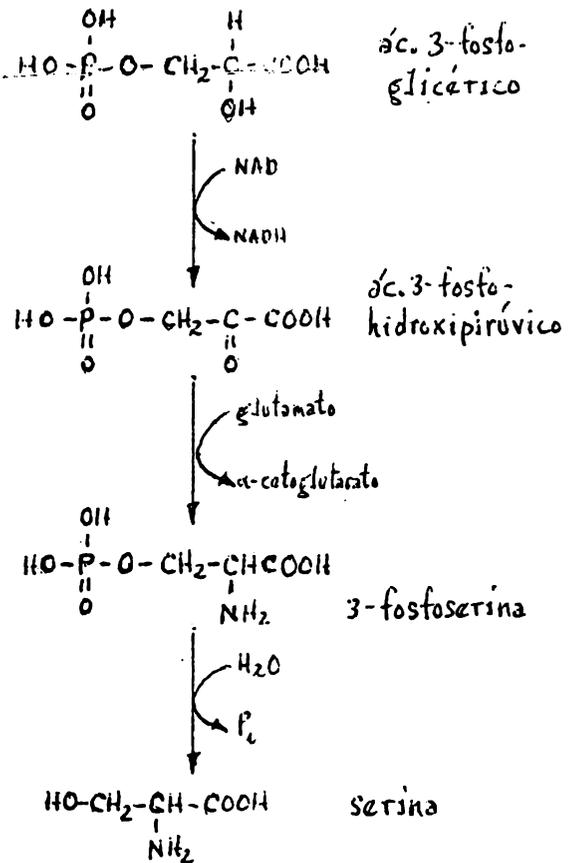
La vía del ác. diaminopimélico para la biosíntesis de la lisina en las
bacterias y las plantas.

c) La familia de la serina. Los aminoácidos que utilizan la vía del ácido 3-fosfoglicérico para su biosíntesis son la serina, la glicina y la cisteína.

(1) Serina.- El descubrimiento de que un fragmento de tres carbonos, derivado de los carbohidratos o de las grasas, era el precursor inmediato de la serina y que no se trataba del ác. pirúvico, llevó a la conclusión de que el posible precursor sería el ác. glicérico o el ác. 3-fosfoglicérico. (H.R.V. Arnstein, 1955; S. Kit, 1955; A.L. Black et al., 1955; J. F. Nye & I. Zabin, 1955).

Los experimentos en los que se utilizaron glicerol- C^{14} (R.E. Koeppe et al., 1957) y ác. glicérico- C^{14} (H.J. Sallach, 1956; J.L. Hedrick y H.J. Sallach, 1960) dieron apoyo a esa conclusión. El estudio de las enzimas involucradas en la ruta biosintética llevó a la formulación de la vía del ác. 3-fosfoglicérico para la síntesis de la serina (H.J. Sallach, 1956; A. Ichihara y D.M. Greenberg, 1955 y 1957).

La síntesis comienza con la oxidación del grupo α -hidroxilo del ác. 3-fosfoglicérico para formar al ác. 3-fosfohidroxipirúvico (C.E. Gallou y R. Hesse, 1956; A. Ichihara y D.M. Greenberg, 1957). Este compuesto efectúa una transaminación con el ácido glutámico para formar a la 3-fosfoserina; la reacción es catalizada por una glutamato-transaminasa (A. Ichihara y D.M. Greenberg, 1955 y 1957). Finalmente, la 3-fosfoserina experimenta hidrólisis, catalizada por la serín-fosfatasa, para formar a la serina libre (L.F. Borkenhagen y E.P. Kennedy, 1949; J. Hanford y D.D. Davis, 1958; F.C. Neuhaus y W.L. Byrne, 1959).



La vía del ác. 3-fosfoglicérico para la síntesis de la serina.

La vía del ác. 3-fosfoglicérico es la única para la biosíntesis de la serina en E. coli y en muchos microorganismos (H.E. Umbarger et al., 1963; L.I. Pizer y 1963).

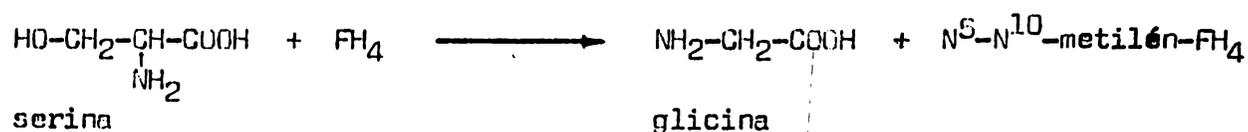
(2) Glicina.- Administrando serina doblemente marcada, en el grupo amino y en el grupo carboxilo - $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CHN}^{15}\text{H}_2-\text{C}^{13}\text{OOH}$ -, a las ratas D. Shemin (1946) descubrió que los animales formaban a la glicina con la misma relación $\text{N}^{15}:\text{C}^{13}$ que la serina administrada; lo cual sugirió a Shemin que la serina era degradada hacia glicina, mediante la eliminación del carbono β , en forma de un grupo fur-

Pero, la identidad del formaldehído "activo", no se estableció hasta que se descubrió el modo de acción del ác. fólico.

Los estudios sobre la formación de la serina a partir de la glicina (T. Winnick, I. Moring-Claesson y D.M. Greenberg, 1948; P.D. Goldsworthy, T. Winnick y D.M. Greenberg, 1949; P. Sickevitz y D.M. Greenberg, 1949); el descubrimiento de que un fragmento C_1 , un derivado del formaldehído, se condensaba con la glicina para formar el carbono β de la serina (I. Siegel y J. Lafaye, 1950; C. Mitoma y D.M. Greenberg, 1952; D. Elwyn et al., 1951); la observación de que el formaldehído era activado por medio de una reacción con el ác. tetrahidrofólico (R.L. - Kisliuk y W. Sakami, 1954 y 1955; R.L. Blakley, 1954; J. Lascelles y D.D. Woods, 1950 y 1954; S. Doodhar y W. Sakami, 1953; D.W. Sakami, 1955; N. Alexander y D. - M. Greenberg, 1955 y 1956; R.L. Blakley, 1955; F.M. Huennekens et al., 1957; L. - Jaenicke, 1955; H.M. Rauen y L. Jaenicke, 1953; P. Berg, 1953); y los estudios con S. faecalis (J. Lascelles y D.D. Woods, 1950 y 1954) y con homogenados hepáticos (W. Sakami et al., 1953 y 1955), que mostraron el requerimiento del fosfato de piridoxal como cofactor, permitieron conocer el papel del ác. fólico durante la interconversión serina-glicina.

En tanto que, los trabajos de R.L. Blakley (1957), R.L. Kisliuk (1957), R. - L. Blakley (1958), M.J. Osborn y F.M. Huennekens (1957 y 1959), R.L. Blakley -- (1954 y 1955) y M.J. Osborn et al. (1957) permitieron conocer la estructura de las coenzimas del ác. tetrahidrofólico.

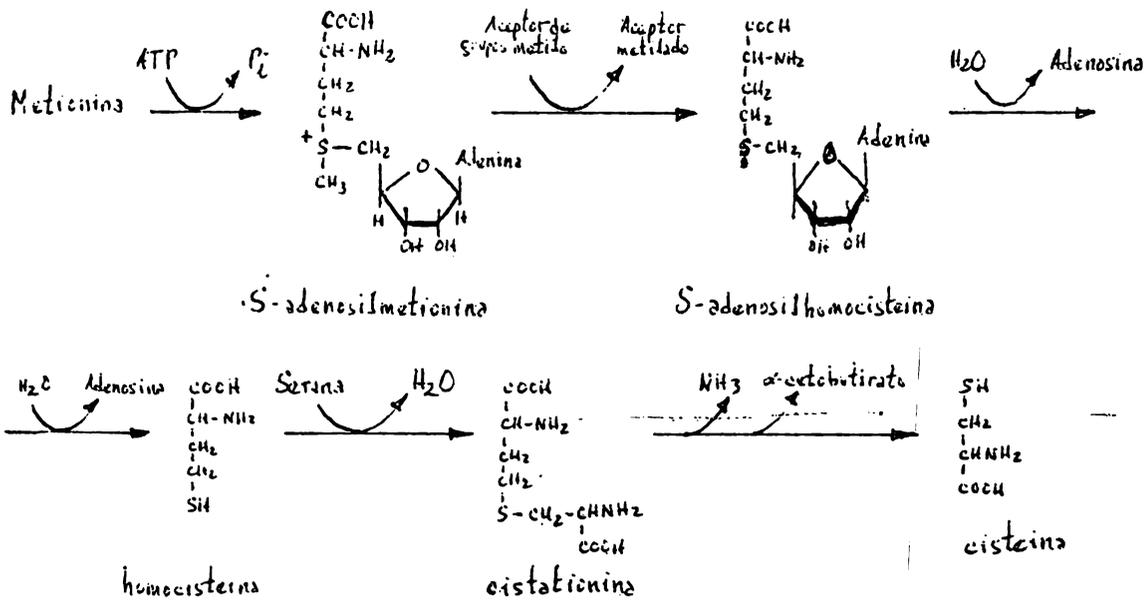
Actualmente, se sabe que el ác. tetrahidrofólico, FH_4 , actúa como aceptor del carbono β de la serina, cuando ésta se escinde para formar glicina. El átomo de carbono eliminado forma un puente metilénico entre los átomos de nitrógeno 5 y 10 del tetrahidrofolato para formar al N^5-N^{10} -metilén-tetrahidrofolato :



(3) Cisteína.- Los estudios de nutrición con animales demostraron que el átomo de azufre de la metionina podía ser utilizado para la biosíntesis de la cisteína; lo cual se comprobó al administrar metionina- S^{35} a las ratas, al hombre y a los perros, mediante el aislamiento de la cisteína marcada a partir de tales organismos (W.C. Rose et al., 1955).

La biosíntesis de la cisteína se inicia con la conversión de la metionina en homocisteína, mediante la pérdida del grupo metilo del átomo de azufre que es transferido hacia un aceptor de grupos metilo por el ATP. La S-adenosilhomocisteína resultante es hidrolizada hacia homocisteína libre. A continuación, la homocisteína se condensa con la serina para formar cistationina; la reacción es catalizada por la cistationín-sintetasa (M. Tabachnick y H. Tarver, 1955; F. Binkley et al., 1952; D.E. Metzler et al., 1954).

Finalmente, la cistationasa cataliza la escisión de la cistationina para formar cistationina libre; la enzima requiere del fosfato de piridoxal (F. Binkley et al., 1952; D.E. Metzler et al., 1954).

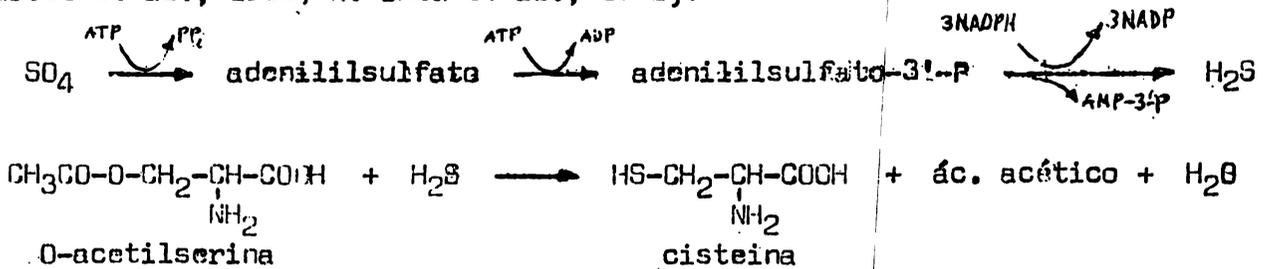


La biosíntesis de la cisteína a partir de la metionina y la serina en los animales superiores.

En algunos microorganismos como *E. coli* y *S. typhimurium* se utiliza otra ruta para la síntesis de cisteína. La vía involucra la activación de la serina para formar la O-acetilserina, que posteriormente se condensa con el H₂S.



N.M. Kredich y G.M. Tompkins (1966) observaron la formación de la O-acetilserina en extractos de *E. coli* y en mutantes de *S. typhimurium*. En tanto que, la activación del grupo sulfato y su reducción hacia sulfito, y la reducción completa del sulfito hacia sulfuro, conduce a la formación del H₂S que a continuación se condensa con la O-acetilserina (N.M. Kredich et al., 1969; R.J. Ellis, 1964; A.B. Pardee et al., 1966; N. Ohta et al., 1971).



d) La familia del piruvato. Los aminoácidos que se sintetizan a partir del ácido pirúvico son la valina, alanina y leucina.

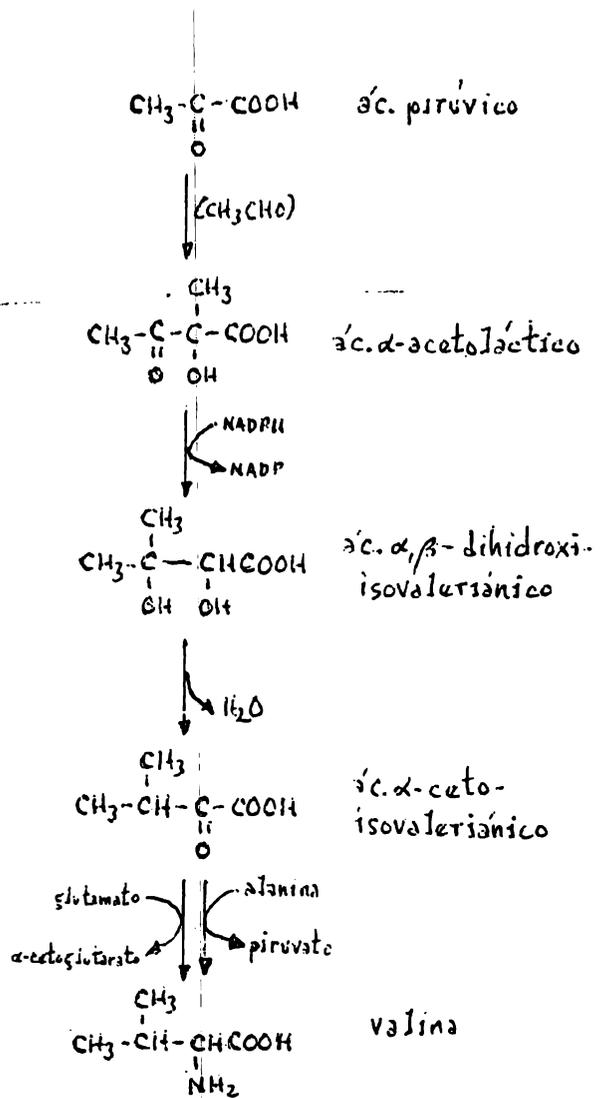
(1) valina.- Como ya se vió, la biosíntesis de la valina es muy semejante a la de la isoleucina; además de que, las mismas enzimas catalizan las distintas reacciones de las dos vías metabólicas.

La biosíntesis de la valina se inicia con la condensación de un grupo acetaldehído activo (que deriva del piruvato) con una segunda molécula de piruvato para formar al ácido α-acetoláctico (T.P. Singer y J. Pensky, 1952; M. Strassman et al., 1953; K.F. Lewis y S. Weinhouse, 1958; H.E. Umbarger et al., 1957 y 1958; R.P. Wagner et al., 1959).

A continuación, el ácido α-acetoláctico experimenta una reducción, seguida de la migración de un grupo metilo, para formar al ácido α,β-dihidroxi-isovaleriánico (E.A. Adelberg y E.L. Tatum, 1950; J.R. Bjolander et al., 1954; E.A. Adelberg y H.E. Umbarger, 1953; R.P. Wagner et al., 1958; H.E. Umbarger, 1958).

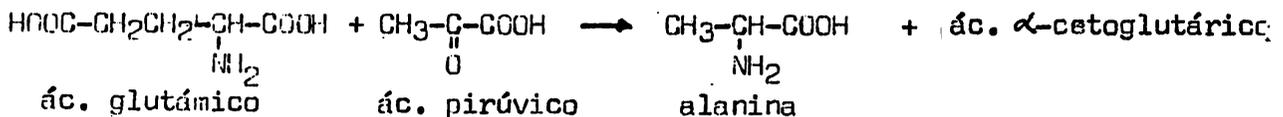
Una deshidratasa cataliza la deshidratación del dihidroxiácido para formar el correspondiente cetoácido, el ácido α-cetoisovaleriánico como lo demostraron J. Strassman et al. (1958) utilizando levaduras y J.W. Myers y E.A. Adelberg (1954) con extractos de *E. coli* y *Neurospora*.

Por último, una transaminasa cataliza la reacción entre el ácido α-cetoisovaleriánico y el glutamato o la alanina para formar a la valina (D. Rudman y A. Meister, 1953; J.R.S. Finchman y A.B. Boulter, 1956; R.L. Seecof y R.P. Wagner, 1959).

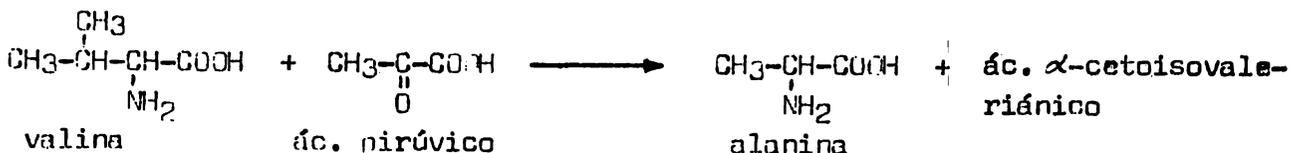


La biosíntesis de la valina a partir del piruvato.

(2) Alanina.- En la mayoría de los organismos la alanina se sintetiza por la transaminación entre el ácido glutámico y el ácido pirúvico (A.E. Braunstein y M.G. Kritzmann, 1937 y 1938; P.P. Cohen, 1939). La reacción es catalizada por la transaminasa alanín-glutámica (D.E. Green et al., 1945) :



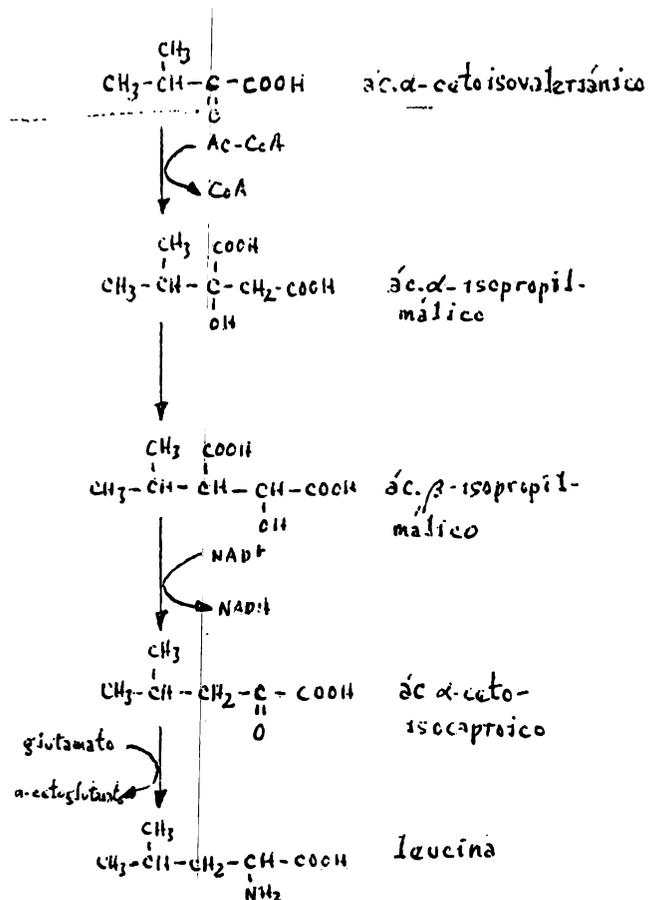
En algunos microorganismos como *E. coli*, una transaminasa cataliza la transaminación entre la valina y el ácido pirúvico para formar alanina (D. Rudman y A. Meister, 1953) :



(3) **Leucina.**- Los estudios sobre la biosíntesis de la leucina a partir de precursores marcados, tales como el acetato-, lactato-, piruvato- ó glucosa- C^{14} , en las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Torula utilis*) (O. Reiss y K. Bloch, 1955; H. Strassman et al., 1955); así como los experimentos de competición isotópica en *E. coli*, *Neurospora crassa* y *T. utilis* (P.H. Abelson, 1954; P.H. Abelson y H.J. Vogel, 1955) permitieron conocer las primeras etapas involucradas en la biosíntesis de la leucina.

De tales estudios se concluyó que la leucina se sintetizaba a partir de la combinación del ácido α -cetoisovaleriánico con un fragmento acetilo (la acetil-CoA) para formar al ácido α -cetoisocaproico. Lo cual era consistente con la observación de que los átomos de carbono (C_1 y C_2) del acetato eran los precursores de los mismos átomos de la leucina (G. Ehrenstam et al., 1951; D.J. Reed et al., 1954).

Actualmente se sabe que la síntesis de la leucina comienza con la condensación del ácido α -cetoisovaleriánico (que también es precursor de la valina) con la acetil-CoA (que deriva del piruvato) para formar al ácido α -isopropilmálico. Las etapas siguientes son similares a las que van del ácido cítrico al ácido α -cetoglutárico, en el ciclo del ácido tricarbóxico. (G. Kohlhaw et al., 1969 y 1971; T.R. Lea y G. Kohlhaw, 1972; R.E. Webster y S. Gross, 1965; E.H. Ulm et al., 1972).



La biosíntesis de la leucina.

e) La familia de los aminoácidos aromáticos (familia del shikímato). Los aminoácidos que se sintetizan a partir del ácido shikímico son la fenilalanina, la tirosina y el triptófano.

Los estudios de B.D. Davis con mutantes auxotróficos de *E. coli* y *A. aerogenes*, que requerían de la tirosina, fenilalanina, triptófano y del ácido p-aminobenzoico para su crecimiento, permitieron conocer los pasos involucrados en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.

Después de probar varios compuestos, Davis descubrió que el ácido shikímico podía reemplazar a los compuestos aromáticos para lograr el crecimiento pleno de las bacterias mutantes (B.D. Davis et al., 1951, 1955 y 1956); de lo cual se concluyó que tal compuesto era un intermediario de la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos. Esta observación se confirmó mediante estudios con otros microorganismos (E.L. Tatum et al., 1954) y en las plantas superiores (S.A. Brown y G. Neish, 1955). Después de lo cual se descubrió rápidamente a los demás intermediarios de la vía biosintética.

En tanto que, los experimentos iniciales con isótopos, en los cuales se incluían acetato-, piruvato- y glucosa- C^{14} con las levaduras y otros microorganismos para estudiar la distribución de los isótopos en los aminoácidos aromáticos (J. - Raddiley et al., 1950; C. Gilvarg y K. Bloch, 1951 y 1952; C. Cuttinelli et al., 1951; R.C. Thomas et al., 1953); y los experimentos isotópicos de D.B. Sprinson et al., quienes estudiaron la incorporación isotópica del ácido shikímico que acumulaban algunos mutantes de *E. coli* (P.S. Srinivasan et al., 1955 y 1956), permitieron completar el esquema para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.

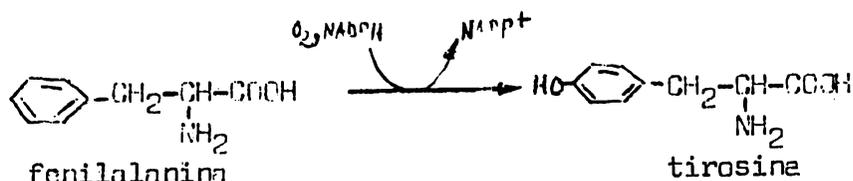
(1) **Fenilalanina.**- La biosíntesis de la fenilalanina, y de los aminoácidos aromáticos, se inicia con la condensación del fosfoenolpiruvato (que proviene de la glucólisis) y la eritrosa-4-fosfato (que proviene del ciclo de las pentosas) para formar al ácido 3-desoxi-D-arabinoheptulosónico-7-fosfato; el cual se cicliza, con la eliminación de fosfato, para formar al ácido 5-deshidroquinico (P.R. Srinivasan et al., 1955 y 1956), cuya estructura se estableció por medio de su espectro infrarrojo, de su composición y propiedades químicas, y por medio de su conversión hacia el ácido 5-deshidrosikímico (U. Weiss, B.D. Davis y E.S. Mingioli, 1953).

El ácido 5-deshidrosikímico, proveniente de la deshidratación del ácido 5-deshidroquinico (S. Mitsuhashi y B.D. Davis, 1954), es reducido por la deshidrosikímico-reductasa para formar al ácido shikímico (ácido 3,4,5-trihidroxi- $\Delta^{1,6}$ -ciclohexén-1-carboxílico); la enzima ha sido aislada de las bacterias, levaduras y las plantas superiores (H. Yaniv y C. Gilvarg, 1955; E.W. Nester y R.A. Jensen, 1966; D. Wasser et al., 1969; J.R. Jacobson et al., 1972; I.I. Salamon y B.D. Davis, 1953). A continuación, el ácido shikímico es fosforilado por el ATP para formar al ácido shikímico-5-fosfato (B.D. Davis y E.S. Mingioli, 1953; J.W. Jacobson et al., 1972). El ácido shikímico-5-fosfato se condensa con el fosfoenolpiruvato para formar al ácido 3-enolpiruvilshikímico-5-fosfato (B.D. Davis y E.S. Mingioli, 1953).

La defosforilación del compuesto anterior conduce a la formación del ácido corísmico; la reacción es catalizada por la corismato-sintetasa (U. Weiss et al. 1954 y 1956; R.L. Metzberg y H.K. Mitchell, 1956; E.W. Nester y R.A. Jensen, 1966). La ruta para la formación de la fenilalanina continúa con la isomerización, catalizada por la corismato-mutasa, del ácido corísmico hacia el ácido prefénico (B.D. Davis, 1953; M. Katagiri y R. Sato, 1953; C. Gilvarg y K. Bloch, 1951 y 1952; R.C. Thomas et al., 1953; J. Dayan y D.B. Sprinson, 1971; G.E. Davidson et al., 1972).

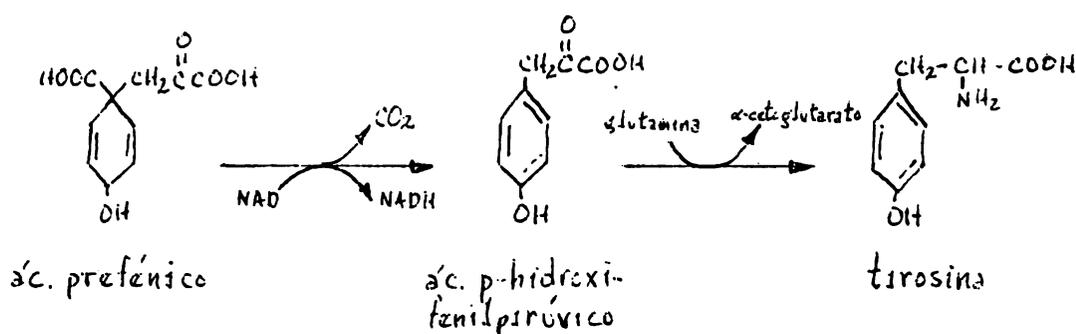
La profenato-deshidratasa convierte al ácido prefénico en el ácido fenilpirúvico, con desprendimiento de CO_2 ; la reacción ha sido ampliamente estudiada en varios microorganismos como *E. coli*, *S. typhimurium* y *B. subtilis* (J.L. Rebello y R.A. Jensen, 1970; J.C. Schmitt et al., 1970; G.L.E. Koch et al., 1971; T.A.A. Dopheide et al., 1972). Finalmente, una transaminasa cataliza la reacción entre el ácido fenilpirúvico y el ácido glutámico para formar a la fenilalanina (D.F. Silbert et al., 1963; R.H. Collier y G. Kohlhaw, 1972).

(2) **Tirosina.**- La formación de la tirosina a partir de la fenilalanina, en el hígado de los mamíferos, es catalizada por la fenilalanín-hidroxilasa (S. - Benfriend y J.R. Cooper, 1952; S. Kaufman, 1957).



Algunos microorganismos como Neurospora también pueden convertir a la fenilalanina en tirosina (R.W. Barratt et al., 1956).

Pero la tirosina también se puede formar a partir del ácido prefénico, mediante una deshidrogenación seguida de una descarboxilación, que conduce a la formación del ácido p-hidroxifenilpirúvico; este compuesto efectúa una transaminación con la glutamina para formar a la tirosina. Esta reacción es catalizada por la tirosin- α -cetoglutarato-transaminasa (S. Simmonds, 1950; B. N. LaDu y D.M. Greenberg, 1951; B.N. LaDu y V.G. Zannoni, 1961; E.G. Gollub et al., 1972 y 1973; W. - S. Champney y R.A. Jensen, 1970).



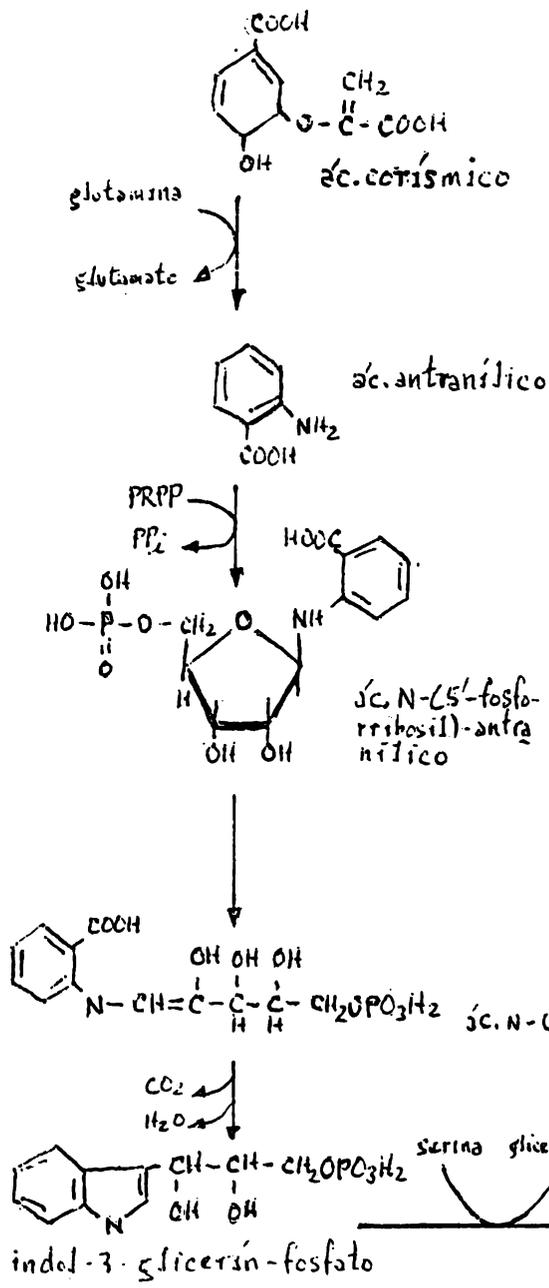
La conversión del ácido prefénico en tirosina.

(3) **Triptófano.**— El descubrimiento de que el indol y el ácido antranílico podrían reemplazar al triptófano como factor de crecimiento en β -typhosus y *Lactobacilli* (P. Fildes, 1941; E.E. Snell, 1943), sugirió que estos compuestos podrían ser intermediarios durante la biosíntesis del triptófano.

Esta suposición se confirmó mediante los estudios con mutantes auxotrofos de Neurospora (E.L. Tatum et al., 1944; J.F. Nye et al., 1949; G.W.H. Partridge et al., 1952) y de *E. coli* (C. Yanofsky, 1955, 1956 y 1957). El descubrimiento de que el indol y la serina, incubados con Neurospora, se condensaban para formar triptófano (E.L. Tatum y D.M. Bonner, 1943 y 1944); así como la observación de que el anillo del indol se formaba mediante la condensación entre el ácido antranílico y el fosforribosil-pirofosfato, seguida de la ciclización del compuesto resultante y la pérdida del grupo carboxilo del ácido antranílico; junto con los experimentos con isótopos en los que se utilizó ácido antranílico- C^{14} y ácido antranílico- N^{15} (J.F. Nye et al., 1949; C. Yanofsky, 1956 y 1957) permitieron conocer el esquema para la biosíntesis del triptófano.

La síntesis comienza con la formación del ácido antranílico a partir del ácido antranílico; la reacción es catalizada por la antranilato-sintetasa (J. Ito y C. Yanofsky, 1966; E.J. Henderson y H. Zalkin, 1971; H. Nagano et al., 1970; S.F. Wucner e I.C. Gunsalus, 1970; M.J. Pabst et al., 1973).

El ácido antranílico se condensa con el fosfo-ribosil-pirofosfato para formar el ácido N-(5'-fosforribosil)-antranílico, una observación inicial de C. Yanofsky (1955 y 1956) con mutantes auxotrofos de *E. coli*, la que confirmó las conclusiones de los experimentos con isótopos en los que se emplearon ribosa-C₁¹⁴ y glucosa-C₁¹⁴ (C. Yanofsky, 1955).



A continuación, el ácido N-(5'-fosforribosil)-antranílico se convierte en el ácido N-(5'-fosfodesoxirribosil)-antranílico. Este compuesto es descarboxilado por la indol-gliceril-fosfato-sintetasa para formar al correspondiente compuesto cíclico, el indol-3-gliceril-fosfato; la enzima requiere de los iones Magnesio (C. Yanofsky, 1956).

Por último, la triptófano-sintetasa cataliza la condensación del indol-3-gliceril-fosfato con la serina para formar al triptófano, eliminando gliceraldehído-3-fosfato (E.L. Tatum y D.M. Bonner, 1943 y 1944). La enzima ha sido ampliamente estudiada y se demostró que requiere del fosfato de piridoxal (W.W. Umbreit et al., 1946; M. Gordon y H.K. Mitchell, 1950; C. Yanofsky, 1952; E.L. Tatum y D. Shemin, 1954).

La biosíntesis del triptófano ha sido tratada ampliamente por P. Margolin en H. Vogel (ed) *Ketabolic Pathways*, vol.5, p. 389, Academic Press, Inc., N.Y., 1971.

La biosíntesis del triptófano a partir del ácido corísmico.

f) Biosíntesis de la histidina. Debido a que la ruta metabólica para la biosíntesis de la histidina involucra una serie de reacciones complejas y poco comunes, generalmente se estudia la biosíntesis de este aminoácido por separado.

De nuevo, los estudios con mutantes de *Neurospora crassa* y de *E. coli*; así como los estudios que demostraron la interrelación del metabolismo de la histidina con las purinas en *Lactobacillus casei* (H.P. Broquist y E.E. Snell, 1949; B. Maganik et al., 1956) y los estudios que establecieron que las purinas contribuían

con algunos de los átomos de carbono y nitrógeno del anillo imidazólico de la histidina (B. Magasanik, 1956; G. Mitoma y E.E. Snell, 1955; A. Neidle y H. Waelsch, 1957) permitieron esclarecer la ruta biosintética de la histidina.

La biosíntesis de la histidina comienza con la condensación del 5-fosforribosil-1-pirofosfato con el ATP para formar al N-1-(5'-fosforribosil)-ATP; la reacción es catalizada por la fosforribosil-transferasa (A. Neidle y H. Waelsch, 1956; H.S. Moyed y B. Magasanik, 1957 y 1960; F. Blasi et al., 1971; H.J. Whitfield Jr., 1971). Este compuesto se transforma en el N-1-(5'-fosforribosil)-AMP, eliminando al pirofosfato; este último compuesto experimenta la apertura del anillo de purina para formar al N-(5'-fosforribosil)-formimino-5-amino-1-(5''-fosforribosil)-4-carboxamida, que se isomeriza hacia el N-(5'-fosforribulosil)-formimino-5-amino-1-(5''-fosforribosil)-4-carboxamida (S.H. Love, 1956; J.S. Gots y E.G. Gollub, 1956; H.S. Moyed y B. Magasanik, 1957).

El último compuesto experimenta una reacción con la glutamina para formar un nuevo anillo de imidazol, el imidazol-glicerín-fosfato, y eliminar el residuo del anillo de purina en forma del aminoimidazolcarboxida-ribótido (H.S. Moyed y B. Magasanik, 1957 y 1960).

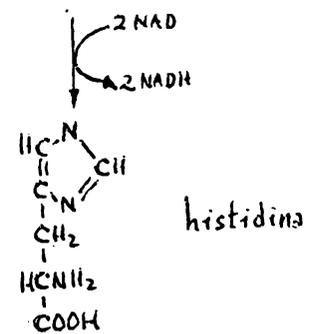
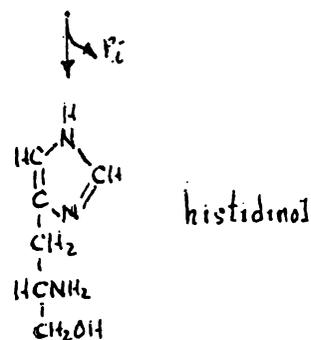
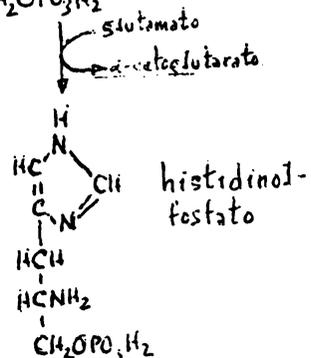
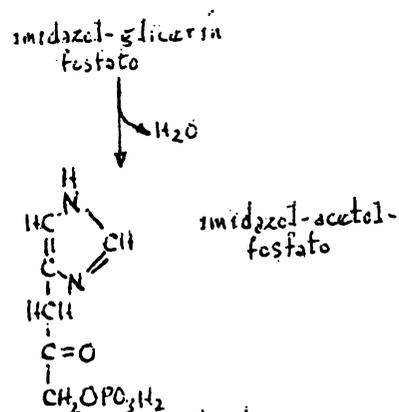
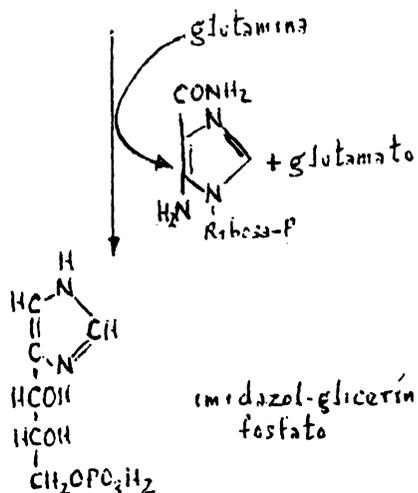
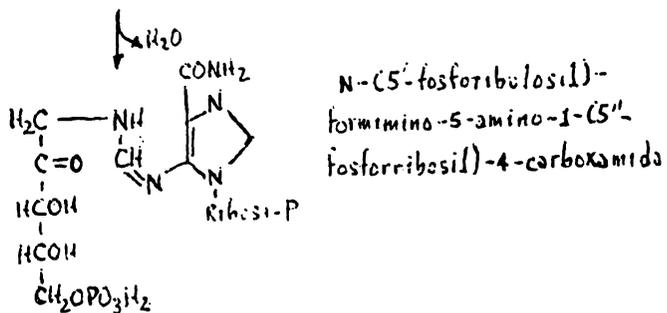
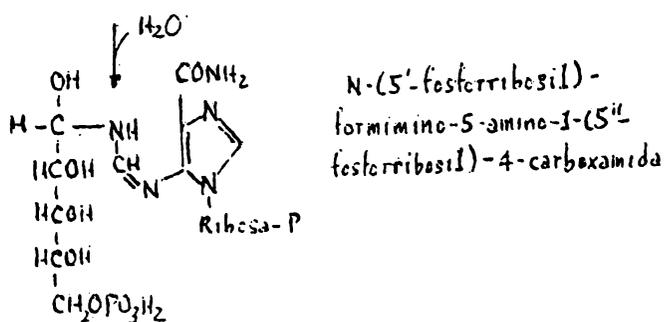
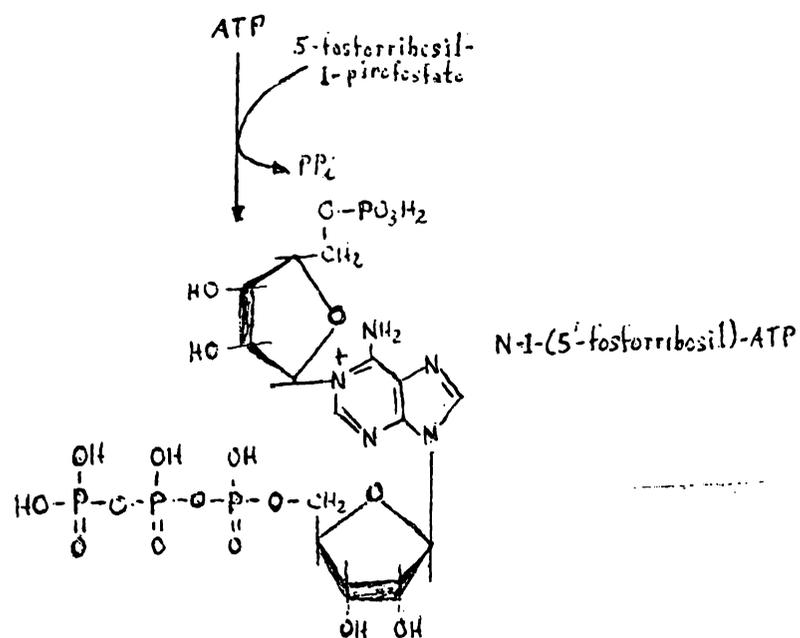
A continuación, el imidazol-glicerín-fosfato es transformado por una enzima, obtenida de Neurospora (B.N. Ames y H.K. Mitchell, 1955; B.N. Ames, 1955), en el imidazol-acetol-fosfato, mediante una deshidratación (B.N. Ames et al., 1953; B.N. Ames y H.K. Mitchell, 1955). Una transaminasa cataliza la reacción entre el imidazol-acetol-fosfato y el ác. glutámico para formar al histidinol-fosfato; la enzima requiere del fosfato de piridoxal y fue aislada a partir de mutantes de Neurospora (B.N. Ames y B.D. Horecker, 1956; B.N. Ames et al., 1957).

El histidinol-fosfato es hidrolizado por las preparaciones enzimáticas obtenidas de Neurospora para formar al histidinol (B.N. Ames et al., 1955, 1956 y 1957).

Por último, un sistema enzimático obtenido de las levaduras, de E. coli, de Arthrobacter histidinolovorans y de otras bacterias, la histidinol-deshidrogenasa, cataliza la oxidación del histidinol para formar a la histidina. La enzima requiere del fosfato de piridoxal y se supone que se forma inicialmente el intermediario histidinal, el cual es oxidado hacia la histidina (E. Adams, 1954 y 1955).

Recientemente, varios investigadores han estudiado con mayor detalle al conjunto de enzimas involucradas en la biosíntesis de la histidina en S. typhimurium (P.E. Hartman et al., 1971) y en E. coli (L. Garrick-Silversmith y P.E. Hartman, 1970; E.P. Goldschmidt et al., 1970).

Para ampliar la información con respecto a la biosíntesis y la degradación de los aminoácidos consultar las revisiones recientes sobre la materia en el tratado de H. Vogel (ed): Metabolic Pathways, vol. 5, 4a. ed., Academic Press, Inc., N. Y., 1971.



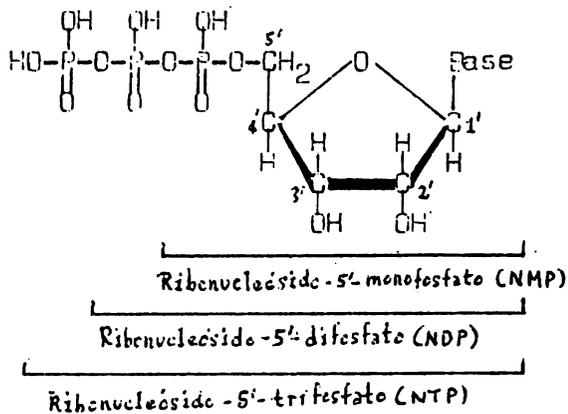
La biosíntesis de la histidina en los microorganismos.

Capítulo V

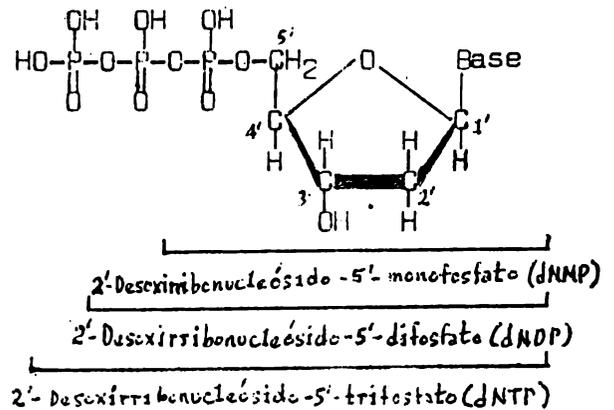
METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS

1. Degradación de los ácidos nucleicos.

Las investigaciones iniciales sobre la hidrólisis de los ácidos nucleicos, en las que se utilizaron ácidos y bases (A. Kossel, 1891; A. Kossel y A. Neumann, 1893-1894; A. Ascoli, 1900-1901; A. Kossel y H. Steudel, 1903), así como estudios posteriores acerca de la hidrólisis de los productos obtenidos por degradación de los ácidos nucleicos, los nucleótidos, permitieron establecer que éstos últimos se hallan formados por una base nitrogenada (derivada de la purina o de la pirimidina), un azúcar y el ácido fosfórico (D.M. Brown y col., 1952-1954; R. Markhan y J.D. Smith, 1952; J.X. Khym y W.E. Cohn, 1954; S.G. Leland y W.G. Overend, 1954; A.M. Michelson y A.R. Todd, 1955; J.G. Walker y G.C. Butler, 1956).



Estructura general de un ribonucleótido.



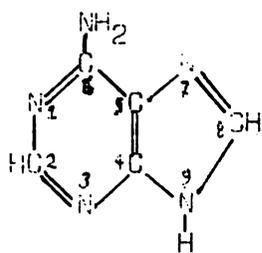
Estructura general de un desoxirribonucleótido.

En tanto que los trabajos sobre la degradación enzimática de los ácidos nucleicos en los animales superiores, mostraron que los nucleótidos resultantes por acción de las nucleasas del páncreas (ribonucleasas y desoxirribonucleasas) y las fosfodiesterasas del intestino, podían ser hidrolizados enzimáticamente por las fosfatasas intestinales (mononucleotidasas) produciendo los correspondientes nucleósidos a través de la eliminación del grupo fosfato de la ribosa respectiva.

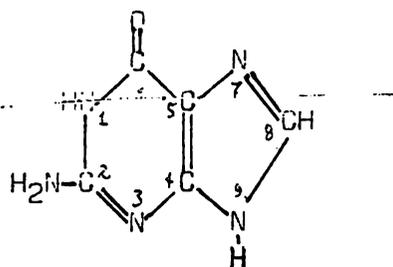
Finalmente, las nucleotidasas del intestino escinden a los nucleósidos de purina y pirimidina para formar las respectivas bases nitrogenadas en estado libre (W. Jones, 1920; M. Kunitz, 1940-1950; M.R. McDonald, 1948; E. Volin y col., 1951-1953; C.E. Carter, 1951; E. Chargaff y col., 1950-1956; L. Shuster y N.O. Kaplan, 1953; R.L. Ginsheimer y col., 1954-1957; M. Holden y N.W. Pirie, 1955; M. Privat de Garilhe y M. Laskowski, 1955; S.M. Kalman y col., 1955; L.A. Heppel y col., 1955-1956; C.B. Anfinsen y col., 1955-1957; C.H.W. Hirs y col., 1956; G. Kalnitsky y W.I. Rogers, 1956-1957; G.R. Barker y col., 1957).

Las bases nitrogenadas obtenidas de los nucleótidos son las purinas adenina (6-aminopurina) y guanina (2-amino-6-oxipurina); y las pirimidinas citosina (2-oxi-4-aminopirimidina), uracilo (2,4-dioxipirimidina) y timina (5-metil-2,4-dioxipirimidina).

Las purinas

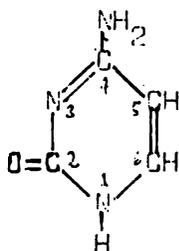


Adenina

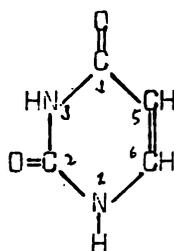


Guanina

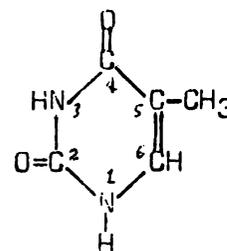
Las pirimidinas



Citosina



Uracilo



Timina

La guanina fue aislada inicialmente por B. Unger en 1858 a partir del guano, que había sido introducido a Europa por A. von Humboldt en 1840. Esta purina fue aislada posteriormente por R. Virchow, en 1866, de las costras musculares de cerdos que padecían gota. A su vez, la adenina fue descubierta por Albrecht Kossel en 1885, en extractos obtenidos del páncreas.

Mediante la hidrólisis de preparaciones obtenidas del ácido nucleico del timo, Albrecht Kossel logró aislar la timina en 1893 y la citosina en 1894; sometiendo a hidrólisis preparaciones de ácido nucleico de levaduras Kossel también logró separar la citosina en 1903. En tanto que, A. Ascoli aisló el uracilo empleando preparaciones de ácido nucleico de levaduras, en el periodo de 1900-1901.

Para ampliar la información con respecto a las enzimas y mecanismos implicados en la degradación de los ácidos nucleicos, consultar la bibliografía en la sección correspondiente.

2. Degradación de los nucleótidos de purina.

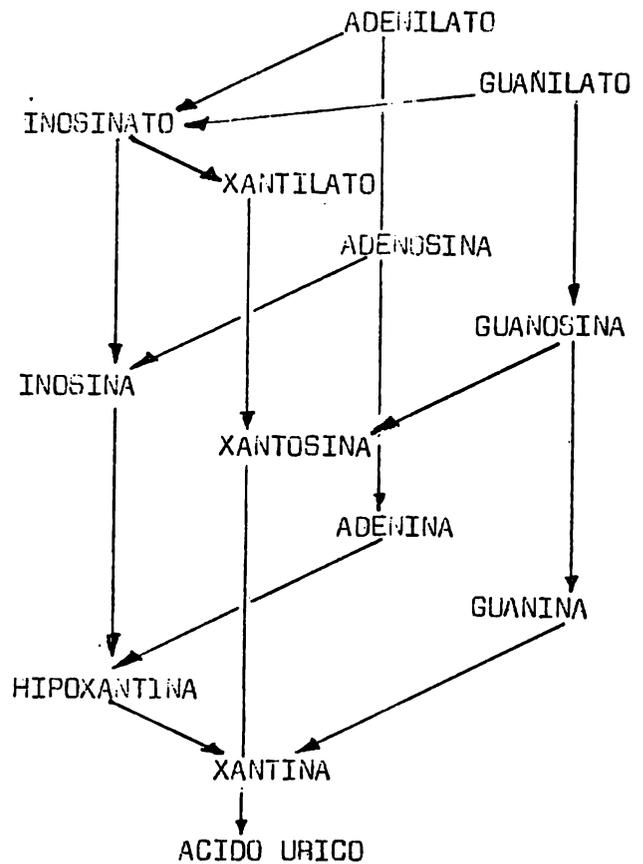
Los distintos organismos degradan los nucleótidos de purina rindiendo una serie de derivados que son excretados como productos finales del catabolismo de las bases púricas. Para que se lleve a cabo la degradación de las purinas se conocen una serie de reacciones enzimáticas comunes a la mayor parte de los organismos y son las siguientes: Defosforilación; desaminación, escisión de los enlaces β -glucosídicos y oxidación.

a). Defosforilación. Como resultado de los trabajos de varios investigadores se ha logrado la identificación de un conjunto de enzimas que promueven la hidrólisis de los ésteres fosfóricos de los nucleótidos de purina, para formar los respectivos nucleósidos adenosina y guanosina.

Entre tales enzimas se encuentran las pirofosfatasas, como la del ATP llamada apirasa (L.A. Hennel y R.J. Hilme, 1953; H. Johnson y col., 1953), que convierten los nucleósidos trifosfato (NTP) en los correspondientes nucleósidos difosfato (NDP), o bien, en los nucleósidos monofosfato (NMP).

Las fosfodiesterasas tales como la del veneno de serpiente (M. Privat de Gailhe y M. Laskowski, 1955), la del cerebro (R. Rodnight, 1956) y las ribonucleasas (L.A. Heppel y P.R. Whitfield, 1955; R.K. Morton, 1955; W.W. Kielley, 1961), que hidrolizan a los nucleósidos difosfato (NDP) formando nucleósidos monofosfato (NMP).

En tanto que el grupo de enzimas ampliamente distribuidas, las llamadas fosfatasas -que en su mayoría no son muy específicas, convierten los nucleósidos monofosfato (NMP) en los respectivos nucleósidos, adenosina y guanosina, sin importar el tipo de base púrica o la posición del grupo fosfato (2', 3' ó 5') (H. Paer y col., 1966; F.L. Inata, 1968; Arsenis y D. Touster, 1968; O. Bodansky y M.K. Schwartz, 1968).

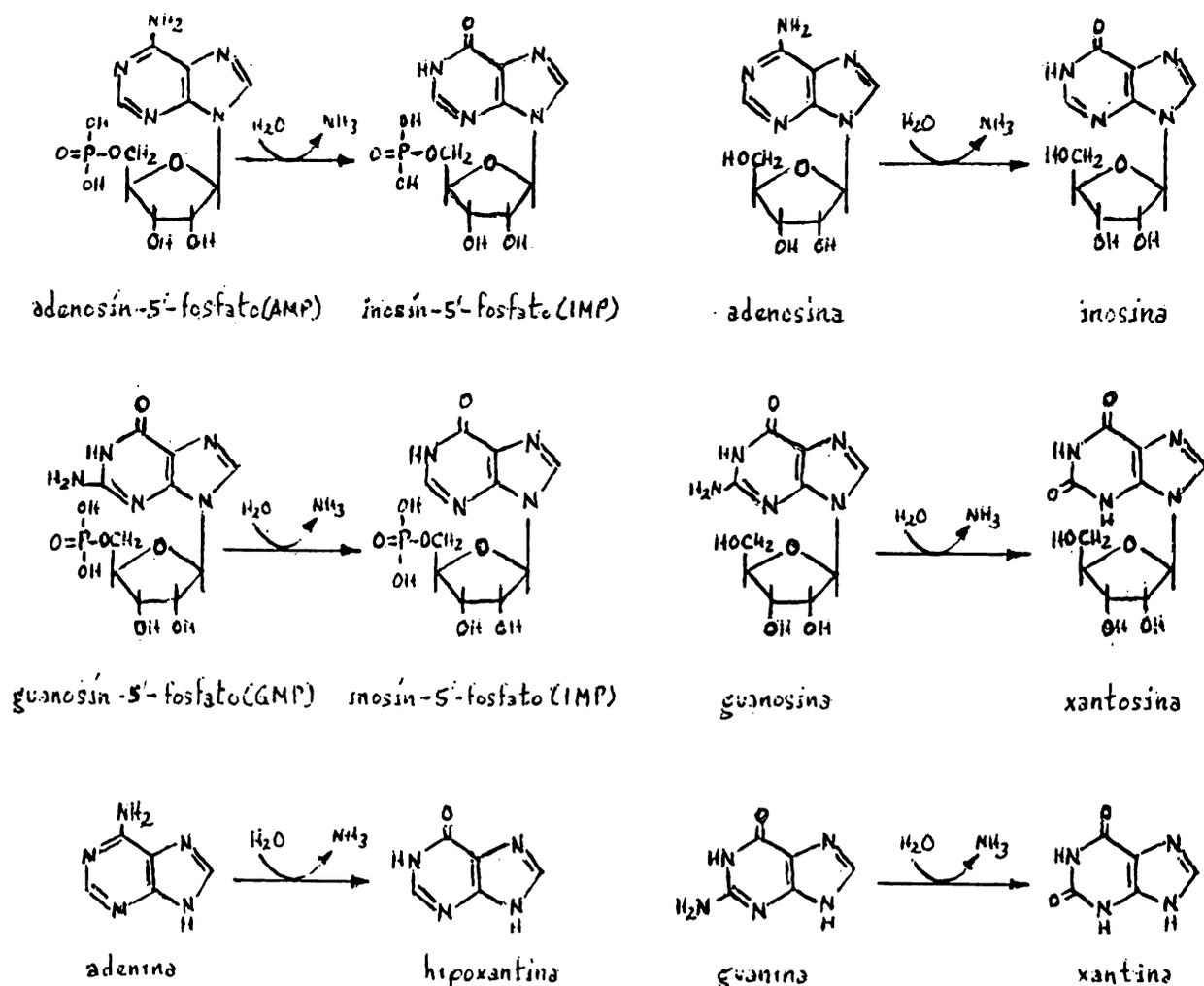


Vías metabólicas para la degradación de los nucleótidos de purina.

Se conocen dos grupos de fosfatasas, las fosfatasas ácidas como la 3'-nucleotidasa obtenida de la próstata y del fluido seminal humano (M. London y col., 1956; F. Lundquist, 1947); y fosfatasas alcalinas como la 5'-nucleotidasa aislada del fluido seminal y del veneno de serpiente (L.A. Heppel y R.J. Hilme, 1951; O. Hurst y A.C. Futler, 1951), así como la 3'-nucleotidasa obtenida del centeno (L. Shuster y H.O. Kaplan, 1953).

b) Desaminación. Otro grupo de enzimas efectúa la desaminación de las purinas o de sus nucleótidos. Así por ejemplo, la adenilato-desaminasa convierte al ácido adenílico (AMP) en el ácido inosínico (IMP) (G. Schmidt, 1928 y 1932; -- B. Nikiporuk y S.P. Colowick, 1956; Y. Lee, 1957; R. Burger y J.K. Lowenstein, -- 1967).

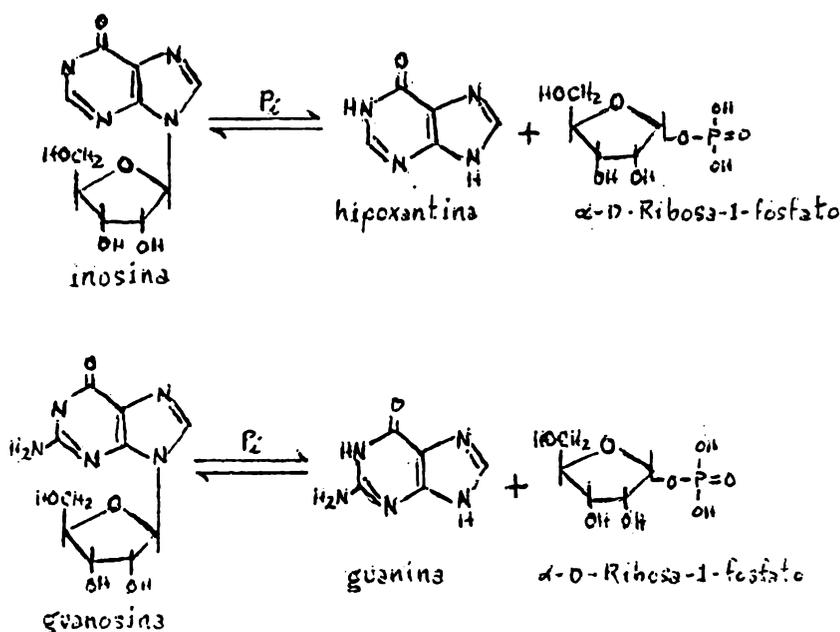
Mientras que, la adenosín-desaminasa puede convertir a la adenosina en inosina (H.E. Kalckar, 1947; J.L. Reis, 1934; T. Brady, 1942). La enzima se ha obtenido de los mamíferos y ha sido ampliamente estudiada (H.P. Baer et al., 1968; -- J. Spencer et al., 1968; H.P. Baer y G.I. Drummond, 1968). También se halla presente en varios microorganismos como Aspergillus oryzae (N.O. Kaplan et al., 1952). Y, la adenín-desaminasa (adenasa), que se se halla presente en los tejidos animales como se pensó originalmente (E.J. Morgan et al., 1923; G. Duchateau et al., -- 1940; M. Blauch et al., 1949) pero que está presente en varios microorganismos (A. Roush y E.R. Norris, 1950), en E. coli (G. Lutwak-Mann, 1936; J. Kream y E. -- Jhargaff, 1952; A.L. Koch y G. Vallee, 1959) y en Azotobacter vinelandii (L.A. -- Leppel et al., 1957) desamina a la adenina para transformarla en hipoxantina.



Las enzimas correspondientes para la guanina y sus derivados son la guanilato-reductasa, que convierte al ácido guanílico (GMP) en el ácido inosínico (IMP). La guanosín-desaminasa que cataliza la desaminación de la guanosina para transformarla en xantosina (H. Laskowski, 1951; Y. Ishida et al., 1969).

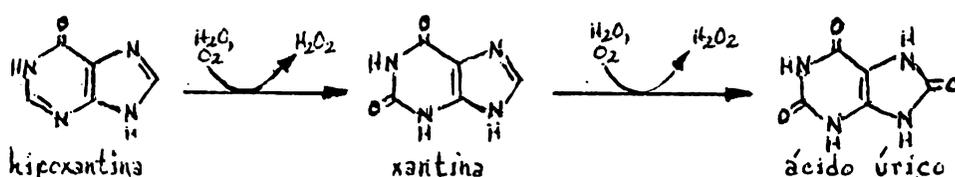
Y, la guanín-desaminasa (guanasa) que puede convertir a la guanina en xantina; esta enzima se halla ampliamente distribuida en los tejidos animales (G. Schmidt, 1932 y 1933; Y. Wakabayashi, 1938; A. Roush y E.R. Norris, 1950; E. Silverstein et al., 1969; S. Kumar, 1969).

c) Escisión de los enlaces N-glucosídicos. En la mayoría de los organismos, la escisión de los enlaces N-glucosídicos de los nucleósidos de purina se efectúa mediante una reacción de fosforólisis y no por hidrólisis como se pensaba originalmente. La reacción es catalizada por el sistema enzimático de la purín-nucleósido-fosforilasa (H.M. Kalckár, 1945 y 1947).



La purinnucleósido-fosforilasa se ha aislado del hígado de res (E.D. Korn y I.M. Buchanan, 1955) y escinde a los nucleósidos de purina para rendir a la purina en forma libre y a la ribosa-1-fosfato (R.S. Wright y H.G. Khorana, 1956). La reacción catalizada por esta enzima es reversible y el equilibrio se halla desplazado en la dirección de la síntesis del nucleósido (M. Friedkin y H. Kalckar, 1961).

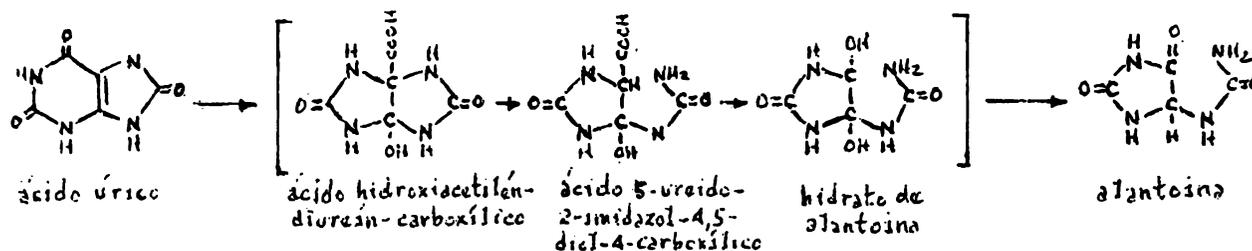
d) Oxidación. Finalmente, la hipoxantina y la xantina son oxidadas por a xantín-oxidasa para formar ácido úrico. La enzima se ha obtenido de la leche (E.G. Ball, 1939) y en forma cristalina (P.G. Avis et al., 1955 y 1956). También se ha estudiado en el hígado de rata (D.A. Richert y W.W. Westerfeld, 1953; .C. De Renzo et al., 1953; B. Mackler et al., 1954; H.R. Mahler et al., 1954; .K. Kielley, 1955; C.N. Remy et al., 1955; J. Hurwitz, 1955; F. Bergmann y S. -ikstein, 1956).



El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en algunos vertebrados, incluyendo al hombre y a los monos superiores, en ciertos reptiles, en las aves y en el perro dalmata (E.C. De Menzo, 1956; R.G. Bray, 1963; -- J.E. Knox y O. Greengard, 1963; P.B. Rowe y J.B. Wyngaarden, 1966; G.H. Mudge et al., 1968; G.R. Zins et al., 1968; F. Stirpe y E. Della Corte, 1969).

Por otra parte, se conocen sistemas enzimáticos similares a los descritos y que catalizan la formación de las bases púricas y pirimídicas a partir de los desoxirribonucleótidos; los que provienen de la degradación del ácido desoxirribonucleico (DNA) (G. Schmidt, 1932; T. Brady, 1942; G.A. Zittle, 1946; H.M. Kalckar, 1947; M. Friedkin y H.H. Kalckar, 1950; M. Laskowski, 1951; C.E. Carter, 1951; -- H.M. Kalckar et al., 1952; N.O. Kaplan et al., 1952).

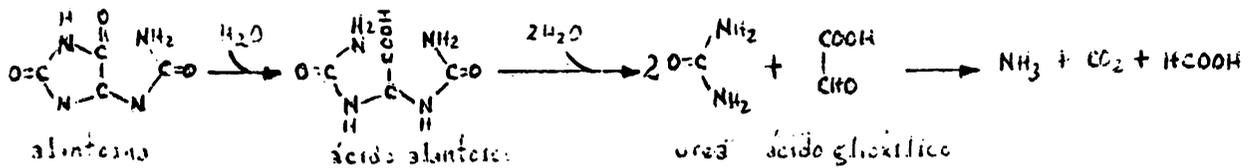
e) Degradación del ácido úrico. En la mayoría de los mamíferos, excepto el hombre y los monos superiores, el ácido úrico es degradado en el hígado hacia alantoína la cual se excreta en la orina (W. Wiechowski, 1907; W.C. Winterwitz y W. Jones, 1909; J.R. Miller y W. Jones, 1909; A. Schittenhelm, 1909). Esta conversión también se ha observado en los reptiles y en los moluscos (M. Florkin y G. Duchateau, 1943).



La reacción es catalizada por la enzima uricasa, la cual ha sido ampliamente estudiada (F. Batteli y L. Stern, 1909; K. Felix et al., 1928; W. Schuler y W. Reindel, 1932 y 1933; R. Fosse et al., 1933; H.R. Mahler et al., 1956; H. Baum et al., 1956; A. Allam y T. Elzainy, 1969). Se ha identificado la participación de varios intermediarios durante la conversión del ácido úrico hacia alantoína (E. Praetorius, 1948; F.W. Klemperer, 1945; R. Bentley y A. Neuberger, 1952; C.E. Dalglish y A. Neuberger, 1954); lo cual se ha confirmado mediante estudios con isótopos (G.B. Brown et al., 1947; L.F. Cavalieri y G.B. Brown, 1948).

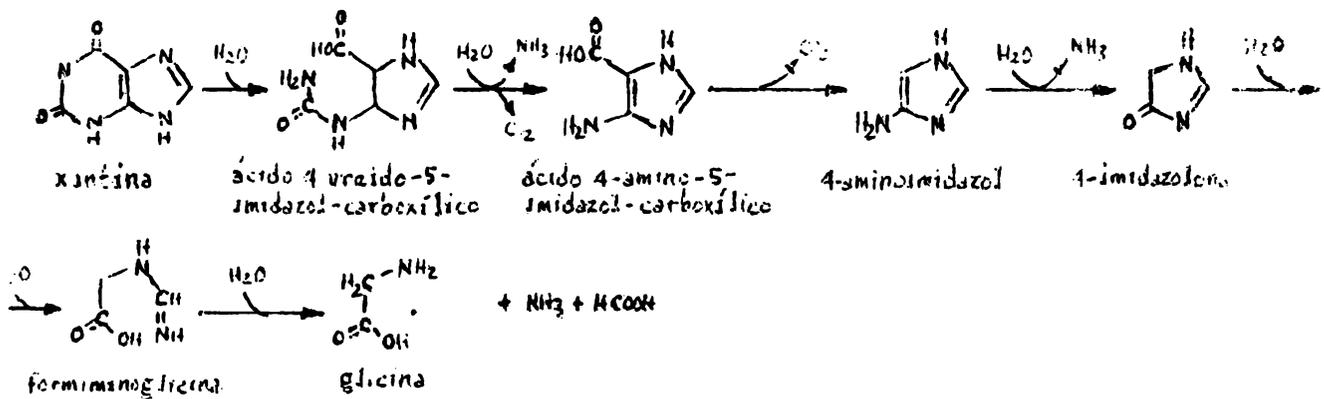
En el hígado de los anfibios la alantoína es degradada hacia urea y en la transformación se hallan involucradas dos enzimas (S.J. Przylecki, 1925). Una de ellas es la alantoínasa, que hidroliza a la alantoína para convertirla en ácido alantoico; mientras que, la alantoicasa escinde al ácido alantoico para formar ácido glioxílico y urea (R. Fosse et al., 1930; E. Stransky, 1933; A. Brunel, 1937). Algunos peces teleosteos convierten al ácido úrico en alantoína y, posteriormente, en ácido alantoico; pero, la mayoría de los peces, anfibios y pelucípodos de agua dulce pueden degradar al ácido úrico hasta ácido glioxílico y urea (A. Brunel, -- 1937; M. Laskowski, 1951).

Una de las vías más completas para la degradación de las purinas, que producen y aminoácidos, se encuentra en en las formas inferiores de vida tales como los poliquetos marinos, los crustáceos y los alveolados. Estos organismos se hallan en el océano de ericaria, atlántica y de ureasa (H. Floorkin y S. Duchateau, 1942).



f) Degradación de las purinas en los microorganismos. Se conocen varias vías microbianas para la degradación de las purinas. Una de las vías más estudiadas es la que efectúan las bacterias anaerobias tales como *Clostridium acidurici* y *Clostridium cylindrosporum* que pueden utilizar como la única fuente de carbono y nitrógeno a las purinas (ic. úrico, guanina, xantina, hipoxantina) y a partir de ellas mediante la fermentación de las mismas (H.A. Barker y J.V. Beck, 1957).

Los extractos sin células de tales bacterias pueden degradar a la xantina y convertirla en glicina, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, HCOOH , NH_3 y CO_2 (N.S. Radin y H.A. Barker, 1953; J.C. Rabinowitz y H.A. Barker, 1956; R.D. Sagers y J.V. Beck, 1957).

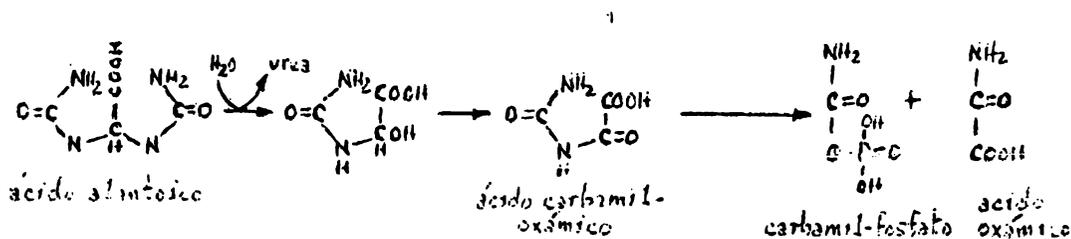


La degradación de las purinas en *Clostridium acidurici* y *Clostridium cylindrosporum*.

Mediante estudios isotópicos, en los que se utilizaron purinas marcadas, se pudo identificar a los intermediarios involucrados en la degradación de la xantina (J.C. Rabinowitz, 1956; J.C. Rabinowitz y W.E. Pricer, 1958). En el paso de la conversión de la formiminoglicina en glicina, se hallan involucrados derivados del ácido fólico y se forma ATP (J.C. Bonn et al., 1948; J.C. Rabinowitz y W.E. Pricer Jr., 1958; H.A. Barker, 1962). También se conocen vías de degradación de al ácido úrico y la guanina en los clostridios (H.A. Barker y J.V. Beck, 1957; J.C. Rabinowitz y H.A. Barker, 1956).

En otros microorganismos, tales como *B. succinifera*, las purinas son degradadas a alantoina, hacia el ácido glicólico y la urea; posteriormente, el ácido glicólico es convertido en ácido oxálico y la urea es hidrolizada hacia amoníaco y

dióxido de carbono (I. Franke y G.E. Hahn, 1955; U. Bachrach, 1957). Otros como E. coli, Aerobacter aerogenes y Proteus vulgaris también poseen enzimas que pueden degradar a la alantoina (E.G. Young y W.H. Hawkins, 1944). Microsporium degrada al ácido úrico para transformarlo en amoníaco y ácido glioxílico (F.T. Sukhenko y E.S. Podgainaia, 1958).



Mientras que Streptococcus allantoinicus puede utilizar a la alantoina como su única fuente de carbono; los productos de la fermentación de la alantoina pueden ser el amoníaco, CO_2 , la urea, el ác. fórmico, el ác. láctico, el ácido acético, el ácido oxámico y el ácido glioxílico (H.A. Barker, 1943).

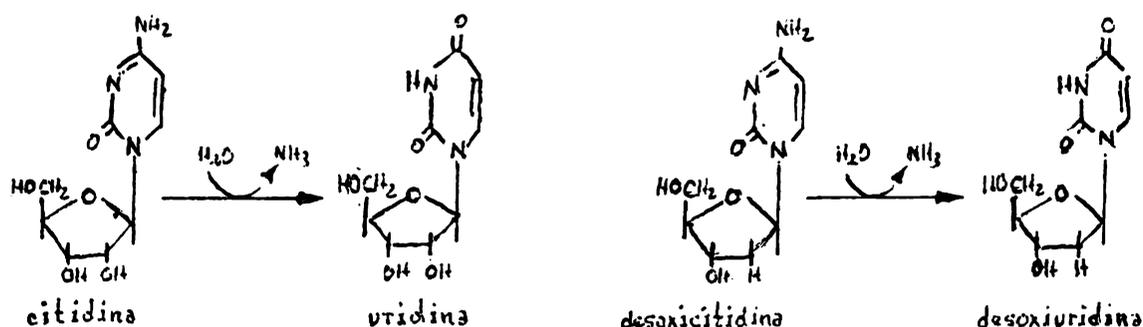
3. Degradación de los nucleótidos de pirimidina.

La degradación de los ribo- y desoxirribonucleótidos de las pirimidinas también se efectúa mediante la secuencia de reacciones que se estudiaron en el catalismo de las purinas. Esto es, defosforilación, desaminación y escisión de los enlaces N-glucosídicos; pero, a diferencia de las purinas, las pirimidinas generalmente son sometidas a una reducción mejor que a una oxidación. No obstante, también se conoce una vía oxidativa.

a) Defosforilación. La hidrólisis de los ésteres fosfóricos de los ribo- y desoxirribonucleótidos de las pirimidinas, que conduce a la formación de los nucleósidos respectivos, es catalizada por el mismo grupo de enzimas que actúan sobre los ribo- y desoxirribonucleótidos de purina.

Las pirofosfatasas, que convierten a los nucleósidos trifosfato (NTP) en los respectivos nucleósidos difosfato (NDP) o en los nucleósidos monofosfato (NMP); las fosfodiesterasas que hidrolizan a los nucleósidos difosfato (NDP) para formar a los nucleósidos monofosfato (NMP); así como las monofosfatasas, que transforman a los nucleósidos monofosfato (NMP) en los correspondientes ribo- y desoxirribonucleósidos, han sido ampliamente estudiadas (G. Schmidt y S.J. Thannhauser, 1943; J. Roche, 1950; J. Roche y N.-v. Thoai, 1950; C.E. Carter, 1951; L.A. Heppel y R.J. Milmo, 1951; L. Shuster y N.O. Kaplan, 1953; R.K. Morton, -- 1954; G. Drawerman y E. Chargaff, 1955; W.W. Kielley, 1961; H.P. Baer et al., -- 1966; R.L. Morton, 1965; M.E. Talis, 1967; P.L. Ipata, 1968; O. Godencky y G.K.-Schwartz, 1968).

b) Desaminación. La desaminación de las pirimidinas solamente ocurre a nivel de los ribo- y desoxirribonucleósidos o de las bases libres pero no se ha observado con los ribo- y desoxirribonucleósidos fosfato (NMP, NDP ó NTP) (C.A. Keller y A.R. Todd, 1950; J. Neuhard, 1968).

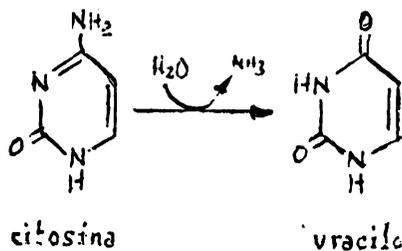


Y así, la citidín-desaminasa convierte a los ribo- y desoxirribonucleósidos, como la citidina y la desoxicitidina, en los derivados correspondientes, la uridina y la desoxiuridina (G. Schmidt, 1932; E.J. Conway y R. Cooke, 1939).

La citidín-desaminasa se ha obtenido de varios tejidos animales y del hígado de la oveja y se ha demostrado que no efectúa la desaminación del ácido citilico (CMP) o del ácido desoxicitidilico (dCMP) (L.B. Wisdom y L.A. Orsi, 1969).

También se ha obtenido a partir de varios microorganismos como *E. coli* y *S. typhimurium* (T.P. Wang et al., 1950) pero no se encuentra en las levaduras ni en los lactobacilos (G.A. O'Donovan y J. Neuhard, 1970). En tanto que, la desoxicitidín-desaminasa, obtenida de *E. coli*, también puede desaminar a la desoxicitidina para convertirla en desoxiuridina (T.P. Wang et al., 1950). La enzima también efectúa la desaminación de la desoxicitosina para convertirla en la desoxitimidina. (J.S. Cohen y H.D. Garner, 1957).

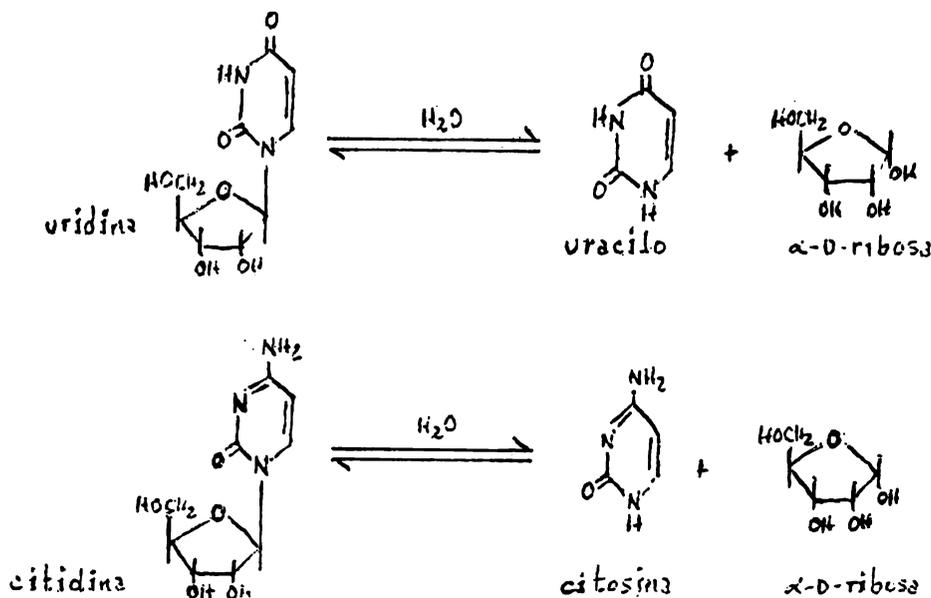
La citósín-desaminasa lleva a cabo la desaminación de la citosina para transformarla en el derivado correspondiente, el uracilo.



La enzima se ha obtenido a partir de *E. coli* y de las levaduras (E. Chargaff y J. Kream, 1952) pero no se halla presente en los tejidos animales como lo demostrarán los estudios con extractos de tejidos de rata y de ratón (J.P. Greenstein et al., 1952).

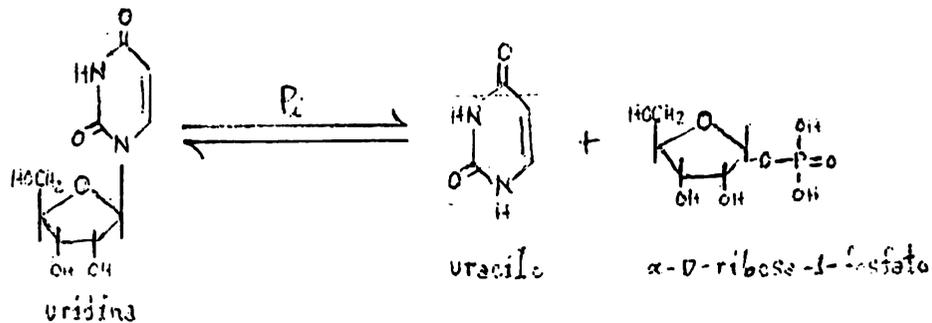
La citósín-desaminasa también se halla presente en algunos otros microorganismos (G.A. O'Donovan y J. Neuhard, 1970).

c) Escisión de los enlaces N-glucosídicos. Se ha observado que en varios microorganismos como *Lactobacillus pentosus* (J.O. Lampen y T.P. Wang, 1952), *Saccharomyces cerevisiae* (M. Grenson, 1969) y otros (C.E. Carter, 1961; L.A. Heppel y R.J. Hilmeo, 1952; A.L. Koch, 1956; Y. Takagi y B.L. Horecker, — 1957) la escisión de los enlaces N-glucosídicos de la uridina y la citidina se efectúa mediante una reacción de hidrólisis, que resulta en la formación de las bases pirimidínicas libres, (el uracilo y la citosina) y la ribosa correspondiente.



Pero, en las células de los animales y en distintos microorganismos, la escisión de tales enlaces se efectúa principalmente por medio de una reacción fosforolítica reversible que conduce a la liberación de una ribosa-fosfato y de la base pirimídica respectiva.

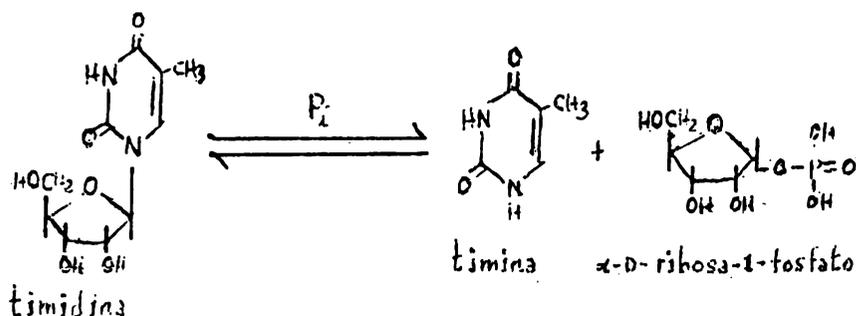
Y así, la uridín-fosforilasa cataliza la escisión de la uridina para llevar a cabo la liberación del uracilo y de la ribosa-1-fosfato.



La enzima se ha obtenido a partir de E. coli (C.E. Cardini et al., 1950; - L.M. Paegge y F. Schlenk, 1952) y de varias especies (E.S. Canellakis, 1957; T.A. Krenitsky et al., 1954 y 1965; G. Etzold et al., 1968) más; se ha observado que también puede escindir a la uridina que proviene de la desaminación de la citidina, a la desoxiuridina y a la timidina (M. Friedkin et al., 1949; H.M. Kalckar, 1950; M. Friedkin y H.M. Kalckar, 1950; L.A. Manson y J.O. Lampen, 1951; M. -- Friedkin, 1950 y 1952).

Igual que ocurre en la escisión de los enlaces N-glucosídicos de las purinas, la fosforolisis de las pirimidinas es reversible y el equilibrio también se halla desplazado en la dirección de síntesis del nucleósido; lo cual pone de manifiesto el papel anabólico de las fosforilasas durante el metabolismo intermedio de las purinas y de las pirimidinas (L.M. Paegge y F. Schlenk, 1952; H. Pontis et al., 1961).

Mientras que la timidín-fosforilasa, obtenida del hígado de caballo, escinde a la timidina, a la desoxitimidina y a la desoxiuridina para liberar a las bases pirimídicas correspondientes (M. Friedkin y D. Roberts, 1954; T.A. Krenitsky, G. Barolay y J.A. Jacquez, 1964).



d) Reducción. Al igual que las purinas, las pirimidinas son degradadas en los distintos organismos para formar una serie de derivados los cuales se excretan como productos finales del catabolismo de las bases pirimídicas.

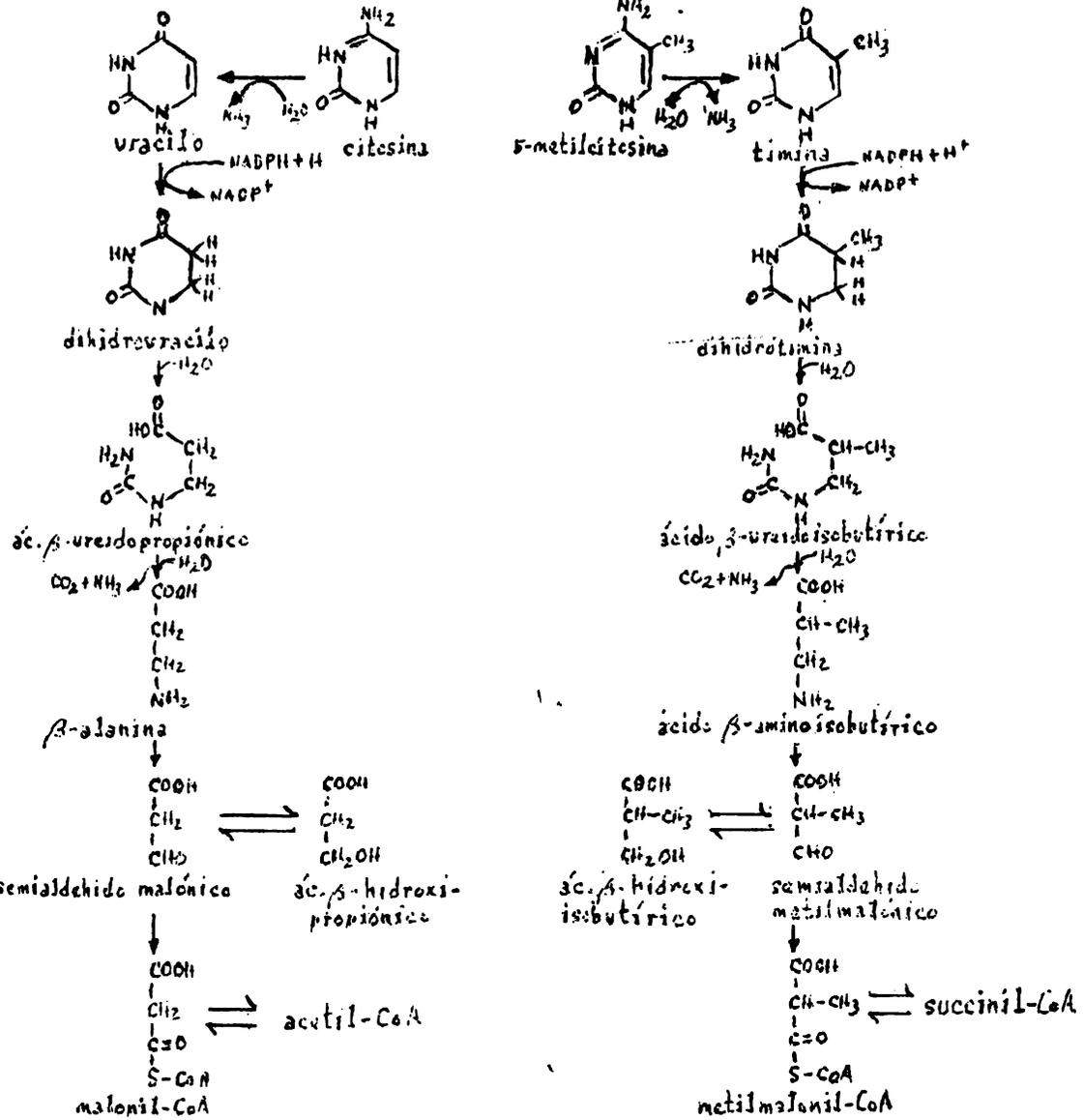
Los experimentos en los cuales se administraban timina, dihidrotimina o DNA a las ratas intactas demostraron que dichos animales excretaban a un aminoácido como producto final de la degradación de las pirimidinas, el ác. β -aminoisobutírico. Mientras que, la administración de uracilo conducía a la excreción de β -alanina y de una carbamil- β -alanina, el ác. β -ureido propiónico. (K. Fink et al., 1951; R.M. Fink et al., 1952).

Estas observaciones se confirmaron mediante experimentos isotópicos en los que se utilizaban animales intactos así como preparaciones hepáticas (K. Fink et al., 1956; E.S. Canellakis, 1956; P. Fritzon y K.F. Nakken, 1956; P. Fritzon, - 1957; P. Fritzon y A. Pihl, 1957); y, mediante el estudio de las enzimas involucradas en el proceso (S. Grisolia y D.P. Wallach, 1955; D.P. Wallach y S. Grisolia, 1957). Lo cual trajo como resultado la identificación de las etapas enzimáticas involucradas en la degradación de las pirimidinas en las células animales. Y así, se sabe que la secuencia enzimática para la degradación de las pirimidinas uracilo y timina es muy similar; y comprende los siguientes pasos :

- 1) Una reducción inicial del doble enlace 5:6 del anillo de pirimidina para formar a las respectivas dihidropirimidinas, el dihidrouracilo (G. Funk et al., 1952) y la dihidrotimina (K. Fink et al., 1952).
- 2) Apertura del anillo pirimidínico mediante la escisión oxidativa del doble enlace 3:4; lo que conduce a la formación de los correspondientes β -carbamil aminoácidos : el ácido β -ureidopropiónico a partir del dihidrouracilo (S. Grisolia et al., 1955; S. Grisolia y -- S.S. Cardoso, 1957) y el ácido β -ureido isobutírico, a partir de la dihidrotimina (K. Fink et al., 1952; R.M. Fink et al., 1953).
- 3) Escisión de los β -carbamil aminoácidos para formar CO_2 , NH_3 y β -alanina a partir del ác. β -ureidopropiónico (S. Grisolia y -- D.P. Wallach, 1955; S. Grisolia et al., 1955) o ácido β -amino isobutírico, a partir del ác. β -ureido isobutírico.

Finalmente, los β -aminoácidos pueden ser desaminados oxidativamente para formar β -aldehídos (A. Pihl y P. Fritzon, 1955; H.A. Heinsen, 1938 y 1945), que son convertidos en β -hidroxiácidos, los que se metabolizan de varias formas; o, pueden esterificarse con la CoA, para rendir a los derivados correspondientes, la malonil-CoA o la metilmalonil-CoA.

También se han identificado vías reductoras similares para el catabolismo del uracilo en ciertas bacterias (R.M. Fink et al., 1954; L.L. Campbell Jr., -- 1957), en Clostridium uracilicum (L.L. Campbell Jr., 1958) y en Neurospora crassa (W.W. Woodward et al., 1957).



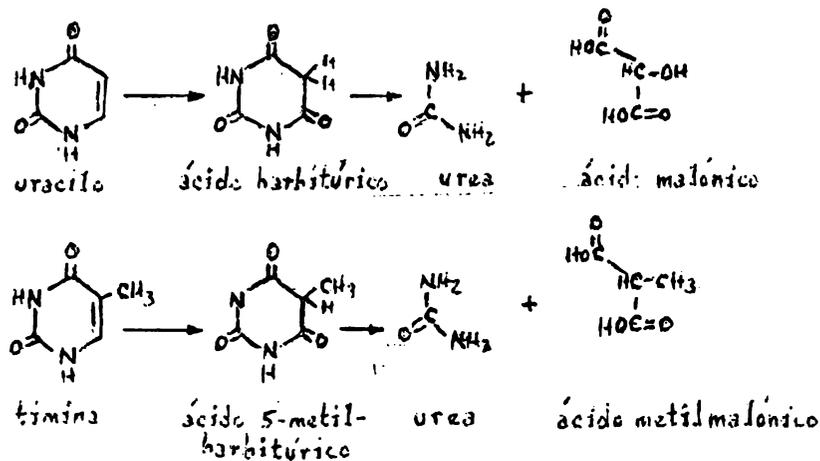
La vía reductora para el catabolismo de las pirimidinas.

Las pirimidinas halogenadas que se utilizan en la quimioterapia del cáncer, tales como el 5-bromo- ó el 5-yodo-uracilo, también son degradadas por medio de reacciones reductoras similares a las de las pirimidinas normales. Se ha observado que en el hombre (H.B. Pahl et al., 1959) y en otras especies (R.M. Fink et al., 1956; H.W. Parrett y R.A. West, 1956; W.H. Prusoff y R.A. Garro, 1957; J. Caravaca y S. Grisolia, 1958; S. Grisolia et al., 1959) las halopirimidinas son deshalogenadas en el paso reductor inicial y metabolizadas posteriormente mediante la vía reductora normal.

Mientras que, en el caso del 5-fluoro-uracilo, el compuesto es convertido en el ácido α-fluoro-β-ureido-propiónico y, posteriormente, es degradado hacia urea la cual se excreta (N.K. Chaudhuri, K.L. Mukherjee y G. Heidelberger, 1958).

e) Oxidación. Los estudios basados en las técnicas del enriquecimiento o cultivos, y en los que se observó que las bacterias podían utilizar a las pirimidinas como la única fuente de carbono y nitrógeno, demostraron que tales

microorganismos podían efectuar la oxidación de las pirimidinas para convertir el uracilo en ácido barbitúrico y a la timina en el correspondiente ácido, el ácido 5-metilbarbitúrico (O. Hayaishi y A. Kornberg, 1951 y 1952; T.P. Wang y J.O. Lampen, 1952).



La vía oxidante para el catabolismo de las pirimidinas.

La oxidación de las pirimidinas es catalizada por la barbiturasa que escinde el anillo pirimidínico para rendir urea y ácido malónico a partir del uracilo, o urea y ácido metilmalónico a partir de la timina (O. Hayaishi y A. Kornberg, 1952).

Parece ser que la citosina y la 5-metil-citosina, después de ser desaminadas por la citosín-desaminasa hacia uracilo y timina, también son oxidadas por la barbiturasa para rendir los derivados correspondientes (R. Iwatsura y M. -- Zhikano, 1923; A. Hahn y W. Lintzel, 1923; S. Friedman y J.S. Gots, 1951; O. Hayaishi y A. Kornberg, 1952; T.P. Wang y J.O. Lampen, 1952).

4. Biosíntesis de los nucleótidos de purina.

En la mayoría de las células de los seres vivos existen dos tipos de vías metabólicas para efectuar la biosíntesis de los nucleótidos. La primera es la llamada vía de novo, en la cual una ribosa-fosfato, ciertos aminoácidos, el CO_2 y el NH_3 se combinan mediante reacciones sucesivas para formar a los nucleótidos.

Ni las bases púricas libres (adenina y guanina) ni las bases pirimídicas libres (citosina, uracilo y timina); ni los correspondientes nucleósidos (ó desoxi-ribonucleósidos) participan como intermediarios en la vía de novo.

Por otra parte, muchas células disponen de varios mecanismos de "rescate" para recuperar a las bases libres y a los nucleósidos que resultan de la degradación de los ácidos nucleicos. Y, al conjunto de rutas por medio de las cuales se pueden recuperar las bases púricas y pirimídicas, se le conoce con el nombre de la vía de salvamento.

a) Síntesis de novo de los nucleótidos de purina.

Se han publicado varias revisiones excelentes que cubren en detalle el desarrollo histórico de los trabajos que condujeron a la elucidación de los mecanismos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de novo de las purinas y, por tanto, no se repetirán aquí.

De manera que, la discusión presente se hará desde un punto de vista más general, mencionando únicamente las aportaciones principales y los descubrimientos más importantes en el campo; pero, sin profundizar demasiado en los detalles experimentales como son el aislamiento y caracterización de los compuestos involucrados, el estudio de los sistemas enzimáticos, etc., para lo cual se recomienda consultar las revisiones que se citan en la bibliografía al final del capítulo.

Las aportaciones iniciales.- Antes de que se introdujeran los métodos isotópicos para estudiar los procesos metabólicos, se disponía de poca información con respecto a la vía metabólica para la biosíntesis de las purinas.

Pero las investigaciones efectuadas entre 1940 y 1956 permitieron conocer el origen bioquímico de cada uno de los átomos del anillo de las purinas. Y sí, el origen de los átomos de nitrógeno del ácido úrico fue investigado inicialmente por F.W. Barnes y R. Schoenheimer en 1943 mediante experimentos isotópicos en los cuales administraban compuestos marcados con N^{15} a las ratas y a los pichones.

Barnes y Schoenheimer descubrieron que el nitrógeno marcado del $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ se incorporaba rápidamente a las purinas de los ácidos nucleicos de los tejidos; sí como a los productos de excreción derivados de las purinas. En tanto que, el nitrógeno marcado de compuestos como la urea- N^{15} , la histidina- N^{15} y la arginina- N^{15} no se incorporaba a los ácidos nucleicos de los tejidos, lo cual indicaba que tales compuestos no eran precursores del ácido úrico como se había supuesto con anterioridad (H. Wiener, 1902; H. Ackroyd y F.G. Hopkins, 1916).

Estas observaciones fueron confirmadas por K. Bloch (1946) quien descubrió que la administración de arginina- N^{15} a los pichones, no conducía a la excreción de ácido úrico marcado. Mientras que los experimentos de A.A. Plentl y R. -- Schoenheimer (1944) habían indicado que las pirimidinas tampoco participaban en la biosíntesis de las purinas. Pero, D. Shemin y D. Rittenberg (1947) descubrieron que el nitrógeno marcado de la glicina- N^{15} se incorporaba principalmente al C-7 del ácido úrico excretado en la orina.

Mientras que los estudios para determinar el origen de los átomos de carbono del anillo de las purinas se iniciaron con los trabajos de J.C. Sonne, J.M. - Buchanan y A.M. Belluva en 1946. El hecho de que los átomos de nitrógeno de las purinas parecían provenir de precursores sencillos, sugirió a los investigadores que los átomos de carbono del ácido úrico también podrían derivar de precursores metabólicos sencillos.

Para probarlo, los investigadores administraron una serie de compuestos marcados a los pichones ($^{13}CO_2$, $H^{13}COOH$, $CH_3^{13}COOH$, $NH_2-NH_2-^{13}COOH$, $CH_3CHOH^{13}COOH$ y $^{13}CH_3^{13}CHOHCOOH$), aislaron al ácido úrico excretado y, posteriormente, lo degradaron para identificar la posición de los átomos marcados (J.C. Sonne et al., - 1946 y 1948; J.M. Buchanan y J.C. Sonne, 1946; J.M. Buchanan et al., 1948). Sus resultados demostraron que :

- a) El CO_2 y el HCO_3 eran los precursores del C-6 del ácido úrico.
- b) El carbono carboxílico de la glicina era el precursor del C-4 y el carbono alfa lo era del C-5, del ácido úrico.
- c) El formiato era el precursor de los átomos C-2 y C-8.

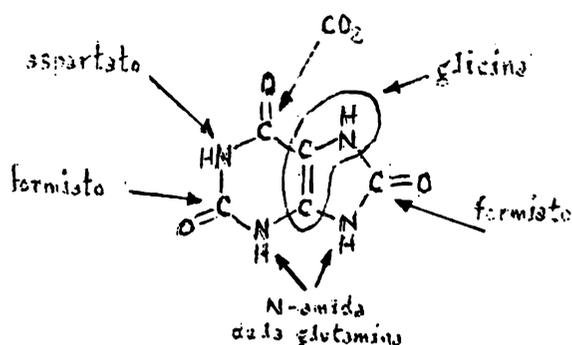
Estas observaciones fueron confirmadas y ampliadas posteriormente por J.L. Karlsson y H.A. Parker (1949) quienes comprobaron que el carbono alfa de la glicina era el precursor del C-5 del ácido úrico y que, por tanto, la glicina se incorporaba intacta a las posiciones C-4, C-5 y C-7 del ácido úrico. En tanto que, W. Sakami (1948) y P. Siekewitz y D.M. Greenberg (1949) demostraron que la glicina también era precursora de los átomos C-2 y C-8, a través de la formación de formiato durante el metabolismo de su carbono alfa.

Se observó, así mismo, que la glicina también era utilizada de manera similar para formar la guanina de los ácidos nucleicos de las levaduras (R. Abrams, E. Hammarsten y D. Shemin, 1948).

Pero el origen de los átomos N-1, N-3 y N-9 del ácido úrico no pudo determinarse mediante los estudios in vivo, debido a la rápida redistribución del N^{15} entre los aminoácidos de la poza metabólica de nitrógeno del cuerpo. Para lo cual se hizo necesario el desarrollo de sistemas sin célula: en los cuales pudiera efectuarse la síntesis de novo de las purinas.

G.R. Greenberg (1948) desarrolló tal sistema basándose en los estudios iniciales de H.A. Krebs y colaboradores (1936 y 1939). Mediante el empleo de las fracciones sobrenadantes, que resultaban de la centrifugación a alta velocidad de los homogenados hepáticos, así como de las enzimas precipitadas con etanol a baja temperatura por Buchanan, se desarrollaron sistemas que podían efectuar la síntesis de las purinas. Y, al suspender a las enzimas que sintetizan a las purinas en soluciones buffer que contenían ribosa-5-fosfato, glicina, formiato,

ácido fosfoglicérico, CO_2 y ATP se observó que la biosíntesis era estimulada por la adición de glutamina y de ácido aspártico (G.R. Greenberg, 1951; M.P. Schulman y J.M. Buchanan, 1951; M.P. Schulman et al., 1952).



El origen de los átomos de la familia de las purinas.

La glutamina es el precursor de los átomos N-3 y N-9 del anillo de las purinas -- (B. Levenberg, S.G. Hartman y J.M. Buchanan, 1956).

Cuando se repitieron los experimentos con glutamina- N^{15} marcada en el grupo amida, el ácido inosínico sintetizado contenía al nitrógeno marcado en los átomos N-3 y N-9 (J.C. Sonne et al., 1953 y 1956). Y, después de que se desarrolló un nuevo método para identificar a los átomos de nitrógeno de las purinas (H. Grandenberger, 1954), se descubrió que el ácido aspártico era el precursor del átomo N-1; en tanto que, el nitrógeno amídico de la

b) Identificación de los intermediarios. El conocimiento del origen de los átomos del anillo de las purinas, así como el desarrollo de los sistemas sin células que podían efectuar la síntesis de novo de las purinas, prepararon el camino para los estudios posteriores que permitieron la identificación de algunos de los intermediarios claves involucrados en la síntesis de novo de las purinas.

Utilizando un sistema sin células, G.R. Greenberg (1951) incubó formiato- C^{14} y pudo aislar ácido inosínico radiactivo así como hipoxantina marcada del medio. Este descubrimiento permitió identificar al ácido inosínico como el producto final y único de la síntesis de novo. Además, Greenberg demostró que se adicionaba un fosfato de ribosa en algún punto de la ruta biosintética.

Un descubrimiento clave que permitió la identificación de los intermediarios que participan en la síntesis de las purinas, fue la observación de que los cultivos de E. coli cuyo desarrollo era inhibido parcialmente por la sulfanilamida, excretaban 4-amino-5-imidazolcarboxamida hacia el medio (M.R. Stetten y C.L. Fox, 1945; W. Shive et al., 1947). Y, aunque posteriormente se sugirió que tal compuesto podría ser un precursor de las purinas (N. Fries et al., 1949; J.S. Gots, 1950; E.D. Bergmann et al., 1952), pronto hubo reportes que demostraron que no era utilizado por E. coli y otras bacterias (W. Shive, 1950; J.S. Gots, 1950).

Sin embargo, en 1950 se demostró que tal compuesto era incorporado a las purinas de los ácidos nucleicos de las ratas (C.S. Miller et al., 1950; G.M. Gonzelman Jr., 1952); mientras que era convertido en ácido úrico en los pichones (M.P. Schulman et al., 1950).

Casi de inmediato, se demostró que los extractos hepáticos de pichón convertían a la aminoimidazol-carboxamida marcada en ácido inosínico y pareció lógico suponer que el fosforribosil derivado del compuesto podía ser un intermediario en la síntesis (G.R. Greenberg, 1951); lo cual se comprobó al observar que los extractos hepáticos de pichón efectuaban la síntesis de la fosforribosil-aminoimidazol-carboxamida y la convertían en ácido inosínico (G.R. Greenberg y

L. Spilman, 1956). Estos descubrimientos mostraron que la porción imidazólica del anillo de purina se forma antes que la porción pirimídica y que los intermediarios implicados en la síntesis de las purinas se hallan en forma de derivados de la ribosa-fosfato.

Pronto se pudieron identificar otros intermediarios de la síntesis de novo. Incubando extractos hepáticos de pichón con ribosa-5-fosfato, glutamina, glicina- C^{14} , formiato y ATP se observó la acumulación de dos nuevos compuestos radiactivos (D.A. Goldthwait y col., 1954); en tanto que al incubar formiato- C^{14} y glicina sin marcar, sólo se obtuvo un compuesto radiactivo. Las sustancias fueron identificadas como la fosforribosil-glicinamida y la fosforribosil-formil-glicinamida (D.A. Goldthwait y col., 1956; E. Levenberg y J.M. Buchanan, 1956).

La identificación de estos intermediarios permitió establecer que en la síntesis de novo participan fosforribosil-derivados y que la molécula de glicina es el esqueleto sobre el que se construyen los dos anillos de las purinas. A su vez, el fraccionamiento sucesivo de los extractos hepáticos condujo al aislamiento de las enzimas, así como a la identificación de todos los intermediarios que intervienen en la síntesis de novo.

c) Etapas enzimáticas en la síntesis del ácido inosínico. La vía de novo, que conduce a la producción del ácido inosínico en primera instancia y posteriormente a la formación de los ácidos adenílico y guanílico, comienza con la síntesis del α -5-fosforribosil-1-pirofosfato a partir de la ribosa-5-fosfato y ATP (A. Kornberg y col., 1954-1955; C.N. Remy y col., 1955; G. Khorana y col., 1958).

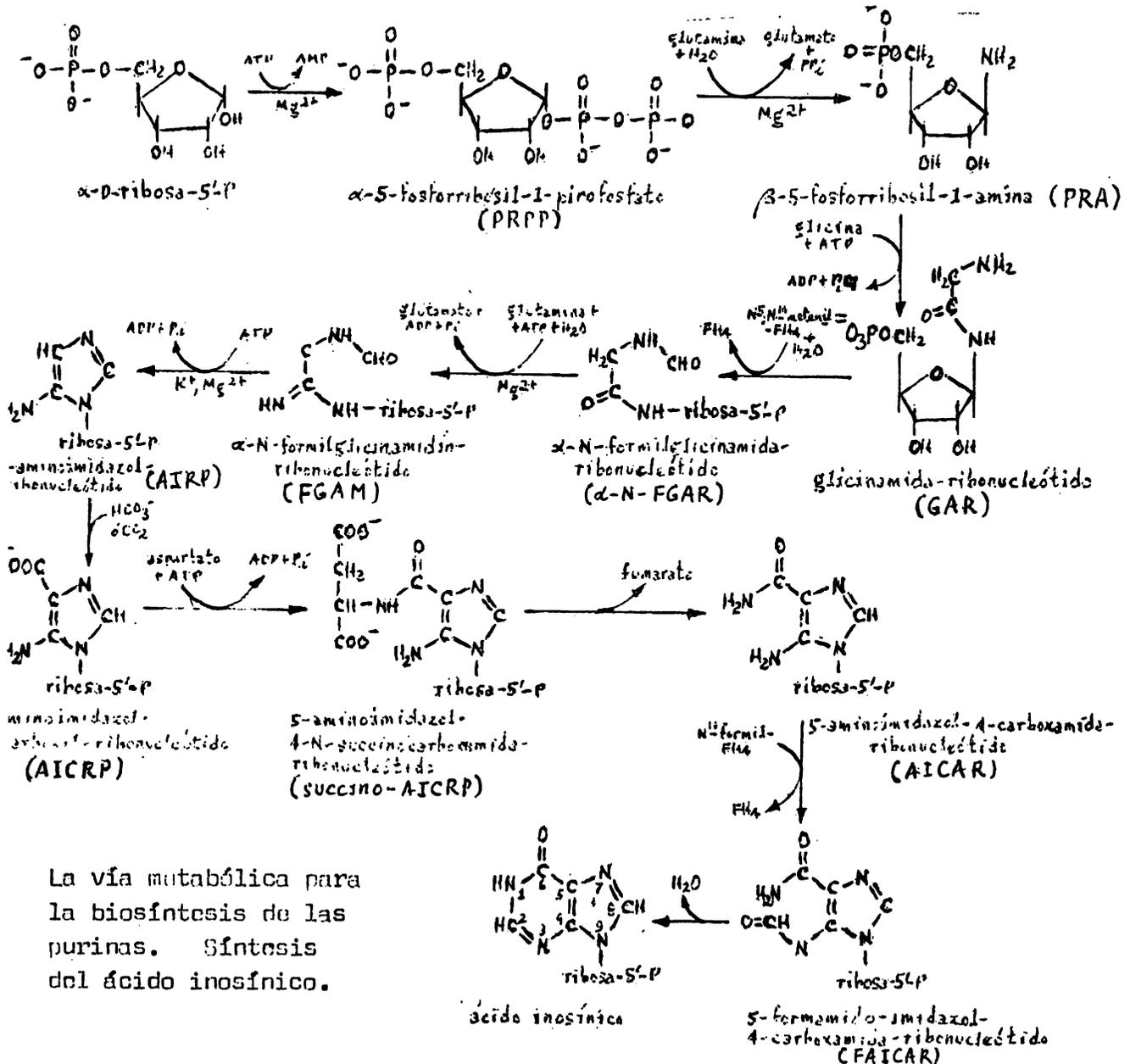
La reacción es catalizada por la ribosafosfato-pirofosfoquinasa que se ha obtenido en forma muy pura (R.L. Switzer, 1968). La ribosa-5-fosfato que se requiere para la síntesis del PRPP puede derivar de la glucosa-6-fosfato vía 6-fosfogluconato y ribulosa-5-fosfato (B.L. Horecker y col., 1951), o bien, de la fructosa-6-fosfato (E. Backer y col., 1954).

El PRPP reacciona con la glutamina para rendir β -5-fosforribosil-1-amina, por transferencia del grupo amino de la porción amida de la glutamina hacia la posición 1 de la ribosa con inversión de la configuración (D.A. Goldthwait y col., 1956; D.A. Goldthwait, 1956; S.C. Hartman y J.M. Buchanan, 1958). La reacción es promovida por la 5-fosforribosilpirofosfato-amidotransferasa, aislada del hígado de pichón (S.C. Hartman y J.M. Buchanan, 1958) y que ha sido ampliamente estudiada (M.L. Le Gal y col., 1962; S.C. Hartman, 1963; P.B. Rowe y J.B. Wyngaarden, 1968; A. Herscovics y R.M. Johnstone, 1964; D. Trachewsky y H.M. Johnstone, 1969; L.J. Fontenelle y J.F. Henderson, 1969).

A continuación la glicina se condensa con el grupo 1-amino de la PRA, en presencia del ATP, para formar un ribonucleótido de cadena abierta el glicinamida-ribonucleótido (D.A. Goldthwait, 1956; D.A. Goldthwait y col., 1956; S.C. Hartman y col., 1956). La reacción se efectúa en presencia de la GAR-sintetasa o fosforribosilglicinamida-sintetasa (S.C. Hartman y J.M. Buchanan, 1958; D.P. Herlich y B. Magasanik, 1965).

El átomo C-8 del anillo de purina se introduce por la adición, al grupo formilo del GAR, de un átomo de carbono donado por el N⁵-10-metilén-tetrahidrofolato que se une al grupo α-amino libre para formar al α-N-formilglicinamida-ribonucleótido (D.A. Goldthwait et al., 1956; L. Jenicke, 1956; S.C. Hartman y J.M. Buchanan, 1959).

La enzima, la glicinamida-ribonucleótido transformilasa o fosforribosilglicinamida formiltransferasa se ha obtenido del hígado de pichón (G.R. Greenberg, 1954; G.R. Greenberg et al., 1955; L. Warren et al., 1957) y de *Salmonella typhimurium* (C.A. Westby y J.S. Gots, 1969).



En la etapa siguiente, se transfiere el nitrógeno del grupo amida de la glutamina hacia el grupo formilo del α-N-FGAR para formar al α-N-formilglicinamidin-ribonucleótido (A.J. Tomisek et al., 1955; B. Levenberg et al., 1957; B. Levenberg y J.M. Buchanan, 1957).

La enzima que cataliza la reacción, la fosforribosilformilglicinamidin-sintetasa o FGAR-amido transferasa se ha aislado a partir del hígado de pichón (I. Felnick y J.M. Buchanan, 1957), del hígado de pollo (K. Mizobuchi y J.M.

Buchanan, 1966; K. Mizobuchi et al., 1968; D.D. Schroeder et al., 1969) y de Salmonella typhimurium (T.C. French et al., 1963; I.B. Dawid et al., 1963).

En la reacción siguiente se cierra el anillo imidazólico del FGAM, mediante la eliminación de una molécula de agua que escinde al ATP hacia ADP y P_i , lo que conduce a la formación del 5-amino-imidazol-ribonucleótido (B. Levenberg y J.M. Buchanan, 1956 y 1957). La fosforribosil-aminoimidazol-sintetasa se ha obtenido a partir del hígado de pichón (B. Levenberg y J.M. Buchanan, 1957; S.C. Hartman y J.M. Buchanan, 1959) y la reacción también se ha estudiado en varios microorganismos (S.H. Love y J.S. Gots, 1959; J.C. Rabinowitz, 1956).

A continuación se incorpora el átomo de carbono del CO_2 , para formar al átomo C-6 del núcleo de purina, lo que lleva a la formación del 5-aminoimidazol-4-carboxil-ribonucleótido (B. Levenberg y J.M. Buchanan, 1957). Esta reacción de carboxilación es catalizada por la AIRP-carboxilasa (L.N. Lukens y J.M. Buchanan, 1957 y 1959; F. Ahmal et al., 1965).

En el paso siguiente, el ácido aspártico completo se incorpora al carboxi-AIRP para formar al 5-aminoimidazol-4-N-succinocarboxamida-ribonucleótido (B. Levenberg y J.M. Buchanan, 1957; L.N. Lukens y J.M. Buchanan, 1959). La enzima que cataliza la reacción, la succino-AICRP-sintetasa, se ha obtenido del hígado de pollo (R.W. Miller y J.M. Buchanan, 1962) y se ha estudiado con detalle (C.R. Fisher, 1969).

La adenilo-succinato liasa escinde al succino-AICRP para liberar fumarato y formar al 5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleótido. La enzima también puede escindir al ácido adenilosuccínico para formar ácido adenílico y ácido fumárico (C.E. Carter y L.H. Cohen, 1956). Lo cual se confirmó mediante experimentos con mutantes de M. crassa (R.W. Miller et al., 1957 y 1959; J.S. Gots y E.A. Collub, 1957; N.H. Giles et al., 1957).

La siguiente reacción permite la introducción del átomo C-2 del anillo de las purinas, el cual es donado por el grupo formilo del N^{10} -formil- FH_4 al grupo 5-amino del AICRP (S.C. Hartman y J.M. Buchanan, 1959; G.R. Greenberg, 1954; G.R. Greenberg et al., 1959). La enzima que interviene en la reacción, la AICRP-transformilasa o fosforribosilglicinamida-formiltransferasa se ha obtenido del hígado de pollo (J.G. Flaks et al., 1957; S.C. Hartman y J.M. Buchanan, 1959).

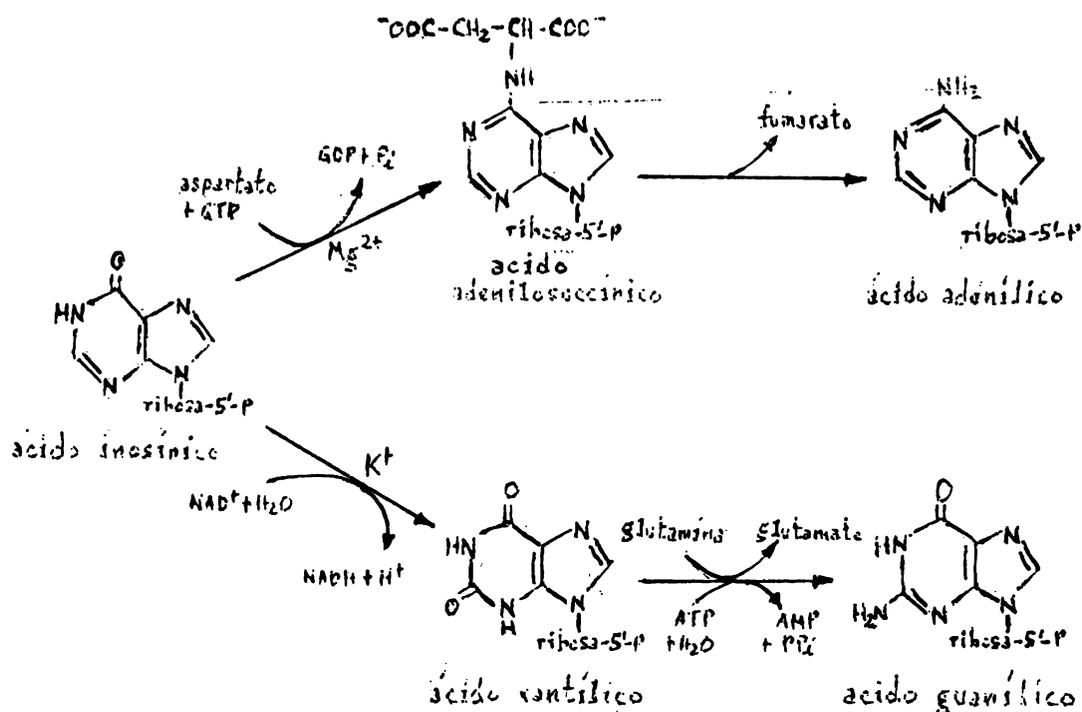
Finalmente, la inosinicasa cataliza la ciclización del anillo del FAICAR para convertirlo en ácido inosínico mediante la eliminación de agua (J.G. Flaks et al., 1957; L. Warren et al., 1957). Aunque originalmente se pensó que la AICRP-transformilasa y la inosinicasa eran la misma enzima, se ha demostrado recientemente que son dos enzimas diferentes (J.S. Gots et al., 1969).

d) Síntesis de los ácidos adenílico y guanílico. La síntesis del ácido adenílico (AMP) a partir del ácido inosínico (IMP) se observó inicialmente en la médula ósea del conejo (R. Abrams y M. Bentley, 1955) y en varios microorganismos (I. Lieberman, 1956).

La reacción se inicia con la condensación entre el ácido aspártico y el GTP para formar al ácido adenilosuccínico (C.E. Carter y L.H. Cohen, 1955 y 1956; I. Lieberman, 1956). Esta reacción es catalizada por la enzima adenilosuccina-

to-sintetasa, la que se ha obtenido de E. coli (I. Lieberman, 1956) y del germen de trigo (W.D. Hatch, 1966).

Y, a continuación, la adenilo-succinato liasa cataliza la escisión reversible del ácido adenilosuccínico para formar ácido adenílico (AMP) y fumarato -- (D.E. Carter y L.H. Cohen, 1955 y 1956).



La conversión del ácido inosínico en los ácidos adenílico y guanílico.

Mientras que la síntesis del ácido guanílico se observó también en la médula ósea del conejo (R. Abrams y M. Bentley, 1955 y 1956) y en el hígado de pichón (U. Lagerkvist, 1955 y 1957).

La síntesis del ácido guanílico (GMP) se inicia con la oxidación del ácido inosínico (IMP) por la IMP-deshidrogenasa, que requiere del NAD^+ , para formar al ácido xantílico (XMP) (G.R. Greenberg, 1953; U.M. Buchanan et al., 1957; U. Lagerkvist, 1957). La enzima se ha obtenido de A. aerogenes (B. Magasanik et al., 1954 y 1957; L.B. Gehring y B. Magasanik, 1955; E. McFall y B. Magasanik, 1950).

En el paso siguiente, la GMP-sintetasa cataliza la aminación del ácido xantílico (XMP) por la glutamina principalmente o por el amoníaco (B. Magasanik et al., 1956), para formar al ácido guanílico (U. Lagerkvist, 1957; R. Abrams y M. Bentley, 1959; H.S. Moyed y B. Magasanik, 1966). La GMP-sintetasa se ha obtenido a partir de A. aerogenes (B. Magasanik et al., 1957; H.S. Moyed y B. Magasanik, 1957), del hígado de pichón (U. Lagerkvist, 1958) y del timo de la ternera (R. Abrams y M. Bentley, 1959).

5. Biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina.

En la ruta biosintética que conduce a la formación de las pirimidinas, al igual que en la que lleva a las purinas, ni las bases libres ni los correspondientes ribo- y desoxirribonucleósidos actúan como intermediarios durante el proceso.

Pero, a diferencia de la síntesis de novo de las purinas, en la síntesis de novo de las pirimidinas primero se forma el anillo pirimidínico, y posteriormente se le une la ribosa-fosfato. La senda biosintética también se conoce con el nombre de vía del protato.

a) Síntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina.

La discusión presente, al igual que se hizo en la correspondiente a las purinas, se hará desde un punto de vista muy general y mencionando únicamente los descubrimientos más importantes.

Se recomienda consultar las revisiones que se citan en la bibliografía para poder ampliar la información que se presenta aquí.

Las aportaciones iniciales.- Los primeros experimentos isotópicos en los que se administraron sales de amonio- N^{15} marcadas a las ratas (F.W. Barnes y R. Schoenheimer, 1943), lo que conducía a la rápida incorporación del nitrógeno marcado a las pirimidinas de los tejidos (un hecho que no ocurría al aplicar racilo-, citosina o timina- N^{15} marcados; A.A. Plentl y R. Schoenheimer, 1944), permitieron establecer que las pirimidinas también se sintetizaban a partir de recursos sencillos.

Pronto, los estudios sobre los factores de crecimiento en diversos microorganismos proporcionaron las pistas que llevaron a la solución de la vía metabólica. Se encontró que el ácido orótico (una sustancia que se descubrió y aisló de la leche de vaca; G. Biscaro y E. Belloni, 1905) podía reemplazar a los nucleósidos de pirimidina como factor de crecimiento en ciertos lactobacilos (F.W. Bantaway, 1944), estreptococos (H.J. Rogers, 1944) y mutantes de Neurospora (L.S. Loring y J.G. Pierce, 1944) pirimidina-deficientes.

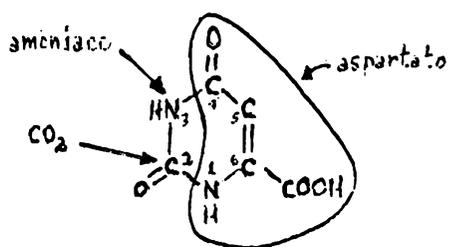
Estas observaciones en microorganismos se confirmaron en investigaciones, in vivo e in vitro, en las que se utilizaron tejidos animales. Así, se encontró que las ratas intactas podían emplear el ácido orótico- N^{15} inyectado como precursor para la síntesis de las pirimidinas del RNA (H. Arvidson, col., 1949) y del DNA (E. Reichard, 1949). En tanto que el ácido orótico- C^{14} era incorporado por reparaciones hepáticas y del riñón obtenidas también de las ratas (L.L. Weed y W. Wilson, 1951-1953).

Sin embargo, estos experimentos isotónicos no permitieron decidir si el ácido orótico era en sí un intermediario en la síntesis de las pirimidinas o si estaba en la vía metabólica por medio de una reacción lateral.

Para poder definir la situación, se incubaron fracciones hepáticas de rata con $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ solo ó $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ con ácido orótico no marcado. Después del periodo de incubación se descubrió que las pirimidinas del RNA aislado contenían mayor marca cuando el experimento se hacía en ausencia de ácido orótico no marcado. Lo cual sugirió que el ácido orótico sí era un intermediario en la biosíntesis de las pirimidinas (P. Reichard, 1952). Durante estos experimentos se observó que el nitrógeno marcado del amoniaco se incorporaba al ácido orótico.

Estas observaciones se confirmaron posteriormente, cuando se observó que los átomos marcados del ácido aspártico, del CO_2 y del ácido carbamil-aspártico se incorporaban al ácido orótico para formar ácido orótico marcado (P. Reichard y U. Lagerkvist, 1953).

Por otra parte, los experimentos en los que emplearon ratos y células con tumor de Ehrlich demostraron que el amoniaco era el precursor del átomo N-3 del anillo de las pirimidinas (P. Reichard, 1952; P. Reichard y O. Skold, 1957).



Origen de los átomos del anillo de las pirimidinas.

El CO_2 es el precursor del átomo C-2 de las pirimidinas, como se descubrió en los experimentos in vivo (M.R. Heinrich y D.W. Wilson, 1950; U. Lagerkvist, 1950) e in vitro, en los que se utilizaron fracciones hepáticas (P. Reichard y U. Lagerkvist, 1953).

Esta observación se confirmó posteriormente mediante experimentos en los que se utilizaron células con tumor de Ehrlich (K. Kusama y E. Roberts, 1963; S. Hager y M.E. Jones, 1965).

En tanto que, los experimentos con aspártato marcado establecieron que dicho ácido era el precursor de los átomos 1,4,5 y 6 del anillo de las pirimidinas. (U. Lagerkvist et al., 1951).

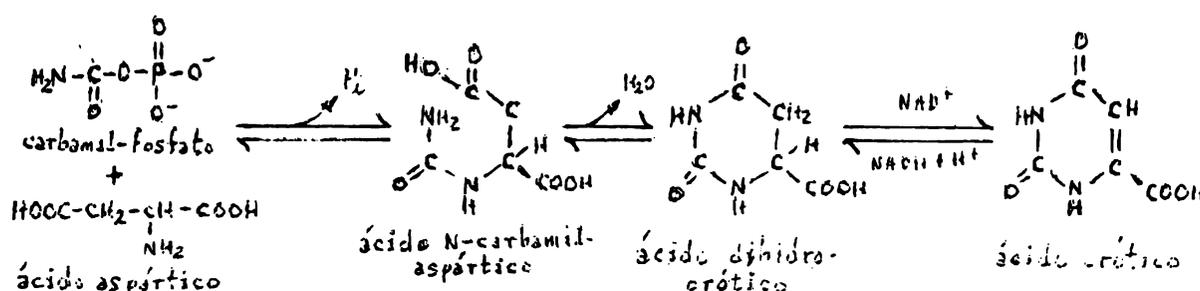
b) Identificación de los intermediarios. Durante las investigaciones sobre los factores de crecimiento en Lactobacillus bulgaricus, se observó que el ácido orótico podía ser reemplazado por el ácido carbamilaspartico; por lo cual se decidió investigar si tal compuesto podía ser un precursor de las pirimidinas. Y, mediante experimentos en los que empleó ácido carbamilaspartico marcado, se encontró que este compuesto era tan efectivo como el ácido orótico para formar a las pirimidinas de los ácidos nucleicos de Lactobacillus (L.D. Wright et al., 1951).

Pronto se descubrió una enzima capaz de catalizar la formación del carbamilfosfato a partir del CO_2 y del ATP en Streptococcus fecalis; así como una enzima capaz de sintetizar al ácido carbamilaspartico, a partir del carbamilfosfato y del ácido aspártico (M.E. Jones et al., 1955).

Mientras que, las enzimas que catalizan la conversión del ácido carbamilaspartico en ácido dihidro-orótico, y la de este último en ácido orótico se pudieron aislar a partir de cultivos de Zymobacterium oroticum y otras bacterias que utilizaban al ácido orótico como fuente de energía (I. Lieberman y A. Kornberg, 1953 y 1954; E.S. Reynolds, I. Lieberman y A. Kornberg, 1955).

c) Biosíntesis del orotato. La biosíntesis de las pirimidinas comienza con la carbamilación del ácido aspártico, hecha por el carbamifosfato, lo que lleva a la producción del ácido N-carbamil-aspártico (L.D. Wright et al., 1950 y 1951; O.P. Wieland et al., 1950; L.L. Weed y D.W. Wilson, 1954).

La reacción es catalizada por la aspartato-transcarbamilasa la cual ha sido ampliamente estudiada y se le ha obtenido del hígado de pichón, de varios tejidos de rata, de E. coli y de las levaduras (P. Reichard, 1954; J.M. Lowenthal y I.P. Cohen, 1954, 1955 y 1956; P. Reichard y G. Hanshoff, 1955). La aspartato transcarbamilasa de E. coli ha sido muy estudiada debido a sus propiedades regulatorias (R.A. Yates y A.B. Pardee, 1957; B. Shepherdson y A.B. Pardee, 1960; J.G. Gerhart et al., 1962 y 1965; E.R. Stadtman, 1966; K. Weber, 1968; G.B. Hammes et al., 1970; G.R. Jacobson y G.R. Stark, 1973).



La vía para la biosíntesis del ácido orótico.

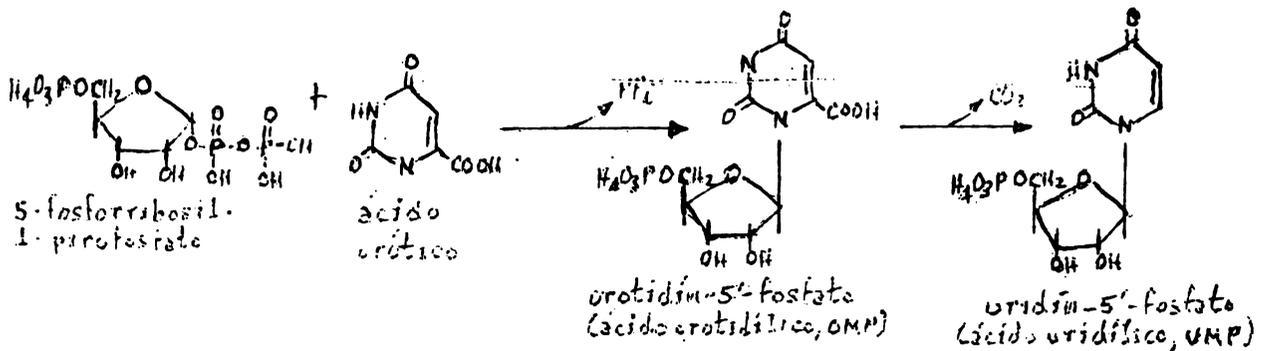
En el paso siguiente, la dihidro-orotasa promueve el cierre del anillo pirimidínico, mediante la eliminación de agua del ácido N-carbamil-aspártico, para formar al ácido dihidro-orótico (I. Lieberman y A. Kornberg, 1953). La enzima se ha obtenido a partir de varias bacterias como Z. oroticum y corinebacterias - (I. Lieberman y A. Kornberg, 1954; E.S. Reynolds et al., 1955), de E. coli (R.A. Yates y A.B. Pardee, 1956) y del hígado de rata (G. Cooper et al., 1955); se le ha identificado también en los eritrocitos humanos (L.H. Smith Jr. y F.A. Baker, 1959) y en las células con tumor de Ehrlich (E. Brasnick y B.H. Hitchings, 1961).

Por último, la flavoproteína dihidro-orotato-deshidrogenasa oxida al ácido dihidro-orótico para producir al ácido orótico (I. Lieberman y A. Kornberg, 1953). La enzima contiene FAD, FMN y hierro (E.S. Reynolds et al., 1955; J.L. Graves y B. Vennesland, 1957; H.C. Friedman y B. Vennesland, 1956) y ha sido muy estudiada (W.H. Taylor et al., 1968; V. Alemán et al., 1968).

La conversión del ácido orótico en UMP.- La formación del ácido orótico constituye la primera etapa en la síntesis de novo del anillo de las pirimidinas. En tanto que la segunda etapa de la biosíntesis de las pirimidinas conduce a la formación del ácido uridílico (UMP) el cual, a su vez, sirve como un precursor de los nucleótidos de citidina.

La formación del ácido uridílico (UMP) se inicia con la condensación del ácido orótico y el fosforribosil-pirofosfato (PRPP), con eliminación de pirofosfato, lo que produce al ácido orotidílico (OMP) (R.B. Hurlbert y V.L. Potter, 1952).

La enzima que cataliza la reacción, la orotidín-5'-fosfato pirofosforilasa u orotato-fosforribosil-transferasa se ha obtenido del hígado de rata (R.B. Hurlbert y V.R. Potter, 1954; R.B. Hurlbert y P. Reichard, 1954), de las levaduras (I. Lieberman et al., 1955), del hígado de ternera (D.K. Kasbekar et al., 1964), de los eritrocitos de res (D. Hatfield y J.B. Wyngaarden, 1964) así como de las células de los ratones con leucemia (P. Royce, 1969).

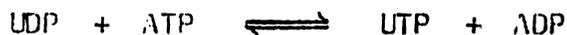
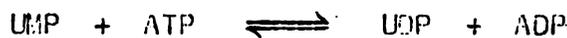


La formación del ácido uridílico (UMP) a partir del ácido orótico.

En seguida, el ácido orotidílico es descarboxilado por la orotidín-5'-fosfato-carboxilasa u orotidilato-descarboxilasa para formar al ácido uridílico (UMP) (I. Lieberman et al., 1955).

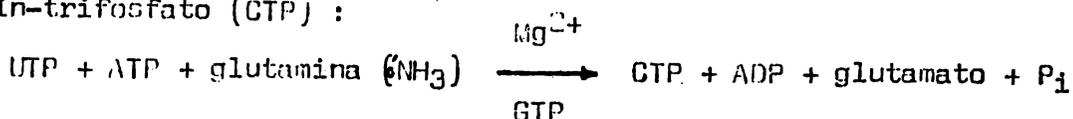
La conversión se ha observado en las bacterias y en varios tejidos de mamíferos y aves (I. Lieberman et al., 1955; R.B. Hurlbert y P. Reichard, 1955) y no hay duda de que representa el mecanismo general para la formación del UMP.

d) La formación del citidín-trifosfato (CTP). La conversión del ácido uridílico (UMP) hacia los nucleósidos de citidina requiere que el UMP sea fosforilado previamente hacia UTP (I. Lieberman, 1955 y 1956); y se efectúa de la manera siguiente :



Las reacciones de fosforilación son catalizadas por una serie de quinasas no específicas, las cuales se han obtenido de las levaduras y de preparaciones homocéntricas de los mamíferos (I. Lieberman et al., 1954 y 1955; J.L. Strimminger et al., 1954; A. Munch-Petersen, 1954; P. Berg y W.K. Joklik, 1954; R.E. Parks y R.P. Agarwal, 1973).

A continuación, la CTP-sintetasa obtenida de E. coli (I. Lieberman, 1956; G.W. Long y A.B. Pardee, 1967) y de células animales (R.B. Hurlbert y H.O. Karmen, 1960) cataliza la aminación - en la posición 4 del UTP-, para rendir al citidín-trifosfato (CTP) :



En E. coli el amoníaco actúa como donador del grupo amino (I. Lieberman, -- 1955 y 1956); mientras que en los mamíferos el donador es el grupo amida de la albúmina (L. Lagerkvist, 1955; H.S. Moyed y S. Magasanik, 1957).

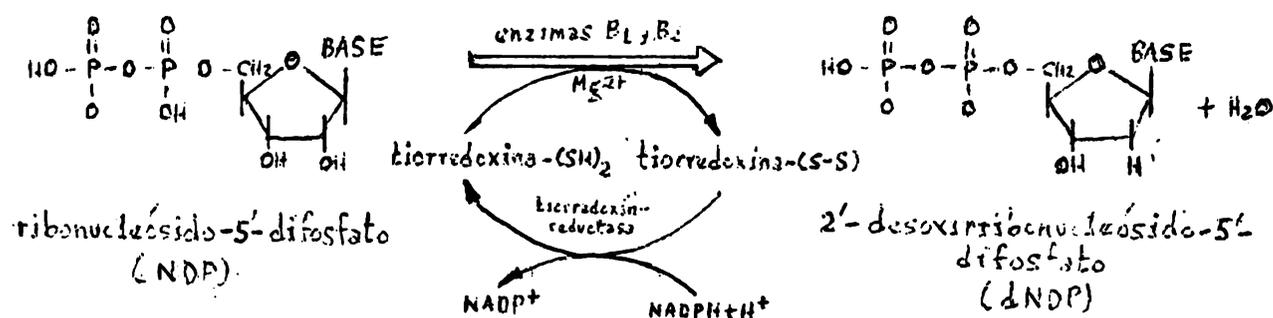
e) Biosíntesis de los desoxirribonucleótidos.

La formación directa de los desoxirribonucleótidos a partir de los ribonucleótidos se observó por primera vez durante los estudios con ratas a las cuales se les administraban citidina- y uridina- N^{15} , lo que era seguido por la formación de los correspondientes ácidos nucleicos marcados en sus respectivas pirimidinas (E. Hammarsten et al., 1950).

Experimentos posteriores confirmaron esta observación. Empleando citidina- C^{14} marcada en la base y en la ribosa, se descubrió que la relación entre las actividades específicas de la citosina y la ribosa de la citidina inyectada era la misma que la de la pirimidina y la desoxirribosa en el DNA de la rata (I.A. Rose y H.S. Schweigert, 1950). Se hicieron observaciones similares al utilizar ácido citidílico (P.M. Roll et al., 1956), ácido uridílico (P.M. Roll et al., 1956) y uridina (P. Reichard, 1957).

Pero la manera en que un ribonucleósido es reducido para formar directamente al correspondiente desoxirribonucleósido, no se pudo aclarar hasta que se descubrieron las enzimas que participan en la conversión. Actualmente se conocen dos vías para la reducción de los ribonucleósidos.

En E. coli los cuatro ribonucleósidos difosfato, el ADP, el GDP, el UDP y el CDP son reducidos directamente hacia los correspondientes desoxirribonucleósidos difosfato: el dADP, el dGDP, el dUDP y el dCDP.



La biosíntesis de los desoxirribonucleósidos.

La reacción es catalizada por el sistema enzimático de la ribonucleósido-difosfato-reductasa y durante el proceso intervienen cuatro proteínas enzimáticas separadas: la tiorredoxina, la tiorredoxin-reductasa, y las proteínas enzimáticas B₁ y B₂; así como el Mg²⁺ (P. Reichard, 1967 y 1972; N.C. Brown et al., 1969; L. Thelander, 1973).

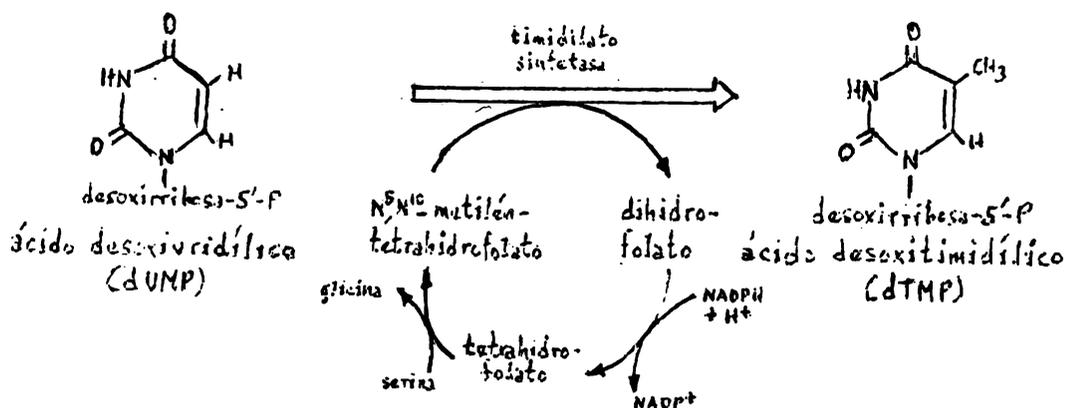
Mientras que en algunos lactobacilos, el sistema enzimático correspondiente utiliza preferentemente a los ribonucleósido-5'-trifosfato que a los nucleósidos difosfato y el cofactor de la reductasa es la vitamina B₁₂. En tanto que las características de la reacción así como los controles alostéricos son muy similares a los de E. coli (M. Goulian y W.S. Beck, 1966; W.S. Beck, 1967).

La biosíntesis de la timina.— Los experimentos en los que se utilizaron compuestos marcados con C^{14} demostraron que el grupo metilo de la timina podía derivar del carbono- β de la serina (D. Elwyn y D.B. Sprinson, 1954), del formiato (J.R. Totter et al., 1951 y 1955), del carbono- α de la glicina (D. Elwyn y D.B. Sprinson, 1950) o del grupo metilo de la metionina (R.L. Herrmann et al., 1955).

Pero experimentos anteriores habían aportado evidencias de que los compuestos que actúan como donadores de grupos C_1 , los derivados del ácido fólico, podían participar en la formación del grupo metilo de la timina en varios microorganismos (E.E. Snell y H.K. Mitchell, 1941; J.L. Stokes, 1944; W.H. Prusoff et al., 1948). Pronto, nuevos experimentos isotópicos in vivo e in vitro, en los que se utilizaron tejidos animales, confirmaron esta observación y demostraron que el desoxi-UMP actuaba como aceptor del grupo metilo (P. Reichard, 1955; M. Friedkin et al., 1955 y 1957; L. Jaenicke, 1956; R.L. Blakley, 1957; E.A. Phear y D.M. Greenberg, 1957; G.K. Humphreys y D.M. Greenberg, 1958).

Actualmente está bien establecido que la metilación del desoxiuridilato — (dUMP) es la ruta de novo para la síntesis del timidilato. La reacción es catalizada por la enzima timidilato-sintetasa que cataliza la transferencia del grupo hidroximetilo ($-CH_2OH$) del metilén-tetrahidrofolato hacia el dUMP; lo que es seguido por la reducción de este grupo hacia el grupo metilo ($-CH_3$), a expensas del tetrahidrofolato, para formar al desoxitimidilato (dTMP) (R.L. Blakley, 1969; T.C. Crisberg et al., 1970).

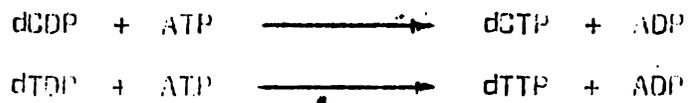
La timidilato-sintetasa se ha obtenido de E. coli (M. Friedkin y A. Kornberg, 1957; J.G. Flaks y S.S. Cohen, 1959; A.J. Wahba y M. Friedin, 1961) y de S. fecalis (B.M. McDougall y R.L. Blakley, 1960) y ha sido ampliamente estudiada (D.V. Santi et al., 1972 y 1974).



La formación de la timidina-5'-fosfato (dTMP) a partir de la desoxiuridina-5'-fosfato (dUMP).

Finalmente, los desoxirribonucleótidos difosfato (dNDP) son convertidos en los correspondientes desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) por una serie de quinasas, las cuales se han obtenido principalmente de E. coli.

Y así, se ha identificado a una quinasa que convierte al dCDP, así como al dUMP, en el correspondiente desoxirribonucleósido trifosfato el dCTP (I.R. Lehman et al., 1958; M.J. Bossman, 1959).



Mientras que otra quinasa aislada por los mismos investigadores (I.R. Lehman et al., 1958; M.J. Bossman, 1959) convierte al dTDP en dTTP.

Capítulo VI

METABOLISMO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

A. BIOSINTESIS DEL DNA.

La serie de investigaciones que llevaron a la identificación del mecanismo implicado en la biosíntesis del DNA pueden estudiarse convenientemente dividiéndolas en dos periodos: 1) Identificación del DNA como portador de información genética y 2) La elucidación de la vía biosintética.

1) Identificación del DNA como portador de información genética.

Durante las primeras investigaciones sobre la naturaleza de los genes la mosca de la fruta, *Drosophila*, ocupó un lugar destacado como el organismo más utilizado en los experimentos genéticos. No obstante, pronto fue reemplazada por las bacterias y virus bacterianos.

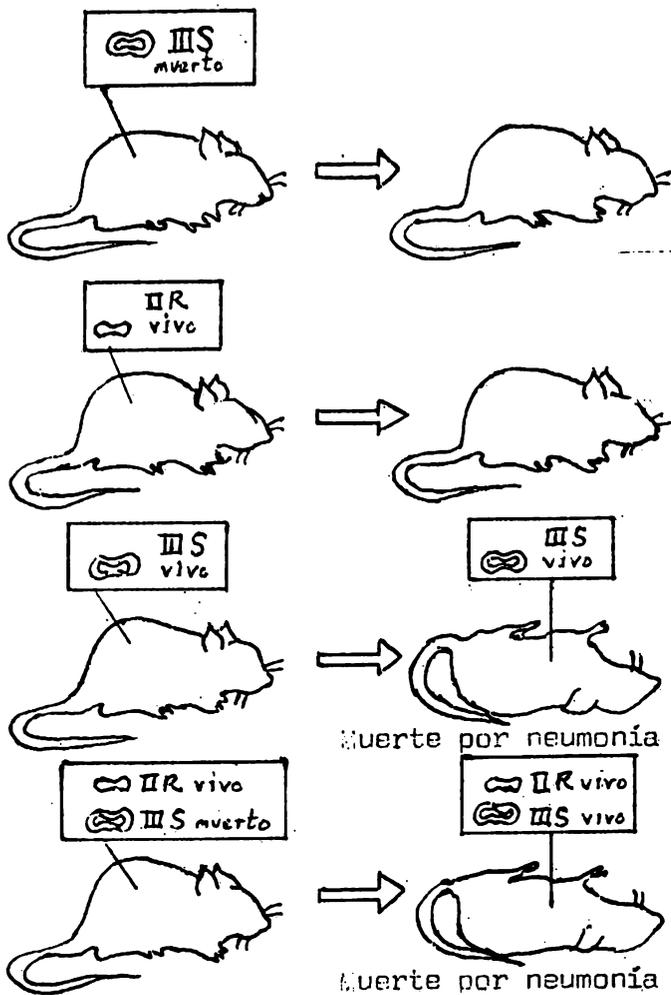
Una gran ventaja experimental de las bacterias es que tales microorganismos pueden desarrollarse en un medio que contenga sustancias sencillas, así algunas bacterias logran crecer en un medio completamente sintético que solamente contenga, además de agua y sales simples, a la glucosa como fuente de energía. Además, el tiempo de reproducción de estos microorganismos es relativamente corto en comparación con el de organismos superiores como *Drosophila*.

En la década de los años 1910, Frederick W. Twort y F. d'Hérelle, de manera independiente, descubrieron a unos pequeños microorganismos que actúan como parásitos de las bacterias, los virus bacterianos o bacteriofagos. Ya en 1922, H.J. Muller pensó que estos microorganismos podían aportar un nuevo recurso para el estudio de los problemas genéticos; con la misma idea, Max Delbrück, en 1938, decidió experimentar con los bacteriofagos (en particular con un virus parásito de la bacteria intestinal *E. coli*), con la esperanza de que el estudio de su reproducción proporcionara nuevas luces a los problemas implicados en la replicación biológica.

a) Las investigaciones con neumococos. De investigaciones realizadas con la bacteria neumococos (*Diplococcus pneumoniae*), a principios de la década de los años 1920, se sabía que un punto de diferencia entre las colonias bacterianas radicaba en la cubierta capsular de carbohidratos que determina su apariencia física. Así, determinadas colonias eran lisas (S) porque poseían cápsulas de polisacáridos, en tanto que otras eran rugosas (R), debido a que carecían de tales cápsulas. Además, las colonias con cápsula eran virulentas y producían neumonía al ser inyectadas a las ratas y a otros mamíferos.

Partiendo de estos antecedentes Frederick Griffith, en 1928, realizó una serie de experimentos con ratones para estudiar los efectos de los neumococos virulentos y no virulentos. Griffith procedió a administrar a un grupo de ratones células virulentas muertas por calor; en otro grupo inyectó células no virulentas y aplicó células virulentas muertas por calor, mezcladas con células no virulentas, a un tercer grupo de ratones.

Los dos primeros grupos de ratones no fueron afectados pero los animales del tercer grupo contrajeron neumonía. Esto fue un descubrimiento inesperado, ya que se producía un caso de neumonía en los ratones si se les aplicaba una mezcla de organismos vivos no virulentos y organismos virulentos muertos.



El experimento de Griffith que demuestra la transformación de las células no virulentas II R en células virulentas del tipo III S.

Esta observación sugirió a Griffith que alguna sustancia presente en las células S muertas debía ser transferida a las células vivas R, volviéndolas virulentas.

Una vez que estuvo lista la escena, pronto se hizo un nuevo descubrimiento que permitió deducir el papel biológico del DNA.

En 1944, Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod y Maclyn McCarty estudiando con más detalle la transformación de Griffith, encontraron que la adición de DNA purificado obtenido de una cepa de neumococos del tipo III liso (S) a una cepa mutante de neumococos del tipo II rugoso (R) (que difería de la cepa del tipo III en que carecía de la enzima necesaria para la elaboración de la cápsula de carbohidratos), era seguida por la transformación, de modo hereditario, de las bacterias mutantes rugosas (R) en bacterias del tipo III lisas (S). Este cambio era acompañado por la conversión de los organismos mutantes no virulentos en bacterias virulentas.

Este descubrimiento sugirió a Avery que el DNA era portador de un mensaje genético que podía ser asimilado y expresado por las células de tipo mutante. En otras palabras, Avery concluyó que la forma física de los genes bacterianos debía ser el DNA, esto es, que el DNA es el material genético.

b) Los trabajos de Erwin Chargaff. De las investigaciones químicas sobre la estructura de los ácidos nucleicos surgieron nuevas evidencias que parecieron apoyar las observaciones de Avery.

En 1950, Erwin Chargaff decidió adaptar los métodos cromatográficos desarrollados por A.J. Porter Martin y Richard L.M. Syngé (1944) para el análisis de los aminoácidos, a la determinación cuantitativa de las bases nitrogenadas que se hallan presentes en las moléculas de DNA. Para lo cual, Chargaff sometió a hidrólisis, seguida de cromatografía en papel, a muestras de DNA obtenidas de diferen-

tes especies y sus resultados mostraron lo siguiente :

- a) El DNA obtenido de diferentes especies biológicas presentaba una composición de bases muy distinta; mientras que las muestras de distintos tejidos de una misma especie, tenían la misma composición de bases.
- b) En adición, la suma de los nucleótidos de purina era igual a la suma de los nucleótidos de pirimidina; por otra parte, la razón molar de adenina a timina era la unidad tal como ocurría con la razón molar de guanina a citosina y 5-metilcitosina que también era la unidad. Estos resultados mostraban claramente un "apareamiento" o una equivalencia de bases en el DNA.

Resultó evidente para Chargaff que la molécula del DNA era más compleja de lo que se pensaba y que no estaba formada por una secuencia repetida de tetranucleótidos como habían sugerido P.A.T. Levene y otros investigadores, previamente. Es decir, que los cuatro tipos de nucleótidos podían estar distribuidos en forma arbitraria a lo largo de la molécula del DNA; aún más, Chargaff concluyó que cualquier molécula de DNA podía almacenar información genética en forma de una secuencia precisa de nucleótidos a lo largo de su cadena polinucleotídica (E. Chargaff y col., 1949-1951; J.D. Smith y G.R. Wyatt, 1951).

Sin embargo, no se acentó de inmediato la idea de que el DNA es el portador de la información genética celular puesto que en los primeros experimentos con virus no se logró identificar a ningún precursor del DNA viral en las primeras etapas de la infección vírica de las células bacterianas.

c) Las investigaciones de Hershey-Chase con isótopos y los estudios de rayos X de Wilkins-Franklin. Pronto se hicieron dos descubrimientos claves que permitieron confirmar el papel del DNA como portador de información genética. En el primero de ellos, A.D. Hershey y M. Chase (1952) proporcionaron una evidencia directa de que el DNA es el material genético de ciertos virus bacterianos.

Después de marcar con P^{32} el DNA y con S^{35} las proteínas del fago T_2 , y al utilizar este microorganismo "marcado" para infectar células de E. coli, Hershey y Chase descubrieron que únicamente el DNA- P^{32} radiactivo penetraba en las células bacterianas, mientras que las proteínas virales- S^{35} radiactivas quedaban retendidas en la superficie externa de las paredes celulares, y por lo mismo, eran ajenas al proceso reproductivo que ocurría en el interior de las células de E. coli.

Este experimento demostró de manera concluyente que el DNA es el portador de la información genética, y se confirmó plenamente cuando se publicaron los resultados de otras investigaciones, en algunas de las cuales se obtuvieron micrografías electrónicas del proceso de infección. Con ayuda del microscopio electrónico se observó que después de la infección viral de las células bacterianas la cabeza del fago T_2 permanecía unida a pared celular de las bacterias infectadas (T. Anderson, 1953); y después de un ataque enzimático a la pared celular (L.F. -- Harrington y L.M. Kozloff, 1956; L.M. Kozloff y col., 1957), la entrada del DNA en la célula huésped era seguida por una serie de eventos metabólicos, como la iniciación de la síntesis de muchas enzimas, y por un incremento en la actividad

de desoxirribonucleasa que conducía a la degradación del DNA de la bacteria infectada (L.H. Kozloff, 1953). Después de un breve periodo, el DNA del fago era activamente sintetizado a partir de los constituyentes del DNA de la célula bacteriana (S.S. Cohen, 1951; M.S.H. Siddiqi y col., 1952) y, finalmente, la multiplicación del fago hasta formar cientos de partículas era seguida por la ruptura (lisis) de la célula infectada, con la consiguiente liberación de las partículas virales al medio circundante (J.S.K. Boyd, 1956).

El segundo evento importante provino de la aplicación de los análisis de difracción de rayos X a la determinación de la estructura tridimensional de las moléculas con importancia biológica. Estos trabajos se iniciaron a fines de la década de los años 1930 con las investigaciones de W.T. Astbury y J.D. Bernal (1938) quienes aplicaron las técnicas de difracción de rayos X al análisis de la estructura de proteínas y ácidos nucleicos; y el primer gran triunfo en la aplicación de estas técnicas fue logrado por Linus Pauling en 1951, quien logró determinar la estructura básica de las proteínas: la ordenación en hélices alfa de las cadenas polipeptídicas de ciertas proteínas fibrosas como el colágeno del tejido conectivo.

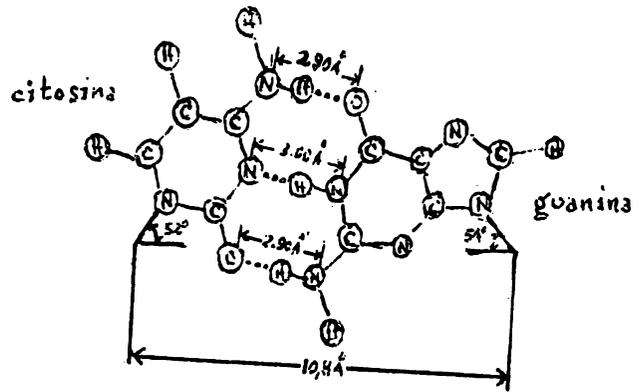
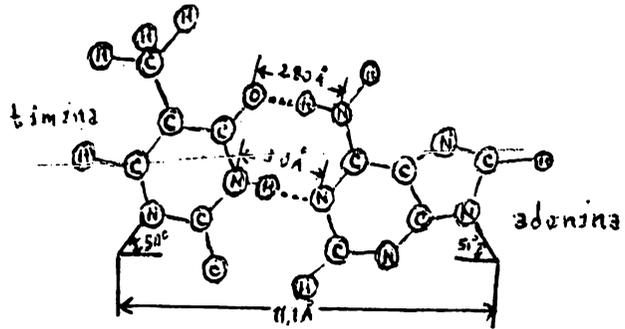
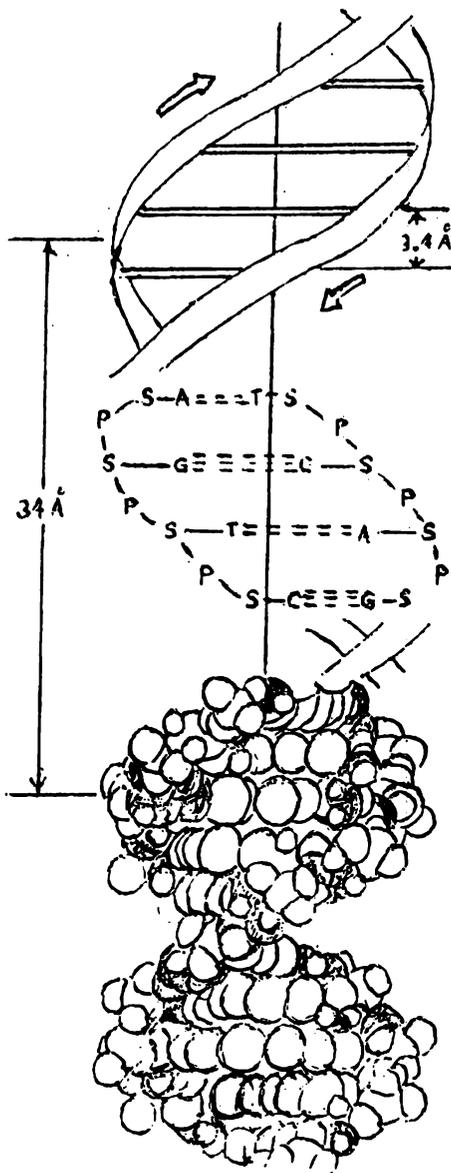
Pronto se tuvieron datos para los ácidos nucleicos cuando empezaron a obtenerse preparaciones más purificadas de DNA. En el periodo de 1950 a 1953, y como resultado de los trabajos de Maurice H.F. Wilkins y Rosalind E. Franklin, se encontró que la forma B del DNA producía unos patrones de difracción que mostraban claramente dos tipos de periodicidades: una principal de 3.4 \AA y otra secundaria de 34 \AA , muy semejantes a las periodicidades mayor y menor de las alfa-queratinas. Pero, de inmediato surgió el problema de cómo interpretar estas periodicidades en términos atómicos.

d) El modelo de la doble hélice de Watson y Crick. El éxito logrado por Linus Pauling al elucidar la estructura de las proteínas, motivó a James D. Watson a abandonar sus estudios acerca de la reproducción de los virus bacterianos, que estaba realizando en 1950, para dirigirse a Cambridge en 1951 y trabajar en lo que él consideraba que era una cuestión fundamental: la identificación de la estructura tridimensional del DNA.

En Cambridge, Watson conoció a Francis H.C. Crick quien también consideraba que el conocimiento de la estructura del DNA proporcionaría revelaciones importantes sobre la naturaleza del material genético. Pronto, Watson y Crick empezaron a trabajar en colaboración y en la primavera de 1953, como resultado de sus investigaciones, publicaron su clásico escrito en Nature en el cual proponían un modelo tridimensional para la estructura del DNA, basado en gran parte en los patrones de difracción de rayos X obtenidos por Franklin y Wilkins así como en las equivalencias de bases determinadas por Chargaff. En este modelo, Watson y Crick sugerían que la molécula del DNA estaba formada por una doble hélice compuesta de dos cadenas de polinucleótidos, unidos entre sí a través de enlaces fosfodiéster, arrolladas en torno a un eje común.

De manera que las bases de cada hebra quedarían situadas en el interior de la doble hélice, con sus planos paralelos entre sí, y perpendiculares al eje de la hélice doble. En tanto que las bases de una hebra se hallarían unidas a las de la otra por medio de enlaces de hidrógeno y de manera complementaria, esto es,

para cada nucleótido de adenina de una cadena le corresponde únicamente un nucleótido de timina en la otra, en tanto que a cada nucleótido de guanina de una de las hebras le corresponde solamente un nucleótido de citosina en la otra.

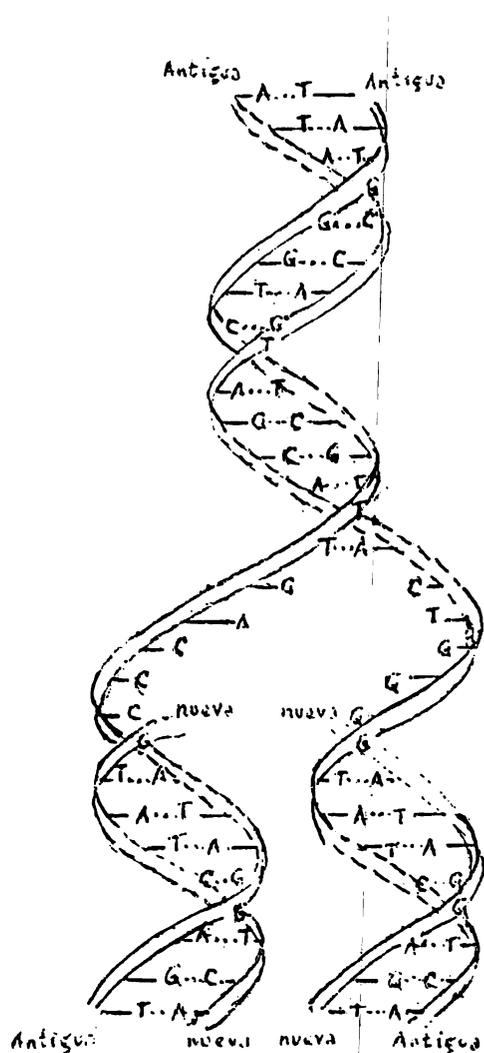


El modelo de Watson y Crick de la doble hélice para la molécula del DNA.

Aunque a primera vista el modelo de Watson y Crick parecía muy similar al de la hélice alfa de las proteínas propuesto por Pauling, sin embargo contenía un segundo elemento que permitía visualizar por vez primera cómo funciona el mecanismo genético implicado en la replicación celular.

Pues el modelo sugirió de inmediato un mecanismo por medio del cual la información genética se podía replicar con precisión. Así se postuló que durante la división celular el DNA podría replicarse mediante la separación de las dos hebras, con lo cual cada una serviría como un molde para especificar la secuencia de bases de la nueva hebra complementaria sintetizada. El resultado

final del proceso produciría a la formación de dos moléculas de DNA, cada una de las cuales contiene una de las hebras del DNA original.



Antes de que se demostrara experimentalmente el modelo de Watson y Crick, la formulación de la hipótesis original causó un gran impacto y tuvo una influencia decisiva sobre los experimentos posteriores.

En 1962, James D. Watson, Francis H. C. Crick y Maurice H.F. Wilkins compartieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por el modelo y la hipótesis presentados en 1953, y que se comprobaron en los años siguientes.

La replicación del DNA según la hipótesis original de Watson y Crick. Las hebras progenitoras se separan y sirven como moldes para la síntesis de las hebras hijas complementarias.

2) La elucidación de la vía biosintética.— Como se ha visto, la característica más importante del modelo propuesto por Watson y Crick, desde el punto de vista genético, era su proposición de que las dos cadenas que forman la doble hélice de la molécula del DNA podían separarse durante la replicación — con lo cual cada una actúa como molde—, para formar hebras hijas complementarias antiparalelas a las hebras progenitoras, y las cuales contienen una de las hebras de la hebra progenitor. A este proceso se le da el nombre de replicación semiconservadora.

Watson y Crick pensaron que este era el mecanismo por el cual ocurría la replicación del DNA in vivo y, además, sugirieron que las bases nitrogenadas que actúan como precursores de las hebras hijas se orientarían por sí mismas, de acuerdo con la ley de los apareamientos complementarios, con las hebras progenitoras que actúan como moldes y que entonces se "cerrarían" (como se usan los dientes de un cierre), sin la participación de ninguna enzima. Sin embargo, de un análisis de la estructura del DNA y de la naturaleza antiparalela de las cadenas, se pueden deducir otros dos mecanismos por medio de los cuales también pueden formarse dos hebras complementarias de DNA.

Uno de estos mecanismos es la replicación conservadora, y en la cual, durante la replicación del DNA, la doble cadena del DNA progenitor no se desdobló y cada

Lo que implica que únicamente se copia una cadena, en una dirección antiparalela, la que a su vez sirve como patrón en la síntesis de la cadena complementaria. En el otro mecanismo se propone que para facilitar la replicación, las cadenas de DNA progenitor se rompen a intervalos y que, posteriormente, los fragmentos replicados se combinan en una misma hebra con segmentos de la cadena progenitora. Esta es la llamada réplica dispersora. Esto planteó la cuestión de determinar cuál es el mecanismo que ocurre realmente durante la replicación in vivo del DNA en las células de los distintos organismos.

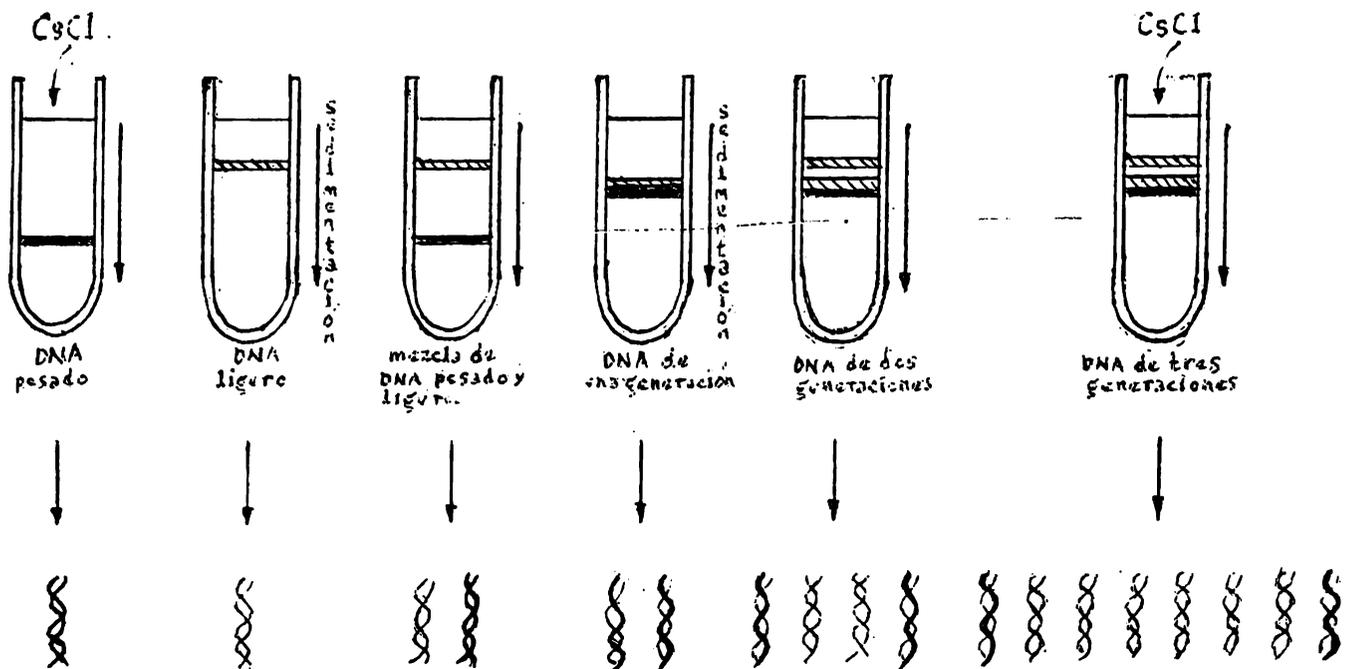
a) La demostración de Meselson y Stahl: En 1957, C. Levinthal y C.A. Thomas decidieron estudiar el modo de replicación del DNA analizando el proceso reproductivo del fago T₂; estos investigadores fueron los primeros en emplear la técnica del marcado radiactivo, seguido por autorradiografía, para seguir de cerca el proceso replicativo. Sin embargo, las técnicas utilizadas necesitaban un mayor refinamiento, ya que los resultados obtenidos no eran fáciles de interpretar.

De manera que la demostración convincente para esclarecer el mecanismo de la replicación tuvo que esperar un poco, hasta que vinieron las aportaciones decisivas de Meselson y Stahl. Estos trabajos no sólo establecieron el carácter semiconservativo de la replicación, sino que además, Meselson y Stahl introdujeron la técnica del equilibrio de sedimentación en gradientes de densidad, cuyo empleo en el estudio de las propiedades fisicoquímicas del DNA ha aportado resultados invaluable.

Para lograr su demostración, Meselson y Stahl cultivaron células de E. coli en un medio que contenía como única fuente de nitrógeno cloruro de amonio marcado, $N^{15}H_4Cl$, con lo que todos los compuestos nitrogenados, incluyendo el DNA, resultaron marcados y sólo contenían átomos de nitrógeno pesado (N^{15}). A continuación las bacterias lavadas fueron transferidas rápidamente a un medio que contenía nitrógeno normal, N^{14} , en forma de cloruro de amonio, como única fuente nitrogenada; se permitió entonces que las células se reprodujeran durante varias generaciones, después de tomar muestras a intervalos variables que correspondían uno, dos o tres ciclos de duplicación en el medio "ligero" de N^{14} , se recogió el cultivo y se recuperó el DNA por los procedimientos usuales. Seguidamente, se determinó la densidad de flotación de las distintas muestras de DNA por centrifugación en gradientes de cloruro de cesio.

El DNA de las bacterias cultivadas en el medio "pesado" de N^{15} también resulta "pesado" y por lo mismo sedimenta en una región particular del gradiente salino, formando una banda muy profunda; en tanto que el DNA normal origina una banda menos profunda y distinta de la del DNA "pesado". Al centrifugar el DNA obtenido después de una generación, se obtuvo una sola banda situada entre la del DNA normal y la del DNA pesado; esto es lo que cabría esperar si el DNA se hallara formado por una hebra progenitora "pesada" y una hebra de N^{14} recién sintetizada. El DNA de la segunda generación mostró dos bandas, una idéntica a la del DNA ligero y otra idéntica a la del DNA híbrido de la primera generación. Evidentemente, los resultados concuerdan con la hipótesis de la replicación semiconservativa de Watson y Crick, difiriendo de los que cabría esperar de las otras hipótesis.

Así que el experimento de Meselson y Stahl comprobó plenamente la hipótesis de Watson y Brick más allá de toda duda; y fue especialmente convincente porque en su desarrollo se utilizaron células vivas e intactas, sin que se recurriera al empleo de ningún artificio durante la división celular.



Representación esquemática del experimento de Meselson y Stahl que demuestra la réplica semiconservadora del DNA, por medio de la formación de bandas características, correspondientes a los distintos tipos de DNA, en gradientes salinos de densidad de CsCl y mediante la sedimentación en equilibrio de estas soluciones.

Sin embargo, algunos investigadores como L.F. Cavalieri y B.H. Rosenberg -- (1962) objetaron la demostración de Meselson y Stahl y propusieron que la cadena de DNA progenitor que se transmite a las hebras hijas de la primera generación y no es necesariamente una de las cadenas de la doble hélice, sino que se trata de una doble hélice completa; es decir, que en realidad ocurriría una replicación de tipo conservativo.

Pero, C.L. Schildkraut et al. (1961) así como D. Freifelder y P.F. Davison (1962), sometiendo al híbrido de Meselson y Stahl, formado durante la primera generación, a una serie de desnaturalizaciones térmicas y estudiando la velocidad de aparición de las cadenas ligera y pesada en función del tiempo de calentamiento; junto con los experimentos de V. Luzzati et al. (1962), quienes emplearon métodos de difracción de rayos X de ángulo reducido, permitieron llegar a la conclusión de que durante la replicación del DNA no se forma ningún dímero de cuatro cadenas. Y, finalmente, R.L. Baldwin y E.M. Shooter (1963) demostraron en forma definitiva que el intermediario en la replicación del DNA es una doble hélice y que una de las hebras proviene del DNA progenitor, para lo cual emplearon una técnica similar a las de Schildkraut y de Meselson y Stahl.

E.H. Simon (1961), utilizando al 5-bromouracilo como marcador de densidad, demostró que la replicación de las células humanas en cultivo también se efectúa mediante un mecanismo semiconservativo. En tanto que, J.H. Taylor et al., -

(1957), utilizando la técnica del marcado de las estructuras cromosomales con timidina tritiada y empleando raíces del guisante vicia faba, mostraron que también los cromosomas se replican por medio del mecanismo semiconservativo.

Las características de la replicación semiconservadora del DNA.— Ahora bien, la demostración de Meselson y Stahl permitió dar respuesta a una pregunta: ¿Cuál es el mecanismo involucrado en la replicación del DNA in vivo? Y, como ellos lo probaron, el mecanismo semiconservador es el que ocurre actualmente durante la replicación celular.

Pero, una vez que se comprobó la validez de los experimentos de Meselson y Stahl, y que se estableció la generalidad del mecanismo semiconservador a nivel del DNA y de los cromosomas, surgieron entonces nuevas interrogantes. Y aunque en la actualidad se sigue buscando la contestación para algunas de ellas, el conocimiento de buena parte de las respuestas que se ha logrado desde los años siguientes a los experimentos de Meselson y Stahl, ha llevado a la formulación de las características básicas del mecanismo semiconservador para la réplica del DNA.

b) Replicación secuencial del DNA. Debido a que la réplica semiconservadora del DNA requiere que las dos cadenas de la doble hélice se separen, para servir cada una como molde para las hebras hijas, C. Levinthal y H.R. Crane, en 1956, supusieron que las dos cadenas de la doble hélice se separarían conforme

avanzara la replicación, mediante el rompimiento de un pequeño número de puentes de hidrógeno, lo que llevaría a la formación de una horquilla de replicación (estructura en "Y") cuyos brazos estarían formados por las hebras hijas recién sintetizadas.

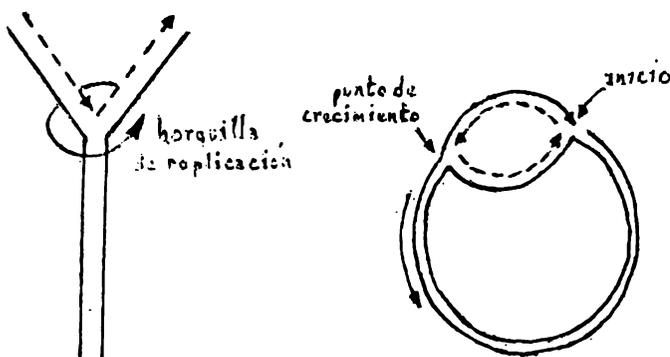
Y en el caso del cromosoma bacteriano circular, la horquilla de replicación sería la que se muestra en la figura adyacente.

Y surgió entonces una nueva pregunta: ¿El DNA de las bacterias se

replica a partir de un solo punto de crecimiento, que se mueve alrededor del cromosoma bacteriano circular, o bien se replica al azar y en varios puntos a la vez?

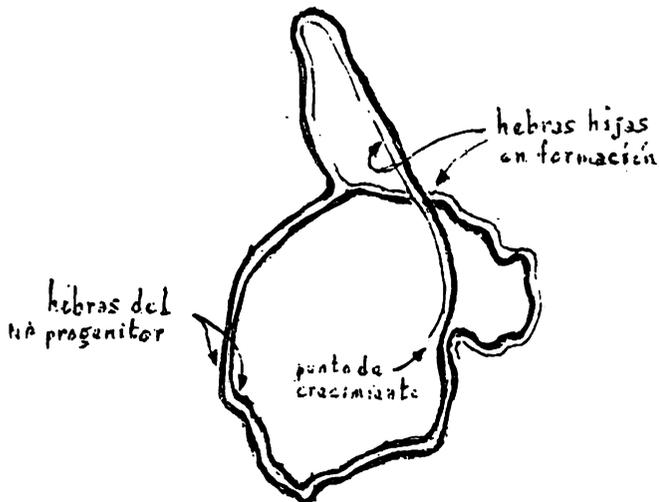
En 1963, J. Cairns inició sus investigaciones para tratar de determinar la configuración geométrica de las hebras del cromosoma circular de E. coli durante las distintas etapas de la replicación y para lograrlo recurrió al empleo de las técnicas autorradiográficas.

El procedimiento consistía en utilizar células de E. coli cultivadas en un medio que contenía timina marcada con tritio, la cual se incorporaba al DNA de las bacterias. Obteniendo muestras de células a distintos intervalos, se extrajo cuidadosamente el DNA evitando las roturas y fraccionamientos; a continuación, se extendió al DNA sobre rejillas, las que se cubrieron con placas fotográficas.



La horquilla de replicación y las estructuras en "Y" de los cromosomas bacterianos circulares.

La radiactividad de la timina provocó la reducción del cloruro de plata de las placas fotográficas, dando lugar a la formación de gránulos de plata metálica los que después de varias semanas de exposición proporcionaron la "estructura" de los cromosomas y se fotografiaron con ayuda del microscopio.



Esquema que ilustra la replicación del cromosoma de *E. coli*, tal como se observó durante los exámenes autorradiográficos de Cairns.

Las fotografías mostraron claramente que el cromosoma de *E. coli* era una estructura cerrada y sin fin, lo que coincidía con su mapa genético circular.

Además, se observó que la replicación procedía mediante la formación de las estructuras en "Y" u horquillas de replicación, tal como lo habían sugerido Levinthal y Crane; y, por otra parte, se pudo concluir de un análisis de las fotografías que la replicación se efectuaba de manera secuencial. Es decir, que la replicación se efectúa siguiendo una secuencia a partir de un punto de origen.

De los trabajos de H. Yoshikawa y N. Sueoka (1963) se obtuvieron conclusiones similares. Sus investigaciones estaban basadas en el principio de que si la horquilla de replicación atraviesa una región genética dada, entonces el número de genes de dicha región que se hallen presentes en la célula será (de momento) dos veces mayor que el de los genes pertenecientes a un segmento sin replicar.

Así que, utilizando este principio y el método de las transformaciones, en el cual se extraía el DNA de las células de *Bacillus subtilis* y se adicionaba a una cepa receptora que carecía del gene que se desea determinar. Entonces una parte de las células receptoras recupera el gene faltante, mediante la incorporación del material genético del donador; seleccionando a esta fracción de células con los métodos adecuados y determinando el número de colonias que provienen de las células transformadas, es posible deducir un porcentaje relativo de los genes transferidos a las células receptoras. Y ya que la replicación de un gene depende de su posición en el cromosoma bacteriano, al observar que la frecuencia de un marcador genético cercano al origen de la replicación era el doble de la de un marcador situado cerca del final de la misma, Yoshikawa y Sueoka concluyeron que esto solamente ocurriría si la replicación procede mediante un mecanismo secuencial.

Otros experimentos de Sueoka y Yoshikawa (1963), mediante la técnica de la transferencia isotópica, y en los cuales se marcó al DNA de las bacterias con O_2^{18} y N^{15} y se transfirió a estos DNA's "pesados" a un medio "ligero" (H_2O y N^{14}), determinando posteriormente la progresión en que son transferidos los marcadores genéticos hacia el DNA de densidad intermedia; junto con las investigaciones de M. Masters y A.B. Pardee (1965), quienes observaron que el incremento

en la síntesis enzimática de los cultivos sincronizados que emplearon, se efectuaba conforme a la secuencia de su mapa genético, han permitido establecer la naturaleza secuencial de la replicación del DNA.

c) Origen y dirección de síntesis en la replicación del DNA. Ya que la replicación de los genes se efectúa secuencialmente y de acuerdo con su posición en el mapa genético, resulta evidente que la formación de la horquilla de replicación debe tener un punto de origen y no varios distribuidos al azar a lo largo del cromosoma.

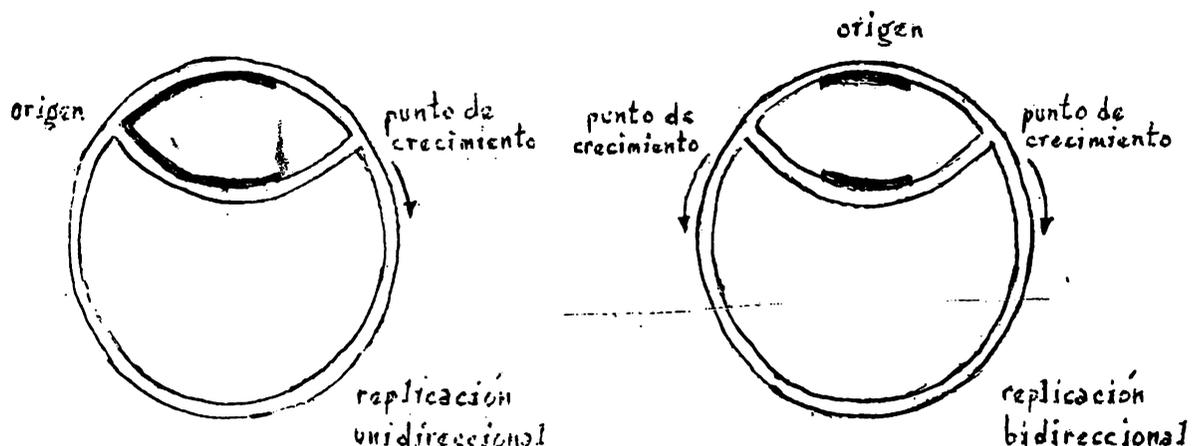
La idea de un origen fijo para la replicación puede deducirse de los experimentos de Yoshikawa y Suenka (1963) y fue propuesta por Francois Jacob, S. Brenner y F. Ouzin (1963) en su modelo del replicón, que postula la existencia de un sitio específico en el cromosoma (el replicón) en el cual unas proteínas específicas inician la síntesis del DNA. El modelo también proponía un origen único de replicación para cada replicón.

Y los trabajos iniciales de M. Meselson y F.W. Stahl (1958), O. Maaløe y P.S. Hanawalt (1961), K.G. Lark et al. (1963) y J. Cairns (1963) demostraron claramente que en cada etapa de replicación de E. coli, ésta se iniciaba en un mismo sitio. T. Nagata y M. Meselson (1968), combinando las técnicas de marcado isotópico con timina tritiada y la técnica de la cetrifugación en gradientes de CsCl, demostraron que la periodicidad en los picos de densidad del DNA híbrido de E. coli, aún después de cinco generaciones, sólo era compatible con la existencia de un punto fijo para la replicación del DNA bacteriano, generación tras generación.

Mientras que R.E. Bird et al. (1972), basándose en el hecho de que el profago lambda siempre se incorporara en el misma posición del cromosoma de E. coli y de que el profago mu se incorpora al azar, determinaron la cantidad relativa de DNA-mu portador con respecto a la del DNA-lambda portador mediante la hibridación DNA-DNA y demostraron que la replicación del cromosoma de E. coli se inicia alrededor del minuto 74 en un punto fijo cercano al sitio ilv; entonces, la replicación procede en ambas direcciones (y no unidireccionalmente como había sugerido J. Cairns en 1963) y con la misma velocidad aproximadamente, para terminar alrededor del minuto 27 en el sitio trp, que es diametralmente opuesto al origen. Estas observaciones se han confirmado con las evidencias autorradiográficas que muestran claramente la replicación bidireccional del cromosoma de E. coli (D.M. Prescott y P.L. Kuempel, 1972). Y estos trabajos permitieron confirmar las observaciones iniciales de L.S. Caro y C.M. Berg (1968) así como las de M. Masters y P. Broda (1971).

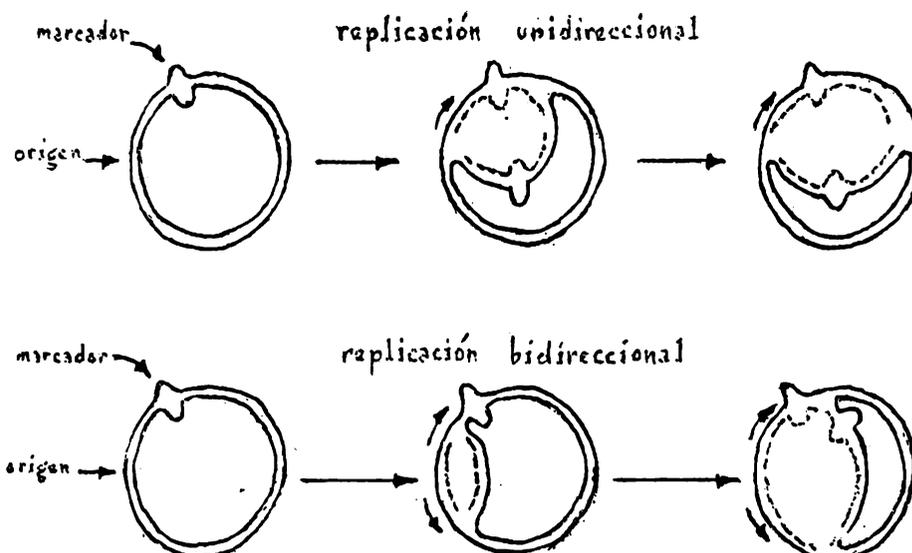
Y. Nishihoka y A. Eisentask (1970) demostraron que la replicación también ocurre de manera bidireccional a partir de un origen fijo en Salmonella typhimurium. En B. subtilis la replicación también es bidireccional como se ha demostrado los estudios genéticos (N. Suenka et al., 1973) y los estudios autorradiográficos con timina marcada (R.G. Wake, 1973; E.B. Gyurasitis y R.G. Wake, 1973) y el punto de origen se halla localizado cerca del sitio ade 16 (H. Yoshikawa y N. Suenka, 1963; A. O'Sullivan y N. Suenka, 1967; N. Suenka y W.G. Quinn, 1968). El conjunto de estas observaciones sugiere que el mecanismo común para

la replicación del cromosoma bacteriano procede bidireccionalmente a partir de un origen fijo.



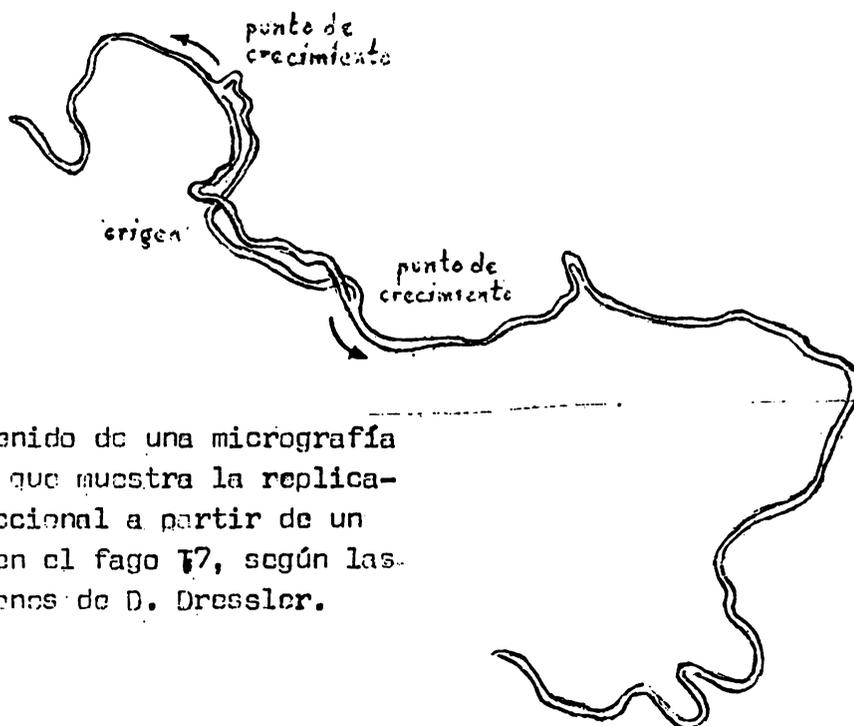
Esquemas obtenidos de los estudios autorradiográficos con timina marcada en los que se muestran las horquillas de replicación, así como la dirección de la replicación indicada por la densidad de granos pesados.

En el caso de los fagos, utilizando distintas técnicas como son la comparación de los mapas de desnaturalización con micrografías electrónicas (M. Schnös y R. Inman, 1970 y 1971) o la utilización de homólogos radiactivos del RNA los cuales forman híbridos con regiones específicas del DNA (W.F. Stevens et al., - 1971), se ha demostrado que la replicación del DNA del fago lambda procede a partir de un punto fijo y que también se efectúa en ambas direcciones. En tanto que W.F. Dove et al. (1971) han hecho estudios para determinar el punto de origen en la replicación del fago lambda.



En la técnica de los mapas de desnaturalización se localizan marcadores los cuales se emplean para determinar la dirección de la replicación.

Se han hecho observaciones similares con el fago T7, utilizando micrografías electrónicas que muestran claramente la formación de las horquillas de replicación y se ha localizado al punto de origen a un 17% a la izquierda del final del cromosoma (J. Wolfson et al., 1972; D. Dressler et al., 1972).



Esquema obtenido de una micrografía electrónica que muestra la replicación bidireccional a partir de un punto fijo en el fago T7, según las investigaciones de D. Dressler.

M. Schnös y R. Inman (1971), utilizando las mismas técnicas que aplicaron al estudio de la replicación del fago lambda, demostraron que la replicación del fago P2 también se efectúa a partir de un origen fijo situado a un 11,7% a la derecha del final del cromosoma. Pero, la replicación solamente procede en una dirección.

Las evidencias obtenidas de los trabajos de Mesig et al. demuestran que el origen de la replicación del fago T4 se localiza entre los genes 42 y 43 (G. Mesig y R. Werner, 1969; G. Mesig, 1970; R.C. Marsh et al., 1971); y aunque existe alguna controversia, las micrografías electrónicas del DNA en replicación del fago T4 sugieren que la replicación también puede ser bidireccional como en el caso de las bacterias (J. Huberman y A.D. Riggs, 1968; H. Delius et al., 1971). Por otra parte, la replicación del virus SV40 en las células animales también se inicia en un punto fijo y procede en ambas direcciones del cromosoma (M.M. Thornton et al., 1972; G.C. Fareed et al., 1972; K.J. Danna y D. Nathans, 1972); mientras que la replicación del DNA mitocondrial del ratón solamente procede en una dirección (H. Kasamatsu y J. Vinograd, 1973).

No obstante, en la actualidad está bien establecido el origen fijo para la replicación, aunque no se ha determinado si la secuencia bidireccional es común a la mayoría de los organismos. Pero, su ocurrencia en las células de los organismos superiores como las levaduras (H.G. Callan, 1973), *Drosophila* (H.J. Kriegstein y D.S. Honness, 1974), los cromosomas de los hamster chinos (J.A. Huberman y A.D. Riggs, 1968; J.A. Huberman y A. Tsai, 1973; K.G. Lark et al., 1971) y los eritroblastos de pollo (H. Weintraub, 1972), permite deducir que sí es un mecanismo común.

3) Etapas en la replicación del DNA.

Una vez que se determinaron las características básicas de la replicación semiconservadora del DNA, a nivel del cromosoma entero; estos conocimientos han servido como base para las nuevas investigaciones que tienen como objetivo principal lograr la elucidación completa del mecanismo general para la replicación.

Este es un campo en el cual se sigue investigando activamente hoy en día; sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora han permitido llegar a establecer una buena parte de la secuencia general de los pasos involucrados en la réplica semiconservadora del DNA.

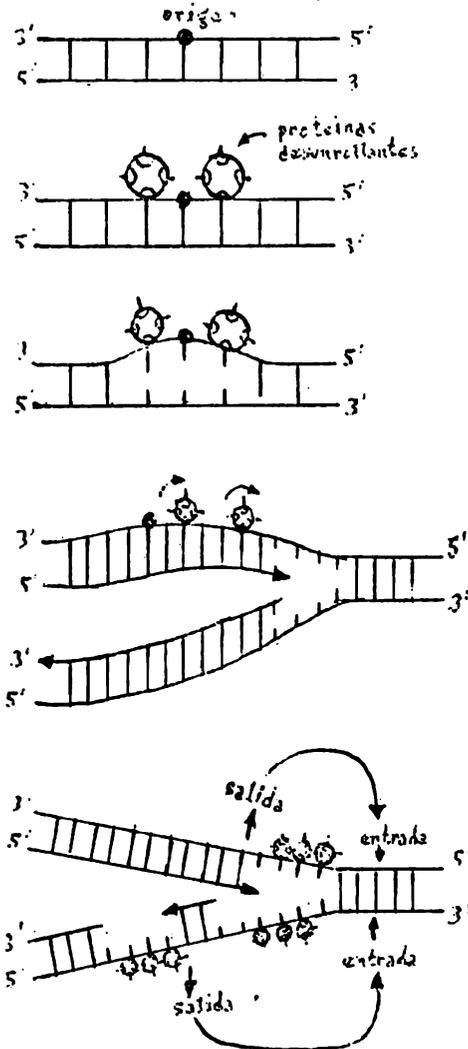
a) Iniciación de la replicación. Una vez que se ha formado la horquilla de replicación (iniciación del cromosoma) se inician entonces una serie de eventos bioquímicos, a este nivel, que conducen a la elongación de las hebras hijas en formación; tales eventos sólo se conocen parcialmente y se han postulado varios modelos para tratar de explicar los hechos observados. Pero, hay evidencias crecientes de que el modelo para la síntesis discontinua, propuesto por R. Okazaki (1968), es el que mejor representa los eventos que ocurren actualmente, durante la elongación de la horquilla de replicación.

Para que se forme la horquilla de replicación y comience la síntesis del DNA, las hebras que componen la doble hélice de la molécula del DNA deben separarse para que cada una actúe como molde y pueda, entonces, iniciarse la acción de las polimerasas. En el modelo del replicón de Francois Jacob et al. (1963) se postulaba que la replicación del DNA era iniciada por una proteína específica (el iniciador) la que debía actuar sobre una región específica del DNA (el repliador).

Las primeras evidencias de que alguna o varias proteínas se hallan involucradas durante cada ciclo de replicación en las bacterias como *E. coli*, se obtuvieron estudiando el fenómeno de la "supresión integrada". Se observó que los mutantes de *E. coli* sensibles a la temperatura no podían iniciar nuevos ciclos de replicación debido a que carecían de una proteína, la que actuaba como iniciadora de la replicación. Pero si se les adicionaba algún replicón, tal como un factor sexual (Y. Nishikawa et al., 1972) o algún otro episoma como los fagos P1 (G. Yarmolansky, 1972), P2 (G. Lindahl et al., 1971) o el fago lambda (P. Brachet, 1972), entonces las bacterias podían replicarse a la temperatura no permitida; debido a que el episoma integrado sí podía codificar para su propio iniciador e iniciaba la replicación, con lo cual se replicaba pasivamente al cromosoma bacteriano (J.A. Wechsler y J.D. Gross, 1971; J.D. Gross, 1972).

Tales proteínas, que también se requieren durante la elongación de la horquilla de replicación, se conocen con el nombre de "proteínas desenrollantes" y se descubrieron cuando se observó que el producto del gene 32 del fago T4 se requería de manera estequiométrica durante la replicación y la recombinación, en las células infectadas por tal fago (D.P. Snustad, 1968). Puesto que la síntesis del DNA se detenía después de la infección, cuando se utilizaban mutantes que carecían del gene 32; y esto se confirmó, al observar que la proteína sintetizada después de la infección era la que faltaba en los fagos mutantes (B.M. Alberts et al., 1968; B.M. Alberts, 1970; S. Hiva et al., 1970).

Por lo tanto, B.L. Alberts et al. propusieron que al inicio de la replicación las proteínas desenrollantes, como la del gene 32, se unen en varios puntos de las dos cadenas del DNA para preferentemente a una de ellas, para promover la desnaturalización de la doble hélice disminuyendo la temperatura de "fusión" del DNA hasta en unos 40°; con lo cual se facilita el desdoblamiento de las hebras progenitoras del DNA (B.L. Alberts y L. Frey, 1970).



Esquema que muestra la acción de las proteínas desenrollantes al iniciarse la replicación; las proteínas se reciclan posteriormente, a medida que va creciendo la horquilla de replicación (según B. Alberts).

En 1971, J.C. Wang aisló a una fracción proteica de E. coli, la proteína omega, que promueve la eliminación de los lóbulos superarrollados de los cromosomas circulares, pero no se conoce el mecanismo. Se ha propuesto que esta proteína también participa en el proceso del desdoblamiento del DNA.

Se requiere de esta "fusión" debido a la gran estabilidad de la doble hélice en las condiciones fisiológicas normales (J. Marmur y P. Doty, 1962); por lo cual es necesario que las proteínas desenrollantes, como la del gene 32, desestabilicen temporalmente a la doble hélice del DNA.

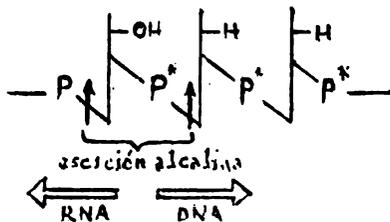
Se ha observado que el punto de unión de las proteínas desenrollantes se efectúa en las regiones de la doble hélice ricas en enlaces A-T, que son los que funden primero, y N. Sigal et al. (1972) han aprovechado este hecho para elaborar mapas de desnaturalización, similares a los que se obtienen por tratamiento del DNA con álcalis o calor.

H. Oelius et al. (1972), utilizando micrografías electrónicas, han demostrado que las proteínas desenrollantes también promueven el desdoblamiento y alineación de los cromosomas virales circulares monofilares.

Es probable que las proteínas desenrollantes se hallen ampliamente distribuidas en la naturaleza pues se les ha obtenido de las células de los procariotas como E. coli (N. Sigal et al., 1972) y del fago M13 (T.J. Henry y D. Pratt, 1969; - D. Pratt et al., 1974); y de las células de los procariotas como las del timo de ternera (A.P. Phillips, 1968), de las plantas superiores y de los espermatozoides de los mamíferos (Y. Hotta y H. Stern, 1971), de las células de los mamíferos (R.L. Tsai y H. Green, 1973) y de las células de mamíferos infectados por virus (P.C. Van der Vleit y A.J. Levine, 1973).

La formación del RNA "cebador" .- W.F. Dove et al. (1971) observaron que además de una proteína iniciadora y de un sitio replicador en el cromosoma, la replicación del DNA en el fago lambda también requería de la síntesis del RNA cerca del punto de origen.

Mediante la técnica del disco de celofán desarrollada por H. Schaller et al. (1972) -en la cual se inmovilizan suspensiones concentradas de células, como las de *E. coli*, sobre una superficie de celofán; y, después de someter a lisis suave y en frío a las células, se seca al lisado resultante sobre el celofán. Adicionando entonces una mezcla de los dNTPs, ATP y Mg^{2+} al lisado, que contiene al complejo de replicación intacto y en funcionamiento, la síntesis semiconservadora procede durante un periodo de 60 min. a una velocidad de alrededor del 20% de la del proceso in vivo. El sistema permite la difusión de las moléculas pequeñas hacia el complejo de replicación, a través del disco de celofán, pero retiene a las moléculas grandes involucradas en la replicación.-, A. Klein y A. - Powling (1972) confirmaron que también se requería a la ^{RNA} polimerasa al principio de la replicación, pero que no era necesaria durante la elongación de la horquilla de replicación.



La demostración del enlace covalente entre el RNA "cebador" y la cadena del DNA. Se observó la transferencia de P^{32} de los dNTPs a los RNTPs después de la hidrólisis alcalina.

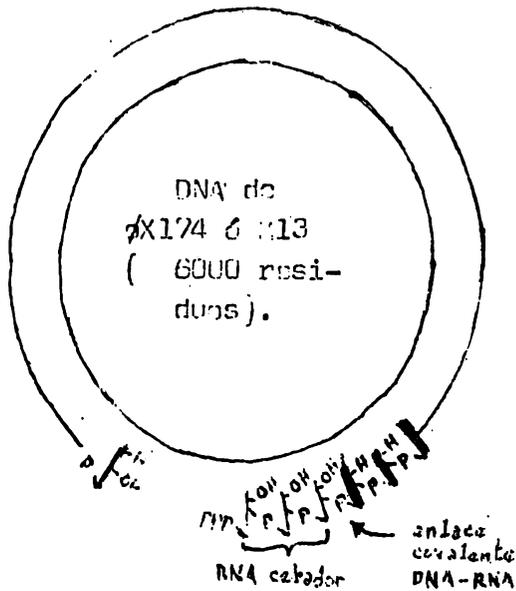
Ahora bien, ninguna de las polimerasas conocidas (las polimerasas I, II y III) pueda iniciar la síntesis del DNA a menos que se halle presente un DNA "cebador", unido a una de las hebras del DNA progenitor, y que proporcione al grupo 3'-OH terminal. Y, aunque durante algún tiempo se pensó que la DNA polimerasa I podía iniciar la replicación del DNA in vitro (P.T. Englund et al., 1968; A. - Kornberg, 1969; M.P. Deutscher y A. Kornberg, 1969; R.B. Kelly et al., 1970), se demostró que también se requieren pequeños fragmentos

monofilares de DNA que actúen como "cebadores" (M. Goulian y A. Kornberg, 1967; M. Goulian, 1968 ; A. Kornberg, 1969).

Sabiendo que la RNA-polimerasa no necesita de "cebador" para iniciar la síntesis del RNA (R. Losick, 1972; E.K.F. Bautz, 1972) y debido a que la DNA polimerasa I puede alargar al término 3'-OH del RNA como lo habían demostrado P. Berg et al. (1963) y R.O. Wells et al. (1972); K.G. Lark (1972) y S. Laurent (1973) propusieron que la síntesis del DNA podía ser iniciada por el RNA, puesto que habían descubierto evidencias en este sentido durante el inicio de la replicación del cromosoma bacteriano.

El primer indicio sobre la participación del RNA en la replicación, había venido de los trabajos de D. Brutlag, R. Schekman y A. Kornberg (1971) quienes observaron que la rifampicina, inhibidor de la RNA polimerasa, bloqueaba la conversión del DNA monifilar hacia la forma dúplex (la forma replicativa, RF) del virus M13 en las células de *E. coli* infectadas por tal virus. Lo cual no ocurría cuando se utilizaban mutantes de *E. coli* resistentes a la rifampicina. Mientras que la rifampicina también bloqueaba esta conversión in vitro, cuando se empleaban fracciones enzimáticas solubles de *E. coli* (W. Wickner et al., 1972).

W. Wickner, D. Brutlag, R. Schekman y A. Kornberg (1972) demostraron claramente que el RNA puede "cebar" la replicación del DNA *in vitro*, al observar que la hidrólisis alcalina del producto sintetizado por el sistema soluble de *E. coli* en presencia de los cuatro dNTPs- P^{32} marcados, producía ribonucleótidos marcados (NTPs- P^{32}); el 84% de los ribonucleótidos marcados era una mezcla de 2' y 3'-rNTP. Resultó evidente que el producto de la síntesis contenía un enlace fosfodiéster 5'-3', entre un ribonucleótido (proveniente del RNA "cebador") y un desoxirribonucleótido (pertenciente al DNA sintetizado).



Esquema que muestra la participación del RNA como "cebador" para la síntesis del DNA de los virus ϕ X174 o M13. El RNA es eliminado antes de que la ligasa selle al DNA circular.

Para eliminar al RNA cebador antes de que la ligasa sellara al DNA para formar el nuevo círculo.

S. Silverstein y D. Billen (1971) y W. Wickner et al. (1972), por otra parte, demostraron que la conversión del DNA monofilar del fago ϕ X-174 hacia la forma dúplex requería de la mayoría de las enzimas del huésped y que era resistente a la rifampicina.

Pero, como lo demostraron R. Schekman, W. Wickner, O. Westergaard, D. Brutlag, E. Seider, L.L. Bertsch y A. Kornberg (1972), también en este caso se requiere de la síntesis del RNA para poder iniciar la síntesis del DNA; puesto que la reacción es inhibida por la actinomicina D, necesita la presencia de los cuatro ribonucleósidos trifosfato y se forman enlaces fosfodiéster entre el RNA y el DNA.

Por tanto, la conversión del DNA monofilar del virus M13 hacia la forma replicativa, *in vitro*, involucra dos pasos; a) En el primer paso se requiere de los ribonucleótidos trifosfato (rNTPs) para la síntesis del RNA y es inhibido por la rifampicina. b) En el segundo paso se necesita al producto de la primera etapa y a los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), y este paso no es inhibido por la rifampicina.

W. Wickner et al. (1972) obtuvieron evidencias adicionales sobre la participación del RNA, al observar que la DNA polimerasa I de *E. coli* podía convertir a la forma replicativa II (RF II) lineal hacia la forma replicativa I (RF I), la forma circular de la doble hélice, en presencia de una ligasa.

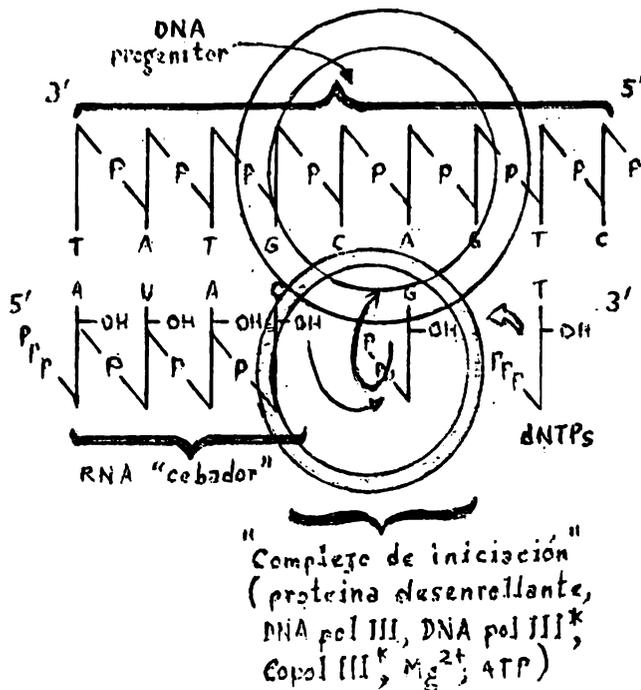
Esto sugirió claramente que se requería de una acción exonucleolítica - 5'-3', probablemente de la DNA pol I, para

eliminar al RNA cebador antes de que la ligasa sellara al DNA para formar el

nuevo círculo.

b) Elongación de las cadenas del DNA.— Habiéndose establecido que la síntesis del DNA es precedida por la formación del RNA que actúa como "cebador", el paso siguiente consiste en la elongación del término 3'-OH libre del RNA por las polimerasas, en presencia de las hebras progenitoras del DNA que actúan como moldes.

Así que la o las polimerasa(s) involucradas en la elongación deben ser capaces de formar enlaces fosfodiéster entre los ribonucleótidos del RNA "cebador" y los desoxirribonucleótidos del DNA que se va a sintetizar.



Esquema en el que se muestra la participación del RNA como "cebador" para la síntesis del DNA. En presencia de las proteínas desenrollantes, el "complejo de iniciación" promueve la formación de enlaces fosfodiéster entre el RNA "cebador" y los desoxirribonucleótidos trifosfato.

Para estudiar con mayor detalle la función de la pol III* y de la copol III*, W. Wickner y A. Kornberg (1973) incubaron a la Copol III* con su anticuerpo, la antiCopol III*, y observaron que no ocurría la síntesis del DNA cuando se adicionaban los dNTPs; esto es, que el anticuerpo bloqueaba la formación de algún "complejo de iniciación". Mientras que en ausencia del anticuerpo, la síntesis del DNA procedía rápidamente al adicionar los dNTPs.

Por tanto, Wickner y Kornberg concluyeron que ocurren dos eventos después de la formación del RNA "cebador". a) En el primero, la Copol III* se halla involucrada en la formación de un "complejo de iniciación" junto con el DNA progenitor-RNA cebador y con la pol III*. Para formar al complejo de iniciación se requiere del ATP y del Mg²⁺.

Durante una investigación de la actividad residual de polimerasa en los mutantes de *E. coli* del tipo pol AI (que carecen de la polimerasa I y que fueron descubiertos por P. DeLucia y J. Cairns en 1969), T. Kornberg y M.L. Gelfer, en 1971, pudieron aislar a una fracción enzimática que catalizaba la replicación del DNA in vitro. La nueva polimerasa recibió el nombre de la polimerasa III (pol C) y se demostró que era esencial para la replicación en *E. coli* (M.L. Gelfer et al., 1971; V. Nusslein et al., 1971), aunque no se pudo identificar su función específica.

Pero en 1973, W. Wickner, R. Schekman, K. Geider y A. Kornberg descubrieron una nueva forma de la polimerasa III, a la que llamaron Pol III*, y demostraron que era necesaria para la síntesis in vitro de las formas replicativas de los fagos M13 y ϕ X-174. Además, los investigadores descubrieron que la pol III* requería de otra fracción proteica, la copolimerasa III* (Copol III*), para la replicación in vitro de los fagos M13 y ϕ X-174.

b) y en el segundo, después de formado el "complejo de iniciación", se efectúa la elongación de la cadena del RNA "cebador", mediante la adición de los desoxirribonucleótidos trifosfato, para formar a la nueva cadena de DNA. Este paso es independiente de la Copol III^k y del ATP.

Y al continuar con sus estudios sobre la conversión del DNA circular monofilar del virus M13 hacia la forma replicativa II, la forma dúplex, Kornberg y sus colaboradores descubrieron que un pequeño fragmento de RNA formado por la RNA polimerasa, en presencia de una proteína desenrollante de E. coli, era extendido por el sistema de la DNA pol III^k in vitro (W. Wickner, R. Schekman, K. Geider y A. Kornberg, 1973). En vista de que las otras dos polimerasas, la pol I y la pol II, no se hallan presentes en el complejo de iniciación, y ya que la Copol III^k se disocia una vez formado el complejo de iniciación; y debido a que la DNA pol III puede catalizar la síntesis del DNA in vitro a una velocidad cercana a la de la replicación in vivo (T. Kornberg y M.L. Gelfer, 1972; B. Otto et al., 1973), Kornberg concluyó que una vez iniciada la elongación, la DNA pol III cataliza la elongación posterior -en la dirección 5'-3'-, hasta que se adicionan alrededor de 500 a 1000 desoxirribonucleótidos al RNA "cebador", para formar a los fragmentos de DNA 10S. A los cuales se conoce con el nombre de los fragmentos de Okazaki, (K. Geider y A. Kornberg, 1974).

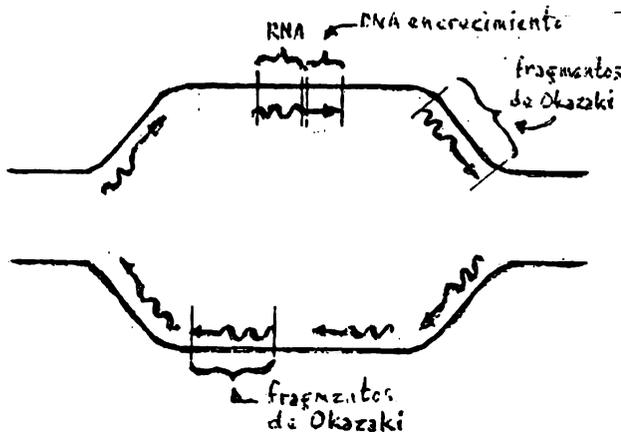
De manera similar a los estudios de T. Kornberg y M.L. Gelfer (1971), Cozzarelli y sus colaboradores investigaron la actividad residual de polimerasa en mutantes de B. subtilis del tipo pol A, y pudieron aislar a una enzima con todas las características de la DNA pol III de E. coli, a la cual designaron como la DNA pol III (K.B. Gass et al., 1971 y 1973; K.B. Gass y N.R. Cozzarelli, 1973).

Así mismo, los investigadores demostraron que la DNA pol III era inhibida específicamente por la hidroxifenil-hidrazinopirimidina (HPUra) (K.B. Gass et al. 1973) y esto fue confirmado también por J.M. Mackenzie et al. (1973), lo cual sugirió claramente que la DNA pol III era una enzima esencial para la replicación en B. subtilis.

En estudios genéticos posteriores, N.R. Cozzarelli y R.L. Low (1973) descubrieron que los mutantes de B. subtilis resistentes a la HPUra contenían una DNA pol III resistente a tal droga; y al tratar a las células con tolueno, éstas aún podían efectuar la replicación resistente a la droga. Por otra parte, de los estudios con mutantes de B. subtilis del tipo pol C (que carecen de la DNA pol III) y que exhiben un aumento en la velocidad de mutación, se han obtenido evidencias adicionales que muestran claramente la participación directa de la DNA pol III de B. subtilis en la replicación.

La formación de los fragmentos de Okazaki.— Una vez que se demostró que cada ciclo de replicación en el fago M13 era iniciado por el RNA, aún permanecía sin explicar otro tipo de iniciación: la replicación discontinua en E. coli, iniciada por los llamados "fragmentos de Okazaki".

Pero en 1972, A. Sugino, S. Hirose y R. Okazaki pudieron demostrar que la replicación discontinua del DNA en E. coli también era iniciada por el RNA, y que los fragmentos de Okazaki contenían RNA unido covalentemente al DNA. Es decir, que los fragmentos de Okazaki se formaban mediante la prolongación de pequeñas cadenas de RNA durante el crecimiento de la horquilla de replicación.



Esquema que muestra la formación de los fragmentos de Okazaki durante la replicación discontinua en E. coli.

Para hacer su demostración, Sugino, Hirose y Okazaki, recurrieron al procedimiento de marcar al DNA con timina triada mediante impulsos breves y después de desnaturalizar al DNA con calor, formamida o formaldehído caliente, sometieron al DNA monofilar al equilibrio de sedimentación por medio de la centrifugación en $CsSO_4$.

Los investigadores observaron que los fragmentos nacientes del DNA eran más densos que el DNA normal utilizado como control y que al tratar con álcalis o RNA-asa, con lo cual se remueve al RNA unido covalentemente, esta diferencia desaparecía. Y volvía a observarse cuando se sometía a sonicación a los fragmentos nacientes del DNA.

Se concluyó que el aumento en la densidad se debía a la presencia de pequeños fragmentos de RNA unidos covalentemente al DNA naciente. Al variar el periodo de marcado por impulsos, aparecieron pequeñas cadenas de DNA (los fragmentos de Okazaki), el DNA 10S, formadas por alargamiento de los fragmentos del DNA naciente. Y, puesto que no se pudo detectar al RNA con periodos de impulsos ligeramente mayores, se concluyó que la formación y eliminación del RNA "cebador" debe ser un proceso rápido; y que el RNA se elimina antes de que se unan los fragmentos de Okazaki. Se estimó que el tamaño del RNA "cebador" estaría entre unos 50 a 100 nucleótidos.

Como era de esperarse, la formación del RNA cebador era resistente a la rifampicina y, por tanto, el RNA cebador puede ser sintetizado por la RNA polimerasa clásica la cual se volvería resistente a la rifampicina al formar parte del complejo de replicación; o, tal vez, por una nueva RNA polimerasa resistente a la rifampicina.

Para investigar la posible participación de las piezas nacientes de RNA-DNA durante la elongación de la horquilla de replicación, A. Sugino y R. Okazaki -- (1973) decidieron utilizar el método de las células tratadas con tolueno desarrollado por R.E. Moses y C.C. Richardson (1970) y ampliado por T. Matsushita et al. (1971).

Las células tratadas con tolueno al 1% pueden incorporar a los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) al DNA, en presencia del Mg^{2+} y de altas concentraciones de ATP; y después de someter a marcado con dBrUTP durante 60 min. (transferencia de densidad) y a centrifugación con CsCl, se obtienen picos de densidad que corresponden a los híbridos RNA-DNA formados durante la replicación semiconservadora del DNA. Y ya que la síntesis del DNA en este sistema sólo procede a alrededor del 7% de la velocidad in vivo, esto resulta en una replicación muy lenta. Y, mediante este procedimiento, Sugino y Okazaki pudieron aislar a los fragmentos RNA-DNA formados durante la elongación de la horquilla de replicación.

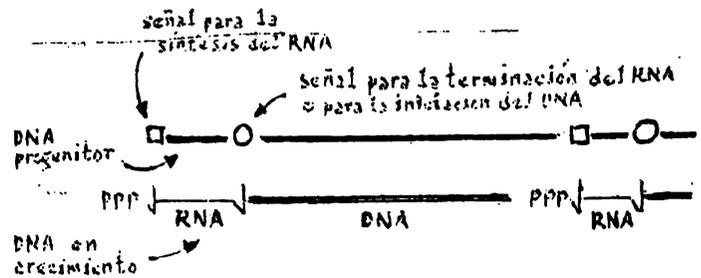
Para estudiar la transferencia del P^{32} de los dNTPs- $(\alpha\text{-}P^{32})$ marcados hacia los ribonucleótidos del RNA, Sugino y Okazaki sometieron a hidrólisis alcalina a los enlaces fosfodiéster de los fragmentos RNA-DNA obtenidos después de la replicación semiconservadora.

Después de lo cual, los investigadores pudieron demostrar que la estructura del enlace covalente formado entre el RNA y el DNA era del tipo $P(rPy)P(rA)P(rU \text{ ó } rC)P(dG)P$. Sugino y Okazaki sugirieron que esta secuencia podría servir como una señal de terminación para la síntesis del RNA o de iniciación para la síntesis de los fragmentos de Okazaki, los fragmentos de DNA los.

W. Wickner et al. (1972) así como R. Schekman et al. (1972) demostraron que en el fago $\phi 13$ el punto de unión entre el RNA y el DNA contiene AMP principalmente; en tanto que en el virus $\phi X-174$, se hallan presentes los cuatro rNMPs en el punto de unión. En otros virus, como el de la micloblastosis, la unión es del tipo $(rU)P(dG)$ ó $(rA)P(dA)$ como lo demostraron R.M. Flugel y R.D. Wells (1972). Aunque también se conocen puentes de unión del tipo $\dots P(rPy)P(dG)P \dots$ (S. Hirose et al., 1973).

Estos resultados permitieron comprobar la participación del mecanismo discontinuo durante la replicación semiconservadora del DNA tal como lo había propuesto Okazaki (K. Sakabe y R. Okazaki, 1966; R. Okazaki, 1968). El mecanismo discontinuo parece hallarse ampliamente distribuido pues se ha detectado la presencia de las piezas de Okazaki en las células de los procariotas como *E. coli* (K. Sakabe y R. Okazaki, 1966), *B. subtilis* (M. Oishi, 1968), y el fago T4 (H. Sugino y R. Okazaki, 1972).

Y también en las células de varios eucariotas como el hígado regenerante de rata (K. Tsukada et al., 1968; H. Berger Jr. y J.L. Irvin, 1970), las células del hígado chino (J.M. Taylor y P. Miner, 1968; E.K. Schandl y J.H. Taylor, 1969), las células cancerígenas del ratón (M. Hyodo et al., 1970), las células con tumores de Ehrlich y de Krebs-2 (C. Paolletti et al., 1967; S. Sato et al., 1972), en las células HeLa (A.G. Lewis et al., 1967; J.F. Haugener et al., 1969 y 1970) y

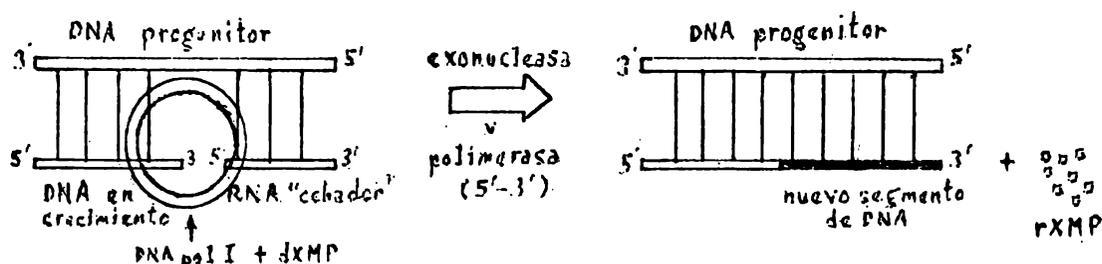


Esquema en el que se muestra la posible función de los enlaces RNA-DNA como señales para la terminación del RNA o de iniciación para el DNA.

en los núcleos aislados de tales células (W.R. Kidwell y G.C. Mueller, 1969), en las células humanas EUE heteroploides (F. Nuzzo et al., 1970) y en los linfocitos humanos (R.M. Fox et al., 1973).

c) La terminación de la replicación del DNA.— Formados los fragmentos de Okazaki, la síntesis discontinua del DNA procede en la dirección 5'-3' hasta que la DNA pol III encuentra al término 5' del fragmento adyacente; y, en vista de que el producto final no contiene RNA, debe eliminarse al RNA "cebador" del término 5' antes de que continúe la replicación.

Durante una investigación de la actividad enzimática en los mutantes del tipo pol A (que carecen de la DNA pol I), I.R. Lehman y J.R. Chien (1973) detectaron una actividad casi normal de DNA pol I asociada a una función de exonucleasa 5'-3' en todos los mutantes. Mientras que Arthur Kornberg y sus colaboradores, durante sus estudios sobre la conversión in vitro de la forma replicativa II -- (RF II) de los fagos ϕ X-174 ó M13 hacia la forma replicativa I (RF I) estable a los álcalis, descubrieron que la "hendidura" en la hebra sintética del DNA dúplex circular formado por el sistema (la forma replicativa II) podía ser eliminada por la acción conjunta de la DNA pol I y de la ligasa de *E. coli*. Lo cual no ocurría al emplear a la DNA polimerasa del fago T4, que carece de la actividad de exonucleasa 5'-3' (W. Wickner et al., 1972; O. Westergaard, O. Brutlag y A. Kornberg, 1973).



La actividad de exonucleasa 5'-3' y de polimerasa 5'-3' de la DNA polimerasa I de *E. coli*. La eliminación del RNA "cebador" se efectúa mediante un mecanismo similar al de la traslación de "hendiduras" por la acción 5'-3' de exonucleasa de la DNA pol I; y la actividad de polimerasa "cierra" las "hendiduras" del DNA en crecimiento.

Por tanto, Kornberg y sus colaboradores concluyeron que el RNA "cebador" podía ser eliminado de la cadena del DNA sintetizado, mediante la actividad de exonucleasa 5'-3' de la DNA pol I. Y, que tal actividad de exonucleasa de la DNA pol I era acompañada por la actividad polimerizante de la misma enzima, en la dirección 5'-3', con lo que el resultado final de esta actividad dual de la DNA polimerasa sería semejante al mecanismo para la traslación de "hendiduras" en las cadenas del DNA, descubierto tiempo atrás por el grupo de Kornberg (R.B. Kelly et al., 1969 y 1970; A. Kornberg, 1969).

Estas conclusiones confirmaron los experimentos de P.L. Kuempel y G.E. Voornatt (1970) y de R. Okazaki et al., (1971) quienes observaron la acumulación de fragmentos de Okazaki en los mutantes del tipo pol A, debido al cerramiento muy

lenta de las "hendiduras" entre los fragmentos de DNA, por la falta de la actividad polimerizante de la DNA pol. I. De lo que habían concluido que la actividad polimerizante de la DNA pol. I, se requería durante el último paso de la elongación para cerrar las "hendiduras" entre los fragmentos de Okazaki.

En 1974, E.B. Tenrad e I.R. Lehman aislaron a un nuevo mutante de E. coli, el mutante k-12 polAex1, que exhibía una actividad polimerizante pero sólo un 2% de la actividad normal de exonucleasa 5'-3' aunque, de manera similar a los mutantes del tipo pol A, también acumulaba fragmentos de Okazaki. Pero a diferencia de tales mutantes, las cepas eran letales y no crecían a una temperatura de 43°C; en tanto que, al revertir a los mutantes hacia el fenotipo normal, recuperaban su actividad normal de exonucleasa 5'-3'. Estos resultados confirmaron las conclusiones de Kornberg y sus colaboradores, pues demostraron que la actividad de exonucleasa 5'-3' de la DNA pol. I es esencial para la replicación de E. coli.

Aunque, S.C. Weatherford et al. (1972) y C.M. Henry et al. (1973) aislaron a una RNA-asa de E. coli que actúa únicamente sobre el RNA unido al DNA progenitor y tal enzima ha recibido el nombre de RNA-asa H ó "hibridasa". Y se han obtenido enzimas similares del timo de ternera (H. Stein y P. Hausen, 1969 y - 1970), de las células humanas KB (K. Dolling et al., 1971), del embrión de pollo (V. Keller, 1972), del cirus de la mieloblastosis (W. Keller y R. Crouch, 1972) y del virus asociado de Sjus (D. Baltimore y D.F. Smolc, 1972). Por lo tanto, parece ser que hay dos enzimas en E. coli que pueden eliminar el RNA "cebador", la DNA pol. I y la RNA-asa H.

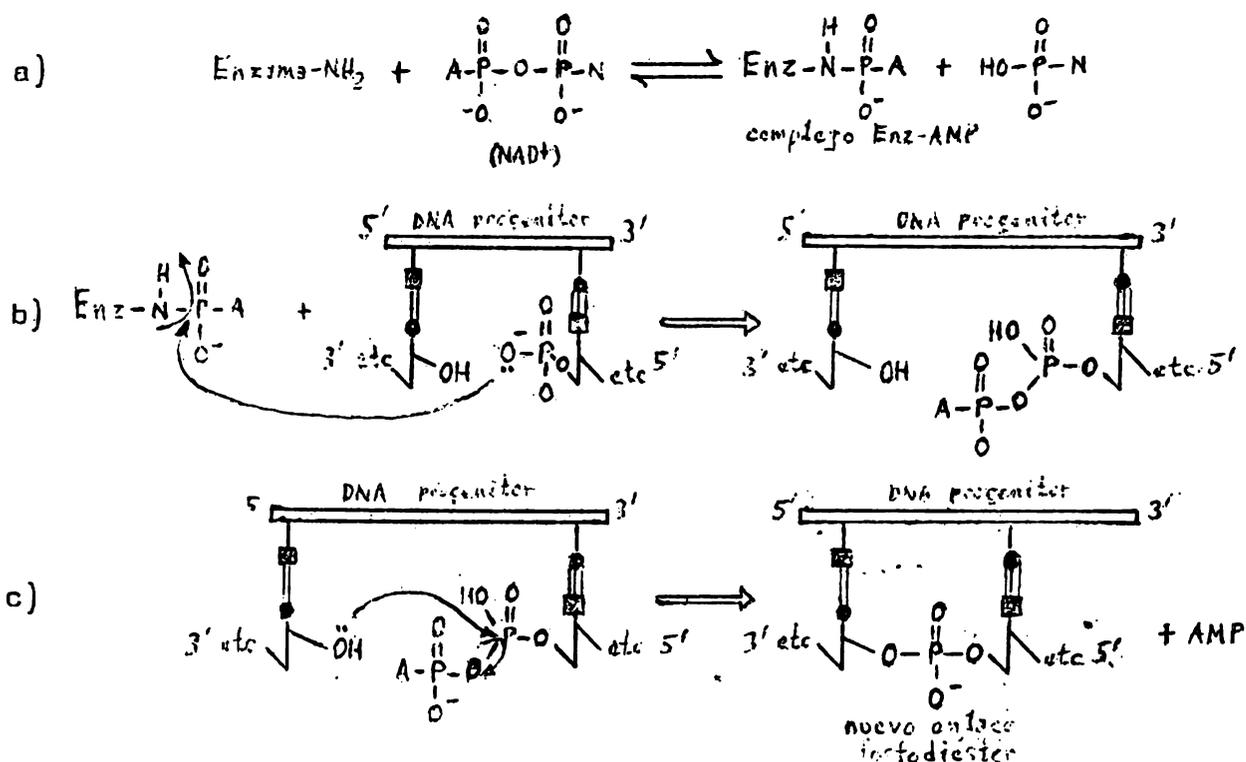
Resumiendo, durante la elongación el RNA "cebador" que sirvió para iniciar la formación de los fragmentos de Okazaki debe ser eliminado. Así que, la DNA pol. I, y probablemente la RNA-asa H, asume esta función; y una vez que se ha eliminado al RNA "cebador", la DNA pol. I continúa elongando los fragmentos de Okazaki en la dirección 5'-3' hasta que encuentra al RNA "cebador" del siguiente fragmento, y después de eliminarlo, lo reemplaza por el DNA mediante el mecanismo similar al de la traslación de "hendiduras".

En 1968, C. Pauling y L. Hamm aislaron a un mutante del tipo TAU de E. coli, el llamado mutante ts-7, y observaron que tal mutante exhibía el doble de sensibilidad a la radiación UV a 40°C, con respecto a la que presentaba a 27°C. Además, a los 40°C se acumulaban pequeños fragmentos de DNA, lo cual sugería la posible inactivación de la DNA ligasa. Y en 1971, P. Modrich e I.R. Lehman demostraron que los mutantes ts-7 efectivamente contenían una ligasa sensible a la temperatura. Por otra parte, M. Gellert y M.L. Bullock (1970) habían aislado a varios mutantes que exhibían una actividad residual de DNA ligasa y observaron que tales organismos no podían mantener el crecimiento del fago T4 (deficiente en ligasa). En estos mutantes no se acumulaban los fragmentos de Okazaki (en contraste con los mutantes ts-7) debido a que su actividad residual de ligasa, del 2-10%, aún podía "sellar" durante la replicación del DNA. Otros mutantes aislados posteriormente, con una actividad residual menor al 1%, exhibían a 42°C una disminución de 5 a 10 veces en su capacidad para "sellar" al DNA, pero aún podían desarrollarse normalmente a esa temperatura.

Estos resultados sugirieron claramente que la actividad de la DNA ligasa era esencial durante la replicación y junto con las observaciones obtenidas por Kornberg y sus colaboradores, durante los estudios sobre la conversión entre las formas replicativas de los fagos ϕ X-174 y M13 (W. Wickner et al., 1972; O. - Westergaard et al., 1973), permitieron elucidar el mecanismo para la terminación de la replicación.

Y así, conforme se aproximan una a otra las horquillas de replicación, alrededor del minuto 27 del mapa genético, el número de enlaces de hidrógeno entre las hebras progenitoras de DNA es insuficiente para mantenerlas unidas y se separan, quizás con la ayuda de una endonucleasa o de la proteína omega. Entonces, las hebras hijas del DNA recién sintetizadas son "selladas" por la DNA ligasa que forma un enlace fosfodiéster entre los términos 3'-OH y 5'-monofosfato de los extremos de las cadenas, después de que se ha eliminado al RNA "cebador".

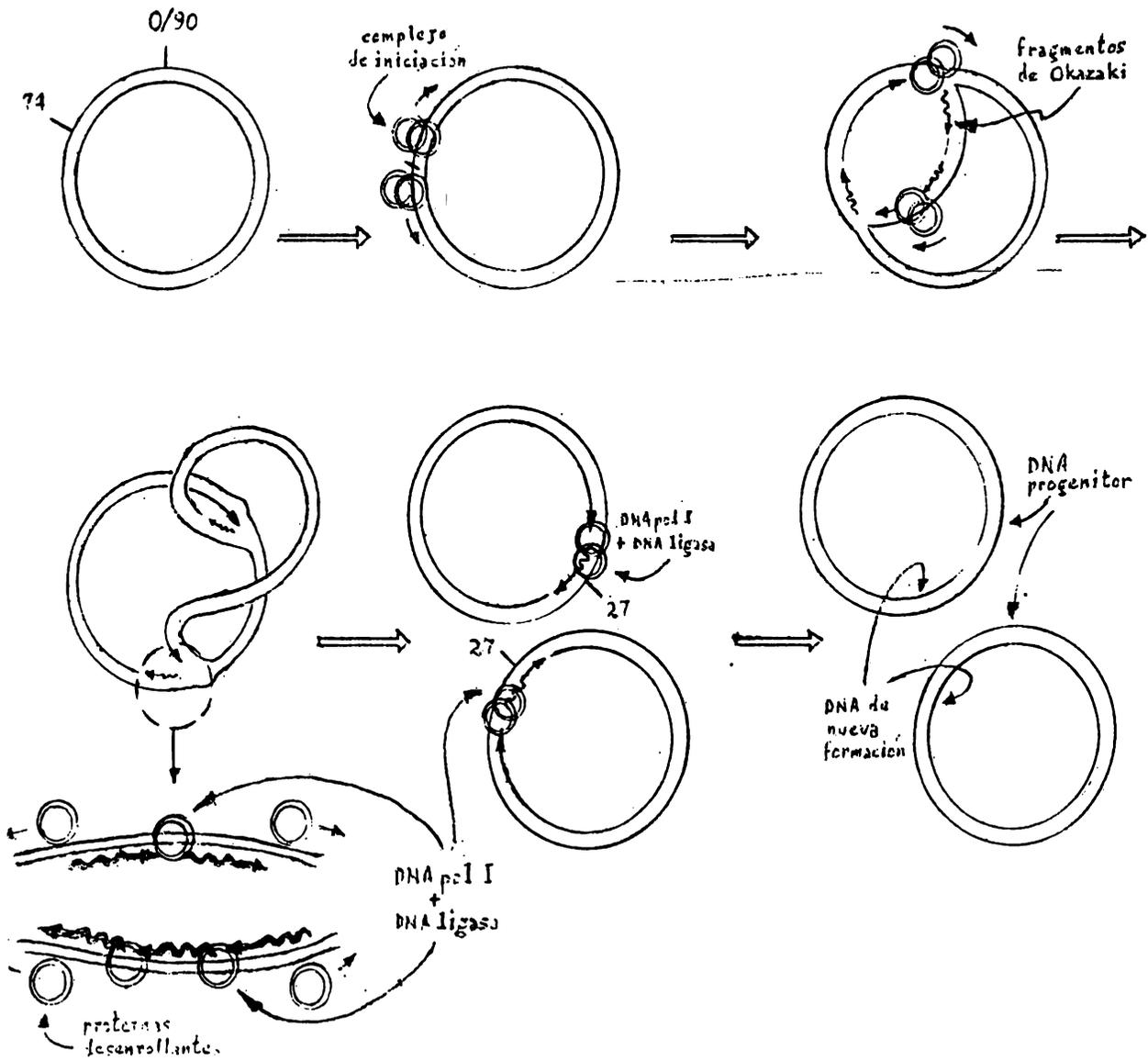
El mecanismo de reacción para la DNA ligasa involucra tres pasos. a) En el primero, la DNA ligasa se une con el cofactor NAD^+ para formar un complejo Enzima-AMP (J.W. Little et al., 1967; B.M. Olivera et al., 1968). b) En el segundo paso, el AMP del complejo es transferido hacia el grupo 5'-fosfato del DNA (B.M. Olivera et al., 1968) y c) En el tercer paso, se forma el enlace fosfodiéster entre el término 3'-OH y el grupo 5'-fosfato, mediante la eliminación del AMP, con lo cual queda "sellado" el DNA sintetizado.



El mecanismo de "sellado" de la DNA ligasa al término de la replicación del DNA en E. coli.

Por lo tanto, en espera de que las futuras investigaciones permitan ampliar la información con respecto a cada uno de los pasos individuales involucrados en las distintas etapas de la replicación; los conocimientos actuales sobre la

replicación del DNA en E. coli pueden resumirse de la manera siguiente.



B. BIOSINTESIS DEL RNA.

1) Introducción.

Como se ha visto, la información genética para el desarrollo y funciones de los distintos organismos se halla codificada en forma de las secuencias lineales de desoxirribonucleótidos que constituyen a las cadenas del DNA. Y, por tanto, la transcripción de la secuencia informativa del DNA viene a ser la primera etapa del proceso para la expresión del gene.

Los productos de la transcripción del DNA son largas cadenas de ribonucleótidos que vienen a formar a los llamados ácidos ribonucleicos (RNA) y, durante el proceso de la transcripción, el DNA es utilizado como patrón para formar a las secuencias complementarias de ribonucleótidos del RNA. Y así, de la transcripción de ciertas secuencias de desoxirribonucleótidos se forma el RNA de transferencia (tRNA) y de otras, el RNA ribosomal (rRNA). Mientras que la transcripción de secuencias especiales conduce a la formación del RNA mensajero -- (mRNA) el cual es portador de una secuencia de ribonucleótidos que es traducida posteriormente hacia un nuevo tipo de secuencia, la secuencia aminoácida de las proteínas necesarias para las distintas funciones celulares.

Y el conjunto de investigaciones que permitieron conocer la estructura general para el proceso de la transcripción son las siguientes.

2) Las primeras investigaciones.— Como en otros campos del metabolismo, la introducción de los métodos isotópicos al estudio de las vías metabólicas aportó los primeros datos sobre el origen de los átomos del entonces llamado ácido pentosanucleico (PNA) y que hoy se conoce como el ácido ribonucleico (RNA).

Y así durante las investigaciones de S.S. Furst y col. (1950) sobre el recambio metabólico de los ácidos nucleicos, en las cuales se administró adenina- N^{15} marcada a las ratas, se observó que la marca se incorporaba principalmente a la adenina y a la guanina del RNA del hígado y, en menor grado, a las purinas del RNA intestinal. En tanto que el DNA de los tejidos sólo contenía muy pequeñas cantidades de marca; de lo cual se concluyó que el RNA se renovaba mucho más rápidamente que el DNA. E. Hammarsten y G. Hevesy (1946) así como J.N. Davidson et al. (1951) obtuvieron conclusiones similares al estudiar la velocidad de incorporación del P^{32} administrado en forma de fosfato inorgánico.

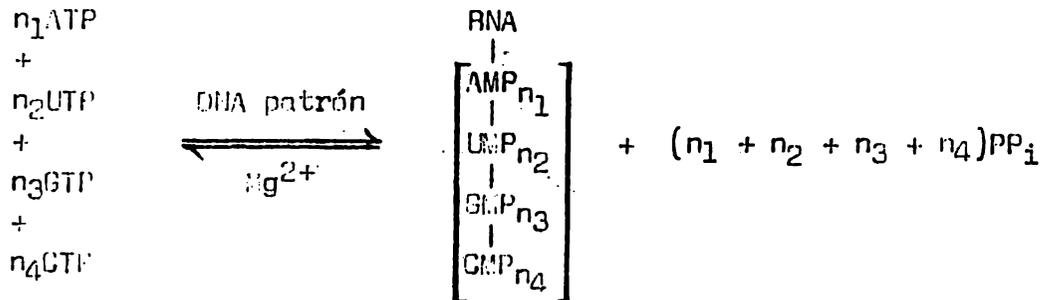
K. Moldave y C. Heidelberger (1954), después de administrar fosfato- P^{32} marcado, ác. orótico- C^{14} y glicina- C^{14} a las ratas, encontraron que el patrón de marcado del fosfato y de las pirimidinas del RNA del hígado no era uniforme, en contra de lo que ocurría con el DNA. Por otra parte, se descubrió que no obstante que el RNA de los tejidos animales parecía hallarse en un estado dinámico, las células bacterianas como las de E. coli, cultivadas en presencia de P^{32} , no mostraban ningún recambio aparente puesto que la marca se retenía tanto en el RNA como en el DNA (L. Siminovitch y A.F. Graham, 1956).

Ya durante los estudios citológicos pioneros de J. Brachet (1941) y de T. Caspersson (1941) se había observado una correlación entre la intensidad de

la síntesis de proteínas y el contenido de ácido ribonucleico (RNA) en una gran variedad de células.

Pero las primeras evidencias sobre la existencia de una enzima capaz de sintetizar al RNA a partir de sus cuatro ribonucleótidos constituyentes, surgieron a principios de la década de los sesentas (1960s) de los trabajos de tres grupos de investigadores. S.B. Weiss y L. Gladstone (1959 y 1960), utilizando células hepáticas de rata, y J. Hurwitz et al. (1960) así como A. Stevens (1960), a partir de extractos de E. coli, de manera independiente pudieron aislar a tal enzima.

Los investigadores, después de incubar a los extractos celulares con una mezcla de los cuatro ribonucleótidos trifosfato (rNTPs) - uno de los cuales se marcaba con C^{14} ó con P^{32} en el fosfato alfa-, observaron que la marca se incorporaba a un compuesto polimérico insoluble en ácido al cual identificaron como el RNA después de someterlo a distintos tratamientos de tipo físico, químico o enzimático. Tales pruebas incluyeron el tratamiento con RNA-asa o con fosfodiesterasa de serpiente, las cuales degradaban al compuesto sintetizado pero no al DNA; mientras que la hidrólisis alcalina rendía a los cuatro ribonucleótidos trifosfato. Por otra parte, la omisión de alguno de los rNTPs o la ausencia del Mg^{2+} ó del Mg^{2+} , así como el tratamiento previo de los extractos con DNA-asa, limitaban seriamente la acción de la enzima polimerizante que recibió el nombre de RNA-polimerasa. La reacción catalizada por la RNA-polimerasa es la siguiente:

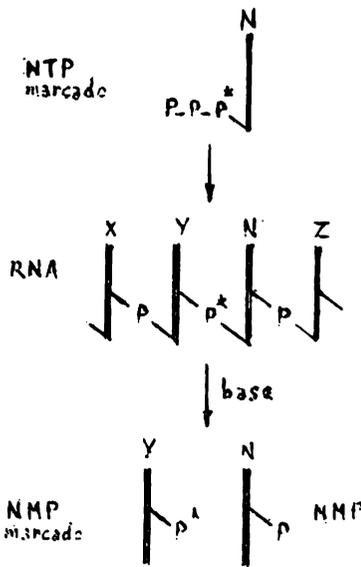


Al continuar las investigaciones sobre la enzima, se probaron distintos tipos de DNA como patrón para el proceso de transcripción, entre los que estaban el poli(dT), poli-d(A-T), el DNA del fago T2, DNA del timo, DNA de E. coli, DNA de micrococcus así como DNA monofilar y DNA dúplex del fago ϕ X-174 y se encontró que la relación entre las bases del RNA sintetizado era muy semejante a la que existía entre las bases de los distintos DNAs utilizados como patrones (J.J. Furth et al., 1961; S.B. Weiss y T. Nakamoto, 1961; A. Stevens, 1961).

Se observó además que cuando se empleaba al poli(dT) como molde, únicamente se requería del ATP y el producto resultante era un híbrido del tipo $(dT)_n - (rA)_n$ (J.J. Furth et al., 1961); en tanto que si el molde era el polímero d(A-T), se requería del ATP y del UTP y el producto contenía secuencias alternadas de AMP y UMP (M. Chamberlin et al., 1963). Estos resultados demostraron claramente que el DNA utilizado como patrón, determina la composición de bases del RNA sintetizado.

Por otra parte, al utilizar el análisis de la frecuencia de bases por el método del vecino más próximo, que consiste en degradar al RNA formado con álcali de manera que el fosfato interno de uno de los rNTPs, marcado con P^{32} , se encuen

tre unido a la molécula del nucleósido más próximo, que puede contener a cualquiera de las cuatro bases, y a continuación se separa a los cuatro ribonucleósidos monofosfato-3' ó -2'.



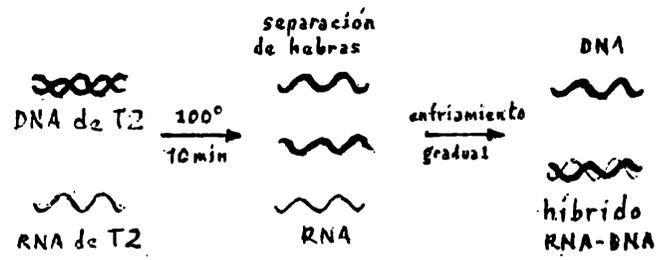
Análisis de la frecuencia de bases por el método del vecino más próximo.

Determinando la actividad de éstos últimos, se obtiene una medida de la frecuencia relativa con la que un nucleótido dado aparece junto a cierto vecino en la cadena del RNA; y después de repetir el proceso para cada uno de los rNTPs marcados, se obtiene la frecuencia de las 16 combinaciones posibles de vecinos más próximos, S.B. Weiss y T. Nakamoto (1961) así como J. Hurwitz et al. (1962) hallaron que había una correspondencia muy grande entre los valores de las frecuencias obtenidas para el RNA con los valores conocidos de las frecuencias del DNA patrón.

Por tanto, los investigadores concluyeron que el DNA patrón no solamente determina la secuencia de bases del RNA sintetizado sino que, además, el RNA es una réplica de las hebras del DNA patrón.

Mientras que E.P. Geiduschek, T. Nakamoto y S.B. Weiss (1961), utilizando la técnica de la hibridación molecular, pudieron sintetizar RNA radiactivo in vitro empleando como patrón al DNA del fago T2. Aislado al RNA sintetizado mediante gradientes de CsCl, la adicionaron más DNA del fago T2; y calentando la mezcla a 100° durante 10 minutos, para provocar la separación de las hebras del DNA, sometieron a la preparación a enfriamiento gradual y, finalmente, la equilibraron a 40° durante 12 hrs.

Transcurrido ese tiempo, las determinaciones de la densidad óptica y de la radiactividad mostraron claramente la formación de un híbrido entre el RNA y el DNA, el cual era resistente a la acción de la RNA-asa. Estos resultados mostraron sin lugar a dudas, que el RNA sintetizado por el sistema tenía una secuencia de bases precisamente complementaria a la del DNA utilizado como patrón.



La formación de los híbridos RNA-DNA, que permitió demostrar la secuencia complementaria del RNA

Se ha detectado la presencia de la síntesis del RNA, que utiliza al DNA como patrón, en varios tejidos animales (I.H. Goldberg, 1961; R.L. Hancock et al., 1962; J.J. Furth y P. Loh, 1963; R.M.S. Smellie, 1963; S.S. Debnv et al., 1964; P.L. Ballard y H.G. Williams-Ashman, 1964 y 1965; J. Gorski, 1964; P. Chambon et al., 1965; M. Ramuz et al., 1965; M.S. Jurkowitz et al., 1965); en tejidos de plantas (R.C. Huang et al., 1960; J. Bonner et al., 1961; J.T.O. Kirk, 1964) y en varios microorganismos (P.J. Ortiz et al., 1960; A. Stevens, 1960; S. Ochoa et al., 1961; M. Chamberlin y P. Berg, 1962; T. Nakamoto et al., 1964).

3) La RNA polimerasa. Aunque la RNA-polimerasa es una de las enzimas más ampliamente estudiadas, actualmente no se ha determinado su estructura por completo ni se conocen en detalle las funciones específicas de cada una de sus componentes. Pero se sabe que la RNA polimerasa de E. coli, como la de otros organismos, cataliza la síntesis neta del RNA que posee secuencias de bases complementarias a una de las cadenas del DNA que sirve como patrón.

La enzima se ha obtenido en distintos grados de pureza y utilizando diversos métodos de preparación, y las primeras micrografías electrónicas indicaron la presencia de varias subunidades componentes (W. Doerfler et al., 1962; E. Fuchs et al., 1964; A.J.E. Colvill et al., 1966; A. Stevens et al., 1966).

Pronto se descubrió que la enzima podía disociarse en sus subunidades componentes mediante el tratamiento con agentes desnaturizantes como los detergentes, dodecilsulfato de sodio (SDS), la urea 8 M o el hidrocloreuro de guanidina (W. Zillig et al., 1966; A. Ishihama et al., 1967; G. Walter et al., 1968; R.R. Burgess, 1968 y 1969). Y empleando la electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían SDS o urea 8 M, o bien utilizando hojas de acetato de celulosa y urea 8 M, R.R. Burgess (1969), G. Walter et al. (1968) así como V.S. Sethi y W. Zillig (1970) pudieron separar a las distintas subunidades de la enzima e identificaron a las siguientes componentes :

una cadena β' (165 000)
 una cadena β (155 000)
 dos cadenas α (39 000)
 y una cadena del factor sigma σ (95 000)

Y R.R. Burgess (1969), utilizando la cromatografía por filtración de geles en columnas de Sephadex G-200 equilibradas con SDS al 1%, descubrió que se podía separar al factor sigma (σ) de las otras subunidades, las cuales constituyen el llamado "núcleo" de la enzima y determinó que su relación estequiométrica era $2\beta\beta'$.

Y así, las investigaciones posteriores han permitido conocer de manera muy general las funciones específicas de algunas de las subunidades de la RNA-polimerasa.

β . Estudiando el efecto sobre la polimerasa de las mutaciones inducidas con distintas drogas, e identificando a la subunidad mutante y correlacionándola con la función alterada, A.A. Travers y R.R. Burgess así como E. Di Mauro et al. (1969) encontraron que el sitio de acción de las drogas se encontraba en el "núcleo" de la enzima; mientras que D. Rabussay y W. Zillig (1969) y A. Heil y W. Zillig (1970) estudiando la movilidad electroforética de las subunidades y reconstituyendo a la enzima a partir de sus componentes, concluyeron que la subunidad β es el componente que se halla involucrado en la inhibición de la RNA polimerasa por la rifampicina y otras drogas como la estreptolidigina.

β' . Con el objeto de determinar cuál de las subunidades de la RNA polimerasa es la que se une al DNA durante la transcripción, R.R. Burgess (1969) sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida a una mezcla constituida por la enzima, RNA ó DNA y urea 8 M, y determinó que únicamente las subunidades β' , β y sigma se unían a las cadenas de polinucleótidos; mientras que las subunidades α

y α migraban normalmente a través del medio.

Y al continuar con esta investigación, W. Zillig et al. (1970) y E.K.F. Bautz et al. (1970) trataron a la enzima con un exceso de DNA y sometieron a la mezcla resultante a cromatografía en columna de fosfocelulosa, después de lo cual observaron la formación de agregados del tipo $\alpha_2\beta\beta'$ en el efluente de la columna así como en el líquido sobrenadante después de un periodo de reposo. De lo que concluyeron que la enzima se disociaba en varios tipos de agregados, algunos de los cuales contenían a la subunidad β , mientras que otros contenían a la subunidad β' , unida a la fosfocelulosa o, probablemente, al DNA retenido por la columna. Y al utilizar membranas filtrantes y condiciones no desnaturilizantes para separar a las subunidades y determinar su capacidad para unirse al DNA, V.S. Sethi, W. Zillig y H. Bauer (1970) encontraron que únicamente la subunidad β' se unía de manera eficiente al DNA, lo cual no ocurría con los demás componentes. De manera que, los investigadores concluyeron que la subunidad β' es la que se une al DNA durante el proceso de la transcripción.

σ .- Como lo demostraron los trabajos iniciales de R.R. Burgess (1969) sobre la RNA-polimerasa, la holoenzima se podía disociar en dos componentes principales, el factor sigma (σ) y el llamado "núcleo" de la enzima ($\alpha_2\beta\beta'$). Y posteriormente, Richard R. Burgess (1969) mediante centrifugación en gradientes de densidad pudo obtener al factor sigma en forma pura.

Estudiando la posible función del factor sigma, Richard R. Burgess (1969 y 1970), R.B. Khesin et al. (1969) así como D. Berg et al. (1969) encontraron que el "núcleo" de la enzima contenía el sitio catalítico para la síntesis del RNA pero que su capacidad para transcribir al DNA era muy baja; mientras que, después de adicionar al factor sigma que no posee actividad catalítica por sí mismo, se restauraba la habilidad del "núcleo" y se estimulaba la transcripción del RNA. Pero como lo demostraron R.R. Burgess y A.A. Travers (1969 y 1970) el estímulo sobre la transcripción se debía a un aumento en el número de cadenas de RNA sintetizadas y no a un incremento en la velocidad de elongación. Se concluyó además que el factor sigma funciona de manera catalítica, actuando sobre sitios específicos del DNA durante la iniciación, y que se disocia para ser reciclado una vez que se ha iniciado la transcripción (R.R. Burgess et al., 1969; D. Berg et al., 1969; J.S. Krakow y K. von der Helm, 1970).

Estas observaciones fueron confirmadas por E.K.F. Bautz et al. (1969) quienes determinaron que en ausencia del factor sigma, el "núcleo" de la enzima transcribía a las dos cadenas del DNA patrón y que la iniciación no era específica; mientras que al adicionar al factor sigma se estimulaba la transcripción y únicamente se transcribía a una de las cadenas del DNA (transcripción asimétrica) y, además, la iniciación era específica.

J.S. Krakow y sus colaboradores observaron que la holoenzima se disociaba en presencia de cadenas monofilares de polinucleótidos y concluyeron que la aparición de las cadenas del RNA, una vez que se ha iniciado la transcripción, es lo que conduce a la disociación del factor sigma (J.S. Krakow et al., 1969; J.S. Krakow y E. Frank, 1969; J.S. Krakow y K. von der Helm, 1970).

En tanto que, M. Sugiura et al. (1970) descubrieron que al utilizar DNA dúplex como patrón para la transcripción, el RNA sintetizado por la enzima comple-

ta ($\alpha_2\beta\beta'$) sólo formaba un híbrido RNA-DNA con una de las cadenas del DNA. Mientras que el producto sintetizado por el "núcleo" de la enzima ($\alpha_2\beta\beta'$) formaba híbridos con las dos cadenas del DNA y la secuencia de iniciación era distinta en cada producto.

R.O. Hall et al. (1969), utilizando DNA del virus T4, y W.C. Sommers et al. (1969), con el DNA del virus T7, obtuvieron conclusiones similares y demostraron que en presencia del factor sigma, la síntesis del RNA se hallaba restringida a sitios específicos de las cadenas del DNA; y que en ausencia de tal factor, la transcripción se iniciaba en todas las regiones del genoma.

ρ .- En 1969, J.W. Roberts aisló de *E. coli* a una proteína tetramérica (P.M. 200 000) que promovía la terminación específica del RNA, y demostró que tal proteína disminuía la síntesis del RNA, liberando pequeñas cadenas del mismo, pero sin afectar la iniciación de las cadenas. Esto fue confirmado por A.R. Goldberg (1970), T. Okamoto et al. (1970) y por R.L. Millette y C.D. Trotter (1970) quienes descubrieron que la supresión de la síntesis neta del RNA consiste en una disminución del tamaño de las cadenas pero que la iniciación y la propagación no son afectadas.

Mientras que los estudios in vitro utilizando DNAs de distintos fagos, como el lambda (J.W. Roberts, 1969), T4 (J.P. Richardson, 1970; H.J. Witner, 1971) y T7 (R.J. Davis y R.J. Hyman, 1970), mostraron que los productos de la transcripción formados en presencia del factor ρ eran muy semejantes a los del proceso in vivo, tanto en tamaño como en propiedades de hibridación.

Y los trabajos de J.L. Darlix, A. Sentenac y P. Fromageot (1971) aportaron evidencias que sugieren que los sitios de terminación específica para la factor ρ corresponden a regiones del DNA en las cuales la holoenzima deja de transcribir debido a la presencia de muy bajas concentraciones de sustrato. Por lo cual se ha sugerido que la RNA polimerasa detiene la transcripción, respondiendo a ciertas secuencias del DNA patrón, cuando disminuye el nivel de sustratos y que, en presencia del factor ρ , esto conduce a la terminación del proceso y a la liberación de las cadenas del RNA sintetizado.

4) Etapas para la síntesis del RNA.

Por tanto, los conocimientos actuales sobre las etapas implicadas en la bio síntesis del RNA, que depende del DNA, se pueden resumir de la manera siguiente (R. G. Curran, 1971; F. Chamberlín, 1970 y 1974) :

a) Unión al DNA patrón.- En esta primera etapa del proceso de la transcripción, la holoenzima de la RNA-polimerasa se une al DNA patrón, localiza al sitio específico para la iniciación y se convierte en la forma enzimática activa.

b) Iniciación de la cadena del RNA.- A continuación la enzima cataliza el acoplamiento del ATP o del GTP con otro ribonucleótido trifosfato para formar un dinucleótido del tipo pppPupX, el cual permanece unido al complejo de la RNA o 1-DNA durante la transcripción.

c) Elongación de la cadena del RNA.- Esta etapa procede mediante la adición sucesiva de ribonucleótidos monofosfato al término 3'-OH del dinucleótido inicial.

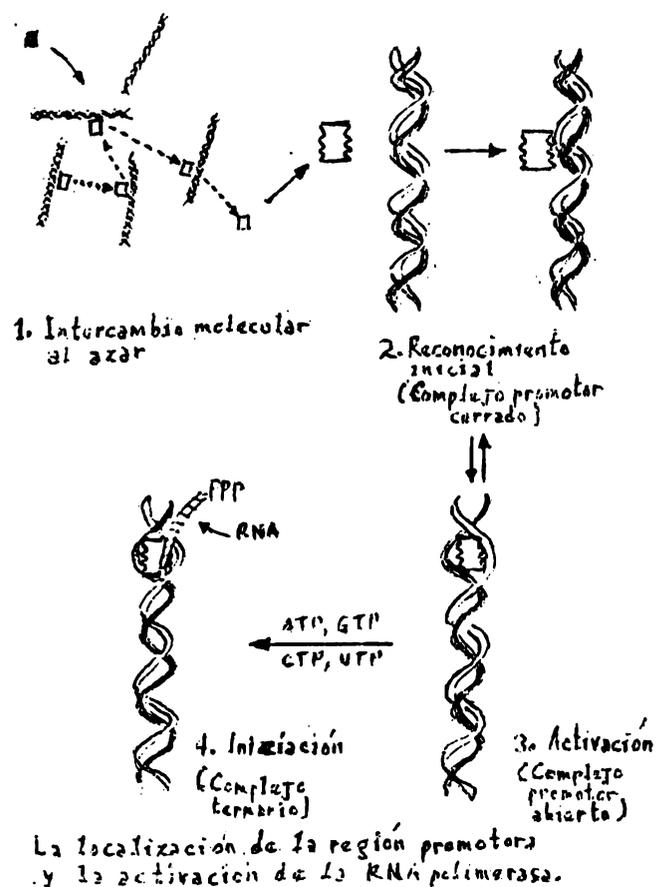
d) Terminación de la cadena del RNA.- Y el proceso de la transcripción termina cuando se separan la cadena del RNA recién sintetizado y la RNA polimerasa de la cadena del DNA patrón.

A continuación, se expondrá en forma concisa lo que se sabe sobre cada una de las etapas de la transcripción del DNA; en espera de que las futuras investigaciones permitan ampliar los conocimientos actuales.

a) Unión al DNA patrón. A diferencia de la DNA-polimerasa que necesita de un "patrón-cebador" para efectuar sus funciones, la holoenzima de la RNA polimerasa únicamente requiere de un "patrón", el DNA dúplex, y la transcripción se inicia en sitios específicos de la cadena del DNA llamados regiones "promotoras".

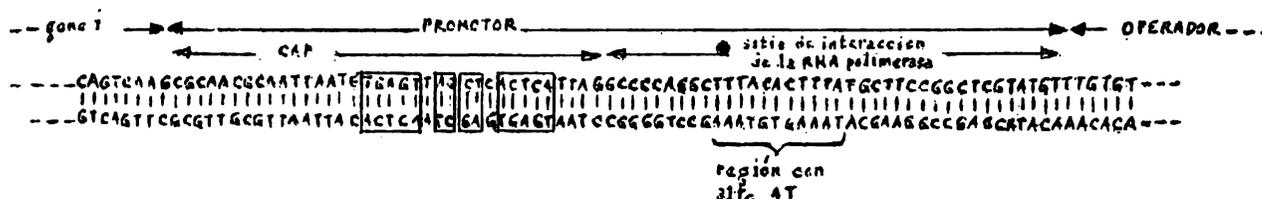
M. Zillig y sus colaboradores propusieron un modelo para explicar este proceso (F. Chamberlín, 1974). Y así, después de una serie de interacciones al azar entre la RNA polimerasa y el DNA patrón, la holoenzima "reconoce" a una secuencia específica de bases dentro de la región "promotora", y se une al DNA en esta región (G. Walter, M. Zillig, P. Palm y E. Fuchs, 1967).

Durante el proceso de unión, alrededor de 6 a 10 pares de bases se separan, mediante una "fusión" localizada en las cadenas del DNA (M. Gilbert y A. Maxam, 1973), para formar un "complejo abierto" entre la RNA pol y el DNA, con lo cual la holoenzima puede seleccionar a la hebra adecuada del DNA patrón para iniciar la transcripción asimétrica de una sola hebra (A. Travers, 1974).



Mientras que, K. Mueller (1971) así como D. Hinkle y M. Chamberlin (1974) han propuesto que el factor sigma (σ) promueve la unión específica de la RNA polimerasa con el DNA dúplex y que, además, contribuye a la formación del complejo RNA pol-DNA disminuyendo la velocidad de disociación de tal complejo. Y una vez formado el complejo promotor cerrado, el factor sigma (σ) colabora en la formación del complejo promotor abierto. Como lo sugirieron D. Hinkle et al. (1972), el factor sigma (σ), así mismo, evita que el núcleo de la enzima forme cadenas de RNA en regiones del DNA abiertas al azar, con lo cual promueve una iniciación es pecífica.

Y como consecuencia de las funciones del factor sigma (σ), y de las demás subunidades, se ha concluido que la holoenzima de la RNA polimerasa debe experimentar varios cambios en su conformación, durante todo el proceso de la transcripción (D. Hinkle y M. Chamberlin, 1972).



Esquema que muestra el sitio de interacción de la RNA polimerasa, así como la secuencia de bases de la región promotora del operador lac de *E. coli*.

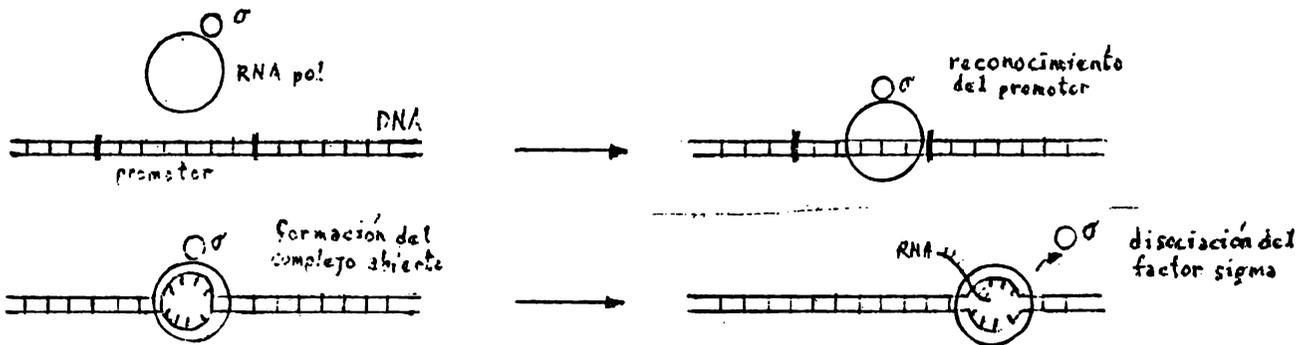
En tanto que los estudios sobre las funciones regulatorias del operador lac de *E. coli*, han permitido determinar la secuencia de nucleótidos involucrada en la región promotora; así como el sitio de interacción de la RNA polimerasa, en segmentos con alto contenido de enlaces A-T, dentro de la región promotora (J. Beckwith et al., 1972; W. Gilbert y A. Maxam, 1973; R.C. Dickson et al., 1975).

b) Iniciación de la cadena del RNA. En el paso siguiente, una vez que ha ocurrido un cambio conformacional en la región promotora del DNA y que se ha formado el complejo abierto, la holoenzima inicia la formación del RNA sobre una de las hebras del DNA patrón (J.M. Saucier y J.C. Wang, 1972).

U. Maitra y J. Hurwitz (1966) observaron que el extremo 5' de muchos RNAs se halla formado por la terminación pppA ó pppG; mientras que los estudios sobre la inhibición de la transcripción habiend demostrado que la rifampicina y otras drogas se unen específicamente con la subunidad β (H. Heil y W. Zillig, 1970). Por tanto, se concluyó que al iniciarse la transcripción la subunidad β se une al ATP o al GTP para fijar al primer nucleótido de la cadena del RNA, y específicamente al extremo 5' (D.A. Goldthwait et al., 1970).

Después de lo cual, una vez que se ha formado el primer enlace fosfodiéster entre el ATP o el GTP y el siguiente nucleótido especificado por la cadena del DNA, el factor sigma se separa de la holoenzima -disminuyendo la afinidad de la RNA polimerasa hacia el DNA-, de manera que el núcleo de la enzima queda libre para desplazarse a lo largo de la cadena del DNA patrón y puede continuar con la transcripción (A.A. Travers, 1971). O.L. Miller et al. (1970) han permitido visualizar esta secuencia mediante microfografías electrónicas del proceso.

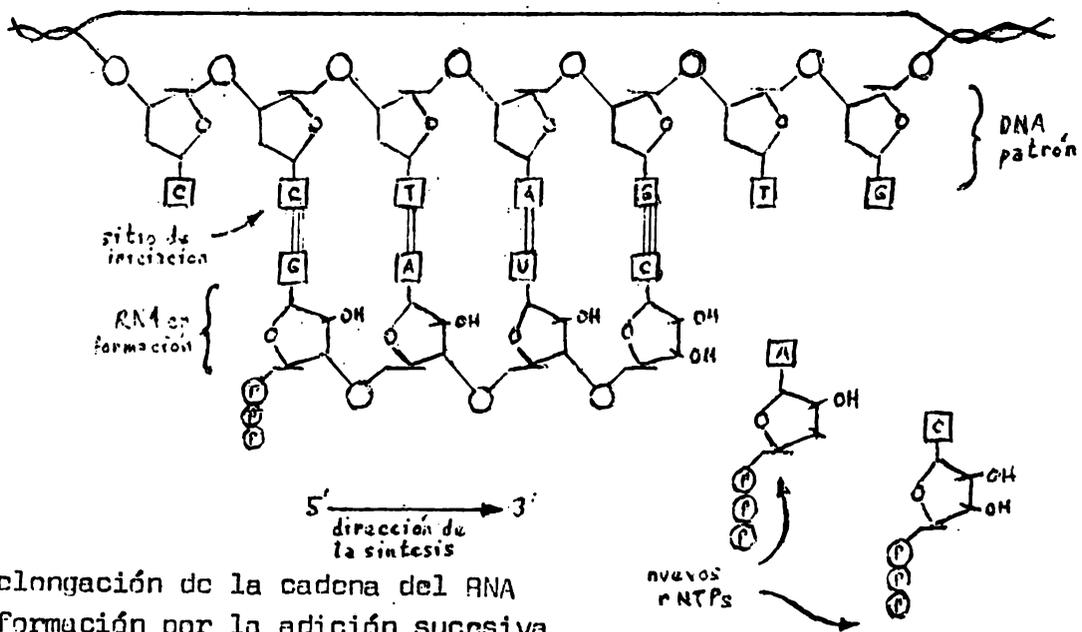
Y, tan pronto como la RNA polimerasa se aparta del sitio de iniciación para seguir adelante con la transcripción, una segunda polimerasa se une a la región promotora para iniciar una nueva transcripción, y el proceso vuelve a repetirse varias veces.



La secuencia de eventos durante la iniciación de la transcripción.

c) Elongación del RNA.

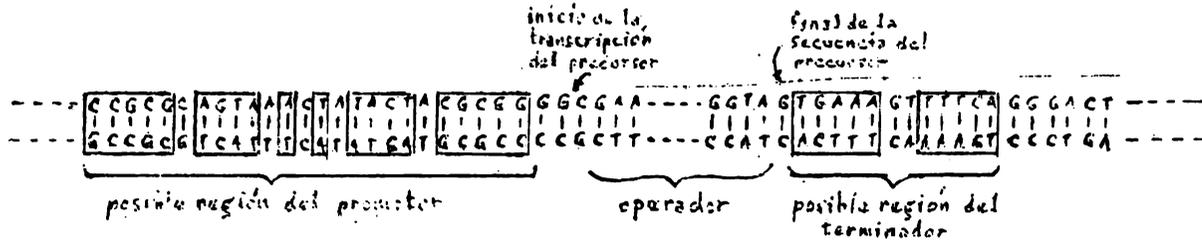
A continuación, la cadena del RNA en formación empieza a crecer mediante la adición de nuevos ribonucleótidos monofosfato al extremo 3'-OH del último ribonucleótido adicionado y la síntesis se efectúa en la dirección 5'-3' (H. Bremer et al., 1965; D.D. Anthony et al., 1966; U. Maitra et al., 1967; G. Walter et al., 1967).



La elongación de la cadena del RNA en formación por la adición sucesiva de nuevos ribonucleótidos monofosfato.

I.H. Goldberg y P.A. Friedman (1971) demostraron que la elongación puede ser inhibida por la actinomicina D, que se une a los residuos de dG del DNA patrón, con lo que impide el desplazamiento del "núcleo" de la RNA polimerasa a lo largo de la cadena del DNA.

d) Terminación de la transcripción. Al final del gen que se ha transcrito existe una secuencia de bases, la región del terminador, que indican el final de la transcripción y es en este momento cuando el factor ρ se une a la RNA polimerasa para bloquear el proceso de transcripción; y entonces, se libera al RNA formado mientras que la RNA polimerasa permanece unida al DNA formando un complejo inactivo (J.W. Roberts, 1969; A. Goldberg, 1970; J. Richardson, 1970; M. Takanami et al., 1971)..



Posible secuencia de nucleótidos de la región terminadora para el gen del tRNA supresor de la tirosina de *E. coli*.

Aunque se conoce poco acerca de la secuencia de bases involucradas en la región del terminador, P.C. Loewen et al. (1974) han podido determinar la posible secuencia de bases de un terminador para el precursor del tRNA supresor de la tirosina en *E. coli*.

La transcripción en las células de los eucariotas.

El proceso de la transcripción en las células de los eucariotas es extremadamente complejo pues el DNA nuclear es muy grande y contiene secuencias de nucleótidos demasiado complejas.

No obstante, se han podido obtener preparaciones solubles de la RNA polimerasa de varias fuentes como son el hígado y los genitales de la rata (P.L. Ballard y H.G. Williams-Ashman, 1966; D.D. Cunningham y D.F. Steiner, 1967), el linfosarcoma bovino (J.J. Furth y P. Ho, 1965) y de los tejidos de distintos mamíferos (B.B. Biswas y R. Abrams, 1962; R.H. Burdon y R.M.S. Smellie, 1962; R. Eason y R.M.S. Smellie, 1965; K. Tsukada e I. Lieberman, 1965; C.C. Widnell y J.R. Tata, 1963).

Mientras que P.G. Roeder y W.J. Rutter (1969) así como S. Liao et al. (1969) a partir de fracciones solubles del hígado pudieron aislar dos tipos de RNA polimerasa. La RNA polimerasa I, asociada al nucleolo, que es la responsable de la síntesis del RNA ribosomal y requiere del Mn^{2+} y del Mg^{2+} . Y la RNA polimerasa II que sintetiza al RNA mensajero, que requiere del Mn^{2+} , y es inhibida por la toxina alfa-amanitina (F. Novello et al., 1970 y 1971; E.A. Zylber y S. Penman, 1971).

Se conocen además otros tipos de polimerasas. La RNA polimerasa III que sintetiza al tRNA y al RNA 5S, y que no es afectada por la alfa-amanitina (P. Price y S. Penman, 1972; S.T. Jacob, 1973). Y la RNA polimerasa IV, asociada a las membranas internas de las mitocondrias, y que se encarga de transcribir al DNA mitocondrial. La enzima se ha obtenido a partir de las levaduras y de *N. Crassa* (A.H. Scragg, 1971; H. Kunztsel y K.P. Schafer, 1971), y del hígado de

rata (C. Saccone et al., 1971). Las dos polimerasas son afectadas por la rifampicina pero no son sensibles a la alfa-amanitina.

e) Modificación de los RNAs sintetizados.

Tanto en las células de los procariotas como en las de los eucariotas, los distintos tipos de RNAs sintetizados por las RNA polimerasas son modificados enzimáticamente antes de que ser liberados como los productos finales mRNA, tRNA y rRNA.

Un primer tipo de modificación de la estructura de los RNAs consiste en la metilación de las bases púricas y pirimídicas de los distintos tipos de RNA; y la reacción es catalizada por las metilasas que promueven la transferencia del grupo metilo de la S-adenosil-metionina hacia los distintos nucleótidos (E. -- Berek y P.R. Srinivasan, 1966). J. Hurwitz, M. Gold y M. Anders (1964) han identificado a cuatro tipos de metilasas en las células de *E. coli*: las adenín-tRNA-metilasas que forman a los derivados 2-metil adenosina, 6-metil adenosina y 6-dimetil adenosina, y las guanín-metilasas que forman derivados como la 1-metil guanosina y la 7-metil guanosina. Mientras que las uracil- y citosín-tRNA metilasas catalizan la alquilación de la posición C-5 de las pirimidinas para formar a la ribotimina y a la 5-metil citosina, respectivamente.

Se han observado actividades enzimáticas similares, que también emplean a la S-adenosil-metionina, en los ribosomas de *E. coli* (P. Thammana y W.A. Held, 1974) y en los ribosomas nucleolares de las células de los mamíferos (L.A. Culp y G.M. Brown, 1970). En tanto que R.H. Burdon y sus colaboradores también han identificado actividades de metilasa en el citoplasma de los eucariotas (R.H. - Burdon et al., 1967).

Por otra parte, las tiolasas promueven la transferencia del átomo de azufre de la L-cisteína hacia algunos tipos de bases para formar a los derivados respectivos. D. Soll (1971) ha estudiado a una enzima de *E. coli* que cataliza la formación in vitro de la 4-tiouridina por sulfuración del uracilo del tRNA. En tanto que H. Edmons y R. Abrams (1960), así como R.H. Burdon (1963) a partir de los núcleos de las células de los mamíferos obtuvieron a una enzima que efectúa la adición de unidades de adenina (alrededor de 200 restos de AMP) al extremo 3' del mRNA; después de lo cual, al ser liberado al citoplasma el mRNA, la cadena 3'-poli A es eliminada.

Otro tipo de modificación enzimática consiste en la reducción del tamaño de los distintos tipos de RNAs, una reacción que se efectúa antes de que tales compuestos sean convertidos en los productos finales rRNA y tRNA.

Y así, las investigaciones iniciales sobre la formación del RNA ribosomal en las células de los eucariotas, utilizando células HeLa, demostraron que los rRNAs son sintetizados en el nucleolo en forma de una gran hebra que sedimenta a 45S en gradientes de sacarosa (S. Penman, 1968; H. Greenberg y S. Penman, 1968; J.E. Darrell, 1968; S. Chaudhuri e I. Lieberman, 1968).

Mientras que los estudios cinéticos, en presencia o ausencia de la actinomicina D, permitieron concluir que el RNA precursor 45S se escinde mediante un proceso de "maduración" para formar al RNA 18S, que es liberado del nucleolo hacia

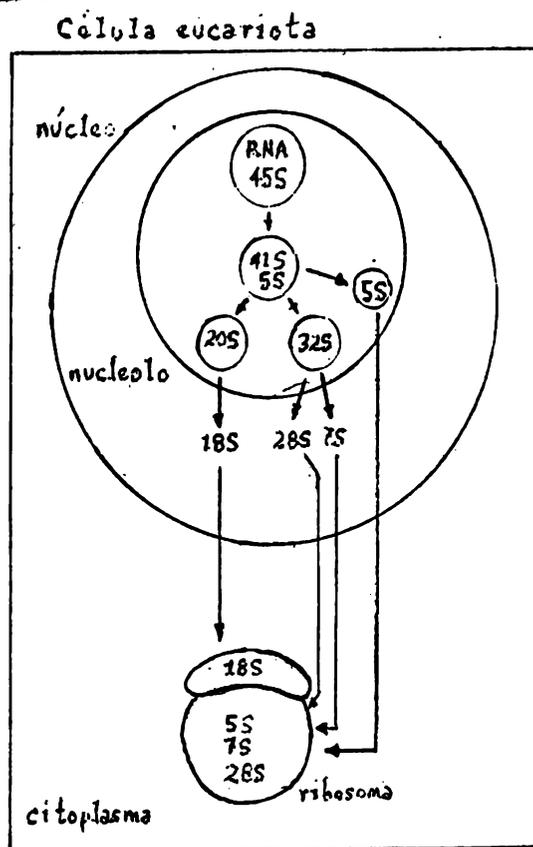
el citoplasma, así como al RNA 32S que es transformado en el núcleo hacia los rRNAs 28S y 7S, antes de salir al citoplasma (J.J. Pene et al., 1968; M. Willems et al., 1968).

Recientemente, C.K. Kuan et al. (1974) han obtenido una preparación enzimática de los núcleos de las células HeLa que probablemente se halla involucrada en el "procesamiento" de los RNAs 45S o del hnRNA. I. Winicov y R.P. Perry (1974) han estudiado a esta enzima aislando a las partículas 80S, precursoras del RNA ribosomal, a partir de los nucleolos de tales células; en tanto que, P.G. Loewen et al. (1974) han investigado la acción de las preparaciones nucleolares sobre los RNAs 45S purificados.

Por otra parte, R.H. Burdon y sus colaboradores han demostrado que en las células de las eucariotas también los tRNAs se producen a partir de precursores de mayor tamaño (A.E. Clason y R.H. Burdon, 1969). Y que tales precursores son sometidos a un proceso de "maduración" que comprende la escisión de la cadena precursora hacia las dimensiones del tRNA; así como la modificación enzimática de ciertas bases del tRNA por medio de una serie de reacciones como la metilación, desaminación, acetilación, reducción, adición de grupos isopentenilo ó -OH o procesos de reordenación (R.H. Burdon y A.E. Clason, 1969; J. Smillie y R.H. Burdon, 1970; R.H. Burdon, 1971).

Se ha observado un proceso de "maduración" similar para el tRNA de los procariontas como *E. coli* (H. Ikeda, 1971; S. Altman, 1971; S. Altman y J.D. Smith, 1971). Mientras que S. Altman y H.D. Robertson (1973) han aislado de *E. coli* a una enzima, la RNA-asa II, que "procesa" a los RNAs ribosomales intermedios de *E. coli*, las formas 25S y 17.5S, hacia los productos finales 23S y 16S. Tal enzima también puede actuar como exonucleasa, degradando al fragmento 5' terminal del precursor del tRNA de la tirosina.

S. Altman y H.D. Robertson (1973) también obtuvieron a partir de *E. coli* a dos endonucleasas, la RNA-asa y la RNA-asa III. La RNA-asa P se localiza en los ribosomas y promueve la eliminación de una cadena de 41 nucleótidos extra que se hallan unidos al precursor del tRNA. Mientras que la RNA-asa III participa durante el "procesamiento" del precursor del RNA ribosomal, para convertirlo hacia las formas intermedias, rRNA 25S y rRNA 17.5S. (N. Nickolaev et al., 1974). J.J. Dunn y F.W. Studier (1973) han sugerido que posiblemente esta enzima también se halla involucrada en la formación del mRNA en las células de *E. coli* infectadas por el fago T7.



El proceso de "maduración" del RNA ribosomal en las células de las eucariotas.

Capítulo VII

SINTESIS DE PROTEINAS Y CODIGO GENETICO

A. SINTESIS DE PROTEINAS.

La información genética almacenada en forma de la secuencia de nucleótidos que constituyen a cada una de las hebras complementarias del DNA puede ser transcrita, como ya se ha visto, por la RNA-polimerasa hacia la secuencia lineal de ribonucleótidos de que se halla compuesto el mRNA, cuya secuencia de bases es complementaria a una de las cadenas del DNA.

Posteriormente, el mRNA se une a los ribosomas donde el mensaje que porta en forma de su secuencia lineal de ribonucleótidos es traducido y convertido hacia la secuencia lineal de aminoácidos que constituyen a las cadenas polipeptídicas de las distintas proteínas.

En este capítulo se estudiarán la serie de investigaciones y de evidencias experimentales que han permitido identificar al mecanismo general involucrado en la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las proteínas.

1) Los estudios iniciales. Durante sus investigaciones acerca del crecimiento de las plantas K. Linderström-Lang y H. Holter (1932) observaron que durante el brote de los retoños en las matas de avena, la actividad proteolítica de las peptidasas se concentraba muy cerca del punto de crecimiento del coleóptilo. Mientras que J.D. Mounfield (1936 y 1938) halló que también en las semillas de trigo la actividad proteolítica crecía enormemente durante la germinación.

Estas observaciones llevaron a M. Bergmann y J.S. Fruton (1938) a investigar la posible participación de las enzimas proteolíticas como la tripsina, en la síntesis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Para lo cual estudiaron la cinética de la constante de equilibrio para la reacción hidrolítica de un dipéptido como la benzil-L-tirosilglicinamida en presencia de la quimotripsina y hallaron que el proceso inverso, la síntesis del dipéptido a partir de la glicinamida y la benzil-L-tirosina, era factible y que podía obtenerse a la benzil-L-tirosilglicinamida con un rendimiento del 1%; pero el rendimiento podía ser del 65% si se utilizaba a la glicinamida en lugar de la glicinamida, para obtener a la correspondiente benzil-L-tirosilglicinamida. Al continuar con sus investigaciones, M. Bergmann y J.S. Fruton (1944) encontraron que otras proteínas como la papaina, la ficina y la catepsina C también podían catalizar la síntesis de enlaces amídicos como los que se encuentran en las cadenas polipeptídicas de las proteínas.

H.M. Huffman (1942), durante el mismo periodo también estudió la síntesis de los dipéptidos pero desde el punto de vista termodinámico, y pudo determinar los valores del cambio de energía libre de formación a partir de los valores de entalpía y de entropía de los reactivos y productos; sus resultados mostraron claramente que la síntesis de los enlaces peptídicos CO-NH es un proceso de tipo endergónico y que solamente una cantidad muy pequeña del producto de condensación (el dipéptido) se halla en equilibrio con los reactantes.

Y a pesar de que la síntesis de los enlaces peptídicos mediante reacciones

de condensación catalizadas por las proteinasas era muy pequeña en los sistemas *in vitro* utilizados (J.S. Fruton et al., 1951; A. Dobry et al., 1952); H. Barsok (1953) y J.S. Fruton (1954) sugirieron que probablemente en los organismos vivos las proteinasas catalizaban la síntesis de los enlaces peptídicos mediante reacciones de condensación como las estudiadas pero que tales reacciones se hallarían acopladas con procesos que condujeran a la separación, de la mezcla en equilibrio, de los productos sintetizados; lo que podría ocurrir como resultado de la insolubilidad relativa del producto formado, por su participación en otras reacciones metabólicas o por su incorporación a los fluidos circulantes del organismo.

En otra serie de investigaciones se descubrió que las proteinasas como la quimotripsina, tripsina, papaína, ficina y las catpsinas B y C, también eran capaces de efectuar reacciones de transamidación del tipo $\text{RCO-NHR}' + \text{NH}_2\text{X} \rightleftharpoons \text{RCO-NHX} + \text{NH}_2\text{R}'$; y, que en algunos casos, las reacciones de transamidación superaban en rendimiento a las reacciones hidrolíticas catalizadas por las mismas enzimas (R.G. Johnston et al., 1950; M.E. Jones et al., 1952). J.S. Fruton y sus colaboradores (1953) demostraron que las reacciones de transamidación catalizadas por las proteinasas conducían a un alargamiento de las cadenas peptídicas como ocurría en la condensación sucesiva de un dipéptido como la L-alanil-L-fenilalaninamida para producir al hexapéptido correspondiente, en presencia de la catpsina C. Estas observaciones permitieron concluir que las proteinasas también podían catalizar la elongación de las cadenas polipeptídicas *in vivo* a partir de los aminoácidos libres; para lo cual se requeriría que algunos de los enlaces peptídicos CO-NH se formasen de novo mediante reacciones endergónicas acopladas a procesos de tipo exergónica, antes de que las proteinasas efectuaran la elongación de las cadenas polipeptídicas mediante reacciones de transamidación (S.G. Walby y J. Matsen, 1954; K. Blau y S.G. Walby, 1954; J. Durell y J.S. Fruton, 1954).

a) Participación del ATP. En otro campo de investigación, se obtuvieron preparaciones enzimáticas de los tejidos animales como el hígado y el cerebro -- (A. Lajtha et al., 1953) y de las plantas (P.R. Stumpf, 1951) las cuales podían catalizar la síntesis del ácido γ -glutamil-hidroxámico a partir de la glutamina y la hidroxilamina en presencia de los iones Mn^{2+} ó Mg^{2+} ; las enzimas requerían además de la presencia de trazas de ADP y fosfato, aunque no se pudo determinar la función que desempeñaban estos últimos.

En 1949, F. Lipmann había sugerido que la formación de los enlaces peptídicos de las proteínas posiblemente se hallaba acoplada a la escisión de los enlaces pirofosfato del ATP formada durante la degradación de los carbohidratos, y cuya energía estaba disponible para una serie de procesos endergónicos como el de la síntesis de los enlaces peptídicos.

Después que las investigaciones siguientes se centraron en el estudio experimental de esta proposición para lo cual se recurrió al empleo de reacciones "de ida y vuelta" como la síntesis de la glutamina a partir del ácido glutámico y el amoníaco ($\text{ác. glutámico} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{glutamina} + \text{ADP} + \text{P}_i$) con preparaciones enzimáticas obtenidas de tejidos animales como el hígado de pichón, el cerebro de oveja y el de las chicharras (A.H. Elliot, 1953); también, la formación del glutatión a partir del ácido glutámico y la cisteína, utilizando preparaciones enzimáticas obtenidas

nidas de las levaduras y del hígado de pichón (J.E. Snake y K. Bloch, 1952 y 1955; S. Mandales y K. Bloch, 1955). Los resultados obtenidos permitieron demostrar que efectivamente ocurría la escisión de los enlaces pirofosfato del ATP, para formar ADP y P_i , durante la síntesis de los enlaces peptídicos CO-NH.

Mientras que en estudios paralelos, en los cuales se mezclaban preparaciones enzimáticas, varios L-aminoácidos y ATP, se pudo observar la formación de compuestos del tipo α -aminoacil-AMP (aminoacil-adenilatos) y se concluyó que tales derivados del ác. adenílico podrían ser las formas "activadas" de los aminoácidos que actuarían como intermediarios durante la síntesis de los enlaces peptídicos de las proteínas (A. Kowalski et al., 1956; J.A. de-Moss y G.D. Novelli, 1956; M.B. Hoagland et al., 1956).

Y en conjunto, estas investigaciones permitieron deducir que el ATP juega un papel importante durante el proceso que conduce a la síntesis de las proteínas.

b) El recambio de proteínas. Pero un avance realmente significativo en este campo se logró cuando R. Schoenheimer, en 1938, introdujo el empleo de los métodos isotópicos para el estudio de los procesos metabólicos; y en particular, la utilización de aminoácidos marcados para estudiar el metabolismo de las proteínas.

A fines de la década de los treinta (1930s) se aceptaba generalmente en los círculos bioquímicos que el metabolismo de las proteínas podía consistir de dos procesos. En uno de ellos, los aminoácidos que se incorporasen al cuerpo de un animal con un equilibrio de nitrógeno no serían utilizados para la síntesis de las proteínas sino que se metabolizarían, excretándose al nitrógeno en forma de urea principalmente. Este era el llamado metabolismo "exógeno" de las proteínas. Mientras que en el segundo proceso, las proteínas de los tejidos se hallarían sometidas a una constante "utilización y eliminación", lo que conduciría a la excreción urinaria de creatinina y, en menor grado, de ác. úrico. Este proceso constituía el metabolismo "endógeno" de las proteínas. El segundo tipo de metabolismo sería un proceso constante a diferencia del primero, que era variable pues dependía de la dieta.

Así que, para estudiar el metabolismo de las proteínas, R. Schoenheimer administró ác. benzoico y glicina- N^{15} marcada a las ratas y descubrió que el ác. hipúrico excretado por los animales contenía una menor cantidad de isótopo de la esperada. Esta observación sugirió que una parte de la glicina del ác. hipúrico provenía de "otra" fuente distinta del aminoácido; es decir, que desde el punto de vista metabólico, la glicina- N^{15} marcada se había "mezclado" con otra glicina no marcada que se hallaba presente en el cuerpo. Por tanto, resultó obvia que no podía hacerse una separación estricta entre un metabolismo "exógeno" y uno "endógeno" para las proteínas. (R. Schoenheimer, 1938).

En otra serie de experimentos, R. Schoenheimer y sus colaboradores administraron leucina- N^{15} marcada a las ratas adultas, como parte de una dieta que contenía caseína. Se procedió a coleccionar la orina y las heces de los animales, y después de tres días se sacrificó a las ratas. Y también se determinó el contenido de nitrógeno proteico y no proteico de los tejidos. Los resultados permitieron concluir que las proteínas de los tejidos se hallan sometidas a un estado de equilibrio dinámico o de recambio metabólico, puesto que el nitrógeno de la dieta se incorporó en una gran proporción (57.5%) a los tejidos durante el perio-

de de tres días y no se eliminó totalmente.

Por otra parte, los resultados mostraron que los procesos involucrados en la síntesis y degradación de las proteínas ocurren muy rápidamente en el hígado; esto es, que las proteínas del hígado se hallan en un estado de mayor recambio metabólico que las de otros tejidos. Y al determinar la distribución del nitrógeno marcado entre los aminoácidos obtenidos después de hidrolizar a las proteínas del hígado, se encontró que también los aminoácidos se hallan sometidos a un recambio constante (R. Schoenheimer et al., 1939).

Estas observaciones fueron confirmadas posteriormente por varios investigadores quienes, utilizando aminoácidos marcados con ^{35}S o con C^{14} , determinaron que ciertos tejidos como la mucosa intestinal, el hígado, el riñón, el bazo, el páncreas y la médula ósea se marcan mucho más rápidamente que otros tejidos como la piel, el músculo, el cerebro y los eritrocitos (F. Freidberg et al., 1948; D.M. Greenberg y T. Winnick, 1948).

c) Papel de los ribosomas en la síntesis de proteínas. Y la segunda contribución, que resultó ser definitiva, surgió de las investigaciones sobre la incorporación de aminoácidos marcados a preparaciones de tejidos animales.

Como se ha visto, los procesos involucrados en la síntesis de las proteínas ocurren muy rápidamente en las células del hígado, donde las proteínas se hallan sometidas a un elevado recambio metabólico. Por tanto, resultó claro que el tejido ideal para estudiar la biosíntesis de las proteínas era el tejido hepático.

P.C. Zamenick y sus colaboradores (1954) decidieron utilizar esta posibilidad. Y así, después de inyectar a las ratas con aminoácidos- C^{14} marcados, Zamenick y sus colaboradores las sacrificaron y procedieron a extraer los hígados, los sometieron a homogenización y finalmente, a centrifugación diferencial. Los investigadores observaron que si fraccionaban al hígado poco después de la inyección, solamente la fracción microsomal del tejido hepático resultaba marcada. Y obtuvieron resultados similares al incubar preparaciones hepáticas sin células con aminoácidos- C^{14} marcados, ya que después de someter a centrifugación diferencial a la mezcla resultante, se encontró que nuevamente la fracción microsomal se marcaba mucho más rápidamente que otros componentes celulares como los núcleos, las mitocondrias y la fracción sobrenadante. Estos resultados mostraron claramente que los microsomas son el sitio donde se efectúa la síntesis de las proteínas en las células hepáticas y que, posteriormente, las proteínas sintetizadas podrían ser transferidas hacia otros componentes celulares (P.C. Zamenick y E.B. Keller, 1954; J.W. Littlefield, E.B. Keller, J. Gross y P.C. Zamenick, 1955).

Al continuar con sus investigaciones, Zamenick et al. dividieron a los homogenizados hepáticos en las fracciones llamadas nuclear, mitocondrial, microsomal y soluble y decidieron probar distintas combinaciones en su capacidad para incorporar a los aminoácidos- C^{14} marcados a las proteínas. Los resultados demostraron claramente que eran necesarias dos de las fracciones para que ocurriera la incorporación aminoácida: la fracción microsomal y la fracción soluble. Los aminoácidos se incorporaban rápidamente a la primera fracción, mientras que la segunda aportaba ciertos cofactores necesarios para el proceso. Y la fracción mitocondrial podía aportar energía en forma del ATP (E.B. Keller y P.C. Zamenick, 1956).

Y al someter a la fracción microsomal a un ulterior fraccionamiento, se observó que la radiactividad se incorporaba principalmente a unas pequeñas partículas formadas por ribonucleoproteínas (la fracción ribonucleoproteica), las cuales poseían un alto contenido de RNA y la incorporación aminoácida podía ser inhibida tratando a las partículas, que posteriormente se conocieron como ribosomas, con ribonucleasa. Estos resultados sugirieron que también el RNA debía jugar un papel importante en el proceso que conduce a la síntesis de las proteínas. (M.B. Hoagland et al., 1958; P.C. Zamenick, M.L. Stephenson y L.I. Hecht, 1958).

Como se ha visto, los estudios espectrofotométricos de T. Caspersson (1941 y 1950), las investigaciones histoquímicas de J. Brachet (1941 y 1950) y los métodos químicos empleados por J.N. Davidson y G. Wraymouth (1944) ya habían indicado que el RNA se hallaba presente en abundancia durante la síntesis proteica en varios tipos de células. Lo que se había confirmado al tratar con ribonucleasa a distintos tipos de organismos como *S. aureus* (E.F. Gale y J.P. Folkes, 1955 y 1957), *R. megaterium* (O.E. Landmann y S. Spiegelman, 1955), a las amibas y a las raíces de cebolla (J. Brachet, 1954 y 1955), pues se pudo demostrar que la adición de tal enzima detenía o disminuía marcadamente la síntesis de las proteínas; es decir, que la hidrólisis del RNA debía destruir a un componente esencial para la síntesis proteica.

Pronto, varios grupos de investigadores pudieron confirmar que los ribosomas son, en efecto, el sitio donde ocurre la síntesis de las proteínas, y que, además, se requiere la presencia del RNA, el ATP, el Mg^{2+} , de ciertas enzimas activadoras de la fracción soluble y del GTP (M. Rabinowitz y M.E. Olson, 1956; P.W. Campbell et al., 1958; R.B. Roberts et al., 1958; R.S. Schwent et al., 1958; K. McQuillen et al., 1959; K.C. Smith et al., 1959; G. Acs et al., 1959). Por otra parte, se concluyó que la función de los ribosomas, durante la síntesis de las proteínas, sería la de proporcionar "moldes" estables de RNA; tales "moldes" contendrían la información genética necesaria para especificar el arreglo de los distintos aminoácidos, en forma "activada" o unidos a ciertos nucleótidos, de las cadenas polipeptídicas de las proteínas. Es decir, que el RNA ribosomal actuaría como un intermediario para transferir la información genética almacenada en el DNA hacia las cadenas polipeptídicas de las distintas proteínas (R.B. Lofthouse, 1957; M.E. Balis et al., 1958; M. Rabinowitz y M.E. Olson, 1959).

d) "Activación" de los aminoácidos. Ya se ha hecho mención a un descubrimiento de Zamenick y sus colaboradores, quienes observaron que el grupo carboxilo de los distintos aminoácidos era "activado" enzimáticamente en presencia del ATP para formar a unos compuestos del tipo Enzima- α -aminoacil-AMP (M.B. Hoagland et al., 1956).

Casi simultáneamente, varios investigadores confirmaron esta observación y demostraron que efectivamente, en presencia del ATP, cada aminoácido es "activado" por una enzima específica para el mismo; y que, además, la "activación" es un paso previo a la iniciación de la síntesis proteica (P. Berg, 1956; J.A. DeMoss y G.D. Nevelli, 1956; E.W. Davie et al., 1956; V.V. Koningsberger et al., 1957; R.D. Cole et al., 1957; R.S. Schwent y E.H. Allen, 1958; F.M. Bergmann et al., 1958).

Al continuar las investigaciones, Zamenick y sus colaboradores (M.B. Ho-

gländ et al., 1957 y 1958) así como Ogata y sus colaboradores (F. Ogata et al., 1957) hicieron un descubrimiento sumamente importante. Los investigadores encontraron que como un requisito previo a la incorporación de los aminoácidos "activados" a las cadenas polipeptídicas, éstos debían ser transferidos por sus enzimas activadoras hacia unas moléculas de RNA de bajo peso molecular, obtenidas de la llamada fracción soluble. Este tipo especial de RNA recibió el nombre de RNA soluble o sRNA. De inmediato, varios grupos de investigadores reportaron observaciones similares (R.J. Holley, 1957; S.B. Weiss et al., 1958; R.S. Schweet et al., 1958; P. Berg y E.J. Ofengand, 1958).

En adición, Zamenick y sus colaboradores hallaron que las moléculas del sRNA debían poseer ciertas características químicas para poder actuar como acceptoras de los aminoácidos "activados". Y al estudiar en detalle esta observación, encontraron que el GTP y el ATP se unían reversiblemente con el sRNA para formar una secuencia terminal del tipo sRNA-CMP-GMP-AMP, la cual debía estar presente antes de que se unieran los aminoácidos activados (L.I. Hecht et al., 1958 y 1959). Y pronto, H.G. Zachau et al. (1958) demostraron que el grupo carboxilo de los aminoácidos "activados" se esterificaba con los grupos hidroxilo 2' ó 3' de los residuos adenosílicos de la secuencia terminal del sRNA. Este resultado fue confirmado por J. Preiss et al. (1959) quienes después de tratar con ribonucleasa a los complejos C^{14} -leucil- y C^{14} -valil-sRNA, obtenidos de *E. coli*, pudieron aislar a los correspondientes C^{14} -leucil- y C^{14} -valil-AMP derivadas.

Ahora bien, ya que el proceso de unión de los aminoácidos "activados" es terminal y específica, esto permitió concluir que los complejos aminoacil-sRNA eran intermediarios en la síntesis de las proteínas y que, por otra parte, debían existir moléculas distintas y específicas para cada uno de los 20 aminoácidos que se encuentran normalmente en las proteínas (P. Berg y E.J. Ofengand, 1958).

Ya en 1958, F.H.C. Crick había postulado la existencia de intermediarios del tipo aminoacil-sRNA, para poder explicar la manera en que los diferentes aminoácidos pueden hallar su posición correcta sobre el "molde" que especifica la secuencia aminoácida de las proteínas. Y con esta idea, Zamenick y sus colaboradores sugirieron que los distintos tipos de sRNA podrían actuar como moléculas "adaptadoras" para colocar a los diferentes aminoácidos en la posición adecuada; puesto que cada molécula de sRNA posee una secuencia de bases determinada, la que puede interactuar mediante enlaces de hidrógeno, con la secuencia de bases del RNA que actúa como "molde" (H.B. Hoagland, P.C. Zamenick y M.L. Stephenson, 1959).

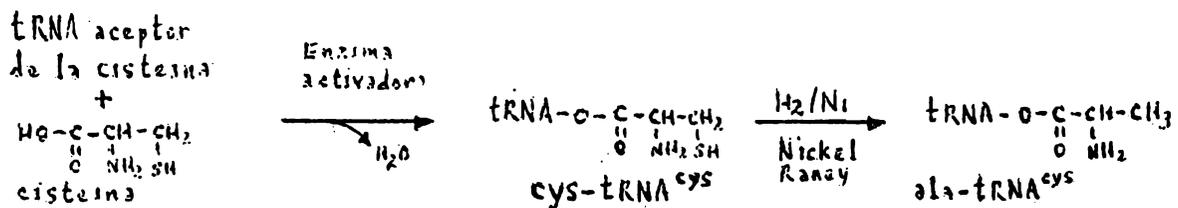
En suma, para que pueda iniciarse la síntesis de las proteínas se requiere del ATP y el GTP (P.C. Zamenick et al., 1958 y 1959), de las enzimas activadoras de los aminoácidos presentes en la fracción soluble (L.G. Grossi y K. Moldavi, 1959; M. Takanami y T. Okamoto, 1960; D. Nathans y F. Lipmann, 1960), de los aminoacil-sRNA y de los ribosomas. Mientras que para la etapa de polimerización surgieron dos posibilidades. Que la polimerización fuese simultánea o que ocurriera en etapas. Y en el segundo caso, los aminoácidos podrían unirse secuencialmente desde un extremo hacia el otro o, quizá, podrían formarse péptidos al azar los que posteriormente se unirían para formar una sola cadena, lo cual parecía menos probable (D. Steinberg et al., 1956; R.B. Loftfield et al., 1960).

2) Los componentes que participan en la síntesis de proteínas.

A continuación se expondrán los conocimientos actuales sobre cada uno de los componentes moleculares involucrados en el proceso que conduce a la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las proteínas.

a) El RNA de transferencia. Como ya se ha visto, para tratar de explicar la manera específica en que la secuencia lineal de nucleótidos del DNA puede ser "traducida" hacia la secuencia lineal de aminoácidos de las cadenas proteicas, F.H.C. Crick (1958) propuso la existencia de una molécula "adaptadora", compuesta de ácido nucleico, la cual podría activar a un cierto aminoácido específico para, posteriormente, ser capaz de "reconocer" las señales codificadas por la secuencia de nucleótidos de la molécula que actúa como "molde" e interaccionar con ellas mediante enlaces de hidrógeno. . .

Y pronto, como ya se indicó, las investigaciones de P.G. Zamenick y sus colaboradores (H.D. Hoagland et al., 1957 y 1958; L.I. Hecht et al., 1958 y 1959), así como las de H. Ogata y sus colaboradores (1957) confirmaron la existencia de tal molécula "adaptadora" en forma del llamado RNA soluble (SRNA), al que posteriormente se le dió el nombre de RNA de transferencia, tRNA. Mientras que los trabajos de otros investigadores como H.G. Zachau et al. (1958), P. Berg y E.J. - Ofengand (1958), J. Preiss et al. (1959) permitieron conocer las características químicas de las moléculas del RNA de transferencia.



La reducción del cisteinil-tRNA^{cys} hacia el alanil-tRNA^{cys}.

Pero fue en 1962, cuando F. Chanville et al., aportaron las pruebas experimentales definitivas que confirmaron la participación del tRNA como una molécula "adaptadora" durante la síntesis de las proteínas. Chanville y sus colaboradores trataron con nickel Raney (H₂/Ni) al grupo -SH del residuo cisteínico del tRNA para la cisteína (cys-tRNA) con el objeto de reducirlo hacia el -H, con lo cual se formó el correspondiente derivado de la alanina, el ala-tRNA^{cys}. Y, después de incubar a este último compuesto con un mRNA sintético, los investigadores observaron la incorporación de la alanina, dirigida por el tRNA^{cys}, en las posiciones que normalmente corresponderían a la cisteína.

Es decir, que el tRNA efectivamente actúa como una molécula "adaptadora" capaz de "leer" el mensaje codificado por la secuencia de nucleótidos del "molde" y, de esa manera, puede colocar al aminoácido correspondiente en la posición adecuada dentro de la cadena polipeptídica en formación. Lo cual indica que, una vez unido al tRNA específico, los aminoácidos son incapaces de dirigir su colocación en la posición que les corresponde de acuerdo con la secuencia especificada por la molécula que actúa como "molde".

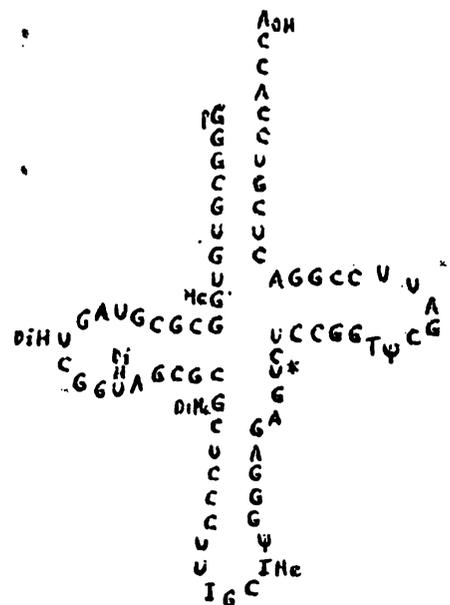
Y aunque inicialmente se pensó que existiría una molécula específica de tRNA para cada uno de los 20 aminoácidos (W.B. Hoagland et al., 1958; P. Berg y E.J. - Oefendorf, 1958; L.I. Hocht et al., 1959; J. Preiss et al., 1959) hubo que modifi car esta idea pues pronto se identificaron diferentes clases de tRNA que podían acti var al mismo aminoácido. P. Berg et al. (1961) estudiando a la enzima acti vadora que une a la metionina con su tRNA, encontraron que había dos enzimas dis tintas que podían activar al mismo aminoácido en E. coli. En tanto que, B.P. - Doctor et al. (1961) al someter al análisis en distribución a contracorriente al tRNA de las levaduras, observaron que los picos correspondientes a la leucina y a la treonina eran heterogéneos. Y en investigaciones posteriores se logró identi ficar al menos cinco tRNAs para la leucina en E. coli (G. Van Ehrenstein y D. -- Oais, 1963; H.U. Blank y D. Sell, 1971), así como cinco tRNAs para la serina en las levaduras (P. Bergquist y J. Robertson, 1965).

La estructura del tRNA.- Ahora bien, para poder explicar la gran especi- ficidad de las enzimas que unen a los aminoácidos "activados" con sus respectivos tRNAs, así como otros hechos derivados de la participación de estos últimos duran- te la síntesis de las proteínas, pronto se comprendió que era necesario determi- nar la estructura de los distintos tRNAs. Y para lograr la elucidación de la es- tructura primaria del tRNA, está claro también, que tal determinación depende del grado de pureza de las muestras utilizadas para tal fin.

Y entre los primeros métodos utilizados para lograr la separación y aisla- miento de los distintos tRNAs en forma pura se encuentran los de distribución a contracorriente (R. Holley et al., 1965), los sistemas de partición líquido-lí- quido (J.X. Thym, 1966), y una serie de procedimientos cromatográficos que han incluido cromatografía en fase inversa en diatomáceas (A.D. Kelmers et al., 1965 y 1966) o en columnas de hidroxapatita (R.L. Pearson y A.D. Kelmers, 1965; K. - Muench y P. Berg, 1966); o bien, separación cromatográfica mediante el empleo de distintas resinas sintéticas como Sephadex G-25 (K. Muench y P. Berg, 1966), DEAE-celulosa y DEAE-Sephadex (J. Cherayil y R. Rock, 1965) ó DEAE-celulosa ben- zoilada (G.B. Tener et al., 1966), las cuales son ampliamente utilizadas en la actualidad.

Y así, en 1965, R. Holley y sus colabora- dores, empleando el método de distribución a contracorriente introducido por ellos mismos, pudieron obtener en forma pura al tRNA especi- fico para la alanina a partir de las levaduras.

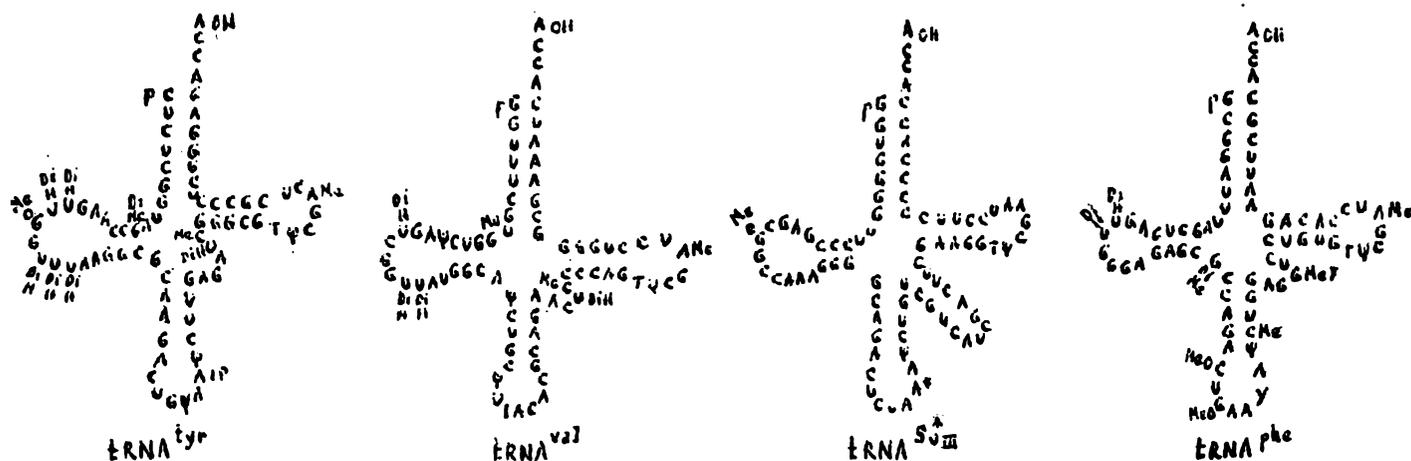
A continuación lo sometieron a hidrólisis con la RNA-asa pancreática y procedieron a de- terminar la secuencia de bases de los pequeños fragmentos resultantes. Y comparando las se- cuencias obtenidas por ese tratamiento, con las resultantes de tratar al tRNA con RNA-asa del fago T-1, que hidroliza al tRNA en grandes fragmentos y que a 0°C divide a la molécula en dos partes, Holley y sus colaboradores logra- ron establecer la estructura primaria del tRNA.



La estructura primaria del tRNA^{ala}

Este resultado, junto con reportes previos acerca de la composición de fragmentos purificados del tRNA de la serina (tRNA^{ser}) publicados por H.G. Zachau y sus colaboradores (D. Duching y H. Zachau, 1964; F. Melchers y H. Zachau, 1964; H. Zachau et al., 1966) iniciaron las investigaciones para tratar de determinar la estructura primaria de distintos tRNAs.

Y recurriendo al empleo de distintos métodos como la desnaturalización térmica (J.R. Fresco et al., 1963; G. Felsenfeld y G.L. Cantoni, 1964), el intercambio de hidrógeno marcado (H^3) entre el tRNA y el H_2O (S.W. Englander y J.J. Englander, 1965), la dispersión óptica rotatoria (J.M. Vournakis y H.A. Scheraga, 1966), difracción de rayos X de ángulo reducido (J.A. Lake y E.L. Beeman, 1967), modificación química (H. Seidel y F. Craver, 1965; S.J. Brastoff y V.M. Ingram, 1967; J.A. Nelson et al., 1967) o digestión parcial con ribonucleasas (H.G. Zachau et al., 1966; D. Boll y G.J. Russell, 1967; D.H. Millar y R.W. Bryne, 1967), se logró determinar la estructura primaria de otros tRNAs.

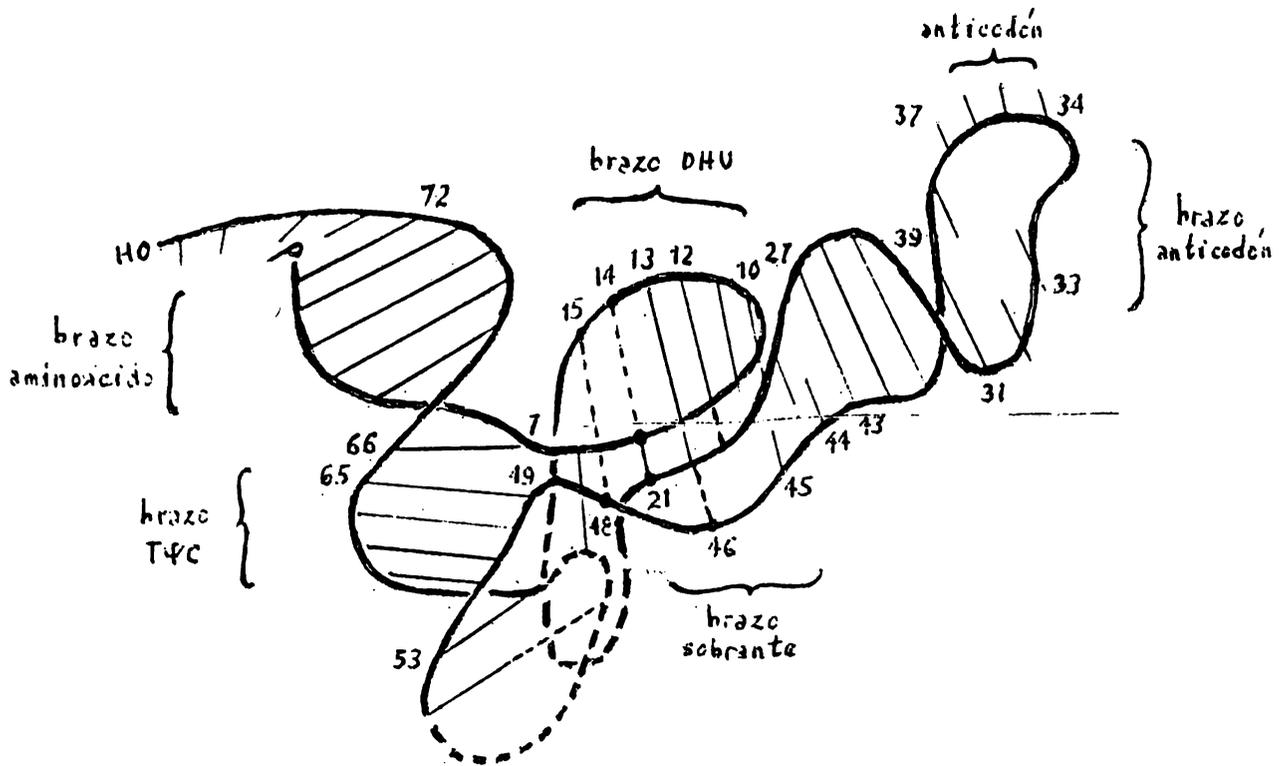


La estructura primaria de algunos tRNAs.

Ahora bien, durante sus investigaciones sobre la desnaturalización del tRNA, con pérdida de la actividad biológica en presencia de agentes quelantes o altas temperaturas, o bien durante la renaturalización del tRNA, con recuperación de la actividad biológica en presencia del Mg^{2+} y temperaturas elevadas, J.R. Fresco y sus colaboradores observaron que los tRNAs biológicamente activos poseían una estructura terciaria definida; y que, no obstante que es posible un gran número de tales estructuras a través de la formación de enlaces de hidrógeno, solamente una de ellas es biológicamente activa.

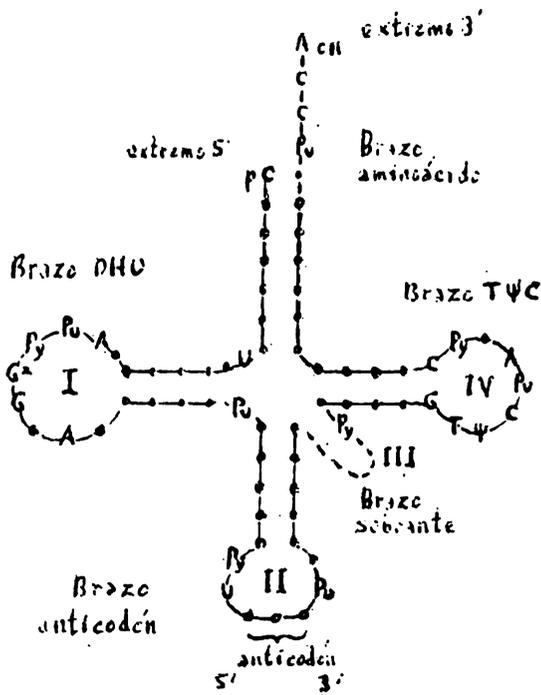
Estos resultados demostraron que no únicamente la secuencia de nucleótidos del tRNA puede determinar las interacciones altamente específicas del mismo con las secuencias correspondientes de las moléculas que actúan como "molde", sino que además, es necesaria una conformación tridimensional específica, la cual se pierde durante el proceso de desnaturalización (J.R. Fresco et al., 1966; T. Lindahl, A. Adams y J.R. Fresco, 1966).

Y utilizando la cristalografía de rayos X, J.D. Roberts et al. (1974) así como S.H. Kim et al. (1974), lograron determinar la estructura terciaria de un tRNA, el tRNA de la fenilalanina. Este resultado, unido a una serie de investigaciones previas, permitió deducir una serie de conclusiones generales sobre la función específica de cada una de las subestructuras de las moléculas del tRNA.



La conformación tridimensional del tRNA para la fenilalanina obtenido a partir de las levaduras (S.H. Kim et al., 1974).

No ha podido establecer una estructura general para los distintos tipos de tRNA a la cual se la conoce comúnmente con el nombre de la configuración de la hoja de trébol; y esta estructura se logra disponiendo las bases de manera que se obtenga el máximo apareamiento entre las mismas. Y de tal estructura, se ha determinado la función específica de cada una de las "brazos" que componen a la molécula del tRNA.



Estructura general de hoja de trébol de los tRNAs.

Y así, se sabe que la secuencia terminal PU-C-G-A del brazo aminoácido es la misma en todos los tipos de tRNA (H.G. Zachau et al., 1958; L.I. Hecht et al., 1958 y 1959). Por otra parte, es común un resto de dihidroxiuridina, DHU, en el brazo número I, y tal brazo posiblemente se halla involucrado en el reconocimiento de la tRNA sintetaso.

En tanto que, el llamado brazo "anti-codón", el brazo número II, contiene un triplete de bases específica y distinto en cada una de las diferentes moléculas de tRNA. Y se ha observado que siempre se halla un nucleótido U del lado 5' del triplete de bases que forman al anticodón, y una purina modificada del lado 3'. La llamada base "vacilante" siempre se halla junto al nucleótido U en el extremo 5'.

Por otra parte, la presencia del triplete T_ΨC siempre es constante en el brazo número IV (A. Zahir, R. Halley y N. Marquisse, 1965), lo cual ha llevado a sugerir que esta secuencia se halla involucrada en la unión del tRNA con la subunidad 50S de los ribosomas, puesto que no tiene relación con los aminoácidos y, además, no depende del mensajero utilizado como "molde" (K. Moldave, 1965).

En suma, los tRNAs tienen tres funciones específicas que son las siguientes:

- a) Reconocer a la aminoacil-tRNA sintetasa específica, que porta al aminoácido "activado" que le corresponde de acuerdo con la secuencia de bases de su "anticodón".
- b) Identificar mediante el triplete de bases de su "anticodón", al "codón" que le corresponde en la secuencia de bases del RNA que actúa como "molde" y unirse a él mediante enlaces de hidrógeno; de manera que el aminoácido que porta pueda colocarse en el lugar adecuado dentro de la secuencia aminoácida de la cadena polipeptídica en formación.
- c) Fijar a las cadenas polipeptídicas en crecimiento a los ribosomas, mientras se efectúa la síntesis de las proteínas.

El RNA de iniciación.— A principios de la década de los sesentas (1960s) varias investigaciones descubrieron que la mayor parte de las proteínas solubles y ribosomales de *E. coli* tenían como grupo amino-terminal; en el 90% de los casos, a la metionina (45%) seguida de alanina, serina y treonina; pero no se le pudo asignar ningún significado a esta distribución terminal de aminoácidos (H.J. Morowitz y R.V. Barra, 1959; J.P. Waller y J.I. Harris, 1961; J.P. Waller, 1963 y 1964).

Y en 1964, K. Marcker y F. Sanger observaron que en las células de *E. coli*, y en los extractos sin células de tales bacterias, el metionil-tRNA era formilado parcialmente para convertirse en el N-formilmetionil-tRNA; este resultado sugirió que podrían existir dos tipos de tRNA específicos para la metionina. Y casi de inmediato, J. Goldstein et al. (1964) así como K. Marcker (1965) pudieron confirmar la existencia de dos tipos de tRNA para la metionina. K. Marcker (1965) demostró que sólo uno de ellas podía ser formilado por una enzima distinta de la enzima activadora de la metionina y que el donador del grupo formilo era el N¹⁰-formil-TH₄-folato; mientras que la formilación se efectúa una vez que se ha formado el metionil-tRNA.

En una serie de experimentos genéticos, R. Webster et al. (1966), así como J. Adams y M. Capocchi (1966), utilizando sistemas sin células de *E. coli* a los cuales se adicionaba RNA de los fagos f2 ó RL7 como mensajeros, hallaron que la secuencia amino-terminal de la cubierta proteica de los fagos en crecimiento era la siguiente N-formil-met-ala-ser-asn-phe-thr; en tanto que, la secuencia terminal en los fagos adultos era ala-ser-asn-phe-thr. Los investigadores concluyeron que esta última secuencia se originaba por la acción de una enzima que podría escindir al residuo N-formil-met de la cadena polipeptídica en crecimiento. Y por otra parte, se concluyó que el N-formil-met actúa como el iniciador de la síntesis proteica en las células de los procariontes como *E. coli*, y que las distintas proteínas se originan por una modificación posterior de las cadenas en crecimiento.

E. Baltus, 1959).

Ahora bien, puesto que el DNA es el portador de la información genética la cual es transmitida del núcleo hacia el citoplasma, y en vista de que el RNA se halla asociado con la síntesis de las proteínas en el citoplasma; se sugirió entonces, que probablemente el ácido ribonucleico podría actuar como "molde" para dirigir la síntesis de las proteínas. Para lo cual, posiblemente se formarían moléculas específicas de RNA en el núcleo, bajo la dirección del DNA, las que posteriormente serían transferidas hacia el citoplasma para dirigir la síntesis proteica (A.L. Dounce, 1952 y 1953; L.S. Lockingen y A.G. DeBusk, 1955; D. Mazia, -- 1956). Y durante cierto tiempo se atribuyó esta función al RNA estable de los ribosomas (R.B. Loftfield, 1957; M.E. Salis et al., 1958; R.B. Roberts et al., - 1958; M. Rabinowitz y F.E. Olson, 1959).

Durante sus primeras investigaciones con distintos microorganismos, Jacques Monod y F. Cohen (1952) descubrieron que algunos de ellos eran capaces de "adaptarse" a la utilización de una o varias sustancias adicionadas al medio de cultivo, formando una enzima (o sistema enzimático) que no era detectable en ausencia de tales sustancias. El fenómeno recibió el nombre de "inducción enzimática" y la sustancia que promueve la aparición de la enzima se conoció como el "inductor" enzimático. Y así, al cultivar células de *E. coli* en un medio al que se adicionaban beta-galactósidos, como la lactosa, ó metil-beta-tiogalactósidos, Jacques Monod (1956) observó que esto conducía a la aparición de la enzima beta-galactosidasa en las células bacterianas. Empleando distintos fagos B. Rotman y S. Spiegelman (1954), así como D.G. Hogness et al. (1955) efectuaron determinaciones similares.

Y al continuar con sus investigaciones Jacques Monod y sus colaboradores hicieron un descubrimiento sumamente importante. Los investigadores encontraron que al transferir una fracción del cromosoma de la cepa bacteriana Hfr que portaba el carácter Lac^+ (es decir, que podía sintetizar a la beta-galactosidasa) hacia el citoplasma de la cepa F^- (Lac^-) incapaz de sintetizar a tal enzima, que es to era seguida por la síntesis inmediata de la beta-galactosidasa en la segunda cepa. Resultó obvio, que la aparición de la enzima después de adicionar al genoma no concordaba con la suposición de que el "molde" que dirige la síntesis de las proteínas se halla presente en el citoplasma en forma de la fracción estable del RNA de los ribosomas (A.B. Pardee, F. Jacob y J. Monod, 1959).

Mientras que al utilizar DNA- P^{32} marcado, los investigadores observaron que el decremento en la velocidad de síntesis de la beta-galactosidasa era semejante a la velocidad de decaimiento del P^{32} marcado del DNA. Esta observación sugirió a Monod y sus colaboradores que en el citoplasma se formaba un tipo especial de RNA que actuaba como "molde" para dirigir la síntesis de las proteínas. Pero, tal tipo de RNA era tan inestable que la síntesis de las proteínas requería de la presencia continua del DNA (M. Riley, A.B. Pardee, F. Jacob y J. Monod, 1960). Esta conclusión estaba en total acuerdo con las observaciones previas de E. Volkin y L. Astrachan (1956) y de E. Volkin et al. (1958) quienes habían detectado la síntesis de un tipo especial de RNA después de que las células de *E. coli* eran infectadas por los fagos; el RNA sintetizado era altamente inestable pero metabólicamente activo.

En conjunto, estas observaciones permitieron concluir que el DNA efectivamente es capaz de sintetizar a un tipo especial de RNA. Y puesto que las células no poseen ningún conocimiento previo sobre la estructura de sus nuevas proteínas, tal clase de RNA debe portar en su secuencia de bases la información genética necesaria para especificar la secuencia aminoácida de las distintas proteínas. En su clásico escrito, en el cual unificaron brillantemente a los experimentos sobre la síntesis del RNA en las células infectadas por fagos con las investigaciones acerca de la inducción y represión enzimáticas, Francis Jacob y Jacques Monod - (1961) predijeron las propiedades generales de este tipo especial de RNA, al cual le dieron el nombre de RNA mensajero ó mRNA.

Evidencias experimentales de la existencia del mRNA.- Pronto, una serie de investigaciones apoyaron la existencia del mRNA y confirmaron su participación como la molécula portadora de la información genética que actúa como "molde" durante la síntesis de las proteínas.

Durante sus investigaciones con células infectadas por fagos E. Volkin y sus colaboradores encontraron que el patrón radiactivo de marcado con P^{32} , obtenido para la secuencia de nucleótidos del RNA sintetizado después de la infección, era muy diferente al patrón que se obtenía para el RNA de la célula huésped; y más aún, la composición de bases del nuevo RNA era muy semejante a la secuencia del DNA del fago infeccioso pero distinta a las secuencias correspondientes al DNA, al RNA ribosomal o al RNA de transferencia de la célula infectada. Es decir, que el RNA sintetizado por las células infectadas pertenecía a un nuevo tipo y que era totalmente distinto a los RNAs que existían previamente en las células bacterianas (E. Volkin et al., 1958; L. Astrachan y E. Volkin, 1958; J.L. Countryman y E. Volkin, 1959). Una observación que fue confirmada por M. Nomura et al. (1960) quienes utilizando centrifugación en gradientes de densidad y electroforesis en geles de almidón, descubrieron que después de que el fago T2 infecta a las células de E. coli, el P^{32} marcado se incorpora rápidamente al RNA que se sintetiza y su secuencia de bases es distinta a los otros tipos de RNA de la célula infectada.

Por otra parte, S. Brenner, F. Jacob y M. Meselson (1961) aportaron nuevas evidencias que vinieron a ser definitivas. Para tratar de determinar en forma precisa si el RNA sintetizado después de que los fagos infectan a las células bacterianas es una sustancia libre que se une a los ribosomas existentes en las células infectadas o bien, si tal RNA forma parte de los ribosomas bacterianos, los investigadores cultivaron células bacterianas en un medio "pesado" que contenía ^{13}C y N^{15} de manera que todos los constituyentes celulares resultaran marcados con tales isótopos.

A continuación, se procedió a transferir a las células bacterianas "pesadas" hacia un nuevo medio que contenía P^{32} -marcado y se les sometió a la infección por los fagos; después de lo cual, las células infectadas fueron transferidas hacia un medio "ligero" que contenía C^{12} y N^{14} y se les permitió desarrollarse de manera que los nuevos componentes celulares sintetizados serían "ligeros", y además, se adicionaron células portadoras. Los ribosomas fueron aislados antes y después de la infección viral, utilizando gradientes de densidad de $CsCl$, y se procedió a determinar a cuáles partículas se hallaba asociado el nuevo RNA sintetizado.

Los resultados mostraron, de manera concluyente, que el nuevo RNA sintetizado, el RNA- P^{32} marcado, se hallaba asociado únicamente a los ribosomas sintetizados antes de la infección de las células bacterianas, los ribosomas "pesados"; mientras que no se pudo detectar a ningún tipo de RNA- P^{32} marcado en los ribosomas "ligeros" sintetizados después de la infección viral. Más aun, los ribosomas "ligeros" de las células portadoras no contenían P^{32} -marcado, lo que indicó que no hay síntesis de ribosomas después de la infección de las células bacterianas. Es decir, que el nuevo RNA sintetizado efectivamente constituye una nueva especie independiente de molécula, la cual puede unirse a los ribosomas para dirigir la síntesis de las proteínas. En adición, se observó que al disminuir la concentración del Mg^{2+} , el RNA- P^{32} marcado podía separarse de las partículas ribosomales.

Se obtuvieron evidencias adicionales de las investigaciones de J. Marmur y sus colaboradores (P. Doty et al., 1960; J. Marmur y D. Lane, 1960), así como de las B.D. Hall y S. Spiegelman (1961), quienes, utilizando células de E. coli infectadas por el fago T2, pudieron demostrar la formación de híbridos del tipo DNA-RNA entre el mRNA sintetizado después de la infección (marcado con P^{32}) y el DNA del fago T2 (marcado con H^3). Mientras que cuando se empleó DNA de otros fagos o bacterias, no se observó la formación de ningún híbrido (J. Marmur et al., 1963; S. Spiegelman y M. Hayashi, 1963). Esto es, que el DNA efectivamente es capaz de sintetizar a un nuevo tipo de RNA, el mRNA, cuya secuencia de bases es complementaria a una de sus cadenas y, por tanto, distinta a la secuencia de bases de los otros tipos de RNA que se hallan presentes en las células antes de que se inicie la síntesis de las proteínas. P.R. Venkataramm y E.L. Cne (1961) pudieron observar también la formación de los híbridos DNA-RNA complementarios en las células de los eucariotas como los núcleos hepáticos de los embriones de pollo; en tanto que J. Sanner et al. (1961) hicieron observaciones similares empleando sistemas embrionarios obtenidos de los chícharos.

Por otra parte, M.W. Nirenberg y J.H. Matthaei (1961) realizaron un gran descubrimiento que vino a confirmar la función específica del mRNA como la molécula que dirige la síntesis de las proteínas, especificando la secuencia aminoácida de sus cadenas polipeptídicas. Empleando un sistema sin células que contenía ribosomas lavados, los investigadores hallaron que al adicionar un polinucleótido sintético como el poli-U se estimulaba la síntesis de los enlaces peptídicos y aumentaba 1000 veces la incorporación de un aminoácido específico, la fenilalanina. Un hecho que no se observó cuando se utilizó al mismo polímero con los demás aminoácidos. Mientras que al probar distintos polímeros como el poli-A, poli-C, poli-I ó poli-A-U (2:1) no ocurrió la incorporación de la fenilalanina. Y los estudios cinéticos y de solubilidad demostraron que el producto sintetizado en presencia del poli-U, era un polipéptido con una secuencia repetida, la poli-fenilalanina. Claramente, el mRNA actúa en la forma que predijeron F. Jacob y J. Monod, esto es, como una molécula que transmite la información genética del DNA hacia los ribosomas, donde actúa como un "molde" para especificar la secuencia aminoácida de las proteínas.

Mientras que, a partir de otra serie de experimentos, se han obtenido conclusiones con respecto a la estabilidad del mRNA. Y así, utilizando métodos como el marcado por impulsos del RNA (S. Brenner et al., 1961; F. Gros et al., 1961),

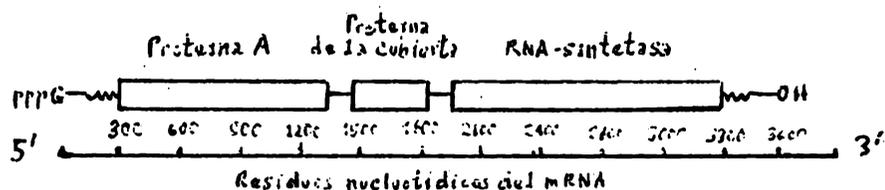
La represión de la síntesis del mRNA con actinomicina D (L.H. Hartwell y B. Magasanik, 1964; L. Leivo, 1965; H.C. Pitot et al., 1965; M. Schaechter et al., 1965) o la inducción enzimática específica seguida de represión por eliminación del inductor (D. Nakada y B. Magasanik, 1962 y 1964; A. Kepes, 1963; F. Imamoto et al., 1964), se ha confirmado que el mRNA es altamente inestable y que posee una vida media de uno a dos minutos en las células de los procariotas como *E. coli* (L. Leivo, 1965; D. Nakada y B. Magasanik, 1964) y *B. subtilis* (L.H. Hartwell y B. Magasanik, 1964; C. Levinthal et al., 1962).

Por, en las células de los eucariotas, el mRNA es relativamente más estable y se le ha podido determinar una vida media que va de las dos horas (M. Revel y H.H. Hiatt, 1964; A.C. Trakatellis et al., 1964; H.C. Pitot et al., 1965; S. -- Bloom et al., 1965; I.J. Bokher et al., 1965) hasta un día o algo más (R.B. Scott y E. Hall, 1964; J.W. Drysdale y H.N. Munro, 1966; L. Dure y L. Waters, 1965; - O. Grongard et al., 1965; A. Spector y J.H. Kinoshita, 1965).

Finalmente, otra serie de investigaciones han confirmado la presencia del mRNA asociado a los ribosomas durante la síntesis de las proteínas. Y en los experimentos de marcado por impulsos, en los cuales se introdujeron precursores marcados de los ácidos nucleicos (como el ác. orótico- H^3) a las ratas, mostraron que después de 30 minutos, el mRNA- H^3 marcado del hígado se hallaba asociado principalmente a las polirribosomas pero que los ribosomas aislados presentaban muy poca radiactividad (A. Munro et al., 1964). Y se han efectuado experimentos similares empleando células de distintos procariotas como las bacterias (R.W. Risco-brough et al., 1962; M. Schaechter et al., 1965) o de eucariotas como las levaduras (L. Marcus et al., 1965) y células animales (S. Penman et al., 1963).

Mientras que en estudios realizados con la ayuda del microscopio electrónico se han obtenido microfografías electrónicas que muestran al mRNA unido a los ribosomas formando arreglos lineales que se conocen con el nombre de polisomas (A. Rich et al., 1963; R. Williamson et al., 1963; T. Stachelin et al., 1963; R.A. Rifkind et al., 1964; A.P. Mathias et al., 1964).

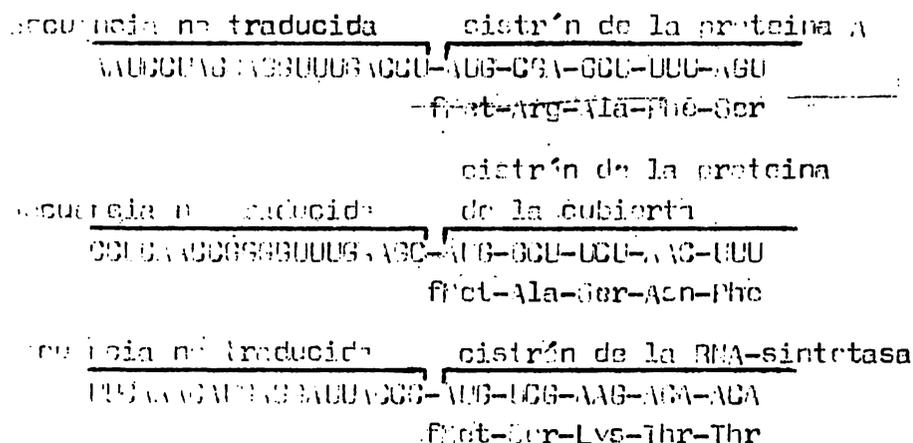
La estructura del mRNA.— Y a partir de estudios más recientes se ha logrado determinar las estructuras primaria y secundaria de algunos tipos de mRNA.



Secuencia de las proteínas codificadas por el genoma del fago R17.

Utilizando al mRNA del fago R17 y marcándolo con P^{32} , se procedió a determinar la secuencia de nucleótidos de acuerdo con el método desarrollado por F. Sanger. Y comparando los resultados obtenidos por este procedimiento con la secuencia aminoácida deducida mediante un tratamiento similar de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de tal virus, P.G.W. Jeppesen y sus colaboradores (1970) y J.L. Nichols (1970) pudieron deducir el mapa genético y la secuencia de las proteínas codificadas por el mRNA del fago R17.

... para determinar los sitios del mRNA que se unen a los ribosomas, y que contienen a los codones de iniciación para la síntesis de las proteínas, se permitió que el mRNA del fago R17 se uniera a los ribosomas; a continuación se sometió al complejo mRNA-ribosomas a la acción de la ribonucleasa, con lo cual resultó hidrolizado todo el mRNA con excepción de los segmentos unidos a los ribosomas, finalmente se procedió a determinar la secuencia de bases de tales fragmentos (J.A. Steitz, 1969; P.G.M. Janssen et al., 1970).



Secuencia que muestra las regiones del genoma que no son traducidas y que corresponden a los sitios de unión del mRNA con los ribosomas.

Los resultados han mostrado que tales segmentos contienen secuencias de nucleótidos que no son traducidas y que corresponden precisamente, a las regiones del mRNA que se unen a los ribosomas.

Por lo general, las secuencias sin traducir contienen el triplete de iniciación AUG en uno de sus extremos, el extremo 3'; y posiblemente el mRNA posea una estructura secundaria en la cual se forman subestructuras en forma de horquillas, unidas por enlaces de hidrógeno, de manera que el triplete AUG se halla localizado en la punta de tales horquillas donde puede ser reconocida fácilmente por los ribosomas y los demás factores involucrados en la síntesis de las proteínas (J.A. Steitz, 1969).

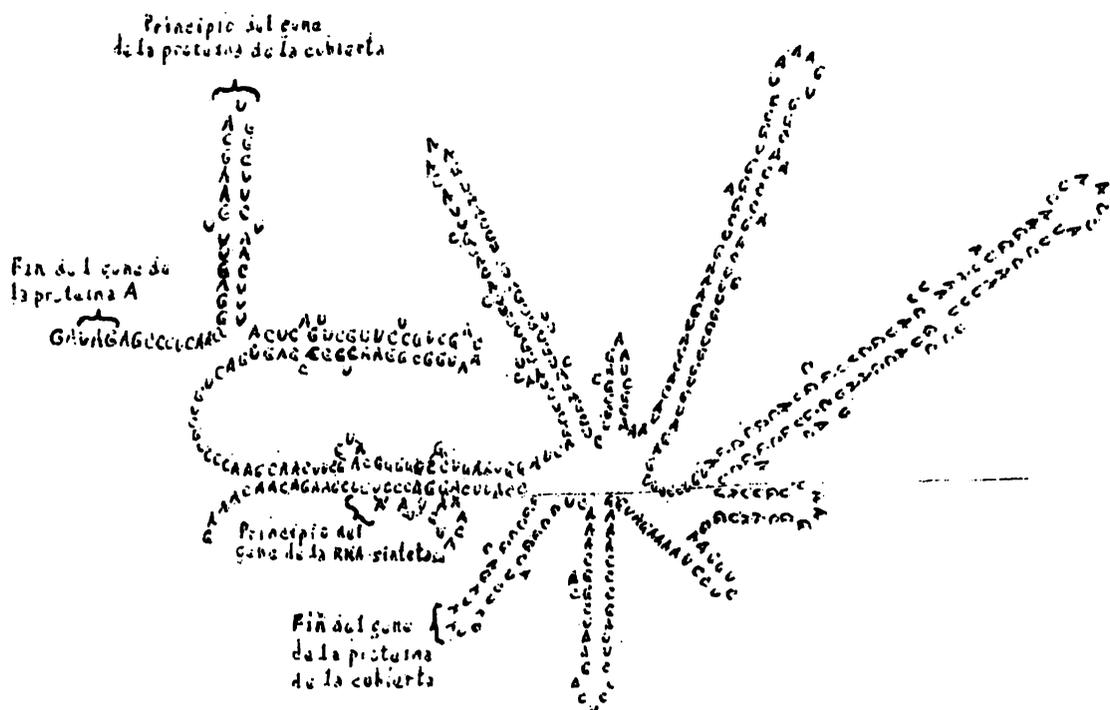


PyAGAGCCUUAACC^{G...U(AC)}

Possible estructura secundaria del sitio de unión a los ribosomas del cistron que codifica a la proteína de la cubierta del fago R17.

W.D. McEwain y sus colaboradores (1971) trataron de unir una RNAasa al mRNA del fago T32, y con la ayuda de la electroforesis en geles de poliacrilamida, pudieron aislar a los fragmentos resistentes a la acción hidrolítica de la enzima y procedieron a determinar la secuencia de bases de tales segmentos. Y en tanto que procedimiento lograron determinar la secuencia de bases del extremo 5' terminal del mRNA de este fago.

En tanto que, L. Min Jou et al. (1972) lograron establecer la secuencia completa de nucleótidos del gen que codificó a la secuencia aminoácida de la proteína que forma a la cubierta del virus T2.



La secuencia de nucleótidos del gene que codifica a la proteína de la cubierta del fago T2.

Recientemente, J. L. Adams y S. Cory (1973) han detectado la presencia de nucleótidos modificados en el extremo 5' en los mRNAs de los virus y de las células animales. Y así, se han podido identificar secuencias del tipo $m^7GpppNpNp...$, en las cuales los nucleótidos modificados m^7Gppp y $NpNp$ se hallan unidos mediante enlaces 5'-5'. De lo que se ha concluido que tales bases metiladas quizá pueden servir como sitios de reconocimiento para las enzimas que convierten al precursor de alto peso molecular del mRNA, el RNA heteronuclear hnRNA, hacia la forma metabólicamente activa del citoplasma.

Mientras que, a partir de una serie de investigaciones en las cuales se observó que un RNA de tipo mensajero exhibía una gran resistencia a la acción hidrolítica de enzimas como la RNA-asa pancreática o la RNA-asa del virus T1 (J. Kates, 1970; J.E. Barnell et al., 1971) y a la extracción con fenol bajo condiciones específicas (A. Hadjivassiliou y G. Brownman, 1966 y 1967; S.Y. Lee et al., 1971); y que, por otra parte, era retenida con una elevada especificidad por la oligo(dT)-celulosa (L. Edmonds et al., 1971), por los gránulos de poliestireno (L. Lim y E.G. Cancellakis, 1970) y por los filtros Millipore (S.Y. Lee et al., 1971), se acumularon evidencias que condujeron al descubrimiento de que el mRNA se halla unido a un segmento de poli-adenina en uno de sus extremos terminales.

Lo cual se confirmó cuando, después de someter a un proceso de fraccionamiento al mRNA, se encontró que los residuos de actividad para dirigir la síntesis de las proteínas se hallaban asociados con un segmento intacto de poli-adenina (M.R. Harrison et al., 1972; W.G. Lanyon et al., 1972; H.H. Kazazian Jr. et al., 1973).

Actualmente se sabe que el segmento de poli-A consiste de al menos un 95% de residuos de AMP (L. Edmonds et al., 1971; J. Mendocci et al., 1972; G.R. Molloy y J.E. Barnell, 1973) y que se halla unido al extremo 3' terminal del mRNA (J. Mendocci, S.Y. Lee y G. Brownman, 1972). La cadena de poli-A posee una longitud de unos 170 residuos de AMP en las células de los eucariotas como los polisomas del ratón (J. Mendocci et al., 1972) y de 100 a 200 residuos en las células HeLa

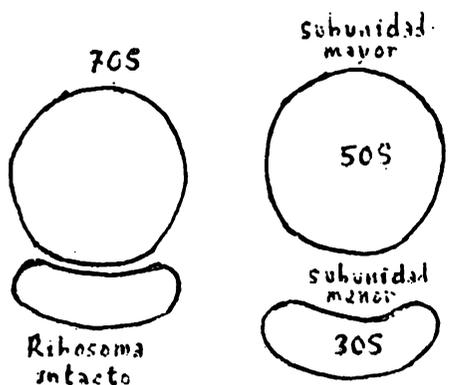
(H. Nakazaki et al., 1973); y se han hecho observaciones similares utilizando células de levaduras (G.B. McLaughlin et al., 1973).

Lo se ha logrado establecer la función que desempeña el segmento de poli-A en el mRNA de las células eucariotas, aunque posiblemente participa en el unión del mRNA a las membranas (J.E. Darnell et al., 1973) o como un dispositivo que se hala el envejecimiento del mRNA. Pues D. Sheiness, L. Puckett y J.E. Darnell (1975) han demostrado que conforme "envejece" el mRNA se va acortando el tamaño de su segmento poli-A.

c) Los ribosomas. Como se ha visto, las investigaciones de P.C. Zamenick y sus colaboradores mostraron claramente que las pequeñas partículas obtenidas a partir de la fracción microsomal, y formadas por ribonucleoproteínas, eran el sitio donde se efectuaba la síntesis de las proteínas (P.C. Zamenick y E.B. Koller, 1954 y 1956; J.W. Littlefield et al., 1955; P.C. Zamenick et al., 1958; M.B. Holland et al., 1958). Posteriormente, tales partículas recibieron el nombre de ribosomas.

Y aunque durante cierto tiempo se consideró que el RNA estable de los ribosomas era el "arido" que especificaba la secuencia aminoácida de las proteínas (J.W. Littlefield, 1957; J.E. Volis et al., 1958; R.B. Roberts et al., 1958; L. Haberman y H.G. Olsen, 1959); los trabajos de Jacques Monod y sus colaboradores demostraron que esta función correspondía al RNA mensajero (A.B. Pardee et al., 1957; J. Riley et al., 1960; F. Jacob y J. Monod, 1961).

Sin embargo, pronto hubo nuevas investigaciones que permitieron identificar la estructura precisa de las partículas ribosomales. Y así, se encontró que la mayor parte de los ribosomas, tanto en las células de los procariontes como en las de los eucariotas, se hallan formados por dos subunidades y una de ellas posee un tamaño de partícula aproximadamente el doble con respecto a la subunidad menor (F.-G. Gian, 1957; H.L. Petermann y H.G. Hamilton, 1957; P.O.P. Ts'o et al., 1958; A. Tissières et al., 1959; P.O.P. Ts'o y J. Vinograd, 1961).



Representación esquemática de las estructuras ribosomales.

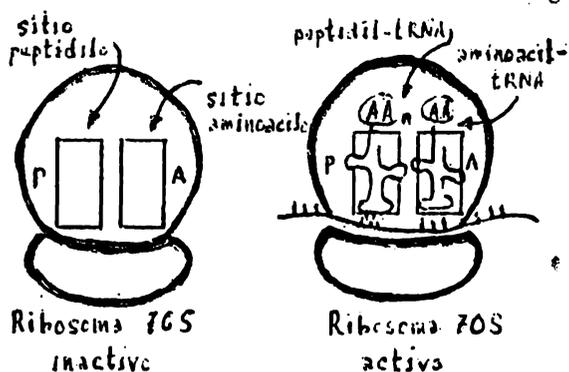
Por otra parte, los ribosomas de los procariontes como las bacterias poseen constantes de sedimentación con valores de 70S, 50S y 30S, que corresponden al ribosoma intacto y a las subunidades mayor y menor, respectivamente (A. Tissières et al., 1959). En tanto que los ribosomas completos y sus subunidades mayor y menor en las células de los eucariotas poseen constantes de sedimentación de 80S, 60S y 40S (H.L. Petermann, 1960; P.O.P. Ts'o y J. Vinograd, 1961). En presencia de altas concentraciones de Mg^{2+} (10^{-2} a 10^{-1} M) las subunidades mayor y menor permanecen asociadas pero se disocian cuando disminuye la concentración del Mg^{2+} (0.1 a 0.01 M)

(F.-G. Gian, 1957; H.L. Petermann y H.G. Hamilton, 1957; P.O.P. Ts'o et al., 1958; A. Tissières et al., 1959; J. Vinograd, 1961; G.B. Davis, 1971).

En una serie de experimentos, se procedió a investigar la interacción específica del mRNA con los ribosomas. Para lo cual se emplearon sistemas sin células formados por ribosomas lavados, Mg^{2+} ($5 \times 10^{-3} M$) y a los cuales se adicionaban mensajeros sintéticos como el poli-U (S.J. Spyridis y F. Lipmann, 1962; S.A. Aronson y T.S. Aronberg, 1962; H.S. Martin y S.M. Amos, 1962; W. Gilbert, 1963) o mensajeros naturales como el mRNA del RNA del fago T2 (T. Okamoto y M. Takanaami, 1963). A continuación, se aisló a los polisomas formados mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa y se detectó al mensajero por marcaje radioactivo.

Los resultados obtenidos mostraron lo siguiente. Que el mRNA, o los líos sintéticos, se asociaban a la subunidad 30S de los ribosomas para formar complejos del tipo mRNA-30S (T. Okamoto y M. Takanaami, 1963; S. Patska y M. Ehrenberg, 1963); a los que, posteriormente, podían unirse los distintos tRNAs de manera específica a través de enlaces de hidrógeno (F. Chapville et al., 1962; A. Raji y H. Raji, 1963; J.O. Roten, 1964; S.S. Kurland, 1966). Por otra parte, la subunidad 30S solamente podía unirse a una sola cadena de mensajero a la vez y el sitio de unión daba cabida a un a 32 nucleótidos (M. Takanaami y G. Zubay, 1964). En adición, se requería la presencia continua del Mg^{2+} y de ciertos factores obtenidos de la fracción sobrenadante (R.L. Horro, 1966; A. Goldberg, 1966). Mientras que, al mezclar ribosomas lavados de *E. coli* con tRNA y Mg^{2+} ($10^{-2} M$), se determinó que el tRNA se unía de manera no específica con la subunidad 50S (G. Cannon et al., 1963).

Posteriormente, H. Raji y A. Raji (1964), empleando polímeros sintéticos como mensajeros, descubrieron que solamente dos moléculas de tRNA se hallaban unidas a cada ribosoma en los complejos poli-N-ribosoma.



Los sitios ribosomales.

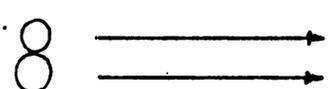
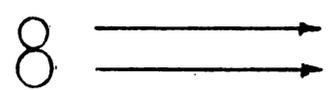
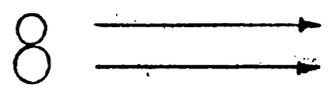
Y de otras investigaciones, en las cuales se estudió la acción de antibióticos como la tetraciclina sobre la unión de las tRNAs con los ribosomas, se concluyó que efectivamente sólo dos tRNAs podían unirse a un ribosoma a la vez; y que, por tanto, era muy probable que existieran sitios de unión específicos para cada tRNA en los ribosomas intactos 70S (H. Matthari et al., 1964; I. Suzuka et al., 1964; G. Suarez y D. Nathans, 1965; M. Hierowski, 1965; H. Raji et al., 1966).

Estas observaciones fueron confirmadas plenamente por R.S. Schweet y sus colaboradores. Empleando un sistema compuesto por reticulocitos y un mensajero sintético como el poli-U, los investigadores observaron la incorporación enzimática de una molécula de phe-tRNA por cada ribosoma. Mientras que, en presencia del ATP y una fracción enzimática obtenida de la fracción soluble -el factor de transferencia I (IF-1, R.S. Traut y R.E. Horro, 1964; J. Allende et al., 1964; T. Conway y F. Lipmann, 1964), tal enzima podía catalizar la unión específica de una segunda molécula de phe-tRNA a los ribosomas.

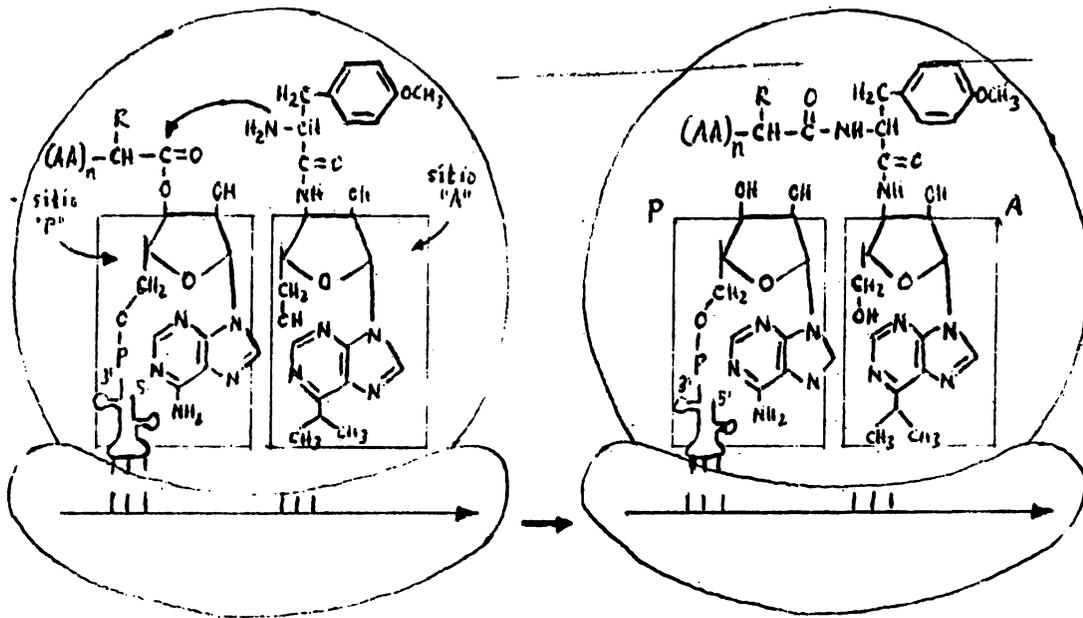
Por otra parte, al lavar a los complejos phe-tRNA-ribosomas e incubarlos en presencia de una segunda fracción enzimática -el factor de transferencia 2 (TF-2) y un anticódigo como la puramicina, los investigadores descubrieron que sólo una fracción de los phe-tRNAs (20-25%) que se habían unido enzimáticamente eran convertidos en difenil-tRNA; mientras que el 50% de tales phe-tRNAs formaban un enlace de tipo peptídico con la puramicina adicionada. Bajo las mismas condiciones, los phe-tRNAs unidos de manera no enzimática, eran incapaces de efectuar estas reacciones.

Estos resultados confirmaron plenamente la existencia de dos sitios de unión para los tRNAs en los ribosomas. El primero de ellos, que recibió el nombre de sitio "acceptor" (el sitio aminoacilo), es el sitio al cual se unían de manera no enzimática los aminoacil-tRNAs entrantes por medio de interacciones codón-anticodón. En tanto que, el llamado sitio "donador" (el sitio peptídico), es al cual se unían de manera enzimática las cadenas de peptidil-tRNA, y era el mismo sitio al que se unía la puramicina. Es decir, que el tRNA del sitio "donador" es capaz de "orden" su cadena peptídica en crecimiento al aminoacil-tRNA que se halla en el sitio "acceptor", durante la formación de cada enlace peptídico (J. Bishop y R.S. Schwect, 1961; G. Arlinghaus et al., 1964; R.S. Schwect et al., 1965; R. Hantz et al., 1966). Y se obtuvieron conclusiones similares mediante estudios *in vivo* (J. Garner y A. Rich, 1964) y de estudios *in vitro* en los que se emplearon sistemas naturales (F. Wittstein y H. Noll, 1965).

A continuación se presentan, de manera resumida, los conocimientos actuales sobre la estructura de los ribosomas.

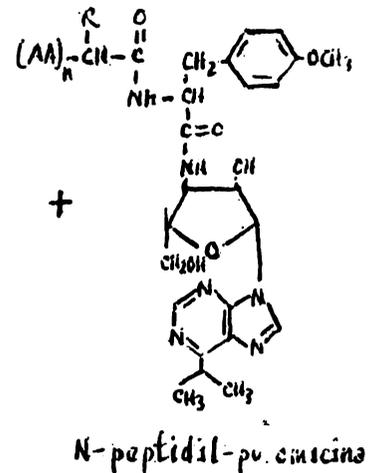
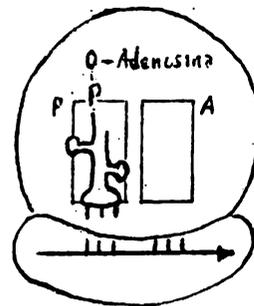
Ribosomas	Subunidades	rRNA (PM)	Número de proteínas distintas
Procariontas			
Bacterias, actinomicetos, algas azul-verdes, mitocondrias de los eucariotas			
70S		16S (550,000) 5S (40,000) 23S (1,100,000)	21 33
Eucariotas			
Reino vegetal			
~80S		16-18S (~700,000) 5S (40,000) 25S (~1,300,000)	34 50
Reino animal			
~80S		18S (~700,000) 5S (40,000) 28-29S (1,400,000-1,800,000)	34 50

La acción de la puromicina.- Como se ha visto, distintos grupos de investigadores descubrieron que los antibióticos, como la puromicina, podían inhibir la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las proteínas; y que, en el caso de esta última, la inhibición ocurría porque su estructura era muy semejante a la de los aminoacil-tRNAs (M.R. Yarnalansky y S. De la Haba, 1959; A.J. Morris y R.S. Schwartz, 1961; D.J. Allen y P.C. Zamenick, 1962).



Y se estableció posteriormente, que la acción inhibitoria de la puromicina a nivel del ribosoma es capaz de formar enlaces de tipo "peptídico", entre su grupo alfa-amino y el grupo carboxilo de las peptidil-tRNAs, para rendir derivados de la peptidil-puromicina.

Puesto que la cadena polipeptídica de tales derivados no puede proseguir, la N-peptidil-puromicina se disocia de los ribosomas; lo que trae como resultado la inhibición completa de la síntesis de las proteínas (D. Nathans, 1964; J.D. Smith et al., 1965).



d) Factores adicionales. Ya desde las primeras investigaciones en las que se estudió la incorporación de los aminoácidos a sistemas sin células, formados por fracciones microsomas capaces de efectuar la síntesis de las proteínas, se observó el requerimiento de otros factores presentes en la fracción sobrenadante y distintos a los tRNAs, al ATP y a las aminoacil-tRNA sintetasas (E.S. Keller y P.C. Zamenick, 1964; P.C. Zamenick et al., 1968; L.G. Grassi y K. Moldave, 1959).

Lo cual se confirmó en estudios posteriores en los que se emplearon ribosomas purificados y sobrenadantes fraccionados (A. Von der Decken y T. Hultin, 1960; J.M. Fossenden y K. Moldave, 1961; J. Bishop y R.S. Schweet, 1961; H. Lamfron y B. Squires, 1962); o bien, ribosomas purificados, sobrenadantes fraccionados y mensajeros sintéticos como el poli-U (D. Nathans et al., 1963; J.E. Allende et al., 1964). En adición, esta serie de experimentos demostraron que los factores requeridos, y aislados de las sobrenadantes fraccionados, eran de naturaleza proteica. Actualmente se ha identificado a varias de estas proteínas y, aunque no forman parte de los ribosomas, son necesarias durante las distintas etapas del proceso que conduce a la síntesis de las proteínas. (A. Smith, 1976).

Factores de iniciación.- Aún se requiere de nuevas investigaciones para poder definir con claridad la función específica de cada una de los factores de iniciación conocidos.

IF-1 (MW, 9-2400). Posiblemente este factor se halla involucrado en la disociación de las subunidades ribosomales; así como en la estabilización del complejo formado por los factores de iniciación y, además, en el reciclaje de los factores IF-2 e IF-3.

IF-2 (MW, 80-100000). Este factor participa en la unión del tRNA que inicia la síntesis de las proteínas, el fMet-tRNA_f, y que se une a la subunidad 30S. En presencia de la subunidad 50S y de este factor ocurre la hidrólisis del GTP.

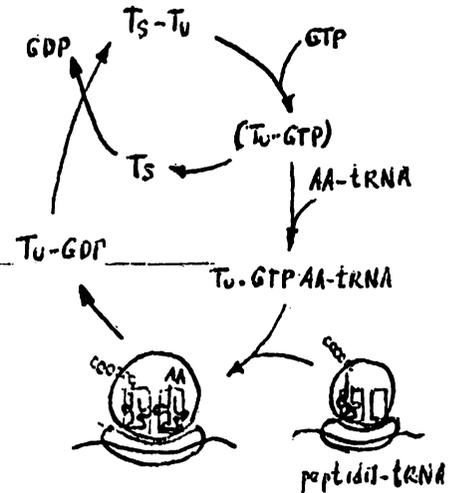
IF-3 (MW, 21-23000). Tal factor es responsable del "reconocimiento" del sitio, en el mRNA, al cual deben unirse los ribosomas. Así mismo, promueve la disociación de los ribosomas 70S como paso previo para que se inicie la síntesis de las proteínas. Por otra parte, no puede efectuar sus funciones cuando está en presencia de mensajeros sintéticos.

Factores de elongación.- Se han identificado dos tipos principales de factores de elongación. Los factores del primer grupo son los responsables de fijar a los aminoacil-tRNAs al sitio A de los ribosomas y se conocen como el factor T (EF-T) en las bacterias o el factor I (EF-I) en los eucariotas. Mientras que los factores del segundo grupo efectúan la translocación del peptidil-tRNA desde el sitio A hacia el sitio P de los ribosomas, después de que se ha formado el enlace peptídico correspondiente. Se los conoce como el factor G (EF-G) en las bacterias o el factor II (EF-II) en las células de los eucariotas.

EF-T. En las células de los procariontes, como las bacterias, es el factor encargado de fijar a los aminoacil-tRNAs al sitio A de los ribosomas. Y se halla constituido por dos subunidades polipeptídicas: las que se conoce como la fracción estable Ts y la fracción inestable Tu (J. Lucas-Lenard y F. Lipmann, 1965; Y. Nishizuka y F. Lipmann, 1966).

EFTu (PM, 40000). Cataliza en primer lugar, la unión entre el GTP y el aminoacil-tRNA entrante, y a continuación los fija al sitio A de los ribosomas. Después de lo cual, el GTP se hidroliza y se libera al complejo Tu-GDP.

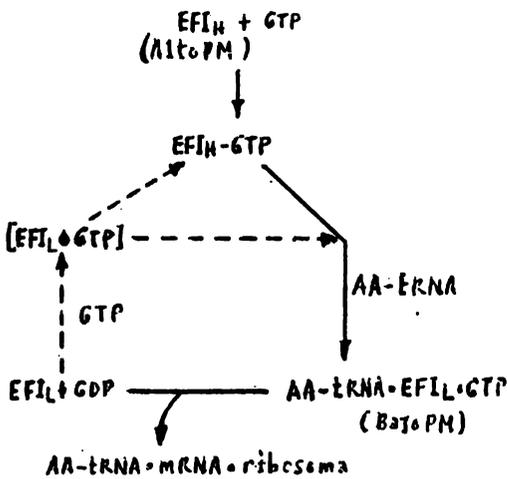
EFTs (PM, 19-20000). Esta fracción probablemente se une al complejo Tu-GDP, liberando al GDP, para formar el nuevo complejo Tu-Ts. Y este último reacciona con el GTP, liberando al factor Ts, para que, quizá, vuelva a formarse el complejo Tu-GTP nuevamente. Con lo cual se logra un proceso cíclico (S. Brenner et al., 1961).



La función de los factores Ts y Tu durante el proceso de elongación.

Por otra parte, el factor de elongación EF-I de las células eucariotas (PM, 50000) no posee al componente Ts, y se ha sugerido que esto puede ser consecuencia de la disociación espontánea del complejo EF-I-GDP (H. Weisbach y N. Brot, 1974). En adición, se han identificado distintas formas de este factor con pesos moleculares variables -- (5×10^4 - 1.5×10^6).

Mientras que la unión del GTP a la forma de alto peso molecular, EF-I_H, promueve la liberación del complejo EF-I_L-GTP, constituido por la forma EF-I_L de bajo peso molecular; pero no se sabe si se establece un ciclo vía la forma de alto peso molecular, EF-I_H. (M. Revel et al., 1972).



La función de los factores EF-I_L y EF-I_H durante la elongación de las cadenas polipeptídicas.

EF-G (PM, 80000). También se conoce a este factor con el nombre de "translocasa" y en las células de los procariontas, como las bacterias, participa en la traslación del peptidil-tRNA desde el sitio A hacia el sitio P de los ribosomas, una vez que se ha formado el enlace peptídico correspondiente. De manera que este factor se halla involucrado en el desplazamiento de los ribosomas a lo largo de la cadena del mRNA (E.R. Traut y R.E. Monro, 1964; Y. Nishizuka y F. Lipmann, 1966).

El factor correspondiente de las células eucariotas, el factor de elongación EF-II, es muy similar al factor EF-G de las bacterias; y ambos tipos de proteínas requieren de la presencia del GTP, el cual es hidrolizado por la GTPasa en la subunidad 50S de los ribosomas.

Factores de terminación.— S. Brenner y sus colaboradores descubrieron que la presencia de los tripletes UAG (ámbar) y UAA (ocro) en las cadenas del mRNA de los mutantes ámbar del fago T4, conducía a la terminación prematura y liberación de las cadenas polipeptídicas de las proteínas que forman a la cabeza de tal virus. Esta observación sugirió a los investigadores que en las cadenas del mRNA debían existir "señales" de terminación para la síntesis de las proteínas.

Lo cual se confirmó cuando los mutantes ámbar del fago T4 (cuya supresión negativa, su^- , conducía a la aparición de los tripletes UAG y UAA que no codificaban a ningún aminoácido) fueron sometidos a una nueva mutación, la que trajo como resultado la síntesis normal de las cadenas polipeptídicas de las proteínas pero con un aminoácido distinto; pues ahora un resto de serina ocupaba el sitio en que se halla la glutamina en las proteínas de los fagos normales (supresión positiva, su^+) (A.S. Sarabhai et al., 1964; A.O.W. Stretton y S. Brenner, 1965; S. Brenner et al., 1965).

Fago de tipo salvaje : NH_2 -Ala-Gly-Val-Phe-Asp-Phe-Gln-Asp-...

Fago mutante (su^-) : NH_2 -Ala-Gly-Val-Phe-Asp-Phe
(proteína incompleta)

Fago mutante suprimido (su^+) : NH_2 -Ala-Gly-Val-Phe-Asp-Phe-Ser-Asp-...
(proteína completa)

Se obtuvieron evidencias adicionales en experimentos genéticos paralelos, en los que se encontró que las mutaciones en los genes que codifican a la fosfatasa alcalina (M.G. Eigert y A. Garin, 1965) y a la cubierta proteica del fago f2 -- (G. Natani et al., 1965) y que conducían a la terminación prematura de tales proteínas, se debían a la conversión hacia el triplete UAG de las secuencias que codificaban al triptofano y a la glutamina, respectivamente.

Y la existencia de señales de terminación en las cadenas del mRNA, en forma de la secuencia de tripletes UAG y UAA, ya se había sugerido en experimentos previos. Pues al emplear sistemas sin células a los cuales se adicionaban mensajeros naturales, como el RNA obtenido de *E. coli*, del fago f2 o del fago R17, se observó que las cadenas polipeptídicas sintetizadas eran liberadas hacia la fracción soluble una vez terminadas (J.O. Bishop et al., 1960; A. Tissières et al., 1960; A.J. Morris y R.S. Schweet, 1961; D. Nathans et al., 1962). En tanto que, al utilizar mensajeros artificiales como poli-U, poli-A, poli-C, poli-CA, poli-AG, poli-UC, poli-UG ó poli-UX, las cadenas polipeptídicas formadas permanecían unidas a los ribosomas a través del tRNA del grupo carboxilo del último residuo aminoácido (W. Gilbert, 1963; M. Takanami y Y. Yan, 1965; M.S. Breticher et al., 1965; M.C. Ganoza y J. Nakamoto, 1966).

Investigaciones posteriores han confirmado plenamente la existencia de "señales" de terminación en las cadenas del mRNA, en forma de los tripletes UAA, UAG y UGA. Y se ha encontrado que, además de los codones de terminación de la síntesis proteica, se requiere de la presencia de ciertos factores de naturaleza proteica que participan activamente durante la etapa final de la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las proteínas (A.L. Beaudet y C.T. Caskey, 1972).

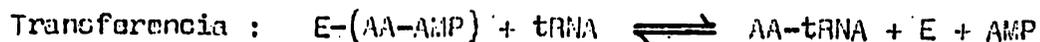
En las células de los procariotas, como las bacterias, se han identificado los siguientes factores. El factor R_1 (PM, 44000) que puede "leer" a los tripletes de terminación UAA y UAG, y el factor R_2 (PM, 47000) que "lee" a los codones de terminación UAA y UGA. En tanto que, el factor R_3 ó S (PM, 40000) es capaz de fijar al GDP y al GTP. Por otra parte, en las células de los eucariotas, como los mamíferos, únicamente se ha identificado a un factor de terminación (PM, 150000) que puede "leer" a los tres codones UAA, UAG y UGA; y que, además,

e) Las aminoacil-tRNA sintetetasas. Las aminoacil-tRNA sintetetasas son componentes esenciales durante la síntesis de las proteínas puesto que son las enzimas responsables de unir a cada uno de los 20 aminoácidos con el tRNA correspondiente.

Las evidencias obtenidas desde las primeras investigaciones indicaron que cada organismo solamente posee una aminoacil-tRNA sintetetasa para cada uno de los 20 aminoácidos. Y así, M.H. Makman y G.L. Cantoni (1965) solamente identificaron a una seril-tRNA sintetetasa en las levaduras, A.N. Baldwin y P. Berg (1966) a sólo una isoleucil-tRNA sintetetasa en *E. coli* y M.P. Stollberg (1967) sólo pudo aislar a una fenilalanil-tRNA sintetetasa. Mientras que las investigaciones posteriores han confirmado la existencia de sólo una aminoacil-tRNA sintetetasa para cada aminoácido (F.C. Heidhardt et al., 1975).

Las aminoacil-tRNA sintetetasas se han aislado y purificado a partir de las células de las procariontas como *E. coli* (R. Stern y A.H. Mehler, 1965; A.H. Mehler y C. Josenky, 1966; R.A. Lazzarini y A.H. Lehler, 1966; R. Calender y P. Berg, 1966; A.N. Baldwin y P. Berg, 1966); y de las células de los eucariotas como las levaduras (U. Lagerkvist y J. Waldenstrom, 1965; M.H. Makman y G.L. Cantoni, 1965; M.H. Makman, 1966) o las células del hígado de rata (C.C. Allende y J.E. Allende, 1964; C.C. Allende et al., 1966). Las distintas enzimas obtenidas tienen un peso molecular de entre 100,000 a 240,000 y algunas de ellas se hallan formadas por una sola cadena polipeptídica como ^{la} leucil- y la isoleucil-tRNA sintetetasas. En tanto que otras, como la metionil-tRNA sintetetasa, poseen dos subunidades idénticas y algunas tienen subunidades distintas.

El proceso que conduce a la activación y transferencia de los distintos aminoácidos desde las aminoacil-tRNA sintetetasas hacia sus correspondientes tRNAs se efectúa en dos pasos. En la primera etapa, la aminoacil-tRNA sintetetasa cataliza la reacción del aminoácido involucrado con el ATP para formar un intermediario aminoacil-adenilato (M.B. Hoagland et al., 1955 y 1956; P. Berg, 1956; J.A. De Joss y B.D. Novelli, 1956; E.W. Davie et al., 1956; V.V. Koningsberger et al., 1957; R.D. Cole et al., 1957; R.S. Schweet et al., 1957; F.M. Bergmann et al., 1959).



Y en el segundo paso, el aminoácido "activado" es transferido desde el intermediario aminoacil-adenilato hacia el extremo 3' del tRNA particular para rendir el correspondiente aminoacil-tRNA (J.E. Allende y C.C. Allende, 1964; A.T. Norris y P. Berg, 1964; U. Lagerkvist y J. Waldenstrom, 1965).

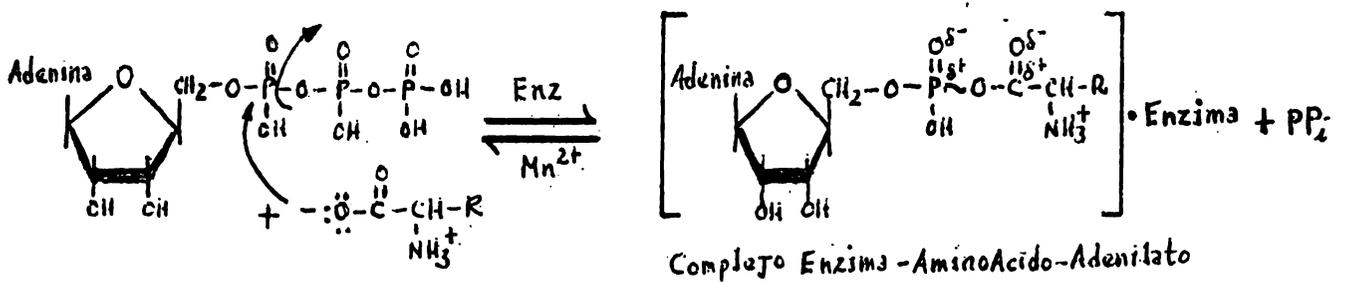
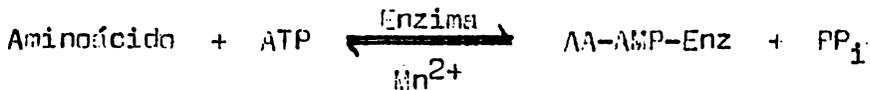
Por otra parte, las investigaciones recientes se han orientado hacia la determinación del o los sitios de unión, así como de los patrones de reconocimiento, entre las aminoacil-tRNA sintetetasas y sus correspondientes sustratos (C. Bruton y J.S. Hartley, 1970; L.L. Kisselev y O.O. Favorova, 1974; D. Söll y P.R. Schimmel, 1974).

3) Etapas para la síntesis de proteínas.

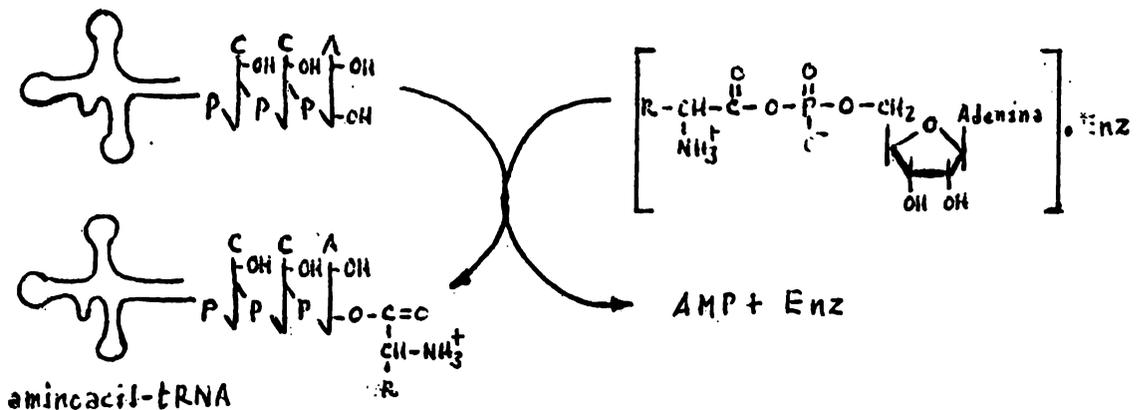
El proceso que conduce a la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las proteínas puede dividirse en cuatro etapas principales que son las siguientes : a) Activación de los aminoácidos; b) Iniciación de la síntesis; c) Elongación de las cadenas polipeptídicas y d) Terminación. Y a continuación se expondrán los conocimientos actuales acerca de cada una de las etapas individuales de este proceso; en espera de que las investigaciones futuras permitan aclarar las dudas que aún existen.

a) Activación de los aminoácidos.- Los 20 aminoácidos que comunmente se encuentran en las cadenas polipeptídicas de las proteínas son "activados", como ya se ha visto, por unas enzimas activadoras específicas, las aminoacil-tRNA sintetetas; la activación es un requisito previo para que, posteriormente, los aminoácidos "activados", unidos a sus respectivos tRNAs, puedan incorporarse a los ribosomas donde se efectua la síntesis de los enlaces peptídicos de las proteínas.

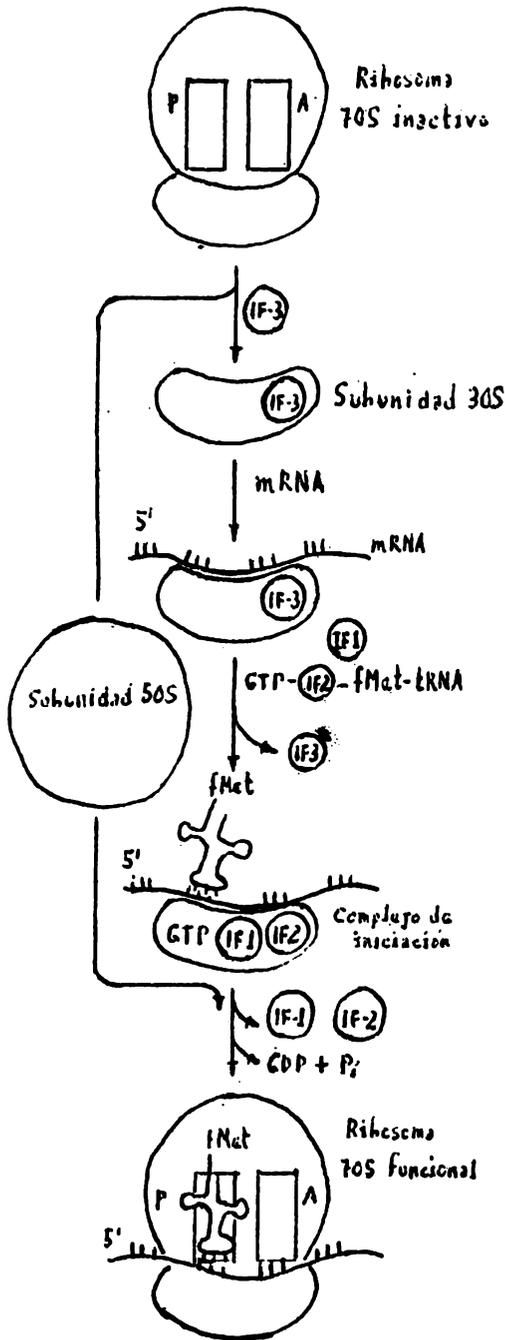
El proceso de activación de los aminoácidos se efectua en dos pasos. En el primero, las aminoacil-tRNA sintetetas catalizan la reacción del aminoácido involucrado con el ATP, liberando PP_i, para formar a los complejos aminoacil-adenilato, que permanecen unidos a las sintetetas.



Y a continuación, la aminoacil-tRNA sintetetasa involucrada promueve la transferencia del aminoácido "activado" particular hacia el extremo 3' del tRNA aceptor específico.



b) Iniciación de la síntesis.— Y la síntesis de las proteínas comienza con la incorporación del factor de iniciación IF-3 a la subunidad ribosomal 30S para formar el complejo 30S-IF-3. Entonces, el mRNA se une a la subunidad 30S para formar el nuevo complejo mRNA-30S-IF-3.



La formación del complejo de iniciación y del ribosoma funcional 70S en *E. coli*.

A continuación, el tRNA de iniciación fMet-tRNA y el GTP se unen al factor de iniciación IF-2 para constituir al complejo GTP-IF-2-fMet-tRNA, y junto con el factor de iniciación IF-1, se asocian al complejo formado en la etapa anterior, el mRNA-30S-IF-3, lo cual conduce al llamado "complejo de iniciación" mRNA-30S-fMet-tRNA-GTP, después de que se ha separado el factor IF-3.

Es entonces, cuando la subunidad 50S se combina con el complejo de iniciación para constituir al ribosoma funcional 70S. Durante la formación del complejo ribosomal 70S, que contiene al fMet-tRNA unido al sitio peptídico, probablemente se utiliza a la energía liberada durante la hidrólisis del GTP hacia GDP y P_i . Y los factores IF-1 e IF-2 se separan del ribosoma para volver reciclarse.

G) Elongación de las cadenas polipeptídicas.— El proceso que conduce a la elongación de las cadenas polipeptídicas se efectúa en tres etapas que son las siguientes:

Etapa I. En este primer paso, el nuevo aminoacil-tRNA entrante se combina con el complejo formado por el GTP y los factores de elongación Tu y Ts, GTP-EFTu-EFTs, para constituir al nuevo complejo GTP-EFTu-AATRNA, con liberación del factor EFTs que se recicla.

Y a continuación, el AATRNA unido al complejo anterior se incorpora al ribosoma funcional 70S en forma tal, que debe quedar ubicado en el sitio A con su anticodón unido mediante enlaces de hidrógeno al correspondiente codón del mRNA. Durante este proceso se emplea a la energía liberada por la hidrólisis del GTP,

hacia GDP y P_i , para que el AATRNA quede situado en la posición correcta en el sitio A ribosomal. Y el GDP abandona al ribosoma 70S en forma del complejo EFTu-GDP, que se recicla nuevamente.

Etapa 2. Una vez que el fMet-tRNA se halla presente en el sitio P y que el nuevo AA-tRNA entrante ha quedado debidamente colocado en el sitio A del ribosoma 70S, se forma entonces el primer enlace peptídico.

Para lo cual, la peptidil-transferasa de la subunidad 50S cataliza el ataque nucleofílico del grupo amino del A-tRNA sobre el grupo carboxilo esterificado del fMet-tRNA para formar el correspondiente enlace peptídico. El producto resultante es un dipeptidil-tRNA que se encuentra unido al sitio A del ribosoma 70S, en tanto que el tRNA descargado permanece unido al sitio P. Y la formación de los nuevos enlaces peptídicos se efectúa mediante un proceso similar.

Etapa 3. A continuación, el complejo formado por el GTP y el factor de elongación G, EFG-GTP, se asocia al ribosoma 70S.

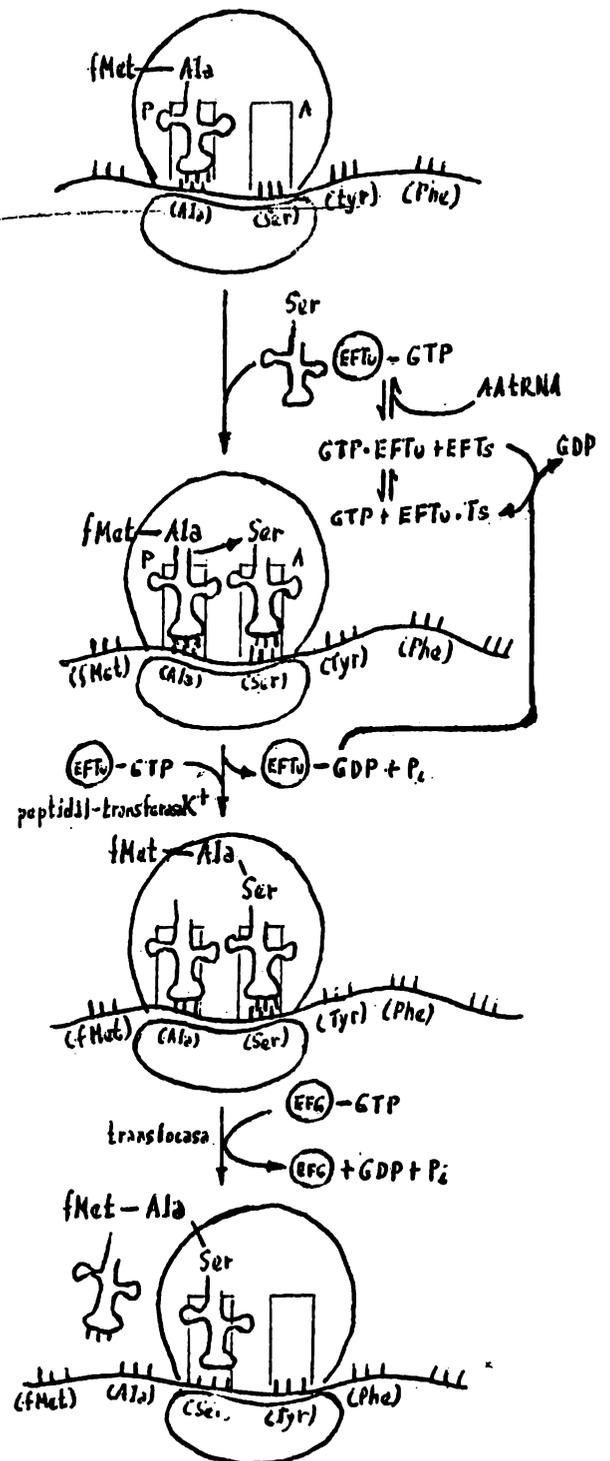
Una vez que se encuentra ahí, el GTP se hidroliza hacia GDP y P_i y la energía liberada se utiliza para la traslación del ribosoma 70S, en la dirección 5'-3', hacia el codón siguiente del mRNA. Simultáneamente, el peptidil-tRNA formado en la etapa anterior y que se encuentra unido al sitio A, es transferido por la actividad de translocasa del factor G hacia el sitio P, donde desplaza al tRNA descargado.

De manera que, el sitio A ha quedado libre nuevamente y listo para recibir al siguiente AA-tRNA especificado por el codón del mRNA presente en este sitio. Una vez que se ha efectuado la traslación del ribosoma y la traslocación del peptidil-tRNA, el GDP y el factor G abandonan al ribosoma 70S.

d) Terminación.— La terminación de la cadena polipeptídica de la proteína recién sintetizada comprende dos eventos.

En el primero, las señales de terminación del mRNA —los codones UAA, UAG y UGA—, son reconocidas por los factores de terminación R_1 y R_2 que se unen al ribosoma 70S para promover el desplazamiento, hacia el sitio P, del polipeptidil-tRNA que se halla unido al sitio A.

Y en el segundo evento, que tiene lugar en el sitio P, la peptidil-transferasa cataliza la hidrólisis del enlace éster formado entre la cadena polipeptídica



La reacción de la peptidil-transferasa y la elongación de las cadenas polipeptídicas.

ca recién sintetizada y el tRNA del último residuo aminoácido adicionado, lo cual conduce a la liberación de la proteína terminada. La actividad hidrolítica de la peptidil-transferasa es inducida por la presencia de los factores de terminación R_1 y R_2 .

Por otra parte, después de que el factor de terminación TR libera al tRNA descargado que permanece unido al sitio P, el mRNA abandona al ribosoma 70S. Entonces, el ribosoma 70S libre se disocia y el factor de iniciación IF-3 se une a la subunidad 30S para comenzar un nuevo ciclo, que conducirá a la síntesis de otra cadena polipeptídica de una nueva proteína.

Ahora bien, la proteína recién sintetizada por los ribosomas es sometida, posteriormente, a una serie de modificaciones que conducen finalmente, a la producción de la forma biológicamente activa de tal proteína.

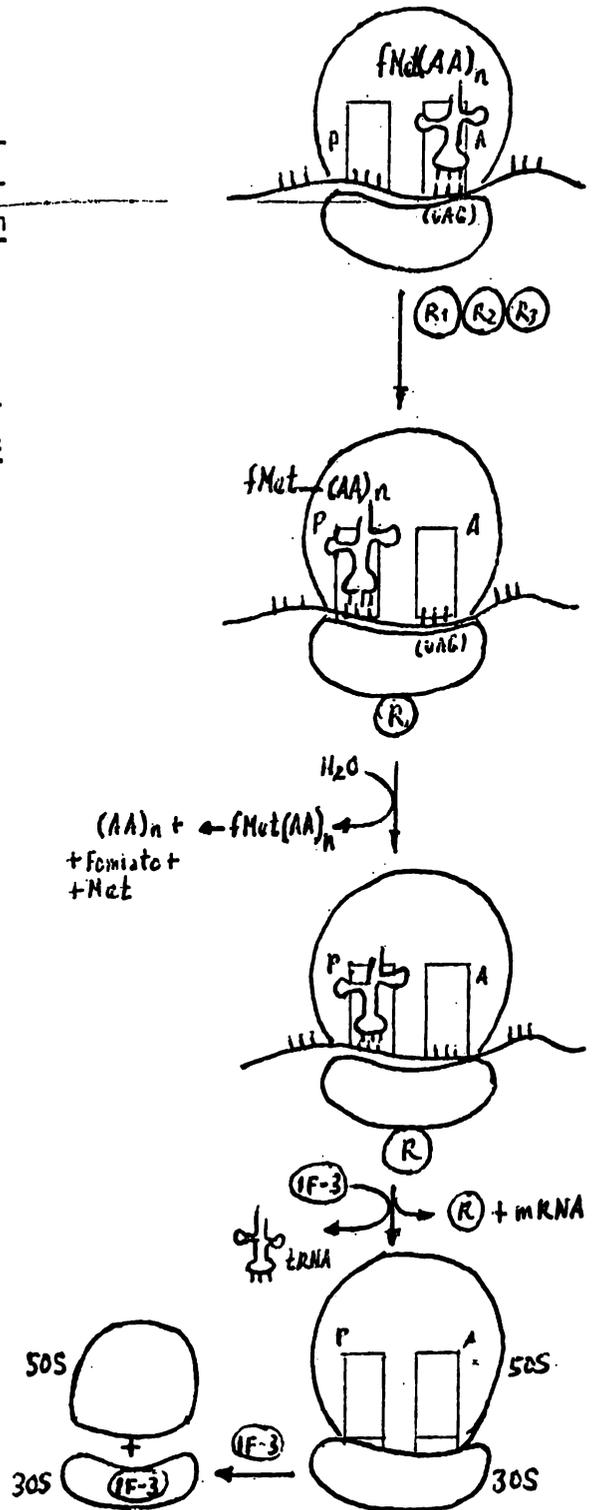
Y así, por ejemplo, la N-formil-Met del extremo amino terminal de las cadenas polipeptídicas es eliminada antes de que la proteína particular adopte su conformación terciaria específica. Dos enzimas participan en este proceso. En primer lugar, una deformilasa específica elimina al grupo N-formilo, rindiendo una cadena polipeptídica con un residuo de Met en el extremo amino-terminal:



En tanto que, una metionín-aminopeptidasa cataliza la hidrólisis del residuo de Met que permanece unido a la cadena polipeptídica:



Otras modificaciones que tienen lugar después de la traducción del mRNA incluyen reacciones de fosforilación, metilación e hidroxilación; así como reacciones en las cuales se incorporan coenzimas o grupos prostéticos a las proteínas terminadas.



La terminación de la síntesis proteica y la liberación de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas.

B. CODIGO GENETICO.

La secuencia aminoácida de cualquier proteína se halla determinada por la secuencia de bases de las cadenas del DNA que se encuentra presente en el núcleo de la célula donde se sintetiza tal proteína; y esta información es transmitida hacia los ribosomas, que son el sitio donde se efectúa la síntesis proteica, en forma de la secuencia de bases del mRNA.

Pero como existen 20 aminoácidos distintos en las cadenas polipeptídicas de las proteínas y únicamente cuatro tipos de bases diferentes en las cadenas de nucleótidos que forman al DNA; la manera en que las secuencias de cuatro nucleótidos distintos de las cadenas del DNA se relacionan con la secuencia lineal de aminoácidos de las proteínas se halla especificada por las combinaciones de bases descritas por el código genético.

Y en seguida, se estudiarán la serie de investigaciones que permitieron establecer las posibles combinaciones de bases que especifican a cada uno de los 20 aminoácidos que se hallan presentes en las cadenas polipeptídicas de las distintas proteínas.

1) Las primeras investigaciones. De los clásicos experimentos genéticos de Seymour Benzer (1955) en los cuales estudió, mediante la técnica de la recombinación viral, una pequeña región del cromosoma del fago T4 (la región rII) pudieron obtenerse conclusiones muy importantes con respecto al tamaño de los genes; y también, con respecto a las unidades que experimentan las mutaciones, esto es, las porciones del material genético que son alteradas bajo determinadas circunstancias.

Y así, Benzer dió el nombre de "cistrón" a una determinada secuencia de nucleótidos del DNA que contenga la información necesaria para especificar la secuencia aminoácida de una determinada proteína (esto es, un gene). De lo que surgió el nuevo concepto según el cual la información genética del DNA obedece a la relación un gene-una cadena polipeptídica. Por otra parte, de estas conclusiones resultó obvio que una secuencia definida de nucleótidos en la cadena del DNA podría funcionar como un código para especificar la secuencia aminoácida de las proteínas. ¿Pero qué tan grande sería dicha secuencia de nucleótidos? De simples consideraciones matemáticas se encontró que si la secuencia de nucleótidos comprendía a tres residuos era posible obtener un total de $4 \times 4 \times 4 = 64$ combinaciones diferentes, lo cual era más que suficiente para codificar a los 20 aminoácidos. Y cada triplete de bases vendría a ser entonces una "palabra" del vocabulario genético o código genético.

Pronto, las investigaciones que permitieron descifrar la naturaleza del código genético se iniciaron con los trabajos de Marshall W. Nirenberg en 1961. Como se ha visto, M.W. Nirenberg y J.H. Matthaei (1961) desarrollaron un sistema in células, obtenido de la fracción sobrenadante que resultó de la centrifugación de células de *E. coli*, al cual adicionaron ribosomas lavados, tRNAs y los facto-

res necesarios para la síntesis de las proteínas. La característica distintiva de este sistema con respecto a los desarrollados por otros investigadores era que la síntesis de las proteínas dependía de la adición del polinucleótido que actúa como mensajero. Y, por tanto, era posible "dirigir" la síntesis de las proteínas adicionando al sistema distintos tipos de mensajeros elegidos arbitrariamente.

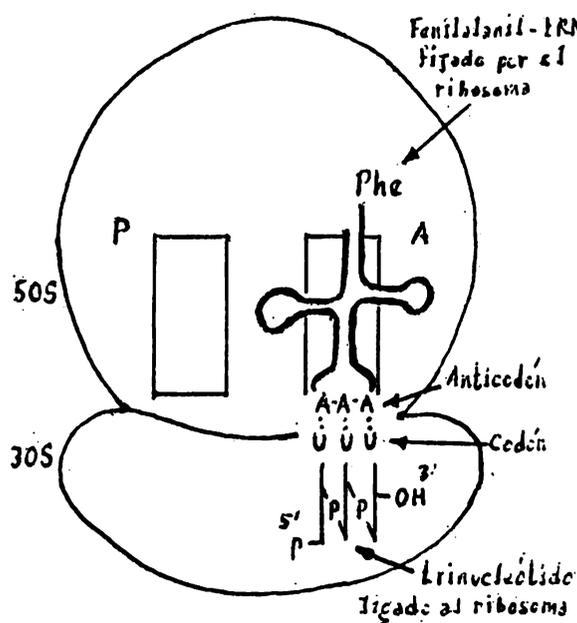
Y a este sistema, los investigadores adicionaron una mezcla de aminoácidos marcados radiactivamente y un mensajero sintético como el poli-U, obtenido por la acción de la polinucleótido-fosforilasa sobre el UDP. Al analizar el producto sintetizado por el sistema se halló que solamente se había incorporado a la cadena polipeptídica insoluble en ácido, uno de los aminoácidos radiactivos, la Phe. Los estudios cinéticos y de solubilidad mostraron que tal polipéptido estaba formado únicamente por restos de Phe; es decir, que el producto era la poli-Phe. De lo cual, Nirenberg y Matthaei concluyeron que el polímero poli-U efectivamente podía actuar como un mensajero y que contenía la información necesaria, en forma de los tripletes UUU, para que únicamente las unidades de fenilalanil-tRNA se incorporaran a los ribosomas y pudieran sintetizarse las cadenas de poli-Phe obtenidas. Cuando los investigadores emplearon otros mensajeros sintéticos como -- poli-A, poli-G, poli-I ó poli-AU (2:1) no se observó la incorporación de la Phe, pero se incorporaron otros aminoácidos; aunque no se determinó la secuencia precisa de bases involucrada ni los aminoácidos incorporados (R.S. Martín, J.H. Matthaei, D.W. Jones y M.W. Nirenberg, 1962).

2) Las aportaciones decisivas. Las investigaciones siguientes se encaminaron, obviamente, a tratar de determinar por un procedimiento similar las secuencias de los tripletes para los demás aminoácidos. Nirenberg y sus colaboradores así como Ochoa y su grupo, de manera independiente, iniciaron esta tarea.

Por una parte, Severo Ochoa y sus colaboradores empleando métodos bioquímicos sintetizaron varios copolímeros como el poli-UC, cada uno de los cuales contenía a dos de las cuatro bases en distintas proporciones. A continuación, los investigadores procedieron a determinar el grado de estímulo de tales mensajeros sintéticos sobre la incorporación de cada uno de los distintos aminoácidos al polipéptido insoluble en ácido, sintetizado por un sistema compuesto de ribosomas lavados obtenidos de *E. coli* y de los factores adicionales necesarios. Los resultados obtenidos, junto con cálculos sobre la probabilidad de la ocurrencia de una determinada secuencia de nucleótidos, permitieron asignar los tripletes de bases correspondientes a los distintos aminoácidos; de los cuales, los siguientes fueron correctos : Asp (GAU); Asn (AAU); Gly (GGU); Ile (AUU); Leu (CUU); --- Ser (UCC); Trp (UGG) y Val (GUU), (P. Lengyel, J.F. Speyer y S. Ochoa, 1961; J.F. Speyer, P. Lengyel, C. Basilio y S. Ochoa, 1962; P. Lengyel, J.F. Speyer, C. Basilio y S. Ochoa, 1962; J.F. Speyer, P. Lengyel, C. Basilio y S. Ochoa, 1963).

En tanto que, M. Nirenberg en 1964, desarrolló un nuevo método para investigar la naturaleza de los tripletes de bases para los distintos aminoácidos. En colaboración con P. Leder, Nirenberg descubrió que los ribosomas aislados de las células de *E. coli* y cultivados en un medio que contenía al Mg^{2+} ($MgCl_2$, 0.01M), eran capaces de unirse a las cadenas de polinucleótidos de los mensajeros sintéticos como el poli-U pero que, al mismo tiempo, también podían fijar a una molécula el aminoacil-tRNA especificado por la secuencia de bases del mensajero. En adí

ción, los investigadores encontraron en las pequeñas cadenas formadas por tres nucleótidos también dían actuar como mensajeros.



Y basados en estas observaciones, Nirenberg y sus colaboradores desarrollaron la llamada técnica de la fijación al ribosoma; durante cuyo desarrollo no ocurre la síntesis de las proteínas debido a la ausencia del GTP.

La técnica consistía en incubar ribosomas lavados con trinucleótidos de secuencia conocida como el pUpUpU, en presencia de los distintos aminoacil-tRNAs marcados con C^{14} en el residuo aminoácido; y después de un periodo de incubación determinado, la suspensión resultante era pasada a través de un filtro de nitrocelulosa que puede retener a los ribosomas pero no a las moléculas más pequeñas como los aminoacil-tRNAs.

Además bien, la fijación a los ribosomas de los distintos aminoacil-tRNAs marcados dependía de la presencia de un trinucleótido específico; pero si no ocurría tal fijación, el aminoacil-tRNA particular pasaría a través del filtro.

Y así, después de ensayar con distintas mezclas de los 20 aminoácidos, uno de los cuales estaba marcado con C^{14} , Nirenberg y sus colaboradores pudieron determinar los tripletes correspondientes a los distintos aminoácidos en poco más de un año (P. Leder y F. Nirenberg, 1964; M.R. Bernfield y F. Nirenberg, 1965; J.S. Trupin, F.M. Rottman, R.L.C. Brimacombe, P. Leder, M.R. Bernfield y M.W. Nirenberg, 1965; F. Nirenberg, P. Leder, M.R. Bernfield, R.L.C. Brimacombe, J.S. Trupin, F.M. Rottman y G. O'Hearl, 1965; R.L.C. Brimacombe, J.S. Trupin, M.W. Nirenberg, P. Leder, M.R. Bernfield y T. Jacuni, 1965).

La asignación de cadenas para los distintos aminoácidos de acuerdo con los resultados obtenidos por Nirenberg y sus colaboradores, mediante la técnica de la fijación al ribosoma.

1a.	2a.				3a.
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	---	Ser	---	---	A
	---	Ser	---	Trp	G
C	---	Pro	His	Arg	U
	---	Pro	His	Arg	C
	---	Pro	Gln	Arg	A
	---	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	---	Thr	Lys	---	A
	---	Thr	Lys	---	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

3) Dirección de lectura del Código Genético. Ahora bien, la técnica de la fijación al ribosoma introducida por Nirenberg no sólo permitió determinar la composición de los tripletes de bases que especifican a los distintos aminoácidos, de manera similar a los resultados obtenidos por Ochoa y sus colaboradores, sino que permitió además establecer la secuencia precisa de cada uno de los nucleótidos dentro de cada triplete.

Y así, Nirenberg y sus colaboradores encontraron que los trinucleótidos más activos para fijar a los distintos aminoácil-tRNAs a los ribosomas, eran aquellos que poseían un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo libre en el extremo 3'; mientras que los trinucleótidos fosforilados en el extremo 3' eran inactivos o poseían una actividad muy baja. De manera que, por ejemplo, el trinucleótido más activo para la Phe era el que tenía la secuencia (5')pUpUpU-OH (3'), y otros como el UpUpU ó el UpUUp eran menos eficientes. En adición, los investigadores descubrieron que un trinucleótido como el pGpUpU inducía la incorporación del valil-tRNA pero que el triplete pUpUpG no lo hacía; lo cual indicó claramente que los tripletes poseían una dirección específica de lectura, y que esta se hacía en la dirección 5'-3'. Con este conocimiento Nirenberg y sus colaboradores pudieron establecer la secuencia precisa de los nucleótidos dentro de cada triplete de bases para los distintos aminoácidos (M. J. Nirenberg et al., 1965).

Pronto hubo nuevos experimentos que permitieron confirmar esta observación. Empleando un sistema sin células al cual adicionaron el polímero sintético (5').pApApUpUpU-OH (3'), R. E. Thach y sus colaboradores (1965) descubrieron que esto conducía a la síntesis del dipéptido Lys-Phe pero no a la del dipéptido Phe-Lys. Por tanto, la lectura del hexanucleótido se iniciaba en extremo 5' (que codifica al grupo NH₂-terminal, que en este caso pertenecía al residuo de Lys) y procedía hacia el extremo 3' (que codifica al grupo -COOH-terminal, y que en este caso pertenecía a la Phe). Y nuevas investigaciones de Ochoa y sus colaboradores aportaron evidencias adicionales a este respecto. A un sistema compuesto por ribosomas de E. coli y un sobrenadante obtenido de L. arabinosus, los investigadores adicionaron mensajeros sintéticos del tipo A_nCA_n. Y así, el polinucleótido AAA...AAG, compuesto de 21 a 23 residuos, dirigió la síntesis del polipéptido Lys-Lys-Lys...Lys-Asn, en el cual el residuo de Asn ocupaba el extremo carboxilo-terminal. Pero al eliminar al residuo de citosina, ya no ocurrió la incorporación de la Asn y se obtuvo al polipéptido Lys-Lys-Lys...Lys, en el que ahora un residuo de Lys ocupaba el extremo carboxilo-terminal.

A continuación, Ochoa y sus colaboradores adicionaron otros polinucleótidos como el AAAACA...AAA (A₄CA_n) y el AAAACA...AAA (A₅CA_n) y encontraron que con el primero se formaba el polipéptido Lys-Thr...Lys, en tanto que el segundo, codificaba al polipéptido Lys-Asn...Lys. En ambos casos, la Thr y la Asn se hallaban junto al extremo amino-terminal; mientras que el grupo carboxilo-terminal era ocupado por un resto de Lys en los dos polipéptidos. Resultó claro para los investigadores que la lectura del mensaje contenido en los polinucleótidos sintéticos se efectuaba precisamente en la dirección 5'-3'; y, además, se comprobó que efectivamente las cadenas o palabras del código genético se hallan formados por tripletes de bases (C. Salas et al., 1965; M. Smith, E. Salas, W. Stanley, A. -- Bahba y S. Ochoa, 1966).

pero la demostración concluyente en este sentido proviene de experimentos genéticos. A. Tsugita y sus colaboradores (1965) cruzaron mutantes del fago T4, obtenidos por delección (eliminación) de algún nucleótido en la cadena del mRNA, con otros mutantes del mismo fago obtenidos mediante la inserción de algún nucleótido en la cadena del mRNA. Después de lo cual, los investigadores encontraron que los nuevos mutantes (recombinantes) sintetizaban una especie de lisosima que exhibía una marcada reducción en su actividad enzimática y que, además, contenía una secuencia de cinco aminoácidos diferentes a los que se encuentran en la lisosima sintetizada por la especie silvestre del fago.

Proteína sintetizada
por el fago silvestre

Thr-Lys-Ser-Pro-Ser-Leu-Asn-Ala-Ala-Lys

Secuencia de bases del
mRNA del fago silvestre:

eliminar → (A)GU-GCA-UCA-CUU-AAU-UC ← insertar G

Secuencia de bases del
mRNA del fago doble
mutante :

GUC-CAU-CAG-LUA-AUG-UC

Proteína sintetizada
por el fago doble
mutante :

Thr-Lys-Val-His-His-Leu-Met-Ala-Ala-Lys

De acuerdo con las secuencias conocidas de tripletes para cada aminoácido se construyó una posible estructura para el mRNA que concordará con la secuencia aminoácida de la proteína sintetizada por el fago de tipo silvestre. Así mismo, se construyó otra estructura para el mRNA del fago doble mutante que interpretara a la secuencia aminoácida de la lisosima sintetizada por este fago.

Y los investigadores hallaron que sólo una secuencia específica de nucleótidos del mRNA, mediante la eliminación de un residuo de adonina en el extremo 5' y la inserción de un residuo de guanina en el extremo 3', podía especificar mediante un corrimiento en el marco de lectura a la proteína sintetizada por el fago doble mutante y a la lisosima sintetizada por el fago de tipo silvestre. Lo cual indicaba de manera inequívoca, que la lectura del mensaje contenido en la secuencia de nucleótidos del mRNA se realizaba efectivamente en la dirección 5'-3'. Y, por otra parte, que los codones o palabras del código genético realmente se hallan constituidos por tripletes de bases; y, por último, que los tripletes asignados a algunos de los aminoácidos son correctos.

4) Nuevas evidencias experimentales. A fines de 1965, H.G. Khorana y sus colaboradores introdujeron un nuevo método para lograr la determinación de los tripletes que especifican a los distintos aminoácidos. . .

La técnica consistía en el empleo de sistemas sin células a los cuales se adicionaban polímeros sintéticos como mensajeros pero, a diferencia del método empleado por Ochoa, la secuencia de nucleótidos de estos polímeros era alternada y se hallaba perfectamente bien definida. De manera que, por ejemplo, el polímero $(U-C)_n$, si cada palabra del código genético se halla formada por tripletes de bases, podría leerse de la manera siguiente UCU-CUC-UCU-CUC; y, por tanto, debería codificar a una cadena polipeptídica con una secuencia alternada de aminoácidos. Y en efecto, eso es lo que ocurrió. — Pues los investigadores observaron la formación del polipéptido Ser-Leu-Ser-Leu. . . .

Mensajero	Aminoácidos incorporados	Mensajero	Aminoácidos incorporados
Dinucleótidos repetidos		Trinucleótidos repetidos	
Poli (U-C)	Ser-Leu	Poli (G-U-A)	Val, Ser
Poli (A-G)	Arg-Glu	Poli (U-A-C)	Tyr, Thr, Leu
Poli (U-G)	Val-Cys	Poli (A-U-C)	Ile, Ser, His
Poli (A-C)	Thr-His	Poli (G-A-U)	Met, Asp
Trinucleótidos repetidos		Tetranucleótidos repetidos	
Poli (U-U-C)	Phe, Ser, Leu	Poli (U-A-U-C)	Tyr, Leu, Ile, Ser
Poli (A-A-G)	Lys, Glu, Arg	Poli (C-A-U-A)	Ninguno
Poli (U-U-G)	Cys, Leu, Val	Poli (U-U-A-C)	Leu, Thr, Tyr
Poli (C-A-A)	Gln, Thr	Poli (G-U-A-A)	Ninguno

La incorporación de aminoácidos dirigida por polímeros de secuencia alternada y perfectamente bien definida según los resultados obtenidos por H.G. Khorana y sus colaboradores.

Y a continuación se ensayaron otros polímeros con dinucleótidos repetidos y alternados como el poli-AG, poli-UB y poli-AC, los cuales dirigieron la síntesis de los polipeptidos de secuencias alternadas de aminoácidos Arg-Glu (AGA-GAG), Val-Cys (UGU-GUG) y Thr-His (ACA-GAC), respectivamente. En tanto que, al emplear a un polímero con trinucleótidos repetidos como el poli-(U-U-C) se obtuvieron tres polipeptidos distintos: poli-Phe, poli-Ser y poli-Leu. Puesto que la secuencia de tal polímero se puede leer de tres maneras diferentes dependiendo del punto de partida:

UUC-UUC-UUC-...
UCU-UCU-UCU-...
CUU-CUU-CUU-...

Por otra parte, un polímero con secuencia de cuatro nucleótidos repetidos como el poli-(U-A-U-C), que puede leerse como UAU-GUA-UCU-AUC-UAU-GUA-..., condujo a la formación de un polipeptido con la secuencia repetida y alternada de los aminoácidos Tyr-Leu-Ile-Ser-...etc. Por último, los polímeros con secuencia repetida de cuatro nucleótidos poli-(G-A-U-A) y poli-(G-U-A-A) no condujeron a la incorporación de ningún aminoácido (H.G. Khorana, 1965; S. Nishimura, D.S. Jones, E. Ohtsuka, H. Hayatsu, T.M. Jacob y H.G. Khorana, 1965; S. Nishimura,

D.S. Jones y H.G. Khorana, 1965; H.G. Khorana, H. Büchi, H. Ghosh, N. Gupta, T.M. Jacob, H. Küssel, S. Margan, S.A. Narang, E. Ohtsuka y H.D. Sells, 1966; A.R. Margan, H.D. Sells y H.G. Khorana, 1966; H.G. Khorana, H. Büchi, T.M. Jacob, H. Küssel, S.A. Narang y E. Ohtsuka, 1967; H.G. Khorana, 1968).

Y así, con los resultados obtenidos por Khorana y sus colaboradores, los cuales concordaron con las conclusiones obtenidas mediante la técnica de la fijación al ribosoma de Nirenberg y su grupo — así como a las investigaciones de Ochoa y sus colaboradores —, se pudieron asignar aminoácidos específicos a 61 de las 64 posibles palabras o codones que componen al código genético. En tanto que, los tres codones restantes se identificaron como "señales" de terminación de la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las proteínas.

Tipo salvaje	Mutante	Sustitución
Arg (AGA)	→ Gly (GGA)	A → G
Asn (AAU)	→ Ser (AGU)	A → G
Ile (AUU)	→ Val (GUU)	A → G
Glu (GAA)	→ Gly (GGA)	A → G
Pro (CCC)	→ Ser (UCS)	C → U
Pro (CCC)	→ Leu (CUC)	C → U
Ser (UCU)	→ Phe (UUU)	C → U
Thr (ACA)	→ Ile (AUA)	C → U

Algunas sustituciones aminoácidas en la cubierta proteica de los mutantes del virus mosaico del tabaco (TMV)

y pirimidinas del RNA de tales virus. Después de lo cual, se procedió a infectar a las hojas de las plantas con las partículas mutantes del TMV, permitiendo que se replicaran

Y transcurrido cierto periodo, se aisló a las partículas fijadas a partir de los mutantes, y se procedió a estudiar las sustituciones aminoácidas en las proteínas de la cubierta elaborando mapas para las secuencias polipeptídicas. Los resultados obtenidos mostraron que en todos los casos, la sustitución aminoácida podía explicarse mediante la transformación química de la adenina en hipoxantina, que es equivalente a la guanina, y por la transformación de la citosina en uracilo (A. Tsugita y H. Fraenkel-Conrat, 1960; A. Tsugita y Tampakushitau Kakusan Kase, 1961; H.G. von Wittman, 1962 y 1963; H. Fraenkel-Conrat, 1964)

Estos resultados, junto a los obtenidos por Nirenberg, Ochoa y Khorana, confirmaron totalmente la existencia del código genético; y, en adición, mostraron que los codones o palabras de tal código corresponden a secuencias de tres nucleótidos en las cadenas del mRNA, por medio de las cuales, éste puede dirigir la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las proteínas especificando la secuencia correcta de aminoácidos.

Y, nuevamente, los experimentos de tipo genético permitieron disponer de evidencias in vivo acerca de la naturaleza del código genético, las cuales concordaron plenamente con las asignaciones de tripletes para los distintos aminoácidos obtenidas de las diferentes investigaciones in vitro.

Estas evidencias vinieron de los experimentos con mutantes del virus mosaico del tabaco (TMV). Tales mutantes se obtuvieron por tratamiento con ácido nítrico de las partículas del TMV, lo cual condujo a la desaminación química de las purinas

5) Naturaleza del Código genético. Y finalmente, como resultado de las conclusiones obtenidas en las investigaciones anteriores, se han podido deducir una serie de generalizaciones con respecto al Código Genético y son las siguientes.

Posición de los nucleótidos

1a.	2a.				3a.
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term	Term	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

El Código Genético.

T. Yamane, 1963; T.P. Bennett et al., 1965; H.U. Blank y D. Soll, 1971). Y puede observarse que en tales tripletes la tercera base es menos específica que las dos primeras; lo cual sugiere que, por lo general, la degeneración del código sólo implica a la tercera base. De manera que, el nucleótido en la posición 3' de cada codón puede ser una purina o una pirimidina, con lo que cada codón puede representarse por medio de los tripletes XY^A ó XY^U . Y por tanto, resulta evidente que las dos primeras bases de cada codón son las que determinan la especificidad de la lectura mientras que la tercera no es tan importante y tiende a ser variable.

Ahora bien, distintos investigadores demostraron que en los anticódones de algunos tRNAs se halla con frecuencia a la base inosina, como en el alanil-tRNA (IGC), seril-tRNA (ISA) y valil-tRNA (IAC), la cual invariablemente se une a la tercera base variable del respectivo codón en el mRNA (R.W. Holley et al., 1965).

a) El Código es universal.— Esto es que los vocablos del código que especifican a los distintos aminoácidos son los mismos en todas las especies.

Se han obtenido evidencias en este sentido a partir de experimentos en los cuales se "cruzaron" tRNAs de una especie con los codones del mRNA de otra especie diferente. Y así, G. von Ehrenstein y F. Lipmann (1961), y Elizabeth S. Maxwell (1962), demostraron que un sistema sin células formado por reticulocitos de conejo, tRNAs obtenidos de E. coli y los factores adicionales necesarios, era capaz de sintetizar a las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina en presencia del mRNA que codifica a esta proteína; y que se halla presente en los reticulocitos del conejo.

b) El Código es degenerado.— Lo cual indica que más de un triplete de bases puede especificar al mismo aminoácido.

Se han identificado cinco tRNAs distintos para la Leu en E. coli que pueden leer a los codones UUA, UUG, CUU, CUC, CUA y CUG (D.P. Doctor et al., 1961; R. Weissblum et al., 1962 y 1965; G. von Ehrenstein y D. Dais, 1963; N. Sueoka y

Y para poder explicar esta consecuencia de la degeneración del Código Genético F.H.C. Crick propuso la llamada "hipótesis de la variación". De acuerdo con tal hipótesis puede tolerarse cierto grado de "variación" ó "vacilación" en la tercera base de cada uno de los codones del mRNA siempre y cuando se cumplan ciertas reglas de apareamiento de bases entre el codón y su respectivo anticodón.

Aminoácido codificado :	Ala	Ser	Tyr	Val	Pho	
Anticodón :	GGI	AGI	AUG	GAI	AAG	
	3'	←	←	←	←	5'
Codón	GGC	UCG	UAC	GUU	UUU	
	5'	→	→	→	→	3'

Apareamientos permitidos de bases de acuerdo con la Hipótesis de la "variación" propuesta por F.H.C. Crick.

En tal forma que las llamadas bases "vacilantes" U, C y A, presentes en el extremo 3' de los distintos codones, sólo pueden unirse a la inosina presente en el extremo 5' de los respectivos anticodones; en tanto que, la guanina del extremo 5' de los anticodones sólo puede unirse mediante enlaces de hidrógeno con las bases "vacilantes" U y C, de los codones correspondientes. (F.H.C. Crick, 1961 y 1966).

c) El Código no se superpone.— Los distintos codones adyacentes en las cadenas del mRNA se hallan perfectamente definidos y no se superponen. Lo cual ha sido confirmado por distintos experimentos genéticos (B.C. Carlton y G. Yanofsky, 1963; H.G. Wittman y B. Wittman-Liebald, 1963; F.H.C. Crick, 1963).

d) El Código no tiene comas.— Es decir, que no existen señales especiales para diferenciar a cada uno de los codones y que, una vez iniciada la lectura, ésta se efectúa en forma secuencial y consecutiva. Lo cual encuentra apoyo experimental en investigaciones realizadas in vitro, en las cuales se emplea al FINA del fago f2 como mensajero, y se observó que la incorporación de un aminoácido relativamente alejado del extremo amino-terminal dependía de la incorporación previa de otros relativamente más próximos a tal extremo (J.H. Schwartz, 1965).

Sin embargo, la iniciación de la lectura del mRNA debe estar indicada de manera específica al comienzo del proceso de traducción. Lo que sugiere de inmediato que existe una señal única en el mRNA que indica el punto de iniciación de la lectura. Como se ha visto, esta señal de iniciación se halla representada por el codón AUG. Mientras que, los codones UAA, UAG y UGA que no codifican a ningún aminoácido, y que en un principio se los llamó "codones sin sentido", como se sabe representan las señales de terminación del proceso de traducción.

APENDICE

Cronología de la Bioquímica. A continuación se resumen los logros científicos más destacados en la Historia de la Biología y que contribuyeron en forma decisiva al surgimiento y desarrollo de la bioquímica.

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

- 1500 Leonardo da Vinci comparó la nutrición animal con el arder de una vela, indicando que los animales serían incapaces de sobrevivir en una atmósfera que no sostuviera la combustión.
- 1660 Lefevre, en su "Traité de Chimie", propuso que la función del aire consumido en la respiración era purificar la sangre.
- 1789 Seguin y Lavoisier efectuaron las primeras determinaciones sobre la velocidad del metabolismo humano.
- 1810 Gay-Lussac dedujo la ecuación de la fermentación alcohólica.
- 1833 Payen y Persoz aislaron la amilasa de la malta del centeno.
- 1836 Cagniard de Latour y Schwann señalaron que las levaduras eran responsables de la fermentación.
- 1836-37 Los trabajos de Schultze y Schwann se oponen a la teoría de la generación espontánea.
- 1837 Berzelius propuso la naturaleza catalítica de la fermentación.
- 1840 Liebig sostenía que la fermentación era un proceso químico que no dependía de organismos vivos.
- 1850 Bernard aisló el glucógeno del hígado mostrando que podía convertirse en glucosa sanguínea, simultáneamente descubrió el proceso de la gluconeogénesis.
- 1854-64 Pasteur demostró que la fermentación era provocada por microorganismos, descartando la hipótesis de la generación espontánea.
- 1872 Pflüger halló que todos los tejidos animales consumen oxígeno y que esta no es una función exclusiva de la sangre y los pulmones.
- 1897 Eduard Buchner descubrió que la fermentación alcohólica podía ser inducida por extractos de levadura exentos de células.
- 1905 Harden y Young demostraron que la fermentación alcohólica requería la presencia de fosfato y aislaron la primera coenzima, la cozimasa, que después se identificó como el NAD.
- 1907 Fletcher y Hopkins demuestran que durante la contracción muscular anaerobia se forma ácido láctico a partir de la glucosa.
- 1912 Neuberg propone una ruta metabólica química para la fermentación.
- 1930 Lundsgaard observó que los músculos pueden contraerse sin que haya producción de ácido láctico.

- 1932 Lohmann descubrió la reacción ATP-fosfocreatina.
- 1933 Embden y Meyerhof identificaron los metabolitos importantes que tienen en común la vía glucolítica y la fermentación.
- 1935 Schoenheimer y Rittenberg emplean por vez primera isótopos para el estudio del metabolismo intermedio de los carbohidratos.
- 1935 Szent-Györgyi observó el efecto catalítico de los ácidos dicarboxílicos en la respiración.
- 1937 Krebs postula el ciclo del ácido cítrico.
- 1937 Cori y Cori empezaron sus investigaciones incisivas sobre la glucógeno-fosforilasa.
- 1937-38 Warburg halló que la formación de ATP se encuentra acoplada con la deshidrogenación del gliceraldehído-3-fosfato.
- 1937-38 Lohmann y Schuster mostraron que la tiamina es un componente del grupo prostético de la piruvato-carboxilasa.
- 1948 Kennedy y Lehninger descubren que el ciclo del ácido tricarboxílico tiene lugar en las mitocondrias.
- 1948 Leloir y colaboradores identifican el papel de los nucleótidos uridínicos en la biosíntesis de los carbohidratos.
- 1948 Calvin y Benson observaron que el ácido fosfoglicérico es uno de los primeros intermediarios formados en la fijación fotosintética del CO₂.
- 1953 Horecker, Dickens y Racker esclarecen la vía de los fosfatos de penta-sa.

METABOLISMO DE LIPIDOS

- 1904 Knoop deduce el mecanismo de beta-oxidación para la degradación de los ácidos grasos.
- 1922 Ruzicka identifica al isopreno como unidad constitucional de muchos productos naturales.
- 1935 Schoenheimer y Rittenberg introducen el empleo de isótopos para estudiar el metabolismo intermedio de lípidos.
- 1942 Bloch y Rittenberg descubren que el acetato es precursor del colesterol.
- 1943-47 Leloir y Muñoz muestran la oxidación de ácidos grasos en sistemas enteros de células; Lehninger descubre el requerimiento de ATP y deduce la estequiometría de la oxidación de ácidos grasos.
- 1948 Kennedy y Lehninger indican que la oxidación de los ácidos grasos ocurre en las mitocondrias.
- 1947-50 Lipmann y Kaplan aislaron y caracterizaron la coenzima A.
- 1951 Lynen postuló el papel de la coenzima A. Poco después Lynen, Green y Ochoa aislaron las enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos.

1954-58 Kennedy descubre la ruta biosintética de los triglicéridos y fosfoglicéridos, así como el papel de los nucleótidos citidínicos.

METABOLISMO DE AMINOACIDOS

- 1752 Réaumur en experimentos con aves descubrió que el jugo gástrico licuaba las proteínas ingeridas.
- 1773 Rouelle aisló la urea de la orina.
- 1783 Spallanzani deduce que la digestión proteica en el estómago es un proceso más químico que mecánico.
- 1823 Prévost y Dumas descubren que la urea es transportada en la sangre.
- 1828 Wöhler sintetiza la urea a partir del cianato de plomo y amoniaco.
- 1836 Magendie mostró el requerimiento de nitrógeno en la dieta.
- 1836 Schwann reportó la acción de la pepsina y describió sus propiedades.
- 1856 Corvisart describió las propiedades de la tripsina.
- 1862 Danielewski logró separar la tripsina de la amilasa pancreática por adsorción diferencial.
- 1926 Sumner logró preparar la ureasa cristalina.
- 1930-31 Northrup cristaliza la pepsina, y Northrup y Kunitz obtienen la tripsina cristalina.
- 1933 Krebs y Henseleit descubren el ciclo de la urea.
- 1938 Braunstein y Kritzman descubren las reacciones de transaminación.
- 1956 Umbarger indica que en la biosíntesis de leucina a partir de treonina el producto final inhibe la primera enzima de la secuencia reaccional. Yates y Pardee describen la retroinhibición de la aspartato-transcarbamilasa por el trifosfato de citidina.
- 1950-65 En este periodo se esclarecen las etapas principales de las síntesis y degradaciones de los diferentes aminoácidos como resultado de las investigaciones de A.E. Braunstein, M.J. Coon, D.I. Crandall, B.O. Davis, D.M. Greenberg, I.C. Gunsalus, W.E. Knox, A. Meister, W.G. Robinson, D.B. Sprinson, H.E. Umbarger y otros.

METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS

- 890-1903 Kossel y colaboradores realizan las primeras investigaciones químicas sobre los productos de hidrólisis de los ácidos nucleicos.
- 1925-30 Levene deduce la estructura de los mononucleótidos y demuestra que son las unidades estructurales de los ácidos nucleicos.
- 1935-36 Warburg y Euler aislan y determinan la estructura y función de los nucleótidos piridínicos.

- 1943 Barnes y Schoenheimer emplean isótopos para estudiar el metabolismo intermedio de los nucleótidos de purina y pirimidina.
- 1950-65 En este periodo se elucidan las etapas enzimáticas implicadas en las síntesis y degradaciones de los nucleótidos de purina y pirimidina gracias a las aportaciones de K. Bloch, J.M. Buchanan, G.R. Greenberg, H.M. Kalckar, A. Kornberg, B. Magasanik, P. Reichard y otros.

METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS

- 1869 Miescher descubre el DNA.
- 1927 Muller y Stadler demuestran ~~la mutación artificial~~ de los genes por los rayos X.
- 1944 Avery, MacLeod y McCarty descubren que el DNA induce transformaciones bacterianas.
- 1950-53 Chargaff y colaboradores describen la equivalencia de bases en el DNA.
- 1952 Hershey y Chase en experimentos isotópicos mostraron que el DNA es el portador de la información genética.
- 1953 Watson y Crick postulan el modelo de la doble hélice para la estructura del DNA.
- 1955 Ochoa y Grunberg-Manago descubren la polinucleótido-fosforilasa.
- 1956 A. Kornberg aisla y caracteriza la DNA polimerasa.
- 1958-59 S.B. Weiss, J. Hurwitz y A. Stevens, independientemente, descubren la RNA polimerasa DNA-dirigida.
- 1958 Meselson y Stahl aportan la confirmación experimental del modelo de Watson y Crick para la replicación semiconservadora del DNA.
- 1968-72 R.R. Burgess y otros estudian en detalle la RNA polimerasa, así como el mecanismo implicado en la transcripción del DNA.
- 1960-75 En este periodo se estudian intensivamente las etapas individuales de la rénlica semiconservadora del DNA por B.M. Albers, J. Cairns, D. Dressler, A. Kornberg, R. Okazaki, N. Sueoka y muchos más.

SINTESIS DE PROTEINAS Y CODIGO GENETICO

- 1938-39 Schoenheimer y colaboradores emplean isótopos para estudiar el metabolismo de las proteínas.
- 1941 Brachet y Caspersson efectúan sus clásicos estudios citológicos en los observan la síntesis de proteínas.
- 1952-54 Zamenick y colaboradores descubren que las partículas de ribonucleoproteína, los ribosomas, son los sitios de la síntesis proteica.
- 1955 Benzer construye mapas genéticos de estructura fina, llegando a la conclusión de que un gene posee varios sitios mutables.

- 1957 Hoagland, Zamenick y Stephenson aislan el RNA de transferencia y postulan su función.
- 1957 Vogel, Magasanik y otros describen la represión genética de la síntesis enzimática.
- 1956-58 Anfinsen y White llegan a la conclusión de que la conformación tridimensional de las proteínas viene especificada por su secuencia aminoácida.
- 1958 Crick enuncia el dogma central de la genética molecular.
- 1961 Jacob y Monod proponen la hipótesis del operón y postulan la función del RNA mensajero.
- 1961 Nirenberg y Matthaei descubren que el ácido poliuridílico codifica a la colifenilalanina, abriendo el camino para la identificación del código genético.
- 1961-65 Los laboratorios de Nirenberg, Khorana y Ochoa identifican los vocablos del código genético de los aminoácidos.
- 1960-75 En este periodo se afinan numerosos detalles del mecanismo implicado en la síntesis de proteínas debido a las aportaciones de J.E. Allende, P. Leder, F. Lipmann, K.A. Marcker, K. Moldave, S. Ochoa, J.M. Ravel, M. Revel, R.S. Schweet, P.C. Zamenick y muchos más.

BIBLIOGRAFIACapítulo I (Metabolismo)

Libros

1. Educational Programs Improvement Corporation (EPIC), Venezuela: "Ciencias Biológicas: De las moléculas al Hombre", Cap. 20; C.E.C.S.A., México, 1975.
2. FINEAN, I.B., COLEMAN, R. y MICHELL, R.H.: "Membranes and Their Cellular Functions" ; Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1974.
3. GIESE, A.C.: "Fisiología Celular y General", 3a.ed., Cap. 13 y 18; Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, 1975.
4. GOODWIN, T.W.: "Recent Advances in Biochemistry", 4a.ed., Cap. 8; Little Brown and Co., Boston, 1960.
5. GREEN, D.E. y GOLDBERGER, R.F.: "Molecular Insights into the Living Process", Cap. 12; Academic Press Inc., N.Y., 1967.
6. JESSOP, N.M.: "Biosfera: Los Seres Vivos y Su Ambiente", Cap. 14; Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1975.
7. LEHNINGER, A.L.: "Bioquímica", Cap. 13 y 32; Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1972.
8. LEVY, J., CAMPBELL, J.R. y BLACKBURN, T.H.: "Introductory Microbiology", Cap. 10; John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 1973.
9. MERTZ, E.T.: "Bioquímica", Cap. 10; Publicaciones Cultural, S.A., México, 1974.
10. OSER, B.L. (ed): "Hawk's Physiological Chemistry", 14ava.ed., Cap. 15-18; McGraw-Hill Inc., N.Y., 1965.

Artículos

11. ALBERS, R.S.: "Biochemical Aspects of Active Transport", Ann. Rev. Biochem., 36, 727-756 (1967).
12. ATKINSON, D.E.: "Regulation of Enzyme Activity", Ann. Rev. Biochem., 35, 85-124 (1966).
13. DEMAIN, A.L.: "Overproduction fo Microbial Metabolites and Enzymes Due to Alteration of Regulation", Advan. Biochem. Eng., 1, 113-142 (1971).
14. HOLTZER, H. y DUNTZE, W.: "Metabolic Regulation by Chemical Modification of Enzymes", Ann. Rev. Biochem., 40, 345-374 (1971).
15. JOST, J.-P. y RICKENBERG, H.V.: "Cyclic AMP", Ann. Rev. Biochem., 40, -741-774 (1971).
16. OXENDER, D.L.: "Membrane Transport", Ann.Rev.Biochem., 41, 777-814 (1972).
17. RICKENBERG, H.V.: "Cyclic AMP in Procariots", Ann. Rev. Microbiol., 28, 353-369 (1974).

18. ROBISON, G.A, BUTCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W.: "Cyclic AMP", *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 149-174 (1968).
19. SRERE, P.A. y MOSBACH, K.: "Metabolic Compartmentation: Symbiotic, Organellar, Multienzymic and Microenvironmental", *Ann. Rev. Microbiol.*, 28, 61-83 (1974).
20. STADTMAN, E.R.: "Allosteric Regulation of Enzyme Activity", *Advan. Enzymol.*, 28, 41-154 (1966).
21. STADTMAN, E.R.: "Mechanisms of Enzyme Regulation in Metabolism" en P.D. Boyer (ed), "The Enzymes", 3a.ed., Vol. 1, Academic Press, N.Y. 1970.
22. WILSON, D.B.: "Cellular Transport Mechanism", *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 933-965 (1978).

Capítulo II (Metabolismo de Carbohidratos)

Libros

1. BOYER, P.D., LARDY, H. y MYRBÄCK, K. (eds): "The Enzymes", 2a.ed., vols. 1-5, Academic Press, Inc., N.Y. 1961.
2. FLORKIN, M. y STOTZ, E.H. (eds): "Comprehensive Biochemistry", Vol. 31, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1975.
3. FLORKIN, M. y STOTZ, E.H. (eds): "Comprehensive Biochemistry", Vol. 33A, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1979.
4. FRUTON, J.S. y SIMMONDS, S.: "General Biochemistry", 2a.ed., Cap. 20-22, John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 1960.
5. GREENBERG, D.M. (ed): "Metabolic Pathways", 2a.ed., Vol. 1, Academic Press, Inc., N.Y., 1960.
6. GREENBERG, D.M. (ed): "Metabolic Pathways", 3a.ed., Vols. 1-2, Academic Press, Inc., N.Y., 1967.

Artículos

1. AXELROD, B.: "Other Pathways of Carbohydrate Metabolism" en Greenberg, D.M. (ed): "Metabolic Pathways", 3a.ed., Vol. 1, Academic Press Inc., N.Y., 1967.
2. CLARK, M.G. y LARDY, H.A.: "Regulation of Intermediary Carbohydrate Metabolism" en Whelan, W.J. (ed): "MTP International Review of Science, Biochemistry Series One", Vol. 5, Butterworths, London, 1975.
3. KREBS, E.G. y PREISS, J.: "Regulatory Mechanisms in Glycogen Metabolism" en Whelan, W.J. (ed): "MTP International Review of Science, Biochemistry Series One", Vol. 5, Butterworths, London, 1975.
4. SCRUTTON, M.C. y UTTER, M.F.: "The Regulation of Glycolysis and Gluconeogenesis in Animal Tissues", *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 249-302 (1968).
5. STADTMAN, E.R.: "Allosteric Regulation of Enzyme Activity", *Advan. Enzymol.*, 28, 41-154 (1966).

Capítulo III (Metabolismo de Lípidos)

Libros

1. DEUEL, H.J. (ed): "The Lipids", Vol. 3, Interscience Publishing Inc., N.Y., 1957.
2. ERWIN, J.A.: "Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms", Academic Press Inc., N.Y., 1973.
3. FLORKIN, M. Y STOTZ, E.H. (eds): "Comprehensive Biochemistry", Vol. 31, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1975.
4. FLORKIN, M. Y STOTZ, E.H. (eds): "Comprehensive Biochemistry", Vol. 32, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1977.
5. FLORKIN, M. Y STOTZ, E.H. (eds): "Comprehensive Biochemistry", Vol. 33A, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1979.
6. FRUTON, J.S. Y SIMMONDS, S.: "General Biochemistry", 2a.ed., Cap. 24-25, John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 1960.

Artículos

1. BLOCH, K.: "Control Mechanisms in The Synthesis of Saturated Fatty Acids", Ann. Rev. Biochem., 46, 263-298 (1977).
2. DEMPSEY, M.E.: "Regulation of Steroid Biosynthesis", Ann. Rev. Biochem., 43, 967-990 (1974).
3. FINNERTY, W.R.: "Physiology and Biochemistry of Bacterial Phospholipid Metabolism", Advan. Microb. Phys., 18, 177-233 (1978).
4. GAYLOR, J.L.: "Enzymes of Sterol Biosynthesis" en Goodwin, T.W. (ed): "MTP International Review of Science, Biochemistry Series One", Vol. 4, Butterworths, London, 1974.
5. JAENICKE, L. Y LYNNEN, F.: "Coenzyme A" en Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrback (eds): "The Enzymes", 2a.ed., vol. 3, Academic Press Inc., N.Y., 1961.
6. LENNARZ, W.J.: "Lipid Metabolism", Ann. Rev. Biochem., 39, 359-388 (1970).
7. MCGARRY, J.D. y FOSTER, D.W.: "Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production", Ann. Rev. Biochem., 49, 395-420 (1980).
8. MCMURRAY, W.C. y MAGEE, W.L.: "Phospholipid Metabolism", Ann. Rev. Biochem., 41, 129-160 (1972).
9. OLSON, J.A.: "Lipid Metabolism", Ann. Rev. Biochem., 35, 559-598 (1966).
10. VAGELOS, P.R.: "Lipid Metabolism", Ann. Rev. Biochem., 33, 139-172 (1964).
11. VAGELOS, P.R.: "Acyl Group Transfer" en Boyer, P.D. (ed): "The Enzymes", 3a.ed., Vol. 8, Academic Press Inc., N.Y., 1973.

12. VAGELOS, P.R.: "Biosynthesis of Saturated Fatty Acids" en Goodwin, T.W. (ed) : "MTP International Review of Science, Biochemistry Series One", Vol. 4, Butterworths, London, 1974.
13. VAN DER BOSCH, H.: "Phosphoglyceride Metabolism", Ann. Rev. Biochem., 43, 243-277 (1974).
14. VOLPE, J.J. y VAGELOS, P.R.: "Saturated Fatty Acid Biosynthesis and its Regulation", Ann. Rev. Biochem., 42, 21-60 (1973).
15. WAKIL, S.J.: "Lipid Metabolism", Ann. Rev. Biochem., 31, 369-406 (1962).

Capítulo IV (Metabolismo de Aminoácidos)

Libros

1. FLORKIN, M. y STOTZ, E.H. (eds): "Comprehensive Biochemistry", Vol. 31, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1975.
2. FLORKIN, M. y STOTZ, E.H. (eds): "Comprehensive Biochemistry", Vol. 32, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1977.
3. FRUTON, J.S. y SIMMONDS, S.: "General Biochemistry", 2a.ed., Cap. 31-33, John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 1960.
4. MEISTER, A.: "Biochemistry of The Amino Acids", 2a.ed., Vols. 1 y 2, Academic Press Inc., N.Y., 1965.

Artículos

1. GREENBERG, D.M.: "Biosynthesis of Amino Acids and Related Compounds" en Greenberg, D.M. (ed): Metabolic Pathways, Vol. 2, Academic Press Inc., N.Y., 1961.
2. UMBARGER, H.E.: "Regulation of Amino Acid Metabolism", Ann. Rev. Biochem., 38, 323-370 (1969).
3. UMBARGER, H.E.: "Regulation of Amino Acid Biosynthesis in Micro-organisms" en Arnstein, H.R.V. (ed): "MTP International Review of Science, Biochemistry Series One", Vol. 7, Butterworths, London, 1975.
4. UMBARGER, H.E.: "Amino Acid Biosynthesis and Its Regulation", Ann. Rev. Biochem., 47, 533-606 (1978).

Capítulo V (Metabolismo de Nucleótidos)

Libros

1. FLORKIN, M. y STOTZ, E.H. (eds): "Comprehensive Biochemistry", Vol. 32, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1977.
2. FRUTON, J.S. y SIMMONDS, S.: "General Biochemistry", 2a.ed., Cap. 7 y 35, John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 1960.
3. HARPER, H.A.: "Manual de Química Fisiológica", Cap. 16, Editorial El Manual Moderno, México, 1976.

4. HENDERSON, J.F. y PATERSON, A.R.P.: "Nucleotide Metabolism", Academic Press Inc., N.Y., 1973.
5. KORNBERG, A.: "DNA Synthesis", Cap. 2, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1974.

Artículos

1. BLAKLEY, R.L. y VITOLS, E.: "The Control of Nucleotide Biosynthesis", Ann. Rev. Biochem., 37, 201-224 (1968).
2. BUCHANAN, J.M. y HARTMAN, S.C.: "Enzymic Reactions in The Synthesis of The Purines", Advan. Enzymol., 22, 199-261 (1959).
3. LASKOWSKI, M. Sr.: "DNA-ases and Their Use in The Studies of Primary Structure of Nucleic Acids", Advan. Enzymol., 29, 165-257 (1968).
4. MAGASANIK, B.: "Biosynthesis of Purine and Pyrimidine Nucleotides" en Gunsalus, I.C. y Stanier, R.Y. (eds): "The Bacteria", Vol. 3; Academic Press Inc., N.Y., 1962.
5. REICHARD, P.: "The Enzymic Synthesis of Pyrimidines", Advan. Enzymol., 21, 263-294 (1959).
6. SCHULMAN, M.P.: "Purines and Pyrimidines" en Greenberg, D.M. (ed): "Metabolic Pathways", 2a.ed., Vol. 2, Academic Press Inc., N.Y., 1961.
7. UEDA, T. y FOX, J.J.: "The Mononucleotides", Advan. Carbohydrate Chem., 22, 307-419 (1967).
8. WARREN, L.: "Nucleotides and Nucleosides" en Greenberg, D.M. (ed): "Metabolic Pathways", 2a.ed., Vol. 2, Academic Press Inc., N.Y., 1961.

Capítulo VI (Metabolismo de Acidos Nucleicos)

Libros

1. GROS, F. y GRUNBERG-MANAGO, M.: "Biosíntesis de los Acidos Nucleicos", Editorial Omega, S.A., Barcelona, 1976.
2. KORNBERG, A.: "DNA Synthesis", W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1974.

Artículos

1. EMMERSON, P.T.: "DNA Replication in E. coli" en "MTP International Review of Science, Biochemistry Series One", Vol. 6, Butterworths, London, 1974.
2. GOULIAN, M.: "Biosynthesis of DNA", Ann.Rev.Biochem., 40, 855-898 (1971).
3. KLEIN, A. y BONHOEFFER, F.: "DNA Replication", Ann. Rev. Biochem., 41, 301-332 (1972).
4. MATSUSHITA, T. y KUBITSCHER, H.E.: "DNA Replication in Bacteria", Advan. Microb. Phys., 12, 247-327 (1975).

Libros

1. BURDON, R.H.: "RNA Biosynthesis", Chapman and Hall Ltd., London, 1976.
2. DAVIDSON, J.N.: "The Biochemistry of The Nucleic Acids", Cap. 12; Chapman and Hall Ltd., London, 1972.

Artículos

1. ABELSON, J.: "RNA Processing and The Intervening Sequence Problem", Ann. Rev. Biochem., 48, 1035-1069 (1979).
2. BRAWERMAN, G.: "Eukaryotic Messenger RNA", Ann. Rev. Biochem., 43, 621-642 (1974).
3. BURGESS, R.R.: "RNA Polymerase", Ann. Rev. Biochem., 40, 711-740 (1971).
4. CHAMBERLIN, M.J.: "The Selectivity of Transcription", Ann. Rev. Biochem., 43, 721-775 (1974).
5. GEIDUSCHEK, G.P. y HASELKORN, R.: "Messenger RNA", Ann. Rev. Biochem., 38, 647-676 (1969).
6. HAYES, D.: "Mechanisms of Nucleic Acid Synthesis", Ann. Rev. Microbiol., 21, 369-379 (1967).
7. LOSICK, R.: "In Vitro Transcription", Ann. Rev. Biochem., 41, 409-446 (1972).
8. MADISON, J.T.: "Primary Structure of RNA", Ann. Rev. Biochem., 37, 131-148 (1968).
9. NEIDHARDT, F.C., PARKER, J. y MCKEEVER, W.G.: "Function and Regulation of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Prokaryotic and Eukaryotic Cells", Ann. Rev. Microbiol., 29, 215-250 (1975).
10. PERRY, R.P.: "Processing of RNA", Ann. Rev. Biochem., 45, 605-629 (1976).
11. SINGER, M.F.: "Messenger RNA: An Evaluation", Ann. Rev. Biochem., 35, 195-230 (1966).

Capítulo VII (Síntesis de Proteínas y Código Genético)

Libros

1. DAVIDSON, J.N.: "The Biochemistry of The Nucleic Acids", Cap. 13; Chapman and Hall Ltd., London, 1972.
2. SMITH, A.: "Protein Biosynthesis", Chapman and Hall Ltd., London, 1976.

Artículos

1. AVES, B.N. y MARTIN, R.G.: "Biochemical Aspects of Genetics: The Operon", Ann. Rev. Biochem., 33, 235-258 (1964).
2. ATTARDI, G.: "The Mechanism of Protein Synthesis", Ann. Rev. Microbiol., 21, 383-416 (1967).

3. COHEN, G.N. y GROS, F.: "Protein Biosynthesis",
Ann. Rev. Biochem., 29, 525-546 (1960).
4. EPSTEIN, W. y BECKWITH, J.R.: "Regulation of Gene Expression",
Ann. Rev. Biochem., 37, 411-435 (1968).
5. HASELKORN, R. y ROTHMAN-DENES, L.B.: "Protein Synthesis",
Ann. Rev. Biochem., 42, 397-438 (1973).
6. LUCAS-LENARD, J.: "Protein Biosynthesis",
Ann. Rev. Biochem., 40, 409-418 (1971).
7. MAAS, W.K. y MCFALL, E.: "Genetic Aspects of Metabolic Control",
Ann. Rev. Microbiol., 18, 95-110 (1964).
8. NOVELLI, G.D.: "Amino Acid Activation for Protein Synthesis",
Ann. Rev. Biochem., 36, 449-484 (1967).
9. SCHWEET, R. y HEINTZ, R.: "Protein Synthesis",
Ann. Rev. Biochem., 35, 723-758 (1966).
10. SIMPSON, M.V.: "Protein Biosynthesis",
Ann. Rev. Biochem., 31, 333-368 (1962).