

Capítulo 3.

Bioquímica del ácido fólico y las pterinas

3.1. Introducción

Los primeros trabajos científicos relacionados con las pteridinas, se remontan a las investigaciones llevadas a cabo, a fines del siglo XIX, por Frederick Gowland Hopkins quien intentó aislar el pigmento amarillo de una mariposa denominada "brimstone" (azufre) (Hopkins, 1889a, 1889b) y uno blanco de la mariposa de la col (Hopkins, 1895). No pudo, sin embargo, obtenerlos con la suficiente pureza como para realizar ulteriores estudios que le permitieran dilucidar su estructura. Estos pigmentos fueron denominados muchos años más tarde xantopterina y leucopterina, respectivamente, por Clemens Schöpf (Wieland y Schöpf, 1925; Schöpf y Wieland, 1926). Finalmente fue Robert Purmann quien dilucidó la estructura de estas sustancias (Purmann, 1940a, 1940b, 1941), proponiendo que eran derivados del heterociclo pirazina[2,3-d]pirimidina, al que finalmente se le dio el nombre de pteridina (Schöpf et al., 1941).

Actualmente se conoce una gran cantidad de pteridinas naturales que pueden ser incluidas dentro de dos familias de compuestos: las pterinas y las lumazinas. Las diferencias químicas entre ambos grupos de compuestos fueron mencionadas en el capítulo anterior, y, en el presente, sólo nos referiremos al primero. Las pterinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Están presentes en prácticamente todos los seres vivos, pero, en general, en muy pequeñas cantidades. Estas moléculas desempeñan funciones muy diversas en los organismos vivos, participando en muchas reacciones bioquímicas de gran importancia (Nichol et al., 1985).

El tetrahidrofolato, un derivado reducido del ácido fólico, y la tetrahidrobipterina son los integrantes de esta familia de compuestos que más han sido estudiados en relación con su

participación en reacciones químicas presentes en los seres vivos. Ambos están involucrados en reacciones metabólicas indispensables para los mamíferos; tal es así que su deficiencia produce serias alteraciones bioquímicas que conducen al desarrollo de graves enfermedades (Rapaport, 1988). La mencionada presencia como pigmentos en las alas de ciertos insectos es otra de las funciones conocidas y bien estudiadas. Sin embargo, existen otros compuestos que cumplen otras funciones menos conocidas.

También se sabe, actualmente, que algunos derivados de este grupo participan en ciertos procesos biológicos desencadenados por la luz; es decir, que están involucrados en reacciones fotoquímicas que ocurren *in vivo*. La mayoría de estos procesos aún no se conocen en profundidad y, en muchos casos, el papel del derivado pteridínico no está del todo aclarado. Más aún, existen algunos ejemplos en los cuales la participación de los mismos está propuesta, pero no ha sido probada todavía.

Algunos miembros de este grupo, por ejemplo, han sido encontrados en órganos fotosensibles como los ojos (Christomanos, 1967). Ha sido propuesto, por su parte, que ciertos derivados pteridínicos podrían participar en algunas etapas de la fotosíntesis (Fuller et al., 1971) y que otros pueden actuar como antenas para la luz azul en las plantas superiores (Maier y Ninnemann, 1995) y otros organismos tales como el hongo *Phycomyces blakesleeanus* (Hohl et al., 1992).

También se ha detectado la presencia de estas moléculas en la piel de vertebrados inferiores (Viscontini y Stierlin, 1962) y en el tegumento de artrópodos (Merlini y Nasini, 1966). Más recientemente se ha demostrado la presencia de biopterina en la piel de seres humanos así como también su acumulación en pacientes con trastornos de despigmentación (Schallreuter et al., 1994). Asimismo, se ha demostrado su participación en algunos procesos desencadenados por la irradiación de luz UV sobre este tejido y se sospecha su participación en otros. El ejemplo mejor conocido de este grupo de fenómenos es la DNA fotoliasa, enzima que desencadena una serie de mecanismos de defensa contra los daños producidos por la luz UV. Esta enzima contiene una molécula de N⁵,N¹⁰-meteniltetrahidrofolilpoliglutamato, un derivado del ácido fólico capaz de funcionar como antena detectora de luz UV (Sancar y Sancar, 1988; Johnson et al., 1988). También se ha propuesto que las pterinas podrían jugar algún rol en la generación de distintos cánceres de piel provocados por luz de tipo UV-A (320-400 nm.) (Ito y Kawanishi, 1997).

Cabe destacar, en este punto, que los estudios fisicoquímicos realizados *in vitro* sobre la fotoquímica de estos compuestos revisten importancia porque aportan datos que pueden servir para comprender los mecanismos específicos que ocurren *in vivo*.

Se hace evidente, teniendo en cuenta lo expuesto hasta aquí, la importancia bioquímica de esta familia de compuestos. En este capítulo se hará una descripción resumida de sus principales funciones *in vivo* conocidas hasta el momento, mientras que los procesos fotobioquímicos citados se expondrán con mayor detalle.

3.2. Metabolismo y función del ácido fólico

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble incluida en la serie conocida como complejo vitamínico B. El derivado activo de esta molécula es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, denominado normalmente tetrahidrofolato, el cual actúa como coenzima transportando unidades activas de un átomo de carbono. La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participa este derivado hacen que, el ácido fólico sea una molécula indispensable para la vida (Stryer L., 1995).

3.2.1. Absorción y transporte del ácido fólico

Los mamíferos no poseen la capacidad de sintetizar el anillo de pterina, por ello deben recurrir a otras fuentes. En efecto, adquieren esta vitamina principalmente a partir de la dieta y, en menor proporción, de los microorganismos existentes en su tubo digestivo. Se encuentra principalmente en vegetales verdes, muchas frutas, hígado, riñón, huevos y leche, pero se destruye fácilmente durante la cocción. Los requerimientos diarios de un ser humano adulto son de 50 a 100 μg , aunque estas necesidades aumentan hasta 400 μg durante el embarazo.

Esta vitamina se encuentra en los alimentos generalmente en forma de poliglutamatos; es decir que el residuo de ácido glutámico presente en la molécula de ácido fólico se encuentra unido a otras moléculas de ácido glutámico mediante uniones peptídicas (función amida). Los poliglutamatos no pueden ser absorbidos por el intestino por lo cual primero se escinde la cadena de residuos de glutamato para obtener el monoglutamato (ácido fólico propiamente dicho). Esta reacción es catalizada por un grupo de enzimas denominadas conjugasas presentes en el borde en cepillo de las células de la mucosa yeyunal.

Posteriormente y sin el requerimiento de ningún cofactor, como es necesario para otras vitaminas, es absorbido y convertido, en el interior de la célula de la mucosa intestinal, en N⁵-metiltetrahidrofolato (figura 3.1).

El ácido fólico circula en el plasma en forma de N⁵-metiltetrahidrofolato libre o ligado débilmente a la albúmina y es captado por todos los tejidos, pero principalmente por el tejido hepático donde se almacena y participa en las reacciones metabólicas que se detallan en la próxima sección.

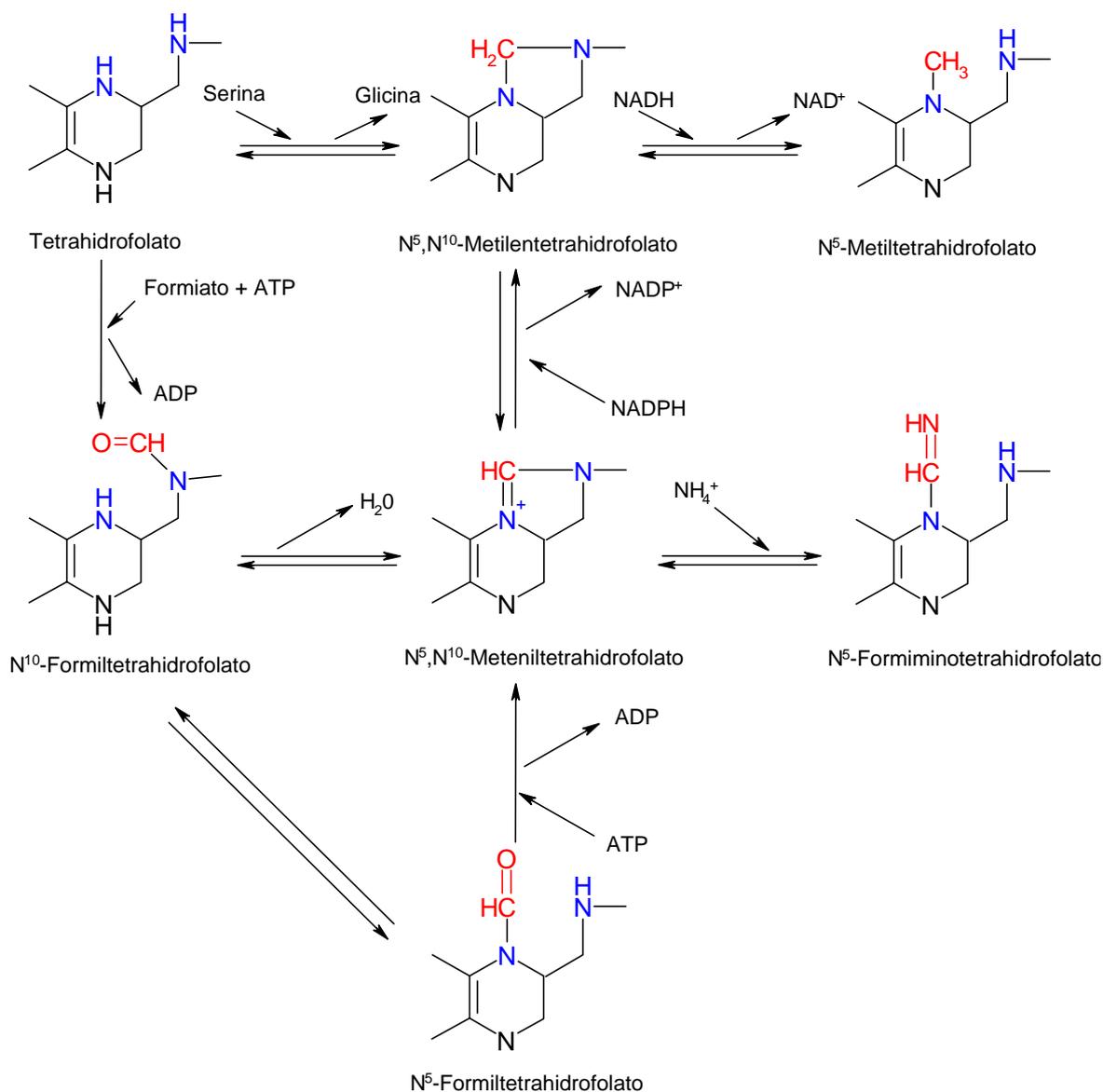


Figura 3.1. Derivados del ácido fólico que participan en reacciones metabólicas transportando unidades monocarbonadas y las reacciones mediante las cuales se interconvierten.

3.2.2. Tetrahidrofolato como transportador de fragmentos de un átomo de carbono.

Como se mencionó anteriormente, el tetrahidrofolato actúa como transportador de unidades de un solo átomo de carbono (Stryer L., 1995). Este fragmento monocarbonado está unido al átomo de N-5 o al N-10 (que se indican como N⁵ y N¹⁰), o a ambos y puede existir en tres estados de oxidación. La forma más reducida corresponde al grupo metilo, la forma intermedia corresponde al grupo metileno. Las formas más oxidadas corresponden a los grupos metenilo, formilo o formimino. Como puede observarse en la figura 3.1 estas unidades de un átomo de carbono son interconvertibles, existiendo para ello un conjunto de reacciones bioquímicas específicas.

Estos derivados del tetrahidrofolato sirven como dadores de unidades monocarbonadas en una amplia gama de reacciones biosintéticas. La metionina, por ejemplo, se sintetiza a partir de homocisteína por transferencia del grupo metilo del N⁵-metiltetrahidrofolato. Ciertos átomos de carbono de las purinas derivan del N¹⁰-formilderivado. El grupo metilo de la timina, una pirimidina, proviene del N⁵,N¹⁰-metilentetrahidrofolato. Este último derivado también participa en la síntesis de glicina a partir de CO₂ y NH₄⁺ cediendo un fragmento monocarbonado.

Por otra parte, el tetrahidrofolato sirve como aceptor de fragmentos monocarbonados de ciertas reacciones degradativas. En particular, tiene gran importancia la conversión de serina en glicina, la cual origina N⁵,N¹⁰-metilentetrahidrofolato (figura 3.1). Esta reacción permite obtener fragmentos monocarbonados a partir de carbohidratos. Otra reacción relevante es la escisión de la histidina que genera el N⁵-formiminotetrahidrofolato.

3.2.3. Déficit de ácido fólico.

La falta de ácido fólico afecta a todas aquellas rutas metabólicas en las cuales el mismo participa cediendo o aceptando unidades monocarbonadas. Esto produce una serie de trastornos que se manifiestan en forma de patologías (Rapaport, 1988; Ranney y Rapaport, 1993). El déficit de ácido fólico puede producirse en los mamíferos y, en particular en el hombre, por diversos motivos. Uno de ellos, el más frecuente, es una mala alimentación. La dieta habitual no contiene mucho más de la demanda diaria mínima y los depósitos tisulares en los adultos sólo se mantienen unos tres meses. Otra causa es la absorción deficiente que ocurre, en general, en asociación con los síndromes de malabsorción intestinal. La utilización inadecuada del ácido fólico, en cambio, es mucho menos frecuente y puede estar asociada a

cierto bloqueo de su metabolismo por el alcohol o por el uso de antagonistas del ácido fólico, como el metotrexato, utilizado habitualmente en el tratamiento de neoplasias.

De todas las reacciones bioquímicas en las que participan los derivados del ácido fólico las más importantes son las involucradas en la síntesis de nucleótidos (monómeros de los ácidos nucleicos). Cuando estas reacciones se interrumpen por algún motivo, déficit de ácido fólico, por ejemplo, los ácidos nucleicos no pueden sintetizarse y, como consecuencia de esto, las células no pueden replicarse. Por lo tanto, se ven seriamente afectadas todas aquellas regiones del organismo que requieren de la multiplicación constante de ciertas células. En efecto, los tejidos y órganos más afectados son los relacionados con las células sanguíneas y la mucosa intestinal.

De esta manera, la alteración en la síntesis de DNA que existe en el déficit de ácido fólico conduce a una patología con un cuadro morfológico característico en la sangre periférica y en la médula ósea, que se conoce con el nombre de anemia megaloblástica. Por otra parte, se produce una atrofia de la mucosa del tubo digestivo que puede provocar un estado de malabsorción que puede, a su vez, intensificar el déficit primario.

3.3. Fotoliasa

La irradiación con luz UV-C (200 - 280 nm) mata rápidamente a las células y, entre las supervivientes, se encuentra una elevada frecuencia de mutaciones (Stanier et al., 1984). Esto explica los daños que produce la luz UV sobre la piel del ser humano y la tendencia a generar cáncer de piel en las zonas expuestas.

Estos fenómenos se producen debido a los procesos fotoquímicos que ocurren a nivel del ADN celular. La presencia de las bases nitrogenadas en la estructura del DNA, hace que esta macromolécula absorba fuertemente la luz UV; su absorción máxima se sitúa alrededor de los 260 nm.

Al irradiar una solución de ADN con luz UV, tienen lugar varios cambios químicos. El más importante es la formación de enlaces covalentes entre restos de pirimidina adyacentes en una misma cadena, formando dímeros de pirimidinas. Estos dímeros distorsionan la forma de la molécula de ADN e interfieren en el apareamiento normal de las bases. Este efecto produce un bloqueo parcial de la replicación, a cargo de la enzima denominada ADN polimerasa, y de

la transcripción del ADN, lo cual puede producir la muerte celular. Las mutaciones también son generadas principalmente por los dímeros de pirimidina. En efecto, cuando la ADN polimerasa logra pasar la zona del dímero de pirimidina, sintetiza moléculas de ADN con la secuencia equivocada, generándose una mutación que se transmitirá a las células hijas. Todos los procesos que aumentan la frecuencia de mutaciones elevan la probabilidad de la aparición de procesos neoplásicos.

Las células tienen dos mecanismos principales para defenderse de los dímeros de pirimidina. Uno de ellos consiste en la acción de un elaborado conjunto de enzimas que efectúan la denominada "reparación oscura del ADN". Estas enzimas cortan la cadena dañada en la zona donde se encuentran los dímeros de pirimidina, remueven los nucleótidos y vuelven a sintetizar una cadena nueva. El otro mecanismo se denomina fotorreactivación (Kelner, 1949), está a cargo de la enzima ADN-fotoliasa (fotoliasa) y es el que interesa, a los fines de este capítulo, porque en él participa un derivado del ácido fólico. Este mecanismo puede evidenciarse con un experimento muy sencillo diseñado hace más de 60 años (Hollaender y Claus, 1937). Si las células son irradiadas previamente con luz de longitud de onda en el rango 350 - 500 nm, que no daña directamente a la molécula de ADN, pues no absorbe en esta zona, disminuye considerablemente tanto la frecuencia de mutación como la letalidad cuando se las expone a la luz UV-C. Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce este fenómeno fue dilucidado muchos años después (Sancar, 1990; Eker et al., 1990).

La fotoliasa contiene dos cofactores unidos de forma permanente a su estructura proteica (Sancar y Sancar, 1988; Johnson et al., 1988, Hearst, 1995). Uno de ellos es una molécula de flavin-adenín-dinucleótido en una de sus formas reducidas (FADH). El otro es una molécula de N⁵,N¹⁰-meteniltetrahidrofolato (MTHF).

La figura 3.2 muestra un esquema que representa el mecanismo de acción de la fotoliasa (Hearst, 1995). La molécula de MTHF absorbe un cuanto de luz y pasa a un estado electrónicamente excitado. Mediante un proceso de transferencia de energía vuelve a su estado basal, excitando a la molécula de FADH. Esta molécula excitada es capaz de ceder un electrón al dímero de piridina, rompiéndose los enlaces que unen al par. Por último, la piridina que quedó con un electrón de más, lo cede nuevamente al FADH.

Como puede observarse claramente la energía proveniente de luz UV-A o visible es utilizada para reparar el dímero de pirimidina, causado por luz de longitud de onda menor. En la mayor parte de los casos cuando una célula recibe luz UV de longitudes de onda menores

300 nm, también recibe luz de mayores longitudes de onda. Es decir que a la vez que se produce el daño al ADN, se activa la maquinaria para repararlo. Eso ocurre, por ejemplo en las exposiciones prolongadas a la luz solar. La competencia entre los procesos que dañan al ADN y los mecanismos de reparación decide el destino de la célula irradiada.

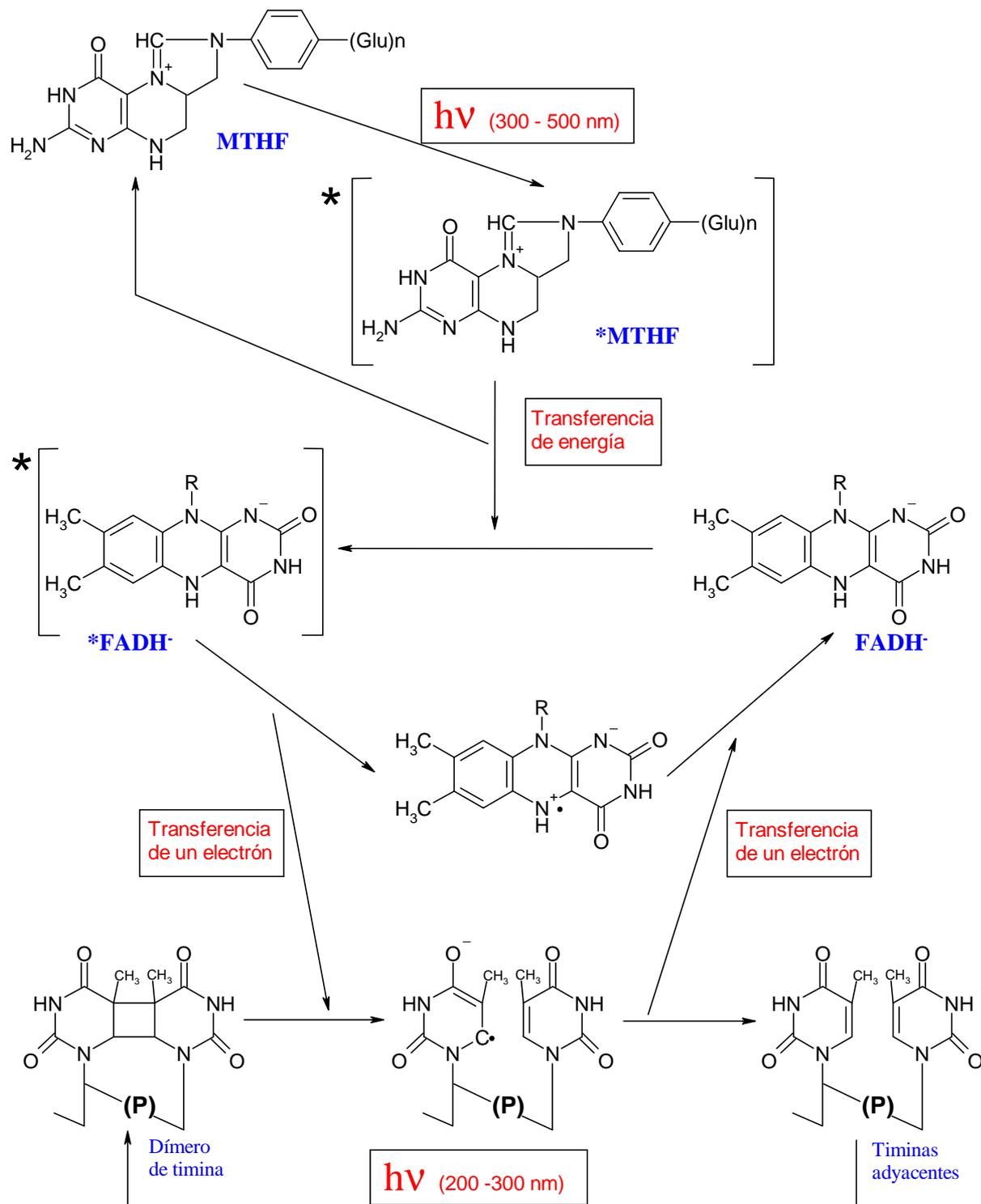


Figura 3.2. Mecanismo de la fotorreparación por la fotoliasa.

3.4. Pterinas presentes en insectos como pigmentos

Como fue mencionado al inicio de este capítulo, los compuestos denominados xantopterina y leucopterina fueron descubiertos en las alas de ciertas mariposas como pigmentos. En 1933 otro compuesto amarillo fue aislado de las mariposas (Wieland et al., 1933) y recibió, tiempo después, el nombre de isoxantopterina. Las estructuras químicas de estos derivados se muestran en la figura 3.3. Investigaciones más recientes han revelado que pigmentos de otros colores presentes en una gran variedad de especies de mariposas son también de naturaleza pterínica (Pfleiderer, 1993). La eritropterina, por ejemplo, fue aislada de mariposas tropicales sudamericanas (Schöpf y Becker, 1936); en particular, se la encuentra en grandes cantidades en la especie *Catopsilia argante*. Este compuesto presenta una forma tautomérica estable que es la responsable de su intenso color naranja (von Philipsborn et al., 1963).

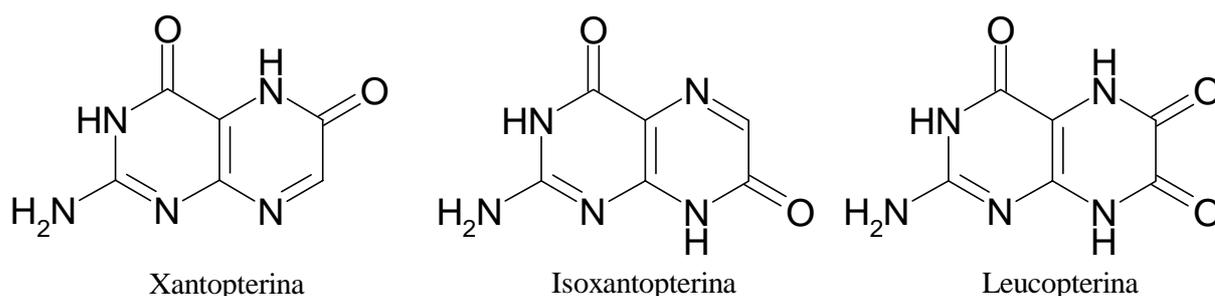


Figura 3.3. Estructura química de algunas pterinas encontradas en las alas de ciertas mariposas.

Otros grupos de derivados más complejos fueron más recientemente descubiertos en otros organismos. Por ejemplo, la pterorrodina (Pfleiderer, 1963), fue aislada de varios insectos y anfibios. Esta sustancia de un color rojo muy intenso consta en su estructura, mostrada en la figura 3.4, de dos moléculas de xantopterina unidas por un puente de un átomo de carbono. Vale la pena resaltar que este compuesto, encontrado en cantidades considerables en los ojos de varios animales inferiores (Kühn y Egelhaf, 1959; Viscontini et al., 1970) y en ciertas especies de sapos (Misuraca et al., 1977), parece estar ampliamente distribuido en el reino animal. Otro interesante grupo de pterinas naturales fue descubierto, ya en la década del 40', en los ojos de la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) (Lederer, 1940; Viscontini et al., 1957; Scwink y Mancini, 1973). Se trata de las drosopterinas cuya estructura básica,

que se muestra también en la figura 3.4, sólo pudo ser resuelta hacia fines de los 70's (Theobald y Pfeleiderer, 1978).

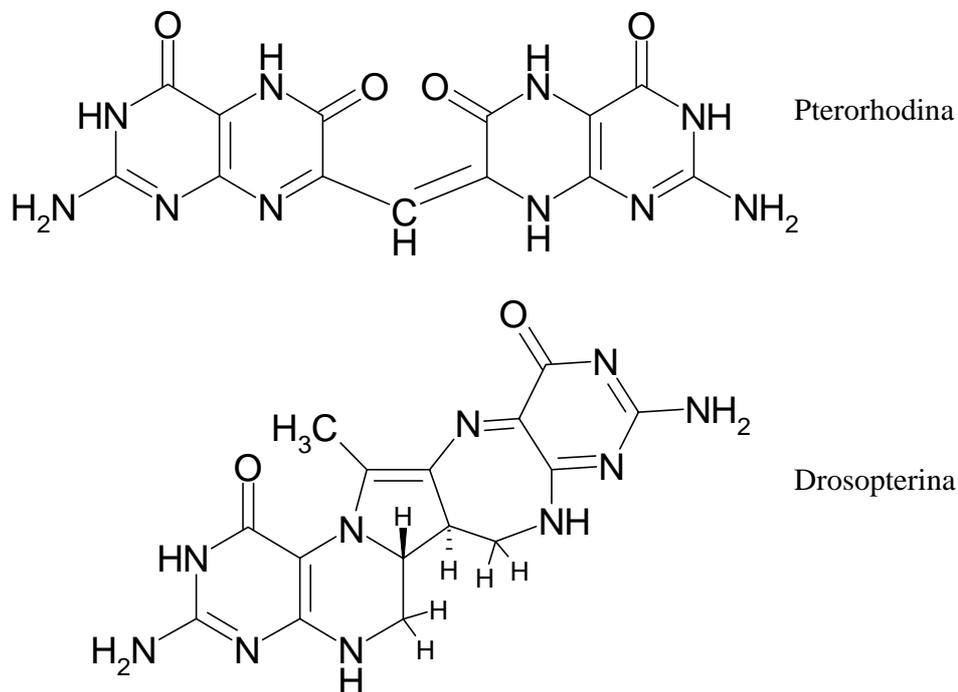


Figura 3.4. Estructura química de algunos derivados pterínicos encontrados en los ojos de ciertos insectos y anfibios.

Debido a sus características espectrales y al hecho de ser hallados en órganos fotosensibles, se ha postulado que estos compuestos podrían participar en la captación de la luz por parte de los mismos. Sin embargo, y aunque se encuentran en marcha diversas investigaciones en este sentido, esto no se ha podido demostrar aún.

3.5. Tetrahidrobiopterina y molibdoenzimas.

Además del ácido fólico, otros compuestos relacionados con la familia de las pterinas participan en reacciones bioquímicas del metabolismo de los animales superiores. La 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, un derivado reducido de la biopterina, y ciertos derivados pterínicos azufrados son los ejemplos mejor conocidos.

3.3.1. Tetrahidrobiopterina.

Este compuesto participa en la transformación de la fenilalanina a tirosina, una importantísima reacción del metabolismo de los aminoácidos catalizada por la fenilalanina hidroxilasa (Stryer L., 1995). Esta enzima pertenece a la familia de las monooxigenasa, las cuales catalizan reacciones en las que participa el O_2 disuelto en el medio. Uno de los átomos del mismo se incorpora al compuesto que se oxida (generalmente se hidroxila), mientras que el restante aparece en forma de H_2O . En la figura 3.5 se muestra un esquema del conjunto de reacciones involucradas en esta transformación.

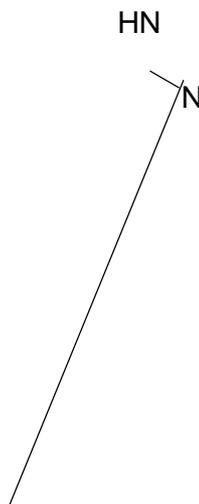


Figura 3.5. Participación de la tetrahidrobiopterina a la conversión de fenilalanina a tirosina.

Se sabe, actualmente, que el óxido nítrico ($\bullet NO$) es un intermediario metabólico de los mamíferos. Participa en diversos procesos tales como la vasodilatación y la regulación del tono vascular normal, la inhibición de la agregación plaquetaria, transmisión neuronal y citostasis. El óxido nítrico se forma en las células a partir de la L-arginina y esta reacción es catalizada por una compleja enzima denominada óxido nítrico sintasa, que contiene a la tetrahidrobiopterina como uno de sus cofactores (Marletta, 1993). La función de este derivado no está aún totalmente dilucidada existiendo actualmente varias hipótesis sobre el tema (Hevel y Marletta, 1992; Giovanelli et al., 1991).

3.3.2. Molibdoenzimas.

Existe un conjunto de enzimas que contienen ligado a su estructura proteica átomos de molibdeno. Entre ellas se encuentran la sulfito oxidasa, la nitrogenasa, la nitrato reductasa y la

xantina deshidrogenasa (Rajagopalan et al., 1993). Estas molibdoenzimas catalizan, excepto la nitrogenasa, reacciones de hidroxilación oxidativa o deshidroxilación reductiva. Si bien el cofactor que contiene al molibdeno aún no ha podido ser aislado, investigaciones llevadas a cabo sobre la sulfito oxidasa lograron caracterizarlo, postulándose la estructura mostrada en la figura 3.6 (Kramer et al., 1987). Se cree que este cofactor, al cual se le ha dado el nombre de molibdopterina, está presente en todas las molibdoenzimas con excepción de la nitrogenasa. Puede observarse que el átomo metálico está coordinado a un grupo ditioleno a través de sus azufres; las otras dos posiciones de coordinación están ocupadas por átomos de oxígeno. Varios grupos de investigación están intentando dilucidar la función específica que cumple este singular cofactor.

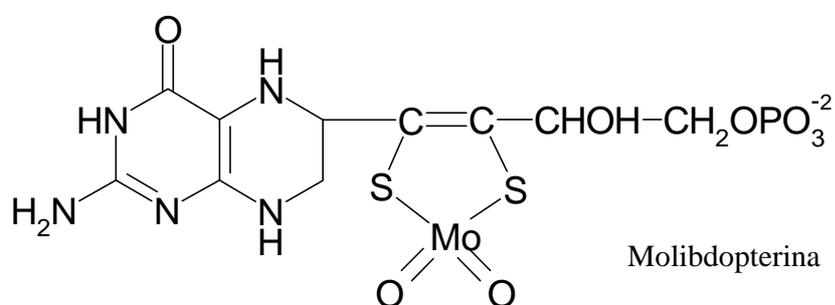


Figura 3.6. Estructura química postulada para el cofactor de la sulfito oxidasa.

3.6. Pterinas como fotorreceptores

Existe un conjunto heterogéneo de procesos bioquímicos que son activados en presencia de luz ultravioleta de tipo UV-A y que son denominados, genéricamente, respuestas fisiológicas controladas por la luz azul (Ninnemann, 1995). Estos fenómenos fotobiológicos, no incluidos en la fotosíntesis, entre los que se encuentra la fototaxis, han sido estudiados principalmente en microorganismos tales como bacterias y hongos unicelulares. Todos tienen en común la existencia de un compuesto, o conjunto de compuestos, que sirve como antena; es decir, que absorbe la radiación ultravioleta e inicia la secuencia de cambios químicos que conducirán finalmente a la respuesta fisiológica de la célula a la luz. La fotoliasa, detallada en la sección 3.2 y toda la respuesta de defensa contra el daño producido por la luz UV sobre el ADN, se encuadran dentro este tipo de procesos.

Numerosos grupos de investigación han dedicado sus esfuerzos a aislar e identificar a los cromóforos que absorben luz cumpliendo el papel de fotorreceptores. Las primeras investigaciones en este sentido fueron realizadas por Warren Butler a principios de la década de 1970, quien buscó sistemáticamente cambios de absorbancia en sistemas biológicos posteriores a la irradiación con luz azul y UV-A. Se admitía que la absorción de luz por parte de los fotorreceptores generaría cambios en los mismos que se traducirían en cambios en la absorbancia del sistema de suficiente magnitud como para poder ser detectados espectrofotométricamente. Esta búsqueda tuvo resultados positivos en experimentos realizados con *Dictiostelium* (Poff et al., 1973), *Phycomyses* (Poff y Butler, 1974) y *Neurospora* (Muñoz et al., 1974). En estos trabajos se estudiaron las características de los cambios espectrales, la variación de la respuesta bioquímica con la longitud de onda de la luz incidente y otros aspectos espectroscópicos. Asimismo se investigó el efecto de la irradiación de luz sobre la concentración *in vivo* de sustancias que eran sospechadas de ser cromóforos. Posteriormente, se estudió la respuesta bioquímica a la luz en mutantes que eran deficientes en posibles cromóforos (Brain et al., 1977; Paietta y Sargent, 1981).

Los resultados de estos estudios permitieron saber que, en general, estos fotorreceptores son sustancias incluidas, como grupos prostéticos, en complejas estructuras proteicas que, a su vez, pueden tener otros grupos prostéticos y cofactores, necesarios para generar una señal química a partir del fenómeno primario de absorción de luz. Se ha demostrado que ciertas flavinas, formando parte de las denominadas flavoproteínas, y compuestos carotenoides cumplen este tipo de funciones en una variedad de organismos.

Si bien todavía no existe evidencia concluyente como la hay para las flavinas y compuestos carotenoides, la participación de las pterinas en respuestas fisiológicas controladas por la luz azul ha sido propuesta en varios organismos. El ejemplo mejor conocido, tal vez sea la mencionada anteriormente nitrato reductasa de *Neurospora*, enzima que está involucrada en este tipo de procesos fotobiológicos y que contiene en su estructura tanto molibdopterinas como flavinas (Klemm y Ninneman, 1979; Ninneman, 1984; Siefermann-Harms et al., 1985). Asimismo, derivados pteridínicos podrían jugar un papel importante en combinación con las flavinas en ciertas especies de *Phycomyses* (Berns y Vaughn, 1970; Hohl et al., 1992), particularmente, se demostró la existencia de biopterina en *Phycomyses blakesleeanus* (Kiewisch y Fukshansky, 1991). Por último, fue postulada la

participación de las pteridinas como fotorreceptores en procesos de fototaxis presentes en *Euglena gracilis* (Galland et al., 1990; Schmidt et al., 1990; Brodhum y Häder, 1990).