JUNIO 1987

EDITORIAL

LA BIOQUIMICA EN LA PROSPECCION DE LA EDUCACION SUPERIOR

La educación es un instrumento de conservación y de cambio que es influída por la estructura y las actividades sociales dominantes, los nuevos conocimientos y por la tecnología. En el siglo XX lo más influvente ha sido justamente el cambio. La educación se ha visto obligada a ser un instrumento para facilitar y afrontar el cambio, incluso en aquellas sociedades que no participan de una revolución consciente semejante a la de países como la Unión Soviética, Cuba y los nuevos Estados de los antiguos pueblos coloniales. Esto se debe a que la ciencia y la tecnología son para el siglo XX, lo que fue la revolución industrial para el siglo XIX. La ciencia y su aplicación han repercutido en los métodos y propósitos de la educación en general y de la educación superior en particular, ya que se procura formar personas de mentalidad cuestionadora, con una visión científica de la vida, que les permita desenvolverse adecuadamente en medio de las nuevas experiencias y conocimientos que van a encontrar. Esta formación no puede depender de la que pueden conferir los padres de familia o ser obtenida a través del aprendizaje práctico. Las necesidades de ciudadanos cultos para los estados democráticos y de personal capacitado para las sociedades industrializadas conflevaron presiones sobre las instituciones educativas que habían de responder a las aspiraciones de los individuos, además de actualizarse paralelamente a las transformaciones de los conocimientos y de las sociedades considerando prospectivamente las exigencias del desarrollo. "Todos los países necesitaban un número creciente de técnicos, especialistas y profesionales en todos los campos de la actividad humana" (UNESCO, Tomo II, p. 442).

"Durante el siglo XX la educación de la masa fue extendida en todas partes: a los niveles secundario y superior en los países de desarrollo industrial avanzado; al nivel elemental en el resto del mundo" (p. 484).

En los países subdesarrollados hubo muchos obstáculos para la educación masiva. La inestabilidad política, aunada a los intereses elitistas de las clases altas, la fuerte tradición literaria y la intervención de la iglesia en la educación, desalentaban los movimientos a favor de una educación sostenida por el Estado y el desarrollo de tipos prácticos de preparación. Sin embargo el derecho al voto de todos los adultos, la necesidad de expertos a todos los niveles para el progreso económico y la idea aceptada mundialmente de que la educación era un derecho básico que todo Estado moderno debe garantizar a su pueblo hicieron de la educación general un imperativo ineludible para los países subdesarrollados, una vez que se realizaron grandes esfuerzos para ampliar rápidamente los servicios educativos aunque sólo fuese para evitar que la situación empeorara. La tendencia general fue la de ampliar la educación masiva más allá de la educación elemental. En casi todos los países, la extensión de la educación por parte del Estado fue vista como la aceptación por el gobierno de una responsabilidad que debía a su ciudadanía. Tal parecía que el problema se reducía a que los Estados estuviesen dispuestos a movilizar a sus pueblos, para emprender de manera clara y resuelta una estrategia global de desarrollo a largo plazo, que implicara un mejoramiento de las condiciones de vida y la elevación de los niveles de libertad. Para que el proceso de desarrollo fuese viable y constante se reconoce como necesaria, aunque no suficiente, la disponibilidad de personal calificado, capaz de promover, organizar y administrar dicho proceso.

Las tendencias mundiales respecto a la educación superior consisten en la adopción, por parte de todos los países desarrollados y de algunos en desarrollo, de incrementar la escolaridad de sus pueblos. No se suele hablar de educación superior masiva pero si de "educación superior

COMITE EDITORIAL

INDICE

BEB 87 Vol.6 Núm.2 Junio 1987

ALFONSO CARABEZ	
Instituto de Fisiología C	elular
Universidad Nacional As	

GUILLERMO CARVAJAL Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional

ALBERTO HAMABATA
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

JESUS MANUEL LEON CAZARES Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

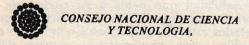
ENRIQUE PIÑA GARZA Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México

COORDINADOR EDITORIAL
YOLANDA SALDAÑA DE DELGADILLO
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

Serafín Águado (Morelia, Mich.), Ma. Dolores Alvarez Bruneliere (León, Gto.), Humberto Avila Rodríguez (Durango, Dgo.), Alberto Boveris (Buenos Aires, Argentina), Carlos Corredor (Cali, Colombia), Alfredo Delgado (Momerrey, N.L.), Manuel Escobar L. (Zacatecas, Zac.), Jesús R. Garcilaso (Hermosillo, Son.), Ma. Cristina González de Mac Swiney. (Mérida, Yuc.), Ma. Guadalupe Oliva Ruiz (Tampico, Tamps.), Ma. Guadalupe Puga (Querétaro, Qro.), Héctor Reyes Leal (Ciudad Juárez, Chih.), José Alberto Rivera Brechu (México, D.F.), Jesús M. Rodríguez (San Luis Potosí, S.L.P.), Alba Marina Valdez de García (Guatemala, Guatemala, C.A.), Manuel Vázquez T. (Santo Domingo, República Dominicana).



DR. HECTOR MAYAGOITIA DOMINGUEZ Director General

DR. JESUS GUZMAN GARCIA
Director Adjunto de Desarrollo Científico

EDITORIAL

Educación Superior. José Huerta Iba-	
rra	3
ARTICULOS	
Cinco Preguntas sobre Biología Celu-	
lar. Jesús Manuel León Cázares	35
Papel de la Fuente de Nitrógeno en la	
Producción Fermentativa de los Anti-	
bióticos Penicilina y Cefalosporina.	
Sergio Sánchez, Rosa Elena Cardoza y	
María Elena Flores	48

58

60

La Bioquímica en la Prospección de la

DONATIVO PCSACNA-451019

Instrucciones para los Colaborarores del Boletín de Educación Bioquímica..

INDICES DE REVISTAS

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB) es una publicación trimestral editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Registro en Trámite. Correspondencia: Y. Saldaña de Delgadillo. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina UNAM. Apdo. Postal 70159. Delegación Coyoacán. 04510 México, D.F.

universal": es decir, la de procurar igualdad de oportunidades eduactivas a la mayoría de la población, en serios intentos de generalizar los niveles de educación superior con la subsecuente supresión de un sistema de educación orientado a la clase dirigente política o económica. Esto implica, también, la eliminación de discriminaciones en el acceso a la educación superior: "Los países socialistas europeos han abierto de par en par las puertas de sus instituciones de enseñanza superior a las mujeres. En la URSS por ejemplo, de cada dos ingenieros uno es mujer; de cada cuatro médicos tres son mujeres. En estos países se ha considerado que "la eduación universitaria al democratizarse ya no es privilegio sino una oprtunidad".

Las tendencias mundiales se ven reflejadas en las instituciones de enseñanza superior de México y en las prospecciones que se realizan sobre las profesiones y especialidades. A las funciones de conservar, enseñar y extender los límites del aprendizaje superior es inminente que adopten una función de servicio público; es decir, se les requiere que muestren mayor afinidad hacia la comunidad que hacia el claustro académico. Se trata, entonces, de la substitución de una posición histórica de la universidad con privilegios e inmunidad por una de responsabilidad y justificación.

Por todo ello la bioquímica, como materia básica de la formación de médicos y de otros profesionistas, parece destinada a jugar un papel relevante en el presente y futuro de dichas profesiones. El proceso permanente de modificaciones en la producción, la ciencia y la tecnología del mundo moderno destaca la importancia de asimilar y asumir con plenitud los contenidos, desarrollos e implicaciones de la bioquímica, ya que ésta facul-

tará el aprendizaje productivo de disciplinas como la informática, la biotecnología, la robótica, la microelectrónica, etc. En los estudios de prospectiva de las profesiones se ha detectado que los conocimientos y habilidades de menos obsolencia son los que el estudiante adquiere en las materias básicas, por lo que si se profundiza en el estudio de éstas se adquiere una especialización. que proporciona lenguajes, expresiones y métodos flexibles, adaptables y prácticos de mayor perdurabilidad. Por ello, las tendencias curriculares consisten en procurar substituir la ultraespecialización, la obsolencia y la dispersión de conocimientos por planes y programas que estimulen la capacidad de afrontar múltiples problemas en circunstancias diferentes. A este respecto la bioquímica está ubicada en una situación privilegiada pues contiene elementos que capacitan para anticipar los efectos de las tecnologías y para asimilar los conocimientos científicos de frontera en todos los niveles.

No resulta extraño preveer que el futuro curricular del médico incrementará el hincapié en materias como bioquímica y que las posibilidades de actualización del médico en su disciplina dependan cada vez más del grado de dominio que haya alcanzado en esta materia y de otras similares consideradas como básicas.

La naturaleza actual de la revolución científica y tecnológica incide en cambios a nivel cultural y hace emerger nuevos tipos de apropiación técnica del saber; la bioquímica esta llamada dentro de la prospección de las profesiones, a formar parte del "alfabeto científico y tecnológico" del futuro.

José Huerta Ibarra Departamento de Psicología Educativa Facultad de Psicología, UNAM.

CINCO PREGUNTAS SOBRE BIOLOGIA CELULAR

Jesús Manuel León Cázares. Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Ciencias, UNAM.

RESUMEN

En este trabajo se presenta una relación de cómo ha evolucionado la Biología Celular, desde sus antecedentes más lejanos hasta la actualidad. Para esto se analizarán algunos de los principales avances, tanto conceptuales como de tecnología, que la han hecho crecer hasta transformarla en una disciplina en sí misma, encargada de aportar modelos sobre el origen, la evo-

lución y la morfofisiología del nivel de complejidad celular.

Con objeto de facilitar la apreciación de este desarrollo, se plantean cinco preguntas, que al contestarse, ofrecen una imagen del estado actual de la Biología Celular. Las preguntas se refieren a los enfoques conceptuales que le han servido de marco de referencia, la evolución del concepto de célula y algunos de los

hallazgos más recientes sobre la morfofisiología celular y los métodos de estudio que los hizo posibles. Para finalizar se mencionan algunas de las perspectivas de la investigación dentro del ámbito de esta disciplina.

ANTECEDENTES

No obstante que los antecedentes de la Biología Celular se podrían localizar entre 1759 y 1838, es durante los últimos 25 años que ésta ha llegado realmente a su mayoría de edad.

En 1759 Wolff aplicó la microscopia al estudio de la embriología de los animales y estableció que: "Las particulas que constituyen a todos los órganos de un animal, en su forma más incipiente son pequeños glóbulos, que pueden distinguirse bajo el microscopio". En 1802 Mirbel concluyó de sus numerosas observaciones sobre la estructura de los vegetales que: "La planta esta completamente formada por tejido celular membranoso contínuo. Las plantas están constituidas por células, todas sus partes están en continuidad y forman un solo tejido membranoso" y en 1838 se publicaron las observaciones de Schleiden y Schwann, el primero sobre la génesis de los tejidos de los vegetales y el segundo sobre los tejidos de los animales, que le permitieron proponer que: "Las células son organismos y las plantas y animales completos son agregados de estos organismos arreglados de acuerdo a leyes precisas" (1).

Ahora se reconoce a la Biología Celular como una disciplina en sí misma, lo que se refleja en que en instituciones académicas, éstas o los departamentos y laboratorios lleven su nombre, que se otorguen grados con esta especialidad e incluso existan revistas en que se le situa como un campo especial de las Ciencias Biológicas, como el Journal of Cell Biology, entre muchas otras.

Se puede decir que la Biología Celular se origina alrededor de 1955 (2), cuando se produce la interacción de los enfoques novedosos de la Biofísica y la Bioquímica y éstos se fusionan con los de la antigua Citología, que hace aproximadamente 25 años se ocupaba en definir la estructura de la célula y apenas se vislumbraba la coincidencia de ésta con la función.

En este mismo momento, el aislamiento de estructuras subcelulares adquiría el caracter de técnicas rutinarias y reproducibles, se iniciaba la localización subcelular de las proteínas, se descubrían las mitocondrias, se tenían los primeros indicios de los sistemas intracitoplásmicos de membranas y los ribosomas eran prácticamente desconocidos (3).

Al comparar ese momento con el estado actual, parece dificil que en tan corto tiempo, se haya llegado a comprender tanto sobre la célula, pues se cuenta con modelos que explican su origen y evolución, su morfofisiología y aún la regulación de su funcionamiento. Tal y como se describe para algunos de estos aspectos en las respuestas a las siguientes preguntas.

1. ¿CUAL ES EL ENFOQUE CONCEPTUAL UTILIZADO EN LOS ESTUDIOS SOBRE LA CELULA?

Fue Carrel quien en 1931 (4), con base en la experiencia obtenida a través de la aplicación de los métodos del cultivo de tejidos, llegó al enfoque conceptual que transformó a la Citología clásica en lo que denominó "la nueva Citología", que aproximadamente 20 años más tarde interactuaria con la Biofísica y la Bioquímica, para dar origen a la Biología Celular.

En esta nueva Citología, se propone que la células y el medio que las rodea están en continuidad fisiológica, ambos elementos forman un todo, cuya interdependencia es tan estricta como la del núcleo y el citoplasma de los eucitos.

Con base en esta proposición, se puede suponer que el estado de un tejido, reside al mismo tiempo en sus propiedades hereditarias e historia previa y en las condiciones de su medio, y por lo tanto, es necesario substituir el concepto de células y tejidos separados de su entorno y aislados en el espacio, por el de un sistema "célula-medio ambiente" y estudiar simultáneamente las partes constituyentes del conjunto.

Aquí vale la pena mencionar la definición de sistema propuesta por Thomas en 1979 (5): "... es una estructura de componentes interactuantes e intercomunicados que, como grupo, actúan u operan individualmente y en conjunto, para lograr un objetivo común a través de la actividad concertada de las partes individuales".

De esta manera, se origina el enfoque conceptual que podría denominarse ecológico, que en la actualidad permite entender los procesos de comunicación que se llevan a cabo dentro y entre los organismos así como en el medio, de los que resultan los estados de equilibrio u homeostasis característicos de los sistemas vivos.

Un ejemplo que sirve para ilustrar la estrecha comunicación entre las células y su ambiente y que permite evaluar hasta donde llega la capacidad de influencia recíproca entre las partes del sistema célula-medio, propuesto por Carrel, es la transformación de la atmósfera del planeta de reductora en oxidante; que se inicio hace aproximadamente 2 000 millones de años, como resultado de los procesos de fotosíntesis realizados por las cianobacterias.

2.¿COMO SE CARACTERIZA EL CONCEPTO DINAMICO DE CELULA?

La pregunta se plantea como una consecuencia del enfoque propuesto en la respuesta anterior y deberá substituir el concepto meramente morfológico y bidimensional, es decir aquel que se refiere sólo a su tamaño y elementos formadores; como el que dice: la célula es un corpúsculo microscópico, dotado de vida propia, formado por membrana, citoplasma y núcleo, que desde luego no toma en consideración a los protocitos.

En esta substitución el elemento más relevante es el tiempo y su importancia queda plasmada en la siguiente proposición de Mazia de 1974 (6): "Ya no es satisfactorio obtener una buena medición u observación o una explicación inteligente de algún mecanismo en la célula, a menos que se pueda localizar sobre el eje del tiempo, del tiempo propio de la célula como se expresa en la historia de su vida", es decir durante su ciclo de generación. En éste se reconocen para los eucitos, dos etapas principales que tradicionalmente se han deno-

minado como interfase y mitosis, cuya duración es la requerida para llevar a cabo un programa preciso para cada tipo de célula.

La interfase se ha subdividido en varios períodos que son: G1, S y G2 cuya duración para diferentes tipos celulares es más o menos constante, como se muestra en el ejemplo para las células HeLa (fig. 1). Para algunos autores la etapa G1, tiene una parte característica de las células diferenciadas a la que denominan G0.

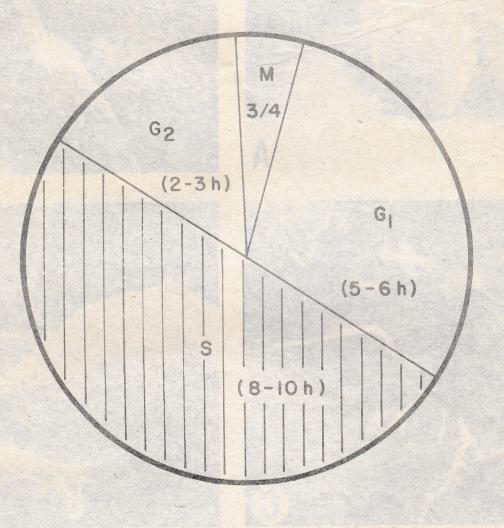


Figura 1 - Diagrama del ciclo de generación celular de las células HeLa, donde se muestra la duración en horas de cada etapa (tomado de Lerner y Hodge, 1971) (7).

Desde el punto de vista metabólico es la duplicación del ácido desoxirribonucleico, la parte que define al evento crucial del ciclo. La síntesis del ARN se mantiene constante, mientras que la de proteínas presenta variaciones a lo largo del tiempo.

En lo que respecta a la morfología de las células que ahora se insiste en representar en sus 3 dimen-

siones— ésta también cambia a lo largo del ciclo e incluso si se careciera de su conocimiento, se podrían tomar a las células que se encuentran en distintas etapas como de diferentes tipos, tal sería el caso de la célula en mitosis (fig. 2A) y las que están en G2 (fig. 2D) en la imagen de microscopia de barrido de un cultivo de células de ovario de hamster.

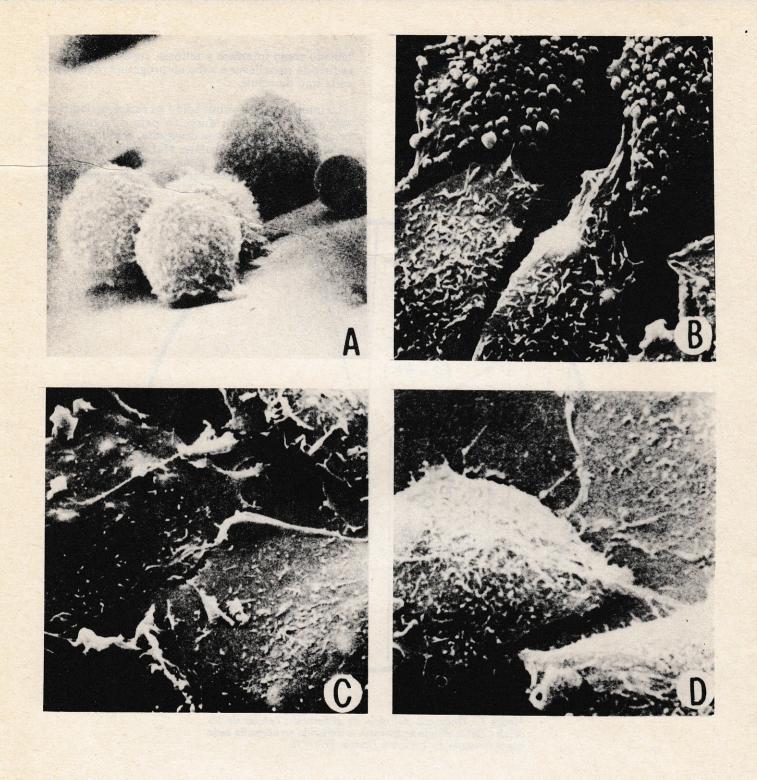


Figura 2 - Cambios en la apariencia y en la textura de las células según la etapa del ciclo de generación celular por la que cursan. Células de ovario de hamster en cultivo de tejidos, microscopia electrónica de barrido. A) Células hijas al final de la mitosis e inicio de G1. B) Fases finales de la etapa G1, con establecimiento de contactos entre ellas. C) Inicio de la etapa S. D) Inicio de la etapa G2. (tomado de Mazia, 1974) (6).

Estos cambios en la apariencia y en la textura de la superficie celular, se pueden correlacionar con la fase del ciclo por la que está cursando, debido a que la forma, cantidad y distribución de las proyecciones de la membrana plasmática son diferentes. Así las células que inician la fase G1 (fig. 2A), se parecen mucho a las que estan en mitosis, aunque se inicia su adhesión al sustrato; más adelante ya en plena fase G1 (fig. 2B), las células se han aplanado y muestran microvellosidades y microampollas. Las siguientes (fig. 2C), han iniciado la fase S, las microvellosidades prácticamente han desaparecido y se notan algunos repliegues. En la última imagen, en la fase G2 (fig. 2D), reaparecen las microvellosidades y microampollas incluso en la misma célula.

Al tomar en cuenta los cambios morfofisiológicos durante el ciclo de generación celular, se puede proponer un concepto de célula como el siguiente: Una célula viva es un sistema isotérmico abierto, formado por moléculas orgánicas, que se autoensambla, se autorregula y se autoduplica, que opera sobre el principio de máxima economía de partes y procesos; que promueve muchas reacciones orgánicas encadenadas y

consecutivas de transferencia de energía y de síntesis de sus propios componentes, por medio de catalizadores orgánicos que ella misma produce (8).

En esta proposición se debe tener presente que las actividades de ensamble, regulación y duplicación, están enmarcadas dentro del parámetro tiempo, representado por el ciclo de generación celular, cuyas etapas se definiran por las intensidades en que la célula manifiesta sus propiedades.

3. ¿A QUE SE DENOMINA SUBSTANCIA FUNDA-MENTAL CELULAR?

Los antecedentes se situan en 1929, cuando Peters propuso sobre bases teóricas lógicas, que las reacciones bioquímicas complejas que suceden en el citoplasma, como por ejemplo la glucólisis, no podían depender de las colisiones al azar entre los substratos y las enzimas en un medio líquido homogéneo, sino de "una tenue red que coordinara las reacciones enzimáticas" (9).

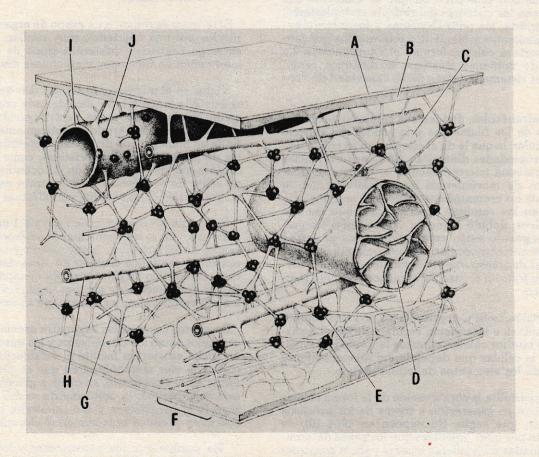


Figura 3 - Diagrama que representa el sistema microtrabecular de la substancia fundamental celular, en una reconstruccion amplificada aproximadamente 300 000 diámetros. A) Membrana plasmática. B)Corteza celular. C) Muñon de microtrabécula contraida. D) Mitocondria. E) Polirribosoma. F) Fibras de tensión. G)Fibra microtrabecular. H) Microtúbulo. I) Cisterna del retículo endoplásmico rugoso. J) Ribosoma adosado al retículo endoplásmico rugoso (tomado de Porter y Tucker, 1981) (9).

Fue hasta la década de 1970, que esta suposición se pudo investigar, gracias a la disponibilidad de una nueva herramienta, el microscopio electrónico de alto voltaje (MEAV), capaz de permitir observaciones a través de células completas, que por lo general se obtienen de cultivos de tejido.

Este microscopio que tiene una altura de 10 metros y pesa más de 20 toneladas, tiene capacidad de acelerar a los electrones 10 veces más que los microscopios electrónicos de transmisión convencionales, es decir aproximadamente 1 millón de voltios, lo que produce una imagen análoga a una placa de rayos X, que revela la estructura interna sin necesidad de haberla cortado previamente.

Esto hace posible observar un sistema de microtrabéculas que forman la Substancia Fundamental Celular (SFC), que encierra a los organelos y da estructura a proyecciones como las microvellosidades y que en sus vértices contiene a los denominados ribosomas libres, como se aprecia en el modelo que se representa en la figura 3, amplificando 300 mil diámetros, que se obtuvo a partir de la observación de cientos de imágenes tomadas con el MEAV, en que se muestran sus relaciones con las cisternas del retículo endoplásmico, una mitocondria, los polirribosomas y los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios que junto con la corteza celular, forman el citoesqueleto. La presencia de muñones atestigua la dinámica característica del sistema, a través de su capacidad de contracción.

Las microtrabéculas, dividen a la célula en dos fases: la proteica de los filamentos y la acuosa del espacio intertrabecular, lo que le da al citoplasma su consistencia y sus propiedades dinámicas. Se tienen evidencias de que el sistema microtrabecular interviene en diferentes tipos de movimientos intracelulares, como la migración de los cromatóforos de peces y anfibios, que les permiten los cambios de coloración que les son característicos, debido a que en estas células los gránulos de pigmento están embebidos en las proteínas de la trama microtrabecular, de la misma manera que los sistemas de transporte en las células del tejido nervioso, sobre todo en el caso del transporte de tipo rápido o axónico.

En conclusión, la SFC organiza a los diversos componentes celulares e interviene, regula y dirige el transporte en el interior celular, controla la forma y el movimiento de la células que depende del funcionamiento integrado de los elementos del citoesqueleto.

Además posibilita la conservación de la forma celular de generación en generación a través de los procesos de citotaxis, que según Sonneborn en 1964 (9), se caracterizan por que: "mientras que los genes determinan las unidades moleculares básicas para la construcción y a través de sus propiedades los tipos de asociaciones moleculares que pueden formarse, las asociaciones que realmente se encuentran, dependen también de las preexistentes".

Recientemente (10) se ha reconocido que así como existe un citoesqueleto, se encuentra también un nucleoesqueleto que tiene su anclaje en la denominada lámina interna, equivalente a la corteza celular, que está constituida por proteínas que se localizan por debajo de la cara nucleoplásmica de la membrana interna de la envoltura nuclear. A partir de ella se proyecta hacia el interior del núcleo una armazón insoluble denominada residual, por que permanece después del tratamiento de extracción con soluciones salinas concentradas que eliminan los fosfolípidos de la envoltura nuclear y la cromatina.

Se tienen evidencias (11) de que este nucleoesqueleto o matriz nuclear tiene un papel importante durante la duplicación de los ácidos nucleicos, la síntesis de ARN, el procesamiento y transporte del ARN heterogéneo nuclear, así como a través de la interacción con hormonas, por ejemplo esteroides, con los procesos de expresión génica.

4.- ¿A QUE SE DENOMINAN MICROCUERPOS CELULARES?

El término se refiere a un grupo de organelos caracterizados por una apariencia muy similar, pero que sin embargo contienen diferentes tipos de enzimas que intervienen en funciones metabólicas diversas.

Vistos en el microscopio electrónico de transmisión, se buscó la función específica de cada uno de ellos por medio de las técnicas de centrifugación diferencial, que permitieron separarlos prácticamente puros a partir de un homogenado de tejido y determinar la presencia de las enzimas características, como la citocromo oxidasa que marca la fracción mitocondrial, la fosfatasa ácida de los lisosomas y la urato oxidasa de los microcuerpos denominados peroxisomas (12).

Estos últimos de aproximadamente 1 micrómetro de diámetro, son el tipo principal de microcuerpos en las células de los animales, se encuentran en el hígado y en ocasiones contienen enzimas de otras vías metabólicas como la del ciclo de glioxilato; por ejemplo en las semillas en germinación de algunos vegetales como el jitomate y entonces se denominan glioxisomas.

En ciertos casos se les encuentra asociados con otros organelos como los cloroplastos y las mitocondrias (fig. 4). Dicha asociación facilita el establecimiento de circuitos de vías metabólicas en que el glicolato que se forma en el cloroplasto, se oxida a glioxilato en el peroxisoma, pasa a la mitocondria como malato, que regresa al peroxisoma como isocitrato, que al formar succinato produce azúcares en el cloroplasto.

Es posible que los peroxisomas y los glioxisomas sean interconvertibles y tengan relación de origen los de las plantas con los de los animales, ya que se encuentran en algunos protoctistas como las levaduras y Tetrahymena y por lo tanto son muy primitivos.

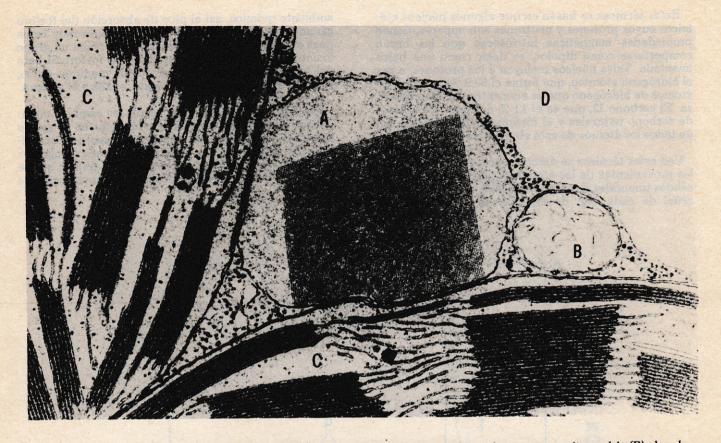


Figura 4 - Asociación de un peroxisoma (A) que muestra un cristal probablemente de catalasa, con una mitocondria (B), dos cloroplastos (C) y la vacuola central (D), de una célula de hoja de tabaco amplificada aproximadamente 58 000 diámetros (tomado de DeDuve, 1983) (12).

Varias partículas identificadas bioquímicamente como peroxisomas o glioxisomas, han sido localizadas en todos los eucitos, donde muestran características en común que hacen pensar en miembros de una misma familia de organelos, que comparten aproximadamente 40 enzimas diferentes, de cuya actividad no se genera el ATP.

En cuanto a su origen se ha propuesto, con muchas reservas debidas a la falta de evidencia indiscutible, pudiera haber sido por simbiosis, de manera similar a como probablemente ocurrió con las mitocondrias y los cloroplastos, aunque no se descarta la posibilidad de un origen endógeno.

5.-¿CUAL ES LA TECNICA MAS PROMETEDORA EN EL ESTUDIO DEL METABOLISMO CELU-LAR?

Desde que se estableció, gracias a los trabajos de Pasteur y los de Buchner realizados el siglo pasado, que algunas substancias contenidas en las células catalizan reacciones químicas, la bioquímica ha tratado de aclarar cómo es que las sustancias extraídas y purificadas a partir de las células, son las responsables de las transformaciones químicas que se realizan dentro de ellas.

Esta estrategia ha generado la objeción sobre la validez de la bioquímica moderna, que aparentemente trata de reducir el proceso de la vida a una secuencia de reacciones químicas, "que pueden ocurrir dentro del tubo de ensayo" (13), pero ¿sucederá igual en el interior de la célula viva? y más aún, ¿cómo ocurrirá en organismos multicelulares?.

Las técnicas de resonancia magnética nuclear empiezan a tratar de contestar estas preguntas por su posibilidad de detectar las reacciones químicas tal y como ocurren dentro de las células, tejidos y organismos completos, que incluyen al hombre.

Estas técnicas se basan en que algunos núcleos atómicos cuyos protones y neutrones son impares, tienen propiedades magnéticas intrínsecas que las hacen comportarse como dipolos, es decir como una barra imantada. Tales núcleos incluyen a los protones, o sea al hidrógeno atómico, que forma el 99.9 % de todos los átomos de hidrógeno que se encuentran en la naturaleza. El carbono 13, que es el 1.1 % de todos los átomos de carbono naturales y el fósforo 31, que es el núcleo de todos los átomos de este elemento en la naturaleza.

Con estas técnicas se detectan por ejemplo, las señales provenientes de los átomos de fósforo del ATP en células tumorales de ratón, en donde se ha visto que la señal de cada uno de ellos se ve influida por su ambiente químico, así el pico de absorción del fósforo gamma del ATP y el beta del ADP, están muy cerca pues su medio es similar, tienen a la derecha un grupo fosfato y a la izquierda están libres. El fósforo 31 beta del ATP, está más aislado por que su medio es único, esta flanqueado por grupos fosfato, el alfa y el gamma.

De esta manera se pueden seguir los cambios metabólicos que ocurren en células completas en su medio ambiente propio (fig. 5), como en el caso de Escherichia coli, antes y de 4 a 6 minutos después de agregar glucosa en el medio, lo que produce los cambios que se observan en el fósforo inorgánico y en la producción de ATP.

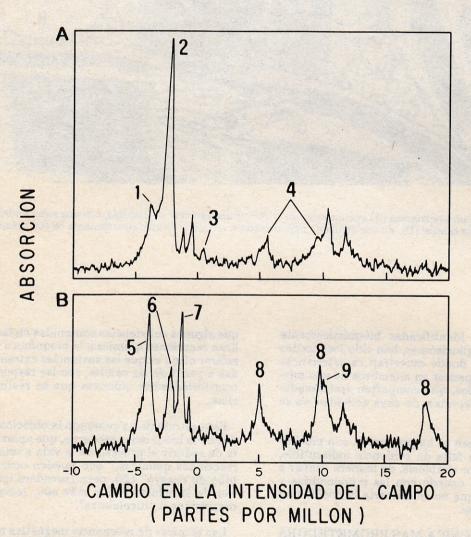


Figura 5 - Efecto del consumo de glucosa sobre los compuestos que contienen fósforo en Escherichia coli. A) Antes de que las células reciban glucosa y B) De 4 a 6 minutos después de recibirla. Los cambios que se muestran pueden deberse al metabolismo del azúcar que produce fructuosa 1-6 difosfato y a la posterior conversión del ADP en ATP.

1) azúcares fosfatados, 2) fosfato inorgánico, 3) fosfoenol piruvato, 4) ADP, 5) fructosa 1-6 difosfato, 6) fósforo inorgánico intracelular, 7) fósforo inorgánico extracelular, 8) ATP, 9) NAD (tomado de Shulman, 1983) (13).

Se ha estudiado también el metabolismo de músculos aislados de ranas, hígado de ratas vivas, glucólisis en levaduras, efectos hormonales en ratas e incluso se han diagnosticado algunas enfermedades musculares en humanos.

Con esta herramienta se está en posibilidad de observar el metabolismo íntegro de un animal completo y de cómo lo afectan los niveles hormonales, la dieta y aún las enfermedades. Esto amplía el entendimiento de cómo se llevan a cabo los procesos bioquímicos en los organismos vivos y ubica en su justo valor las objeciones a la investigación en el tubo de ensaye.

FUTURO DE LA BIOLOGIA CELULAR

Es evidente que los avances conceptuales y la obtención de conocimiento acerca de la Biología Celular, se han desarrollado en paralelo con el diseño de herramientas y técnicas, que permiten indagar y analizar los fenómenos característicos de los organismos vivos.

Las respuestas a las preguntas planteadas, no hubieran sido posibles si no se contara con los métodos de cultivo de tejidos, radioautografía, microscopia electrónica de transmisión, de barrido y de alto voltaje, conjuntamente con las técnicas de criofractura y criograbado, uso de precursores radiactivos, centrifugación diferencial, ensayos de actividades enzimáticas y resonancia magnética nuclear.

Sin embargo, es necesario citar una vez más el trabajo de Carrell de 1931 (4), para dejar claro que: "En el desarrollo de la nueva Citología como en el desarrollo de todas las ciencias, el concepto es más importante que el método. Las técnicas son sólo las sirvientes de las ideas. No tienen gran poder en sí mismas". Es decir toda la tecnología tendría muy poca utilidad, si no existieran las concepciones —la formulación de ideas— que permiten plantear las nuevas preguntas, que son realmente la materia prima del avance de cualquier conocimiento y que por lo general son el producto más valioso de la investigación.

Por lo tanto, este trabajo quedaría incompleto si no se planteara lo que se puede esperar del desarrollo futuro de la Biología Celular y de acuerdo con lo dicho, sin que se definieran algunas de las preguntas más importantes que los avances han generado, que constituyen el reto inmediato y que se podrían resumir de la siguiente manera: La Biología Celular tratará de determinar cómo todo lo que se observa en una célula, está organizado y cómo se regula su morfofisiología a través del conocimiento de cómo las células responden al medio ambiente. Cómo altera esa respuesta la expresión de sus genes. Cómo se comunican unas células con otras. Cómo se diferencian y cómo se relacionan sus funciones especializadas con sus funciones generales.

Así, y de acuerdo con lo que menciona Brachet en 1985 (14), sobre la Bioquímica y la Biología Celular, "Lo que queda por hacer es la tarea difícil e importan-

te de unir a estas dos ciencias más intimamente, ahora que tienen tanto en común".■

REFERENCIAS

- 1 Gabriel, M. L. y Fogel, S. (Eds) (1955). Great experiments in Biology. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA.
- 2 Gall, J. G., Porter, K. R. y Siekevits, P. (Eds) (1981). Discovery in Cell Biology. J. Cell Biol. 91 (3) parte 2.
- 3 Siekevitz, P. (1981). Discovery in Cell Biology. Prefacio II. J. Cell Biol. 91 (3), parte 2.
- 4 Carrel, A. (1931). The new Citology. Science 73, 297-303.
- 5 Thomas, L. (1979). The medusa and the snail. The Viking Press, New York, N. Y. USA.
- 6 Mazia, D. (1974). The cell cycle. Sci. Amer. 230 (1), 54-64.
- 7 Lerner, R. A. y Hodge, L. D. (1971). Gene expression in synchronized lymphocytes: Studies on the control of synthesis of immunoglobulin polypeptides. J. Cell Physiol. 77, 265-276.
- 8 Lehninger, A. L. (1975). Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York, N.Y. USA.
- 9 Porter, K. R. y Tucker, J. B. (1981). The ground substance of the living cell. Sci. Amer. 244 (3), 40-51.
- 10 Bekers, A. G. M., Gijzen, H. J., Taalman, D. F. M. y Wanka, F. (1981). Ultrastructure of the nuclear matrix from *Physarum polycephalum* during the mitotic cycle. J. Ultrastruct. Res. 75, 352-362.
- 11 Nelson, W. G., Pieta, K. J., Barrack, E. R. y Coffey, D. S. (1986). The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. Ann. Rev. Biophys. Chem. 15, 457-475.
- 12 De Duve, C. (1983). Microbodies in the living cell. Sci. Amer. 248 (5), 52-62.
- 13 Shulman, R. G. (1983). NMR spectroscopy of the living cells. Sci. Amer. 248 (1), 76-83.
- 14 Brachet, J. (1985). Molecular Cytology. Academic Press, Inc. Orlando, Florida, USA

PAPEL DE LA FUENTE DE NITROGENO EN LA PRODUCCION FERMENTATIVA DE LOS ANTIBIOTICOS PENICILINA Y CEFALOSPORINA

Sergio Sánchez, Rosa Elena Cardoza y Maria Elena Flores. Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apartado postal 70228. México, D.F. 4510.

RESUMEN

Este trabajo pretende actualizar el conocimiento sobre la regulación que ejerce la fuente de nitrógeno en la síntesis de los antibióticos penicilina y cefalosporina en hongos. En virtud de que ambos antibióticos poseen una estructura peptídica, su formación debe competir por aminoácidos necesarios para la realización de actividades básicas como la síntesis de proteínas. Sin embargo, a través de la evolución, los hongos que los forman han seleccionado mecanismos de control para lograr un balance proporcional entre la producción de la biomasa y la síntesis eficiente de metabolitos secundarios. Consideramos fundamental, para todos aquellos interesados en la síntesis y producción de antibióticos, el aprender lo más posible acerca de los mecanismos de control que regulan su formación. De este modo, el conocimiento ganado podrá ser utilizado como una herramienta para el diseño de estrategías tendientes a elevar los rendimientos de las cepas de que dispongamos.

INTRODUCCION

Una característica común a los sistemas microbianos es su capacidad para sintetizar, a partir de una fuente de carbono y algunas sales inorgánicas, una gran variedad de principios metabólicos necesarios para su crecimiento y reproducción. Para este propósito, miles de reacciones químicas tienen lugar a cada instante dentro de la célula microbiana. Dichas reacciones se encuentran organizadas de tal forma, que el producto de una reacción se convierte en el sustrato de la siguiente y asi sucesivamente, hasta resultar en los productos finales de las vías metabólicas. Estos productos, unidos entre si, son capaces de generar las moléculas grandes y complejas que conforman a los microorganismos. Desde un punto de vista selectivo, se han escogido mecanismos altamente eficientes para la regulación de estos procesos metabólicos para utilizar de manera ventajosa los nutrimentos presentes en el medio. Tales mecanismos permiten a la célula (ya sea por un incremento o una disminución temporal de la actividad y/o la concentración de enzimas cruciales), modular tanto el flujo de metabolitos a través de una vía particular, como la concentración de determinados productos finales.

De entre la gran variedad de metabolitos producidos por los sistemas microbianos, por sus funciones biológicas, formas de acción y aplicaciones terapéuticas, los antibióticos han llamado la atención de los científicos e industriales (1).

Los términos penicilina y cefalosporina se refieren a compuestos bicíclicos en los cuales el anillo beta-lactámico esta unido a un anillo de cinco miembros (tiazolidínico) o a uno de seis miembros (dihidrotiazolidínico), respectivamente (fig. 1).

Se les ha dado el nombre de antibióticos debido a su capacidad para inhibir la síntesis de la pared celular de las bacterias, propiedad que ha permitido su utilización en el tratamiento de infecciones bacterianas (2).

La penicilina y la cefalosporina fueron los primeros antibióticos beta-lactámicos comercialmente disponibles para el tratamiento de infecciones bacterianas tanto en humanos como en animales. Muchos de los antibióticos beta-lactámicos de importancia médica y de reciente introducción han sido obtenidos casi exclusivamente por modificación química de las moléculas de penicilina o cefalosporina. Recientemente también se han hecho modificaciones sobre la molécula de cefamicina C, sustrato beta-lactámico sintetizado por Streptomyces sp., que es utilizado para la producción de antibióticos como el ácido amidinopenicilánico. Otros beta-lactámicos formados por procariontes, incluyen a las nocardicinas, al ácido clavulánico y a los antibióticos carbapenémicos y mono-lactámicos (3).

Han pasado ya casi sesenta años desde el descubrimiento del primer antibiótico beta-lactámico por Alexander Fleming, sin embargo, este grupo de antibióticos continúa dando dividendos de gran importancia médica y científica.

Durante los últimos cinco años se ha observado un avance significativo en el conocimiento del papel que juega la fuente de nitrógeno sobre la producción fermentativa de penicilina y de cefalosporina. En este contexto, la finalidad de este trabajo es presentar a ustedes los hallazgos más recientes en este campo de

Penicilina

Cefalosporina

Figura 1. Estructura química de las penicilinas y cefalosporinas.

investigación así como discutir algunas de las perspectivas más importantes que ofrece el mismo.

A. Vía de biosíntesis

La penicilina y la cefalosporina son producidas por varias especies de microorganismos procariontes y ecuariontes. De entre los eucariontes utilizados para este propósito, solamente *Penicillium chrysogenum* y *Cefalosporium acremonium* han podido destacar comercialmente en cuanto a su habilidad para producir bencilpenicilina y cefalosporina C, respectivamente.

Ambos antibióticos son producto de vías biosintéticas que tienen en común diversos pasos enzimáticos (fig. 2). Todos los microorganismos que producen

penicilina y cefalosporina, sintetizan y utilizan un precursor común denominado delta-(L-alfa-aminoadipil)-L-cisteina (AC). Este compuesto es formado a partir de ácido L-alfa-aminoadípico, L-cisteína y ATP (fig. 3) y representa el primer paso en la vía de biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos (4,5). Posteriormente, con la introducción de L-valina, la cual es epimerizada durante su incorporación, al AC, se sintetiza el péptido Delta-(L-alfa-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina(ACV) (6). Cabe hacer notar en este punto que la adición de inhibidores de la síntesis de proteínas, estimula la formación de ACV in vivo. Este hallazgo es congruente con la idea de que en la síntesis del péptido, los aminoácidos que lo estructuran son condensados sin la participación del sistema ribosomal. Los estudios realizados con extractos libres de células de C. acre-

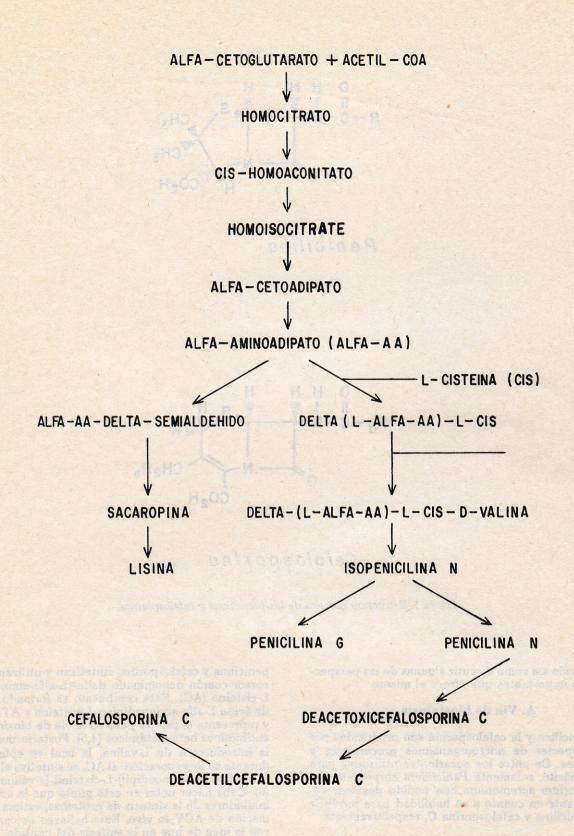


Figura 2. Vías metabólicas para la síntesis de L-lisina y penicilina G en el hongo P. chrysogenum y de L-lisina y cefalosporina C en Cephalosporium acremonium.

monium, han demostrado la presencia de la enzima ACV sintetasa, la cual parece llevar a cabo las primeras dos reacciones de la vía sin que haya necesariamente liberación de AC (6).

La primera penicilina de la vía (isopenicilina N), es sintetizada a partir del ACV por la acción de una enzima de ciclización que presenta requerimientos por fierro y ascorbato para su actividad (isopenicilina N sintetasa o ciclasa). Esta enzima, inicialmente aislada y purificada de C. acremonium, tiene un peso molecular de 40 000, valor que correlaciona bien con el de 39 000 reportado para P. chrysogenum (7). Además del fierro y del ascorbato, Ramos y col. (7), han observado que esta actividad se estimula por oxígeno, sugiriendo que ello se debe a la remoción de los átomos de hidrógeno del ACV, lo cual facilita la ciclización del mismo durante la formación de los anillos beta-lactámico y tiazolidínico respectivos. Dado el papel central de la ciclasa en la biosíntesis de la penicilina y la cefalosporina, la realización de estudios sobre esta enzima, tanto a nivel bioquímico como molecular, ha sido del interés de los científicos en los últimos años. Así, se ha reportado la clonación en Escherichia coli de la información que codifica para la isopenicilina N sintetasa de C. acremonium y de P. chrysogenum (8).

En la última reacción de la biosíntesis de penicilina, el alfa-aminoadipato de la molécula de isopenicilina N es intercambiado por ácido fenilacético. Para ello, este ácido debe ser preactivado en la forma de fenilacetil-CoA. Dicha reacción ocurre por la acción de una aciltransferasa, la cual ha sido aislada y caracterizada de P. chrysogenum (fig. 3) (2).

Por otra parte, para la formación de cefalosporina es necesaria la conversión del intermediario isopenicilina N a penicilina N por una enzima que epimeriza el lado L-alfa-aminoadipil de la molécula a la configuración D. Dicha enzima (isopenicilina N epimerasa), ha mostrado labilidad extrema en extractos libres de células de C. acremonium, por lo que solamente ha sido posible estudiarla en cepas altamente productoras de este antibiótico.

El anillo de la molécula de penicilina N es expandido para formar deacetoxicefalosporina C (DAOC) por la acción de la DAOC sintetasa. Esta enzima, también llamada expandasa, es una dioxigenasa inestable que se estimula por fierro (Fe²⁺), ascorbato y alfa-cetoglutaro. La DAOC sintetasa ha sido purificada de C. acremonium y presenta un peso molecular de 41 000. Además, muestra una alta especificidad por la cadena lateral que está adherida al núcleo de la penicilina.

La siguiente reacción de la vía es la hidroxilación del DAOC para formar deacetilcefalosporina C (DAC). Esta reacción es catalizada por una dioxigenasa conocida como DAOC hidroxilasa. Para su actividad, la enzima requiere de alfa-cetoglutarato, ascorbato y Fe²⁺. Scheidegger y col. (9), con la ayuda de técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida, han obtenido evidencia de que las dos últimas reacciones son

catalizadas por una sola proteína con un peso molecular de 33 000. Ambas reacciones requieren de alfa-ceto-glutarato, FeSO₄, ascorbato y oxígeno. En un trabajo reciente que trata sobre la purificación de las dos enzimas, se ha podido confirmar la existencia de una enzima bifuncional en *C. acremonium*

La cefalosporina C es el producto final de biosíntesis en C. acremonium. Esta es formada acetilando DAC, por acción de la acetil-CoA: deacetilcefalosporina C acetiltransferasa (fig. 3).

B. Fermentación

La mayoria de los procesos patentados para la producción de penicilina y cefalosporina consisten de un proceso fermentativo en lote, en el cual el microorganismo productor (P. chrysogenum o C. acremonium) es inoculado dentro de un fermentador en un medio de cultivo especifico, e incubado bajo condiciones de agitación y aereación controladas. Los ingredientes utilizados en el medio de fermentación generalmente se componen de una mezcla de materias primas de tipo orgánico y algunas sales. Con frecuencia los sustratos de tipo orgánico vienen a ser subproductos de otros procesos industriales. Sin embargo, no existe una receta mágica para la preparación del medio de cultivo. Varias industrias han optimizado sus propios medios de producción y cuando han incorporado una nueva mutante a la misma, ha sido necesario su reoptimización para alcanzar los títulos deseados. Las formulaciones típicas incluyen glucosa o melaza (adicionándolas de manera contínua), licor de maíz, manteca de cerdo como antiespumante (por adición contínua) y precursores específicos o inductores tales como el ácido fenilacético para la producción de penicilina, o de metionina para la síntesis de cefalosporina (10). En algunos casos, los medios pueden ser suplementados con sales inorgánicas. El licor de maíz ha probado ser una valiosa fuente de nitrógeno, pues contiene una amplia variedad de aminoácidos, péptidos y proteínas, además de diversos elementos traza.

Otras fuentes de nitrógeno utilizadas con frecuencia son la harina de cacahuate y el sulfato de amonio. El medio puede ser esterilizado en el mismo fermentador o por separado. La mayoría de los procesos fermentativos para la producción de estos antibióticos utiliza un intervalo de temperatura de 25° a 30° C en dos fases de operación (10). La primera fase (desarrollo del inóculo), se lleva a cabo de manera secuencial en sistemas de fermentación de tamaño creciente. La segunda fase se efectúa generalmente en un solo reactor de gran tamaño y corresponde a la etapa de síntesis del antibiótico. Los niveles máximos de producción se alcanzan después de 6 a 8 días de fermentación.

REGULACION POR NITROGENO

A. Inducción de la vía de biosíntesis de beta-lactámicos

La capacidad de los microorganismos para sintetizar rápidamente ciertas enzimas sólo cuando están pre-

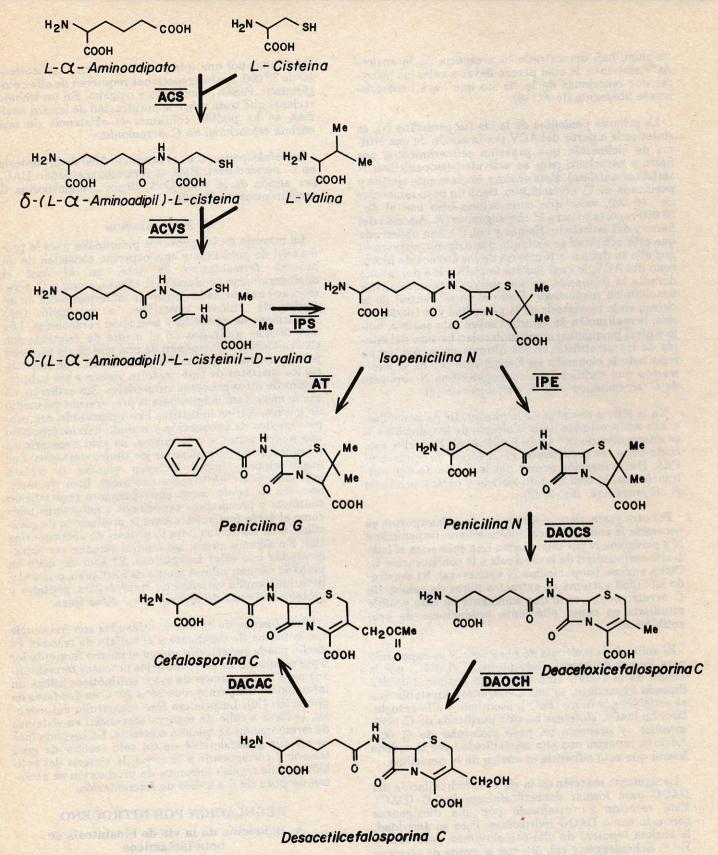


Figura 3. Estructura química de los intermediarios involucrados en las vías de biosíntesis de los antibióticos penicilina G y cefalosporina C en P. chrysogenum y C. acremonium, respectivamente.

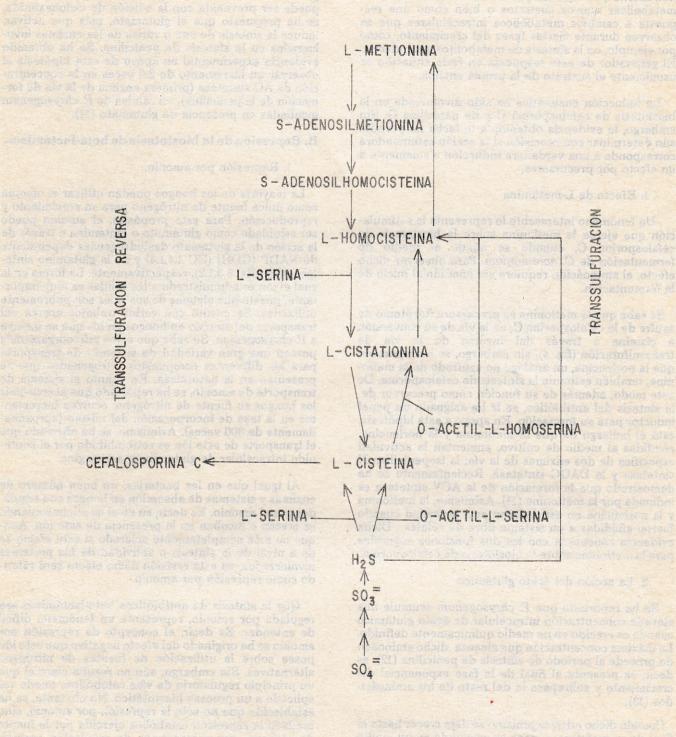


Figura 4. Destinos metabólicos del azufre en C. acremonium.

sentes los sustratos adecuados en el medio, constituye un mecanismo regulador muy efectivo de la biosíntesis y utilización de muchos compuestos. Esta forma rápida de responder a los cambios en el abastecimiento de nutrimentos, es utilizada por los microorganismos para metabolizar nuevos sustratos o bien como una respuesta a cambios metabólicos intracelulares que se observan durante ciertas fases del crecimiento, como por ejemplo, en la síntesis de metabolitos secundarios. El generador de esta respuesta en cada situación es usualmente el sustrato de la propia enzima.

La inducción enzimática ha sido involucrada en la biosíntesis de cefalosporina C y de penicilina G. Sin embargo, la evidencia obtenida a la fecha no permite aún determinar con precisión si la acción estimuladora corresponde a una verdadera inducción o solamente a un efecto por precursores.

1. Efecto de L-metionina

Un fenómeno interesante lo representa la estimulación que ejerce la metionina sobre la biosíntesis de cefalosporina C, cuando se añade al medio de fermentación de *C. acremonium*. Para observar dicho efecto, el aminoácido requiere ser añadido al inicio de la fermentación.

Se sabe que la metionina es precursora del átomo de azufre de la cefalosporina C, en la vía de su conversión a cisteína a través del inverso de la vía de transsulfuración (fig. 4), sin embargo, se ha reportado que la norleucina, un análogo no azufrado de la metionina, también estimula la síntesis de cefalosporina. De este modo, además de su función como precursor de la síntesis del antibiótico, se le ha asignado un papel inductor para su formación. En apoyo a esta hipótesis, está el hallazgo de que la metionina y la norleucina, añadidas al medio de cultivo, aumentan la actividad específica de dos enzimas de la vía; la isopenicilina N sintetasa y la DAOC sintetasa. Recientemente se ha demostrado que la formación de la ACV sintetasa es inducida por la metionina (11). Asimismo, la metionina y la norleucina no estimularon esta actividad cuando fueron añadidas a un sistema libre de células. Dicha evidencia concuerda con las dos funciones sugeridas para la metionina sobre la biosíntesis de cefalosporina.

2. La acción del ácido glutámico

Se ha reportado que *P. chrysogenum* acumula una elevada concentración intracelular de ácido glutámico cuando es crecido en un medio químicamente definido. La máxima concentración que alcanza dicho aminoácido precede al período de síntesis de penicilina (12), es decir, se presenta al final de la fase exponencial del crecimiento y sobrepasa la del resto de los aminoácidos (13).

Cuando dicho microorganismo se deja crecer hasta el final de su trofofase y luego se suspende en un medio compuesto de concentraciones limitantes de nutrimentos(insuficientes para sustentar el crecimiento), es capaz aún de producir penicilina. Bajo tales condiciones, la suplementación del medio con glutamato, estimula la producción del antibiótico (4). Considerando que la estimulación también es ejercida por análogos no metabolizables del glutámico y que esta acción puede ser prevenida con la adición de cicloheximida, se ha propuesto que el glutamato, más que activar, induce la síntesis de una o varias de las enzimas involucradas en la síntesis de penicilina. Se ha obtenido evidencia experimental en apoyo de esta hipótesis al observar un incremento de 3.5 veces en la concentración de AC sintetasa (primera enzima de la vía de formación de la penicilina), en células de *P. chrysogenum* incubadas en presencia de glutamato (14).

B. Represión de la biosíntesis de beta-lactámicos.

1. Represión por amonio.

La mayoría de los hongos pueden utilizar el amonio como única fuente de nitrógeno para su crecimiento y reproducción. Para este propósito, el amonio puede ser asimilado como glutamato o glutamina a través de la acción de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (GDH) (EC 1.4.1.4) y de la glutamino sintetasa (GS) (EC 6.3.1.2), respectivamente. La forma en la cual el ión es administrado a las células es muy importante, puesto que algunas de sus sales son pobremente utilizadas. Se cuenta con varios trabajos acerca del transporte del amonio en hongos en los que se incluye a P. chrysogenum. Se sabe que estos microorganismos poseen una gran variedad de sistemas de transporte para los diferentes compuestos nitrogenados que se presentan en la naturaleza. En cuanto al sistema de transporte de amonio, se ha reportado que al consumir los hongos su fuente de nitrógeno, ocurren incrementos en la tasa de incorporación del mismo (aproximadamente de 800 veces). Asimismo, se ha afirmado que el transporte de este ión es retroinhibido por el contenido intracelular de glutamina y asparagina.

Al igual que en las bacterias, un buen número de enzimas y sistemas de absorción en hongos son regulados por el amonio. Es decir, su nivel es mínimo cuando se crecen o incuban en la presencia de este ión. Aunque no está completamente aclarado si este efecto se da a nivel de la síntesis o actividad de las proteínas involucradas, en esta revisión dicho efecto será referido como represión por amonio.

Que la síntesis de antibióticos beta-lactámicos sea regulada por amonio, representa un fenómeno difícil de entender. Es decir, el concepto de represión por amonio se ha originado del efecto negativo que este ión posee sobre la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas. Sin embargo, aún no resulta claro el que un principio regulatorio de vías catabólicas pueda ser aplicado a un proceso biosintético. No obstante, se ha establecido que no sólo la represión por amonio, sino también la represión catabólica ejercida por la fuente de carbono, son mecanismos de regulación normalmente involucrados en la síntesis de antibióticos beta-lactámicos y de otros metabolitos secundarios. Bajo tal

condición, su síntesis puede ser vista como una forma de utilizar el nitrógeno intracelular, hasta conseguir su excreción fuera de la célula.

Independientemente de las consideraciones anteriores, durante los últimos cinco años, varios grupos de investigación se han interesado por estudiar el efecto negativo que ejerce el amonio sobre la biosíntesis de los antibióticos beta-lactámicos. El hecho de que la represión por amonio juega un papel importante en la formación de penicilina fue demostrado inicialmente en P.chrysogenum (12). Este hongo produce penicilina cuando se crece en un medio químicamente definido con cloruro de amonio (8.5 mM) como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, la formación del antibiótico se reduce drásticamente al aumentar la concentración de amonio en el sistema de fermentación (100 mM). mientras que el pH del medio y el crecimiento no se ven afectados. Una respuesta similar se ha observado en cultivos de C acremonium crecidos en un medio químicamente definido suplementado con asparagina (14). En este ejemplo, cantidades crecientes de sulfato de amonio interfieren de manera significativa con la formación de cefalosporina, pero estimulan la acumulación de un intermediario de la vía (penicilina N).

a. Enzimas involucradas.

Aunque algunos de los intermediarios de las vías de síntesis de penicilina y cefalosporina fueron establecidos desde hace ya varios años, no fue sino hasta hace poco que se logró la caracterización de las enzimas involucradas en el proceso. Bajo estas circunstancias, muchos de los efectos reguladores de la biosíntesis que habian sido reconocidos previamente, pueden ahora ser definidos a nivel bioquímico. Shen y col. (14), en C. acremonium, obtuvieron la evidencia de que el amonio reprime la formación de la DAOC sintetasa (fig. 3). Dicho efecto se tradujo en una disminución en la producción de cefalosporina C y en la acumulación de penicilina N. Otras enzimas de la vía también fueron afectadas. Así por ejemplo, los niveles obtenidos de ACV sintetasa en presencia de un exceso de amonio fueron muy bajos. Por el contrario la isopenicilina N sintetasa no fue afectada.

b. Posibles efectores.

La represión por amonio constituye un mecanismo regulador presente tanto en procariontes como en eucariontes. No se conoce, al menos en los hongos, el mecanismo exacto involucrado en la acción de este ión, sin embargo, existen especulaciones al respecto.

Como se mencionó anteriormente, si se crecen células de P. chrysogenum y de C.acremonium en un medio con amonio como única fuente de nitrógeno, lo asimilan como glutamato y glutamina por medio de la acción de las enzimas NADP-GDH y GS respectivamente. De este modo, los estudios realizados con P. chrysogenum, han demostrado que la adición de una alta concentración de amonio al medio de fermentación, incrementa el contenido intracelular de glutamato, a la vez que disminuye los niveles de NADP-GDH y de GS en un 50 y 80% respectivamente.

Que la NADP-GDH pueda estar involucrada en el mecanismo de represión por amonio, fue sugerido por estudios realizados con mutantes de Saccharomyces cerevisiae y Aspergilius nidulans, carentes de esta actividad gdhA. Bajo estas condiciones, la síntesis de las enzimas involucradas en la utilización de diversas fuentes de nitrógeno, se volvió insensible a la represión ejercida por el amonio y su comportamiento no se modificó por la adición de glutamato al medio de cultivo. Dicha evidencia es congruente con la presencia de esta enzima para llevar a cabo esta represión. Sin embargo, se han obtenido resultados en contra de esta hipótesis en una cepa gdhA de S. cerevisae, al demostrar que si bien la síntesis de asparaginasa II (enzima involucrada en la utilización de asparagina como fuente de nitrógeno) es insensible concentraciones altas de amonio, su síntesis se ve afectada por la adición de bajas concentraciones de este

Independientemente de las consideraciones anteriores, la aplicación de la estrategia antes descrita a nuestras condiciones experimentales (empleando cepas de P. chrysogenum con una baja producción de NADP-GDH), se ha visto limitada. Esto se debe a que dicha mutante no produce antibiótico cuando se crece en presencia de diferentes concentraciones de amonio, sino únicamente cuando se cultiva en presencia de glutamato. Por otro lado, debido a que el amonio interfiere con el transporte de dicho aminoácido al interior de la célula, resulta imposible, bajo estas condiciones, probar el efecto de concentraciones elevadas del ión sobre la síntesis de penicilina en presencia de dicho aminoácido. De este modo, nuestro grupo de investigación no ha podido correlacionar el mecanismo de represión por amonio con la presencia de esta enzima.

Otra enzima que con frecuencia se ha considerado como determinante en la regulación por amonio es la GS. En *P. chrysogenum* esta actividad se reprime por amonio de manera similar a la formación de penicilina (12). Asimismo, bajo condiciones de derrepresión de la misma, se producen niveles altos del antibiótico. Sin embargo, aún es necesario obtener mayor evidencia genética y bioquímica para formarse una idea clara de su papel.

Puesto que una respuesta afirmativa concerniente a la participación de la GDH o de la GS no puede ser obtenida con la información disponible, queda abierta la posibilidad de que el amonio mismo o un producto de su metabolismo, se encuentren involucrados en la represión.

Que el amonio per se, sea el responsable directo de la represión nitrogenada fue sugerido al observar que la metilamina, un análogo no metabolizable de este ión, reprime la esporulación en S.cerevisiae.

A su vez, la glutamina ha sido propuesta como corre-

presora de la nitrato reductasa en Neurospora crassa. Se piensa que la glutamina interactúa con el gene nit-2, el cual parece codificar para la síntesis de una proteína reguladora responsable de la activación de varios genes estructurales del metabolismo del nitrógeno (15). Sin embargo, no ha sido definida la naturaleza exacta de este mecanismo y no se sabe, si además de nit-2, otros genes puedan jugar también un papel dentro del sistema, como elementos de control.

Es claro que para avanzar en el esclarecimiento del mecanismo regulatorio de la represión por amonio de los compuestos beta-lactámicos, será necesario el aislamiento de genes involucrados en su biosíntesis (estructurales y reguladores), de tal manera que sus interacciones no puedan ser examinadas a nivel molecular.

C. Estimulación de la formación de compuestos beta-lactámicos

1. Acido alfa-aminoadípico.

Ha sido establecido que la síntesis de productos finales en una vía metabólica dada (además de las enzimas involucradas), depende directamente de la diponibilidad de sus precursores. La formación de antibióticos beta-lactámicos no es la excepción a esta regla. Se sabe por ejemplo que la biosíntesis de penicilina en P. chrysogenum, requiere de un abastecimiento apropiado de los aminoácidos de valina, cisteína y alfa-aminoadipato. Aunque sólo los dos primeros aminoácidos forman parte del núcleo final de la penicilina, diversos estudios han demostrado la necesidad de alfa-aminoadipato para la operación de esta vía de biosíntesis. Asimismo, se ha observado que el alfa-aminoadipato ejerce una acción estimuladora sobre la formación del antibiótico y que este efecto es aún mayor en presencia de L-lisina, producto final de la vía (13).

D. Inhibición de la síntesis de antibióticos beta-lactámicos

1. El efecto de la lisina.

Hace más de 30 años que se descubrió que la L-lisina es un potente inhibidor de la síntesis de la penicilina en el hongo P. chrysogenum. Posteriormente encontraron que el alfa-aminoadipato no solo revertía este efecto, sino que también estimulaba la producción de penicilina. El hallazgo en hongos, de la participación del alfa-aminoadipato como un intermediario de la biosíntesis de la lisina, sugirió alguna forma de relación metabólica entre estos dos compuestos (fig.2). Bajo estas condiciones, se propuso que la inhibición que ejercía la lisina sobre la producción de penicilina, podría ser el resultado de una retrorregulación de este aminoácido sobre su propia biosíntesis. Ello provocaría una disminución en la síntesis de alfa-aminoadipato que podría destinarse para la formación de penicilina. Evidencia en apoyo a dicha propuesta, fue obtenida en una mutante de P. chrysogenum que presentaba un bloqueo en los pasos finales de la síntesis de la lisina. Con esta cepa se observó una relación inversa entre la acumulación intracelular de alfa-aminoadipato y la concentración de lisina presente en el medio de cultivo. Posteriormente utilizando una mutante de P. chrysogenum con un bloqueo en la parte inicial de la vía de síntesis de lisina y capaz de incorporar precursores radioactivos en la molécula del antibiótico, se demostró que la presencia de este aminoácido en el sistema de incorporación, inhibe marcadamente la biosíntesis del antibiótico. El sitio de acción de la lisina fue establecido utilizando una mutante de P.chrysogenum parcialmente auxótrofa para este aminoácido. Bajo estas condiciones, se observó que la lisina inhibe tanto la acumulación in vivo de homocitrato, como la capacidad de las células para producir homocitrato a partir de acetato de sodio. Además, en virtud de que el ácido homocítrico revierte la inhibición ejercida por la lisina en un sistema de células en reposo, se estableció a la homocitrato sintetasa como la enzima clave en esta acción.

Los estudios recientes sobre este efecto, en cepas de alta y baja producción de penicilina, han demostrado que la adición de las altas concentraciones de lisina al medio de fermentación, reprimen la síntesis de la homocitrato sintetasa (16).

En 1963 fue reportado un efecto similar sobre la biosíntesis de cefalosporina C en C. acremonium. Poco después se observó que la acción inhibitoria de la lisina se revertía con la adición de alfa-aminoadipato. Estos resultados apoyaron la hipótesis, de que en este microorganismo, la lisina también reduce la formación de cefalosporina C, limitando la formación alfa-aminoadipato, precursor común a ambas vías de biosíntesis.

CONCLUSIONES

Finalmente, la vía de biosíntesis de los antibióticos penicilina y cefalosporina en los hongos P. chrysogenum y C. acremonium, puede ser descrita con la confianza de que sus principales pasos e intermediarios han sido caracterizados. Este conocimiento nos abre nuevas posibilidades de estudio y de aplicación en campos tales como la enzimología del metabolismo secundario, la ingeniería genética de la información que codifica para la síntesis de las enzimas que las producen, el empleo de estas enzimas para la manufactura de nuevos antibióticos y el estudio de la regulación del metabolismo secundario. Este potencial de aplicación se presenta ahora en grupo de antibióticos comercialmente importante ya que gran parte de los seis billones de dólares del mercado de los beta-lactámicos, tiene que ver con la producción de penicilinas y cefalosporinas a partir de la modificación química de estos mismos compuestos.

Aún y cuando todavía nos encontramos en la fase descriptiva con respecto a nuestro conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la regulación nitrogenada de la síntesis de antibióticos beta-lactámicos, creemos que el entrar al nivel molecular de este importante fenómeno, se traducirá en un salto cuantioso en nuestro conocimiento y aplicaciones derivadas del mismo.

REFERENCIAS

- 1. Berdy, J. (1980). Recent advances in and prospects of antibiotic research. Proc. Biochem. 15 (Nos. 10, 11), 28-35.
- 2. Waxman, D.J., & Strominger, J.L. (1982). \(\mathcal{B}\)-Lactam antibiotics: biochemical modes of action. En: The Chemistry and Biology of \(\mathcal{B}\)-Lactam Antibiotics, Vol. 3. Editores: Morin, D., and Gorman, M. Academic Press, Inc, New York. pp. 209-285.
- 3. Demain, A.L. (1983). Biosynthesis of ß-lactam antibiotics. En: Antibiotics containing the ß-lactam structure, Parte 1. Editores: Demain, A.L. & Solomon, N.A. Springer-Verlag, Berlín. pp. 189-228.
- 4. Lara, F., Mateos, R.C., Vázquez, G. y Sánchez, S. (1982). Induction of penicillin biosynthesis by L-glutamate in *Penicillium chrysogenum*. Biochem. Biophys, Res. Commun. 105, 172-178.
- 5. Banko, G., Wolfe, S. & Demain, A.L. (1986). Cell-free synthesis of δ·(L-α-aminoadipyl)-L-cysteine, the first intermediate of penicillin and cephalosporin biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 13 528-535.
- 6. Banko, G., Demain, A.L. & Wolf, S. (1987). & -(L-a-Aminoadipyl)-L-cysteinyl- D-valine synthetase, a multifunctional enzyme with broad substrate specificity for the synthesis of penicillin and cephalosporin precursors. J. Am. Chem. Soc. 109, 2858-2866.
- 7. Ramos, F.R., López-Nieto, M.J. y Martín, J.F. (1985). Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ-(L-α-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. Antimicrob. Agents Chemother. 27, 380-387.
- 8. Carr, L.G., Skatrud, P.L., Scheetz, M.E., Queener, S.W. e Ingolia T.D. (1986). Cloning and expression of

- the isopenicillin N synthetase gene from *Penium* chrysogenum. Gene. 48, 257-266.
- 9. Scheidegger, A., Kuenzi, M.T. y Nuesch, J. 34). Partial purification and catalytic properties a bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway ß-lactams in Cephalosporium acremonium. J. Antot. 37, 522-531.
- 10. Hersbach, G.J.M., van der Beek, C.P. y van Dk, P.W.M. (1984). The penicillins: properties, biosynesis, and fermentation. En; Biotechnology of Indusal Antibiotics. Editor: Vandamme, E.J., Marcel Dekr, Inc., New York. pp. 45-140.
- 11. Zhang, J. -Y., G., Wolfe, S. y Demain, A.L. (198) Effect of ammonium as nitrogen source on production δ -(L- α -aminoadipyl-L-cysteinil-D-valine synthetas by Cephaslosporium acremonium C-10 J. Antibiot. 40 1746-1750.
- 12. Sánchez, S., Paniagua, L., Mateos, R.C., Lara, F. y Mora, J. (1981). Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. En: Advances in Biotechnology, Vol. 3, Editores: Vezina, C. y Singh, K. Pergamon Press. Toronto. pp. 147-154.
- 13. Jaklitsch, W.M., Hampel, W., Rohr, M. y Kubicek, C.P. (1986).α-Aminoadipate pool concentration and penicillin biosynthesis in strains of *Penicillium chrysogenum*. Can. J. Microbiol. 32, 473-480.
- 14. Shen, Y.-Q., Heim, J., Solomon, N.A., Wolfe, S. y Demain, A.L. (1984). Repression of ß-lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. J. Antibiot. 37, 503-511.
- 15. Fu. Y.-H. & Marzluf, G.A. (1987). Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. Molec. Cell. Biol. 7, 1691-1696.
- 16. Luengo, J.M., Revilla, G., López, M.J., Villanueva, J.R. y Martín, J.F. (1980). Inhibition and repression of homocitrate synthetase by lysine in *Penicillium chrysogenum*. J. Bacteriol. 144, 869-876.

INSTRUCCIONES PARA LOS

COLABORADORES DEL BOLETIN

DE EDUCACION BIOQUIMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la bioquímica y en áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes no especializados, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea simple explícita y didáctica. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Solicitamos a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial.

I. ARTICULOS DE REVISION

- 1) El manuscrito no debe exceder de 12 cuartillas escritas a máquina a doble espacio (27 renglones por cuartilla y. 70 golpes por renglón).
- 2) Se aceptarán como máximo 6 figuras o tablas. Las cuales se entregaran por separado en papel albanene con tinta o como fotografías brillantes a blanco y negro. La limitación en el número de figuras, tablas y referencias obliga a los autores a que seleccionen aquellas realmente importantes e informativas. Numere las figuras con números arábigos y las tablas con números romanos. Adicione las leyendas y pies de figura en una hoja aparte. Considere que las figuras y tablas serán reducidas de tamaño, aproximadamente a 1/2 o 1/4 de la hoja carta, las letras o números más pequeños no deben ser menores a los 2 mm.
- 3) Sugerimos un máximo de 10 referencias tanto específicas como lecturas recomendadas numeradas en el texto en forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada referencia debe contener: nombre(s) del autor(es), año entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, volumen a cursiva y el número de la primera y última páginas.
 - a) Miller, C.O. (1982). Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. Plan Phusiol, 69, 1274-1277.

- b) Larkins, B.A., Pearlmutter, N.L. y Hurkman, W. J. (1979). The mechanism of zein synthesis and deposition in protein bodies of maize endesperm. En The Plant Seed. Development, Preservation, and Germination, Editores: Rubenstein, I., Phillips. R.L., Green, C.E. y Gengenbach, B.G. Academic Press. New York. pp. 49-55.
- 4) Evite hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes utilizadas en el texto deberán, enlistarse en la primera página.

II. OTRAS COMUNICACIONES

- El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, bolsa de trabajo, etc.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera muy explícita.
- 3) El manuscrito debe ser de una o cuatro cuartillas de longitud, escritas en máquina a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por línea).
- 4) Se aceptarán un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto. En casos en que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o tabla.

Los manuscritos serán leídos por dos revisores, uno de ellos familiarizado con el tema y el otro ajeno al mismo. Las correcciones y sugerencias se comunicarán el primer autor.

Envíe el original y dos copias de los manuscritos a la Dra. Yolanda Saldaña de Delgadillo. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Apdo. Postal 70-159, Delegación Coyoacán, 04510 México, D.F., o al Dr. Alberto Hamabata, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D.F., o bien a través del corresponsal BEB.