

1.º
62

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTADO DE GUERRERO
MEXICO

**EFFECTO DE LA NITROFURANTOINA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS SACCHAROMY-
CES CEREVISIAE CEPA: D-311-3(A)₁₀⁺ Y SU MU-
TANTE ₁₀⁻.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

JERONIMO BENJAMIN FERRUSQUIA VILAFRANCA

MEXICO, D. F.

1974



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.

I N D I C E .

	Pág.
I.- I N T R O D U C C I O N	1
1.- Aspectos químicos de los nitrofuranos ..	1
2.- El nitrofurano como bacteriostático y bactericida.....	3
3.- Papel de la nitrofurantoina sobre la <u>glut</u> <u>tación reductasa</u>	6
4.- Localización y propiedades de la <u>gluta</u> <u>tación reductasa</u>	6
5.- Papel fisiológico del <u>glutación</u>	8
6.- Breve explicación acerca de la mutante <u>ro⁻</u>	12
II.- O B J E T I V O	13
III.- MATERIAL Y METODOS.....	13
1.- Material	13
M E T O D O S	14
1.- Cepas y condiciones de cultivo.....	14
2.- Aislamiento de mutantes	15
3.- Curva de crecimiento.....	16
4.- Espectro de absorbancia de la <u>nitrofur</u> <u>antoina</u>	16
5.- Experimentos de absorción de nitrofurantoina por las levaduras <u>S.cerevisiae</u> D-311-3(A) <u>ro⁺</u> y <u>ro⁻</u>	17
6.- Semipurificación de la <u>glutación reducta</u> <u>sa de S.cerevisiae</u> D-311-3(A) <u>ro⁺</u> y <u>ro⁻</u> ..	18
7.- Medición de la actividad de la <u>glutación</u> <u>reductasa</u>	19
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	21
1.- Sobrevivencia de las bacterias a la <u>nitro</u> <u>furantoina</u>	21

	Pag.
2.- Sobrevivencia de las levaduras a la <u>ni</u> trofurantoina.....	22
3.- Permeabilidad de las membranas celula- res a la nitrofurantoina.....	25
4.- Actividad de la glutatión reductasa en presencia de la nitrofurantoina.....	26
V.- RESUMEN	29
VI.- BIBLIOGRAFIA	31

A B R E V I A T U R A S .

5-NF	Derivado 5 nitrofurano
GSSG reductasa	Enzima glutati3n reductasa
E 1	Enzima 1
E 2	Enzima 2
G6-P	Glucosa 6 fosfato
NADP ⁺ (TPH ⁺)	Fosfato de nicotinamida adenin dinucle3tido oxidado
NADPH (TFNH)	Fosfato de nicotinamida adenin dinucle3tido reducido
FAD	Flav3n adenin dinucle3tido oxidado
FADH	Flav3n adenin dinucle3tido reducido
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado.
CoA SSG	Coenzima A-SS- Glutati3n.
SH	Grupos Sulfidrilo
EDTA	Acido etilen diamino tetra ac3tico
YPD	Yeast extract, Peptona, Dextrosa
M	Molar
ml.	Mililitro
μ l.	Micro litro
n m (m μ)	Nanometro 6 milimicra
D.O.	Densidad 3ptica
U.K.	Unidades Klett
Tris	Tri-hidroxi-metil, amino-metano
R.P.M.	Revoluciones por minuto
U. I.	Unidad Internacional

I N T R O D U C C I O N

I.- Aspectos químicos de los Nitrofuranos.

Desde hace algún tiempo se han venido usando con éxito, los derivados del 5 nitrofurano (5-NF) como agentes bacteriostáticos. Los primeros reportes de este empleo datan de 1944; Dodd y Stillman (1), encontraron que los derivados del 5-NF son drogas bacteriostáticas uno ó dos órdenes de magnitud más activas que los furfurales no nitrados.

También en 1944, durante la II Guerra Mundial (Normandía), Dann y Moller (2) y por otro lado Sander (3) anunciaron el empleo del nitrofurfural como agente valioso en el tratamiento de las infecciones debidas a bacterias. Desde entonces muchos otros derivados de los 5-NF han sido empleados como agentes terapéuticos.

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud, tiene incluida en su lista 19 substancias, de las cuales sólo se recomiendan 8, aunque sus nombres cortos propuestos no estén legalmente protegidos. Para designar estos compuestos se emplean los siguientes prefijos: Fur, -Furani, Nifur y Nitrofur.

Todos estos compuestos contienen el residuo nitrofurano y se les designa como 5-NF.

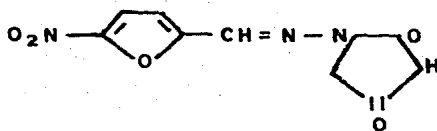
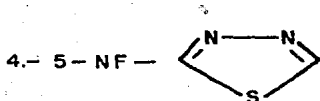
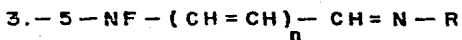
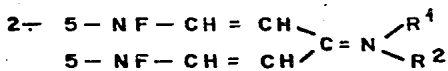
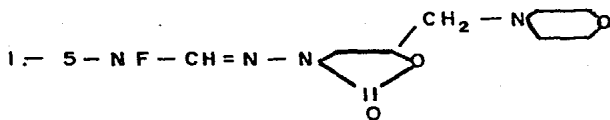
Muir y Reckendorf (4) los clasificaron en cuatro tipos de acuerdo a su estructura:

- 1 Ozometina: Incluye a las 5 nitrofurfural semicarbazona (nitrofural); tales como el 1-5 nitro-2-furfuril de amino imidazolidiona-(nitrofurantoina)
- 2 Compuestos con Di-nitrofurfural.

3 Compuestos Vinilo.

4 Compuestos 5-nitrofuril-heterocíclicos.

A continuación se dan las estructuras de cada uno
de los cuatro tipos en general.



FURADANTINA P. M. 238.16

(N-5-Nitro-2 Furfurylideno-1 amino hidantoina)

La nomenclatura de estos compuestos se complica - con el empleo de diferentes nombres comerciales para una - misma preparación.

Por ejemplo: para el nitrofurfural se designa como nifusina, furasina, nitrofurazona, nitrofurantoina, nifurantina, furadantina, etc.

2.- El nitrofurano como bacteriostático y bactericida.

El efecto de los 5 derivados del 5-NF sobre el crecimiento bacteriano ha sido probado ampliamente por Dodd (5) quien fué el primero en probar que los furfurales nitrados en la posición 5 son dos veces más efectivos que los derivados no nitrados, mientras que los furfurales con grupo nitro en posición 3 ó 4 no son efectivos (6). Si se reemplaza el anillo furano por un fenol ó tiofeno, los compuestos resultantes son menos efectivos o no tienen efecto.

Cramer y Dodd (7) encontraron que el nitrofurfural actúa solamente durante la interfase del ciclo de vida bacteriano.

Schoog (8) encontró que en E.coli y en una cepa de estafilococo la nitrofurantoina a altas concentraciones - prolonga la interfase; mientras que a menores concentraciones afecta la fase de división. Por lo cual a bajas concentraciones actúa como bacteriostático; y a altas concentraciones actúa como bactericida.

Acorde al efecto bactericida O'Connor et al (9) reportaron que derivados nuevos del 5-nitrofurfural producen ro

tura de la pared celular y salida del citoplasma.

Lerian V. y Popoola B. (10) encontraron que determinadas concentraciones de nitrofurantoina causan cambios morfológicos en los bacilos Gram negativos (E.coli) 1-3. Dicha clasificación de las cepas anteriores corresponde al Catálogo de la Norwich Pharmacal. Co.

Y también encontraron las concentraciones inhibitorias mínimas, dichos cambios consisten en elongaciones y formación de muchos glóbulos en los bacilos.

A continuación se dan las concentraciones inhibitorias y bactericidas.

Organismo:	Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml.}$)	Concentración mínima bactericida ($\mu\text{g/ml.}$)	Relación CMI/CMB
<u>E.coli</u> 1	12.50	3.12	1/4
<u>E.coli</u> 2	6.25	1.5	1/4
<u>E.coli</u> 3	6.25	0.75	1/8
<u>E.aerogenes</u>	25.00	6.25	1/4
<u>Klebsiella</u> 1	12.50	1.5	1/8
<u>Klebsiella</u> 2	6.25	0.75	1/8
<u>Salmonella</u> Grupo D.	25.00	6.25	1/4

El efecto de los derivados del 5-NF sobre el metabolismo general de la célula, así como en particular sobre algunas reacciones enzimáticas ha sido estudiado por diversos autores.

La nitrofurantoina inhibe algunos de los siguientes pasos del ciclo de Krebs (11) (Fig.Num.1) Esquema del

ciclo de Krebs; en bacterias.

1) La Piruvato deshidrogenasa, que cataliza la formación de la Acetil-CoA necesaria para la formación del citrato.

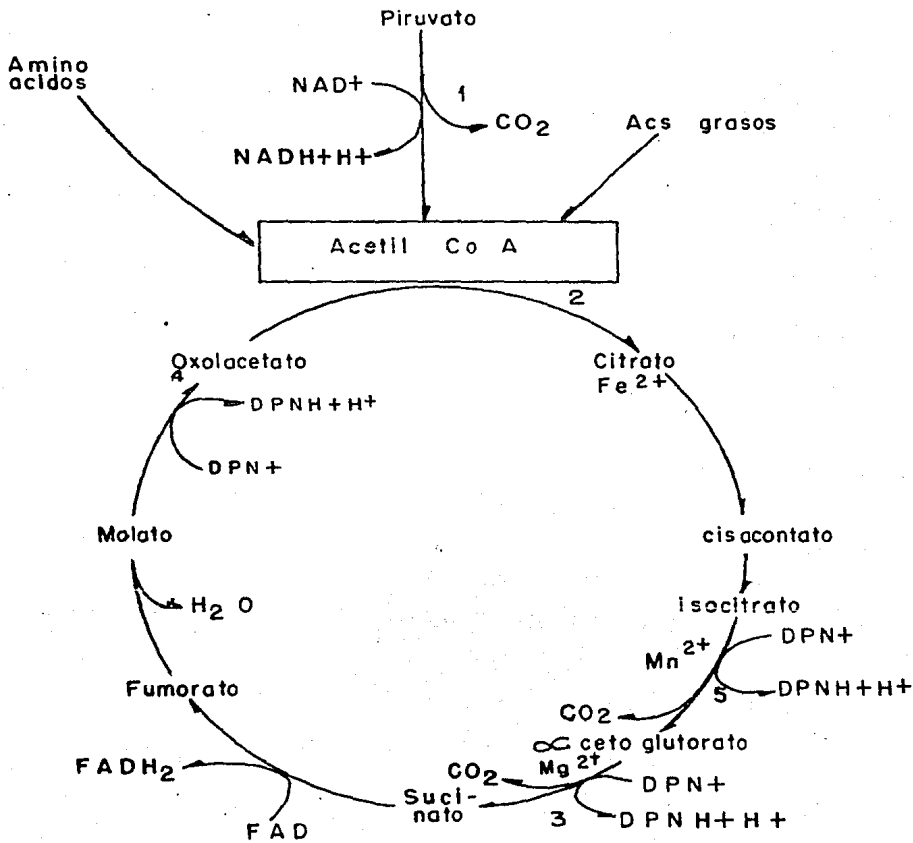
2) La Citrato sintetasa, como resultado de la inhibición en reacción 1); la formación de citrato a partir de la acetil-CoA y oxalacetato se inhibe por la falta de acetil-CoA.

3) La Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, que cataliza la formación de succinato por descarboxilación oxilativa - del alfa-cetoglutarato.

4) La Malato deshidrogenasa, que cataliza la forma --ción de oxalacetato a partir de malato.

5) La Isocitrato deshidrogenasa, que cataliza la formación de alfa-cetoglutarato a partir de isocitrato.

Fig. N° 1



3.- Papel de la nitrofurantoina sobre la glutatión reductasa.

Además del efecto inhibitorio sobre algunas reacciones parciales del Ciclo de Krebs, los derivados del 5-NF inhiben algunas enzimas que contienen grupos SH activos. Así Green et al (12) encontraron un efecto inhibitorio del nitrofural sobre la ureasa cristalina la cual fué inhibida 50 % después de 30 minutos; la adición de la cisteína reactiva parcialmente a la ureasa.

De especial interés para este trabajo es el papel inhibitorio de los nitrofuranos sobre la glutatión reductasa o GSSG reductasa. Dicha inhibición la revisaremos en detalle, en primer lugar diremos algunas palabras sobre la enzima, sus características y ciertos detalles sobre la reacción que cataliza; después anotaremos el papel del glutatión en la fisiología celular y fundamentalmente la acción de los nitrofuranos sobre la glutatión reductasa y las consecuencias que se observan al llevarse a cabo tal inhibición.

4.- Localización y propiedades de la glutatión reductasa.

Esta enzima reductora de disulfuros; ha sido previamente purificada en levaduras (13), como una flovoproteína dependiente de NADPH en presencia del cual se encuentra completamente reducida.

El NADP^+ formado; se combina con la enzima dando un complejo de transferencia de carga en el FADH de la en-

zima y el NADP⁺

Su mecanismo de reacción es típico; ya que al interaccionar con una molécula de sustrato, se modifica antes de reaccionar con una segunda molécula de sustrato; que la -- transformará a su forma original.

Sus características:

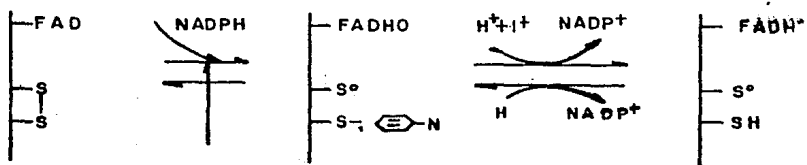
- 1.- P.M. 116,000
- 2.- Km. GSSG 5.5×10^{-5} M
- 3.- Km. NADPH $3,8 \times 10^{-6}$ M
- 4.- pH óptimo 7.1
- 5.- P.I. 5.9
- 6.- Coeficiente de extensión molecular a 280 nm = 15.4

Se forma por dos cadenas polipeptídicas iguales ligadas por puentes monovalentes. El grupo prostético FAD se separa por diálisis o electroforesis lo que indica una unión no covalente con la cisteína.

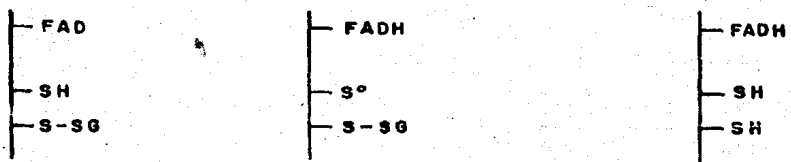
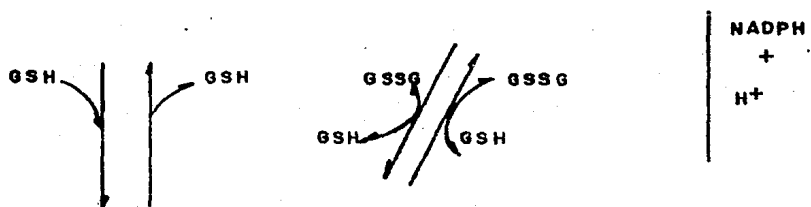
La molécula nativa posee por cada FAD un sólo SH, que expuesto por NADPH es activo.

En la fig. 2 se presenta un esquema del mecanismo de acción de la glutatión reductasa propuesto por Massey (14) en levadura.

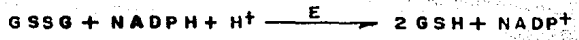
Figura Núm. 2



INHIBICION POR
DERIVADOS DEL S-N F



Ec. general

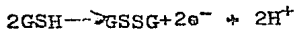


Se ha demostrado la presencia de la enzima en la mayoría de los tejidos de los mamíferos, catalizando la misma reacción que se ha esquematizado en la fig. 2

De particular interés es su papel en el funcionamiento del eritrocito.

5.- Papel fisiológico del glutatión.

El glutatión (GSH) (15), se encuentra en bacterias, plantas y en tejidos animales; como componente característico de todas las células vivas, detectándose en una concentración de 100 a 200 mg/100 grs. de tejido; en forma de GSH la cual es interconvertible con la forma oxidada (GSSG):



Es esencial para proteger los grupos tioles en las proteínas.

En algunas células protege contra la acción tóxica de metales, H_2O_2 (a través de la acción de la GSSG peroxidasa) y otras sustancias extrañas (15).

El GSH ayuda a mantener la integridad de los eritrocitos, pero si se acumula GSSG, éstos se hemolizan (16).

También el GSH interviene como sustrato o coenzima de algunas enzimas las cuales al no haber el GSH disminuyen o pierden su actividad, ya que dicho sustrato se encuentra en forma oxidada (GSSG).

Citaremos algunas enzimas que utilizan glutatión, su fuente de obtención y la reacción catalizada.

GSH peroxidasa	eritrocitos	oxidación del GSH por H ₂ O ₂
GSH transhidrogenasa	hígado y riñón de rata y buey	reduce S-S por GSH e insulina, homocistina y CoASSG

El GSH también ocupa un papel muy importante en algunos procesos orgánicos de desintoxicación; donde el GSH se conjuga con el compuesto extraño y dicho complejo es el primer paso en la síntesis de ácidos mercaptúricos (15), que es la manera como el organismo elimina dichos compuestos extraños.

Mencionaremos algunas de estas enzimas, su fuente de obtención y la reacción catalizada:

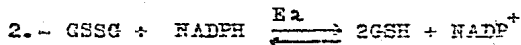
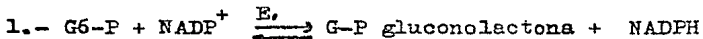
GSH-S-aril transferasa	hígado de muchas especies	reemplaza grupos nitró y aril halógenos por GSH.
GSH-S-epoxi transferasa	riñón e hígado - de algunas especies	reemplaza algunos alquil halógenos y posibles grupos nitró por GSH
GSH-S- aral quil trans-ferasa	en hígado y riñón de rata.	reemplazamiento de - grupos lábiles aral quil halógenos y posibles ésteres por GSH

Si el GSH se encuentra en forma oxidada fallan o se bloquean estos mecanismos de reacción.

La nitrofurantoina induce la hemólisis intravascular en individuos sensibles a la primaquina; y si son incu

bados sus eritrocitos con nitrofurantoina, baja marcadamente la concentración del glutati6n reducido (GSH).

Adem6s dichos individuos son deficientes en enzima glucosa 6-fosfato (G6-P) deshidrogenasa (E 1); lo que sugiere un efecto sobre esta enzima y la glutati6n reductasa (E 2)



Las nitrofurantoina activadas cl6nicamente en el plasma; afectan la GSSG reductasa de los eritrocitos, pero no a la G-6P deshidrogenasa.

La inhibici6n de la GSSG reductasa se observa en las reacciones acopladas 1.- y 2.- tambi6n si agregamos 6-P gluconolactona substituy6ndola por la Glucosa 6-P como donador de electrones; lo cual demuestra que la inhibici6n por nitrofurantoina solo ocurre en la GSSG reductasa oxidada como se observa por la reducci6n de la nitrofurantoina; la cual se acompa6a por la p6rdida de la absorpci6n m6xima de dicho compuesto (17).

En hemolizados de rata se observ6 que la nitrofurantoina inhibe la utilizaci6n de NADPH y la formaci6n de GSH; comprob6ndose que la estequiometria de la reacci6n es - - - NADPH:GSH.

Lo que confirma de una manera directa y de manera exclusiva la inhibici6n de la GSSG reductasa por la nitrofurantoina.

Dicha inhibici6n es proporcional a la concentraci6n de nitrofurantoina, en relaci6n a la GSSG reductasa - - - -

oxidada.

También se encuentra inhibición en hemolizados de eritrocitos de ratones, conejos, perros, pollos, cuyos y monos.

En rata además se inhibió la enzima en los siguientes tejidos (17).

En tejido sanguíneo, hígado, riñón, corazón, cerebro, pulmón, testículo y músculo esquelético. En dichos tejidos la concentración inhibitoria de nitrofurantoina fué de $10^{-5}M$ (2.5 mg./Lt.) (17).

La inhibición en eritrocitos es reversible por diálisis, lo que prueba que no se enlaza firmemente a la enzima.

Buzard, Kopko y Paul (18), probaron la inhibición de varios derivados del 5-NF sobre la GSSG reductasa purificadas de E.coli e hígado; encontrando diferente sensibilidad de las dos preparaciones enzimáticas frente a los diferentes derivados probados. Así como otros compuestos nitro y concluyeron que la sensibilidad al inhibidor está en relación directa con la labilidad del grupo nitro. Además sugirieron la posibilidad de que el efecto bacteriostático de estos compuestos sea debida a la inhibición de la GSSG reductasa; lo que provocaría una acumulación de GSSG en la célula tal como sucedió en la hemólisis de los eritrocitos de individuos sensibles a la primaquina.

En resumen, los datos aportados por la bibliografía muestran que el efecto de los derivados del 5-NF sobre el -

crecimiento y división celular depende tanto del nitrofurano específico ensayado como de la especie utilizada. Asimismo la resistencia o sensibilidad a estos bacteriostáticos (bactericidas en algunos casos) no tiene una causa común en las diferentes especies y el único caso claro es el que de algunas cepas de E.coli: que muestran sensibilidad al antibiótico cuando son capaces de metabolizarlo (reducirlo) y son resistentes cuando son deficientes en el sistema enzimático capaz de transformar estos compuestos que resultan aparentemente fatales para las cepas sensibles (19).

La otra alternativa que es el hecho de que inhiben un gran número de reacciones del Ciclo de Krebs y a la GSSG reductasa; pudiendo de esta manera causar graves trastornos al metabolismo general de la célula, dejando una gran interrogante planteada, que es el hecho de que afectando vías metabólicas y reacciones enzimáticas comunes a todas las células aeróbicas no presentan el mismo efecto nocivo sobre las diferentes especies sometidas a prueba. A pesar de que el efecto inhibitorio es demostrable in vitro como un fenómeno común, con ligeras variaciones en el porcentaje de inhibición como es el caso de la GSSG reductasa y algunas enzimas flavínicas.

En este trabajo se utiliza la mutante denominada ro^- cuyo origen se reporta desde 1953 por Ephrusi y Slonimski reportaron una cepa de S. cerevisiae deficiente en la respiración. Por lo cual la llamaron ro^- a dicha mutante también llamada "Petit", le faltan muchas enzimas respirato --

rias así como la habilidad de fermentar substratos como el lactato y el glicerol.

Es espontánea, presentándose con un alta frecuencia aproximadamente del 1 % por generación. Dicha mutante se dá por un factor citoplásmico (ro⁻) debido a su DNA mitocondrial; lo que nos dá un fenotipo "Petit ro⁻".

Es deficiente en la respiración ya que le faltan los citocromos a y b y sólo tiene el citocromo c. Por lo tanto crece a expensas de glucólisis anaeróbica; ya que tanto el Ciclo de Krebs y la cadena respiratoria no le funcionan. Dicha mutación es irreversible(Sherman y Slonimski - 1964) (20).

II.- OBJETIVO.

El objetivo de la presente Tesis es el contribuir al esclarecimiento de la relación que existe entre la resistencia y sensibilidad a los derivados del 5-NF registrando eventos fisiológicos generales; tales como sobrevivencia a la droga de bacterias y levaduras, efecto de la misma sobre el crecimiento de levaduras así como su permeabilidad de las membranas celulares en S. cerevisiae y en E.coli , y su efecto sobre la actividad de glutatión reductasa en - - - S. cerevisiae.

III.- MATERIAL Y METODOS.

1.- Material.

Para la elaboración del presente trabajo se utilizaron las siguientes especies:

Bacillus cereus.

cepa: C11. Ste.

Escherichia coli cepa: K-16
Candida utilis cepa: CU-1
Saccharomyces cerevisiae cepa: D-311-3 (A) ro⁺ ro⁻

Reactivos de Sigma Chemical Co.:

NADPH, GSH, GSSG, Nitrofurantoina, Albúmina de bovino, Polin Cielteau, Trisma base, EDFA.

Difco Laboratories:

Bacto Peptona, Bacto Agar, Agar Nutriente, Yeast extract, glucosa anhidra.

Cajas Petri estériles de 10 x 1 cms. de la Casa Dade de México.

Los demás reactivos de uso corriente de laboratorio fueron de Merck de México.

Las medidas colorimétricas y espectrofotométricas; se realizaron en un fotocolorímetro Klett-Summerson y espectrofotómetro Zeiss modelo PQII respectivamente.

Las centrifugaciones preparativas se realizaron en una centrífuga Sorval modelo RC2-B y para volúmenes muy pequeños se utilizó una microfuga modelo 152 Microfugue de Beckman.

El material de cristalería fué de la Casa Pyrex.

MÉTODOS.

1.- Cepas y condiciones de cultivo.

Con objeto de aislar mutantes espontáneas, tanto resistentes como sensibles a la nitrofurantoina, se hicieron las curvas de sobrevivencia a dicho nitrofurano, fueron usadas las especies de microorganismos mencionadas anteriormente. Para esto se elaboraron medios sólidos de cultivos (en placas) con concentraciones crecientes de nitrofurantoina y como con-

trol el medio de cultivo sin nitrofurantoina. Las concentraciones oscilaron entre 10^{-3} M y 10^{-8} M

Medio:	Cepa:
Agar nutriente	<u>Bacillus cereus</u> Cal.Ste. (21)
Agar nutriente	<u>E.coli</u> K-16 (22)
YPD	<u>Candida utilis</u> CU-1 (23)
Dekloet	<u>S.cerevisiae</u> D-311-3(A) (24)

2.- Aislamiento de mutantes.

Las diluciones se hicieron de la siguiente forma:

Del cultivo original de cada cepa se toma una azada y se resuspende en 10 ml. de cloruro de sodio al 0.85 % previamente esterilizado (primera dilución), de aquí se toma 0.1 ml. y se mezcla con 10 ml. de cloruro de sodio (segunda dilución), de esta dilución se toman 0.1 de ml. y se mezclan con otros 10 ml. de cloruro de sodio (tercera dilución).

Para inocular las placas se tomó 0.1 ml. de la tercera dilución la cual se le extiende homogéneamente a cada placa con un triángulo de vidrio.

Las cajas se dejan incubar a una temperatura constante de 30 grados centígrados por 24 horas; después se realizaron los conteos de colonias tomando como 100 % de sobrevivencia el número de colonias del medio de control sin nitrofurantoina. Esto fué para todos los casos excepto para la S.cerevisiae ro⁻ que se contó a las 48 horas después de sembrar.

Con los resultados obtenidos se elaboraron las tablas de porcentaje de sobrevivencia.

3.- Curva de crecimiento.

Para tal propósito se preparó medio líquido de -- Dekloet (24) con nitrofurantoina $10^{-3}M$ y sin nitrofurantoina para cepas S.cerevisiae ro^{-}

Se esterilizó en el autoclave el medio de cultivo -- de cuatro matraces con aditamento especial (tubo adaptado pa -- ra leer en el colorímetro). Se pusieron 50 ml. de medio a -- cada matraz de manera que quedaron distribuidos en la siguien -- te forma:

2 matraces para S.cerevisiae ro^{+} uno con 50 ml. de medio libre de nitrofurantoina y el otro con nitrofurantoina $10^{-3}M$ y para S.cerevisiae ro^{-} en la misma forma que el an -- terior.

Se inoculó con 0.1 de ml. de la primera dilución pro -- curando que la densidad óptica del inóculo fuera de 0.8 a -- 540 nm para cada uno de los cuatro matraces.

Se dejan incubar con agitación constante y a una tem -- peratura de 30 grados centígrados constante también.

Se procedió a medir cada hora en el fotocolorímetro con filtro verde (aproximadamente a 540 n m) graficándose las unidades Klett (U.K.) obtenidas directamente en este aparato contra tiempo.

4.- Espectro de absorbancia de la nitrofurantoina.

Se realizó el espectro de absorbancia de nitrofurantoina a una concentración de $10^{-4}M$ Para tal objeto se emple -- ron dos muestras de 1 ml. cada una, conteniendo buffer como -- blanco y la otra conteniendo la nitrofurantoina.

Se leyó en el espectro y se graficó absorbancia con --

tra longitud de onda.

5.- Experimentos de absorción de nitrofurantoina por las levaduras *S.cerevisiae* D-311-3(A)ro⁺ y ro⁻

Se preparó medio líquido de Dekloet libre de nitrofurantoina, se inocula por dilución 0.1 ml. procurando que la densidad óptica sea de 0.8 a 540 n m, se dejaron incubando en agitación y a temperatura constantes de 30 grados centígrados.

Ya que crecieron hasta final de la fase logarítmica, se recupera el paquete de células por centrifugación a 10,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos y se lavan tres veces con agua destilada, se centrifugan después de cada lavado.

Una vez obtenidos los paquetes celulares se les determina el peso húmedo; para lo cual se resta el peso de los tubos, llevándose a un volumen final en relación 1:2 (peso húmedo:volumen final). Con un pequeño volumen de agua destilada se resuspenden los paquetes celulares de cada cepa; ya resuspendidos cada cepa se divide en 2 partes iguales y cada parte se trata por separado.

A una parte se le resuspende con buffer Tris-HCl 0.1 M sacarosa 0.25 M EDTA 1 mM a pH 7.5 con objeto de utilizarla como blanco.

La otra parte se resuspende con nitrofurantoina 10⁻⁵ M

Cada parte resuspendida se agita en el Vortex; dejándose incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugan a 8,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos recuperándose los sobrenadantes a los cuales se les mide la absorbancia a 385 n m en el espectro. Las muestras son de 1 ml. utilizándose como blanco el sobrenadante del paquete resuspendi

do con buffer.

En los siguientes experimentos se emplearon volúmenes pequeños para lo cual se utilizó la microfuga, midiéndose absorbancia a 385 nm.

El experimento anterior también se hizo con E.coli K 16.

6.- Semipurificación de la GSSG reductasa de S.cerevisiae cepas ro⁺ y ro⁻ crecidas en medio líquido de Dekloet y Dekloet nitrofurantoina 10⁻³M en cada cepa.

Se sembraron 4 matraces de S.cerevisiae en 500 ml. de medio de Dekloet, 2 de ellos a una concentración de nitrofurantoina 10⁻³M; se inoculó con densidad óptica de 0.8 a 540 nm y se dejaron crecer con agitación constante a 30 grados centígrados. Una vez crecidas las levaduras se colectan las células por centrifugación a 10,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, y se lavan con buffer Tris-HCl 0.1 M, sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM a pH 7.5

Una vez obtenidos los paquetes de células, se resuspenden en un pequeño volumen del buffer anterior.

Para romper las células, utilizamos el aparato Brown ó ultravibrador, el cual emplea perlas de vidrio (0.5mm. de diámetro) y se enfría por medio de CO₂. Se les dieron de 30 a 60 segundos de vibración alternada; ya rotas se recupera el homogenado y se hace un frotis para ver el rendimiento de la ruptura.

Todos los pasos subsecuentes se realizan a cuatro grados centígrados. El homogenado se centrifuga a 10,000 RPM durante 10 minutos y se recupera el sobrenadante libre de células

(extracto crudo); dicho extracto crudo se lleva a 40 % de saturación con sulfato de amonio sólido y se deja agitando por una hora.

El precipitado obtenido se centrifuga a 10,000 RPM durante 10 minutos, recuperándose el sobrenadante, el cual se lleva de manera semejante a 65 % de saturación con sulfato de amonio y se centrifuga a 10,000 RPM durante 10 minutos. Se recupera el sedimento en donde se encuentra la -- GSSG reductasa; el cual se resuspende en un pequeño volumen de buffer Tris-HCL 0.1 M, sacarosa 0.25 M, EDTA 1mM a pH 7.5. Con objeto de eliminar el exceso de sulfato de amonio se -- dializa por 1 hora contra 1 litro del mismo buffer.

7.- Medición de la actividad de la glutatión reductasa.

La actividad se mide por el cambio de absorbancia a 340 nm de acuerdo con el método basado en la disminución de DO debida a la oxidación del NADPH. La reacción se midió en cubetas de cuarzo de 1 ml.; de la siguiente manera:

Se preparan 2 cubetas conteniendo 0.900 ml. de buffer Tris-HCL 0.1 M sacarosa 0.25 M, EDTA 1 m M a pH 7.5 a continuación se agregan 100 μ l. de muestra (enzima) y 20 μ l. de NADPH disuelto en NaHCO_3 al 1 %; se mezclan los reactivos en en cada una de las cubetas y con una de ellas que nos sirve como blanco se ajusta al espectrofotómetro.

A la otra cubeta se le añaden 50 μ l. de GSSG a una concentración de 7.5 por 10^{-3} M y se va registrando el cambio de densidad óptica a 0, 15, 30, 60, 90 y 120 segundos.

Para obtener la actividad se grafica la densidad -

óptica a cada tiempo de registro; con lo cual obtenemos la -
delta de actividad. Y para obtener la actividad específica
se determina la cantidad de proteína de la muestra por el -
método de Lowry et al (25).

La actividad específica queda definida en Unidades
Internacionales según la Comisión Internacional de Enzimas -
(I.U.P.A.C.) Una unidad es igual al número de m Molas de pro
ducto formado / min./mg. de proteína.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.

1.- Sobrevivencia de las bacterias a la nitrofurantoina.

Como se aprecia de los datos de sobrevivencia obtenidos de las dos especies de bacterias empleadas en este trabajo, (tablas 1 y 2), la dosis letal de nitrofurantoina en medio sólido, se encuentra alrededor de 10^{-5} M sin haber sido posible aislar un mutante espontáneo resistente a la droga; no obstante que se sembraron concentraciones de células que oscilaban entre 3.1×10^2 y 6.3×10^6 . Las células se incubaron inclusive hasta por períodos de 72 horas sin mostrar crecimiento alguno. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura, que muestran un alta sensibilidad de diferentes especies bacterianas a los derivados de 5-NF; con una dosis letal que oscila alrededor de 10^{-5} M (26).

El efecto bacteriostático de la droga se muestra claramente a concentraciones menores a 10^{-5} M pues el tamaño de las colonias es considerablemente menor que el alcanzado por las colonias control crecidas en medio libre de nitrofurantoina. (tablas 1 y 2).

Tabla N.º 1

Sobrevivencia de Bacillus cereus (Cal. Ste.) en medio de AGAR
nutriente - Nitrofurantoina 24 hrs. de crecimiento (placas)

Medio	[Nitrofurantoina] Molar	Celulas Sembradas	Colonias contadas	% Supervivencia
AGAR nutriente	0.0	317	317	100
Nitrofurantoina	10^{-8} M	317	185	58.3
Nitrofurantoina	10^{-7} M	317	141	44.4
Nitrofurantoina	10^{-6} M	634	210	33.0
Nitrofurantoina	10^{-5} M	634	150	23.6
Nitrofurantoina	10^{-4} M	63 400	0	0
Nitrofurantoina	10^{-3} M	634 000	0	0

Tabla N° 2

Sobrevivencia de Escherichia coli K-16 en medio de AGAR
nutriente— Nitrofurantoina 24 hrs. de crecimiento (placas)

Medio	[Nitrofurantoina] Molar	Celulas Sembradas	Colonias contadas	% Supervivencia
AGAR nutriente	0.0	541	541	100
Nitrofurantoina	1×10^{-5} M	541	367	67
Nitrofurantoina	1×10^{-7} M	541	301	55.6
Nitrofurantoina	1×10^{-6} M	541	280	51.5
Nitrofurantoina	1×10^{-5} M	541	200	36.9
Nitrofurantoina	1×10^{-4} M	541	0	0
Nitrofurantoina	1×10^{-3} M	541	0	0

2.- Sobrevivencia de las levaduras a la nitrofurantoina.

A diferencia de lo que sucede en el caso de - - - - -
E.coli K-16 y B.cereus Cal. Ste.; las levaduras Candida utilis
y Saccharomyces cerevisiae D-311-3(A) ro^+ fueron resistentes a
la nitrofurantoina a concentraciones tal altas como 5×10^{-2} M
(no se probaron concentraciones mayores; ya que la droga precipita en el medio) sin mostrar alteración alguna; tanto en el número, como tamaño y apariencia de las colonias (tablas 3 y 4)

La cepa de S.cerevisiae (ro^-) es una mutante obtenida a partir de la cepa D-311-3(A) ro^+ 6 silvestre.

La diferencia entre la ro^+ y ro^- es la ausencia de mitocondrias funcionales en la ro^- por lo tanto dicha mutante - crece sólo a expensas de glucólisis anaeróbica. para obtener - su energía necesaria, ya que tanto el Ciclo de Krebs así como la fosforilación oxidativa no le funcionan (20)

El empleo de este mutante en nuestros experimentos - resultaba de particular interés debido a que en ausencia del Ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria funcionales se puede ensayar la droga sin un metabolismo aeróbico y dependiente totalmente de la glucólisis anaeróbica.

Tabla N° 3

Sobrevivencia de Candida utilis CU-1 en medio YPD DeKloet
Nitrofurantoina 24 hrs. de crecimiento (placas)

Medio	[Nitrofurantoina] Molar	Celulas Sembradas	Colonias contadas	% Supervivencia
De Kloet Nitrof.	0.0	500	500	100
De Kloet Nitrof.	$1 \cdot 10^{-5}$ M	500	490	98
De Kloet Nitrof.	$1 \cdot 10^{-4}$ M	500	498	100
De Kloet Nitrof.	$1 \cdot 10^{-3}$ M	500	480	96
De Kloet Nitrof.	5×10^{-2} M	500	480	97

Tabla N° 4

Sobrevivencia de *Saccharomyces cerevisiae* cepa: D-311-3(A) ^{o+}
 en medio Dekloet-Nitrofurantoina 24 hrs. de crecimiento (placas).

Medio	[Nitrofurantoina] Molar	Celulas Sembradas	Colonias contadas	% Supervivencia
De Kloet Nitrof.	0.0	176	176	100
De Kloet Nitrof.	$1 \cdot 0^{-6}$ M	177	177	100
De Kloet Nitrof.	$1 \cdot 0^{-5}$ M	176	162	92
De Kloet Nitrof.	$1 \cdot 0^{-4}$ M	176	160	90
De Kloet Nitrof.	$1 \cdot 0^{-3}$ M	176	100	60
De Kloet Nitrof.	$5 \times 1 \cdot 0^{-3}$ M	176	20	9

Es baja la sobrevivencia de la cepa de S.cerevisiae D-311-3(A) ro⁻ frente a concentraciones crecientes de nitrofurantoina (10^{-6} M - 10^{-3} M).

La cepa ro⁺ mostró sobrevivencia de 60 % en medio sólido con nitrofurantoina a una concentración de 10^{-3} M en estas condiciones las colonias sobrevivientes presentaban un tamaño y apariencia normal comparable a las colonias crecidas en el medio control libre de nitrofurantoina. En cambio la cepa ro⁻ muestra una sensibilidad comparable a la de las bacterias ensayadas, encontrándose que la dosis que cambia la inhibición corona al 100 % de crecimiento, oscila entre 10^{-5} M y 10^{-4} M.

Pero a diferencia de las bacterias, es posible observar, después de 60 horas de crecimiento, la aparición de algunas colonias con un tamaño menor al de las colonias que crecieron en medio control. Por lo anterior decidimos hacer una curva de crecimiento de las dos cepas de S.cerevisiae en medio de Dekloet líquido; midiendo la densidad óptica a 540 m m en contra del tiempo.

Como se observa en la fig. 3 la nitrofurantoina no muestra efecto considerable sobre la velocidad de crecimiento de la cepa ro⁺ mostrándose tanto la velocidad como el perfil de la curva con las características de control crecido en medio libre de nitrofurantoina.


Por otro lado, el crecimiento de la cepa ro⁻ que normalmente es más lento respecto al de la silvestre ro⁺ en presencia de la nitrofurantoina es aún más lento mostrando un considerable retraso de aproximadamente 10 a 11 horas con respecto

al control crecido en medio libre de nitrofurantoina.

Resulta interesante resaltar el hecho de que en la curva de crecimiento de la mutante ro^- crecida en Dekloet - con nitrofurantoina $10^{-3}M$ presenta una pendiente menor en la etapa logarítmica; además el período de iniciación de la fase logarítmica de crecimiento tiene un retraso considerable con respecto al observado para la misma cepa crecida en medio libre de nitrofurantoina; lo cual sugiere la posibilidad de algún ajuste metabólico en las células necesario para iniciar el crecimiento logarítmico.

Asnis (27) encontró que cuando la bacteria es sometida in vitro a condiciones aeróbicas se incrementa la resistencia a la nitrofurantoina. Es conveniente relacionarlo con la mayor susceptibilidad a la nitrofurantoina observada para la mutante ro^- empleada en el presente trabajo y que como se dijo obtiene la energía para sus funciones a expensas de glucólisis anaeróbica.

Tabla N^o 5

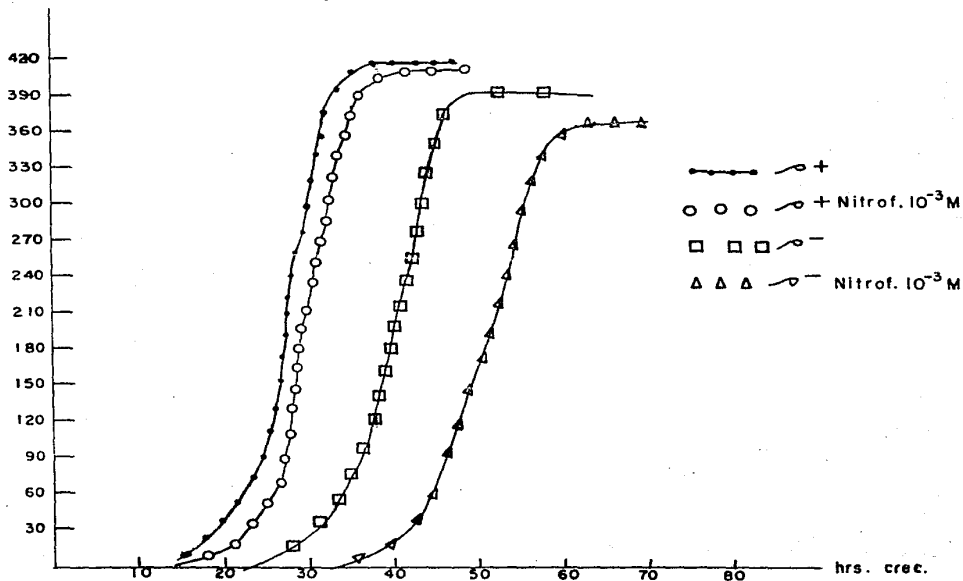
Sobrevivencia de Saccharomyces cerevisiae cepa: D-311-3(A)  en medio Dekloet-Nitrofurantoina 48 hrs. de crecimiento (placas).

Medio	[Nitrofurantoina] Molar	Celulas Sembradas	Colonias contadas	% Supervivencia
De Kloet Nitrof.	0.0	200	200	100
De Kloet Nitrof.	10^{-6} M	200	180	90
De Kloet Nitrof.	10^{-5} M	200	140	70
De Kloet Nitrof.	10^{-4} M	200	0	0
De Kloet Nitrof.	10^{-3} M	200	0	0

Fig. N° 3

CURVA de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae
cepos: D-311-3 (A) + y - en medio de Dekloel con
y sin Nitrofurantoina 10^{-3} M

U. K.



3.- Permeabilidad de las membranas celulares a la nitrofurantoina.

En el caso de las cepas bacterianas; se argumenta que la resistencia se debe a una disminución de la permeabilidad de la pared celular, o a una sensibilidad reducida al nitrofurano de ciertas enzimas bajo condiciones aeróbicas (27). Decidimos poner a prueba esta hipótesis en el caso de S.cerevisiae ro^+ y ro^- . Diseñamos un experimento que nos permitiera conocer si la nitrofurantoina era removida del medio cuando se incubaba por períodos cortos con paquetes de células frescos de ambas cepas, que habían sido crecidas hasta el final de la fase logarítmica en medio de Dekloet. En estos experimentos se utilizaron paquetes de células de E.coli K-16 como control; sabiendo que esta cepa es sensible y a la vez permeable a la nitrofurantoina. Después de preparar las células en la forma descrita en métodos; se incubaron en presencia de nitrofurantoina 10^{-4} M cuyo espectro de absorción previamente se determinó. (Fig.4.)

Como se observa de la tabla número 6, la nitrofurantoina es removida del medio tanto por la E.coli como por la cepa ro^- mientras que la ro^+ deja la nitrofurantoina en el medio. Este resultado demuestra que la ro^+ es impermeable al antibiótico, mientras que penetra fácilmente en la cepa ro^- . Dicha permeabilidad podría deberse a una mutación en la membrana citoplásmica asociada a la mutación mitocondrial, que se ha descrito para esta cepa o simplemente es consecuencia del crecimiento anaeróbico obligado por la mutante mitocondrial.

D.O.

1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1

Fig. N^o 4

Espectro de absorción de la Nitrofurantoina [10^{-4} M] muestra 1 ml.

Abs. máx = 385 n m λ

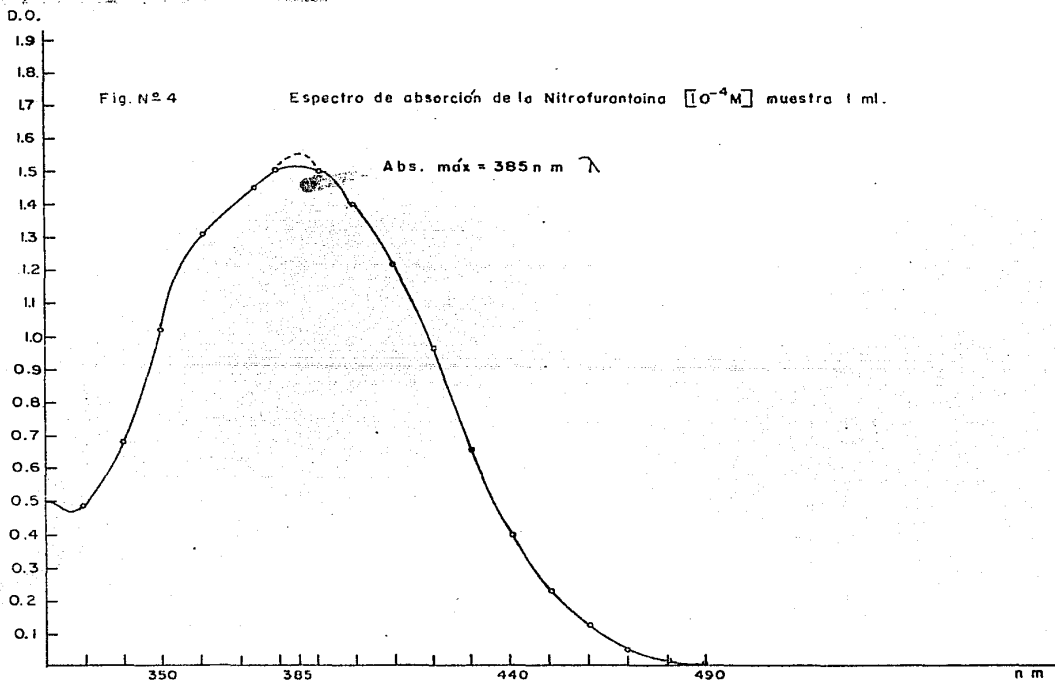


Tabla N° 6

Permeabilidad de Saccharomyces cerevisiae D-311-3(A) ^{o+} y ^{o-} a la Nitrofurantoina
 Los paquetes celulares se incubaron 10 min. a temperatura ambiente.

Preparación	P. hum. (grs.cels.)	Abs 385 m m.	Abs 385 m m.	% Recuperación
^{o+}	4.2	0.45	0.45	100
	5.0	0.90	0.90	100
	4.9	0.95	0.95	100
^{o-}	4.6	0.45 *	0.20	44
	5.3	0.98	0.28	28
	5.2	0.95	0.175	18
Escoli K-16	4.5	0.97	0.22	23

* Concentración de Nitrofurantoina $5 \times 10^{-6} M$; para los demás casos es $10^{-5} M$

4.- Actividad de la glutatión reductasa en presencia de nitrofurantoina.

Dentro de las actividades enzimáticas que se han establecido que son inhibidas por nitrofurantoina in-vitro es cogimos a la GSSG reductasa para determinar el efecto sobre los niveles de esta actividad, en la cepa ro^+ y ro^- cuando son crecidas en ausencia y presencia de dicho antibiótico. A una concentración de 10^{-3} M. El método utilizado en la preparación de los extractos y ensayo de la actividad de la GSSG reductasa se describieron en métodos. Como se aprecia de la tabla número 7 los niveles de actividad de la GSSG reductasa son mayores en la cepa silvestro ro^+ crecida en medio de Dekloet libre de nitrofurantoina que en la cepa ro^- crecida bajo las mismas condiciones. Aparentemente el metabolismo anaeróbico "per se" influye en los niveles de GSSG reductasa; así vemos que la cepa ro^- y sin nitrofurantoina tiene la mitad de la actividad que su correspondiente control ro^+ Como se dijo en la introducción la diferencia fundamental entre estas cepas es que la ro^- carece de mitocondrias y por lo tanto obtiene la energía para sus funciones a partir de la glucólisis anaeróbica.

Al estar viviendo una célula con ausencia de mitocondrias pero con una glucólisis anaeróbica muy activa su potencial redox se modifica ya que los piridín nucleótidos reducidos que se producen en las primeras etapas de la glucólisis anaeróbica, son reutilizados necesariamente en la última reacción de la mencionada glucólisis.

Esto trae como consecuencia una deficiencia relativa de equivalentes reductores de la cepa ro^- . Una hipótesis de trabajo que se puede considerar para explicar la menor actividad de glutatión reductasa en la mutante ro^- es precisamente tomando en consideración su deficiencia de equivalentes reductores que en forma de NADPH y de GSH aparecen en ambos lados de la ecuación catalizada por la glutatión reductasa:



Eventualmente la falta de equivalentes reductores podría llevar a una menor actividad de la enzima.

Por otro lado los niveles de actividad bajo condiciones de crecimiento con nitrofurantoina son menores en ambos casos, que los encontrados en los controles crecidos en medio de Dekloet libre de nitrofurantoina. Dicho en otra forma encontramos diferencia en los niveles de actividad enzimática asociada a la mutación (expresión genética), y una segunda diferencia debida al efecto de la nitrofurantoina sobre el crecimiento y metabolismo general de ambas cepas.

De acuerdo con lo que anotamos en la introducción de esta Tesis, era factible prever una posible acción inhibitoria de la nitrofurantoina en la actividad de la glutatión reductasa. Como se observa en la tabla número 7 la inhibición de la actividad de la enzima por la nitrofurantoina es mucho más marcada en la cepa ro^- donde se observa una inhibición del 60 % en relación con su control que en la cepa ro^+ en relación también con su respectivo control donde la inhibición sólo es del 36 %. Este resultado no tiene nada de sorprendente después de la demostración, que se hizo en esta tesis, de

una mayor permeabilidad de la cepa ro⁻ a la nitrofurantoina (tabla 6).

Por lo tanto una mayor concentración de nitrofurantoina dentro de la célula ro⁻, inhibe en mayor grado la actividad de la glutatión reductasa lo que coincide con lo que mencionamos en la introducción ya que se ha demostrado (17) que la inhibición de la actividad de esta enzima es proporcional a la concentración de nitrofurantoina. También están de acuerdo nuestros datos con la demostrada unión de la nitrofurantoina con la glutatión reductasa (17); unión que como se dijo anteriormente es laxa debido a la reversibilidad por la diálisis.

Tabla N^o 7

Actividad específica de la Glutación Reductasa en cultivos de Saccharomyces cerevisiae
 D-311-3 (A) α^+ y α^- crecidas con y sin Nitrofurantoina 10^{-3} M

Cepa	Cultivo	Glutación Red Act. Esp. m UI *	% de Inhibición	% Actividad
D-311-(A) α^+	De Kloet	110	0	0
D-311-(A) α^+	De K. Nitrof.	70	36	64
D-311-(A) α^-	De Kloet	50	0	0
D-311-(A) α^-	De K. Nitrof.	20	60	40

* m UI = μ Moles de Glutación reducido/min/mg. de proteína.

V.- R E S U M E N .

Se investigó la sensibilidad y permeabilidad a la nitrofurantoina en una cepa de Escherichia coli K-16 y de cepas de Saccharomyces cerevisiae D-311-3(A) ro⁺ y su mutante ro⁻

Para ambas cepas de levaduras el estudio se extendió al efecto de la nitrofurantoina en la actividad de la glutatión reductasa.

Tanto la E.coli K-16 como la S.cerevisiae D-311-3(A)ro⁻ resultaron sensibles a concentraciones de nitrofurantoina que oscilaron entre 10^{-8} M a 10^{-3} M; el criterio empleado fué de so brevivencia en presencia de la droga.

En otro tipo de experimentos la nitrofurantoina emplea da a una concentración de 10^{-3} M alargó la fase de latencia al medir el crecimiento en las dos cepas de S.cerevisiae usadas en este trabajo; el efecto fué mayor en la mutante ro⁻

La cepa ro⁺ de levadura resultó ser más impermeable a la penetración de la nitrofurantoina en comparación con la ro⁻ y la E.coli K-16.

La penetración del derivado de nitrofurano se exploró a la máxima absorbancia (385 m m) que se obtuvo experimentalmen te en nuestras condiciones de trabajo.

La actividad de la glutatión reductasa se ensayó en extractos de las dos cepas de levadura las que se crecieron en ausencia o en presencia de nitrofurantoina a una concentración de 10^{-3} M. La actividad fué menor en la mutante ro⁻ en compa ración con la ro⁺ y el efecto inhibitorio de la nitrofurantoi na fué de mayor magnitud también la mutante ro⁻

La mayor sensibilidad a la nitrofurantoina se explica en base a la mayor permeabilidad de la misma y se sugiere que la sensibilidad dependa de la inhibición que produce la droga en la actividad de la glutatión reductasa.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Dodd, M.C. and Stillman W.B.J. Pharmacol exp. Therapeut 82, 11 (1944).
- 2.- Dann, O. and Möller, E.H. Chem. Ber. 80, 23 (1947)
- 3.- Sanders, H.J., Edmunds, R.T. and Stillman, W.B. Ind. Engng. Chem. 47, 358 (1955)
- 4.- Muira, R. and Reckendorf, H.K. Progress in Medicinal Chemistry, Bd. 5, S. 320 Butlerworth, London 1967.
- 5.- Dodd, M.C. Ibid. 86. 311 (1946)
- 6.- Dodd, M.C. Cramer, D.L. and Ward, W.C.J. Amer. Pharmac. Assoc. Sci. Edit. 29, 313 (1950)
- 7.- Cramer, D.L. and Dodd, M.C.J. Bacteriol 51, 293 (1946)
- 8.- Schoog, M., Arzneimittel-Forsch. 6, 450. (1956)
- 9.- O'Connor, J.R., Russel, H.E. and Carey, F.W. vgl. (5), S.1.
- 10.- Lorian, W. and Popoola, B. The Jour. of Infectious Diseases, 125, 2. (1972)
- 11.- Burrous, S.E. Norwich Pharmacal Co. Division of Research. datos no publicados.
- 12.- Green, M.N. Heath, E.C. and Gall, I. Ibid 76, 152 (1961)
- 13.- Massey, V; and G. Palmer; J. Biol. Chem. 237, 2347 (1962)

- 14.- Massey, V. and Williams, C.H. Jr. J. Biol. Chem. 240, 4470 (1965)
- 15.- Boyland, E. and Chasseaud, L. F. Advances in Enzymology No. 32, 173 (1969)
- 16.- Fegler, G. Nature 170, 4328 (1952)
- 17.- Buzard, J.A., Kopko, H. and Paul, H.M.J. Lab. Clin. Med., 56, 884 (1960)
- 18.- Jour. of Biol. Chem. 238, 1 (1963)
- 19.- Asnis, R.E. Archives of Biochemistry and Biophysics 66, 208 (1957)
- 20.- Sherman and Slonimski (1964)
- 21.- Vogel, J.H. Microbiol. Genet Bull. 13, 42 (1956)
- 22.- Pizer, I.L. J. Bacteriol. 86, 611 (1964)
- 23.- Chen, I. W. and Charalampous, F.C. J. Biol. Chem. 239, 1905 (1964)
- 24.- De Kloet, S., Van Wermeskerken, R. and Koningsberger, V. Biochem. Biophys. Acta 47, 138 (1961)
- 25.- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall: Protein measurement with the folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 26.- Hein, H. and Reiter, W. Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Interktuinskrankh, Hyg., Abt Y Orig. 209, 545 (1959)
- 27.- Asnis, R.E. Cohen, H. B. and Gots, J.S. Antibiotics and Chemotherapy 2, 123 (1952)