GACETA MEDICA DE MEXICO
Tomo XC. Nº 9
Septiembre de 1960

INVESTIGACIONES RELACIONADAS CON ACIDOS NUCLEICOS Y RIBONUCLEICOS *

Dr. Roberto Llamas

Si estuviésemos obligados a señalar cuáles son los más importantes substratos materiales de los fenómenos vitales, deberíamos de contestar diciendo que son los ácidos nucleicos. Efectivamente, el ácido desoxi-ribonucleico, de predominio nuclear, integra los genes, relacionados íntimamente con el fenómeno biológico de la herencia. El llamado desde hace mucho tiempo plasma germinativo por Weissmann, o sea la substancia cromatínica de las gametas, es virtualmente inmortal y su transmisión de progenitores a descendientes, mediante los inmutables mecanismos mendelianos, permitió posteriormente a Morgan integrar un grupo de doctrina que conocemos ahora como teoría genética de la herencia.

Las peculiares características físicoquímicas de los genes por lo tanto, determinarán las modalidades de los caracteres por ellos representados y sus alteraciones modificarán a éstos haciendo aparecer variaciones, todas ellas de tipo hereditario, entre las cuales son de mencionarse como importantes las patológicas, o sean las enfermedades hereditarias.

En el citoplasma, particularmente en las mitocondrias y en los microsomas, pero también en el líquido intercorpuscular que las rodea, se encuentran dos ácidos ribonucleicos, uno de ellos de peso molecular bajo, conocido con el nombre de soluble, en la fracción sobrenadante y el otro, de peso molecular elevado, existente sobre todo en los microsomas y cuya importancia en la síntesis de las proteínas es grande. La intervención de este ácido en la síntesis de los prótidos, conocido a partir de los trabajos iniciales y ya clásicos de Cassperson,[1] es cada vez mejor conocida.

El ácido desoxi-ribonucleico de los núcleos celulares, gobierna la síntesis del ribonucleico citoplásmico, imprimiendo a la molécula de ésta sus peculiaridades

* Leído en la sesión del 10 de agosto de 1960.

estructurales, peculiaridades que, a su vez, hacen que la molécula proteica, en cuya síntesis interviene el ribonucleico, tenga las suyas propias. De acuerdo con este punto de vista, por ejemplo, la síntesis normal de enzimas está gobernada por los genes al través del ácido ribonucleico citoplásmico. Estos conceptos bioquímicos son de extraordinaria trascendencia y han abierto una ancha puerta para lograr avances importantes en el conocimiento de la fisiología celular y de muchas de sus anomalías.

La estructura del ácido desoxi-ribonucleico se conoce; se sabe cuáles son las bases que lo integran y cómo se articulan con la desoxi-ribosa y con los radicales fosfóricos. Se conoce la disposición estructural de la molécula en la forma característica de la doble espiral.

La hidrólisis mediante enzimas o por medio de ácidos, revela que el ácido desoxi-ribonucleico se degrada en la forma siguiente:

Acido DRN ——→ nucleótidos ——→ nucleósidos +
Acido fosfórico ——→ bases púricas y pirimídicas +
desoxi-ribosa.

En la mayor parte de los ácidos desoxi-ribonucleicos examinados predominan las bases púricas adenina y guanina y las pirimídicas timina y citosina. En algunos otros se ha encontrado 5-metil citosina o 5-hidroximetil citosina en lugar de citosina y 6-metil amino purina, o sea una peculiar base púrica característica, al parecer, de ciertas bacterias.

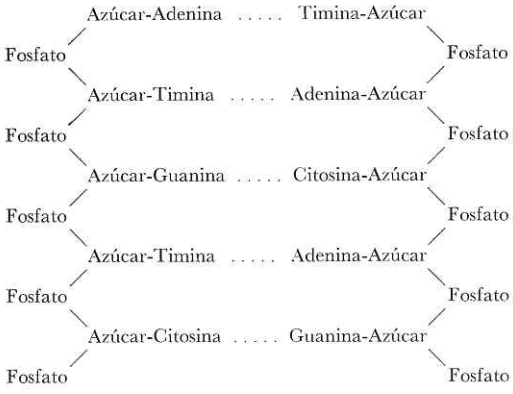
Es conveniente recordar el hecho de que la desoxi-ribosa, posee tres grupos oxhidrilo, en posición 1, 3 y 5; uno de ellos, el primero, se une a una base púrica o pirimídica mientras que los otros dos, el 3 y el 5, se unen a radicales fosfóricos en la característica unión diester 3-5.

Con base en estos hallazgos se ha establecido la estructura general del ácido desoxi-ribonucleico.

Los estudios de Wilkins [2] sobre difracción a los rayos X, demuestran que existe un patrón molecular uniforme para todas las variedades de ácido desoxi-ribonucleico, o sea, que está integrada la molécula por dos o más cadenas de polinucleótidos dispuestos en estructura helicoidal. Watson y Crieck [3] han establecido un modelo de esta molécula y señalan que está integrada por dos cadenas de polinucleótidos en forma helicoidal, unidos mediante puentes de hidrógeno entre las bases. Existe, además, lo que pudiera llamarse formación de pares entre dichas bases o sea que cada par de éstas es simétrico y equivalente en relación con las uniones desoxi-ribosa fosfato.

En el cuadro siguiente se ejemplifica esta estructura entre las bases adenina y timina y guanina y citosina, puede verse que la adenina, base púrica, se une a la timina, base pirimídica y que la guanina, también base púrica, se une a la citosina, a su vez, base pirimídica.

Otros muchos estudios, entre los cuales deben mencionarse los de Thomas,[4] Shumaker [5] y los de Meselson y Sthal [6] apoyan la realidad de esta estructura.



La estructura del ácido ribonucleico no se conoce con exactitud y el esfuerzo de los investigadores se ha orientado a conocer el proceso de su síntesis. Los trabajos de Ochoa,[7] Grunberg-Manago y Col.,[8, 9] Littauer y Kornberg,[10] Heppel,[11] etc., han aclarado aspectos muy importantes en dicha síntesis, que pueden ser esquematizados en la forma siguiente: a partir de difosfatos de nucleósidos y mediante la intervención de una enzima, o sea de una fosforilasa, encontrada en bacterias (Azotobacter vinelandii) se obtiene la polimerización del sustrato y la formación del polirribonucleótido correspondiente con eliminación de fósforo de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$n\,(XRPP) \xrightleftharpoons{Mg.\,+++} (XRP)\,n + n \quad \text{fosfato}$$

X representa la base: adenina, guanina, hipoxantina, uracilo o citosina, R la ribosa y F los radicales fosfóricos. La reacción es reversible.

Al parecer, la enzima cataliza la adición de difosfatos de nucleósido y la reacción guarda ciertas semejanzas con la ejercida por la fosforilasa que interviene en la síntesis del glucógeno. La catálisis se efectúa no solamente a partir de mezclas de los cuatro difosforribonucleósidos naturales, sino que también conduce a la formación de polirribonucleótidos no naturales cuando se emplean los substratos adecuados.

Los polirribonucleótidos sintetizados por esta enzima son semejantes al ácido ribonucleico en lo que respecta a estructura, tamaño molecular, difracción a los

rayos X y comportamiento frente a diversas enzimas como las fosfodiesterasas del veneno de serpiente y del bazo y, la ribonucleasa pancreática cristalina. Esta última enzima, por ejemplo, hidroliza al ácido ribonucleico obtenido por síntesis, dando origen a oligonucleótidos y a los ácidos uridílico y citidílico, estas substancias son idénticas a las obtenidas por la hidrólisis del ácido ribonucleico natural.

La significación biológica de estos hallazgos es poco clara pero según Ochoa [7] el hecho de que Hilmoe y Heppel [12] hayan encontrado una fosforilasa semejante en el tejido hepático y que también parece existir en los vegetales superiores "justifica la idea de que este fermento se halle implicado de una manera general en la biosíntesis del ácido ribonucleico".

Por lo que se refiere al ácido desoxirribonucleico, los trabajos de Lehman,[13] han demostrado que la incubación de mezclas de trifosfatos de desoxirribonucleótidos con una preparación enzimática purificada obtenida de Escherichia coli, en presencia de una pequeña cantidad de ácido desoxirribonucleico como iniciador de la reacción, lleva a la formación de polidesoxirribonucleótidos, cuyas características son muy semejantes también a las del ácido desoxirribonucleico natural. Las unidades de nucleótido en el producto sintético poseen la unión diester 3'-5' que se considera como característica del ácido desoxirribonucleico natural.

Aunque tampoco por el momento no es dable comprender plenamente la significación biológica futura de estos descubrimientos, pueden ellos ser el punto de partida para la síntesis del ácido desoxirribonucleico o sea del material genético fundamental y de los virus, integrados por este ácido, y cuya característica peculiar de moléculas capaces de multiplicación, las sitúan en la iniciación de los fenómenos vitales.

Ribonucleasa

Esta enzima, presente en todos los tejidos en que ha sido investigada, cataliza una reacción de transfosforilación que conduce a la hidrólisis de algunas uniones fosfato diester. Despolimeriza al ácido ribonucleico y deja en libertad diversos mononucleótidos y polinucleótidos.

En el hígado existen dos actividades ribonucleásicas: una a pH 5.8 y otra a pH 8.2, según estudios de Roth [14] y de Lamirande y Allard.[15]

Reid y Nodes [16] han señalado que la ribonucleasa alcalina del tejido hepático deja en libertad nucleótidos cíclicos pirimidímicos que no son atacados posteriormente; por lo contrario, la ribonucleasa ácida de este mismo tejido, libera nucleótidos cíclicos purínicos y pirimidímicos que son posteriormente degradados y producen ácidos adenílico y citidílico.

De acuerdo con los estudios de Zitko y Col.[17] se acepta la existencia de dos ribonucleasas como substancias químicamente distintas y no solamente de una

sola con diversas modalidades de acción dependientes de la acidez o de la alcalinidad.

En el tejido cerebral las actividades óptimas corresponden a los pH 5.5 y 8.0 en el tejido esplénico Maver y Greco [18] encuentran un pH característico y en cambio Hilmoe y Heppel [19] señalan 3.

La actividad de la ribonucleasa alcalina es mayor que la de la ácida en diversos tejidos como la mucosa intestinal, bazo, hígado, corazón, corteza cerebral, corteza renal y timo, de acuerdo con de Lamarande y Allard.[15] Sin embargo otros autores como Roth,[14] Maver y Greco [18] señalan lo contrario.

La estructura de la ribonucleasa pancreática ha sido motivo de estudio durante largos años; se sabe en la actualidad que está integrada por 124 residuos de aminoácidos: ácido aspártico, glutámico, glicina , alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, metionina, prolina, fenil-alanina, tirosina, histidina, lisina, arginina y amida NH_3. Carece de triptofano y de cisteína. La proteína resultante está constituída por una sola cadena y la secuencia de 95 residuos de aminoácidos, del total de los 124 que la integran, está establecida con certeza.

Las funciones desempeñadas por la ribonucleasa en el metabolismo celular nos son desconocidas; sin embargo, estudios diversos parecen demostrar que, independientemente de su actividad hidrolítica sobre el substrato natural, lo que provoca detenciones de la actividad mitótica e inhibición en la incorporación de ácidos aminados en las proteínas, esta enzima es capaz de catalizar la síntesis de polinucleótidos a partir de monofosfatos de nucleósidos (Heppel, Whitfield y Markham [20]). Al parecer esta actividad sintética es ejercida por la ribonucleasa alcalina del hígado.

Efecto de la cortisona sobre la actividad ribonucleásica del tejido hepático

La cortisona es una hormona antianabólica y catabólica. Dosis elevadas (3 mg.) inyectadas a ratones durante seis semanas, detienen el crecimiento de los animales tratados, a pesar de que ingieren un 47% más de alimento que los testigos (Wells y Winter [21, 22]). Provoca notables alteraciones hepáticas estudiadas por Lowe y Williams:[23] aumento del glucógeno, disminución de la basofilia celular y además no es factible demostrar en los animales que la reciben, presencia de ácido ribonucleico en las mitocondrias y en los microsomas, el cual reaparece cuando se suprime la administración de esta hormona. Aun cuando la experimentación acerca de las propiedades antianabólicas o catabólicas de la cortisona es de resultados contradictorios, por que la disminución de peso se acompaña de balance negativo de nitrógeno, no existe, al parecer, actividad

catabólica en el hígado, ya que la disminución de peso, según Clark,[24] coincide con aumento del contenido proteínico en este órgano.

Con respecto a la acción de la cortisona sobre la actividad ribonucleásica del hígado, de Lamirande y Allard [15] encuentran aumento de la alcalina pero sin significación estadística. En nuestras determinaciones hemos encontrado (Llamas, Massieu, Suárez Soto [25]) que la administración de 0.25 mg. de acetato de cortisona y durante 20 días consecutivos a ratones machos de 20 gramos de peso corporal como promedio, provoca descenso de aproximadamente 20% de peso corporal. No se modifica la relación entre el peso del hígado y el peso corporal y aumenta el contenido acuoso de la glándula.

Por lo que se refiere a la actividad ribonucleásica medida a pH 7.8, según el procedimiento de Schucher y Hokin,[26] se eleva a 920 unidades en los animales no tratados, a 1 366 en los tratados, expresadas por 100 mg. de materia seca.

	Normales	*Tratados*
Peso promedio de los animales (19 a 22 gramos)	21 gramos	17 gramos
Materia seca en 0.5 de homogenado de tejido hepático	25.0 mg.	22.4 mg.
Relación entre peso de hígado y peso corporal total	0.049	0.52
Unidades de actividad enzimática en 100 mg. de materia seca	920	1366

Este aumento de actividad es posible que pueda relacionarse con la disminución o ausencia de ácido ribonucleico en los microsomas y en las mitocondrias de las ratas que reciben cortisona de acuerdo con lo señalado por Lowe y Williams.[23] A título de hipótesis es factible relacionar, por otra parte, la disminución del ácido ribonucleico de microsomas y mitocondrias con disminución en la síntesis de proteínas; sin embargo, se ha mencionado ya que los estudios de Clark [24] señalan, por lo contrario, aumento de éstas, lo que estaría de acuerdo con lo afirmado por Pesch y Clark [27] en el sentido de que la cortisona incrementa el catabolismo de los prótidos en el diafragma pero no en el hígado. Por el momento, por lo tanto, la interpretación de estos hechos no aparece muy clara.

Estudio de la actividad ribonucleásica en fracciones celulares de cerebro de ratón

La centrifugación de homogenados de tejido cerebral en sacarosa helada [28] al 0.25 M, permite separar a 3,000 revoluciones por minuto (815.0 x g) un sedimento formado por núcleos celulares y por algunas células completas contaminantes; queda además una fracción líquida en la que se encuentran todas las estructuras citoplásmicas. Este sedimento se denomina fracción nuclear.

La centrifugación de este líquido a 40,000 r.p.m. (144800 x g) hace que todas las partículas visibles sedimenten y se separe un líquido transparente y

cristalino que forma abundante espuma al ser agitado. Esta fracción líquida se denomina sobrenadante.

El precipitado anterior se resuspende por homogenización en sacarosa helada al 0.25 M y se centrifuga a 11,100 r.p.m. (11500 x g) el sedimento que se obtiene se designa como fracción mitocondrial. Finalmente el líquido sobrenadante se acelera nuevamente a 40,000 r.p.m. y se obtiene un sedimento que se conserva como fracción microsomal.

En cada una de estas fracciones se determinó la actividad ribonucleásica ácida (pH 5.5) y alcalina (pH 8.0).[29]

Resultados

Homogenado total

Ribonucleasa ácida	131.5 unidades
ribonucleasa alcalina	110.4 „
Unidades por mg. de nitrógeno	

Fracciones

Acida			
Núcleos	*Mitocondrias*	*Microsomas*	*Sobrenadante*
97.7	223	183.4	2.16
Alcalina			
46.5	100	264.1	31.2

Las cifras representan el promedio de cinco determinaciones y la actividad se expresa en unidades por mg. de nitrógeno.

Por ciento de actividad de cada fracción sobre la del homogenado total

Acida			
Núcleos	*Mitocondrias*	*Microsomas*	*Sobrenadante*
18.6	42.5	34.8	4.1
Alcalina			
10.5	22.6	59.8	7.0

Distribución de nitrógeno en las fracciones

Homogenado total = 100

Núcleos	*Mitocondrias*	*Microsomas*	*Sobrenadante*
40 %	17 %	4.4 %	38.3 %

Puede observarse que la actividad máxima es la de la ribonucleasa alcalina en los microsomas y los de la ácida en las mitocondrias. Schneider y Hoge-

boom [30] han encontrado, a su vez, predominancia de actividad ácida en las mitocondrias y consideran que esto constituye una función característica de dicha fracción.

La actividad nuclear es muy baja y a este respecto debe señalarse que generalmente se piensa que los núcleos están desprovistos de actividad ribonucleásica y que la que habitualmente es exhibida por esta fracción, se debe a contaminaciones de los núcleos por estructuras citoplásmicas o bien a la difusión de la enzima capaz de pasar parcialmente a la fracción nuclear.

En lo que respecta al líquido sobrenadante, los estudios de de Lamirande y Allard [15] señalan lo siguiente:

SOBRENADANTE

	Acida	*Alcalina*
Mucosa intestinal	43.1 %	44.2 %
Corteza renal	42.3 %	33.8 %
Hígado	13.1 %	16.7 %

En nuestras determinaciones se encuentra que la actividad ribonucleásica del líquido sobrenadante del tejido cerebral es muy baja, tanto de la ácida como de la alcalina, 4.1% para aquélla y 7.0 para ésta. Esta baja actividad difiere notablemente de la señalada en los tejidos anteriormente señalados. En general, la baja actividad del sobrenadante, encontrada también en el tejido hepático por Roth,[31] coincide, en este tejido, con elevada cantidad de ácido ribonucleico y la poca actividad ribonucleásica, sobre todo a pH alcalino, se debe a la presencia de un inhibidor específico de naturaleza proteínica, ya que existe ribonucleasa alcalina en cantidad elevada pero en forma inactiva.

Estos inhibidores se encuentran en diversos tejidos animales y vegetales y probablemente su función es la de inactivar a las ribonucleasas que pasan de las mitocondrias y de los microsomas al líquido que los rodea o sea el sobrenadante.

La poca actividad enzimática en esta fracción del tejido cerebral es posible que pueda deberse a la presencia de inhibidores de este tipo.

Aunque no se conoce con exactitud la función de los inhibidores, es posible que intervengan en los procesos que conducen a la división celular. Jacobson y Webb,[32] señalan que, durante este proceso, se desintegran ácido ribonucleico o ribonucleoproteínas diversas que rodean a los cromosomas, para lo cual es necesaria la existencia de ribonucleasas activas. Durante la división celular, por lo tanto, disminuiría la inhibición de la ribonucleasa, con aumento de la forma activa en la fracción sobrenadante. En el tejido nervioso, cuyas células no se dividen, esta característica funcional probablemente esté en relación con la baja actividad del sobrenadante, explicable por la existencia del inhibidor, en elevada concentración.

REFERENCIAS

1. Caspersson, T.: Cell growth and cell function. Norton, New York, 1950.
2. Wilkins, M. H. G., Stokes, A. R., Wilson, H. R.: Nature, 171-738, 1953.
3. Watson, J. D., Crick, F. H. C.: Viruses. Cold Spring Harbord Symposia Quant. Biol. 18-1953.
4. Thomas, C. A.: J. Am. Chem. Soc. 78-1861, 1950.
5. Schumaker, U. Nn., Richards, E. G., Schachman, H K.: J. Am. Chem. Soc. 78-43-20, 1956.
6. Meselson, M., Stahl, F. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. 44-671, 1958.
7. Ochoa, S.: Conferencia Nobel. 11 de diciembre de 1959. Ciencia. 20-1, 1960.
8. Grunberdg-Manago, M., Ochoa, S.: J. Am. Chem. Soc. 77-3165, 1955.
9. Grunberg-Manago, M., Ortiz, P. J., Ochoa, S.: Biochem. et Biophys. Acta. 20-269, 1959.
10. Littauer, U. Z., Kornberg, A.: J. Biol. Chem. 226-1077, 1957.
11. Heppel, L. A., Singer, M. F., Hilmoe, R. J.: Ann. N. York. Acad. Sci. 81-635. 1959.
12. Hilmoe, R. J., Heppel, L A.: J. Am. Chem. Soc. 79-4810, 1957.
13. Lehman, I. R.: Ann. N. York. Acad. Sci. 81-745, 1959.
14. Roth, J. S.: J. Biol. Chem. 208-181, 1954.
15. De Lamirande, G., Allard, C.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 81-618, 1959.
16. Reid, E., Nodes, J. T.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 81-618, 1959.
17. Zytko, J., De Lamirande, G.: Biochem et Biophys, Acta. 233-822, 1958.
18. Maver, M. E., Greco, A. E.: J. Natl. Cancer. Inst. 17-503, 1956.
19. Hilmoe, R. J., Heppel, L. A.: Federation Proc. 12-217, 1953.
20. Heppel, L. A., Whitefield, P. R., Markham, R.: Biochem. J. 60-8, 1955.
21. Wells, B. B., Vendal, C.: Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 15-324, 1940.
22. Winter, C., Silber, R. H., Stoerk, H. C.: Endocrinology. 47-60, 1950.
23. Lowe, Ch., Williams, L.: Proc. Soc. Sxptl. Biol. Med. 84-70, 1953.
24. Clark, J. H., Pesch, L. A.: J. Pharmacol. and Exptl. Therap. 117-202, 1956.
25. Llamas, R., Massieu, G., Suárez Soto, Ma. L.: An. Inst. Biol. Univ. Nac. Méx. 1957.
26. Schucher, R., Hokin, L.: J. Biol. Chem. 210-551, 1954.
27. Pesch, L. A., Clark, J. H.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 91-510, 1956.
28. Hokin, L. E., Hokin, M. R.: J. Biol. Chem. 233-822, 1958.
29. Llamas, R., Coronas Gutierre, E.: Trabajo no publicado.
30. Schneider, W. C., Hogeboom, G.: J. Biol. Chem. 198-155, 1952.
31. Roth, J. S.: J. Biol. Chem. 231-1085, 1958.
32. Jacobson, W., Webb, M.: Exp. Cell. Res. 3-163, 1952.