

00562

1

14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE QUIMICA

¿ES EL GLUTATION UN METABOLITO SECUNDARIO?

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A

MARIA GUADALUPE VAZQUEZ LIZARDI

1 9 8 4

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

## SUMARIO

Página

INDICE DE FIGURAS .....	I
ABREVIATURAS .....	II
RESUMEN .....	1
GENERALIDADES .....	5
- Glutation .....	5
- Metabolismo secundario .....	38
- Penicilina .....	62
ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO	
DEL PROBLEMA .....	73
MATERIALES Y METODOS .....	79
RESULTADOS Y DISCUSION .....	92
CONCLUSIONES .....	110
BIBLIOGRAFIA .....	112

## INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Fórmula estructural del glutati6n (GSH) .....	7
FIGURA 2. Sumario general del metabolismo de glutati6n .....	9
FIGURA 3. Esquema de trof6fase e idiofase y su correlaci6n con la producci6n - de metabolitos secundarios .....	45
FIGURA 4. Estructura fundamental de la penicilina .....	63
FIGURA 5. Esquema general de la ruta ramificada com6n para bencilpenicilina y lisina .....	65
FIGURA 6. Ruta postulada para la bios6ntesis de penicilina .....	67
FIGURA 7. Diversas penicilinas .....	69
FIGURA 8. Cin6tica de crecimiento y producci6n de penicilina en <u>P. chrysogenum</u> ....	70
FIGURA 9. Comparaci6n de la estructura qu6mica del GSH con el trip6ptido precursor de la penicilina .....	74
FIGURA 10. Esquema de tubo de Thunberg .....	91
FIGURA 11. Pozas de los amino6cidos precursores de GSH en correlaci6n con el crecimiento microbiano y los perfiles de producci6n del GSH .....	94

FIGURA 12.	Inducción de la síntesis de GSH por glutamato en <u>P. chrysogenum</u> .....	95
FIGURA 13.	Actividad enzimática de $\alpha$ -aminoadipil cisteína sintetasa y $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa con y sin glutamato .....	97
FIGURA 14.	Niveles de actividad de $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína sintetasa) a diferentes tiempos y su correlación con el crecimiento microbiano .....	100
FIGURA 14a.	Niveles de penicilina y glutati6n intracelular y su correlaci6n con la cin6tica de crecimiento microbiana .....	101
FIGURA 15.	Perfiles de producci6n de GSH intracelular y extracelular .....	103
FIGURA 16.	Inhibici6n de la $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína sintetasa por GSH .....	105
FIGURA 17.	Ciclo del $\gamma$ -glutamilo y el transporte de aminoácidos .....	107
FIGURA 18.	Mecanismo que propone el tripéptido precursor de la penicilina como aca-rrador .....	108

## ABREVIATURAS

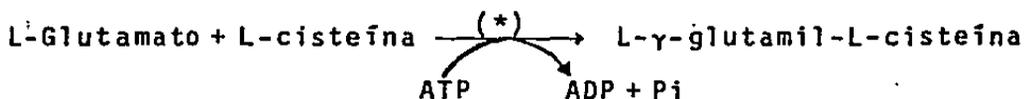
Ac. $\alpha$ -amino adípico .....	$\alpha$ -aaa
Ac. 6-amino penicilánico .....	6-APA
Aminoácido .....	AA
Cicloheximida .....	CH
Cisteín-glicina .....	CISH-GLI
Cisteín-glicina S-derivada .....	CIS-GLI X
Cisteína (reducida) .....	CISH
Glutamato .....	Glu (G)
Glutati3n reducido .....	GSH
Glutati3n oxidado .....	GSSG
$\gamma$ -glutamil aminoácido .....	$\gamma$ -Glu-AA
$\gamma$ -glutamil-cisteína .....	$\gamma$ -Glu-CISH
$\gamma$ -glutamil-cisteína S-derivada .....	$\gamma$ -Glu-Cis-X
Medio de producci3n .....	M.P.
Mezcla de sales Jarvis y Johnson 10X .....	J.J. 10X
Sistema de células en reposo .....	R.C.

## RESUMEN

## RESUMEN

El glutati3n (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) es una mol3cula que participa en varias funciones relevantes para los sistemas biol3gicos, el cual tiene gran semejanza estructural al trip3ptido precursor de la s3ntesis de penicilina  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina).

Las rutas de s3ntesis y/o utilizaci3n del glutati3n han sido ampliamente exploradas. En estudios realizados sobre las propiedades catal3ticas de la primera enzima biosint3tica de glutati3n (cuya funci3n se esquematiza a continuaci3n), Meister y col. encontraron que 3sta puede usar como primer sustrato algunos an3logos de glutamato, incluyendo el D-L- $\alpha$ -aminoadipato (primer sustrato de la bios3ntesis de penicilina).



\* $\gamma$ -glutamil-ciste3na sintetasa.

Adicionalmente Arnstein y col. demostraron que el primer paso de la s3ntesis de penicilina consiste tambi3n en la formaci3n de un dip3ptido:  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-L-ciste3na), pero nada mencionan respecto a la enzima que cataliza esta reacci3n. Bas3ndose en esto Kaszab y Enfors

aislaron la  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa de P. chrysogenum probando su actividad frente a glutamato y  $\alpha$ -aminoadipato, encontrando que la enzima funciona con ambos sustratos. Esto les permitió sugerir que en el primer paso biosintético de glutatión y de penicilina, participa una enzima en común.

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el glutamato (10 mM) induce la síntesis de penicilina en P. chrysogenum, y que la poza de este aminoácido se incrementa notablemente durante la etapa de transición trofofase-idiofase.

Con tales precedentes nos abocamos a buscar analogías biosintéticas y/o regulatorias entre glutatión y penicilina en P. chrysogenum. Encontramos que los perfiles de producción de ambos metabolitos en el curso de una fermentación normal son muy semejantes y que la síntesis de novo de GSH aumenta cuando cesa el crecimiento logarítmico, etapa en la cual se observa también un aumento notable de la poza de glutamato.

Exploramos también los perfiles de actividad  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetasa y de la  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína sintetasa) y encontramos una correlación muy interesan

te ya que ambas presentan un aumento considerable en etapas tardías de la fermentación.

Encontramos también que glutamato ejerce un efecto inductor para la síntesis de GSH, similar al que se presenta en el caso de penicilina, este efecto se presenta también cuando usamos análogos del aminoácido y se previene con cicloheximida. Comprobamos también que glutatión inhibe in vitro la actividad de la  $\gamma$ -glutamil cisteína-sintetasa (efecto que ha sido ampliamente explorado) y de mostramos que también inhibe la actividad de  $\delta$ (L- $\alpha$ -amino-adipil-cisteína sintetasa). Esta inhibición también se presenta in vivo (datos no mostrados) para P. chrysogenum, en un sistema de células en reposo suplementado con GSH, dando como resultado una inhibición de la síntesis de penicilina.

Por otra parte, Sánchez y col. habían observado que la glutamina en concentraciones <de 1 mM estimulan la síntesis de penicilina y a concentraciones >de 1 mM la inhiben. Mateos y col. (del mismo grupo de trabajo) han sugerido que tal inhibición se debe a que el tripéptido precursor de la penicilina se canaliza hacia el transporte de glutamina, de manera análoga a como funciona glutatión, impidiendo su incorporación en los siguientes pasos de la

biosíntesis de penicilina. Tal sugerencia ha sido apoyada por supuesto en hechos experimentales.

Por último, en concordancia a lo reportado por Demain y Piret respecto a que algunos organismos esporulantes contienen dentro de sus esporas aquellos metabolitos secundarios cuya producción los caracteriza, hemos encontrado que las esporas de P. chrysogenum contienen almacenados niveles considerables de penicilina y glutatión.

Por todos los hechos antes mencionados, los cuales parecen indicar que entre penicilina y glutatión no solo existen analogías estructurales sino también funcionales, así como por la existencia de mutantes microbianas GSH (-) capaces de crecer normalmente en medio mínimo (hallazgos reportados en la literatura) y sobre todo por la aparición de la primera enzima responsable de la síntesis de glutatión, y del glutatión mismo en etapas tardías del crecimiento microbiano, es que nos inclinamos a sugerir que la respuesta a la pregunta planteada en esta tesis parece coincidir con el glutatión como un metabolito secundario.

## GENERALIDADES

## GLUTATION

Panorama general

El glutati3n es una mol3cula sulfhidr3lica de bajo peso molecular que se encuentra virtualmente en todos los sistemas biol3gicos. Su abundancia y localizaci3n predominantemente intracelular, permitieron su aislamiento por primera vez a partir de levaduras desde 1888 (1,2). M3s tarde la realizaci3n de diversos estudios cristalogr3ficos y de s3ntesis (3-6) permitieron el esclarecimiento de su estructura qu3mica, como un trip3ptido constituido por 3 amino3cidos fundamentales: glut3mico, ciste3na y glicina (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) (Fig. 1).

Se sabe que este trip3ptido participa directa o indirectamente en fen3menos biol3gicos diversos. Existe actualmente amplia informaci3n respecto a la s3ntesis y metabolismo del GSH a trav3s del ciclo  $\gamma$ -glutam3lico, as3 como su participaci3n en eventos de reducci3n indispensables para la s3ntesis y degradaci3n de prote3nas, formaci3n de desoxirribonucle3tidos precursores del DNA, regulaci3n de las enzimas, protecci3n de las c3lulas contra compuestos oxidantes y radicales libres. Funciona adem3s como coenzima en algunas reacciones, se conjuga con compuestos ex3genos (por ej. drogas) y con compuestos end3ge

nos como estrógenos, prostaglandinas, leucotrienos, participando así en el metabolismo de éstos. (62,65).

Entre los hallazgos de importancia recientes, se sabe que el recambio celular de glutatión, está asociado con su transporte en forma de GSH fuera de la célula. Entre las funciones de dicho transporte se incluye la formación de  $\gamma$ -glutamil aminoácidos con la participación de la  $\gamma$ -glutamil-transpeptidasa (enzima asociada a membranas), los cuales pueden ser transportados al interior de la célula, sirviendo así como un mecanismo de transporte de aminoácidos. El glutatión transportado (GSH), probablemente participa también en reacciones de reducción que pueden involucrar la membrana celular y su entorno inmediato. En los mamíferos el GSH transportado, puede pasar al plasma y ser transferido a otras células; se ha sugerido que el glutatión es un almacén y transportador de cisteína.

Mucha de la información más relevante acerca del glutatión ha surgido de estudios realizados con inhibidores selectivos de las enzimas involucradas en su metabolismo; los efectos observados han contribuido importante-mente al entendimiento del metabolismo y función del GSH. Tenemos así que inhibiendo a la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa,

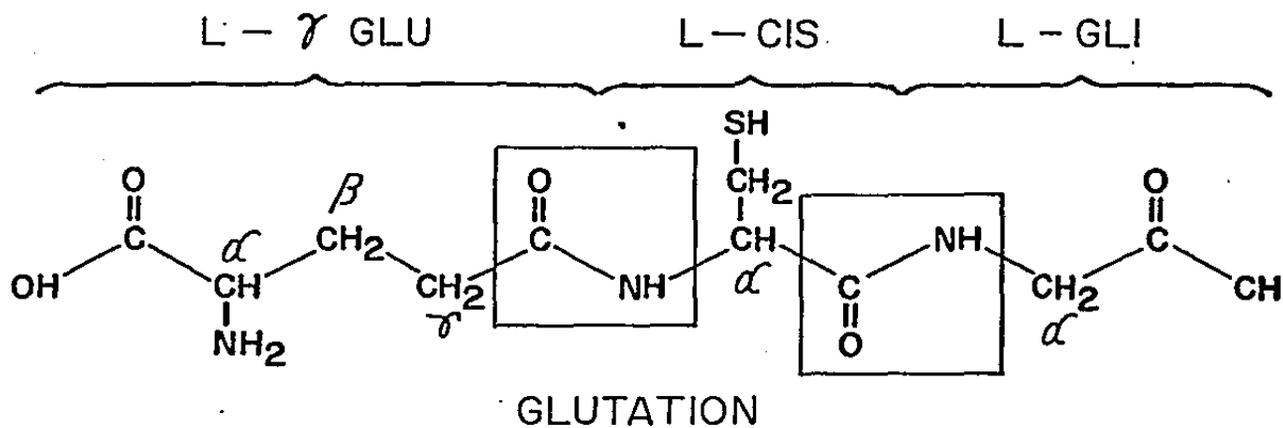


FIGURA 1.- FORMULA ESTRUCTURAL DE GLUTATION

se ha elucidado la formación y transporte de los  $\gamma$ -glutamil aminoácidos. La inhibición de la síntesis del glutati6n por sulfoximas (compuestos que inactivan la  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetasa) ha contribuido también a tales conocimientos, así como a la informaci6n de la participaci6n del GSH en la protecci6n contra radicales libres y compuestos oxigenados. El uso de estos inhibidores o de sustancias que incrementan in vivo la síntesis de GSH, han abierto el camino para entender el metabolismo del GSH.

#### Metabolismo:

El glutati6n se forma por la acci6n de enzimas específicas y no por los procesos generales de la formaci6n de péptidos. Para la síntesis y degradaci6n de GSH se han propuesto las reacciones del ciclo  $\gamma$ -glutamilo. Este ciclo se ha estudiado ampliamente en mamíferos, aunque se sabe que funciona también en levaduras, bacterias, insectos y protozoarios.

El glutati6n se sintetiza intracelularmente por la acci6n consecutiva de dos enzimas: la  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa (Fig. 2, reacci6n 1) y la glutati6n sintetasa (Fig. 2, reacci6n 2). Se ha demostrado que GSH retroinhibe la actividad de la enzima que cataliza la primera reac

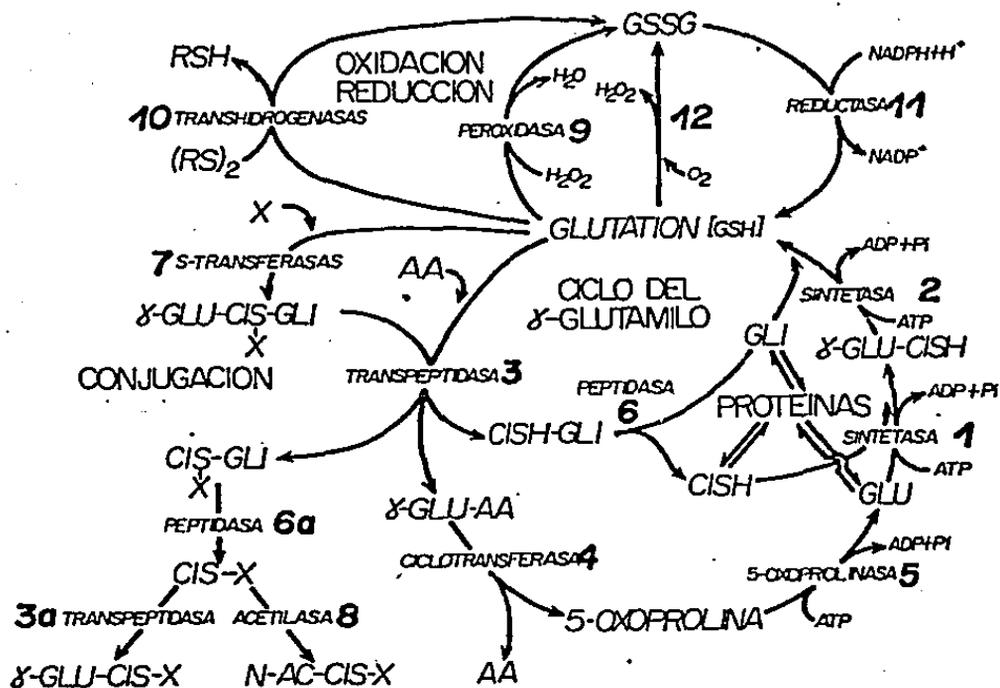


FIGURA 2.- Sumario general del metabolismo del glutati6n: Reacci6n 1. γ-glu-cis sintetasa; Reacci6n 2. GSH sintetasa; Reacci6n 3 y 3a. glutamil transpeptidasa; Reacci6n 4. γ-glu tamil ciclotransferasa; Reacci6n 5. 5-oxo prolinasa; Reacci6n 6. y 6a. dipeptidasa; Reacci6n 7. GSH S-transferasas; Reacci6n 8. N-acetilasa; Reacci6n 9. GSH peroxidasa; Reacci6n 10. transhidrogenasas; Reacci6n 11. GSSG reductasa; Reacci6n 12. Oxidaci6n de GSH por O<sub>2</sub>; la formaci6n de GSSG - tambi6n puede estar mediada por radicales libres.

ción (7).

La utilización de GSH se inicia por acción de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, enzima asociada a membranas, que cataliza la transferencia del grupo  $\gamma$ -glutamilo a algunos aminoácidos aceptores como: cisteína, glutamina, metionina, y a ciertos dipéptidos (Fig. 2, reacción 3). Mediante estudios histoquímicos se ha demostrado que la transpeptidasa se encuentra en la superficie externa de la membrana celular (1), mientras que el glutatión (sustrato de esta enzima), se encuentra intracelularmente y es transportado a través de la membrana celular, de manera que puede interactuar con la transpeptidasa y los aminoácidos receptores del grupo  $\gamma$ -glutamilo. Los  $\gamma$ -glutamil aminoácidos así formados son translocados al interior de la célula, donde se convierten en sustrato de la  $\gamma$ -glutamil ciclo transferasa (Figura 2, reacción 4); la cual los convierte en los correspondientes aminoácidos libres y en 5-oxo-L-prolina. La 5-oxoprolina se convierte en glutamato por acción de la 5-oxoprolinasa, en una reacción que requiere ATP. (Fig. 2, reacción 5). El dipéptido cisteinil-glicina liberado en la transpeptidación se rompe por una dipeptidasa, generando cisteína y glicina libres. (Fig. 2, reacción 6).

Estas 6 reacciones constituyen el ciclo del  $\gamma$ -glutamilo, llevándose a cabo en esta forma la síntesis y degradación del GSH. Dos de las enzimas del ciclo también participan en el metabolismo de los conjugados del GSH, S-sustituídos, los cuales pueden formarse (no enzimáticamente) por interacción del GSH con ciertos compuestos electrofílicos, o bien por acción de GSH transferasas (Fig. 2, reacción 7). Los grupos  $\gamma$ -glutamílicos de estos conjugados, se remueven también por acción de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (Fig. 2, reacción 3), reacción que se facilita por la presencia de aminoácidos (formando los  $\gamma$ -glutamil derivados correspondientes). La cisteinil glicina S-sustituída resultante, se rompe por acción de una peptidasa (Fig. 2, reacción 6A) dando como resultado la cisteína S-sustituída, que puede sufrir n-acetilación (Fig. 2, reacción 8), o alguna transpeptidación adicional, para formar el  $\gamma$ -glutamil derivado correspondiente (Fig. 2, reacción 3a). Cabe hacer notar que los conjugados de GSH se forman tanto con compuestos exógenos como endógenos como se verá posteriormente con más detalle.

Por otra parte el GSH intracelular se convierte a GSSG por acción de la GSH peroxidasa, enzima que contiene selenio y que cataliza la reducción del  $H_2O_2$  y otros peróxidos (Fig. 2, reacción 9), el GSH se interconvierte tam-

bién a GSSG por reacciones de transhidrogenación (Fig. 2, reacción 10). Por otro lado, la reducción de GSSG a GSH se lleva a cabo por acción de la glutatión reductasa, enzima que usa como coenzima NADPH (Fig. 2 reacción 11). Se ha reportado también la formación extracelular de GSSG, mediante reacciones que requieren de  $O_2$  y generan  $H_2O_2$  (Fig. 2, reacción 12). El GSSG se forma también por la interacción del GSH, con radicales libres.

#### Transporte de glutatión

Se ha logrado saber que el glutatión solo se sintetiza intracelularmente ya que las células linfoides depletadas de GSH por tratamiento con butionina sulfoximina mostraron alta sensibilidad a la radiación (8); hecho que no se modifica si se añade al medio GSH (9). La recuperación del GSH intracelular de las células que se suspenden en un medio que contiene GSH, tiene lugar por un proceso enzimático que involucra la degradación del GSH externo, la incorporación de los productos y la resíntesis de éste.

El nivel intracelular de glutatión conocido en mamíferos está en el rango de 0.5-10 mM, mientras que en el plasma se encuentran concentraciones  $\mu$  Molares. Existen varias líneas de evidencia (10), que indican que la  $\gamma$ -glu

tamil transpeptidasa se encuentra en la superficie externa de la membrana celular y que interactúa por lo tanto, con metabolitos externos, sin embargo muchos otros hallazgos indican que el glutatión intracelular, es el sustrato de la transpeptidasa. El que una enzima y su sustrato - se localicen en lados opuestos de una membrana, conduce a postular que el GSH intracelular es transportado hacia la enzima asociada a membrana (11). Las observaciones hechas en pacientes con deficiencia de transpeptidasa, que tienen una marcada glutationemia y glutationuria (12) llevan a sugerir que el transporte del GSH intracelular hacia el plasma o hacia el filtrado glomerular, es un proceso destinado a proveer de sustrato a la enzima asociada a membrana (11, 13). Así en ausencia significativa de actividad de transpeptidasa, aparecen cantidades sustanciales de GSH extracelular. Estas interpretaciones quedan respaldadas por estudios realizados en ratas tratadas con inhibidores de la transpeptidasa, las cuales muestran una marcada glutationemia y glutationuria, alcanzándose en ocasiones concentraciones extracelulares de GSH de 29 mM (14).

Cuando estos animales se tratan con inhibidores de la síntesis de GSH (protionina sulfoximina o butionina sulfoximina) los niveles de GSH plasmático decrecen sustancialmente (10,14,15).

El rápido y marcado incremento de GSH después de la inhibición de la transpeptidasa y el decremento observado in mediatamente después de haber administrado algún inhibidor de la síntesis de este compuesto, indican que existe un recambio muy activo del GSH plasmático. En los sistemas con alto contenido de transpeptidasa, el GSH intracelular interactúa con la enzima unida a membrana y el producto de la acción enzimática es incorporado nuevamente por la célula, mientras que los sistemas con niveles bajos de transpeptidasa, transportan el GSH al exterior liberándolo (16). Los órganos fundamentalmente involucrados en este recambio son el hígado y el riñón aunque también participan otros. Los estudios realizados con animales anéfricos, tratados con inhibidores de transpeptidasa, muestran que cerca del 67% del GSH plasmático es usado por las transpeptidasas renales y el resto, por algunas otras transpeptidasas (14,17).

Estos estudios indican que el glutati $\ddot{on}$  se transloca normalmente in vivo a la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa asociada a la parte externa de la membrana, como un paso obligado del ciclo  $\gamma$ -glutámico (15). Esta afirmación se confirma, por observaciones hechas en cultivos in vitro de células linfoides, fibroblastos (18) y macrófagos (19) en los que el GSH se exporta al medio de cultivo. En prepa-

raciones perfundidas de hígado, también se observa un eflujo de GSH al líquido periférico (20).

Al estudiar los niveles plasmáticos de GSH en diversos vasos sanguíneos, surgen datos que apoyan que el metabolismo de este compuesto tiene interconexiones cíclicas de un órgano a otro. Un hecho muy interesante que evidencia lo antes mencionado, resulta de estudios en los cuales calcularon que cerca del 80% del GSH del plasma arterial se retiene al pasar por riñón y que en la utilización de este compuesto participan también transpeptidasas ubicadas en sitios diferentes a los túbulos (21).

La disminución que habitualmente se observa del GSH plasmático al pasar por riñón, deja de observarse cuando se administra algún inhibidor de la transpeptidasa, lo que indica que la utilización del GSH, involucra la acción de esta enzima (21).

El GSH hepático se transporta a la vena hepática y a la bilis en cantidades apreciables (13,22), sin embargo, al pretender valorar el GSH en bilis se presentó el problema de la contaminación de ésta con jugo pancreático. Con miras a evitar este problema, se canalizó a las ratas de tal manera que se obtuvo bilis pura, la cual tiene una

concentración de glutatión de 1-6 mM, esto nos habla de una baja actividad de transpeptidasa. El jugo pancreático en cambio no tiene GSH o GSSG detectables, lo cual habla de altos niveles de transpeptidasa (14,15). El nivel de GSH en bilis, decrece marcadamente después de tratar a las ratas con butionina sulfoximina y se incrementa, si éstas son tratadas con un inhibidor de la transpeptidasa (23). Los hallazgos sugieren que el GSH transportado de los hepatocitos interactúa con las transpeptidasas de las células del ducto, donde se realiza una reabsorción de metabolitos por el epitelio. Algunos estudios han permitido concluir que el GSSG y los conjugados de GSH se liberan del hígado a la bilis por un proceso en el que éstos compiten por su excreción (24,25). Además existen evidencias de que el sistema tiene más afinidad por los conjugados de GSH, que por GSSG.

El glutatión intracelular se encuentra predominantemente en forma reducida GSH (99%) y es la forma en que se encuentra tanto en plasma (90%) (16,26,27), como en orina (70%), cuando hay inhibición de la transpeptidasa (28). Las células linfoides humanas también excretan GSH en un alto porcentaje.

Bajo condiciones oxidativas o de elevada toxicidad,

el GSSG intracelular se incrementa notablemente (29) y debe haber algún mecanismo de exportarlo, pero tal situación no es habitual (30). Se ha visto que el transporte de GSSG no ocurre en las células depletadas de ATP lo cual sugiere que se trata de un transporte activo (31).

Beutler (30) sugiere que el transporte activo de GSSG puede ser un mecanismo de emergencia que proteja a la célula de los efectos tóxicos de éste. Esto no excluye que GSSG se transporte en condiciones normales, sin embargo, como la concentración intracelular es muy baja, resulta difícil medirlo.

El transporte de GSH de las células, parece ser un medio que suministra azufre cisteínico de una célula a otra. Puede también proteger la membrana celular contra daños oxidativos, manteniendo los grupos GSH funcionales; puede también proporcionar una forma de reducir compuestos en el entorno inmediato de la célula, protegiéndola o facilitando el transporte de ciertos productos por ejemplo disulfuros.

El transporte del GSH a la transpeptidasa unida a membrana que lleva a la formación de  $\gamma$ -glutamil-aminoácidos es parte de un sistema de transporte, el cual tam-

bién participa en la recuperación de los aminoácidos que constituyen al glutatión.

## FUNCIONES DEL GLUTATION

### Funciones del ciclo $\gamma$ -glutamílico.

Existen evidencias diversas de que el ciclo funciona in vivo. Estas se han puesto de manifiesto mediante el uso de inhibidores específicos de enzimas, la adición de sustratos y por la observación de deficiencias enzimáticas naturales (23).

Ya que el ciclo contempla la biosíntesis del GSH, sus funciones están íntimamente ligadas a las funciones del glutatión: funciones metabólicas, de transporte, de protección, procesos catalíticos, la regulación de síntesis y utilización del GSH, así como el almacenamiento y transporte de cisteína.

La hipótesis de que el ciclo del GSH funciona en el transporte de aminoácidos se basa en la idea de que los  $\gamma$ -glutamil-aminoácidos se forman en la membrana celular, por interacción de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa con el GSH intracelular y los aminoácidos extracelulares. Que este mecanismo media el transporte de aminoácidos,

está fuertemente respaldado por datos experimentales que muestran la formación in vivo de  $\gamma$ -glutamil aminoácidos y su transporte. No se ha propuesto que tal mecanismo sea válido para todas las células o para todos los aminoácidos (10,23), cisteína y glutamina son los mejores can didatos para este tipo de transporte, pero pueden participar también otro tipo de aminoácidos.

Existen sin embargo argumentos en contra de la posibilidad de que los aminoácidos se transporten a través del ciclo  $\gamma$ -glutámico. Entre ellos tenemos:

- a) No se ha observado una equivalencia entre el re cambio de glutatión y el transporte de aminoáci dos.
- b) La transpeptidasa funciona in vivo solamente co mo hidrolasa.
- c) La distribución de la actividad transpeptidásica en los túbulos renales no es paralela a la incor poración de aminoácidos.
- d) Los bloqueos del ciclo  $\gamma$ -glutámico no siempre están asociados a un transporte deficiente de aminoácidos.
- e) En dicho transporte se requiere mucha energía.

Sin embargo existen evidencias experimentales (32, 33) que indican que por lo menos la mitad del GSH se utiliza por la transpeptidasa en funciones de transpeptidación y no solamente para hidrolizarlo. Estos datos surgieron de incubar GSH y GSSG y una mezcla de aminoácidos aproximadamente similar a la encontrada en plasma. Los grados relativos de transpeptidación e hidrólisis se determinaron por medición de los productos formados y los resultados indicaron que los aminoácidos participan en transpeptidación y que L-cisteína y L-glutamina son los aceptores más activos. Asimismo los niveles renales de GSH disminuyen cuando existe un apreciable incremento en la transpeptidación. La administración de cantidades moderadas de aminoácidos a ratones conduce a un descenso en el nivel de GSH (11). Tal efecto no se presentó cuando los ratones se trataron con una mezcla de Serina-boratos (mezcla que inhibe eficientemente la transpeptidasa) (34). Se hicieron observaciones similares en cultivos de células renales, las cuales al suspenderse en un medio conteniendo aminoácidos se depletaron de GSH (35). Asimismo el recambio del GSH hepático aumenta significativamente después de la administración de aminoácidos. La velocidad a la cual el GSH intracelular renal disminuye después de dar un inhibidor de la síntesis del mismo se retrasa si se dan inhibidores de la transpeptidasa (11,15).

Existen evidencias de que los  $\gamma$ -glutamil-aminoácidos se forman por transpeptidación en condiciones fisiológicas y se ha propuesto que éstos se transportan al interior de la célula después de haber sido hidrolizados; sin embargo algunos resultados sugieren que los  $\gamma$ -glutamilaminoácidos se transportan completos in vivo: el transporte al interior de la célula de la  $\gamma$ -glutamil-L-metionina-sulfona (un compuesto pobremente metabolizable) es mayor que la incorporación del correspondiente aminoácido libre; dicho transporte se inhibió, cuando se administraron otros  $\gamma$ -glutamil aminoácidos, pero no se dió tal inhibición cuando se administraron aminoácidos libres (36).

Otras evidencias del transporte de los  $\gamma$ -glutamil-aminoácidos surgen al observar que un sistema cuyas células contenían niveles suficientes de GSH para retroinhibir (como ya se ha mencionado antes) la actividad de la  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetasa, al ser adicionado con  $\gamma$ -glutamil-cisteína exógena presenta un aumento notable de GSH. Esto además de sugerir el transporte del  $\gamma$ -glutamil aminoácido, apoya la existencia de una ruta alterna para la biosíntesis de glutati3n. Por otra parte, cuando se administra  $\gamma$ -glutamil-cistina, marcada con S<sup>35</sup> ya sea en el azufre interno o en el externo a ratones

normales, se observó que la radioactividad específica del GSH renal es mayor cuando se da el compuesto marcado en el azufre interno que en el externo (37). Estos resultados indican que la  $\gamma$ -glutamyl cistina se reduce a cisteína y  $\gamma$ -glutamyl cisteína, la cual se incorpora y se convierte directamente a glutati6n.

Se sabe que en pacientes con deficiencia en la transpeptidasa se presenta glutacionuria y glutacionemia y que lo mismo sucede con los animales tratados con inhibidores de la transpeptidasa. Cuando la orina procedente de estos pacientes o de los animales de experimentaci6n se trata con ditiotreitol y 2-vinil piridina, el análisis cromatográfico muestra que se forman derivados vinilpiridínicos de glutati6n, cisteína y  $\gamma$ -glutamyl-cisteína (38). El descubrimiento de un aumento en la excreci6n urinaria de GSH,  $\gamma$ -glutamyl-cisteína y cisteína cuando hay deficiencias de  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasa, sugiere que la actividad fisiol6gica est6 estrechamente asociada con el transporte y/o metabolismo de estos compuestos. La presencia de  $\gamma$ -glutamyl-cisteína en orina se explica porque la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa no se encuentra ausente del todo o inhibida totalmente, siempre queda una actividad remanente, aproximadamente del 10%, la cual es suficiente para catalizar la transpeptidaci6n

entre GSH y cisteína para formar  $\gamma$ -glutamil cisteína, ca  
be hacer notar que la cisteína es un excelente aceptor  
(sustrato) de la transpeptidasa ( $K_m$  30  $\mu M$ ) (39-41) de -  
tal forma que la transpeptidación entre GSH y cisteína  
tiene lugar aún cuando la transpeptidasa se encuentre en  
niveles muy bajos. Otra explicación alternativa a la  
presencia de  $\gamma$ -glutamil-cisteína en orina en animales de  
ficientes en transpeptidasa, es que tanto el GSH como el  
GSSG sufran una hidrólisis en la unión cisteína-glicina.

Existen otras muchas evidencias de que la función  
de la actividad transpeptidásica del ciclo es el trans-  
porte de aminoácidos y que existen conexiones significa-  
tivas entre los niveles de transpeptidasa, la presencia  
de aminoácidos y la excreción de GSH (42-44). Sin embarg  
o no se conoce con detalle la orientación de la transpept  
tidasa en la membrana, y como se llevan a cabo las fun-  
ciones asociadas a ésta, como el transporte de aminoáci-  
dos. Cabe hacer notar que no se observan siempre dismi-  
nuciones dramáticas en el transporte de aminoácidos en  
aquellos animales a los que se les ha bloqueado el ciclo  
en varios pasos; esto puede deberse a que las enzimas no  
se bloquean totalmente o a que existen otros sistemas de  
transporte para los aminoácidos en cuestión, cuya especi-  
ficidad se traslapa con la de otros aminoácidos, suple-

mentándose.

Se han encontrado además, evidencias experimentales que apoyan la existencia de los otros pasos propuestos para el ciclo. Se sabe por ejemplo que la administración de un inhibidor competitivo de la  $\gamma$ -glutamil ciclo transferasa a animales de experimentación provoca una considerable disminución de la 5-oxo-prolina en riñón; esto demuestra que esta enzima puede inhibirse in vivo. (45).

Cuando se administra a ratas un inhibidor competitivo de la 5-oxo-prolinasa, se produce un acúmulo de 5-oxoprolina, la cual se incrementa si se administran simultáneamente aminoácidos (particularmente aquellos que son mejores sustratos de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa) ya que se incrementa la transpeptidación y la cantidad de la 5-oxoprolina formada por la ciclo transferasa. También se ha observado que cuando se inhibe la  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetasa se presenta un aumento notable de la 5-oxo-prolina debido probablemente a una acción reversa de la 5-oxo-prolinasa.

En la 5-oxoprolinuria, padecimiento congénito caracterizado por una deficiencia de GSH sintetasa, como resultado de tal deficiencia, se produce un gran aumento de la 5-oxoprolina en sangre, provocando acidosis y

una excreción masiva de ésta por orina. Se sabe (como ya se ha mencionado varias veces), que el GSH retroregula su propia biosíntesis por retroinhibición de la  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa (7). Si las concentraciones de GSH son bajas, el dipéptido  $\gamma$ -glutamil-cisteína se hiperproduce y se convierte en 5-oxo-prolina y cisteína, por acción de la ciclo transferasa. La 5-oxo-prolina formada excede la capacidad de la 5-oxoprolinasa, y en consecuencia se excreta. Todas estas evidencias llevan a concluir que el ciclo  $\gamma$ -glutamílico funciona in vivo.

#### Interconversión entre Glutación GSH y Disulfuro de Glutación GSSG

Existen diversas funciones metabólicas que involucran el intercambio tiol-disulfuro, por ejemplo, la síntesis y degradación de proteínas, activación e inactivación de enzimas, obtención de desoxirribósidos (necesarios para la síntesis de DNA) reducción de cistina, etc. Se piensa que muchas de estas reacciones se realizan con la participación del GSH ya que como hemos visto es el tiol más abundante dentro de la célula; asimismo por la amplia distribución observada de la glutación reductasa.

Las enzimas propuestas para realizar las funciones mencionadas fueron: a) Glutación oxidasa, b) Glutación transhidrogenasa; c) Glutación peroxidasa y d) Glutación

reductasa.

### Glutación Oxidasa

En cuanto a la Glutación oxidasa existen opiniones diversas y controvertidas. Inicialmente se había considerado estrechamente asociada a la transpeptidasa y se llegó a pensar incluso que una misma enzima presentaba las 2 actividades. Algunos investigadores como Tate y Griffith (46,47) demostraron que la aparente actividad de glutación oxidasa ligada a la transpeptidasa, está mediada por la cisteín-glicina que se forma durante la degradación del glutación, en la cual participa la transpeptidasa. Este dipéptido se oxida rápidamente (en forma no enzimática) a cisteinil-bis-glicina (gli-cis-cis-gli) y la oxidación del GSH tiene lugar por una reacción de transhidrogenación entre éste y la cisteinil-bis-glicina, o entre el GSH y disulfuros formados por cisteinilglicina + Glutación. Esta oxidación no se realiza en presencia de EDTA, por lo que se infiere que está mediada por iones metálicos, probablemente  $\text{Cu}^{++}$  (48). Algunos investigadores, realizando purificaciones exhaustivas encontraron que la actividad de "GSH oxidasa" se encuentra independiente de la transpeptidasa, en una fracción que no contiene proteína, por lo que afirman que no se trata de una enzima (49).

### Glutación Transhidrogenasa

Esta enzima cataliza reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Algunos reportes preliminares indicaron que existía (en hígado de bovino) una actividad catalítica GSH dependiente, que reducía la homocistina (50). También se encontró un sistema similar en levaduras para la reducción de cistina y sistemas análogos (51), además de varias enzimas aparentemente independientes de baja especificidad que catalizan el intercambio tiol-disulfuro entre el GSH y disulfuros de bajo peso molecular o entre GSH y disulfuros proteicos (52). Asimismo se sabe que existen sistemas que catalizan la reducción y arreglo de uniones disulfuro de las proteínas. La glutación reductasa, contrariamente a lo reportado, no cataliza directamente tales reducciones, las cuales están mediadas por transhidrogenaciones independientes de ésta.

Las actividades de transhidrogenación están ampliamente distribuidas, el tipo de sustratos que participan en las reacciones de intercambio tiol-disulfuro, hacen pensar que pueda haber diversas transhidrogenasas. Sin embargo, la diversidad de reacciones involucradas, hace necesario considerar que el número de transhidrogenasas individuales debe ser menor que el número de tales reacciones.

Las transhidrogenasas de glutati6n median funciones muy importantes relacionadas con la sntesis, estructura, degradaci6n y algunas otras funciones de las proteinas. Otros sistemas que afectan la relaci6n tiol-disulfuro de las c6lulas son tambi6n de importancia considerable, como por ejemplo el sistema ampliamente distribuido de la tiorredoxina, el cual tiene un alto potencial reductor (53, 54).

Reichard y colaboradores (53,55), encontraron que los desoxirribonucle6tidos se generan en las c6lulas a partir de una oxidaci6n de los ribonucle6tidos y observaron que las mol6culas involucradas son: ribonucle6tidorreductasa, tiorredoxina, y tiorredoxinreductasa. Recientemente se encontr6 una mutante de Escherichia coli tiorreductasa (-) que, sin embargo, presenta una reducci6n de ribonucle6tidos NADPH dependiente (56). Es importante hacer notar que en esta mutante el GSH y la glutarredoxina (que tambi6n se encuentra en la cepa silvestre) son los que realizan la reducci6n de los sibonucle6tidos (56, 57), siendo la glutarredoxina una proteina ac6dica que posee una elevada actividad especifca de transhidrogenasa. Esta tiene 2 residuos cisteinicos que pueden formar un disulfuro al ceder sus protones, pero recupera su forma diti6lica por acci6n del NADPH y GSH reductasa. La tiorredoxina presenta un mecanismo de reducci6n an6logo,

pero sin la participación del GSH. El hecho de que las mutantes antes mencionadas sigan presentando la reducción de los nucleótidos y una síntesis normal de DNA, así como el hecho de que algunas mutantes GSH (-) crezcan a velocidades normales, indica que existen alternativas de función en procesos vitales para las células.

### Glutación peroxidasa

Esta enzima presente en varios tejidos, cataliza la reducción del  $H_2O_2$  y es GSH dependiente (Fig. 2, reacción 9). En los eritrocitos esta reacción se encuentra acoplada a la oxidación de la glucosa 6 fosfato y 6 fosfogluconato de donde se obtiene el NADPH para la posterior reducción del GSSG por la glutación reductasa. Además de catalizar la reducción del  $H_2O_2$ , la glutación peroxidasa cataliza la reducción de otros peróxidos orgánicos que se forman cuando en los sistemas biológicos se genera oxígeno reactivo. Estos mecanismos reductores confieren protección a la célula ya sea evitando la formación de radicales libres (por efecto del oxígeno) o bien evitando la formación de epóxidos en los lípidos de membranas biológicas (58).

### Glutación reductasa

Esta es una flavoproteína ampliamente distribuida

en los sistemas biológicos; la reacción que cataliza puede observarse en la reacción 11 de la Figura 2. Fue descubierta en 1930 y purificada de varias fuentes siendo su función dependiente de la relación GSH/GSSG presente en la célula. Algunos estudios sugieren que esta enzima puede catalizar la reducción de disulfuros formados entre GSH y  $\gamma$ -glutamil cisteína (38) o entre el GSH y coenzima A, además de los formados con dos moléculas de glutatión (59).

#### Conjugados del glutatión S-sustituídos

Desde 1879 se observó que la administración de clorobenceno o bromo benceno a perros provocaba la excreción urinaria de ácidos mercaptúricos (derivados de cisteína S-sustitutos n-acetilados). Algunos trabajos posteriores revelaron que el GSH es capaz de reaccionar con compuestos exógenos formando conjugados (60,61). Estos compuestos tienen un centro electrofílico que los hace capaces de reaccionar con el GSH, en algunos casos tal grupo electrofílico es introducido por alguna reacción (por ej. mediante la acción de oxidasas se forman epóxidos, capaces de reaccionar con el GSH). La interacción de tales compuestos exógenos con el GSH puede ser espontánea o bien catalizada por glutatión transferasas (GSH-S-transferasas) (Fig. 2, reacción 7). Estos conjugados se con-

vierten a ácidos mercaptúricos por acción de algunas enzimas, estando en primer lugar la transpeptidasa (Fig. 2, reacción 3), por la cual el grupo  $\gamma$ -glutamilo del conjugado se transfiere a un aceptor. El conjugado S-cisteinil-glicina resultante, por la acción de una dipeptidasa (Fig. 2, reacción 6a), libera el cisteinil derivado correspondiente que es rápidamente acetilado (Fig. 2, reacción 8) liberando también a la glicina. Las rutas de conjugación de GSH y el modo de excreción de los derivados formados es variable según el compuesto (62). Se ha sugerido que existen diversas GSH-S-transferasas y su función se considera idéntica o asociada a la de las ligandinas (primeramente reconocidas como proteínas capaces de unirse a compuestos aniónicos) (63,64). Se ha sugerido la existencia de un complejo ligandina-GSH-S-transferasa presente en la fracción soluble de homogenados celulares, cuyas funciones básicas son: a) catálisis, b) fijación de ligandos que no son sustratos, c) formación de uniones covalentes con compuestos muy reactivos que conducen a la inactivación y destrucción de la proteína, es decir, realizan funciones de detoxificación.

La mayoría de los estudios acerca de los conjugados del glutati6n, est6n relacionados con la detoxificaci6n de productos ex6genos. Recientemente se ha incrementado el inter6s sobre las reacciones de conjugaci6n que invo-

lucran metabolitos endógenos. Por ejemplo: El leucotrieno D (una sustancia anafiláctica de liberación lenta) se genera cuando el leucotrieno A (un epóxido del ácido araquidónico) se une al GSH liberando el grupo  $\gamma$ -glutamilo mediante la acción de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa, reacción que se lleva a cabo más rápido en presencia de aminoácidos. Los conjugados S-cisteinil-glicina se escinden por acción de una dipeptidasa para dar el S-cisteinil derivado y la glicina libre. Cabe recordar que ya se había mencionado al principio de este capítulo que en la formación de conjugados S-sustituídos del glutati6n intervienen 2 enzimas del ciclo  $\gamma$ -glutamílico.

Otro ejemplo de conjugaci6n del glutati6n con productos end6genos es la formaci6n de la 5-S-cisteinil,3,4 dihidroxifenilalanina en los melanocitos, por interacci6n del GSH con la melanina; la funci6n de este conjugado parece ser la incorporaci6n del azufre cisteinico a ciertas melaninas. Resulta interesante mencionar que el conjugado arriba citado se excreta en grandes cantidades en la orina de pacientes con melanoma maligno (65).

### Funciones coenzimáticas

Existen varias reacciones enzimáticas en las que el GSH participa como coenzima, la más conocida es la de glioxilasa, en la que el hemimercaptal formado al inter-

actuar el metil-glioxal con el GSH, se convierte a S-lactil GSH por acción de la glioxilasa I y es posteriormente hidrolizado por la glioxilasa II a D-lactato y GSH (66-68). Otro ejemplo en el que participa el GSH como coenzima es la isomerización cis-trans del maleilacetato (69) y la reacción análoga del maleil piruvato (70). La deshidroclorinación del DDT que se realiza en algunos insectos, tiene lugar mediante una enzima que requiere GSH. Parece ser que el DDT reacciona con el glutatión, dando un derivado alquilado el cual se rompe liberando GSH + HCl y el producto deshidroclorinado que ha perdido toxicidad (502-305). Las reacciones catalizadas por la prostaglandin-endoperóxido D-isomerasa y E-isomerasa también requieren de una participación específica del GSH (62,71).

#### Protección contra los efectos nocivos provocados por radiaciones y oxígeno reactivo

Guzmán y Barrón (72) observaron que los tioles son fácilmente oxidados y postularon en 1951 que las radiaciones ionizantes deberían oxidar rápidamente los grupos tiol de las células. Recientemente se ha logrado saber que las radiaciones producen un decremento en la concentración intracelular de GSH, conduciendo asimismo a un aumento en GSSG. Se ha reportado también que la adminis

tración de GSH da protección (aunque no inmediata) a los organismos contra los efectos de las radiaciones. Además de los hechos que indican que la radio sensibilidad de las células depende del contenido de tioles intracelulares, se sabe que los efectos de las radiaciones en presencia de aire son mayores que aquellas observadas en ausencia parcial o total de  $O_2$ . El efecto del  $O_2$  ha sido explicado en términos de competencia con el GSH por los radicales libres generados por la radiación (73), ya que las radiaciones ionizantes extraen protones de las moléculas generando radicales libres y los tioles tienden a restaurar dicho hidrógeno, mientras que la reacción del radical con  $O_2$  fija el daño en virtud de una transformación química posterior, que puede generar incluso mutaciones. Bajo condiciones anóxicas existe más GSH libre, pues no tiene que destruir a los complejos reactivos oxidados producidos por el oxígeno que se genera en los sistemas biológicos, de tal suerte que queda más GSH disponible para reaccionar con los radicales libres generados y así pues, el daño celular producido por radiaciones es menor en ausencia de  $O_2$  que en presencia de aire.

La sobrevivencia in vitro de células depletadas de GSH (fibroblastos y células linfoides) es mucho menor que las células control cuando se someten a radiaciones ó a  $O_2$ . Esto sería una posible explicación a la existen

cia de algunas bacterias anaerobias en las que no se ha detectado GSH.

Existen también conexiones significativas entre los niveles de GSH y algunos procesos de carcinogénesis o entre éste y el metabolismo del calcio, sin embargo son pocos los resultados concluyentes al respecto (74-78).

### El GSH en microorganismos

Se sabe, como ya se ha mencionado, que el GSH se -- aisló primeramente de levaduras. Los estudios respecto a la presencia y/o función de este compuesto, así como de las enzimas que integran el ciclo para la síntesis y utilización del mismo reciben cada vez más atención. Se ha demostrado que en los microorganismos estudiados (levaduras, bacterias y hongos), están presentes todas las enzimas que integran el ciclo del GSH y que su comportamiento es similar al observado en organismos superiores. Entre las funciones que desempeña el GSH en microorganismos tenemos: transporte de algunos aminoácidos, reacciones de intercambio tiol-disulfuro, función detoxificante, protección contra efectos ambientales nocivos, como por ejemplo oxidaciones y radiaciones (1,2,51-56,72).

### Mutantes microbianas deficientes en la síntesis de GSH

Apontowell y Brends (79,80) aislaron mutantes de -

E. coli K12 deficientes en  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetasa o en glutati3n sintetasa. En dos de dichas mutantes no se pudo detectar GSH y en otras se encontro 1% y 12% de los niveles habituales de GSH en la cepa progenitora. Las mutantes crecieron normalmente en medio m3nimo y no mostraron sensibilidad aumentada a rayos X pero si fueron m3s sensibles a reactivos qu3micos.

Por otro lado Fuchs y Warner (81) aislaron una mutante deficiente en GSH sintetasa que acumula  $\gamma$ -glutamyl cisteína en cantidades an3logas a las que la cepa progenitora tiene de glutati3n. Esta mutante creci3 a velocidades normales, a pesar de que la ribonucle3tido reductasa estaba afectada en la subunidad B<sub>1</sub>, sin embargo fue m3s sensible a las diamidas, as3 como al metilglioxal y a los rayos X en condiciones an3xicas que la cepa progenitora.

Se aislaron tambi3n algunas cepas mutantes de E. coli glutati3n reductasa (-) (82), las cuales crecieron normalmente y presentaron cantidades normales de GSH, lo cual indica que el glutati3n se puede reducir por alguna otra ruta de manera semejante a lo que sucede para la reducci3n de ribonucle3tidos.

Recientemente se han encontrado mutantes de Saccharomyces cerevisiae deficientes en GSH sintetasa

(83) y se sabe que la cepa mutante presenta una baja incorporación de glicina. Resulta muy interesante que Saccharomyces, a diferencia de lo que ocurre en E. coli presenta todas las enzimas del ciclo  $\gamma$ -glutámico por lo que el hallazgo de tal mutante ofrece interesantes perspectivas de estudio.

## METABOLISMO SECUNDARIO

El metabolismo secundario representa una de las más complicadas y poco entendidas formas de responder de algunos microorganismos a las condiciones ambientales en que se encuentran.

El poder entender como y/o porqué un microorganismo "enciende" o "apaga" su metabolismo secundario ha constituido un interesante desafío para los investigadores desde que se inició la época de los antibióticos.

### Origen

Las opiniones respecto al origen, naturaleza y función del metabolismo secundario son múltiples y controvertidas. Por ello resulta difícil, incluso definirlo con precisión.

En términos generales, al metabolismo secundario corresponden los siguientes criterios (84).

- a) -Aparece únicamente en grupos pequeños de organismos, sistemáticamente definidos.
- b) -No se reconoce un efecto aparente de los metabolitos secundarios sobre los organismos productores.

c) -Los metabolitos secundarios pertenecen a grupos químicos con gran variabilidad, esta variabilidad puede aparecer en un mismo organismo o en diferentes especies.

El que se desconozcan efectos de los metabolitos secundarios sobre el organismo productor no parece (en opinión de Zähler) sino enfatizar la ignorancia que existe respecto a este tema.

En esta introducción trataré de resumir algunos de los hallazgos y consideraciones más novedosos respecto al metabolismo secundario, contrastándolos con los que se habían contemplado hasta hace unos seis años.

Hipótesis acerca del origen de los metabolitos secundarios: (84).

1. Los metabolitos secundarios son productos de un "descarrilamiento del metabolismo". Las rutas biosintéticas de la incorporación de un sustrato a un metabolito, constan de muchos pasos, uno de los cuales funciona como "switch" para iniciar una ruta no usual. El nuevo producto intermedio (probablemente no estable), es modificado y estabilizado por una serie de pasos del metabolismo -

primario; dando como resultado de tal modifica--  
ción una gran variabilidad.

2. Los metabolitos secundarios son productos sin fun  
ción: Durante la evolución bioquímica se produ--  
cen metabolitos, muchos de los cuales deberían -  
ser eliminados inmediatamente. Otros pueden tener  
una función en alguna etapa temprana, pero la han  
perdido en el curso de la evolución. Los metabolit  
os resultantes "sin función" han sido modificados  
de diferentes maneras de tal forma que no pueden -  
reconocer la función original.
3. Los metabolitos secundarios son residuos del meta-  
bolismo primario: El metabolismo primario tiene -  
una alta eficiencia y especificidad, sin embargo,  
pueden aparecer subproductos en pequeñas cantida--  
des, los cuales tienen una estructura modificada -  
(metabolitos secundarios). La mayoría de enzimas  
y coenzimas forman parte de ciclos claramente defi  
nidos que se repiten innumerables veces durante el  
crecimiento, y los metabolitos secundarios como --  
subproductos, se van acumulando de tal manera que  
pasan a ser cuantitativamente considerables.
4. Los metabolitos secundarios son productos de detoxi  
ficación: Ciertos organismos productores transfor

man algunas sustancias que les son altamente tóxicas, en productos no tóxicos, (ej.: El ácido fenilacético, altamente tóxico para P. crhysogenum se transforma en bencil penicilina).

5. El metabolismo secundario es el resultado de una regulación deficiente del metabolismo primario. Esta hipótesis plantea una correlación negativa entre la capacidad de control del metabolismo primario y el nivel de producción de los metabolitos secundarios.
  
6. Hipótesis del mantenimiento biológico: En algunos casos se observa que la producción de metabolitos secundarios se inicia al final del crecimiento logarítmico o cuando el crecimiento se limita. Cuando los nutrientes se agotan, las enzimas del metabolismo primario transforman algunos sustratos extraños, en productos también extraños. La razón de generar estos "productos sin sentido" es la de mantener activas las enzimas del metabolismo primario, de manera que sean menos susceptibles a las proteasas propias de la célula.

Estas hipótesis no pueden ser del todo aceptadas por que existen hechos que evidencian su poca o ninguna con--

cordancia con la realidad.

Por ejemplo, a la hipótesis que postula a los metabolitos secundarios como productos de detoxificación podría objetarse ya que no parece lógico que S. griseus fabrique 30 o más enzimas para sintetizar estreptomicina solamente para transformar un precursor tóxico (85). Otro ejemplo alusivo podría ser la síntesis de tetraciclinas a partir de malonamida, para la cual se requieren 11 enzimas.

Por otra parte, un argumento que puede oponerse a algunas hipótesis señaladas es la existencia de grupos químicos complejos en el metabolismo secundario, sin que existan en el primario. Entre los metabolitos secundarios existen grupos químicos complejos: en la serie del nitrógeno tenemos grupos nitro, nitroso, isonitrilo y diazo. Existen sistemas cíclicos poco usuales como anillos  $\beta$ -lactámicos, macrólidos y tetrólidos, por citar sólo algunos ejemplos. Obviamente para la síntesis de este tipo de moléculas se requiere de juegos enzimáticos complejos con actividad coordinada y con alto grado de especificidad. Además desde el punto de vista evolutivo, en la naturaleza no hay lugar para cosas sin función por que simplemente no pueden existir en un largo período de tiempo con tal variabilidad ni en grandes cantida-

des porque son eliminadas. No es concebible que estas secuencias de reacciones multienzimáticas se conserven en la naturaleza sin algún beneficio para la célula.

Existe una divergencia notable entre la "realidad" aparentemente observada de los metabolitos secundarios y las consideraciones lógicas contempladas desde el punto de vista de la evolución. No es nuestra pretensión planear una reconciliación entre ellas, simplemente hacer un análisis crítico del asunto, apoyándonos en evidencias objetivas señaladas en la literatura.

Algunos autores han preferido abordar al metabolismo secundario, desde el punto de vista mecanicista, relacionando su aparición con la cinética de crecimiento del organismo productor.

Si los microorganismos productores de estos metabolitos se crecen en "batch" ocurre un evento bifásico. En la primera etapa (trofofase) tiene lugar el crecimiento celular, sin producción del metabolito; cuando la velocidad de crecimiento declina, o el crecimiento cesa por completo, empieza una segunda etapa (idiofase), la cual se caracteriza primero, por no presentar incremento alguno en biomasa y segundo porque se inicia la producción de metabolitos secundarios. La relación tro

fofase-idiofase puede variar con las condiciones de cultivo. Si el microorganismo se hace crecer en un medio químicamente definido, esta relación se mantendrá como una bifase con una cercana aproximación a la figura 3. Sin embargo, si el medio es limitado, puede resultar una asociación o completa sobreposición de las dos fases (86,87).

Es bien conocido el hecho de que el ambiente nutricional es determinante para la expresión del metabolismo secundario (88). En general se ha observado que el inicio de éste, coincide con situaciones que limitan ó frenan el crecimiento. En estas observaciones, obviamente están implicadas fuentes de C, N,  $PO_4^{\equiv}$  ejerciendo cada una de ellas su particular efecto sobre la regulación del metabolismo secundario. Cabe mencionar que cuando un sistema se halla en plena producción de metabolitos secundarios, si se añade alguno de estos factores limitantes, tal producción se para, y puede reiniciarse el crecimiento (89).

El conocer cómo estos nutrientes pueden estar involucrados en la regulación del metabolismo secundario ha sido objeto de múltiples estudios, sin embargo, el mecanismo no ha sido del todo esclarecido.

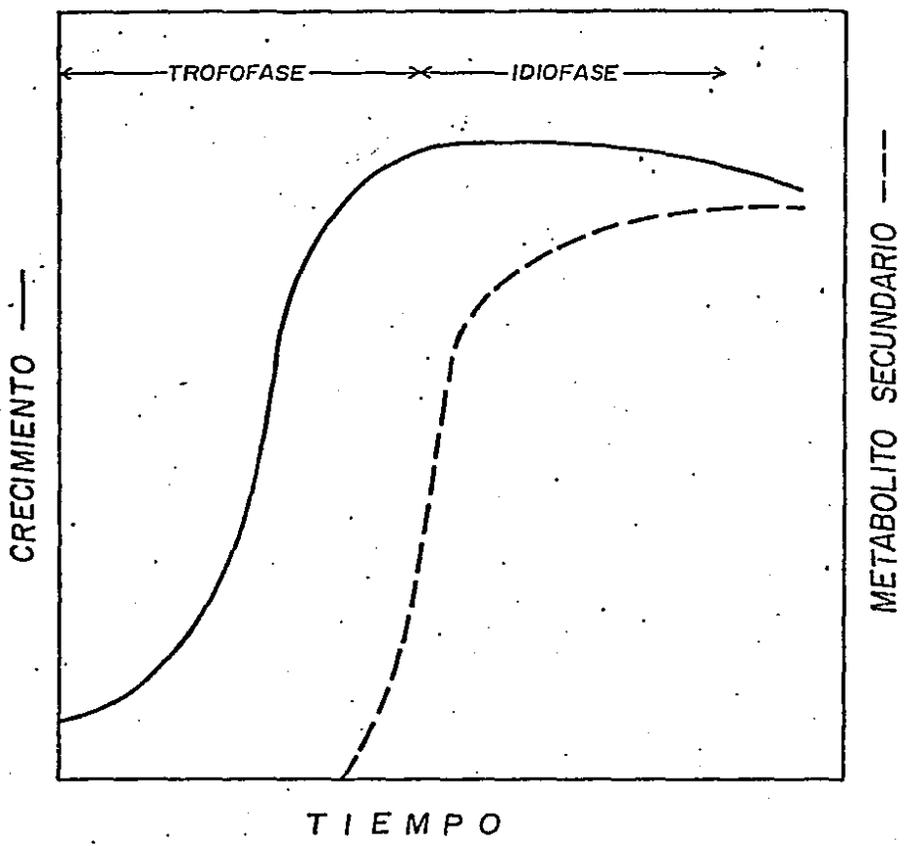


FIGURA 3.- Representación de la trofofase e idiophase, en relación con la producción de metabolitos secundarios.

Hay evidencias de que algunos mecanismos que regulan el metabolismo primario, están implicados también en el metabolismo secundario (90). Por ejemplo, se ha observado que la actividad de algunas enzimas específicamente involucradas en las rutas biosintéticas del metabolismo secundario, están ausentes en la trofofase y se detectan solamente cuando los nutrientes se vuelven limitantes y el crecimiento disminuye o se termina. Tales observaciones sugieren contundentemente que estas enzimas están sometidas a represión catabólica. Mediante estudios realizados con inhibidores de síntesis de proteínas se ha comprobado que estas enzimas se sintetizan "de novo", (91,92) aunque todavía no está claro si la represión catabólica actúa a nivel de transcripción o traducción.

En algunos casos las enzimas involucradas en el metabolismo secundario, se encuentran presentes pero no activas en la trofofase (93), presentando incluso "picos" considerables de actividad específica, mucho antes de que los metabolitos secundarios aparezcan (94,95). Esto indica que además de la represión catabólica existen otros mecanismos de control del metabolismo secundario, que pueden derivarse del control nutricional.

Es importante considerar el control del metabolismo secundario en términos de mecanismos regulatorios clásicos, sin embargo, deben tomarse en cuenta otras variables poco estudiadas pero no menos importantes como la velocidad de crecimiento.

En un cultivo en "batch" los metabolitos secundarios aparecen en una etapa de transición entre 2 fases; donde las células experimentan una disminución marcada en la velocidad de crecimiento. Tal velocidad, en sí misma, puede jugar un papel relevante en la regulación del metabolismo secundario. Recientemente se han introducido técnicas de cultivo en quimiostato, para correlacionar la velocidad de crecimiento y la aparición del metabolismo secundario (87). Los resultados parecen indicar que la aparición del metabolismo secundario está en función de la velocidad del crecimiento. En suma, aunque la naturaleza precisa de los mecanismos moleculares de regulación para los metabolitos secundarios se desconoce, la represión e inhibición catabólicas parecen ser un hecho, y también que la velocidad de crecimiento determina de alguna manera el inicio del metabolismo secundario aunque tal efecto requiere ser dilucidado.

Se ha confirmado que la naturaleza química de los metabolitos secundarios es responsable de actividades

biológicas; las investigaciones se han polarizado hacia aquellas funciones fuera de la célula productora, dejando a un lado el estudio de la posibilidad de una acción dentro de ésta. Tal vez podría entenderse mejor cómo es la acción de los metabolitos secundarios fuera de la célula productora si se conociera alguna función para ésta, ya que se conocen pocos metabolitos secundarios que tienen acción en la célula productora pero seguramente se conocerían más si hubiera un interés real en buscarlos y/o estudiarlos, con una mente libre de los moldes troquelados por intereses económico-terapéuticos.

### Funciones de los Metabolitos Secundarios

#### Función de defensa

Los metabolitos secundarios funcionan como "Armas competitivas". Un grupo importante -probablemente el más estudiado- de metabolitos secundarios son los antibióticos; algunos autores piensan que son los más abundantes, pero esto se debe sin duda a que el criterio más empleado para seleccionar metabolitos secundarios, es justamente la antibiosis. Es por ello que constituyen un grupo mayoritario.

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de complejos metabólicos microbianos, la mayoría de los

cuales confiere ventajas competitivas a los organismos productores aunque de diferente manera. Cerca del 40% de hongos y líquenes recién aislados de la naturaleza son capaces de producir antibióticos en medios de cultivo. Tal habilidad desaparece cuando se ponen en "slants" a 6°C lo que sugiere que la actividad antibiótica es propiciada por el ambiente, a fin de ayudar al organismo productor a eliminar la competencia de otras especies. Esta competencia no solo se observa entre hongos y bacterias, sino entre bacterias y protozoarios; por ejemplo Serratia marcescens y Chromobacterium violaceum producen metabolitos secundarios (prodiginina y violaceína) que les protegen de la fagocitosis amibiana ya que ante la presencia de éstos, las amibas se enquistan o mueren. Cuando no existe colorante estas bacterias sirven de alimento a las amibas (100).

Otro tipo de sustancias que se piensa tienen función de antagonistas son algunos metabolitos producidos por hongos (Micotoxinas) con actividad mutagénica y antibiótica, los cuales constituyen un serio problema de salud pública, pues contaminan algunos alimentos.

#### Función regulatoria

Los metabolitos secundarios en algunos casos tienen un efecto regulatorio en procesos de diferenciación,

particularmente en procesos de germinación y esporulación (85,96,97,98).

Entre las funciones postuladas para los metabolitos secundarios, es ésta la que ha captado mayor atención en los últimos años. Esta hipótesis es cada vez más atractiva, aún cuando las observaciones indican que el nexo entre la producción de antibiótico y la esporulación no es estrictamente interdependiente (99). Se han hecho esfuerzos por dilucidar el papel que juegan estos metabolitos (particularmente antibióticos) en la regulación de los procesos mencionados.

Entre los datos que apoyan esta hipótesis tenemos que la adición de inhibidores de la esporulación (malonato, ac. dipicolínico, fluoroacetato) a cultivos de B. licheniformis, inhiben también la formación de antibiótico (96).

Por otra parte se sabe que algunas mutantes no productoras de antibiótico de B. subtilis son incapaces de esporular. La transformación genética de estas mutantes con DNA tipo silvestre, da como resultado transformantes capaces de esporular y producir antibiótico. La existencia de mutantes no productoras de antibiótico, capaces de esporular, como B. licheniformis

bacitracina (-) parece ser un hecho que invalida la hipótesis. Algunos investigadores han observado que tales esporas tienen diferencias cualitativas con respecto a las formadas por la cepa original, las cuales las hacen ser menos resistentes (85,100).

Algunos investigadores opinan que la existencia de cepas no productoras de antibiótico capaces de esporular, resulta una objeción irrelevante, ya que una cepa "no productora" de antibiótico según los criterios convencionales, puede estarlo generando en cantidades no detectables, pero suficientes para cubrir la demanda fisiológica. Afirman además, que las cepas consideradas como productoras, son en realidad cepas derreguladas que hiperproducen un determinado metabolito y que en ocasiones pueden revertir, a fin de lograr una situación favorable para su economía fisiológica (85).

Existe la posibilidad de que ambos fenómenos (esporulación y producción de antibiótico) sean independientes, pero regulados por un mecanismo de control común.

Sakar y Paulus (100) estudiaron estos fenómenos con detalle en B. brevis ATCC 8185 observando que la aparición de antibiótico (tirotricina) se inicia cuando

termina el crecimiento exponencial, momento en que tiene lugar una caída abrupta de la síntesis de RNA. La tirotricina tiene 2 componentes (tirocidina y gramici-dina) cada uno de los cuales es capaz de inhibir la RNA polimerasa de B. brevis in vitro. Basados en estas observaciones, estos autores proponen que los antibióti-cos regulan la transcripción en el momento de transi-ción de la fase vegetativa a la esporulante "apagando" selectivamente los genes vegetativos.

Por otro lado Ristof y col. (101) observaron que cuando en la fase logarítmica temprana se incubaba al mi-croorganismo en un medio conteniendo glicerol, pero ca-rente de  $N_2$ , la tirocidina estimula la esporulación; pero en este caso la síntesis de RNA está muy aumenta-da. Así que una relación obligada entre esporulación, síntesis de antibiótico e inhibición de síntesis de RNA, no está claramente establecida.

Un hecho que llama la atención es que algunos ba-cilos y actinomicetos contienen en sus esporas aquellos antibióticos cuya producción los caracteriza. Los anti-bióticos así "empaquetados" posiblemente frenan la ger-minación hasta que las condiciones sean favorables. Hirsh y Ensign (100) encontraron que el "factor inhibi-dor de la germinación" producido por S. viridochromogenes

es un antibiótico.

Se han encontrado evidencias recientes de que la Gramicidina S es un inhibidor de la germinación en B. brevis. Estos hallazgos fueron comprobados por Arnold Demain y J.M. Piret (100) usando una cepa de B. brevis productora de gramicidina y una mutante no productora. De sus observaciones ellos concluyen:

1. El inicio de la germinación es similar en la cepa progenitora que en la mutante (observación microscópica).
2. Las esporas de las mutantes Gramicidinas-S (GS) (-) tienen un tiempo de germinación de 1 a 2 hs. En cambio en la cepa progenitora es de 6 a 10 hs.
3. La adición de G.S a las esporas mutantes retarda su germinación comportándose como la cepa progenitora.
4. Si se hace un hidrolizado de gramicidina con proteasas no se observa retraso alguno en el proceso de esporulación de las mutantes.
5. Las esporas progenitoras tratadas con proteasas, germinan rápidamente.

Estas evidencias sugieren que el antibiótico determina de alguna manera el proceso de germinación. Estos investigadores especulan sobre la posibilidad de que el antibiótico funcione como un "detector" de la densidad de población del medio, previniendo la germinación hasta que la población del entorno no tenga significancia competitiva.

Otra posibilidad contemplada es que el antibiótico protege a la spora de la depredación, o bien que al momento de la germinación, se libere lentamente, eliminando competidores y que el retraso en el crecimiento sea el "precio" que debe pagarse por tal protección.

Por otra parte la amplia distribución de los metabolitos secundarios, su variedad y su estructura química, hacen pensar que necesariamente deben tener alguna función para la célula productora ya que se ha observado que algunos metabolitos secundarios de considerable complejidad tienen acción sobre ésta. Por ejemplo, las actinomicinas, antraciclinas y bleomicinas regulan la síntesis del DNA durante la esporulación y la formación del micelio aéreo. Los aminoglicósidos, macrólidos y lincomicinas, regulan la biosíntesis de proteínas durante la esporulación. Las rifamicinas regulan la síntesis de RNA durante la esporulación y la formación de micelio aéreo (85).

H. Zähler (84) opina que los metabolitos secundarios se han generado primeramente para ejercer algunas funciones en el organismo productor y el hecho de que tengan actividad antibiótica es colateral. En su análisis menciona la existencia de moléculas con características de metabolitos secundarios, que ejercen una función específica en los organismos productores.

#### Compuestos transportadores de hierro

La mayor parte de los microorganismos que crecen en cultivos carentes de Fe excretan grandes cantidades de agentes quelantes de éste, los cuales contribuyen a solubilizar el hierro que, en ausencia de tales quelantes es insoluble. Estos quelatos son incorporados por sistemas de transporte específicos. La mayoría de los microorganismos excretan una variedad de quelatos, por ejemplo algunas cepas de *Streptomyces* producen ferroxiaminas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E, F y G. Actualmente se conocen más de 100 compuestos transportadores de hierro (84). La producción de estos compuestos, manifiesta alta especificidad. Los estreptomicetos producen ferroxiamina y los ascomicetos superiores producen sideraminas tipo ornitina. No sólo existe pues una gran variedad y una alta especificidad (2 criterios que caracterizan a los metabolitos secundarios), sino que tienen

(y esto es indudable) un efecto en el organismo productor.

Las sideraminas son un excelente ejemplo de que la actividad antibiótica de los metabolitos secundarios es incidental. Se conocen más de 100 sideraminas y de éstas sólo 2 muestran actividad antibiótica en su estado libre de fierro: la ferroxiamina E y el deferritriacetil fusígeno, la primera de ellas se describió como antibiótico y se le llamó nocardamina (84). La relevancia de estas moléculas reside en su alta capacidad para quelar el fierro y en la selectividad de transporte del mismo, ya que estos quelantes no pueden ser transportados y el fierro no puede ser removido por los organismos sensibles a la actividad antibiótica. Un dato que apoya a lo que se viene argumentando es que el número de actinomicetos cuyo principal componente es la ferrioxiamina B, componente que carece de actividad antibiótica es considerablemente mayor que el número de actinomicetos que tienen nocardamina como principal componente. Parece más o menos fortuito que estos compuestos además de cumplir con la función de transporte de fierro en la célula productora, ejerzan función antibiótica en otros microorganismos (102).

La observación de que sólo algunos metabolitos secundarios tienen acción antibiótica se hubiera dado más frecuentemente, si la antibiosis no se tomara como crite-

rio de selección de los organismos productores de metabolitos secundarios.

### Ionóforos

Moléculas producidas por una gran variedad de microorganismos, que pertenecen a grupos químicos diversos como macrotetrólidos, macrodiólidos, poliéteres, etc. En cada grupo químico existe una gran variabilidad y elevada especificidad de función, estos compuestos resultan excelentes modelos para el estudio de transporte de iones. Tal vez la función de estas moléculas tiene como fin principal la selección de iones metálicos alcalinos que el organismo productor necesita. Existen algunos con actividad antibiótica (84).

Entre otras funciones conocidas de los metabolitos secundarios tenemos:

### Función hormonal

El ácido trispórico, metabolito secundario de los mucorales, funciona como hormona sexual (100).

La zearalenona de Giberella zeae es un regulador de la producción sexual (100).

### Función fitotóxica

Como ejemplo tenemos las fitotoxinas de Pseudomonas

Sp., las cuales son metabolitos secundarios muy activos que inducen clorosis en los tejidos vegetales (100).

#### Función simbiótica

Los hongos del género Ectomycorrhizae se caracterizan por estar asociados a las células corticales de las raíces absorbentes, produciendo antibióticos que benefician a la planta protegiéndola contra bacterias patógenas (100).

#### Enfoque evolutivo

Un mejor enfoque para considerar el metabolismo secundario, es ubicarlo en el área de juego de la evolución bioquímica. Según Winkler (84), la evolución es un proceso lento cuya fuerza directriz resulta de la conjugación entre el incremento de la variación debida a la mutación y el decremento en dicha variación ejercido por la selección.

Los sistemas biológicos tienen niveles de organización metabólica fundamentales cuya función es mantener la viabilidad de una especie, es decir, su reproducción. Estos niveles, dejan solo un pequeño margen a otras actividades, dentro de las cuales se encuentra la evolución; dicho margen no está separado sino al contrario, por una

parte vemos un cambio continuo de los metabolitos secundarios (probables productos de la evolución) hacia los niveles fundamentales del metabolismo y por otra parte, la materia prima para la síntesis de los metabolitos secundarios deriva de tales niveles. Existen además moléculas que están en un punto intermedio entre el metabolismo secundario y los niveles mencionados (84).

En el metabolismo primario una mutación conduce a la muerte de la célula, a menos que el nuevo producto pueda desempeñar las funciones del producto original con igual o mayor eficacia. En contraste en el metabolismo secundario un producto puede ser cambiado en diferentes formas y tal cambio no tiene efectos adversos en ninguno de los niveles fundamentales (arriba mencionados) así podemos tener "variaciones sobre un mismo tema". Por ej. una sola cepa de *Streptomyces* produce 32 antraciclínas.

La participación del metabolismo secundario en el juego de la evolución bioquímica, tiene una estrecha relación con el campo genético.

Una parte, quizás una gran parte, de la información genética para el metabolismo secundario, está o estuvo localizada en episomas. Kirby y Umezawa (103,104)

proponen que la información puede pasarse de un organismo a otro. La habilidad para formar ciertos metabolitos secundarios pudo haberse desarrollado en algún organismo pero puede aparecer ahora, en otro diferente; considerando esto, tendríamos que el desarrollo original de la información genética para formar ciertos metabolitos secundarios y la demostración de alguna función para el organismo productor puede aparecer en principio en diferentes organismos.

Si esto es cierto, habría grupos de organismos extraordinariamente bien dotados para la evolución bioquímica, en cambio, otros con grandes restricciones. La distribución desigual para formar metabolitos secundarios es una pregunta que requiere una respuesta ingeniosa.

De este nuevo enfoque del metabolismo secundario podría concluirse:

1. El desarrollo del metabolismo secundario es rápido y continuo. Más rápido que el desarrollo de los niveles fundamentales.
2. Siempre existe la probabilidad de que los metabolitos secundarios tengan alguna función aunque desconocida para el organismo productor.

3. La actividad antibiótica (actividad de algunos metabolitos secundarios) es incidental y es muy probable que dichos metabolitos tengan alguna otra función.

Si se acepta este nuevo punto de vista, el metabolismo secundario no será más un subproducto de la evolución; más bien el punto de partida para la evolución bioquímica. No será objeto de estudio de los arqueólogos de la bioquímica sino un campo de exploración para los bioquímicos del futuro.

## PENICILINA

En 1929, Fleming descubrió una sustancia con actividad bactericida producida por el hongo Penicillium notatum; al igual que otros metabolitos secundarios la penicilina no presenta ninguna función aparente en los microorganismos que la producen... Su actividad bactericida es sobre gérmenes Gram positivos, aunque también tiene cierto grado de acción sobre Gram negativos (105). Dicha acción sobre estos microorganismos deriva de su capacidad para bloquear la unión entre los aminoácidos D-alanina y L-alanina del péptido glucano de la pared celular, lo que da como resultado una estructura sensible a los cambios osmóticos (106).

Fue hasta el año de 1945 que se esclareció su estructura mediante estudios cristalográficos, viéndose que está esencialmente constituida por un núcleo bicíclico tiazolidín  $\beta$ -lactámico, con una cadena lateral unida por enlace amido en posición 6 (Figura 4).

### Biosíntesis de Penicilina

Los mecanismos de síntesis de este antibiótico se empezaron a conocer, gracias a algunas observaciones de Bonner (107) respecto a que en las cepas de --

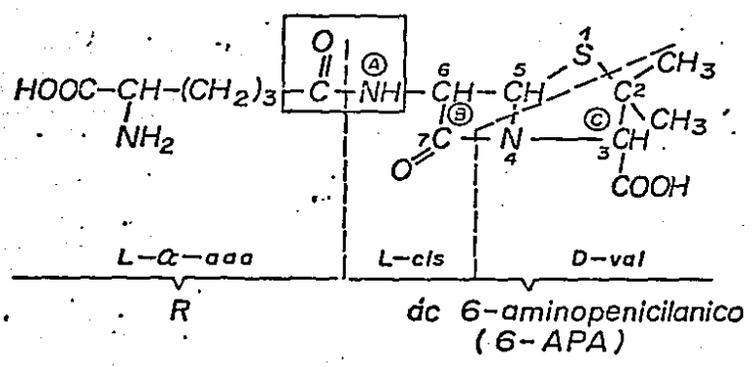


FIGURA 4.- ESTRUCTURA FUNDAMENTAL DE LA PENICILINA

P. crysogenum auxótrofas de lisina presentaban mayor producción de penicilina, sugiriendo que entre dicho aminoácido y el antibiótico podría haber nexos biosintéticos importantes, como por ejemplo provenir de un precursor común.

En 1957 Demain y colaboradores (108) encontraron que cuando P. chrysogenum se crecía en medio mínimo suplementado con lisina, la síntesis de penicilina disminuía notablemente; actualmente se sabe que tal efecto se debe a la retro inhibición que la lisina ejerce sobre la homocitrato sintetasa, afectando de esta forma la síntesis del ácido  $\alpha$ -aminoadípico ( $\alpha$ -aaa) (109,110). Por otra parte se demostró que el  $\alpha$ -aminoadipato es capaz de revertir la inhibición en la biosíntesis de penicilina ejercida por lisina y que es capaz de estimularla en ausencia del aminoácido inhibidor. A la fecha se ha esclarecido perfectamente que el  $\alpha$ -aaa es un precursor común de la biosíntesis de penicilina y de lisina en Penicilium sp. (111, 112) figura 5.

Los hechos anteriormente mencionados condujeron al establecimiento de la ruta biosintética de penicilina, la cual se inicia con el  $\alpha$ -aminoadipato que por acción de la  $\delta$ (L- $\alpha$ -amino adipil cisteína sintetasa) se une a la L-cisteína generando el dipéptido  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteína)

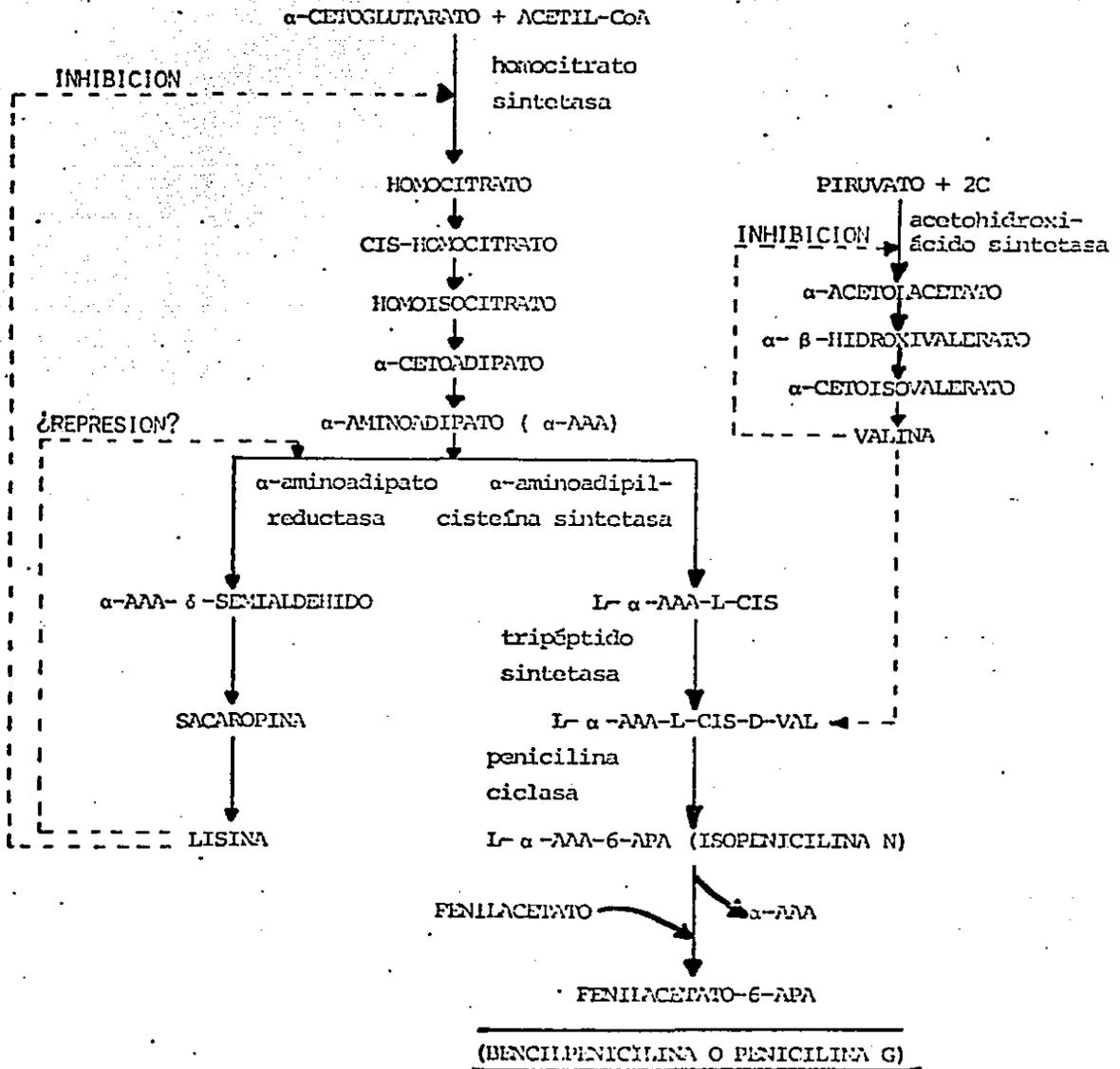


FIGURA 5.- Esquema general de la ruta biosintética común para lisina y bencilpenicilina en *P. chrysogenum* y sus mecanismos de regulación.

primer intermediario de la vía (113), (Figura 6-reacción 1). Este dipéptido por acción de una segunda sintetasa (tripéptido sintetasa) se condensa con la L-valina para dar el tripéptido precursor de la biosíntesis de penicilina:  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina) (Fig. 6 reacción 2). Se sabe que la L-valina se isomeriza en el momento mismo de la unión y no antes ya que el tripéptido no se forma cuando se suministra D-valina o DL-valina (114-118).

Una vez formado el tripéptido, tiene lugar la ciclización entre los residuos de cisteína y valina (119, 120), por acción de la penicilina ciclasa (Fig. 6 reacción 3), dando como resultado el núcleo tiazolidín  $\beta$ -lactámico a través de un intermediario monocíclico, obteniéndose finalmente isopenicilina N, que es un tipo de penicilina cuya cadena lateral es el ácido  $\alpha$ -aminoadípico unido al núcleo 6 aminopenicilánico (6 APA) (117,121-123). La enzima penicilina ciclasa no ha sido aislada, sin embargo existen mutantes que acumulan el tripéptido, ya que no pueden ciclizarlo, por lo que se infiere su existencia (124,126).

El paso final de la biosíntesis de penicilina, es un intercambio de la cadena lateral acíclica unida al núcleo en posición 6 por algún ácido precursor presente en el medio de cultivo, esta reacción es catalizada por

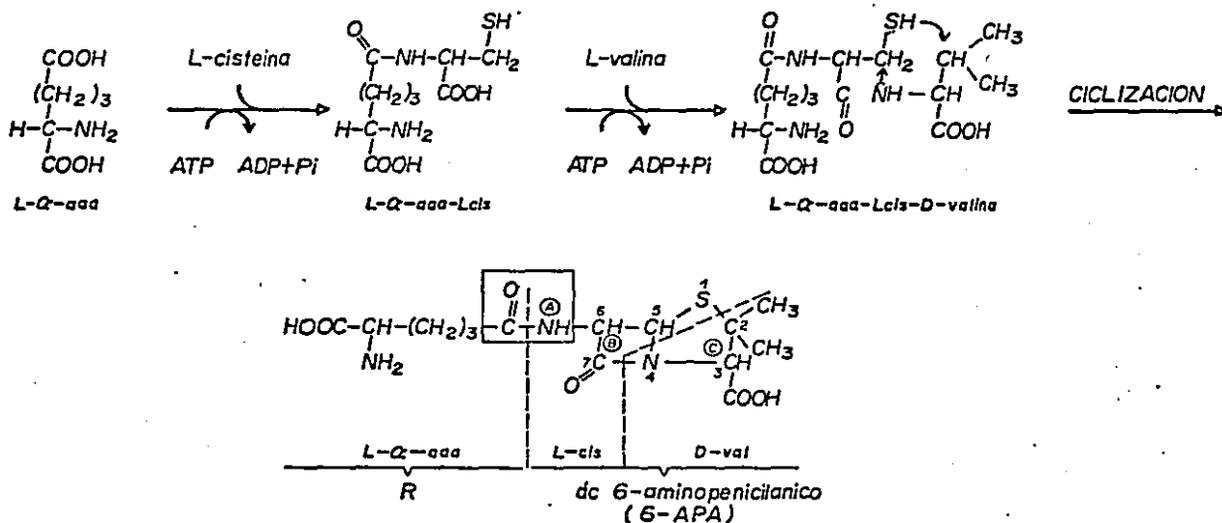


FIGURA 6. Ruta postulada para la biosíntesis de penicilina: (1) Reacción catalizada por la δ(L-α-aminoadipil-cisteína sintetasa); (2) Reacción catalizada por la tripéptido sintetasa; (3) Reacción catalizada por la penicilina ciclasa.

la penicilin-acil-transferasa con participación de ATP y coenzima A, generando diversas penicilinas dependiendo del ácido que se incorpore, como puede verse en la figura 7, (115,128-131).

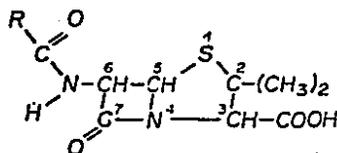
#### Regulación de la biosíntesis de penicilina

Como ya se mencionó al hablar de metabolitos secundarios, éstos se caracterizan por su aparición en la fase tardía del crecimiento microbiano (idiofase) y la penicilina no es la excepción, como puede verse en la figura 8.

Los factores que determinan la síntesis de penicilina se han comenzado a esclarecer, sin embargo parece evidente que existe una relación con la concentración y consumo de las fuentes de carbono y de nitrógeno del medio de cultivo.

#### Regulación por la fuente de carbono

Se sabe que la formación de penicilina en el hongo P. chrysogenum se reprime por acción de la glucosa (132), el grado de inhibición depende de la concentración de la misma en el medio de cultivo. Se ha visto también, que los análogos no metabolizables de glucosa no ejercen tal efecto, por lo que se piensa que tal efecto se debe a algún producto del catabolismo del azúcar, mas que a la



PENICILINA : FORMULA GENERAL

SUSTITUYENTE R	FORMULA	PENICILINA	
		NOMENCLATURA QUIMICA	NOMBRE COMUN
1 <i>ác</i> $\alpha$ -aaa ( $\alpha$ amino adípico)	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-$	ISOPENICILINA	N
2 <i>ác</i> hexanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$	N-AMILPENICILINA	Dihidro F
3 <i>ác</i> octanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(=\text{O})-$	N-HEPTIL PENICILINA	K
4 <i>ác</i> $\beta$ -hexenoico	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$	2 PENTIL PENICILINA	F
5 <i>ác</i> fenil acético		BENCIL PENICILINA	G
6 <i>ác</i> fenoxiacético		FENOXIMETIL PENICILINA	V
7 <i>ác</i> p-OHfenilacético		P-OH BENCIL PENICILINA	X

FIGURA 7.- Diversas penicilinas generadas por acción de la penicilina acil transferasa, enzima que promueve el cambio del  $\alpha$ -aaa por otros sustituyentes acídicos.

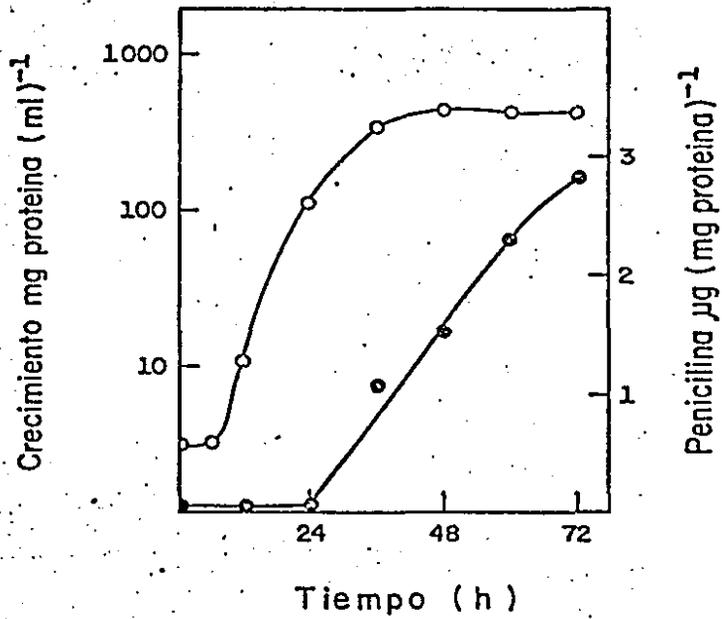


FIGURA 8.- Cinética de crecimiento (○) y de producción de penicilina (●) del hongo P. chrysogenum.

glucosa misma; se sabe también que la represión no se revierte con AMP cíclico (132).

Otros carbohidratos como sacarosa, fructosa y galactosa, ejercen efectos similares a los de la glucosa, en tanto que los polímeros de ésta como el almidón, inhiben solo parcialmente la síntesis del metabolito secundario, mientras que la galactosa y ramnosa carecen de efecto (132).

#### Regulación por fuente de nitrógeno

La penicilina puede considerarse como un antibiótico peptídico ya que en su síntesis intervienen los aminoácidos L- $\alpha$ -aminoadípico, L-cisteína y L-valina. Bajo estas consideraciones puede predecirse que tanto su formación como su regulación están sujetas a los eventos de control que determinen la formación de los aminoácidos precursores.

Hunter y Segel (133) observaron que el micelio de P. chrysogenum crecido en condiciones diversas, acumula elevadas concentraciones de L-glutamato. Sánchez y col. han confirmado tales observaciones y además han encontrado que la poza de este aminoácido se incrementa al final de la trofofase. Adicionalmente, se ha esta-

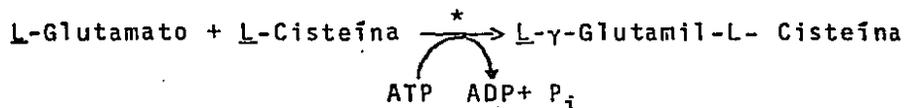
blecido que la concentración de glutamato sobrepasa a los aminoácidos y que su acumulación precede a la síntesis de penicilina (134).

Recientemente se ha reportado que el glutamato estimula la síntesis del antibiótico en el micelio del hongo que ha sido cosechado durante la idiofase y resuspendido en un medio mínimo (113). Este efecto no parece deberse a una mayor disponibilidad de los aminoácidos precursores del antibiótico, ya que su concentración intracelular no se modifica. Además, la estimulación de que antes hablamos, también se presentó cuando se usaron análogos no metabolizables del glutamato y se previno por la adición de inhibidores de la síntesis de proteínas. Estos hechos, como se mencionará posteriormente, constituyen el precedente de este trabajo de tesis.

## ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ruta biosintética para glutatión ha sido ampliamente explorada, como ya se ha visto anteriormente y los pasos propuestos para su síntesis y/o utilización han sido confirmados por diversos medios experimentales (1,23). Asimismo, se sabe que el glutatión retroregula su propia biosíntesis inhibiendo competitivamente a la  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetasa, primera enzima de la vía biosintética, cuya función catalítica se expresa en la siguiente reacción:



\* $\gamma$ -Glutamil-cisteína sintetasa.

Adicionalmente el glutatión (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-D-glicina), es una molécula cuya estructura tiene una analogía sorprendente con el tripéptido precursor de la biosíntesis de penicilina:  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina). Figura 9.

Por otra parte Arnstein y col. (135) probaron que el primer paso en la síntesis de penicilina es la forma

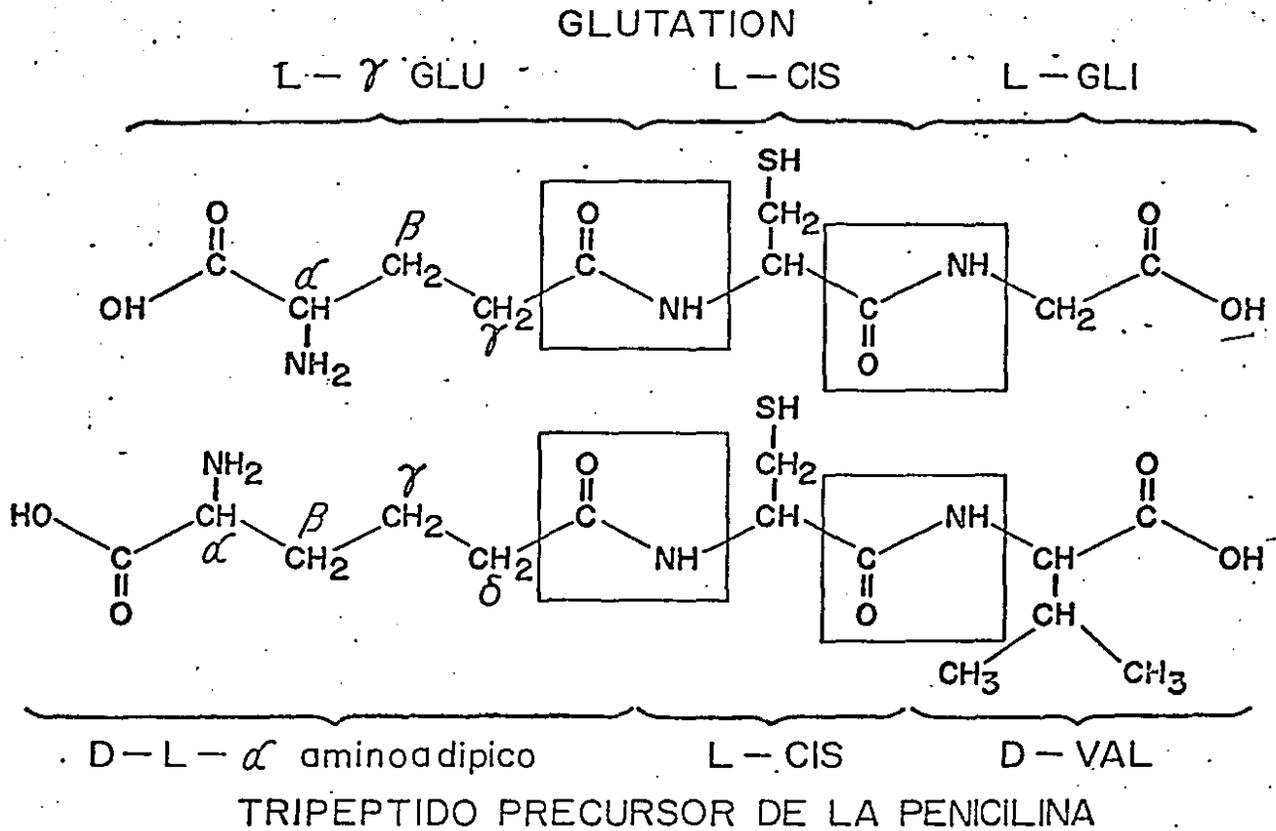


FIGURA 9.- Estructura química del glutati6n y del tripéptido precursor de la penicilina. N6tese la gran similitud que existe entre ambos.

ción del dipéptido  $\delta(\underline{L}\text{-}\alpha\text{-aminoadipil-}\underline{L}\text{-cisteína})$ , pero nada concreto mencionaron respecto a la enzima que cataliza esta reacción.

En estudios realizados sobre las propiedades catalíticas de la primera enzima biosintética de glutatión (aislada de bovino), en presencia de varios análogos de glutamato (primer sustrato de la enzima), Meister y col. (1) encontraron que el DL- $\alpha$ -aminoadipato puede funcionar como primer sustrato, sin embargo, la actividad de la enzima es muy baja (1 - 2% de la alcanzada con glutamato).

Basándose en estos hallazgos y en el hecho de que la mayoría de los organismos inferiores cuentan con la "maquinaria biosintética" para glutatión, Kaszab y Enfors (136) aislaron la  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetasa de P. chrysogenum y probaron su actividad frente a L-glutamato y  $\alpha$ -aminoadipato, encontrando que la enzima funciona con ambos sustratos. La actividad alcanzada con  $\alpha$ -aminoadipato en este caso fue del 70% en relación a la alcanzada con glutamato. Estas evidencias preliminares les permitieron sugerir que en el primer paso biosintético de glutatión y de penicilina en P. chrysogenum participa una enzima en común, ya que en organismos in-

feriores, la selectividad de sustrato por parte de algunas enzimas, no es tan estricta cuando se trata de diferencias estructurales sutiles.

Por otra parte, Sánchez y col. (133), encontraron para P. chrysogenum que en una fermentación normal la poza de glutamato (sustrato para la síntesis de GSH), se eleva considerablemente con respecto a otros aminoácidos, justo antes del inicio de la síntesis de penicilina.

Adicionalmente se ha observado, que cuando se preincuba un sistema de células en reposo de P. chrysogenum con glutamato, se estimula notablemente la síntesis de penicilina en relación al control al que se suplementa con  $\text{HN}_4\text{Cl}$  a la misma concentración. Tal efecto se presenta también cuando se usan análogos no metabolizables de glutamato, en cambio cuando el sistema se preincuba con cicloheximida y glutamato, no se presenta. Esto permite sugerir que se trata de un efecto-inductor del glutamato sobre la síntesis de penicilina. Existen datos preliminares que sugieren que este efecto tiene lugar en la primera enzima de la biosíntesis del antibiótico  $\delta(\underline{\text{L}}\text{-}\alpha\text{-aminoadipil-cisteína-sintetasa})$  (113).

Un hecho relevante que ya se ha mencionado, pero que conviene recordar, es la obtención de mutantes mi-

$\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína-sintetasa)?

3. Los fenómenos de regulación claramente definidos para glutatión se cumplen para penicilina y vice versa?

Si el trabajo experimental planeado para contestar estas preguntas, conduce a una respuesta afirmativa de las mismas, podemos decir que nuestra pregunta fundamental se contesta también afirmativamente.

crobianas deficientes en la síntesis del GSH, que son capaces de crecer normalmente en medio mínimo.

Partiendo de los datos hasta aquí mencionados, se antoja pensar que entre glutatión y penicilina pueden existir más analogías que las que hasta ahora se han contemplado. Si se presume que una misma enzima puede estar involucrada en la síntesis del tripéptido precursor de la penicilina y en la síntesis de glutatión, se abre un panorama con varias incógnitas que integran la pregunta que constituye el título de la presente tesis:

#### ¿ES EL GLUTATION UN METABOLITO SECUNDARIO?

Las incógnitas a las cuales me referí anteriormente y cuya respuesta es el objetivo del presente trabajo son:

1. Presenta el glutatión un perfil de producción semejante al de penicilina?
2. Los perfiles de actividad de la primera enzima biosintética, guardan la misma relación cuando el primer sustrato es L-glutamato que cuando se trata de  $\alpha$ -aminoadipato? Es decir, la actividad de  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetasa, presenta un perfil que se correlacione de alguna manera con el de

δ(L-α-aminoadipil-cisteína-sintetasa)?

3. Los fenómenos de regulación claramente definidos para glutatión se cumplen para penicilina y viceversa?

Si el trabajo experimental planeado para contestar estas preguntas, conduce a una respuesta afirmativa de las mismas, podemos decir que nuestra pregunta fundamental se contesta también afirmativamente.

## MATERIALES Y METODOS

## MATERIALES Y METODOS

### Material biológico

- a) Penicillium chrysogenum NRRL 1951
- b) Sarcina lutea NRRL-B-1018 (empleada para la valoración de antibiótico). Ambas cepas fueron proporcionadas por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill. U.S.A.
- c) Glutación reductasa (extraída de levadura).  
"Stock" de 150 unidades por miligramo de proteína de Sigma Chemical Co.

### Reactivos químicos

El glutación en sus dos formas, oxidada GSSG y reducida GSH, el ácido 5,5' ditio-bis-2nitrobenzoico (DTNB),  $\beta$ -NADPH (sal tetrasódica), ATP y los aminoácidos empleados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

Las sales, ácidos y solventes, fueron adquiridos de las compañías Merck y Baker.

### Medios de conservación

En el caso de P. chrysogenum, se usaron placas con teniendo un medio cuya composición por litro es la siguiente: peptona 10 g, dextrosa 20 g, extracto de levadura 1 g, agar 15 g.

La cepa de S. lutea se conservó en placas con medio completo: extracto de levadura 3 g, peptona 5 g, NaCl 8 g MgSO<sub>4</sub> 0.1 g, dextrosa 5 g, agar 15 g, en 1 lt. de solución final.

### Medio para cuantificar antibiótico

El medio empleado para la cuantificación de penicilina tiene la siguiente composición por litro: 6 g de peptona, 3 g de extracto de levadura, 1 g de extracto de carne y 1.5 g de agar.

### Mezcla de sales de Jarvis y Johnson 10X (J.J.-10X)

La mezcla de sales utilizada en algunos de los medios empleados se preparó de acuerdo a lo reportado por Jarvis y Johnson (138), pero diez veces más concentrada (10X).

### Medio de producción (M.P.)

La composición por litro de este medio es la siguiente: sales J.J. 10X 100 ml, ácido fenilacético 0.5 g, cloruro de amonio 0.45 g, acetato de sodio 3.2 g, lactosa 30.0 g, glucosa 10.0 g (ambas deben ser esterilizadas por separado). El pH se ajusta entre 6.8 y 6.9 con hidróxido de sodio 10 N.

### Medio para los sistemas de células en reposo (M.RC)

Este medio tiene la siguiente composición por litro: 16.0 ml de la mezcla de sales J.J. 10X, 320.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos 1 M pH 7.0, 0.5 g de ácido fenil-acético y 30 g de lactosa (esterilizada por separado).

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C, durante 20 minutos; cuando hubo que adicionar a tales medios, aminoácidos y/o cicloheximida, éstos se esterilizaron por filtración a través de membranas Millipore tipo HA con poro de 0.45 µm.

### Cultivo en medio de producción (fermentación)

Se preparó en agua bidestilada estéril una suspensión de esporas cuya densidad óptica fue de 1.5 a 540 nm.

Se añadió un inóculo del 2% a matraces fernbach conteniendo 500 ml de M.P. La incubación fue a 29°C con agitación rotatoria a 165 revoluciones por minuto. En cada experimento se emplearon dos matraces para cada tiempo de fermentación y para cada condición.

#### Sistemas de células en reposo (RC)

El micelio desarrollado en 500 ml de M.P. durante 36 horas (tiempo en que ya se detecta la producción de penicilina) se colectó filtrando en papel Whatman-31 en condiciones estériles, transfiriéndose a un matraz Erlenmeyer de 1000 ml con 250 ml de medio (R.C.). En cada uno de estos sistemas se incluyó una variable distinta: glutamato 10 mM, Bencil-L-Glutamato 10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM; se usó un sistema adicional, como control de síntesis de proteínas al cual se le adicionó cicloheximida 100  $\mu\text{g/ml}$ ), se incubó el micelio trasferido durante 1 hr después de la cual se adicionó glutamato 10 mM.

#### Quantificación de crecimiento

Esta se realizó mediante medición de la proteína miceliar formada a diferentes tiempos en cada una de las condiciones experimentales empleadas. Para cada caso se tomaron muestras de 2 ml centrifugándose a 9000 rpm durante 10 min, el sedimento se resuspendió en 1 ml de TCA

al 5% y se sometió a homogeneización mecánica en un aparato modelo K45 de tri-R-Instruments a la velocidad II; se usó un ml más de TCA, a fin de recuperar la proteína residual en el vaso de homogenización. El homogenizado se centrifugó durante 15 min a 9000 rpm, se eliminó el sobrenadante mediante una cuidadosa succión; el sedimento se resuspende 2 ml de NaOH 0.4N, de aquí se toman alícuotas de 200  $\mu$ l, aforándose a 1 ml con agua bidestilada para cuantificar proteína por el método de Lowry (139); utilizando como estándar una solución de albúmina sérica bovina, a una concentración de 500  $\mu$ g/ml.

#### Cuantificación de antibiótico

En las muestras de 2 ml obtenidas a los diferentes tiempos, se determinó en el sobrenadante la concentración de penicilina mediante el método de difusión en agar con S. lutea como microorganismo de prueba (140-141), se usó como standard bencil-penicilina a diferentes concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 1.0  $\mu$ g/ml).

### Extracto etanólico

El micelio contenido en 20 ml de la condición en estudio se filtró a través de membranas Millipore tipo HA de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro, se lavó con agua bidestilada y se resuspendió en etanol al 80%; se homogeneizó mecánicamente en el aparato antes mencionado. El homogeneizado se hirvió durante 10 minutos en baño María y se filtró nuevamente a través de membrana Millipore de características arriba señaladas. El filtrado se liofilizó y se disolvió en una décima parte del volumen original de la muestra, en agua, para ser utilizado en la determinación de pozas de aminoácidos en un autoanalizador modelo Durrum D-500.

### Cuantificación de glutatión

a) Intracelular: El micelio contenido en 25 ml de medio de cada tiempo y condición estudiados, se colectó por filtración a través de membranas Millipore tipo HA de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro; el sedimento se lavó con agua bidestilada y se resuspendió en 5 ml también de agua, sometién dose a homogeneización. El volumen se llevó hasta 15 ml y se hirvió durante 10 min

en baño María y se filtró nuevamente a través de membrana Millipore de las características arriba señaladas. El filtrado se liofilizó y se disolvió en una décima parte del volumen original de la muestra, en agua, para ser utilizado en la determinación de pozas de aminoácidos en un autoanalizador modelo Durrum D-500.

#### Cuantificación de glutatión

a) Intracelular: El micelio contenido en 25 ml de medio de cada tiempo y condición estudiados, se colectó por filtración a través de membranas Millipore tipo HA de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro; el sedimento se lavó con agua bidestilada y se resuspendió en 5 ml también de agua, sometiéndose a homogeneización. El volumen se llevó hasta 15 ml y se hirvió durante 10 min en baño María. Se filtró nuevamente a través de una membrana Millipore cuyo diámetro de poro sea 0.45  $\mu\text{m}$ . El filtrado se liofilizó y se redisolvió en 1 ml de agua

bidestilada. En cada extracto se toman alícuotas de 100  $\mu$ l para hacer los estimados de la concentración de glutatión presente.

b) Extracelular: El medio libre de micelio resultante de la primera filtración arriba mencionada se colectó en su totalidad (20 ml) en un matraz Kitasato de 250 ml, se liofilizó y finalmente se redisolvió en 3 ml de agua bidestilada. De aquí se toman alícuotas también de 100  $\mu$ l para los estimados de glutatión extracelular.

El método empleado para la valoración de glutatión fue el de la glutatión reductasa, el cual, por ser enzimático, es altamente sensible y específico. El procedimiento se desarrolló exactamente igual al ultramicrométodo descrito por Orfanos y Naylor (142).

Medición de la Actividad de L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cisteína-Sintetasa y/o  $\delta$ (L- $\alpha$ -Aminoacidipil)-L-Cisteína Sintetasa

a) Obtención de polvos de acetona: El micelio total de cada tiempo y condición en los que se deseaba explorar la actividad enzimática, se colectó por filtración en filtro Buchner con papel Whatman No. 31, se lavó pro-

fusamente con agua destilada fría (4°C). Después de lo cual se vierte sobre el micelio acetona previamente enfriada (4°C), hasta observar que éste se deshidrata por completo (aproximadamente 200 ml). Los polvos de acetona así formados se dejan secar y se guardan en recipientes herméticamente cerrados y claramente identificados a -20°C.

b) La medición de la actividad enzimática se hizo indirectamente, mediante la cuantificación del fósforo inorgánico (Pi) liberado de acuerdo al método de Taussky y Shorr (143). Para llegar a tal determinación, hubieron de montarse las condiciones más adecuadas para la actividad enzimática en el caso concreto de P. chrysogenum. La solución amortiguadora seleccionada, por cuanto en ella se encontró mayor actividad y las diferencias entre las distintas condiciones experimentales fueron más evidentes, fue la de tris-HCl 0.05 M pH 7.3, adicionada de ascorbato a una concentración final de 1 mM; esta solución amortiguadora se preparó fresca para cada ensayo.

Obtención del extracto libre de células. Los polvos de acetona procedentes de cada tiempo o condición experimental se pesan, se fragmentan en trozos pequeños y se colocan dentro de una botella Brawn previamente enfriada, que contiene perlas de vidrio de 1 mm de diámetro, prelava

das con la solución amortiguadora de tris ascorbato. Se procuró que entre la cantidad de perlas empleadas, el micelio obtenido y el volumen del amortiguador empleado, hubiera una relación 1:1:1 en volumen. Posteriormente el micelio así tratado se rompe en un fragmentador Brawn, modelo 853030, durante 25 segundos, usando  $\text{CO}_2$  como agente frigorizante.

La mezcla resultante de tal ruptura se centrifuga a 12000 rpm 20 minutos (a  $4^\circ\text{C}$ ); se separó cuidadosamente el sobrenadante por succión y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, a fin de obtener un extracto más limpio. La concentración aproximada de proteína obtenida en el sobrenadante fue de 2 mg/ml.

Se hicieron algunas determinaciones enzimáticas en el extracto crudo, pero hubo algunos problemas debido a las fosfatasas contaminantes. Se decidió entonces hacer una semipurificación, para lo cual, se hicieron diversos cortes con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Después de varios intentos en los que se midió actividad enzimática en cada fracción, optamos por hacer sólo dos cortes: uno al 40% cuyo sedimento se descartó y el sobrenadante se llevó hasta 70%, quedándonos con el sedimento resultante de esta precipitación (en el cual se observó mayor actividad) como fuente de la enzima. Este sedimento se disolvió en 2 a 3 ml de

solución amortiguadora tris-ascorbato; las alícuotas empleadas en cada determinación fueron de 200  $\mu$ l.

El contenido de los sistemas de reacción (1 ml) fue el siguiente:

- a) para el caso de la actividad de  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa: amortiguador (tris-ascorbato 0.05 M) L-Glutamato 5 mM, ATP 2 mM,  $MgCl_2$  10 mM, cisteína 11 mM; (los blancos no contenían glutamato).
- b) Para el caso de la actividad de  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil cisteína sintetasa); amortiguador,  $\alpha$ -aminoadipato 5 mM, ATP 2 mM,  $MgCl_2$  10 mM, cisteína 11 mM; (los blancos no contenían  $\alpha$ -aminoadipato).

Cabe aclarar que debido a la susceptibilidad de la cisteína a la oxidación, los sistemas se trabajaron en anaerobiosis, por lo que se usaron tubos de Thunberg, (Fig. 10).

En estos tubos, la cisteína se trabajó en forma anhidra, pesándose justo antes de iniciar el experimento (2 mg) y colocándola en la parte A del tubo. En la parte B del mismo se colocan todos los reactivos restantes; se ensamblan la parte A y B (las juntas deben tener grasa de silicón para lograr hermeticidad); se hace vacío durante 10' y para arrancar la reacción se vierte el contenido de

B en A. La temperatura de incubación seleccionada fue de 37°C y el tiempo de incubación 20'; la reacción se para con ácido tricloroacético al 5%, el contenido de cada tubo se somete a centrifugación y del sobrenadante se toman 600  $\mu$ l para hacer la determinación de fósforo inorgánico. La actividad enzimática se expresa como  $\mu$ mol Pi/mg proteína/min.

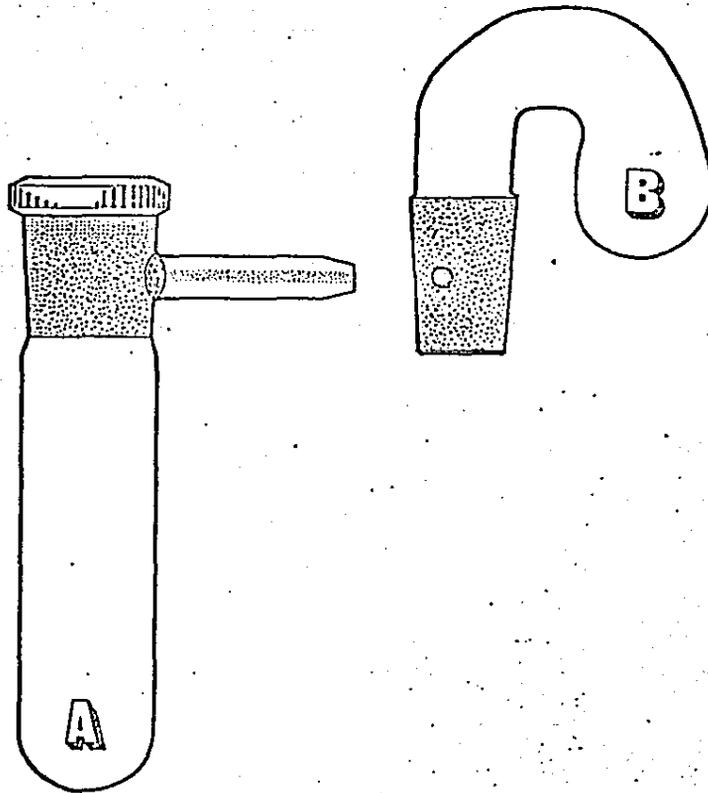


FIGURA 10.- Tubo de Thunberg, utilizado para realizar reacciones en anaerobiosis; en la parte A se coloca el reactante susceptible de oxidación, en la parte B, los reactivos restantes, los cuales se vierten a la parte A, despues de hacer el vacío, dando inicio a la reacción.

## RESULTADOS Y DISCUSION

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para explorar las posibles analogías a nivel biosintético y regulatorio entre glutatión y penicilina en P. chrysogenum, NRRL 1951 se hicieron estudios encaminados a determinar los perfiles biosintéticos de glutatión, así como las pozas de los aminoácidos precursores de este tripéptido a diferentes tiempos de una fermentación normal. Otro parámetro explorado fue la cinética de crecimiento del microorganismo, a fin de establecer alguna correlación entre la situación de las pozas de aminoácidos y las fases de crecimiento del microorganismo, o bien entre ésta y el inicio de la biosíntesis del glutatión. Los resultados se resumen en la fig. 11 en la que puede observarse que a tiempos tempranos de la fermentación (12 hs), se presenta un aumento notable en el glutatión extracelular, y un descenso continuo de éste durante toda la fermentación. En el glutatión intracelular, en cambio, se observó una tendencia a disminuir hasta las 36 horas, tiempo a partir del cual se registra una síntesis de novo que llega a rebasar ligeramente la concentración que existía a las 12 horas. Cabe hacer notar que tal incremento coincide con el inicio del crecimiento estacionario o idiofase de manera análoga a lo que sucede con el perfil de producción de penicilina.

En cuanto a las pozas de aminoácidos tenemos que la glicina presenta un incremento discreto pero continuo desde las 24 horas del proceso de fermentación. La cisteína muestra un ligero ascenso a las 36 horas, un descenso a las 48 y finalmente se estabiliza. El glutamato, en cambio, se encuentra notablemente aumentado desde las 36 horas, tiempo después del cual se inicia el aumento de glutación intracelular. Esto puede sugerir que existe alguna relación entre la presencia de este aminoácido y la subsecuente aparición de glutación, correlación que también se presenta en el caso de penicilina (Figuras 11, y 14A), Sánchez y col. han reportado (como ya se ha mencionado anteriormente) que glutamato (10 mM) induce la síntesis de penicilina en P. chrysogenum en un sistema de células en reposo (113). Si las similitudes observadas entre el glutación y el tripéptido precursor de la penicilina se deben a eventos biosintéticos y/o regulatorios comunes, debería observarse un aumento en la síntesis de glutación por parte de P. chrysogenum, en sistemas de células en reposo suplementadas con glutamato, o un análogo de éste y disminuir significativamente cuando el sistema se adiciona de cicloheximida. De los estudios realizados para esclarecer estas suposiciones, derivan los resultados mostrados en la fig. 12, los cuales concuerdan con las expectativas.

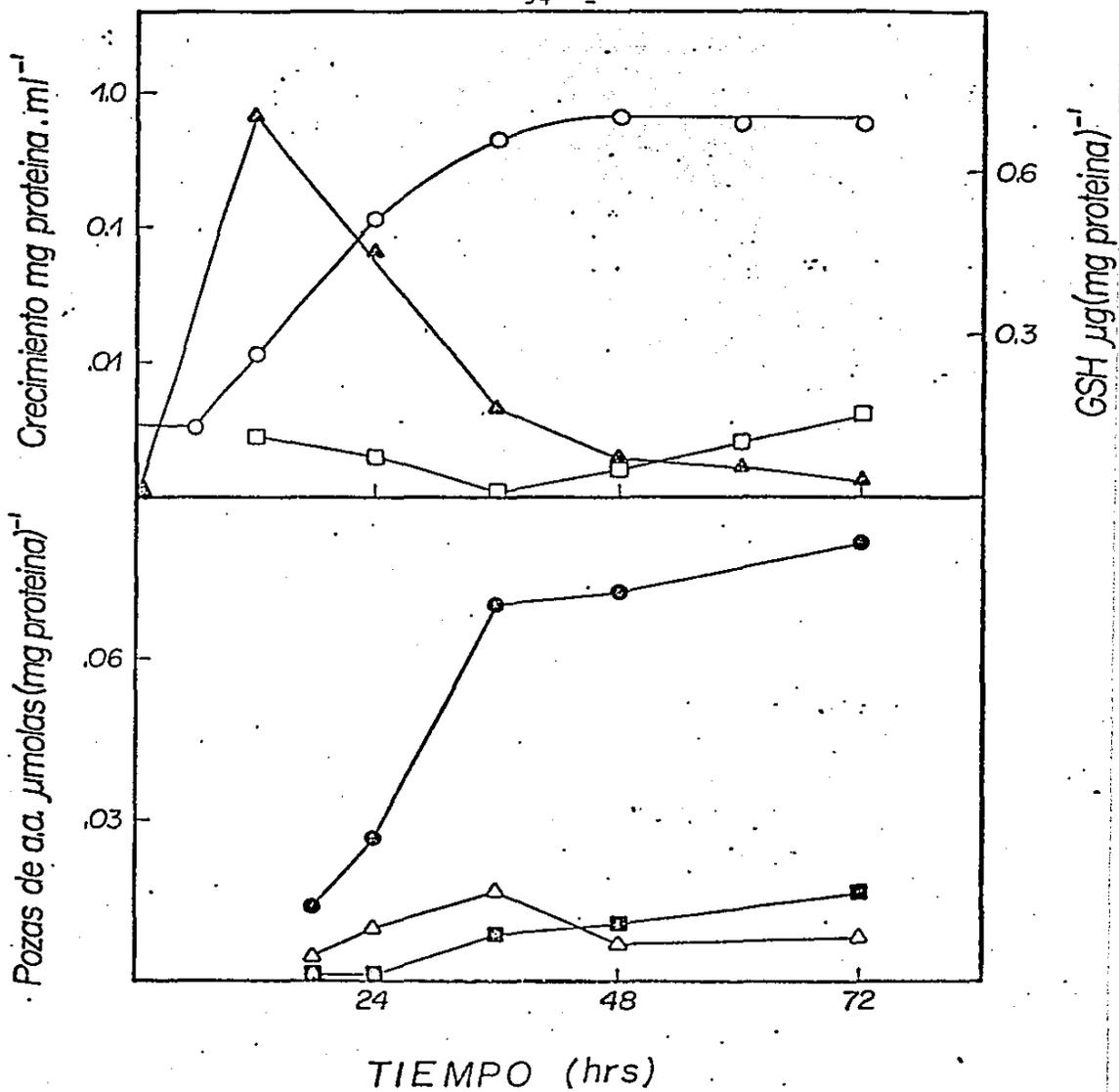


FIGURA 11.- Situación de las pozas de los aminoácidos precursores de glutatión, a diferentes tiempos de una fermentación normal, en correlación con el crecimiento microbiano y el inicio de síntesis de GSH. Crecimiento (○); GSH extracelular (▲); GSH intracelular (□); Glutamato (●); Cisteina (△) Glicina (◻).

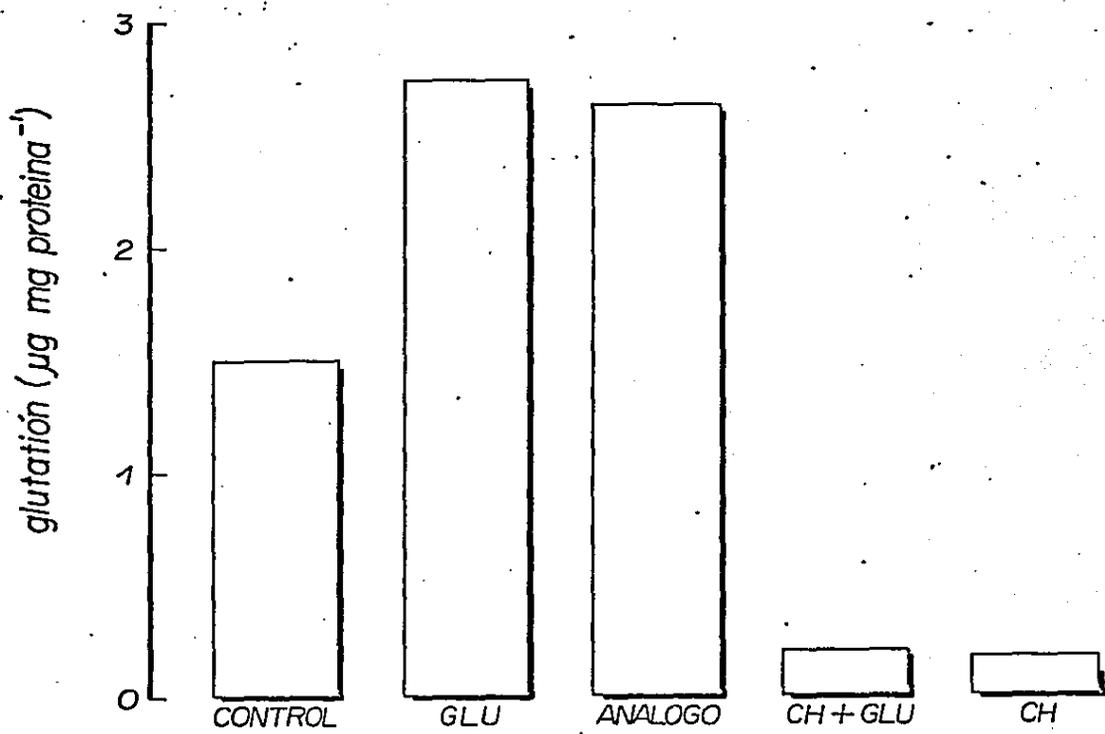


FIGURA 12. Síntesis de GSH a las 36 H en sistemas de células en reposo, suplementados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM (control); Glutamato (10 mM); Bencilglutamato (10 mM); Cicloheximida 100 µg/ml + Glutamato 10 mM (CH + GLU) y Cicloheximida 100 µg/ml (CH).

Por otra parte Meister y col. reportaron que la  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetasa (primera enzima de la biosíntesis del glutatión), cuyos sustratos naturales son: L-glutamato y L-cisteína, es capaz de reemplazar al primero por algunos análogos entre los que se encuentra el  $\alpha$ -aminoadipato (1). En base a esto Kaszab y Enfors (135) hicieron algunos estudios en la enzima extraída de P. chrysogenum usando ambos sustratos (L-glutamato, y  $\alpha$ -aminoadipato). Ellos encuentran evidencias que les permiten sugerir que esta enzima puede ser la misma que sintetiza el dipéptido inicial de la biosíntesis de penicilina ( $\alpha$ -aminoadipil-cisteína).

A fin de encontrar un nexo entre los posibles eventos biosintéticos o regulatorios comunes (de los que anteriormente hemos hablado) y el postulado arriba mencionado, se exploró la actividad de dicha enzima, extraída de P. chrysogenum cultivado en sistemas de células en reposo, suplementado en un caso con  $\text{NH}_4 \text{Cl}$  10 mM como control y en otro con glutamato a la misma concentración. Ambos extractos se probaron con los 2 sustratos (glutamato y  $\alpha$ -aminoadipato); la reacción se realizó en anaerobiosis, pues se usó cisteína como segundo sustrato en todos los casos. Los resultados se resumen en la figura 13 donde puede observarse que la enzima que proviene del micelio cultivado en sistema de células en reposo, suplementado con

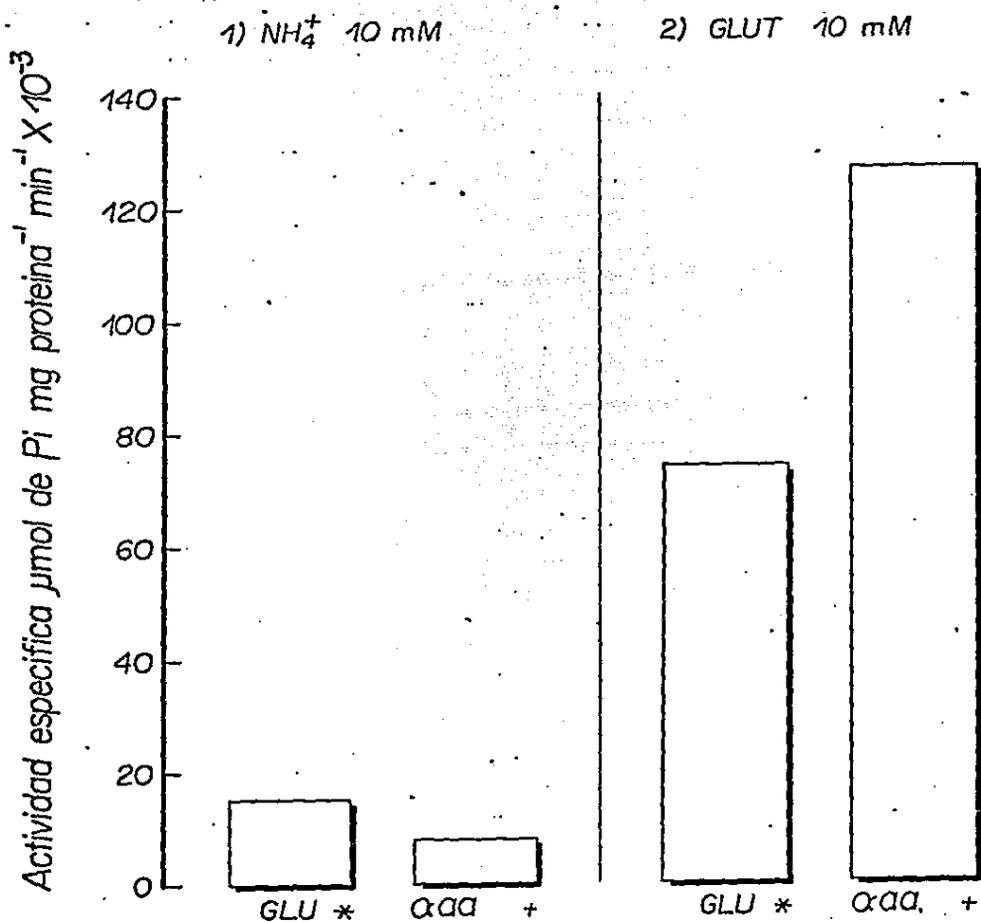


FIGURA 13. Actividad enzimática de la  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa (\*) y de la  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína sintetasa) (+), empleando como fuente de enzima, un extracto libre de células de *P. chrysogenum* de 36 Hs. de cultivo en medio de células en reposo, suplementado con NH<sub>4</sub>CL 10 mM (control) y Glutamato 10 mM.

glutamato muestra una actividad específica mayor que los respectivos controles, (5 veces más cuando el sustrato es glutámico, y 15 veces más con  $\alpha$ -aminoadipato).

Esto pone de manifiesto que el efecto inductor de glutamato, tiene lugar en esta primera enzima que ejerce ambas funciones:  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetasa y  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína-sintetasa). En este caso, la actividad con  $\alpha$ -aminoadipato es 1.5 veces mayor que la alcanzada con glutamato como sustrato. En los controles sin inductor en cambio, nuestros resultados concuerdan con los reportados por Kaszab y Enfors, es decir, la actividad es mayor cuando se usa glutamato como sustrato; cuando se usa  $\alpha$ -aminoadipato, ésta viene a ser un 70% de aquella (nuestros resultados son de 60%).

Los resultados hasta aquí obtenidos parecen indicar no solo que la misma fracción proteica es capaz de catalizar ambas funciones:  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa y  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína sintetasa) sino que tanto la síntesis de penicilina como de glutati $\ddot{u}$ n responden a un efecto regulador común.

Consideramos pues interesante explorar los niveles de actividad enzimática a diferentes tiempos de una fermentación normal. Los ensayos de actividad se hicieron

como se describe en Materiales y Métodos.

- a) con glutamato y cisteína como sustratos
- b) con  $\alpha$ -aminoadipato y cisteína como sustratos.

Los resultados se muestran en la fig. 14. En ellos podemos observar que la actividad para ambos sustratos mantiene niveles de semejanza razonables, presentando en los dos casos un pico a las 48 horas y un aumento marcado a las 72 hs. Si se establece una comparación de tales niveles con la cinética de crecimiento, se observa que la actividad enzimática se hace más aparente en una fase tardía, misma que coincide con el inicio de síntesis de glutatión intracelular y de penicilina, Fig. 14A.

Todos estos hechos parecen reforzar nuestros planteamientos. Sin embargo, no podíamos explicar el que los niveles de glutatión extracelular se encontraran elevados al inicio de una fermentación normal, ya que los niveles de actividad enzimática detectados son bajos. Pensamos que podría tratarse de un artefacto o bien que el medio de cultivo tuviera glutatión. La primera suposición quedó descartada por la repetitividad de los resultados; la segunda, porque determinamos glutatión en el medio en el tiempo cero de fermentación, dándonos un valor nulo.

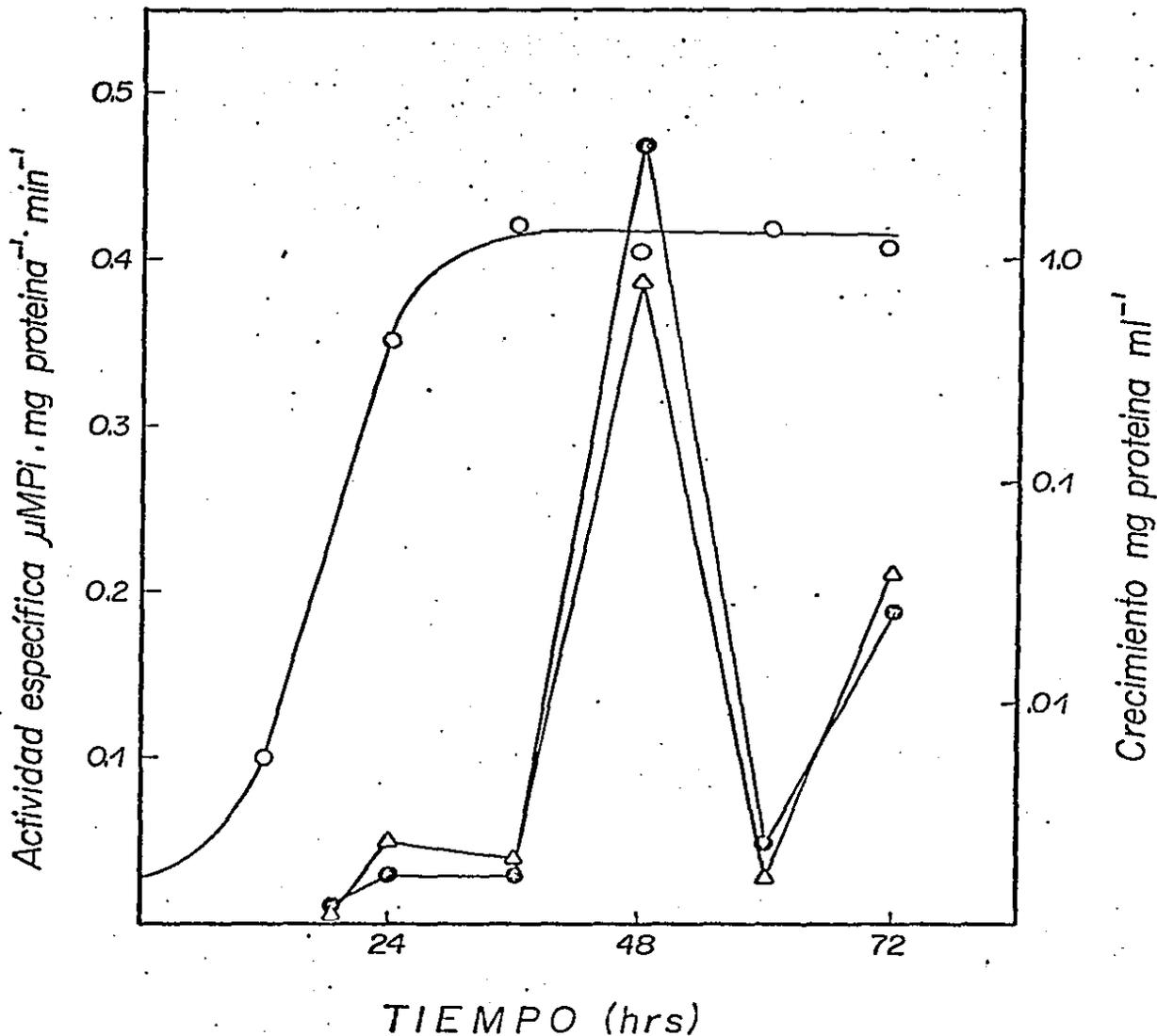


FIGURA 14.- Niveles de actividad de  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetasa ( $\Delta$ ) y  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína sintetasa) (o), a diferentes tiempos de una fermentación normal y su correlación con la cinética de crecimiento del microorganismo (o).

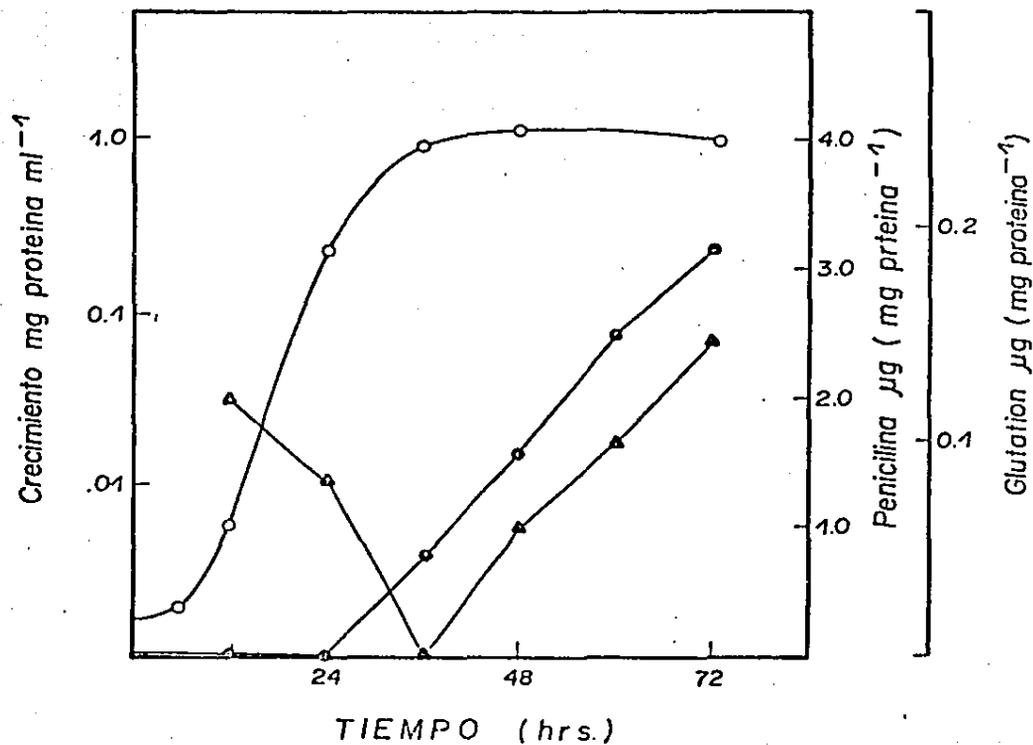


FIGURA 14A. Niveles de penicilina (●) y glutatión intracelular (▲) y su correlación con la cinética de crecimiento del microorganismo en una fermentación normal (○).

Basándonos en lo reportado por Demain y J.M. Piret (100) respecto a que algunos microorganismos esporulantes "almacenan" dentro de sus esporas aquellos metabolitos secundarios cuya producción los caracteriza, optamos por explorar los niveles de glutatión y de penicilina, dentro de las esporas. Con agradable sorpresa encontramos, para glutatión  $7.8 \mu\text{g (mg de proteína)}^{-1}$  y para penicilina  $2.5 \mu\text{g (mg de proteína)}^{-1}$ . Estos datos nos permitieron integrar los resultados presentados anteriormente acerca de los perfiles de glutatión extracelular e intracelular, en el curso de una fermentación normal, fig. 15.

Por otra parte, es bien conocido el hecho de que glutatión retrorregula su propia biosíntesis inhibiendo competitivamente la primera enzima de la vía (7). Se decidió por tanto probar si este tripéptido retrorregula también a la  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil cisteína sintetasa), primera enzima de la biosíntesis de penicilina, a fin de explorar si ambas actividades responden a un efecto regulador común. Para ello se usó como fuente de enzima un extracto libre de células de P. chrysogenum crecido durante 36 horas en medio de producción. La medición de actividad se hizo de acuerdo a lo expresado en Materiales y Métodos, con la variación de que el GSH se adicionó disuelto en buffer tris-ascorbato 0.05 M, para dar concentraciones

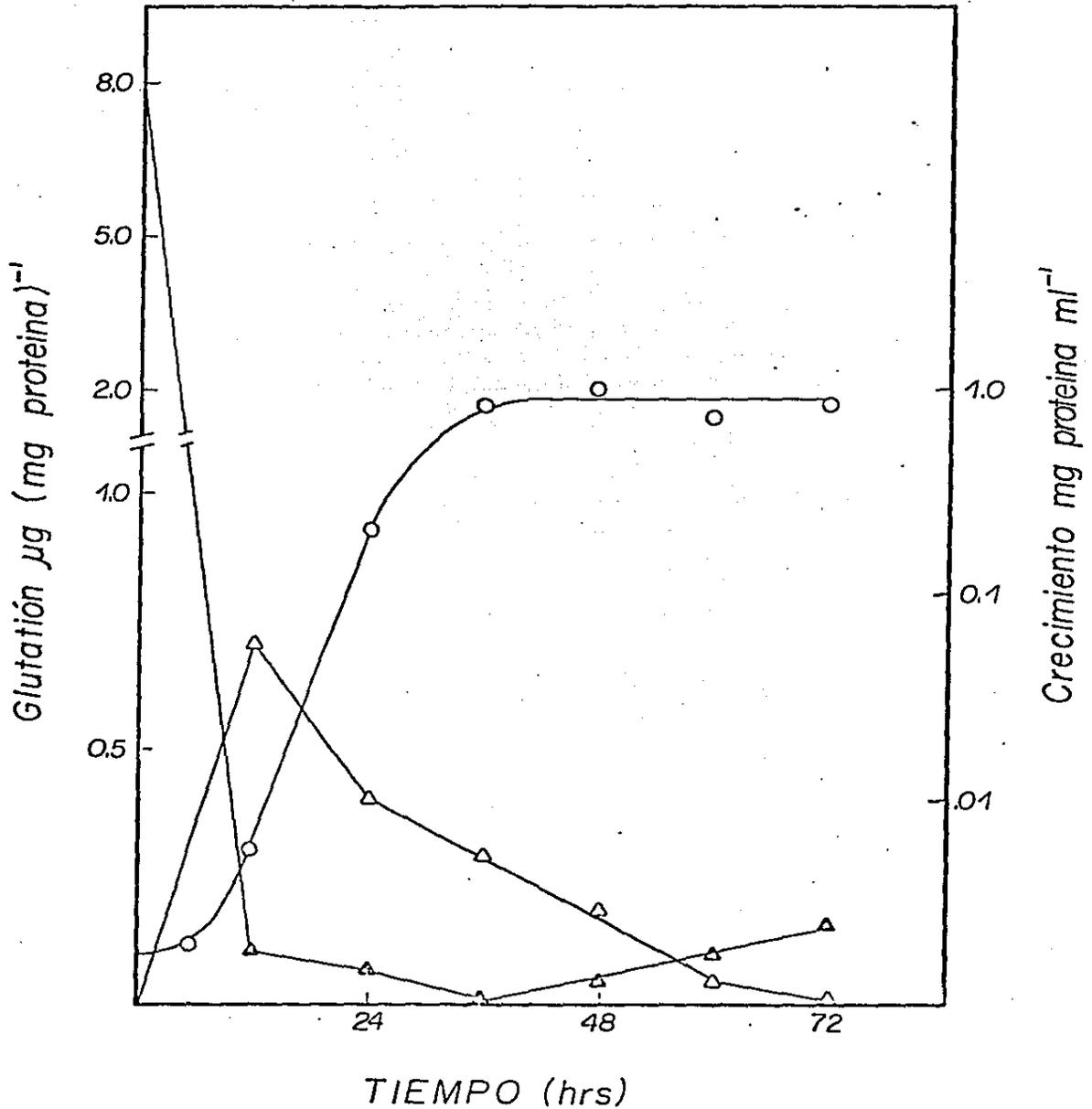


FIGURA 15. Correlación entre el crecimiento microbiano (o) y los perfiles de GSH extracelular ( $\Delta$ ) e intracelular ( $\Delta$ ) a diferentes tiempos de una fermentación normal. El GSH intracelular en el tiempo cero corresponde al encontrado dentro de las esporas: (7.8  $\mu\text{g/mg}$  de proteína).

finales de 1, 5 y 10 mM. Los resultados se muestran en la fig. 16, donde se puede ver que GSH 10 mM inhibe por completo la síntesis del dipéptido  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína).

Por otra parte, cuando se adiciona GSH a cultivos de P. crysogenum en sistemas de células en reposo suplementados con cicloheximida, se observa una disminución en la síntesis de penicilina, es decir, el efecto negativo ejercido por glutatión no solo se presenta in vitro sino también in vivo.

Resulta interesante mencionar que en 1972 Gordee y Day (142) reportaron que cuando se adiciona penicilina a cultivos de Penicillium, se observa una disminución en la síntesis del antibiótico. Tal efecto fue confirmado en 1979 por Martin y col. (143). Sin embargo no existe una caracterización bioquímica que defina claramente al fenómeno.

Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, algunos metabolitos secundarios están implicados en el control de fenómenos de germinación y/o esporulación; probablemente la presencia de glutatión y de penicilina que hemos observado dentro de las esporas tenga alguna

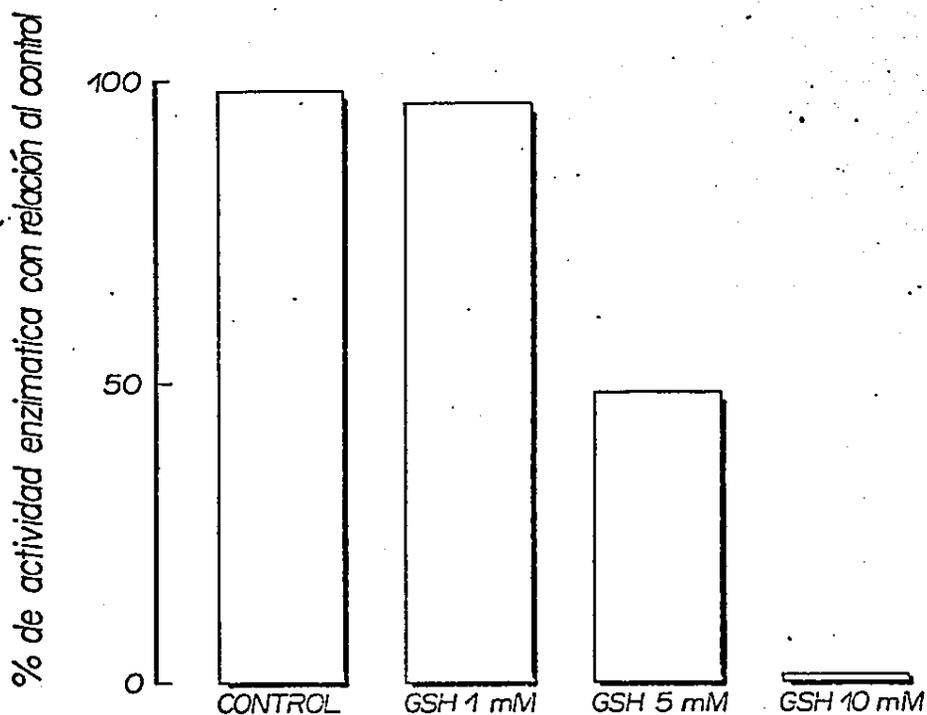


FIGURA 16. Inhibición de la actividad enzimática de la  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil-cisteína sintetasa) por GSH. Se empleó como fuente de enzima, extracto libre de células de *P. chrysogenum*, de 36 hs. de cultivo en medio de producción. El GSH se disolvió en amortiguador tris ascorbato 0.05M inmediatamente antes de probarlo como inhibidor.

significancia de este tipo. Se nos ocurre que penicilina y glutatión puedan sinergizar sus efectos para tales eventos, la una previniendo el antagonismo microbiano del entorno al que se vería expuesto Penicillium al germinar y el otro previniendo a las células contra mecanismos oxidantes o brindándoles protección contra efectos tóxicos y radiaciones.

Cabe mencionar también que Sánchez y col. (133) observaron que glutamina (1 mM) estimulaba la síntesis de penicilina en P. chrysogenum; sin embargo cuando ésta se adicionó en mayor concentración (1-10 mM) se presentó un efecto negativo. Recientemente Mateos, R.C. (144), propuso que tal inhibición se debe a que el tripéptido precursor de la penicilina se canaliza hacia el transporte de glutamina de manera análoga a como funciona el glutatión (Figs. 17 y 18) impidiendo su participación en los siguientes pasos de la biosíntesis de penicilina. Tal sugerencia quedó reforzada por los siguientes hechos:

- a) Cuando glutamina se sustituyó por otro tipo de aminoácidos (neutros) también tuvo lugar una disminución notable en la síntesis de penicilina.
- b) Este efecto se previno preincubando el sistema con glutatión

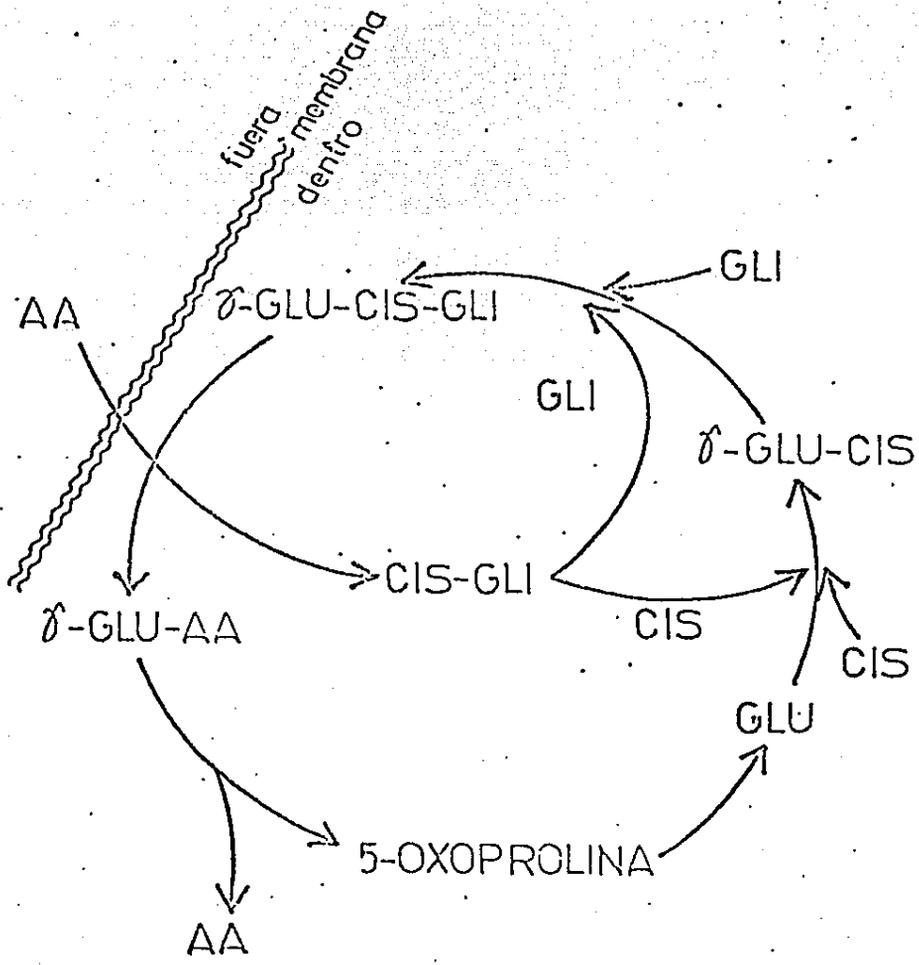


FIGURA 17. Ciclo del  $\delta$ -glutamilo y el transporte de aminoácidos (Meiter y Tate 1).

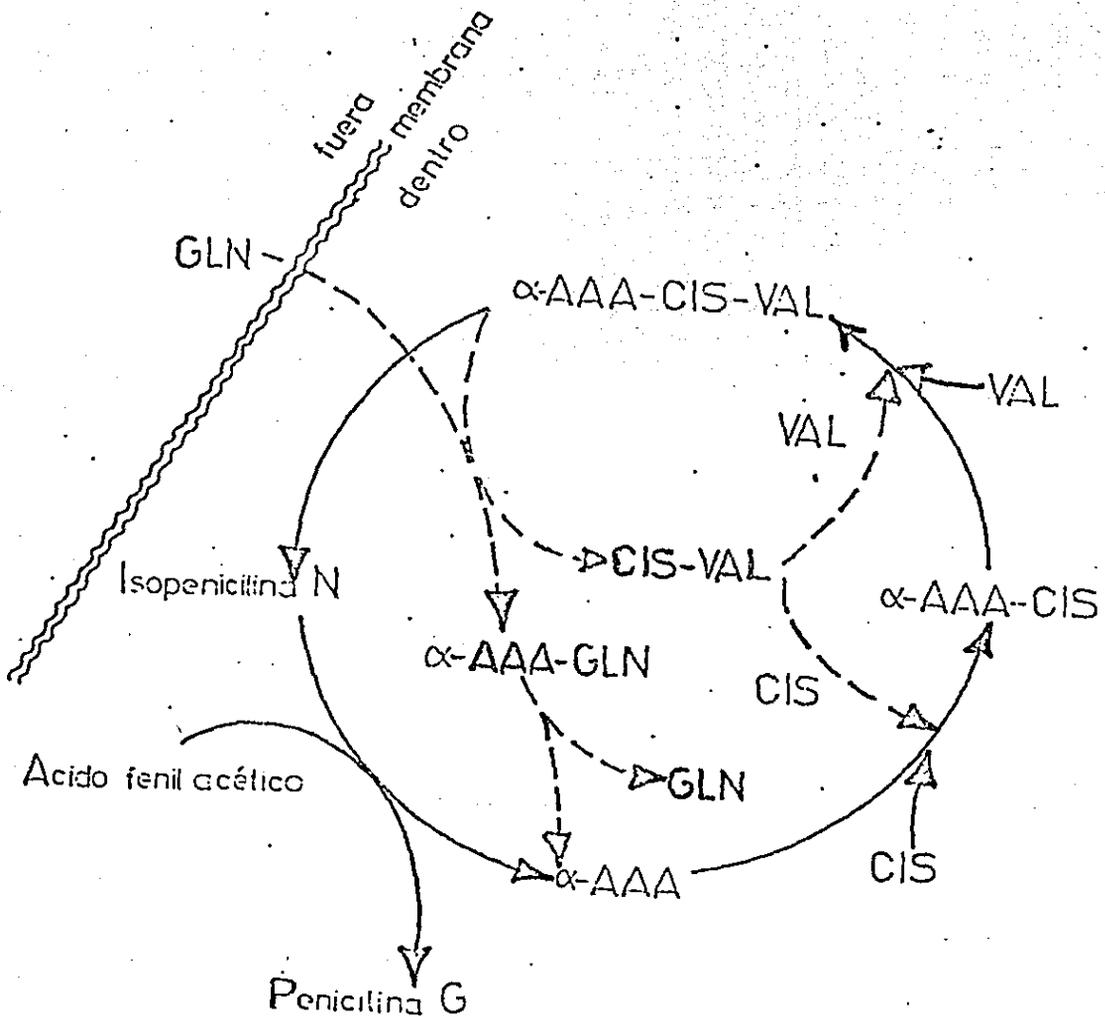


FIGURA 18. Mecanismo propuesto para el transporte de glutamina o aminoácidos neutros, involucrando al tripéptido precursor de la síntesis de penicilina (Mateos, 144).

- c) El transporte de glutamina  $C^{14}$  fue mayor al interior de la célula, en el sistema preincubado con glutatión.

Todos estos hechos parecen evidenciar, cada vez con más fuerza que entre el glutatión y el tripéptido precursor de la penicilina existen analogías no solo de tipo estructural y regulatorio, sino también funcional.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

La síntesis de novo del glutati6n se presenta a partir de las 36 horas, en una fermentaci6n normal tiempo que coincide con la transici6n trofofase-idiofase. Al explorar las pozas de los amino6cidos precursores de GSH, se observa que glutamato se encuentra considerablemente elevado desde las 36 horas, an6logamente a lo reportado para penicilina.

Se observ6 un aumento en los niveles de glutati6n en sistemas de c6lulas en reposo suplementados con glutamato, efecto que se presenta tambi6n cuando se usa alg6n an6logo no metabolizable de glut6mico y que se previene con cicloheximida, lo cual sugiere un probable efecto inductor.

La primera enzima involucrada en la s6ntesis de glutati6n, funciona tambi6n con los sustratos propios del primer paso biosint6tico de penicilina, de acuerdo a lo postulado por Kaszab y Enfors. Ambas actividades presentan un m6ximo considerable a las 36 horas, tiempo que coincide con el inicio de la s6ntesis de GSH y de penicilina.

El GSH inhibe la actividad de  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetasa y de  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoacidipil-cisteína sintetasa), lo cual sugiere que ambas actividades responden a un efecto regulador común.

Por último, la presencia de penicilina como de GSH dentro de las esporas, sugiere que ambos metabolitos pudieran jugar un papel relevante en la regulación de los fenómenos de esporulación y/o germinación.

Los hallazgos respecto a las similitudes en la regulación biosintética o en algunas funciones entre GSH y penicilina constituyen, a mi juicio, una contribución interésante del presente trabajo. Quiero creer en la posibilidad de que puedan motivar el interés por un estudio más profundo de estos eventos. Así mismo puede hacer eco, de alguna manera a la "invitación" que hace Záhner para estudiar a los metabolitos secundarios desde puntos de vista diferentes a los hasta ahora contemplados.

## BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Meister, A. and Tate S. (1976); Ann. Rev. of Biochem. 45: 559-699.
2. Meister, A. Trends in Biochem. Sci. September 1981 231-34.
3. Hopkins, F.G., (1921); Biochem. J. 15: 285-305.
4. Ibid (1929); J. Biol. chem. 84: 269-320.
5. Kendall, E.D., McKenzie, B.F., Mason, H.L. (1929); J. Biol. chem. 74: 657-74.
6. Harrington, C.R.; Mead, T.H. (1935); Biochem. j. 29: 1602-1611.
7. Richman, P.G.; Meister A. (1975); J. Biol. chem. 250: (4) 1422-26.
8. Dethmers, P.G.; Meister A. (1981); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7392-96.
9. Jensen, G.; Meister A. (1982) Fed. Proc. 41: 1168 (Abstr.).
10. Meister, A. (1981) Curr. Top. Cell. Regul. 18: 21-57
11. Griffith, O.W., Bridges, R.J.; Meister, A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5405-5408.
12. Schulman, J.D.; Goodman, S.I.; Mace, J.W.; Tietze, F. and Tate, S.S. (1979) FEBS Lett. 107: 436-440.
13. Sies, H.; Wendel, A.; Eds (1978) Functions of Glutathione in Liver and kidney Proc. Life. Sci. p. 43-59.

14. Griffith, O.W.; Meister, A. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5606-5610.
15. Ibid 76: 268-72.
16. Anderson, M.E.; and Meister, A. (1980) J. Biol. chem. 255: 9530-9533.
17. Haberle, D., Wahllander, A.; Sies, H. (1979) FEBS Lett. 108: 335-40.
18. Bannai, S.; Tsukedo, H. (1979) J. Biol. chem. 254 (9): 3444-3450.
19. Rouzer, C.A.; Scott, W.A.; Griffith, O.; Cohn, Z.A.; (1982) J. Biol. chem. 257: 2002-2008.
20. Bartoli, G.M.; Sies, H. (1978); FEBS lett. 86: 89-91.
21. Anderson, M.E.; Bridges, R.J.; Meister, A. (1980); Biochem. Biophys. Res. Comm. 96: 848-853.
22. Abbott, W.A.; Meiter, A. (1982); Fed. Proc. 41: 1430.
23. Meister, A.; Anderson, M.E. (1983); Ann. Rev. Biochem. 52: 711-760.
24. Sies, H.; Wahllander, A.; Waydhas, C. Soboll, S.; Haberle, D. (1980); Adv. Enzyme. Regul. 18: 303-320.
25. Akerboom, T.P.M.; Bilzer, M.; Sies, H. (1982); FEBS Lett. 140: 73-76.
26. Eberle, D.; Clarke, R. Kaplowitz, N. (1981); J. Biol. chem. 256: 2115-2117.
27. Tietze, F. (1969); Anal. Biochem. 27: 502-522.
28. Griffith, O.W.; Novogrodsky, A.; Meister, A. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2249-2252.

29. Sies, H.; Gerstenecker, C.; Summer, K.H.; Menzel, H.; Flohe, L. (1972); FBS Lett 27: 171-175.
30. Beutler, E. Functions of Glutathione (Nobel Conf.); Larsson, A.; Orrenius, S.; and Mannennik, B. Eds. Raven N.Y. 1983. p.p. 65-74.
31. Akerboom, T.P.; Bilzer, M.; Sies H. (1982); J. Biol. chem. 257: 4248-4252.
32. McIntyre, T.M.; Curthoys, N.P. (1979); J. Biol. chem. 254: 6499-6504.
33. Allison, R.D.; Meister, A. (1981); J. Biol. chem. 256: 2988-2992.
34. Tate, S.S.; Meister, A. (1978); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4806-4809.
35. Ormstad, K. Lastbom, T.; Orrenius, S. (1980) FEBS Lett. 112: 55-59.
36. Griffith, O.W.; Bridges, R.J.; Meister, A. (1979); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6319-6322.
37. Anderson, M.E. Meister, A. (1983); Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 701-711.
38. Griffith, O.W.; Meister, A. (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3384-3387.
39. Thompson, G.A.; Meister, A. (1975); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1985-88.
40. Ibid (1976); Biochem. Biophys. Res. Com. 71: 32-36.
41. Ibid (1977); J. Biol. chem. 252: 6792-6797.
42. Cornell, J.S.; Meister, A. (1976); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 420-422.
43. Puente, J.; Castellón, E.; Spaghager, M. (1982). Experientia 38: 531-532.

44. Vina, J.; Vina, J.R.; Functions of Glutathione (Novel Conf.) Larsson, Orrenius and Mannennik Eds. 1983 Raven, N.Y. p.p. 23-30.
45. Bridges, R.J.; Griffith, O.W.; Meister, A. (1980). J. Biol. chem. 255: 787-92.
46. Tate, S.S.; Grau, E.M.; Meister, A. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 2715-2719.
47. Griffith, O.W.; Tate, S.S.; (1980) J. Biol. chem. 255: 5011-5014.
48. Ormstad, K.; Lastboom, T.; Orrenius, S. (1981) FEBS Lett. 130: 239-243.
49. Ashkar, S.; Binkley, F.; Jones, D.P. (1981); FEBS Lett. 130: 239-243.
50. Racker, E. (1955); J. Biol. chem. 217: 867-74.
51. Nagai, S.; Black, S. (1968); J. Biol. chem. 243: 1942-1947.
52. Mannervik, B.- Erickson, S.A.; (1973); Glutathione Proc. 16th. Conf. German Soc. Biol. chem. Tubingen p.p. 120-132.
53. Thelander, L.; Richard, P. (1979); Ann. Rev. Biochem. 48: 133-158.
54. Holmgren, A. (1981); Trends. Biochem. Sci. 6: 26-29.
55. Hammarsten, E.; Reichard, P.; Saluste, E. (1950); J. Biol. chem. 183: 105-109.
56. Holmgren, A. (1981); Curr. Top. Cell. Regul. 19: 47-76.
57. Hoog, J.O.; Holmgren, A.; D'Silva, C. (1982), FEBS Lett. 138: 59-61.
58. Flohe, L.; Gunzler, W.A., (1973); Glutathione Proc. 16th Conf. German Soc. Biol. chem. Tubingen p.p. 51-64.

59. Carlberg, I., Mannervick, B. (1977); Biochem. Biophys. Acta 484: 268-74.
60. Boyland, E.; Chasseaud, L.F. (1969); Adv. Enzymol. 23: 173-219.
61. Chasseaud, L.F. (1979); Adv. Canc. Res. 29: 175-274.
62. Jakoby, W.B.; 1981. Methods Enzymol. 77: 1-476.
63. Reyes, H.; Levi, A.V.; Gatmaitan, Z. (1971); Clin. Invest. 50: 2242-2254.
64. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Fleischner, G.; Gaitman, Z. (1974); Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 3879-82.
65. Agrup G.; Agrup, P.; Anderson, T.; Flack, B. and Hansson, J.A. (1975); Acta derm. veneorol. 55: 337-41.
66. Douglas, K.I.; Nadvi, I.N.; (1979)- FEBS Lett 106: 393-396.
67. Ball, J.C.; Vander Jagt, D.L.; (1979); Anal. Biochem. 98: 472-77.
68. Uotila, L.; Koivusalo, M. (1980); Acta. Chem. Scand. 34: 63-68.
69. Seltzer, S. (1973); J. Biol. chem. 248: 215-222.
70. Seltzer, S., Lin, M. (1979) Am. chem. Soc. 101: 3091-3097.
71. Duchesne, M.J.; Thaler-Dao, H.; de Paulet, A.C.; (1978). Prostaglandins 15: 19-41.
72. Guzmán-Barron, E.S. (1951); Adv. Enzymol. 11: 201-266.
73. Alexander, P., Charlesby, A. In Radiobiology Symp. Liege 1954. Z.M. Bocq and P. Alexander Eds. Butterworth. London 1955.

74. Meister, A.; Griffith, O.W. (1979) *Cancer Terat. Resp.* 63: 1115-1121.
75. Novi, A.M. (1981); *Science* 212: 541-542.
76. Lam, L.K.T.; Sparnins, V.L.; Wattenberg L.W.; (1982); *Cancer Res.* 42: 1193-1198.
77. Sparnins, V.L.; Chuan, J.; Wattenberg, L.W. (1982) *Cancer Res.* 42: 1205-1207.
78. Jewell, J.A.; Bellomo, G.; Thor, H.; Orrenius, S. (1982); *Science* 217: 1257-79.
79. Apontoweil, P.; Berends, W. (1975); *Biochem. Biophys. Acta* 299: 10-22.
80. *Ibid* (1975); *Mol. Gen. Genet.* 141: 91-94.
81. Fuchs, J.A.; Warner, H.R. (1975) *J. Bacteriol.* 124: 140-148.
82. Davis, N.K.; Geer, S.; Jones-Martimer, M.C.; (1982) *J. Gen. Microbiol.* 128: 1631-34.
83. Mooz, E.D. (1979); *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 1221-1228.
84. H. Zähner (1979); *Folia microbiol.* 24: 435-443.
85. Demain, A.L. (1984); *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 235: 601-612.
86. Haavik, H.I. (1974); 81: 383-390.
87. Pirt, S.J.; Righelato, R.C.; (1967); *Appl. Microbiol.* 15: 1284-1290.
88. Drew, S.W.; and Demain, A.L. (1977); *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 342-356.
89. Liu, C.M.; McDaniel, L.E.; and Schaffner, C.P. (1975) *Antimicrob. Agents. Chemoter* 7: 196-202.

90. Martin, J.F.; and Demain A.L. (1980); Microbiol. Rev. 44: 230-251.
91. Gallo, M. and Katz, E. (1972). J. Bacteriol. 109: 659-667.
92. Grootwassink, J.W.; and Gaucher (1980); J. Bacteriol. 141: 443-455.
93. Ajaronowitz, Y. and Demain, A.L. (in press).
94. Demain, A.L., and Kennel, Y.M. (1978); J. Ferment. Technol. 56: 323-328.
95. Kern, B.A.; Hendlim, D. and Inamine E. (1980) Antimicrob. Agents. Chemoter. 17: 679-685.
96. Sakar, N.H.; Paulus, (1972); Nature New Biol. 239: 228-230.
97. Mach, B.; Tatum, E.L. (1946). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52: 876-884.
98. Hodgson, B. (1970); J. Theoret. Biol. 30: 111-119.
99. Schaeffer, P. (1969); Bacteriol. Rev. 33: 48-71.
100. Demain, A.L.; Piret, J.M.: Microbiology. American Soc. for Microbiology. David Schlessinger Ed. Washington, D.C. 1981. p.p. 363-365.
101. Ristow, H.B.; et al. (1975). Biochim. Bioph. Acta 63: 1085-1092.
102. Anke, H.; (1977); J. Antibiotics 31: 125.
103. Kirby, R.; Wright, L. Hopwod. D. (1975); Nature 254: 265
104. Umezawa, H. (1977). Jap. J. antibiotics. 30: Suppl. S-138.

105. Barza, M. (1977) The Journal of Maine Med. Assoc. 67: 377-386.
106. Ghysen, J.M. (1977). J. Gen. Microb. 101: 13-33.
107. Bonner, D. (1947) Arch. Biochem. 13: 1-9.
108. Demain, A.L. (1957) Arch. Biochem. Biophys. 67 244-245.
109. Masurekar, P.S. and Demain, A.L. (1974). Appl. Microbiol. 28: 265-270.
110. Ibid. 1974 Antimicrob. Agents chemoter. 6: 366-368.
111. Somerson, N.L.; Demain, A.L. and Nunheimer (1961). Arch. Biochem. Biophys. 93: 238.
112. Goulden, S.A.; and Chattaway F.W. (1968). Biochem. J. 110: 55.
113. Lara, F.; Mateos, R.C.; Vázquez, L.G., and Sánchez S. (1982). Biochem. Biophys. Res. Commun. 105: 172-178.
114. Arnstein, H.R.; Morris, D.; and Toms, E.J. (1969) Biochem. Biophys. Acta 35: 561-562.
115. Warren, S.C.; Newton G.G.; Abraham, E.P. (1967) Biochem. J. 103: 891-91.
116. Queener, S.W. and Neuss, N. (1982) Chemistry and Biology of  $\beta$ -lactam Antibiotics Vol. 3, Cap. 1 Morinand Gorman Eds. Academic Press, Inc. N.Y. p.p. 1-81.
117. Fawcet, P.A.; Usher, J.J.; Huddleston, R.C.; Bleany, J.J. and Abraham E.P. (1976) Biochem. J. 157: 651-660.
118. Vandamme, Erik, J. (1977) Adv. Appl. Microbiol. 22: 17-21.
119. Adriaens, P.; Messchaert, W.; Wuyts, H. and Eyssen, H. (1975); Antim. Agents. and Chemoter 8: 638-642.

120. Abraham, E.P. Biosynthesis and enzymic hydrolysis of penicillins and cephalosporins. University of Tokyo Press, Tokyo, 1974.
121. Meesschaert, B.; Adriaens, P.; and Eysen, H. (1980); J. Antibiot. 33: 722-730.
122. Abraham, E.P. Antibiotics and other secondary metabolites. Academic Press. London. 1978 p.p. 141-164.
123. Flynn, E.H.; McCormick, M.H.; Stamper, M.C.; De Valeria, H. (1962); J. Am. chem. Soc. 81: 4594
124. Hopwood, D.A.; and Merrick, M.J. (1977); Bacteriol. Rev. 41 (3): 595-635.
125. Martin, J.F.; Luengo, J.M.; Revilla, G.; Villanueva, J. Antibiotics and other Secondary Metabolites. Biosynthesis and Production. Academic Press. London. (1978) p.p. 19-34.
126. Lemke, P.A.; and Nash, C. (1972); Can. J. Microbiol. 18: (255-259).
127. Loder, P.B.; and Abraham, E.P.; (1971); Biochem. J. 123: 471-476.
128. Ibid. (1971); Biochem. J. 123: 477-482.
129. Adriaens, P. Vanderhaeghe, B.; Meesschaert and Eysen (1975); Antimicrob. Agents. chemoter. 8: 15-17.
130. Arnstein, H.R. and Morris, D. (1960); Biochem. J. 76: 357-361.
131. Revilla, G.; Luengo, J.M.; Villanueva, J.R.; and Martin, J.F. Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis. Advances in Biotechnology. Vol. III. Vezina and Singh Eds. Pergamon Press. Toronto, Canada (1980) p.p. 155-160.

132. Hunter, D.R. and Segel, I.H. (1971); Arch. Biochem. Biophys. 144: 168-183.
133. Sánchez, S.; Paniagua, L.; Mateos, R.C.; Lara, F.; and Mora, J. (1980) Nitrogen regulation of Penicillin biosynthesis in *P. chrysogenum*, NRRL-1951. Advances in Biotechnology. Vol. III. Vezina and Singh. Eds. Pergamon Press. Toronto, Canada (1980) p.p. 147-154.
134. Arnstein, H.R.; Ann. Rept. Progr. chem. 54: 339.
135. Kaszab, I. and Enfors, S.D.; (1981); Abstracts of the Second European Congress of Biotechnology. Eastbourne. England. p.p. 179.
136. Jarvis, F.G.; and Johnson, M.J. (1947); Am. chem. Sci. 69: 3010-3017.
137. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; and Randall (1951); J. Biol. chem. 193: 265-275.
138. Liu, C.M.; Henmann, T. and Miller (1977); J. Antibiot 30: 244-251.
139. Anne, J. (1982); Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 41-46.
140. Orfanos, A.P.; Naylor, E.W.; and Guthrie, R. (1980); Anal. Biochem. 104: 70-74.
141. Taussky, H. and Shorr E. (1953); J. Biol. chem. 202: 675-685.
142. Gordee, E.Z.; Day, L.E. (1972); Antimicrob. Agents. Chemoter. 1: 315-322.
143. Martin, J.F.; Gill, J.A.; Naharro, P. L. and Villanueva J.R.; Industrial microorganisms tailor made by removal of regulatory mechanisms. Genetics of industrial microorganisms. Sebek, O.K., and Laskin, A.I., Eds. American Society for Microbiology; Washington, D.C. 1979. p.p. 205-209.
144. Mateos, R.C. Tesis para obtener el grado de Maestría en Investigación Biomédica Básica, IIBM, UNAM, 1983.