

Metabolismul nucleotidelor purinice și pirimidinice

Metabolismul nucleotidelor se desfășoară la nivelul majorității celulelor nucleate. Nucleotidele sunt sintetizate utilizând ca precursori intermediari amfibolici.

S-a constatat că nucleotidele de origine alimentară ce trec de peretele intestinal, nu sunt încorporate în acizi nucleici tisulari, în timp ce nucleotidele injectate sunt încorporate. Intensitatea metabolismului nucleotidelor depinde de necesitățile fiziologice, sinteza nucleotidelor crescând în timpul creșterii sau regenerării tisulare.

În cazul biosintezei ambelor tipuri de nucleotide există un precursor comun: **fosforibozil pirofosfat (PRPP)**, ce provine din riboză-5-fosfat – produs al căii pentozo-fosfaților. Acest precursor macroergic conține două (restul fosfat și pentoza) din cele trei elemente ce compun o nucleotidă. Acestui compus urmează să-i fie atașată baza azotată, purinică sau pirimidinică, obținută prin reacții specifice.

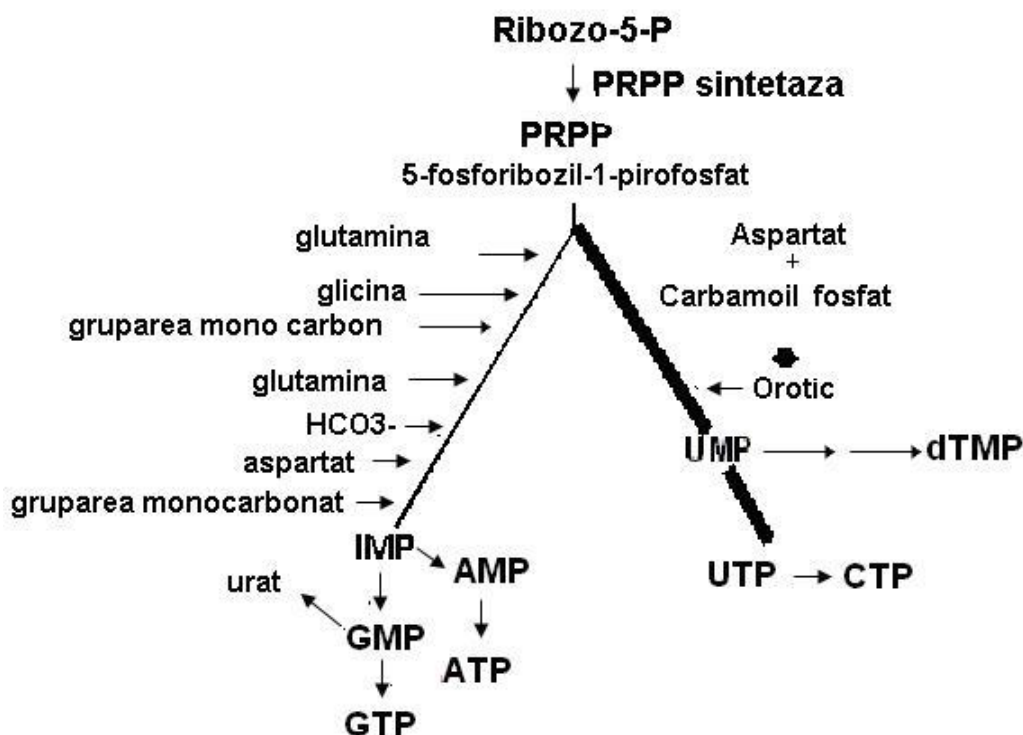


Figura 77. Căi de sinteză ale nucleotidelor

Biosinteza nucleotidelor purinice

Biosinteza nucleotidelor purinice cuprinde 3 etape:

1. Transformarea α -D-ribozo-5-fosfat în inozin monofosfat (IMP).
2. Transformarea IMP în nucleozide purinice monofosfat AMP și GMP.
3. Fosforilarea nucleozidelor purinice monofosfat cu obținerea de nucleozide purinice di- și respectiv trifosfat (ADP, ATP respectiv GDP, GTP).

Moleculele precursor în procesul de sinteză contribuie fiecare cu o grupare de atomi la formarea heterociclului purinic. Sinteza nucleotidelor purinice necesită aminoacizi (Gli, Asp) ca donori de C și N, CO_2 ca sursă de carbon și unități monocarbon transferate prin intermediul FolH_4 .

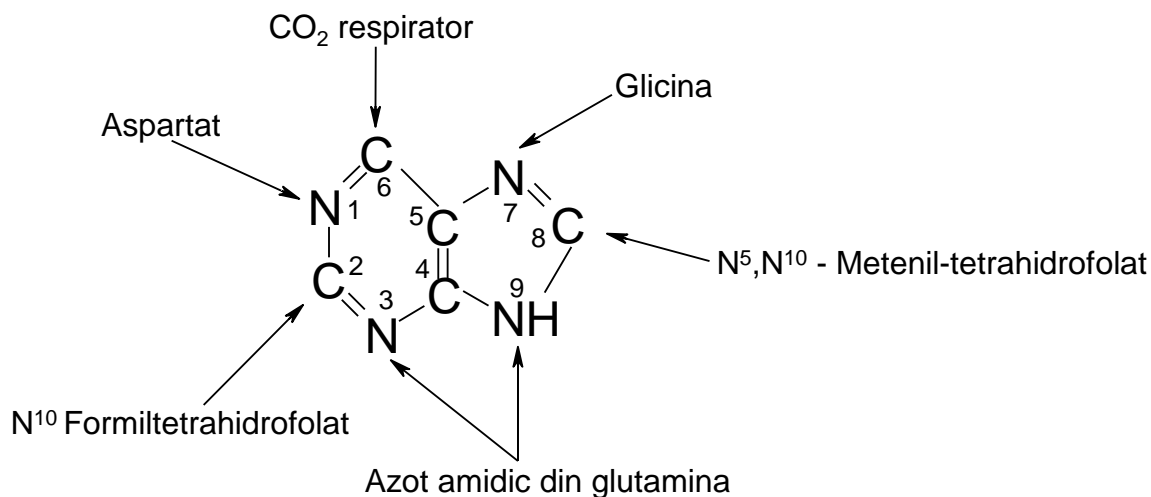


Figura 78. Surse ale atomilor din nucleul purinic

Sinteza cea mai intensă de baze azotate și nucleozide are loc în ficat, organ ce asigură și necesarul țesuturilor incapabile de biosinteză. De exemplu, creierul are o activitate slabă de biosinteză și depinde parțial de purine exogene. Eritrocitele și leucocitele polimorfonucleare nu pot sintetiza purine și depind în întregime de purinele plasmatice pentru a forma nucleotide.

Reacțiile procesului de biosinteză sunt prezentate în figura 79 și figura 80.

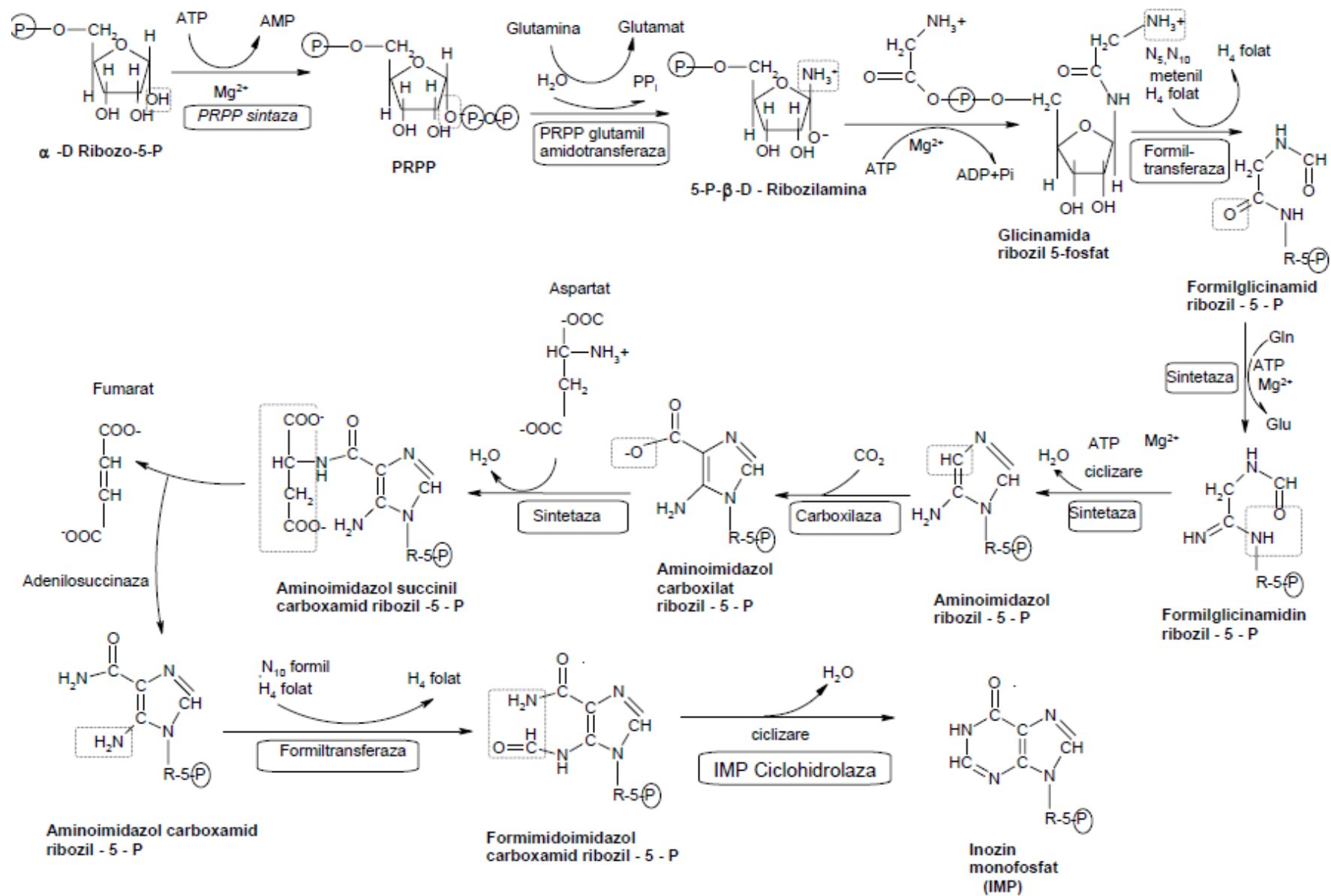


Figura 79. Biosinteza IMP

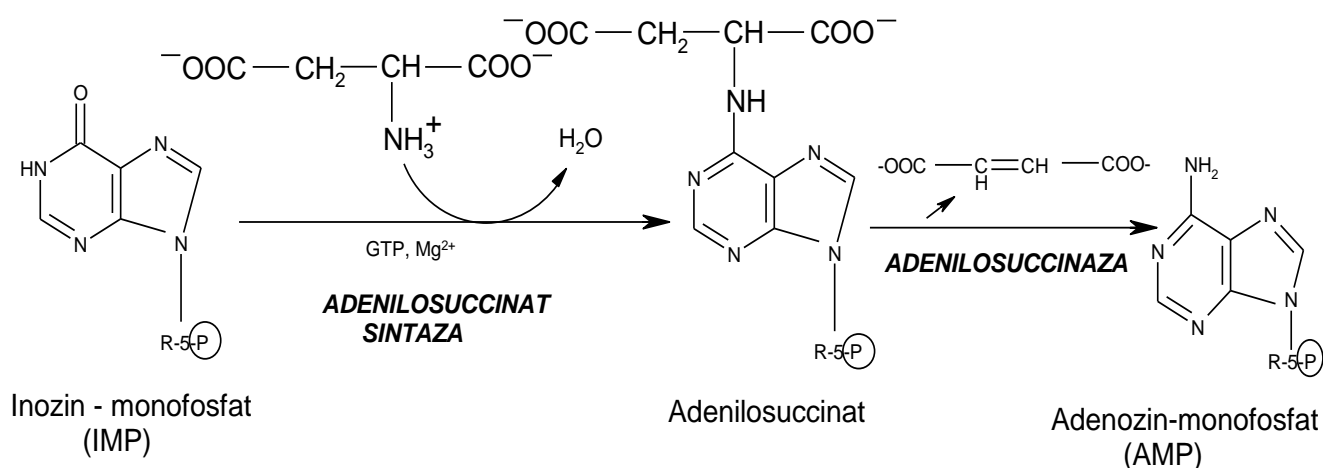


Figura 80. Transformarea IMP în AMP

O caracteristică a procesului de sinteză este faptul că enzimele implicate în calea metabolică au funcții catalitice multiple, realizând mai multe reacții succesiv.

Transformarea IMP în AMP este cea întâlnită în ciclul purin nucleotidelor, implicat în dezaminarea aminoacizilor la nivel muscular.

Reglarea căii de sinteză se face prin concentrația reactanților și a produșilor de reacție. Reglarea de substrat se realizează prin disponibilul de precursori: riboză-5-fosfat, acid folic, glutamină și aspartat.

Reglarea enzimatică se realizează la nivelul enzimei fosforibozil pirofosfat sintetaza și fosforibozil pirofosfat amidotransferaza prin reglajul de tip feedback realizat de produșii procesului de biosinteză: AMP, ADP, GMP și GTP. Deoarece transformarea IMP → AMP necesită GTP, iar transformarea IMP → GMP necesită ATP, cele două tipuri de nucleotide își reglează una altele concentrația.

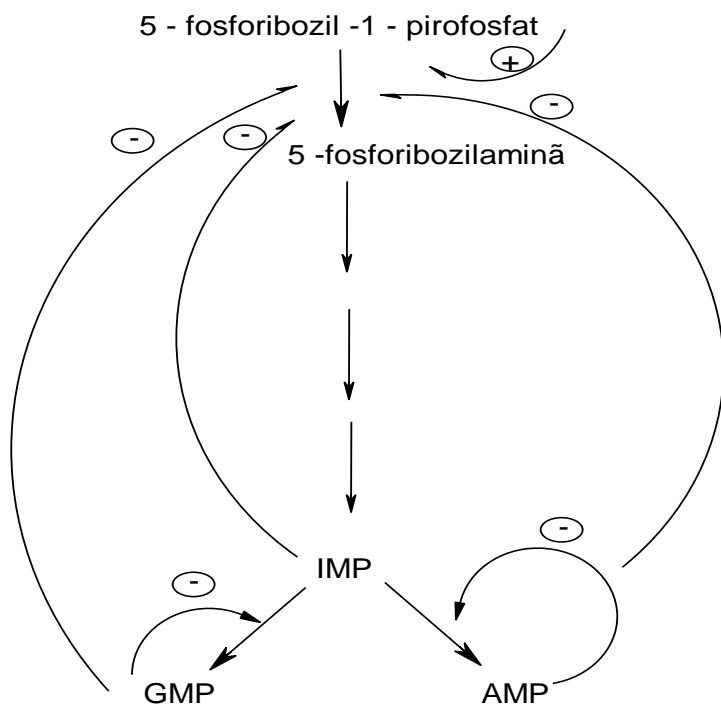


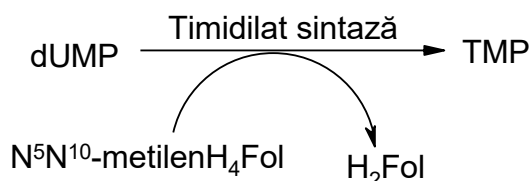
Figura 81. Reglarea biosintezei nucleotidelor purinice

Biosinteza nucleotidelor pirimidinice

Procesul de biosinteză are loc în citoplasmă, unde acționează enzima carbamoil fosfat sintetaza II. Această enzimă este diferită ca localizare și substrat de carbamoil sintetaza I din mitocondrie, enzimă implicată în ciclul ureogenetic. Procesul de sinteză se desfășoară invers comparativ cu sinteza purinelor, deoarece întâi se sintetizează nucleul pirimidinic și apoi se atașează restul fosforibozil.

Primul nucleotid format este acidul orotilic (OMP), care apoi se transformă în acid uridilic (UMP). Acesta este precursorul sintezei celorlalte nucleotide pirimidinice: CTP și respectiv TMP.

Enzimele ce participă la această cale metabolică sunt multifuncționale, catalizând mai multe reacții consecutive. O mențiune specială trebuie făcută pentru sinteza deoxitimidilatului (TMP), ce utilizează ca precursor dUMP.



Enzima timidilat sintetaza catalizează transferul unei grupe metilen și reducerea acesteia la o grupare metil. Este o reacție unică în care FolH_4 , transportor de grupări monocarbon, este redus la FolH_2 . Ulterior FolH_2 este redus la FolH_4 sub acțiunea enzimei FolH_2 reductază.

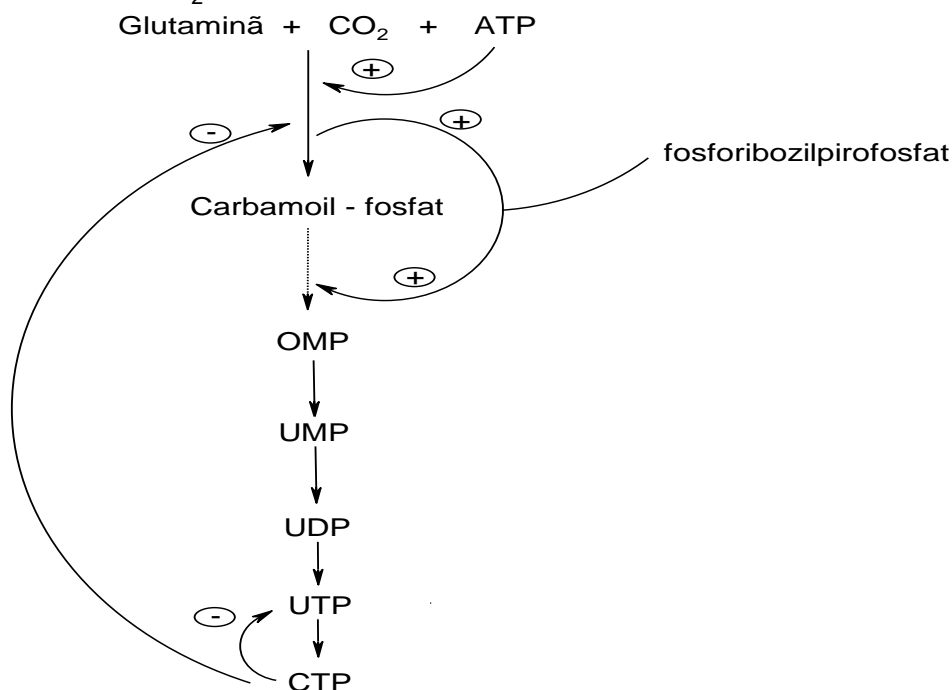


Figura 82. Reglarea biosintezei nucleotidelor pirimidinice

Reglarea biosintezei nucleotidelor pirimidinice se face în principal la nivelul enzimei de ritm a căii alosterice - carbamoil-fosfat sintetaza II, care este inhibată de UTP și nucleotide purinice, dar activată de fosforibozil pirofosfat. Produșii finali ai căii de biosinteză sunt UMP, UDP, UTP, CTP și dezoxi-TMP.

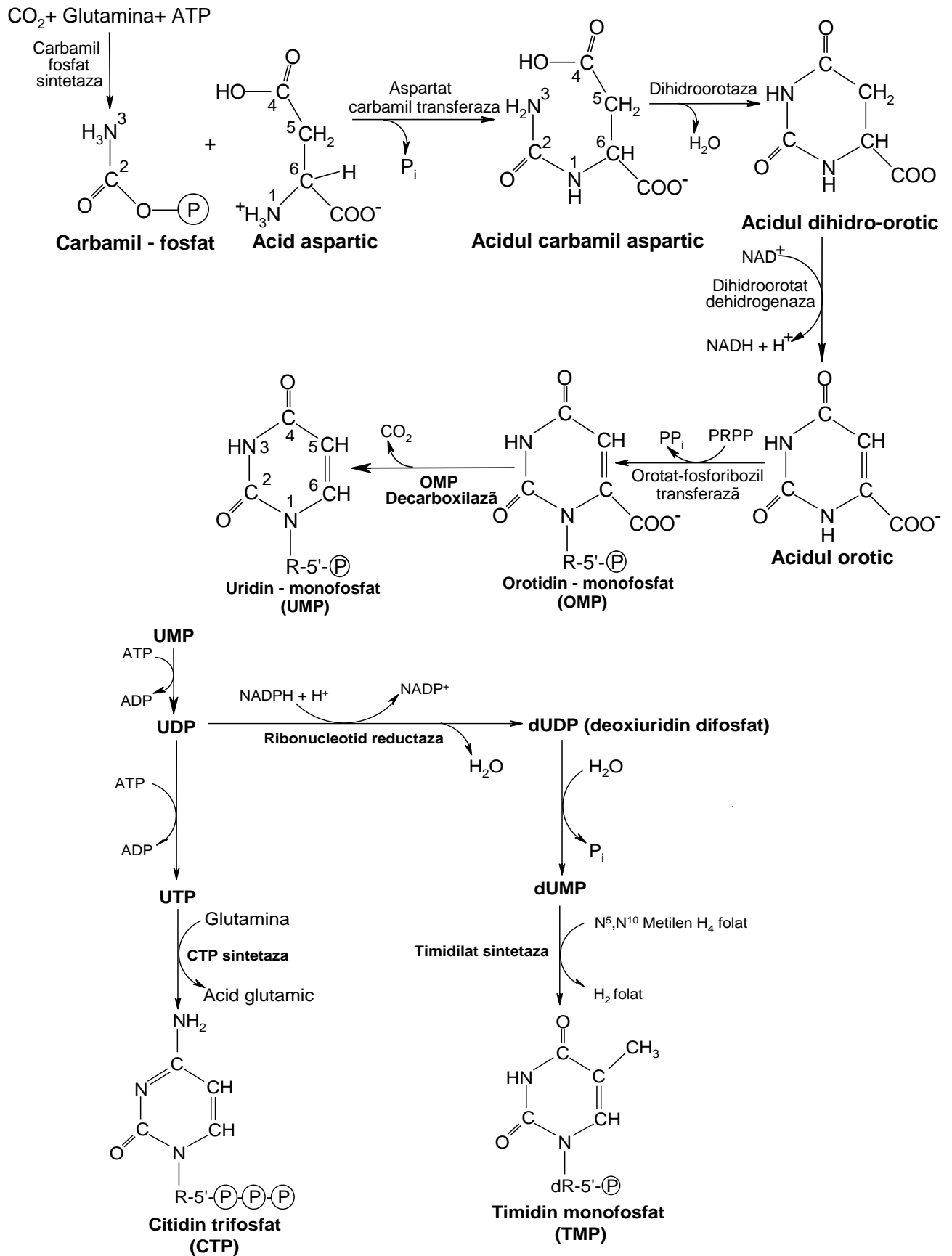


Figura 83. Biosinteza nucleotidelor pirimidinice

Reacții de salvare

Sinteza unei nucleotide este un proces costisitor din punct de vedere energetic, fiind necesară energia a 10 molecule ATP pentru sinteza unei molecule de AMP. Din acest motiv, într-un mod analog cu metabolismul proteic ce reutilizează aminoacizii, în metabolismul acizilor nucleici, sunt reutilizate elementele de bază ale nucleotidelor: baze azotate și nucleozide. În cazul metabolismului purinelor, bazele purinice libere sunt reutilizate printr-o reacție de fosforibozilare, prin care sunt transformate în nucleozide monofosfat. Enzima hipoxantin-guanin fosforibozil transferază este reglată prin feed-back de concentrațiile AMP și GMP.

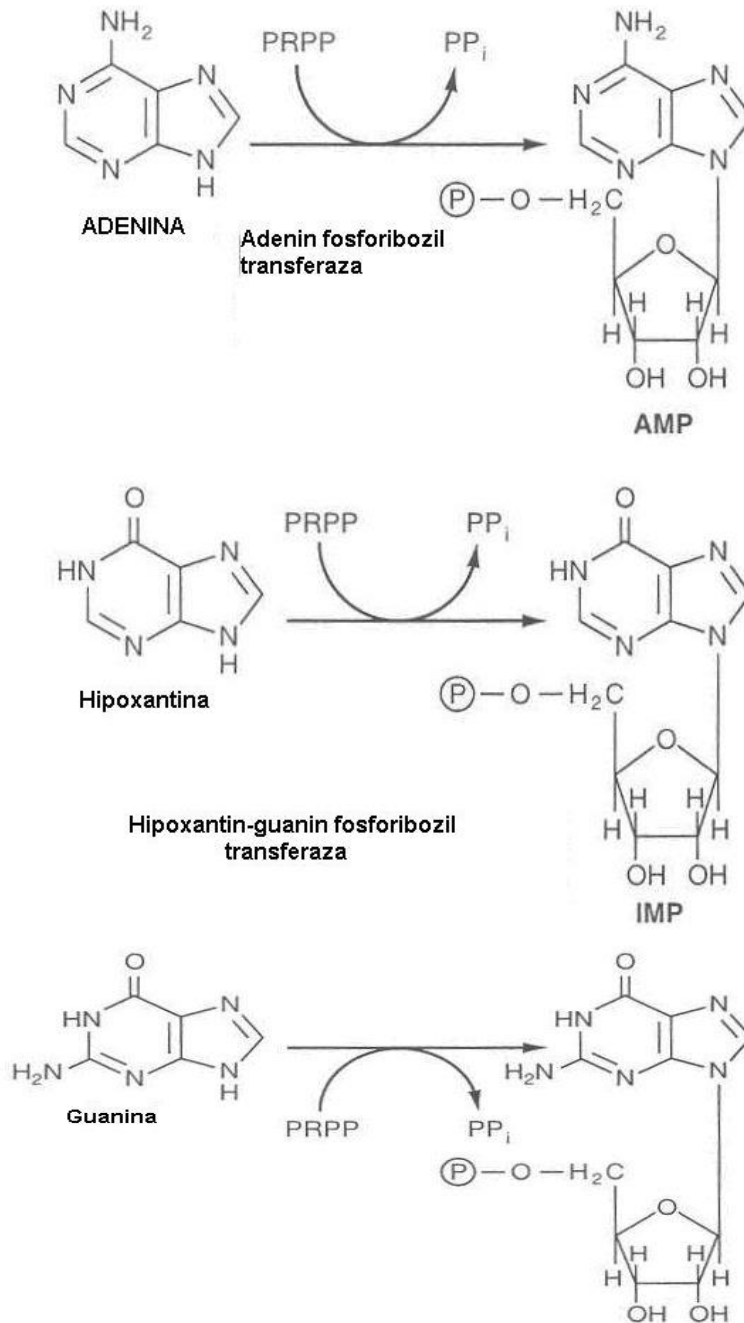


Figura 84. Reacții de salvare în metabolismul nucleotidic.
PRPP – fosforibozil pirofosfat

În cazul nucleotidelor pirimidinice, reacțiile de salvare utilizează doar nucleozide (uridina, citidina, timidina și d-citidina), pe care le convertesc prin fosforilare (fosforiltransferaza ATP dependentă) în nucleotide monofosfat. În plus, enzima orotat fosforibozil transferază transformă acidul orotic liber în orotidin monofosfat (OMP).

În ficat, predomină sinteza de novo a nucleotidelor, acest organ exportând baze azotate libere, nucleozide și nucleotide spre alte țesuturi (exemplu: țesutul nervos, eritrocite), unde sinteza de novo este deficitară, în schimb sunt posibile reacțiile de salvare.

Biosinteza deoxiribonucleozidelor

Deoxiribonucleozidele se obțin prin reacția de reducere a grupării hidroxil din poziția 2' a ribozei ribonucleozidelor difosfat. Pentru aceasta, ribonucleozidele monofosfat sunt fosforilate la forma difosfat, apoi sunt transformate prin acțiunea catalitică a unui complex enzimatic numit ribonucleotid reductază. Acest complex este activ doar atunci când celula sintetizează activ ADN. Echivalenții reducători ai reacției sunt furnizați de un cofactor enzimatic, tioredoxina redusă, ce posedă 2 grupări $-SH$ reducătoare, care după reducere formează o punte disulfidică, caracteristică tioredoxinei oxidate.

Sub acțiunea enzimei tioredoxin reductaza și a echivalenților reducători furnizați de $NADPH + H^+$, tioredoxina este reransformată în forma redusă, putând iniția o nouă reacție de reducere. Procesul este redat în figura 85.

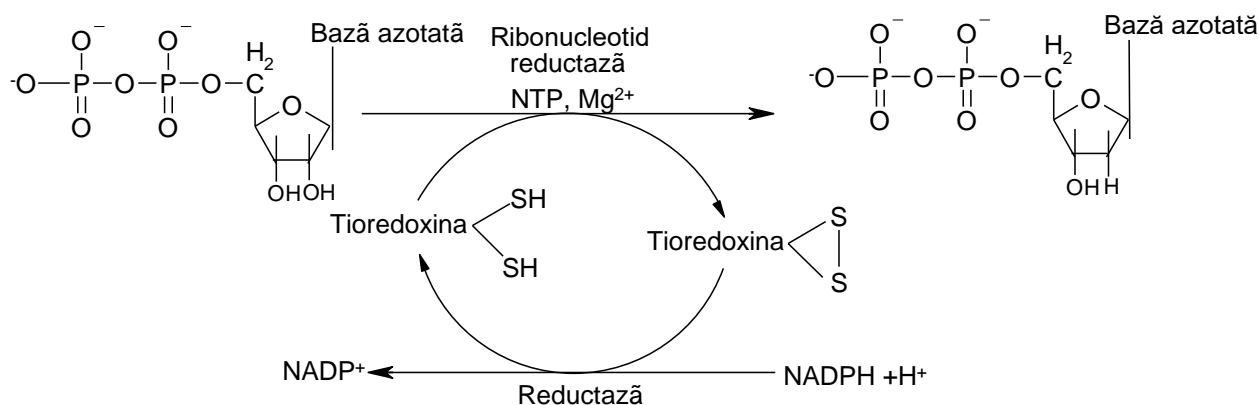


Figura 85. Biosinteza deoxiribonucleozidelor

Procesul de sinteză a deoxiribonucleotidelor este reglat prin feed-back de produșii de reacție obținuți: dATP, dGTP și dTTP. Acest lucru explică de ce deoxiadenozina, deoxiguanozina și deoxitimidina sunt toxici pentru celulele mamiferelor, inhibând sinteza ADN și astfel replicarea celulară.

Catabolismul nucleotidelor

Acizii nucleici sunt hidrolizați de nucleaze la nucleotide, acestea sunt hidrolizate de nucleotidaze la nucleozide, iar nucleozidele sub acțiunea fosforilazelor se transformă în bazele azotate corespunzătoare și riboză-1-fosfat. Bazele azotate purinice sunt catabolizate la acid uric, produs greu solubil cu puternic potențial antioxidant, iar bazele azotate pirimidinice la produși ușor solubili: CO_2 , NH_3 și β aminoacizi (β -alanina și acid β -aminoizobutiric).

Acidul β -aminoizobutiric poate fi transaminat la metilmalonilsemialdehida, care mai departe se transformă în succinil-CoA, componentă a ciclului Krebs. Totuși, s-a constatat că eliminarea urinară de acid β -aminoizobutiric crește în urma unor procese de distrugere a ADN cum ar fi în leucemii sau în radioterapie.

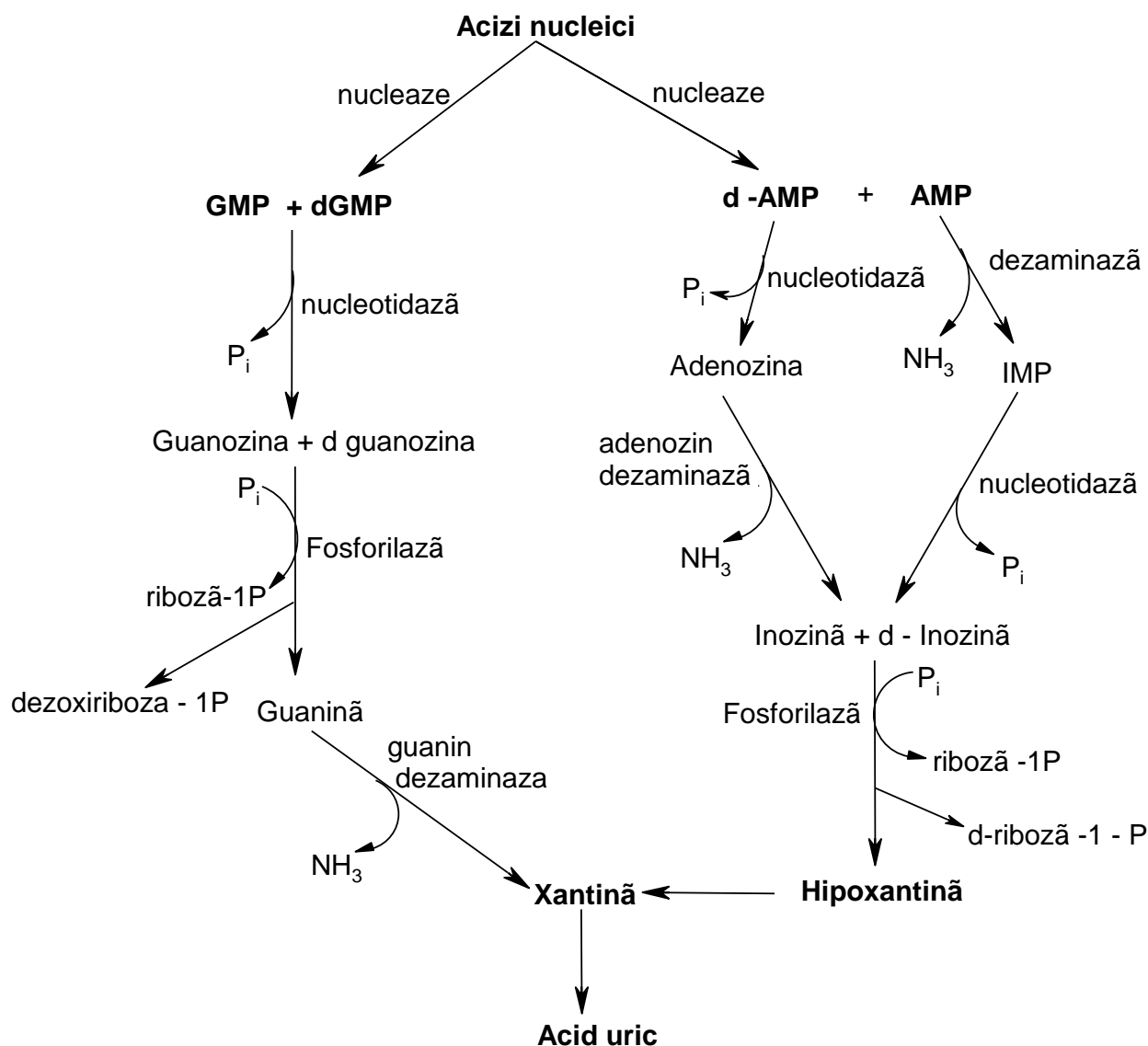


Figura 86. Catabolismul general al nucleotidelor purinice

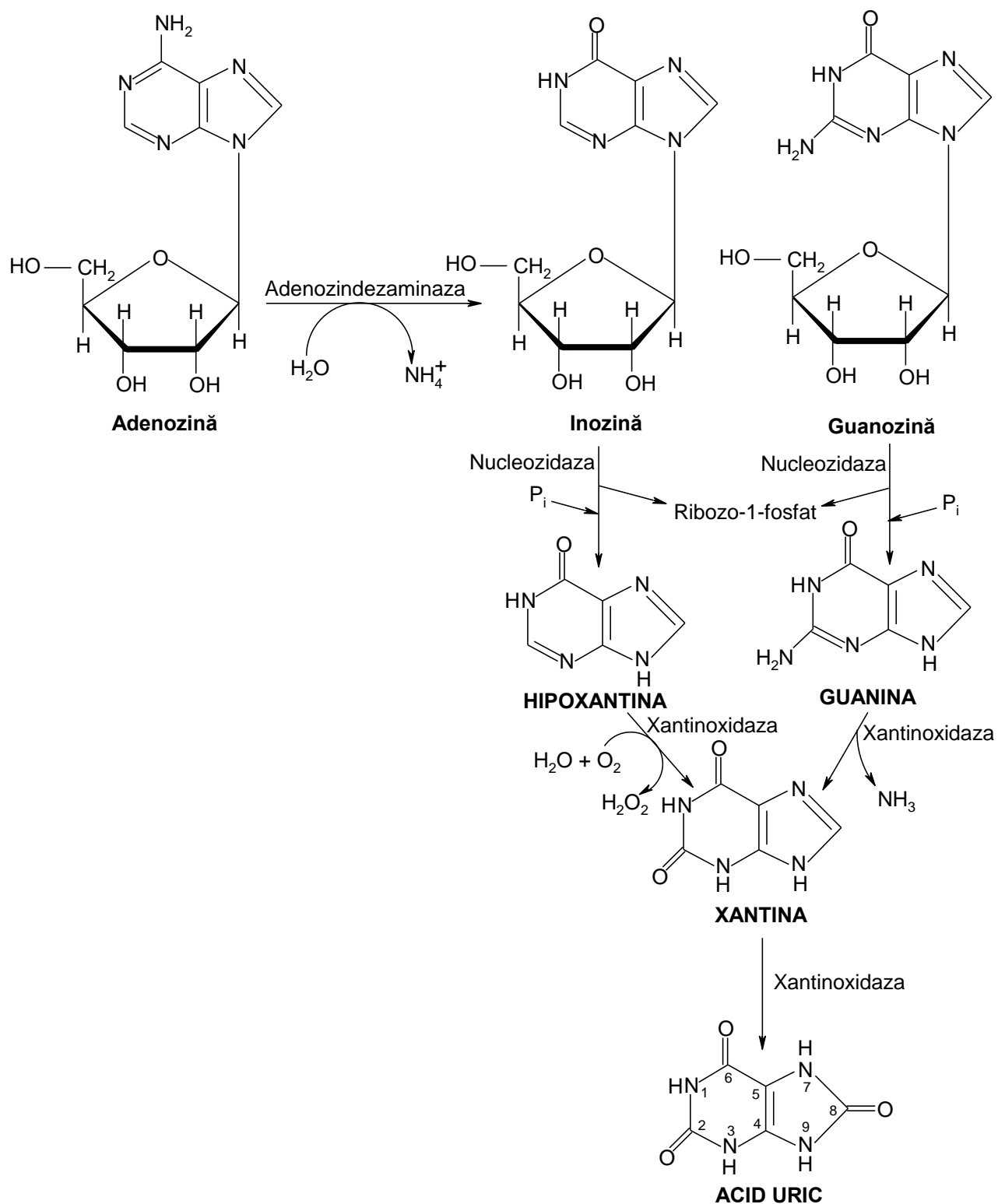


Figura 87. Catabolismul nucleozidelor purinice la acid uric

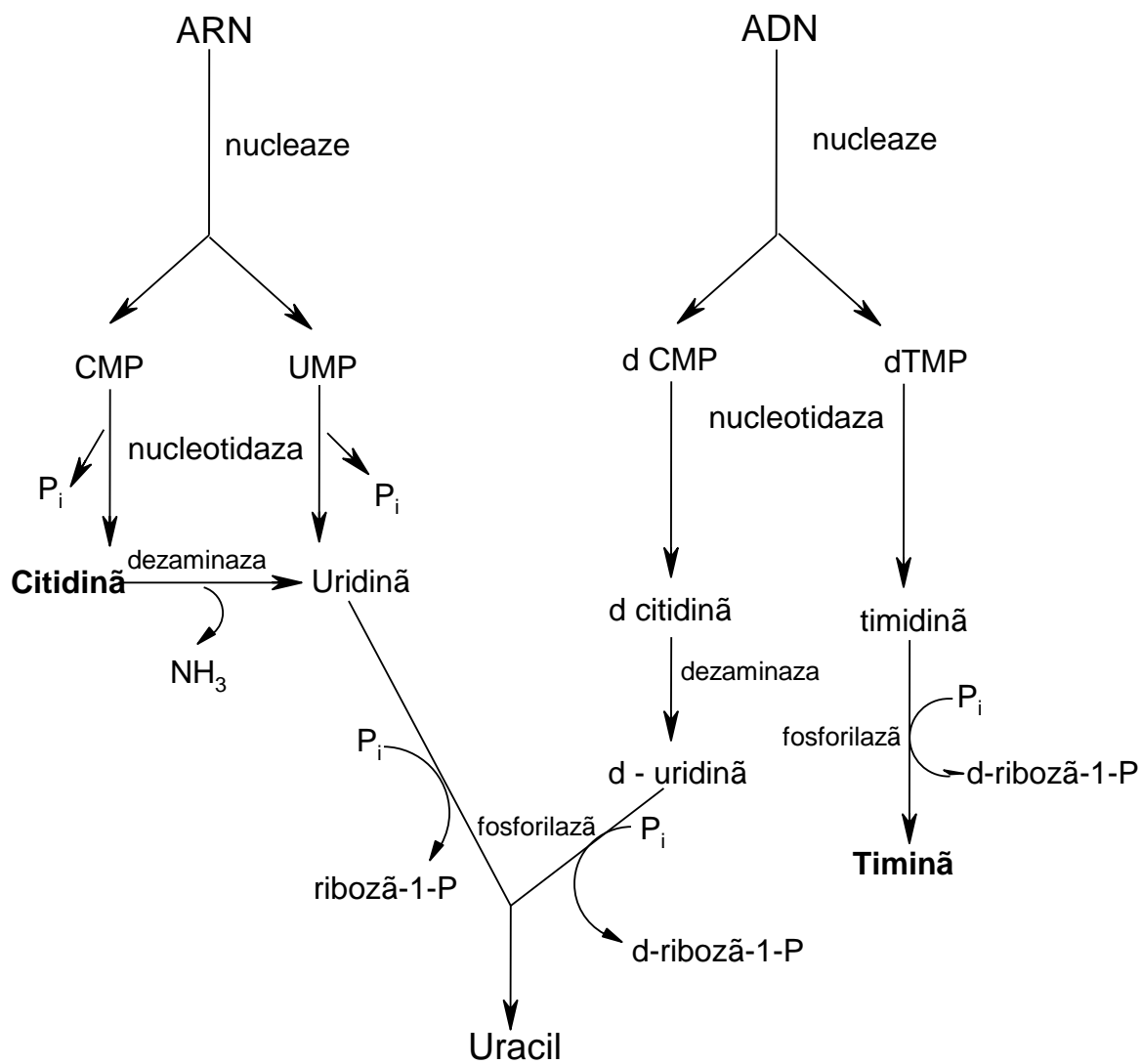


Figura 88. Catabolismul general al nucleotidelor pirimidinice

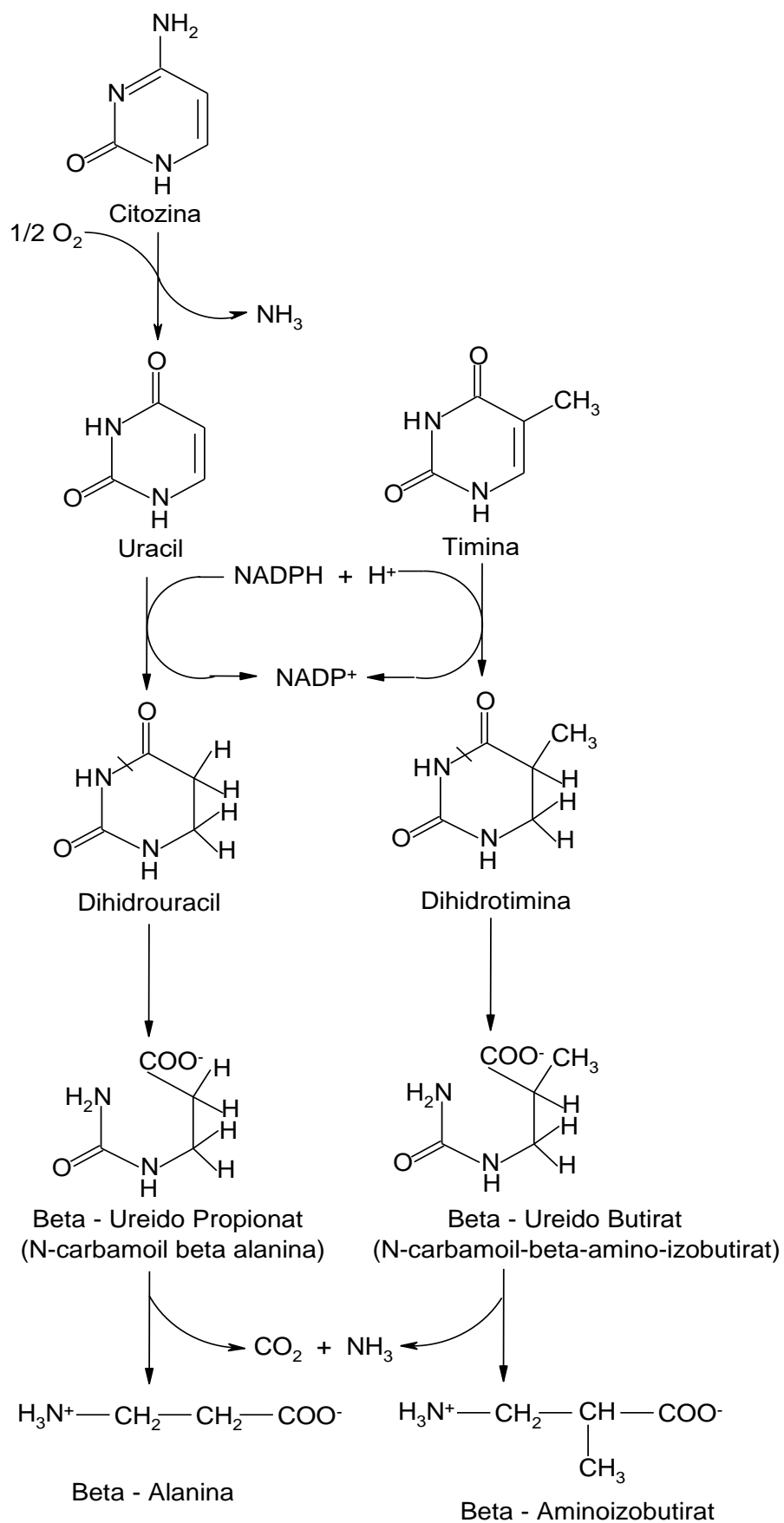


Figura 89. Catabolismul bazelor pirimidice

Acidul uric

Acidul uric este produsul final al catabolismului bazelor purinice la om, primat, amfibieni, reptile și păsări. La restul mamiferelor, enzima uricază oxidează acidul uric la alantoină, un produs mult mai solubil decât acidul uric. Acidul uric provine atât din purinele endogene cât și din cele alimentare. Se constituie zilnic o rezervă de aproximativ 1 g de acid uric, acumulându-se 300-600 mg/zi acid uric provenit din nucleotidele endogene și 600-700 mg/zi din dietă. Aproximativ 75% din acesta este excretat prin urină, iar restul este secretat la nivelul tractului gastro-intestinal unde este degradat până la alantoină sub acțiunea enzimelor bacteriene.

Concentrația plasmatică de acid uric este de 3-9 mg/100 mL (0,18-0,54 mmol/L) la bărbați și 2,5-7 mg/100 mL (0,15-0,45 mmol/L) la femei. Eliminarea urinară zilnică este de aproximativ 0,5 g acid uric.

Acidul uric este un compus puțin solubil, solubilitatea crescând mult la trecerea sub formă de urat. Astfel o urină acidă, pH=5 dizolvă 15 mg de acid uric/l urină, în timp ce o urină neutră cu pH=7 dizolvă o cantitate de peste 10 ori mai mare, 150-200 mg/l urină. Din acest motiv, depunerile de urat la nivel renal se previn prin alcalinizarea urinei. Solubilitatea uratului de sodiu în ser este de 7 mg% la pH fiziologic, astfel că orice mică depășire va precipita urații. La bărbați concentrația este în medie mai mare cu 1 mg% decât la femei și crește cu vârsta.

Concentrația acidului uric plasmatic este mai mare la persoanele care au o dietă bogată în proteine, acizi nucleici (carne) precum și la consumatorii de alcool.

Patologia catabolismului purinelor

A. Hiperuricemiile

Creșterea rezervei de urat (valori 20-25 g) duce la depășirea limitei de solubilitate și depunerea cristalelor de urat de sodiu la nivelul articulațiilor extremităților și în țesutul interstițial renal sub formă de tofi gutoși, fenomen însoțit de dureri acute. Cristalele pot fi vizualizate în lichidul sinovial.

Hiperuricemia este determinată de o creștere a producției sau de o scădere a excreției uratului.

1. Creșterea producției de urat se realizează datorită:

- creșterea activității enzimelor limitante de viteză a sintezei de novo a nucleotidelor purinice, fosforibozil pirofosfat sintetazei și fosforibozilpirofosfat amidotransferaza, sau creșterea concentrației substratului său, fosforibozil pirofosfatul.
- creșterea activității enzimelor care realizează sinteza de acid uric comparativ cu cele care realizează sinteza nucleotidelor.
- creșterea ratei catabolismului acizilor nucleici ca urmare a creșterii turn-overului sau distrucției celulare.
- scăderea activității căii de salvare a nucleotidelor, datorită absenței sau ineficienței enzimei HGPRT.
- creșterea activității xantin-oxidazei.

Această creștere a producției este întâlnită în următoarele circumstanțe:

- primar:

- boli metabolice congenitale: sindromul Lesh-Nyhan (deficit de HGPRT), creșterea activității fosforibozil pirofosfat sintetazei, deficitul de glucozo-6 fosfatazei (boala depozitelor de glicogen tip I), creșterea acitivității xantin-oxidazei.

- secundar:

- creșterea ingestiei de purine;
- accelerarea catabolismului acizilor nucleici: boli maligne, medicamente citotoxice, psoriazis, boli mieloproliferative, boli limfoproliferative (leucemii, limfoame), carcinomatoză, degradarea ATP-ului (datorită hipoxiei sau consumului de alcool).

2. Scăderea eliminării uratului. Excreția renală a uratului reprezintă un proces complex, proces care poate fi afectat de diverse boli renale sau de anumite medicamente:

- scăderea ratei filtrării glomerulare indiferent de cauză, determină o retenție de urat.
- secreția tubulară distală. Acidul lactic, acidul 3-hidroxitubiric și unele medicamente (ca de exemplu diureticele tiazidice) se află în competiție cu uratul pentru această cale excretorie. Orice situație care produce acidoză este asociată cu hiperuricemia.
- reabsorbția tubulară distală. Majoritatea medicamentelor cu efect uricazuric determină o scădere a reabsorbției tubulare de urat. Aceste situații se întâlnesc în următoarele circumstanțe:
 - **primar:**
 - hiperuricemia familială juvenilă;
 - **secundar:**
 - boli renale de diverse etiologii;
 - medicamente sau alte substanțe: diuretice tiazidice, salicilați (doze mici), plumbul, acizii organici (acidul lactic, cetoacizii).

B. Guta

Este principala afecțiune în care este implicată hiperuricemia. Ea reprezintă de fapt un grup de boli metabolice în cadrul cărora simptomele și semnele de boală sunt rezultatul depunerii tisulare a unor depozite formate din cristale de urat de sodiu monohidrat.

Guta se caracterizează prin atacuri recurente de artrită monoarticulară, fiind mai frecvent întâlnită la bărbați. Simptomele acute sunt datorate microtraumatismelor sau modificărilor metabolice locale determinate de acumularea acestor cristale. Cristalele sunt fagocitate de către leucocite și macrofage și produc leziuni membranare leucocitare. Eliberarea lizozimului și a altor mediatori ai răspunsului inflamator acut (citokine, prostaglandine, radicali liberi) determină manifestări locale și sistemice de gută. Aceste depozite de urat în țesuturile moi poartă numele de tofi gutoși.

Majoritatea pacienților prezintă o deteriorare a excreției renale și o eliminare deficitară a uratului. De asemenea, ei dezvoltă adesea calculi renali formați din acid uric și urați, dar formarea acestora este favorizată de deshidratare și de scăderea pH-ului urinar.

Etiologia bolii cuprinde diferite tipuri de tulburări ale enzimelor din sinteza nucleotidelor și care au drept efect o superproducție însoțită de un catabolism corespunzător. Exemple de astfel de defecte enzimatice:

1. Creșterea activității **fosforibozil-pirofosfat sintetazei** (enzima de ritm în sinteza nucleotidelor).
2. Scăderea activității **hipoxantin-guanozin fosforibozil transferazei**, fapt ce reduce reacțiile de salvare ale nucleotidelor, intensificând compensator catabolismul la acid uric.
3. Deficit al **glucozo-6-fosfat fosfatazei** (boala Van Gierke) crește disponibilul

de glucozo-6-fosfat pentru calea pentoze-fosfaților, iar riboza-5 fosfat rezultată este precursor și stimulator al activității fosforibozil-pirofosfat-sintetazei.

Diagnosticul de laborator al gutei se realizează prin:

- **creșterea concentrației plasmatică a acidului uric.** Un număr mic de pacienți prezintă totuși valori normale ale acidului uric seric.
- diagnosticul de certitudine îl conferă **examenul lichidului sinovial** și examinarea microscopică a acestuia. Punerea în evidență a tofilor gutuși sau a cristalelor de urat de sodiu monohidrat fagocitate de către leucocite confirmă diagnosticul. Aceste cristale au o lungime de 2-10 mm lungime iar la examinarea lor în lumină polarizată se observă o birefrință caracteristică.

Măsuri terapeutice în cazul gutei :

- evitarea consumului de alimente care cresc acidul uric plasmatic: dietă hiperproteică, alcool;
- scăderea în greutate;
- administrarea de inhibitori ai sintezei de urat: allopurinolul.

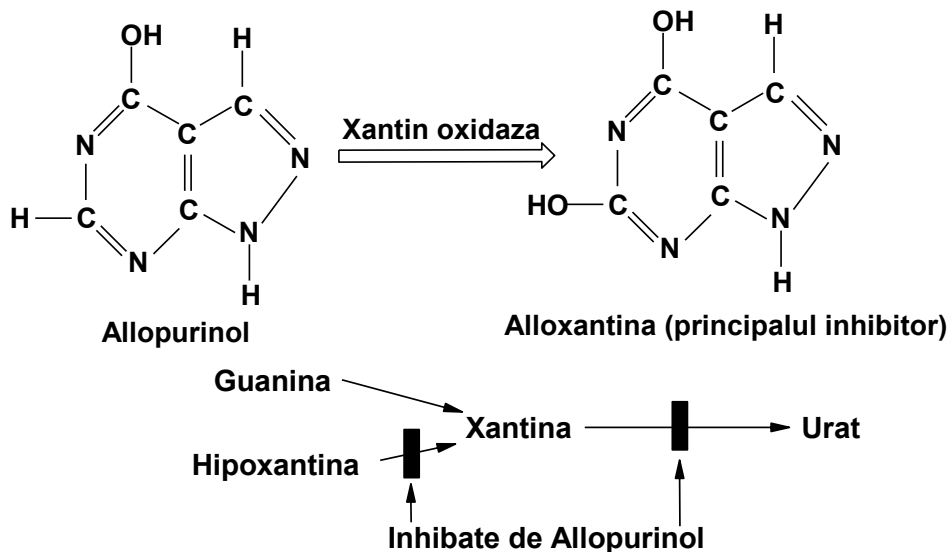


Figura 90. Mecanismul de acțiune al allopurinolului

Allopurinolul este un analog structural al hipoxantinei, ce inhibă competitiv activitatea xantin-oxidazei. Catabolismul purinic este blocat la nivelul xantinei, care fiind mai solubilă decât acidul uric se elimină urinar mult mai ușor.

- alcalinizarea urinei pentru a reduce riscul formării calculilor;
- administrarea de antiinflamatoare nesteroidiene (de exemplu indometacin) în faza acută, fază în care este contraindicată administrarea allopurinolului.

C. Sindromul Lesch-Nyhan

Este o boală congenitală gravă generată de defectul genetic al hipoxantin-guanin-fosforibozil-transferazei ce reduce parțial sau total activitatea enzimei. Acest lucru blochează total reacțiile de salvare a nucleotidelor, astfel că este amplificată sinteza de novo a nucleotidelor, ce vor fi catabolizate la acid uric. Boala se asociază cu o creștere a producției de purine, hiperuricemie, litiază cu acid uric, gută și tulburări neurologice. Acești pacienți prezintă retardare mentală severă cu tulburări de comportament caracterizate în special prin automutilare.

Prognosticul pe termen lung al acestor pacienți este nefavorabil. Totuși, se poate încerca administrarea de allopurinol care să prevină guta și formarea calculilor urinari, tratament ce nu are nici un efect asupra tulburărilor neurologice.

D. Hipouricemiile

Sunt determinate fie de o scădere a producției, fie de o creștere a excreției. Scăderea producției are la bază fie defecte ale enzimelor implicate în catabolismul bazelor purinice: xantin oxidaza, purin nucleozid fosforilaza (asociată și cu imunodeficiență), fie boli hepatice severe. În cazul unui defect al xantin-oxidazei, generat de o mutație genetică sau de o afectare gravă a ficatului, boala se manifestă prin xantinurie și litiază cu xantină. Creșterea excreției se datorează fie unui defect în transportul tubular (sindromul Fanconi, boala Wilson), fie unor medicamente: antiinflamatoare nesteroidiene (fenilbutazona), medicamente uricozurice.

E. Sindromul imunodeficitar sever

Se manifestă prin reducerea și disfuncționalitatea limfocitelor T și B, fapt ce reduce aproape total funcționalitatea sistemului imunitar. Este o boală congenitală, astfel că nou-născutul este vulnerabil față de orice agent patogen. Boala se datorează defectului enzimei adenzin-dezaminază sau a enzimei purin nucleozid fosforilază. În ambele cazuri se acumulează dGTP și dATP, care inhibă ribonucleotid reductaza, blocând astfel sinteza de nucleotide pentru sinteza ADN.

V.2.8. Patologia metabolismului nucleotidelor pirimidinice

Cea mai cunoscută afecțiune legată de metabolismul nucleotidelor pirimidinice este **aciduria orotică**. Boala este dată de defecte congenitale ale enzimelor orotat fosforiboziltransferaza sau orotidilat decarboxilaza, fapt ce blochează sinteza de nucleotide pirimidinice la nivelul acidului orotic, care se acumulează în sânge și se elimină urinar. Boala este periculoasă prin deficitul de nucleotide pirimidinice creat.

Pacienții depind de aportul extern și sunt tratați cu doze mari de uridină, administrată pe cale orală.

Substanțe chemoterapeutice ce interferă cu metabolismul nucleotidelor

Sinteza nucleotidelor este un proces esențial în viața și diviziunea celulelor. Din acest motiv, inhibarea acestui proces va afecta însăși supraviețuirea celulară. În terapie se folosesc inhibitori ai enzimelor importante, implicate în metabolismul nucleotidelor, care după structura sau rolul funcțional se împart în: **antimetaboliți, antifolați, antagoniști ai glutaminei, virustatice**.

A. Antimetaboliți

Sunt substanțe cu structură analoagă cu a purinelor și pirimidinelor, astfel că inhibă prin inhibiție competitivă enzimele implicate în metabolismul normal al nucleotidelor.

Astfel, **6-mercaptapurina, 5-fluorouracilul, citozin-arabinozidul** (Citarabina are arabinoză în locul ribozei), **6-tioguanina** fie inhibă sinteza nucleotidului specific, fie sunt încorporate ca false nucleotide în ADN sau ARN, blocând activitatea acestora. Din acest motiv sunt utilizate ca citostatice în tratamentul cancerului.

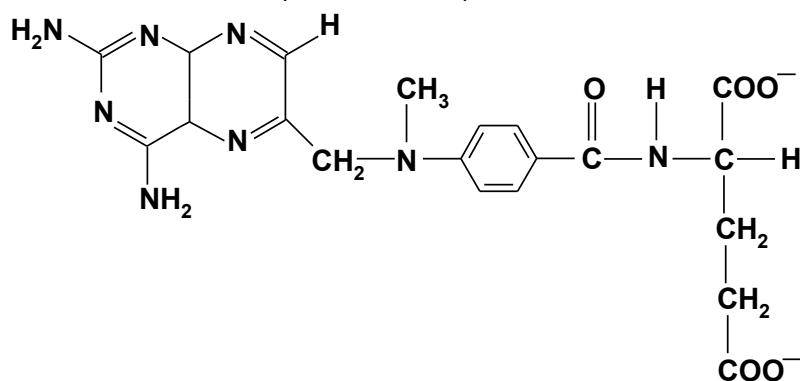
Allopurinolul (un analog structural al hipoxantinei) este inhibitor competitiv al enzimei xantin-oxidaza, blocând transformarea hipoxantinei și a xantinei în acid uric, fenomen asociat cu xantinurie. În același timp, allopurinolul este substrat alternativ

pentru orotat fosforibozil transferază, blocând transformarea acidului orotic în uracil și producând acidurie orotică.

B. Antifolații

Sunt agenți chemoterapeutici, cu structură analogă acidului folic, ce blochează regenerarea FolH_4 din FolH_2 sau acid folic, inhibând competitiv enzima FolH_2 reductaza. Acest efect oprește sinteza de novo a nucleotidelor, blocând diviziunea celulară.

Cel mai cunoscut agent este **metotrexatul**, utilizat curent ca agent antitumoral în tratamentul cancerului. Deoarece metotrexatul este toxic și pentru celulele normale, în tratamentul leucemiei cu metotrexat se asociază cu administrarea de N_5 -formil- FolH_4 (Leucovarină).



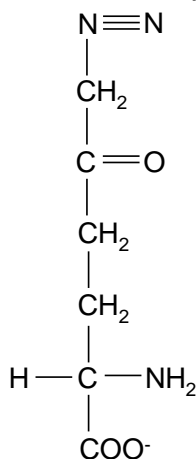
Metotrexatul (Amopterina)

C. Antagoniști ai glutaminei

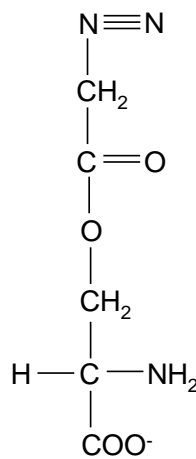
Glutamina este un element esențial în sinteza nucleotidelor:

- este sursa pentru atomii de azot (N_3 și N_9) din nucleul purinic.
- intervine în transformarea $\text{IMP} \longrightarrow \text{GMP}$.
- intervine în transformarea $\text{UTP} \longrightarrow \text{CTP}$.
- participă la sinteza de carbamil-fosfat.

Din acest motiv, analogii structurali ai glutaminei ca 6-Diazo-5-oxo-L-norleucină sau Azaserina pot bloca aceste reacții esențiale în sinteza nucleotidelor. Compușii au un efect citotoxic foarte puternic.



6-Diazo-5-oxo-L-Norleucina

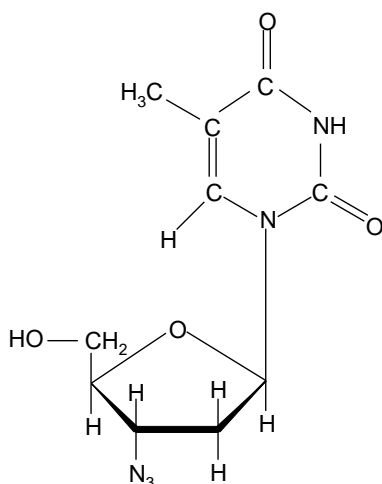


Azaserina

D. Agenți antivirali

Sunt analogi structurali ai purinelor sau pirimidinelor, în care fie sunt substituiți atomi de carbon cu halogeni (iodoxuridină, trifluoruridină), fie componenta glucidică este modificată (vidarabina este o adeninarabinoză, aciclovirul este aciclovirguanozină, azidotimidina este 3' azido-3'-deoxitimidină).

Aciclovirul este un agent antiviral pentru herpesvirus (HSV), iar azidotimidina - AZT pentru virusul imunodeficienței umane (HIV). Ambele substanțe inhibă competitiv kinaze virale, transformându-se în nucleotide aberante, blocând activitatea ADN polimerazelor virale.



3' - azido - 2', 3' - dideoximidina sau AZT