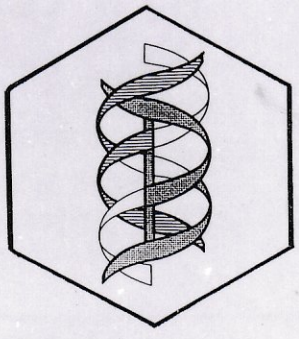
ISSN-0187/294X

BEB 97

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

Vol. 16 No. 1 MARZO 1997

COMITÉ EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

EDITORES

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

EDMUNDO CHÁVEZ COSÍO
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

JAIME MAS OLIVA
Facultad de Medicina e Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES
Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

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

EDITOR ASOCIADO

MA TERESA ELIZABETH FLORES RODRÍGUEZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

APOYO SECRETARIAL

ELISA MORA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, AC

Facultad de Medicina,
UNAM

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, CP 04510 México, D F. Certificados de: Licitud de Título No 6703; Licitud de Contenido No 6989; No de expediente 1/432"92"/8443; Reserva al título en derecho de autor No 6703. Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA** (Indice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,500 ejemplares.

EDITORIAL

LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS

Una situación verdaderamente difícil es la que se vive en diversas clínicas y hospitales del mundo, por el surgimiento de microorganismos patógenos que presentan resistencia a diversos grupos de antibióticos. Tal situación no ha podido ser contrarrestada de manera eficiente, por la limitada generación de antibióticos con mejores propiedades clínicas o derivados químicos de los mismos con menores efectos colaterales. Se puede tomar como ejemplo el sonado caso del Hospital Civil de Guadalajara, en el que durante los meses de julio y agosto de 1996, 11 de 23 niños murieron infectados con una cepa de *Enterobacter cloacae,* microorganismo patógeno altamente resistente a los antibióticos beta-lactámicos (entre los que se incluyen a la penicilina y a las cefalosporinas). Para combatirlo, no fueron suficientes las cefalosporinas de tercera generación, principios caracterizados por inhibir la acción de las beta-lactamasas, enzimas que son producidas por esta y otras bacterias y que les permite resistir la acción de este tipo de antibióticos.

Metafóricamente hablando, se lleva a cabo una verdadera batalla entre la medicina, por un lado, y los microorganismos patógenos, por el otro. Los gérmenes responden de manera inmediata y precisa siempre que ocurre la introducción de un nuevo antibiótico para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

En relación con este acontecimiento y al usar un enfoque concebido después de más de 30 años de investigación sobre la química, la bioquímica y la microbiología de los antibióticos beta-lactámicos, se han abordado y se abordan nuevos intentos para la resolución de este problema por diversos grupos de investigación en el mundo.

Como es sabido, los antibióticos beta-lactámicos funcionan al interferir con la biosíntesis de la pared celular de las bacterias. Las enzimas blanco de esta acción, son conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBPs). Estas son un tipo muy especial de proteasas de serina y según el microorganismo de que se trate, se pueden encontrar de 4 a 8 diferentes PBPs en los mismos. Los antibióticos beta-lactámicos bloquean la acilación del grupo oxhidrilo de la serina presente en el sitio activo de estas enzimas. Al resultar inhibidas, la pared celular de las bacterias no puede formarse de manera apropiada y resulta debilitada. Como consecuencia de esta acción, la célula se hace permeable al agua, se hincha, estalla y muere.

Además de las PBPs, algunas bacterias producen también beta-lactamasas. Ambos sistemas enzimáticos exhiben cinéticas similares de actividad en presencia de penicilina, pero difieren en su constante de velocidad, lo cual resulta en un comportamiento macroscópico distinto. La

interacción de estos sistemas con la penicilina puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$E + I \xrightarrow{k_1} E{\cdot}I \xrightarrow{k_2} E\text{-}I' \xrightarrow{k_3} E + \text{beta-lactámico degradado}$$

donde E es la enzima, I es el sustrato que reacciona inicialmente con la enzima y forma un complejo no-covalente E·I. En el segundo paso se forma un complejo covalente peniciloil-enzima E-I´, el cual se hidroliza regenerando la enzima y dejando al antibiótico degradado. Una característica de este esquema es que el átomo de oxígeno del grupo oxhidrilo de la serina participa en dos procesos consecutivos que incluyen por un lado su adición al grupo carbonilo del anillo beta-lactámico y por otro la conversión del complejo enzima-sustrato (E·I) a un complejo peniciloil-enzima (E-I´) con una constante de velocidad k2. Después, el complejo acil-enzima es hidrolizado con una constante de velocidad k3. En las PBPs, k2 es mucho mayor que k3, típicamente por un factor de 10. En tales casos, la enzima es inactivada y entonces puede observarse la función antibacteriana. Por el contrario, en las beta-lactamasas, k2 y k3 son del mismo orden de magnitud, lo cual permite que la enzima sea regenerada, con la consecuente hidrólisis del anillo e inactivación del antibiótico. Esta secuencia de reacciones, que termina en el paso k3, comprende el mecanismo principal de resistencia bacteriana a estos antibióticos.

De este modo, es teóricamente posible el diseño de compuestos que formen complejos con las enzimas "reconocedoras" de penicilina, de tal forma que lleguen al paso k2 y que permitan la actividad antibacteriana, pero que sean incapaces de una reacción posterior, lo que evitará la formación del paso k3, que conduce a la resistencia.

El apoyo de esta hipóteis se ha obtenido de un estudio amplio y extenso de los 3 procesos consecutivos: 1) el paso inicial de la formación del complejo E·I; 2) el mecanismo preciso del paso k2 y 3) el mecanismo pormenorizado del paso k3. Todo este trabajo, que incluye el análisis teórico detallado de los pasos 1 a 3, ha conducido al grupo del Dr Saul Wolfe, de la Universidad de Queens, Kingston Ontario en Canadá, a iniciar pruebas experimentales de la hipótesis central, por medio del diseño, síntesis y evaluación de nuevas especies de estructuras químicas. Una predicción importante del modelo elaborado por este científico, es que los compuestos dirigidos hacia el receptor de la penicilina, no necesitan poseer un anillo beta-lactámico para ejercer su acción. En este sentido, las tendencias en las actividades antibacterianas y el nivel de actividad que se ha encontrado en los compuestos preparados hasta la fecha, parecen ser consistentes con las predicciones teóricas. Así por ejemplo, el grupo de trabajo del Dr Okasaki, del Central Research Division, de la Takeda Chemical Industries, Ltd, en Osaka, Japón, ha reportado la producción de la lactivicina, antibiótico natural que, sin ser de tipo beta-lactámico, muestra actividades biológicas comúnmente observadas en los beta-lactámicos, tales como acción moderada contra gérmenes Gram-negativos y muy activos contra los Gram-positivos. También, ha mostrado capacidad de inhibir a las beta-lactamasas así como de inducir la síntesis de las mismas. Su blanco de acción en *Escherichia coli* resultaron ser las proteínas PBPs y a bajas concentraciones, es capaz de destruir a esta bacteria. En síntesis, la lactivicina es el primer antibiótico que puede unirse a las proteínas PBPs sin ser de tipo beta-lactámico. Tal compuesto fue utilizado con gran éxito en el tratamiento de infecciones bacterianas en el Hospital Civil de Guadalajara, para combatir a los microorganismos resistentes a la penicilina.

Sergio Sánchez Esquivel
Departamento de Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS

Rosana Benítez y Julio O. Rojas
Laboratorio de Fermentaciones, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Si bien se conocen la mayoría de las rutas de biosíntesis, así como las características de las principales enzimas en la formación de los β-lactámicos, aún no están totalmente esclarecidos algunos de los pasos y el papel de diversos intermediarios y enzimas en la formación de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas. Las principales enzimas que participan en la síntesis de β-lactámicos han sido estudiadas, tanto en su forma pura, como en extractos libres de células. Aún no se conocen algunos procesos de la formación del tripéptido precursor en la biosíntesis tanto de penicilina como de cefalosporinas. También son poco conocidas las enzimas que participan en las últimas reacciones de formación de cefamicinas.

PALABRAS CLAVE: Antibióticos, β-lactámicos, biosíntesis, metabolitos secundarios, enzimas.

ABSTRACT

Although most of the enzymes and precursors involved in the formation of β-lactam antibiotics have already been established, there are still some questions about the role of some enzymes and intermediates of the penicillins, cephalosporins and cephamicins pathways. The most important enzymes of these pathways have been studied either with the purified proteins or in cell-free systems. However, some steps in the formation of the tripeptide, which is the biosynthetic precursor of penicillins and cephalosporins, and the late enzymes of the cephamicins, still remain unknown.

KEY WORDS: Antibiotics, β-lactams, biosynthesis, secondary metabolites, enzymes.

INTRODUCCIÓN

La penicilina es un antibiótico β-lactámico y su síntesis se inicia con la formación de un tripéptido constituido por el ácido α-aminoadípico, cisteína y valina. A partir de este tripéptido se origina la isopenicilina N, la cual por condensación con la fenilacetil-CoA, genera la penicilina G. En los microorganismos que sintetizan cefalosporinas, la isopenicilina N es isomerizada a penicilina N, la que posteriormente origina la desacetoxicefalosporina C. A partir de este último compuesto se forma desacetilcefalosporina C, precursor inmediato de la cefalosporina C (Fig. 1).

ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA BIOSÍNTESIS DE LA PENICILINA

La mayoría de los estudios reportados para el establecimiento y caracterización de las enzimas que participan en la formación de penicilina se han llevado a cabo con extractos acelulares. Las enzimas que intervienen en la síntesis de penicilina G son: la L-α-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina sintetasa (ACV sintetasa), la isopenicilina-N-sintasa, la isopenicilina N-aciltransferasa, la isopenicilina N-amidasa y la 6-aminopenicilánico aciltransferasa (1).

BIOSÍNTESIS DE L-α-AMINOADIPIL-L-CISTEINIL-D-VALINA (ACV)

Este tripéptido es un intermediario en la vía biosintética de la penicilina, las cefalosporinas y las cefamicinas. El compuesto ha sido aislado e identificado en el micelio de varios microorganismos y en extractos celulares de los mismos. La formación del ACV se da por una condensación no ribosomal de los 3 aminoácidos precursores (α-aminoadípico, cisteína y valina), la cual es a su vez estimulada por el ácido α-aminoadípico, e inhibida por leucina, isoleucina y D-valina. La formación del tripéptido se inicia con la activación del residuo δ-carboxilo del ácido L-α-aminoadípico, seguido por la activación del grupo α-amino de la cisteína y su posterior reacción para dar lugar al dipéptido α-aminoadipil-L-cisteína (α-AC). Posteriormente, éste se transforma en el ACV por reacción del grupo α-amino activado de la valina con el dipéptido α-AC activo.

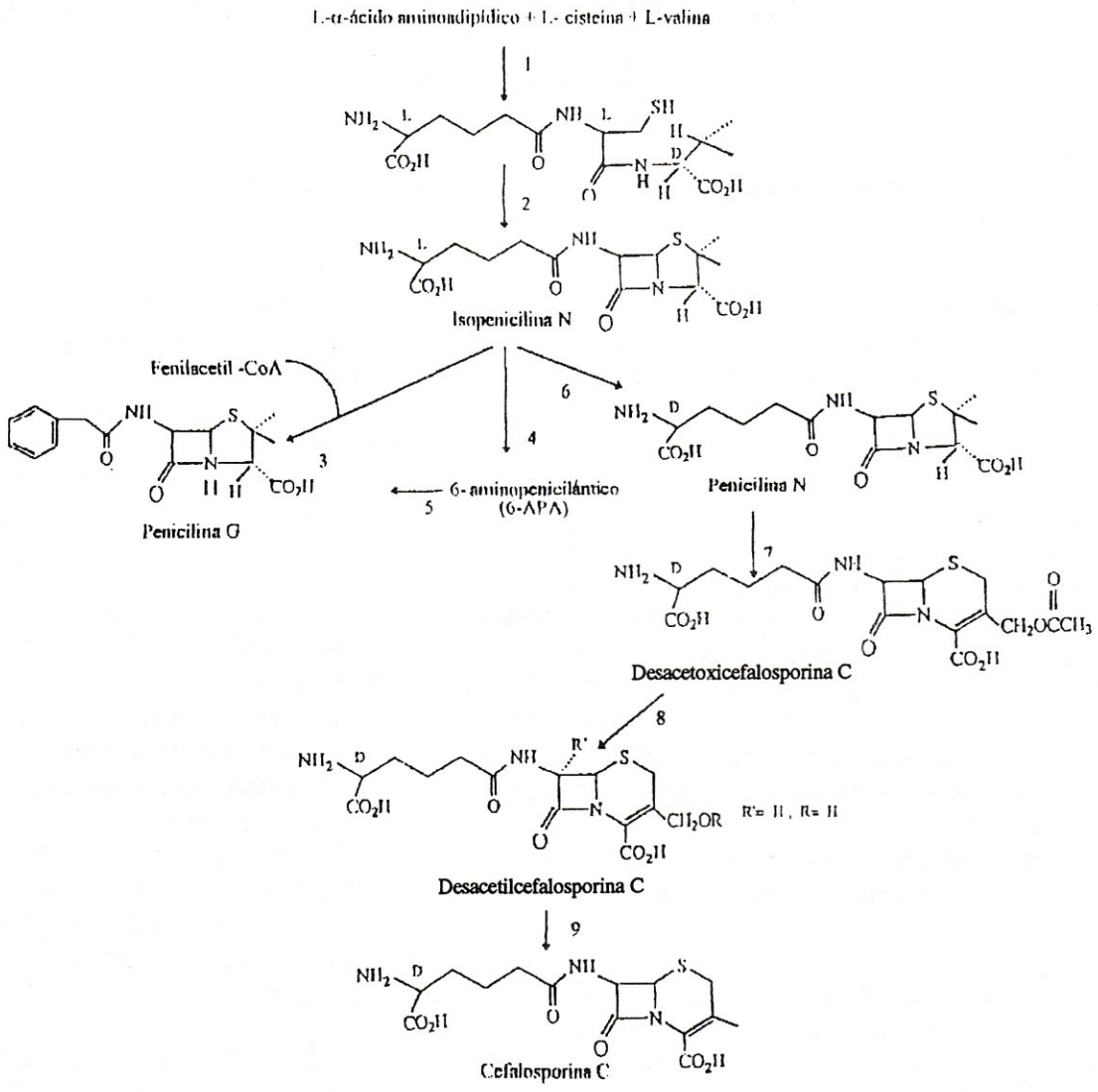


Figura 1. Rutas biosintéticas para los antibióticos β-lactámicos. (1) ACV sintetasa; (2) Isopenicilina N sintasa; (3) Isopenicilina N aciltransferasa; (4) Isopenicilina N amidasa; (5) 6-APA-aciltransferasa; (6) Isopenicilina N epimerasa; (7) Desacetoxicefalosporina C sintasa; (8) Desacetoxicefalosporina C hidroxilasa; (9) Desacetoxicefalosporina C acetiltransferasa.

Es muy probable que el L-isómero de la valina pueda ser epimerizado a su forma D, cuando la enzima se enlaza para dar paso a la formación del tripéptido. Trabajos recientes indican que en el mecanismo de biosíntesis del ACV, el enlace peptídico entre la cisteína y la valina ocurre antes de la epimerización de este último aminoácido (2). En la formación del α-AC se requiere además la presencia de ATP, Mn^{+2} y Mg^{+2}, la temperatura óptima de esta reacción está entre 25-30 °C y son necesarios Fe^{+2}, ácido ascórbico y ditiotreitol (1,3).

Para la síntesis enzimática del ACV , además del α-AC y valina es indispensable la presencia del ATP. Se ha reportado que los valores de K_m de las enzimas que intervienen en esta reacción son: 17 mM para al ácido α-aminoadípico, 0.026 mM para la cisteína y 0.34 mM para la valina (1).

BIOSÍNTESIS DE ISOPENICILINA N

El intermediario ACV sirve como substrato de la isopenicilina N sintasa (IPNS) para la formación de isopenicilina N. Dicha enzima, también conocida como ciclasa, se ha purificado de diversos microorganismos productores de β-lactámicos. Para el caso de *Penicillium chrysogenum* la enzima ha sido purificada 95 veces y muestra una masa molecular de 39 kDa y una Km aparente hacia el ACV de 0.13 mM. Los valores de temperatura y de pH óptimos para la reacción son de 25°C y 7.8, respectivamente y se observó que la reacción requería oxígeno y era estimulada por iones de Fe^{+2} y ascorbato que son cofactores de la actividad de la oxigenasa. Además, la ciclasa se inhibió por el glutatión y por iones de Co^{+2} y Mn^{+2} que son competidores del ion Fe^{+2} (4 y 5)

La ciclización parece ser simultánea con la eliminación de cuatro átomos de H mediada por el O_2 durante la formación de los anillos tiazolidínico y β-lactámico, respectivamente. La IPNS de *Cephalosporium acremonium* ha sido estudiada extensivamente y algunas de sus propiedades se muestran y se comparan con otros productores de β-lactámicos en la tabla I.

TABLA I

CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA ISOPENICILINA N SINTASA EN DIFERENTES MICROORGANISMOS

FUENTE DE LA ENZIMA	Km (mM)	Masa M (kDa)	pI	PURIFICACION (VECES)
P. chrysogenum	0.13	39	5.5	95
C. acremonium	0.30	40	5.0	152
S. lactamdurans	0.18	26	6.5	79
S. clavuligerus	0.32	33	ND	130
A. nidulans	ND	37	ND	ND

Km: valores para ácido-L-α-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV) ND: no se determinó; Masa M: masa molecular; pI: punto isoeléctrico. Esta tabla fue adaptada de (1).

BIOSÍNTESIS DE PENICILINA G

En la última reacción de la vía biosintética de la penicilina la cadena lateral del grupo α-aminoadipil se intercambia por ácido fenilacético, previamente activado en forma de fenilacetil-CoA. Esta reacción se lleva a cabo por un complejo de aciltransferasa establecido en extractos crudos de *P. chrysogenum.*

En ausencia de los precursores de la cadena lateral, se produce ácido 6-amino peniciláminico (6-APA) y pequeñas cantidades de diversas penicilinas entre las cuales se encuentran la benzilpenicilina, la *p*-hidroxibenzilpenicilina, la 2-pentenilpenicilina, etc. La adición del ácido fenilacético al cultivo de *P. chrysogenum* produce un incremento de penicilina G, de modo que muy poca cantidad de 6-APA y de otras penicilinas puede ser detectada. El papel del 6-APA en la biosíntesis de penicilina es poco claro. Se ha propuesto que en la reacción terminal de la síntesis de benzilpenicilina sea más probable el intercambio del α-aminoadípico de la cadena lateral de la isopencilina N por la fenilacetil-CoA. De cualquier modo, dos pasos de la reacción involucran al 6-APA también como un intermediario posible (1).

Mediante estudios *in vitro*, empleando un homogeneizado de *P. chrysogenum*, 6-APA y los substratos *p*- ó *m*-toliacetil-CoA, se han podido sintetizar los antibióticos *p*- y *m*-metilbenzil-penicilina. Los valores de Km de la acil-CoA:6-APA aciltransferasa para los substratos fueron de 6 y 15 mM respectivamente. Como puede verse, dichos valores reflejan una menor afinidad de esta enzima por esos substratos que por la fenilacetil-CoA (0.55 mM) (6).

Otros autores han reportado la síntesis *in vitro* de penicilinas naturales como la hexanoil, heptanoil y octanoilpenicilina. Estas penicilinas fueron obtenidas a partir del 6-APA y ácidos grasos activados (hexanoil, heptanoil y octanoil-CoA), mediante la acción de la acil-CoA:6-APA aciltransferasa de *P. chrysogenum.* Los resultados obtenidos demuestran que la enzima acepta como substratos sólo a los precursores de cadenas laterales alifáticas, cuya longitud se encuentra entre los 6 y 8 átomos de carbono (7).

Recientemente la acil-CoA:6-APA aciltransferasa de *P. chrysogenum* ha sido purificada a homogeneidad (258 veces), evidenciándose así un monómero con 30 kDa de masa molecular y un pI de ≅ 5.5. (8). Esta actividad fue detectada en 2 cepas productoras de penicilina, (*P. chrysogenum y Aspergillus nidulans*), pero no se encontró en la cepa 4 npe, mutante de *P. chrysogenum* que presenta un bloqueo en la biosíntesis de penicilina, sugiriendo que esta enzima está involucrada en la biosíntesis de dicho antibiótico (1).

BIOSÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS

La biosíntesis de cefalosporina C en los microorganismos que producen cefalosporinas y cefamicinas, se inicia con la formación del péptido (L-α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina. Las principales enzimas involucradas en la formación de cefalosporina C y cefamicinas son: la isopenicilina N epimerasa, la desacetoxicefalosporina C sintasa (expandasa), la desacetoxicefalosporina C hidroxilasa, la desacetoxicefalosporina C acetiltransferasa y finalmente la carbamiltransferasa.

Se detalla a continuación cada paso enzimático involucrado en la formación de los diferentes precursores de las cefalosporinas, a partir de la isopenicilina N.

FORMACIÓN DE PENICILINA N

El primer intermediario en la formación de las cefalosporinas es la penicilina N, que es formada a partir de la isopenicilina N por la acción de la primera enzima específica de esta vía, la isopenicilina N epimerasa. Esta enzima transforma de manera reversible la configuración L de la cadena del ácido aminoadípico en la forma D.

Debido a la gran labilidad de dicha enzima, su actividad sólo puede ser evaluada en extractos frescos acelulares. La enzima no requiere Fe^{+2}, ácido ascórbico o ATP y se ha observado que en amortiguador de piridoxal 5-fosfato se estimula su reacción.

Se ha observado que esta actividad además de ser más estable en algunas bacterias Gram-positivas productoras de β-lactámicos (*Streptomyces clavuligerus* y *Streptomyces lactamdurans*), no es estimulada por los cofactores asociados con las enzimas ciclasa y expandasa. Tampoco parece requerir de Fe^{+2} o de otros iónes metálicos para su actividad.

La enzima de *S. lactamdurans* se ha purificado empleando varias técnicas que incluyen precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y HPLC. Algunas de sus principales características se resumen en la Tabla II.

TABLA II

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA ISOPENICILINA N EPIMERASA DE *Streptomyces lactamdurans*

ESTABILIZADORES	piridoxal 5-fostato
INHIBIDORES	iones Cu^{++}, Mg^{++}, Zn^{++}, Co^{++}, Mn^{++}.
Km APARENTE	0.27 mM para la isopenicilina N
MASA MOLECULAR	60 kDa.
TEMPERATURA OPTIMA	25 °C
pH OPTIMO	7

Los datos fueron adaptados de (1)

FORMACIÓN DE DESACETOXICEFALOSPORINA C

La penicilina N, producto de la acción de la epimerasa descrita anteriormente, es el precursor de la desacetoxicefalosporina C. Esta reacción está catalizada por la acción de la enzima desacetoxicefalosporina C sintasa, comúnmente conocida como expandasa.

La enzima fue estudiada inicialmente en el hongo *C. acremonium* y posteriormente en las bacterias *S. clavuligerus* y *S. lactamdurans* (1,9). Las características principales de la desacetoxicefalosporina C sintasa en estos dos microorganismos se resumen en la tabla III.

El requerimiento de α-cetoglutarato para la actividad de esta enzima en *S. clavuligerus, S. lactamdurans* y en diversos hongos estudiados, indica que se trata de una dioxigenasa intermolecular. El α-cetoglutarato es descarboxilado estequiométricamente a succinato y su disponibilidad, puede ser un factor limitante para la expansión del anillo de la penicilina N.

Existe desacuerdo entre varios autores sobre el peso molecular y los puntos isoeléctricos de la enzima expandasa de *C. acremonium*. Se ha reportado en algunos casos una masa molecular de 31 y 33 kDa y un punto isoeléctrico de 4.6, mientras que en otros estudios estos valores corresponden a 40 y 41 kDa y un punto isoeléctrico de 6.3 (1,10). Las expandasas de *S. clavuligerus* y *S. lactamdurans* tienen masas moleculares de 29.5 y 27 kDa respectivamente, las cuales son más bajas que la masa molecular de la enzima reportada para los hongos (11).

La expandasa de los hongos probablemente se originó como consecuencia de la fusión de los genes que codifican esta enzima con aquellos de la desacetilcefalosporina C hidroxilasa. La enzima expandasa parece ser una proteína monomérica, debido a que la masa molecular relativa de su forma natural es idéntica a la de su forma desnaturalizada, observada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sódio (SDS).

FORMACIÓN DE DESACETILCEFALOSPORINA C

La desacetoxicefalosporina C es hidroxilada por la enzima desacetoxicefalosporina C hidroxilasa, una dioxigenasa que requiere α-cetoglutarato para producir desacetilcefalosporina C. Esta enzima se ha observado en extractos de *C. acremonium, S. clavuligerus* y *S. lactamdurans* y cataliza la incorpo-

TABLA III

CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA DESAXETOXICEFALOSPORINA C SINTASA (EXPANDASA) EN DOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CEFALOSPORINA

CARACTERISTICAS	*Cephalosporium acremonium*	*Streptomyces lactamdurans*
ACTIVIDAD	expandasa/hidroxilasa	expandasa
REQUERIMIENTOS	α-cetoglutarato, Fe^{++}, O_2	α-cetoglutarato, Fe^{++}, O_2
ESTIMULANTES	DTT, ascorbato	DTT, ascorbato
pH OPTIMO	7.3 a 7.8	5 a 11
TEMPERATURA (°C)	26 a 34	25 a 30 óptima
Km APARENTE	29 μM	52 μM (penicilina N)
INHIBIDORES	N-etilmaleimida	Mg^{++}, Co^{++}
	o-fenantrolina	Zn^{++}, α-ceto glutarato
	Co^{++}, Zn^{++}	α-cetoadipato
	α-cetoadipato	

DTT: ditiotreitol. Los datos fueron tomados de (1).

ración de oxígeno molecular a la molécula de desacetoxicefalosporina C.

La desacetoxicefalosporina C hidroxilasa requiere de α-cetoglutarato, Fe^{+2} y ascorbato. Posee una gran especificidad para su substrato, ya que al sustituir el grupo D-α-aminoadipil de la desacetoxicefalosporina C por otros grupos tales como formil, fenilacetil, fenoxiacetil, glutarimido y otros, estos no sirvieron como substratos (1,9).

Trabajos realizados por Scheidegger y colaboradores (11) sobre la purificación de la hidroxilasa, a partir de una línea de *C. acremonium*, han demostrado que se trata de una proteína simple bifuncional donde está presente tanto la actividad de expandasa como la de hidroxilasa. Ambas reacciones requieren α-cetoglutarato, sulfato de hierro, ascorbato y oxígeno.

La clonación de un gen que codifica una proteína con actividad tanto de hidroxilasa como de expandasa y su posterior expresión en una línea de *Escherichia coli*, también ha corroborado la hipótesis de la naturaleza bifuncional de esta enzima (1). En resumen, las actividades de expansión y de hidroxilación parecen corresponder a dos enzimas diferentes en *Streptomyces* y a una sola enzima de naturaleza bifuncional en *Cephalosporium.*

FORMACIÓN DE CEFALOSPORINA C

La desacetoxicefalosporina C producida en la reacción discutida anteriormente es transformada en cefalosporina C por una reacción de acetilación catalizada por la enzima acetil-CoA:desacetilcefalosporina C acetil-transferasa.

Se ha evidenciado la transformación de desacetilcefalosporina C en cefalosporina C con extractos libres de células de *C. acremonium* en presencia de acetil-CoA y Mg^{+2}. Se ha reportado también un intervalo de pH óptimo para esta enzima de 7.0 a 7.5 y se ha observado una alta afinidad por los grupos hidroximetilos en el carbono 3 de la acetilcefalosporina C. Por otra parte, esta enzima puede ser reprimida por la glucosa y por otros carbohidratos (1,9).

BIOSÍNTESIS DE CEFAMICINAS

Si bien la cefalosporina C es el producto final de la vía en *C. acremonium*, en diversos estreptomicetos como *S. clavuligerus* y *S. lipmanii* se produce una reacción enzimática que resulta en la introducción del grupo 7-α-metoxi dentro de la molécula de cefalosporina. Los productos de esta reacción se han llamado cefamicinas. El grupo metoxilo se origina del oxígeno molecular y de la metionina y es introducido en la posición 7 de la cefalosporina por un sistema enzimático con actividad de oxigenasa (con requerimientos por hierro y α-cetoglutarato) y de metiltransferasa (9).

La enzima *O*-carbamiltransferasa cataliza la transformación de desacetoxicefalosporina C en *O*-carbamildesacetilcefalosporina C y también del 7-α-

metoxidesacetilcefalosporina C en cefamicina C. Esta enzima en *S. clavuligerus* es más activa a pH 6.8 y se estimula con Mg^{+2}, Mn^{+2} y ATP. Por otro lado, la actividad se estabiliza con iónes fosfato pero se inhibe con pirofosfato (11).

CONCLUSIONES

Si bien se conoce la mayoría de las vías biosintéticas de los antibióticos β-lactámicos, algunos pasos continúan sin elucidarse. La genética molecular, como herramienta, jugará un papel de suma importancia en estos estudios. Para mejorar el conocimiento de las reacciones enzimáticas involucradas en la biosíntesis de antibióticos β- lactámicos, se han clonado algunos de los genes que codifican las principales enzimas de la vía. Estos logros permitirán en un futuro realizar mutagénesis *in vitro* con la finalidad de hacer estudios de expresión *in vivo*. La amplificación de genes y los estudios sobre promotores permitirán superar los pasos limitantes en las reacciones de biosíntesis.

Todos estos estudios realizados en el campo de la fisiología, enzimología y genética de los microorganismos productores de penicilinas y cefalosporinas, tienen como finalidad mejorar y aumentar la producción industrial de estos productos.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al Consejo de Estudio de Postgrado de la Universidad de Los Andes y al Laboratorio de Fermentaciones por la realización del curso de Antibióticos Beta-lactámicos, donde fueron estudiados y discutidos los tópicos del presente trabajo. Al Profesor Sergio Sánchez Esquivel, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la conducción del curso.

REFERENCIAS

1. Martín J F y Liras P (1989) Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. Adv Biochem Eng *39*:153-187.
2. Shiau C Y, Baldwin J E, Byford M F, Sobey W J y Schofield C J (1995) Delta-L-(alpha-aminoadypoyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase:the order of peptide bond formation and timing of the epimerisation reaction. FEBS Lett *358*:97-100.
3. Jaklitsch W M, Hampel W, Röhr M y Kubicek C P (1986) α-Aminoadipate pool concentration and penicillin biosynthesis in strain of *Penicillium chrysogenum*. Can J Microbiol *32*:473-480.
4. Ramos FR, López-Nieto MJ y Martín JF (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.
5. Roach P L, Clifton I J, Fulop V, Harlos K, Barton G J, Hajdu J, Andersson I, Schofield C J y Baldwin J E (1995) Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. Nature *375*:700-704.
6. Martín-Villacorta J M, Reglero A y Luengo J M (1989) Acyl CoA:6-APA acyl transferase of *Penicillium chrysogenum:* studies on substrate especificity using phenyl acetyl-CoA variants. J Antibiot *42*:1502-1505.
7. Luengo J M, Iriso J L y López- Nieto M J (1986) Direct enzymatic synthesis of natural penicillins using phenylacetyl-CoA:6-APA phenylacetyl transferase of *Penicillium chrysogenum*: minimal and maximal side chain length requirements. J Antibiot *39*:1754-1759.
8. Whiteman P A, Abraham E P, Baldwin J E, Fleming M D, Schofield C J, Southerland J D y Willis A C (1990) Acyl coenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*. FEBS *262*:342-244.
9. Abraham E P (1986) Biosynthesis of penicillins and cephalosporins. En Beta-lactam Antibiotics for Clinical Uses Editores: Queener S F, Webber A J y Queener S W. Marcel Dekker Inc, New York pp 101-114.
10. Scheidegger A, Küenzi M T y Nüesch J (1984) Partial purification and catalitic properties of a bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway of β-lactams in *Cephalosporium acremonium*. J Antibiot *37*:522-531.
11. Cortés J, Martín J F, Castro J M, Láiz L y Liras P (1987) Purification and character-ization of an o-ketoglutarate linked ATP-independent deacetoxycephalosporin C synthase of *Streptomyces lactamdurans*. J Gen Microbiol *133*:3165-3174.

INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO, NITRÓGENO Y FOSFATOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS

Ricardo A. Azuaje B.*, Isbelia González, L.*, y Sergio Sánchez E.**
*Laboratorio de Fermentaciones, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Apartado Postal 572, Fax (074) 443166, Mérida, Edo. Mérida, Venezuela.
**Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, 04510, MEXICO. Fax (525) 6223855.

RESUMEN
Fuentes de carbono y nitrógeno fácilmente asimilables para el crecimiento celular interfieren con la biosíntesis de β-lactámicos. Adicionalmente, el fosfato es un nutriente crucial y limitante en muchas fermentaciones de antibióticos β-lactámicos. Ha sido demostrado que la biosíntesis de β-lactámicos en bacterias y hongos está sujeta al control por fosfato. Esta breve revisión cita algunos progresos recientes sobre el tema.

PALABRAS CLAVE: β-lactámicos, antibióticos, fermentaciones, bacterias, hongos.

ABSTRACT
Carbon and nitrogen sources which are readily assimilated for cellular growth often interfere with the biosynthesis of β-lactams. Moreover, phosphate is the crucial growth-limiting nutrient in many β-lactams antibiotic fermentations. It has been shown that the biosynthesis of β-lactams in bacteria and fungi are both subject to phosphate control. Recent progress are highlighted in this report.

KEY WORDS: β-lactams, antibiotics, fermentation, bacteria, fungi.

INTRODUCCIÓN
En el metabolismo de los seres vivos los productos de la síntesis biológica se han clasificado como metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios (por ejemplo aminoácidos, nucleótidos, etc.), son productos cuya síntesis es una parte integral del proceso de crecimiento y son producidos durante la fase exponencial del mismo. Los metabolitos secundarios pueden ser definidos como aquellas sustancias generalmente producidas en la idiofase (por ejemplo, antibióticos) pero no relacionadas con el crecimiento y reproducción del microorganismo que los forma.

En el caso ideal los metabolitos secundarios se caracterizan por: a) su alta especificidad, b) su amplia variación, c) por la presencia de grupos químicos y unidades estructurales que son poco comunes en el metabolismo primario, y d) la dificultad de reconocer un beneficio para el organismo que lo produce.

Los factores fisiológicos que juegan papeles reguladores en el metabolismo primario y/o secundario de los microorganismos más estudiados son : a) Inducción de la síntesis de enzimas, b) Represión, por retroalimentación, de la síntesis de enzimas, c) Represión por catabolito, d) Inhibición, por retroalimentación, de la actividad enzimática, e) Activación de enzimas, f) Inhibición catabólica.

En este trabajo se revisará la regulación que ejercen los componentes del medio de cultivo (carbono, nitrógeno y fosfato) sobre la síntesis de los antibióticos β-lactámicos.

REGULACIÓN POR CARBONO
Para el caso de los antibióticos, no siempre es posible decidir si la regulación catabólica por carbono representa una verdadera represión de la síntesis o una inhibición de las enzimas de una vía biosintética (1). El efecto regulador del carbono puede ser ejercido por diversas fuentes de carbono fácilmente degradables, tales como el citrato y el glicerol. El control por carbono que se ejerce sobre la actividad o la síntesis de enzimas relacionadas con la biosíntesis

de β-lactámicos se resume en la Tabla I. Los datos incluidos en esta tabla indican que el efecto negativo del carbono sobre la producción de β-lactámicos, fue debido a represión de una o más de las enzimas participantes en su biosíntesis (2,3,4). Para el caso de la cefalosporina C, la acumulación de penicilina N y la baja producción del antibiótico, llevaron a el mecanismo de regulación negativa que ejerce esta fuente de carbono sobre la síntesis de β-lactámicos en *C. acremonium* (4). Se ha estudiado también, el efecto del carbono sobre la producción de antibióticos cefem en células en reposo de *Streptomyces clavuligerus* y su reversión por inhibidores de la síntesis de proteínas (5). En este sentido se observó

TABLA I

REGULACIÓN POR CARBONO DE ALGUNAS ENZIMAS RELACIONADAS CON LAS VÍAS BIOSINTÉTICAS DE β-LACTÁMICOS

Referencias	ACV sintetasa	Ciclasa	Epimerasa	Expandasa	Aciltransferasa	Cepa
(2)	–	R	–	R, - I	- R	*C. acremonium*
(3)	–	R	–	–	- R	*P. chrysogenum*
(4)	- R, I	- R	–	R	–	*C. acremonium C-10*

Nota:Datos obtenidos a partir de análisis realizados en sistemas de células en reposo o en sus extractos, I: inhibición, R: represión, - I : sin inhibición, - R: sin represión. —: no determinado, ACV: α-aminoadipil-cisteinil-valina.

pensar que la represión se llevaba a cabo a nivel de la conversión de penicilina N a cefalosporina C (3,4). No obstante, concentraciones muy elevadas de glucosa, reprimieron la acumulación de penicilina N. Esto sugirió también la existencia de un efecto inhibitorio sobre la enzima epimerasa por glucosa o por sus catabolitos (4) (Fig.1, paso 10). Adicionalmente, se observó que la glucosa no reprimió la formación del tripéptido α-aminoadipil-cisteinil-valina (ACV), en el hongo *Cephalosporium acremonium* (2) pero sí lo hizo en *Penicillium chrysogenum* (3). Esto explicó que respuestas diferentes a un mismo efector, pueden darse en diferentes sistemas biológicos. La glucosa también estimuló las actividades de la homocitrato sintasa y sacaropina deshidrogenasa *in vivo* (Fig. 1, pasos 1 y 7), e incrementó la incorporación de lisina a proteína (3). Este resultado llevó a sugerir que la glucosa estimula el flujo a través de la vía biosintética de la lisina evitando de este modo la acumulación del ácido α-aminoadípico, precursor de la penicilina (3) (Fig. 1). Por su parte, la penicilina aciltransferasa de *P. chrysogenum* (Fig. 1, paso 11), no está sujeta al mismo tipo de control de las otras dos enzimas precedentes. Es posible que ésta se ubique en un cromosoma diferente, o se exprese en una unidad transcripcional diferente (3).

Si la inhibición por glucosa sobre la ACV sintetasa observada *in vitro*, es significativa *in vivo*, explicaría

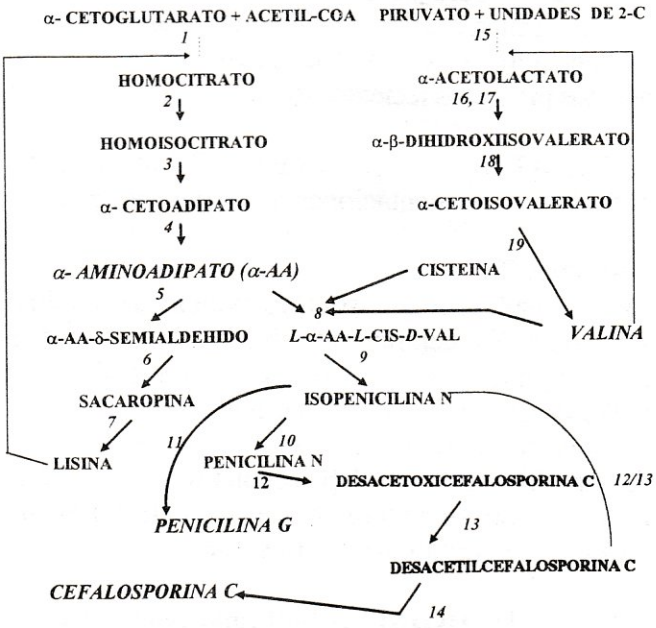


Figura 1. Vía de biosíntesis de los antibióticos penicilina y cefalosporina, mostrando los pasos participantes en la formación de los aminoácidos α-aminoadipato y valina, precursores del metabolismo secundario. 1, Homocitrato sintasa; 2, Homoaconitato hidratasa; 3, Isocitrato deshidrogenasa; 4, α-cetoadipato aminotransferasa; 5, Aminoadipato reductasa; 6, α-AA semialdehido reductasa; 7, Sacaropina deshidrogenasa formadora de lisina y NAD^+; 8, ACV sintetasa; 9, Isopenicilina N sintasa (Ciclasa); 10, Penicilina N sintetasa (Epimerasa); 11, Penicilina aciltransferasa; 12, Desacetoxicefalosporina C sintetasa (Expandasa); 13, Desacetilcefalosporina C hidroxilasa (Hidrolasa); 14, Cefalosporina C sintetasa; 15, Acetolactato sintetasa; 16, Acetolactato mutasa; 17, Acetolactato reductasa; 18, Dihidroxiácido deshidratasa; 19, Valina-Isoleucina aminotransferasa (Valina transaminasa).

que la adición de glicerol, maltosa y almidón al medio de cultivo, bajó la tasa de producción de cefem. Este efecto supresivo se evitó por la adición de cloranfenicol o estreptomicina, aunque el consumo de carbono no fue detectado. Se concluyó así que el efecto negativo de estas fuentes de carbono posiblemente se deba a la formación de una enzima inactivadora (represora), de una o más de las sintetasas de los cefem (5). No obstante, esta posibilidad requerirá más estudios.

La represión catabólica por carbono que se ejerce sobre la expresión de los genes del metabolismo primario, está mediada por el producto de los genes *Cre A, Cre B* y *Cre C* en *Aspergillus nidulans*. Sin embargo, estudios recientes (6), han demostrado que *Cre A, Cre B* y *Cre C*, no juegan un papel regulador importante en la biosíntesis de penicilina en *A. nidulans*.

El gen o los genes que controlan la regulación por carbono de la vía de los antibióticos β-lactámicos y posiblemente de otras vías metabólicas secundarias, no han sido identificados hasta hoy (6).

REGULACIÓN POR NITRÓGENO

Inducción de la síntesis de β-lactámicos: Tal y como ocurre con el metabolismo primario, la inducción de enzimas parece estar involucrada en la regulación de la biosintésis de antibióticos β-lactámicos. No obstante, es difícil reconocer entre una acción estimulatoria o precursora de la biosíntesis de los antibióticos y una verdadera inducción de las sintetasas involucradas en el proceso(1).

Efecto del ácido L-glutámico: Se ha reportado que el L-glutamato (10 mM) estimula la formación específica de penicilina en *P. chrysogenum* (7). El papel inductor del L-glutamato se determinó por dos observaciones experimentales: a) no se observó estimulación de la síntesis de penicilina por L-glutamato, en presencia de cicloheximida, b) análogos no metabolizables del glutamato estimularon la formación del antibiótico.

Efecto de la L-metionina: Se ha postulado que la metionina induce la síntesis de β-lactámicos (1). El papel precursor e inductor de la metionina fue establecido por las siguientes observaciones: a) el aminoácido estimuló la producción de cefalosporina, b) su análogo no azufrado y no metabolizable (norleucina), favoreció también la síntesis, c) la ACV sintetasa fue inducida por metionina en células enteras, pero ni la metionina ni su análogo, estimularon esta actividad en un sistema acelulares.

Estimulación de la formación de β-lactámicos: La síntesis de productos finales en una vía metabólica dada, depende de la disponibilidad de sus precursores. La biosíntesis de β-lactámicos no es una excepción a esta regla. El ácido α-aminoadípico (α-AA) no se encuentra en el núcleo final de la penicilina, pero se requiere para su síntesis. Probablemente sea necesaria la presencia del α-AA para que la enzima ciclasa pueda actuar en la vía biosíntetica (Fig. 1, paso 9). Se ha observado que el ácido α-aminoadípico ejerce una acción estimulatoria en la formación de penicilina, aún en presencia del inhibidor lisina (1).

Sorpresivamente, la L-lisina estimuló la producción de β-lactámicos (1). Previamente se había demostrado que la L-lisina inhibía la formación de penicilina y cefalosporina. Sin embargo, 1 mg/ml de L-lisina en un medio definido mejoró la habilidad de *C. acremonium* para producir cefalosporina C (1). Este aumento de actividad β-lactámica pudo deberse probablemente a dos factores: a) la estimulación de la vía de síntesis de la lisina y por ende de α-AA, precursor de los β-lactámicos (Fig. 1), y b) la transformación de la lisina exógena en un precursor β-lactámico, por un mecanismo desconocido que se active a bajos niveles de lisina.

Se demostró que la glutamina (1 mM) fue capaz de estimular la síntesis de penicilina en un sistema de células en reposo de *P. chrysogenum* (1). Una forma de explicar este fenómeno, es que la glutamina se transforme en glutamato, y que sea éste el verdadero causante del efecto estimulador (inductor), tal y como se mencionó anteriormente.

Represión por retrorregulación: Este efecto regulador se puede llevar a cabo, al menos en tres formas, por un antibiótico: a) un antibiótico puede inhibir su propia síntesis, b) puede inhibir la biosíntesis de un metabolito primario necesario para su formación, c) el metabolismo secundario puede ser regulado por un producto final primario de una vía ramificada común, llevando la otra ramificación al

antibiótico. Un caso de retrorregulación de la vía de un producto final primario que sirve como precursor de síntesis de antibióticos es aquel relacionado con la síntesis de valina y lisina en la producción de penicilina (Fig. 1). En la biosíntesis de penicilina por *P. chrysogenum*, la valina es un precursor directo del anillo tiazolidínico. La valina regula su propia síntesis afectando las primeras enzimas de esta vía (Fig. 1). En mutantes altamente productoras del antibiótico, estas enzimas son poco sensibles a la inhibición por retrorregulación que ejerce este aminoácido sobre su propia biosíntesis, a diferencia de cepas de baja producción. Por lo que se refiere a la L-lisina, su adición a cultivos de *P. chrysogenum* redujo la formación de penicilina (3,8), y esta inhibición se revirtió por la adición del α-AA, el cual a su vez estimuló la producción de penicilina en ausencia de lisina exógena. En estudios *in vivo* la lisina inhibió por retrorregulación la biosíntesis y excreción de homocitrato por un auxótrofo de lisina, bloqueado en la vía de síntesis de este aminoácido después del paso de homocitrato (10). La inhibición por lisina puede ser explicada por un efecto de retrorregulación sobre la homocitrato sintasa (8), primera enzima de la vía (Fig.1, paso 1). El resultado de esta inhibición lleva a una deficiencia del α-AA y por lo tanto a una disminución de la síntesis de penicilina, el producto final secundario de la vía ramificada (8). El mecanismo de retrorregulación ejercido por lisina en *P. chrysogenum*, incluye tanto la inhibición de la actividad de homocitrato sintasa como la represión de su síntesis.

Regulación por amonio: La mayoría de los hongos pueden usar amonio como única fuente de nitrógeno, para su crecimiento y reproducción. El amonio tiene efectos reguladores sobre un determinado número de enzimas, en los hongos. Se ha demostrado que la represión por amonio juega un papel importante en la formación de penicilina por *P. chrysogenum* (1). En la Tabla II se muestran las enzimas involucradas en la regulación negativa por amonio en tres microorganismos diferentes. La expandasa resultó muy sensible a la represión por nitrógeno en los tres microorganismos analizados (Tabla II). Sin embargo, todavia se desconoce la identidad de los verdaderos efectores y los mecanismos por los cuales la regulación se lleva a cabo (9).

TABLA II

REGULACIÓN POR AMONIO DE ENZIMAS RELACIONADAS CON LA BIOSÍNTESIS DE β-LACTÁMICOS

Referencias	ACV sintetasa	Ciclasa	Epimerasa	Expandasa	Aciltransferasa	Cepa
(9)	–	–	–	R	–	*C. acremonium*
(10)	–	R, - I	R, - I	R, - I	–	*S. lactamdurans*
(11)	R	R	–	R	–	*C. acremonium C-10*

Nota: Datos obtenidos a partir de análisis realizados en sistemas de células en reposo o en sus extractos, I: inhibición, R: represión, - I : sin inhibición, - R: sin represión. —: no determinado, ACV: α-aminoadipil-cisteinil-valina.

Se observó que la represión de la expandasa por sulfato de amonio, se revirtió por la adición de fosfato de magnesio tribásico (9). Tal reversión posiblemente se deba a la acción quelante de esta sal sobre los iones amonio.

Con relación al efecto del amonio sobre la ciclasa, se observó que éste ejerce un efecto represivo sobre la formación de esta enzima en dos microorganismos distintos, como se muestra en la Tabla II. La epimerasa, la ciclasa y la expandasa también fueron reprimidas por amonio en *S. Lactamdurans* (Tabla II). Este efecto, fue acompañado de una reducción en la biosíntesis de ACV y de cefamicina en esta cepa (10). Por ello, se propuso que la mayoría de las vías biosintéticas de la cefamicina están reguladas coordinadamente por nitrógeno (10). Sin embargo, esto puede no ser verdadero en todos los microorganismos productores de β-lactámicos como la cefamicina. Más tarde, se estudió el efecto del amonio sobre la síntesis de la ACV sintetasa, ciclasa y expandasa en *C. acremonium*, demostrando que este ión ejercía un efecto represivo sobre la formación de dichas enzimas (11) (Tabla II). La mayoría de los análisis discutidos arriba, concluye que la regulación negativa del amonio fue a nivel de la

transcripción de los genes de las sintetasas de los β-lactámicos.

Inhibición por aminoácidos neutros: La adición de aminoácidos neutros inhibió también la producción de penicilina en sistemas de células en reposo de *P. chrysogenum* con cicloheximida (12). Se observó que esta acción inhibitoria se evitaba al incubar el sistema con glutatión (12). El glutatión es un tripéptido de glutamina, cisteína y glicina muy similar al ACV que además estimula la incorporación de glutamina. En condiciones inhibitorias para la síntesis de β-lactámicos, la incorporación de glutamina se inhibió hasta un 80%. Esto llevó a proponer que el ACV, precursor de la penicilina, es también utilizado en la toma de aminoácidos neutros (12) y con ello es desviado de su función como precursor de la síntesis de penicilina.

REGULACIÓN POR FOSFATO

Se ha postulado que el fosfato afecta las vías metabólicas por alguno de los siguientes mecanismos: a) favoreciendo el metabolismo primario y disminuyendo el metabolismo secundario, b) desviando las vías catabólicas del carbohidrato, c) limitando la síntesis de los inductores de las vías biosintéticas de los antibióticos, d) inhibiendo la formación de precursores de los antibióticos, e) inhibiendo o reprimiendo las fosfatasas necesarias para la biosíntesis de antibióticos.

El fosfato inorgánico afecta preferiblemente la expresión de los genes o enzimas del metabolismo secundario. Por lo tanto, usar amortiguadores de fosfato en los medios de fermentación destinados a la producción de metabolitos secundarios no siempre es lo más adecuado (13). Este era un problema para analizar el efecto del fosfato sobre la producción de antibióticos en general. Este problema fue resuelto utilizando el 3-(N-morfolino)-propano sulfonato (MOPS), un amortiguador orgánico que carece de fosfatos (13). Así por ejemplo, se demostró que la producción de cefalosporina por *S. clavuligerus* ocurría óptimamente en la presencia del MOPS y 25 mM de fosfato. Concentraciones mayores de fosfato inhibieron la producción de antibiótico sin que hubiera cambio en el pH del medio. De este modo, el efecto inhibitorio del fosfato no se debió a cambios en el pH sino a otros factores, como por ejemplo, represión o inhibición de las enzimas relacionadas con la síntesis de los β-lactámicos.

Las sintetasas de β-lactámicos afectadas por el fosfato se presentan en la Tabla III. Allí se observa que la actividad más susceptible a la regulación fue la expandasa (14,15). Un estudio previo, había demostrado que el exceso de fosfato incrementaba la tasa de consumo de glucosa en una cepa de *C. acremonium* (15). Esto llevo a proponer que el fosfato ejercía un efecto negativo indirecto sobre la síntesis de β-lactámicos, ya que incrementaba la represión por glucosa (15). No obstante, estudios más recientes concluyeron que altas concentraciones de fosfato no incrementaron la tasa de asimilación de glucosa (15). Por lo tanto, esta regulación no pudo ser atribuida a un efecto de la glucosa. Sin embargo, hay que resaltar que estos resultados fueron obtenidos con cepas diferentes del hongo *C. acremonium*. Lo anterior puede explicar en cierto modo las diferencias observadas en los resultados. Así, el papel regulador del fosfato en la síntesis de antibióticos, puede ser diferente en microorganismos distintos. Los resultados mostrados en la Tabla III, sugieren que el efecto negativo del fosfato sobre la

TABLA III

REGULACIÓN POR FOSFATO DE ALGUNAS SINTETASAS DE β-LACTÁMICOS

Referencias	ACV sintetasa	Ciclasa	Epimerasa	Expandasa	Aciltransferasa	Cepa
(14)	–	- R, I	- R, - I	R, I	–	*S. clavuligerus*
(15)	R, I	R, I	–	* R, * I	–	*C. acremonium C-10*
(15)	* R, I	R, I	R, - I	* R, I	–	*S. clavuligerus*

Nota: Datos obtenidos a partir de análisis realizados en sistemas de células en reposo o en sus extractos, I: inhibición, R: represión, - I : sin inhibición, - R: sin represión. — : no determinado, * R, * I : efecto más pronunciado, ACV: α-aminoadipil-cisteinil-valina.

producción de antibióticos β-lactámicos, se ubica más a nivel de la síntesis (represión) que da la inhibición de las sintetasas (15). No obstante, se plantea llevar a cabo otros análisis (por ejemplo, medir la concentración intracelular de fosfato) para llegar a conclusiones definitivas. Algunos autores han sugerido, sin que esté claro todavía, que el fosfato también puede generar un agotamiento de algunos microelementos, y con ello repercutir en la síntesis del antibiótico (15).

CONCLUSIONES

El conocimiento de los mecanismos por los cuales las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, afectan la síntesis de antibóticos es de importancia para la producción de estas sustancias a nivel industrial. La producción de mutantes desrreguladas podría llevar a la obtención de cepas superproductoras de β-lactámicos. Otra posibilidad, es la búsqueda de cepas silvestres, poco sensibles a este tipo de regulación. La investigación de compuestos y/o elementos que anulen o reviertan estos efectos negativos, además de aquellos que estimulen o induzcan la síntesis de β-lactámicos, también deben ser tomados en cuenta. A nivel de fermentación se podría agregar la concentración óptima de cada uno de estos factores o bien adicionarlos de manera intermitente para favorecer la producción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de la Unidad del Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad de Los Andes y del Laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Ciencias. Agradecemos al Profesor Dr. José A. Sánchez C., por su valiosa colaboración en la realización de este curso.

REFERENCIAS

1. Sánchez S, Flores ME y Demain AL (1988) Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations. En Nitrogen Source Control of Microbial Processes. Editor Sánchez S CRC Press, Inc Boca raton, FLA pp 121-136.
2. Zanca DM y Martin, J. F. (1983) Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. J Antibiot *36*:700-708.
3. Revilla G, Ramos F, Lopez MJ, Alvarez E y Martin JF (1986) Glucose repress formation of δ-(L-α-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine isopenicillin N synthase but no penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. J Bacteriol *168*: 947-952.
4. Zhang J, Wolfe S y Demain AL (1989) Carbon source regulation of ACV sinthetase in *Cephalosporium acremonium* C-10. Curr Microbiol *18*: 361-367.
5. Hu WS, Braña A y Demain AL (1984) Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* and its reversal by protein synthesis inhibitors. Enzyme Microb Technol *6*:155-160.
6. Espeso EA, Fernandez-C JM y Penalva MA (1995) Carbon regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*: a minor defect of mutations in *CreA, CreB* and *Cre C*. FEMS Microbiol Lett *126*: 63-67.
7. Lara F, Mateos R, Vasquez G y Sánchez S (1983) Induction of penicillin biosynthesis by L-glutamate in *Penicillium chrysogenum*. Biochem Biophis Res Comm *105*: 172-178.
8. Luengo J, Revilla G, Lopez M, Villanueva J y Martin J (1980) Inhibition and repression of homocitrate synthase by lisine in *Penicillium chrysogenum*. J Bacteriol *144*: 869-876.
9. Shen Y, Heim J, Solomon N, Wolfe S y Demain AL (1984) Repression of b-lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources J Antibiot *37*: 503-511.
10. Castro JM, Liras P, Cortes J y Martin JF (1985). Regulation of α-aminoadipyl-cysteinyl-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in *Streptomyces lactamdurans*. Appl Microbiol Biotechnol *22*: 32-40.
11. Zhang J, Wolfe S, y Demain AL (1987) Effect of ammonium as nitrogen source on production of δ-(L-α-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase by *Cephalosporium acremonium* C-10. J Antibiot *40*:1746-1750.
12. Mateos RC y Sánchez S (1990) Transport of neutral amino acids and penicillin formation in *Penicillium chrysogenum*. J Gen Microbiol *136*: 1713-1716.
13. Aharonowitz Y y Demain AL (1977) Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Arch Microbiol *115*: 169-173.
14. Lübbe C, Wolfe S y Demain AL (1985) Repression and inhibition of cephalosporin synthetases in *Streptomyces clavuligerus* by inorganic phosphate. Arch Microbiol *140*: 317-320.
15. Zhang J, Wolfe S y Demain AL (1988) Phosphate repressible and inhibitable β lactam synthetases in *Cephalosporium acremonium* C-10. Appl Microbiol Biotechnol *29*: 242-247.

AVANCES Y CONTRIBUCIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS

Ramón Méndez, Genaro Di Donna y Sergio Sánchez*
Laboratorio de Fermentaciones, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Apartado Postal 562, Fax (074) 4433166, Mérida, VENEZUELA. * Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, FAX (525)6223855, México D F. 04510, México.

RESUMEN
La penicilina permanece como el más importante compuesto farmacológico después de más de cuarenta años de uso. Ésta y sus derivados son efectivos agentes antibacterianos con pocos efectos colaterales. Las vías de biosíntesis de penicilina y cefalosporina son relativamente bien conocidas y los pasos en la ruta biosintética de penicilina G, V y de varias cefalosporinas han sido caracterizadas a nivel enzimático. El conocimiento de los genes responsables de la biosíntesis ha aumentado rápidamente. El gran incremento en la productividad del antibiótico y por consecuencia la disminución de los costos se han obtenido principalmente por mutación y la búsqueda de especies microbianas altamente productivas y recientemente por la contribución de la recombinación genética *in vitro*.

PALABRAS CLAVE: β-lactámicos, biosíntesis, biología molecular.

ABSTRACT
Penicillin remains a major pharmaceutical compound after more than forty years of use. This compound and its derivatives are effective antibacterials with few side effects. The biosynthesis of penicillins and cephalosporins is relatively well understood and the steps in the biosynthetic pathways of penicillin G, V and several cephalosporins have been characterized at the enzymatic level. The understanding of the genes involved in the biosynthesis of penicillin and cephalosporin antibiotics has rapidly increased. The tremendous improvement in antibiotc productivity and the resulting decrease in cost have come about mainly by mutation and screening for microbial strains with higher yields and more recently, by the contribution of *in vitro* genetic recombination.

KEYWORDS: β-lactams, biosynthesis, molecular biology.

INTRODUCCIÓN

La biología molecular ha jugado un papel importante en los estudios de la vía biosintética de los antibióticos β-lactámicos, gracias a lo cual se ha logrado identificar cada uno de los paso relacionados con la formación de tales antibióticos, así como también a los genes que intervienen en dichas vías. Además, por medio de este conocimiento, se ha logrado modificar algunos de los pasos biosintéticos con la finalidad de mejorar la producción de los antibióticos β-lactámicos.

Entre los avances que ha tenido la biología molecular en relación con la formación de antibióticos, podemos mencionar: a) La clonación de los genes participantes en dicha vía, como por ejemplo la de los genes que intervienen en la formación del anillo bicíclico de la penicilina. b) También se puede mencionar la purificación de algunas enzimas como la isopenicilina N sintetasa (ISP), también llamada (L-α-aminodipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) ciclasa, de *Cephalosporium acremonium* (1). Gracias a todos estos trabajos el entendimiento de las vías biosintéticas de la penicilina y de la cefalosporina se ha incrementado rápidamente.

La recombinación de ADN *in vitro*, la tecnología de hibridomas, la ingeniería de enzimas y la ingeniería de proteínas forman las herramientas necesarias para la nueva biotecnología de los antibióticos.

GENES QUE INTERVIENEN EN LA BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS

Diagramáticamente se ha representado a la vía

biosintética de los metabolitos secundarios como sigue:

ADN—> ARN—> Enzima—> Metabolitos Primarios + Enzima—> Metabolitos Secundarios

Llama la atención la complejidad de la vía multigénica que interviene en la biosíntesis de las enzimas que sintetizan cada uno de los componentes para la formación de los antibióticos β-lactámicos, que está influenciada fuertemente por factores genéticos y fisiológicos. Para poder mejorar o modificar una vía biosintética es necesario conocer todos los factores que intervienen en la misma. Dentro de estos factores debemos mencionar el factor genético. Resulta así muy importante conocer cuáles son los genes involucrados, su función, regulación y a qué nivel de la biosíntesis intervienen, además de la ubicación de los mismos. En la biosíntesis de los antibióticos β-lactámicos interviene una serie de genes, los cuales mencionaremos en el presente trabajo. Los que intervienen en los primeros pasos de la biosíntesis de la penicilina, cefalosporina y cefamicina, se designan generalmente como ***pcb***, los que participan en la formación de penicilina como ***pen***, los que intervienen en la biosíntesis de la cefalosporina, como ***cef*** y finalmente, los participantes en la síntesis de cefamicina se llaman ***cmc***. Esquemáticamente se pueden observar de la siguiente manera:

Pasos iniciales de la biosíntesis (***pcb***)—> Formación de penicilina (***pen***)—> Biosíntesis de cefalosporina (***cef***)—> Síntesis de cefamicina (***cmc***).

La formación del péptido ACV por la ACV sintetasa comienza con la activación del ácido L-α-aminoadípico, seguido por la activación de L-cisteína y L-valina y la transferencia del ácido L-α-aminoadípico activado a la forma de dipéptido α-aminoadipil-L-cisteína. Finalmente el dipéptido es transferido con D-valina a la forma de tripéptido δ-(L-α-aminodipil)-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV). En la biosíntesis de penicilina y cafalosporina, el tripéptido (ACV), es oxidado y transformado en isopenicilina N (IPN), lo cual es realizado por una enzima llamada isopenicilina N sintetasa o ACV ciclasa, codificada por el gen ***pcbC***. En la biosíntesis de la cefalosporina, la isopenicilina N se epimeriza a penicilina N, el sustrato para la enzima que realiza la expansión del anillo. Esta reacción es catalizada por un enzima llamada IPN epimerasa, codificada por el gen ***cefD*** (2). Se denomina ***cefN*** en vez de ***pcb*** porque la penicilina N no es sintetizada en hongos que producen penicilina aciltransferasa; estos genes están relacionados con la biosíntesis de cefalosporina en los productores y no productores de penicilina (1). La expansión oxidativa del anillo en la penicilina N a desacetoxicefalosporina C (DEAOC), para luego ser hidrolizado a desacetilcefalosporina C (DAC), es realizado en *C. acremonium* por una proteína bifuncional denominada penicilina N expandasa/ DAOC 3'-hidroxilasa (3), codificada por un gen denominado ***cefEF***, el cual presenta mucha similitud al gen ***cefF*** de *Streptomyces clavuligerus*.

Posteriormente, la DAC es transformada hasta cefalosporina C por un enzima denominada DAC acetiltransferasa o cefalosporina C sintetasa, codificada por el gen ***cefG***. La DAC puede ser transformada también en cefamicina C, en la cual intervienen la enzima 3-hidroximetilcef-3-EM-o-carbamoiltransferasa (HMCoCT) codificada por el gen ***cmcH***. El siguiente paso lo realiza una enzima llamada O-carbamoildesacetilcefalosporina-hidroxilasa (OCDAC-hidroxilasa) codificada por el gen ***cmcI***, formando 7-alfa-hidroxi-OCDA, el cual es posteriormente transformado hasta cefamicina C por una enzima llamada cefamicina sintetasa o metiltransferrasa, codificada por el gen ***cmcJ***. Se denotan estos genes como ***cmc*** para indicar que sólo intervienen en la biosíntesis del cefamicina C (1).

En la biosíntesis de penicilina aciltransferasa (penicilina G y V), el L-α-aminodipil del extremo de la cadena de IPN es intercambiado por el acil del extremo de la cadena de coenzima A (coA). La enzima que interviene en esta reacción es la acil CoA: IPN aciltransferasa (4), la cual es codificada por un gen recientemente clonado por Veenstra y col (5). Se ha sugerido la designación ***pen*** para este gen ya que está relacionado con la biosíntesis de la penicilina aciltransferasa, pero no está presente en la vía biosintética de la cefalosporina (2).

CLONACIÓN DE LOS GENES QUE INTERVIENEN EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LOS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS

Es posible adicionar fragmentos de ADN a células de ciertos microorganismos y cambiar su material

genético. Esta transformación tiene severas limitaciones como son que el ADN provenga de una misma especie y además que pueda ser integrado en el cromosoma del huésped. Para que el gen pueda ser replicado, debe estar unido a una molécula que sea capaz de hacerlo en la célula bacteriana. Tal molécula debe tener un origen bacteriano de replicación, que es la secuencia de ADN reconocida por las enzimas de la célula huésped como un punto para iniciar la replicación. Especies bacterianas, por ejemplo *Escherichia coli*, nunca reconocerían un origen eucarioto, es necesario unir el ADN a una molécula con un origen procariótico. Tales moléculas transportadoras se llaman vectores, que pueden ser moléculas extracromosomales de ADN (plásmidos) y fagos. La Figura 1 muestra los pasos básicos de clonación. Se puede aumentar la productividad tanto de penicilina como de cefalosporina adicionando copias múltiples de los genes relacionados en la ruta

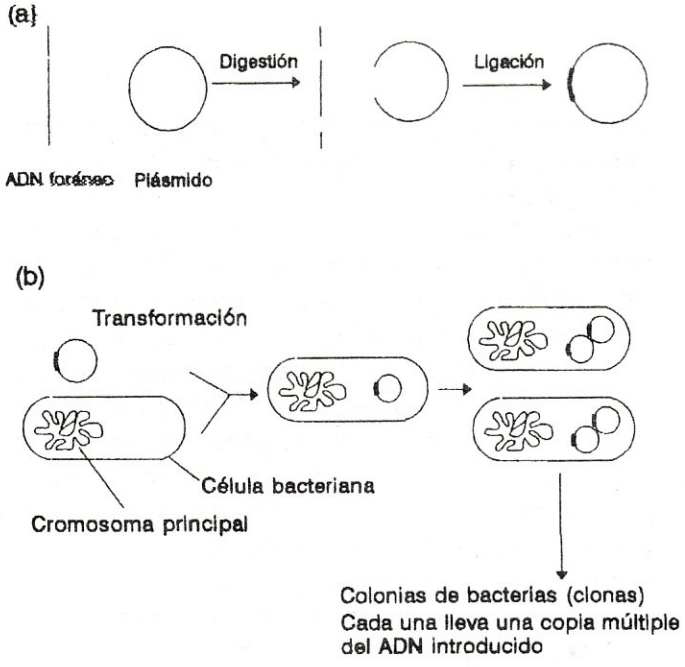


Figura 1. Pasos básicos en el proceso de clonación. (a) Integración del ADN foráneo al vector; (b) Expresión del ADN foráneo.

biosintética. Para poder incrementar la expresión, estos genes se unen a promotores fuertes en el ADN de los microorganismos productores.

Los aumentos en la expresión de un gen dependerán tanto de la clonación de genes reguladores y estructurales que contengan promotores fuertes, así como de la construcción de genes híbridos (6). Los genes que codifican la ACV ciclasa en diferentes productores de penicilina y cefalosporina fueron comparados utilizando técnicas de clonación e hibridación heterológa.

La ACV ciclasa fue aislada de *E. coli*, a su vez transformada con los genes clonados de *Penicillium chrysogenum,* obtenidos al insertar los fragmentos digeridos con, Sau3A del ADN total en EMBL-3, un vector proveniente del fago lambda (7). Los genes ***pcbC*** de *Streptomyces lipmanii* y *S. clavuligerus* fueron tratados en forma similar. Los genes ***pcbC*** de los diferentes productores de β-lactámicos mostraron una gran similitud (Tabla I). Esta similitud sugiere una posible relación en el proceso de evolución de estos genes (6).

Igualmente fueron clonados los genes ***cefEF***, que codifican la enzima penicilina-N expandasa/DAOC hidroxilasa en *C. acremonium* y ***cefE*** que codifica la enzima penicilina-N expandasa en *S. clavuligerus* (8).

La penicilina N expandasa y la DAOC-hidroxilasa de *C. acremonium* fueron purificadas a homogeneidad a partir de extractos crudos de este hongo y su secuencia de aminoácidos determinada (3). El análisis de la secuencia de ADN que codifica de las mismas, mostró que un fragmento de lectura abierta (PM 36,461) codifica toda la secuencia de aminoácidos obtenida. Este fragmento fue insertado en un vector y expresado en *E. coli* obteniéndose actividad tanto de expandasa como de hidroxilasa, demostrando la naturaleza bifuncional de la enzima.

Un tratamiento similar se realizó para clonar el gen ***cefE*** (PM 34,633) de *S. clavuligerus* (9). Este gen fue expresado en *E. coli* obteniéndose una alta actividad de expandasa, con muy poca, casi nula actividad de hidrolasa, determinando su calidad de enzima monofuncional. Los genes ***pcvAB*** y ***penDE*** involucrados en la biosíntesis de la penicilina, también han sido clonados a partir de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*. Estos genes se encuentran agrupados en el cromosoma I de *P. chrysogenum* (10.4 Mb), en el cromosoma II de *P. notatum* (9.6 Mb) y en el cromosoma IV de *A. nidulans* (3.0 MB) (10).

La introducción de genes de la ruta biosintética clonados dentro de microorganismos productores

TABLA I

PORCENTAJE DE SIMILITUD DEL GEN *PCVC* EN DIFERENTES PRODUCTORES DE BETA-LACTÁMICOS

	Streptomyces lipmanii	*Streptomyces clavuligerus*	*Aspergillus nidulans*	*Penicillium chrysogenum*	*Cephalosporium acremonium*
Streptomyces lipmanii		70.1	56.9	53.9	56.9
Streptomyces clavuligerus	79.1		57.0	54.9	55.3
Aspergillus nidulans	62.5	61.8		78.8	72.6
Penicillium chrysogenum	64.4	64.0	75.7		74.7
Cephalosporium acremonium	64.9	65.4	68.8	72.7	

Abajo de la diagonal, a la izquierda: Comparación de ADN.
Arriba de la diagonal, a la derecha: Comparación de aminoácidos.
Los valores vienen expresados en porcentajes.

de antibióticos beta-lactámicos, tales como *A. chrysogenum*, *P. chrysogenum* y *A. nidulans*, ha sido posible utilizando algunos sistemas de transformación con vectores integrativos que portan marcadores dominantes con promotores homólogos. Los sistemas de transformación del gen ***pyrG*** (relacionados con la síntesis de pirimidina) son muy apropiados para poder seleccionar en forma directa, genes de *P. chrysogenum*, por complementación con mutantes bloqueadas (6).

ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN QUE CODIFICA LA SÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS EN LOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES

Se ha logrado determinar en *C. acremonium* la existencia de ochos cromosomas que han sido separados por técnicas de electroforesis transversa de campo alterno. Los genes ***pcbC*** y ***cefEF*** han sido localizados por análisis de hibridación tipo Southern en los cromosomas VI y VII respectivamente (11) a diferencia de lo que ocurre con estos genes en el género *Streptomyces*, donde se encuentran muy cercanos pero en el mismo cromosoma (solo 25 kilobases de separación) (9). El gen que codifica la acil-CoA:IPN aciltransferasa así como el ***pcbC*** de *P. chrysogenum* se encuentran agrupados en el cromosoma (5). Por otra parte, en *A. nidulans* los genes ***pcbAB***, ***pcbC*** y ***penDE*** se encuentran también agrupados en el genoma, dentro de una región de 20 kilobases (12). Los estudios realizados han mostrado que los genes ***pcbAB*** y ***penDE*** se expresan como una sola unidad de transcripción desde promotores separados. Los estudios de regulación de enzimas y análisis de expresión genética han suministrado información útil para conocer el control de la expresión de los genes que guían a la sobreexpresión de los genes relacionados en la producción de la penicilina. Se han estudiado los genes de la producción de cefalosporina en *C. acremonium* y bacterias productoras de cefalosporina. Estos genes están separados por lo menos en dos grupos:

Grupo I (***pcbAB-pcbC***) el cual codifica la síntesis de las dos primeras enzimas de la vía de la cefalosporina.

Grupo II (***cefEF-cefG***) que codifica las últimas tres actividades enzimáticas de la vía de la cefalosporina.

No se conoce actualmente si el gen ***cefD*** codifica la isopenicilina epimerasa que se enlaza a cualquiera de los dos grupos anteriores (12). En las bacterias que producen cefamicina los genes que codifican la

vía biosintética entera estan localizados en un solo grupo con una extensión aproximadamente de 30 Kb (12).

Se demostró que la enzima isopenicilina N aciltransferasa estaba localizada en microcuerpos y se reportó que la isopenicilina N sintetasa se localiza en las vesículas del aparato de Golgi y pared celular (13).

APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL CAMPO DE LOS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS

La biología molecular ha incidido en diversos campos tales como el de la salud, la agricultura, la industria petrolera, la industria alimenticia, etc.

La biología molecular ha desempeñado un papel importante en la industria farmacéutica, principalmente en la producción de antibióticos, cuyo fin se ha centrado en la búsqueda del incremento en la producción, con disminución del costo del proceso, además de lograr una mejor calidad de los mismos.

Numerosas vías importantes en la síntesis de un antibiótico se han revelado gracias al trabajo investigativo realizado en el campo de la biología molecular. También se pueden mencionar los estudios de mejoramiento de las cepas productoras de antibióticos en búsqueda de lograr una mejor producción y una mejor calidad del producto, además de simplificar el proceso. Estudios básicos sobre la biosíntesis han progresado lentamente por muchos años; sin embargo, las recientes aplicaciones de las técnicas de biología molecular sobre diversos organismos productores de antibióticos, han despertado un nuevo espíritu de estudio de los antibióticos β-lactámicos. La clonación de la isopenicilina N sintasa y desacetoxicefalosporina C sintasa se ha concluido y la de otros genes está en progreso. La clonación de genes abre las puertas a los estudios de mutagénesis *in vitro* y expresión *in vivo*. Vectores más eficientes para la transformación de esos microorganismos han sido desarrollados. La amplificación de genes ha sido muy útil para elucidar la vía biosintética de los antibióticos β-lactámicos. El conocimiento de los genes promotores y de expresión eficiente representan una influencia positiva en la producción industrial de penicilina y cefalosporina.

REFERENCIAS

1. Stephen WQ (1990) Molecular biology of penicillin and cephalosporin biosynthesis. Antimicrob Agents Chemother. *34* (6): 943-948.
2. Ingolia TD y Queener SW (1989). β-Lactam biosynthetic genes. Med Res Rev *9*: 245-264
3. Dotzlaf JF y Yeh WK (1987) Copurification and characterization of deacetoxy-cephalosporin C synthetase/hidroxilasa from *Cephalosporium acremonium*. J Bacteriol *169*: 1611-1618.
4. Queener SW y Neuss N (1982) Biosynthesis of β-Lactam antibiotics,. En Chemistry and Biology of β-lactam Antibiotics, Morin, RB y Gorman, M. (ed), vol. 3. Academic press, Inc, New York. pp 1-81.
5. Veentra AE, Van Solingen PV, Huininga-Muurling H, Koekman BP, Groenen MA, Smaal EB, Kattevilder A, Alvarez E, Barredo JL y Martin JF (1989) Cloning of penicillin biosynthesis genes. Abstracts of the ASM. Conference on the Genetics and Molecular Biology of industrial Microorganisms, Am Soc Microbiol Washington, DC. pp 262-269.
6. Martin JF (1991) Molecular genetics of penicillin and cephalosporin antibiotic biosynthesis. En Molecular Industrial Mycology, Editores: Leong S y Berka RM. Marcel Dekker, Inc New York. pp 149-196.
7. Carr LG, Skatrud PL, Scheetz ME, Queener SW e Ingolia TD (1986) Cloning and expression of isopenicillin N synthetase genes from *Penicillium chrysogenum*. Gene *48*: 557-266.
8. Samson SM, Dotzlaf JE, Slisz ML, Becher GW, Van Frank RM, Veal LE, Yeh WK, Miller JR, Queener W e Ingolia TD (1987) Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. Bio/Technology *5*: 1207-1214.
9. Kovacevic, S, Weiget, BKJ, Tobin, M B, Ingolia, TD and Miller, JR (1989) Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Streptomyces clavuligerus* genes encoding deacetoxycephalosporin C synthetase. J Bacteriol *171*: 754-760.
10. Skatrud PL y Queener SW (1989) An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. Gene *78*: 331-338.
11. Lubbe C, Wolfe S y Demain AL (1986) Isopenicillin N epimerasa activity in a high cephalosporin-producing strain of *Cephalosporium acremonium*. Appl Microbiol. Biotechnol. *23*: 367-368.
12. MacCabe AP, Riach BR, Unkles SE, Kinghorn JR (1990) the *Aspergillus nidulåns npeA* locus consists of three contiguous genes required for penicillin biosynthesis. EMBO J. *9*: 279-297.
13. Demain AL (1988) Contribution of genetics to the production and discovery of microbial pharmaceuticals. Pure & Appl Chem 60 (6): *833*-836.

LA TEORÍA DE LA EVOLUCIÓN NO ES UN DECRETO

Las teorías o las leyes de la naturaleza no son inventos o creaciones humanas, son una interpretación del funcionamiento de la naturaleza, sobre las cuales el hombre no tiene influencia alguna; a lo más se acerca a ellas, las identifica, las conoce, eventualmente las comprende y en algunas ocasiones es capaz de aplicarlas en su provecho.

Un ejemplo es la teoría de la evolución, la cual ha tratado de ser explicada en muy diferentes términos, tales como: la sobrevivencia del más fuerte o el predominio del más apto y capaz. Sin embargo, éstas son interpretaciones humanas de la forma como la naturaleza asegura la generación, la permanencia y el perfeccionamiento aparente de la vida, por medio de su adaptación al medio en el que se desarrolla; lo que también incluye la desaparición de los organismos que no se adaptan al medio.

La humanidad ha tenido grandes problemas por una interpretación errónea de la teoría de la evolución, sobre todo en el concepto de la sobrevivencia de los "mejores", confundido convenientemente con el dominio de los "mejores", dando lugar al racismo y a la supremacía de las élites. Sin embargo, tampoco es posible desaparecer la evolución por decreto; ese proceso de la naturaleza existe y permite la evolución de la vida, no es posible detenerla y si vamos en contra de ella, se corren grandes riesgos en contra de la vida y el posible perfeccionamiento de la misma.

Sobre este tema reflexioné en alguna ocasión que llevé a mis sobrinos al cine "cachitos", llamado así por la impresionante cantidad de recortes que le hacen a las películas, así es como convierten películas de dos horas en películas de a lo más 40 minutos. Este cine es parte de la iglesia de San José en la ciudad de Torreón, Coahuila y es por ello que más que en otros cines, el sumiso espectador tiene que soportar la censura de todos. Gobernación no permite que aparezca nada que no alabe al gobierno y que no exalte la autoridad y la "fe" ciega en la patria. Las damas de la vela perpetua no permiten una falda por arriba del tobillo y un escote por abajo de la clavícula. La asociación de la moral y las buenas costumbres no permite que se vea que alguien fuma, que toma una copa y menos aún que se diga alguna "mala palabra". La iglesia no permite que salga una imagen religiosa en posición inconveniente o alguna toma que no favorezca a algún santo, además de que obligan a los asistentes a aplaudir cuando sale una toma gloriosa, bajo amenaza de no continuar con la película si no se tiene el debido respeto a los "seres divinos". Por si fuera poco, también la sociedad de padres de familia interviene, prohibiendo toda escena que ponga en duda la autoridad paterna. Por supuesto que el resultado son pedazos inconexos de películas que no se entienden y que frecuentemente se pueden mal interpretar.

Esa vez que fuimos al cine nos tocó que cortaran la imagen cuando el príncipe despertó con un beso a su amada, en el reestreno mundial de la bella durmiente del bosque; precisamente en esa escena Julito me preguntó –¿oye tío, qué canijo príncipe, qué le haría pa' que se despertara con esa cara de asombro?– con su característico acento de la frontera norte.

Sin embargo, el cine tiene su atractivo; además de ser muy barato, constituye una catarsis para los niños, algo así como el museo del papalote en Torreón, donde se prohíbe no tocar; en el cine los niños pueden gritar todo el tiempo, correr por los pasillos, arrojar papeles y palomitas a los de adelante, poner chicles en los asientos, derramar refrescos en el piso, espiar a los adolescentes que fuman furtivamente y observar detenidamente a las parejas que los llevan o a las que se forman en el interior del cine, algunas de la cuales se dan unos besotes dignos de filmarse. Todo esto, mientras los hermanos y sacerdotes están preocupados por tapar el lente de la cámara y por iniciar los aplausos al salir una santa imagen.

En esa ocasión, al terminar la película, exhibieron un documental donde se veía, más bien se suponía, que unos pajaritos ponían unos huevos y después de que los incubaban tiernamente aparecían unos pollitos a los que se dedicaban a enseñarles a volar. Mis sobrinos, lejos de enternecerse, recordaron a una de sus tías que se dedicaba a dispararles a los urracos con un rifle de municiones, con más ganas que puntería. Todo el cine enmudeció cuando uno de los polluelos, por algún problema en una de sus alas, no pudo volar, cayó al piso y ya no se movió más, hecho que transcurrió, sin que los padres trataran de salvarlo, ya que prefirieron proteger a los que regresaban volando al nido.

Mi sorpresa no tuvo límites, acababa de presenciar un error del responsable de los cortes, cosa que no se había presentado en 15 años de asistir a ese cine. Por lo cual las explicaciones no se hicieron esperar.

La iglesia declaró que el pajarito había muerto porque puso en duda la existencia de la Virgen de Guadalupe. Gobernación puntualizó que el polluelo era del PRD y simpatizante del EZLN, pero que seguramente no se trataba de un crimen político ya que a pesar de encontrarle cinco balas de grueso calibre, la

hipótesis más probable es que se haya suicidado por alguna crisis emocional; se formó rápidamente una fiscalía especial para esclarecer los hechos. La asociación de la moral y las buenas costumbres dijo que eso le había pasado por borracho y por haber asistido hasta tarde a un show de "table dance" de pajaritas que se organizó en el bosque cercano. La sociedad de padres de familia fue más parca en sus declaraciones argumentando que fue por no obedecer a sus padres.

De cualquier forma los sacerdotes nos retuvieron en el cine hasta que se rezó el rosario por el alma del fallecido y se concluyó que deberíamos de olvidar el acontecimiento, porque eran los designios de Dios los que habían hecho que el pajarito fuera a su santo seno y que no nos correspondía a nosotros juzgar el acontecimiento ya que existía una justicia divina.

Mis sobrinitos se asombraron porque pensaron que esas cosas no ocurrían en ese cine, sino sólo en los documentales del "National Geographic" y del "Discovery Channel", que ven conmigo cuando podemos quitarle el televisor a sus papás, que siempre quieren ver el "foot-ball" o a sus mamás que quieren "disfrutar" de las telenovelas del canal de las estrellas. La pregunta obligada la hizo Robertito, el más pequeño de mis sobrinitos del grupo –¿por qué tanto relajo?, si sólo se mulió un pajalito que no pulo volal–. Hectorín, el más grande, le dijo con voz firme y como regañándolo –el escándalo es porque los papás no hicieron nada por salvarlo–. Me asombré del nivel de disertación de los niños, los cuales no tardaron en arremeter contra mí. Emely se sentó en mis piernas y con voz melosa me preguntó –¿verdad que sí son malos los papás del pajarito por que no trataron de salvarlo?–. Me sentí en una trampa filosófica y tuve que pensar más de dos veces la contestación. De pronto percibí que todos los niños me observaban divertidos como si supieran que me habían metido en un callejón sin salida.

Les dije que la naturaleza tiene que conservar las especies y la vida, es por ello que no se puede dar el lujo de tratar de hacer que un organismo que no está bien preparado para sobrevivir, sin auxilio especial, distraiga la atención que se debe dar a los bien preparados, que serán los que podrán conservar la especie; y menos aún permitir que este organismo pueda reproducirse y transmitir tales deficiencias a su descendencia.

Emely, saboreando una dona cubierta de azúcar glass, preguntó –¿pero si el pajarito solamente se equivocó, no quiso volar en ese momento o tuvo mala suerte, la naturaleza también lo hace morir?–. –Pienso que debo decirte que sí–, contesté –la naturaleza toma en cuenta que muchos de los seres que mueren con este sistema son errores o son un producto del azar, es decir de la suerte, pero la sobrevivencia de la especie debe de estar por encima de la mala suerte y de los errores que se pudieran cometer, digamos que es un precio que se debe de pagar–.

–¿Y los papás del pajarito no pueden desobedecer a la naturaleza?– dijo Ilse, con un chocolate en la boca. –Ellos tratan de proteger a todas sus crías, para que puedan crecer, sin embargo, existe una presión sobre ellos que "instintivamente" los obliga a actuar como actúan, esto es proteger a las crías más adelantadas y capaces y en cierto modo olvidar a aquellas con deficiencias– terminé diciendo con ganas de acabar la discusión y con la certeza de que no me estaba dando a entender con los niños.

–¿Entonces si mi hermanita no camina dentro de poco, mis papás pueden dejarla en alguna esquina o tirarla a la basura, para cuidar a los que si caminamos y hablamos?– preguntó Ilse, con un brillo en sus ojos, como tratando de albergar esperanzas de eliminar racionalmente a su competencia. –¡Claro que no!– exclamé, pensando en la pobre de Bianca gateando en un bote de basura, mientras mi hermana y mi cuñado discutían que no se iban a molestar más en enseñarle a caminar. –Los humanos no actúan de esa forma– le dije, mientras le robaba un poco de chocolate.

No había terminado de decir lo anterior cuando Hectorín se adelantó y dijo burlonamente, –pues claro que no, porque los humanos no somos animales–. Me asombré cuando Robertito le dijo –no Hectol, los humanos si son animales–, pero no lo dijo por sus conocimientos de biología, porque de inmediato remató, –mi papá dice que su jefe es un animal completo–. Yo recordé a varios humanos que podrían haber encajado perfectamente en esa definición, y sonreí.

–Los seres humanos son parte del reino animal, es decir somos animales–, les dije. Rápidamente Julito me observó y soltó unas carcajadas; yo ya no quise interrogar con qué animal me identificó.

–Entonces por qué no actuamos como los animales–, me dijo Emely, mientras coquetamente se acomodaba su enorme y discreto moño rosa en la cabeza. –Los humanos tenemos la inteligencia, la conciencia y los sentimientos– le contesté –y eso hace que no se actúe solamente de manera instintiva, como el resto de los animales–. –¡Entonces eso va a provocar que se acabe la vida!, porque tú dijiste que si no se seguían las leyes de la naturaleza la vida corría peligro– terminó diciendo Hectorín. –Creo que tienes razón– suspiré casi vencido. Ilse preguntó –¿me compras una paleta?– y después todos gritaron cuando sugerí que comiéramos un raspado de nuez y fuéramos a los jueguitos, olvidando la plática y los conceptos tan profundos que según yo, habíamos discutido.

Subimos al automóvil y después de pasar lista, para asegurarme que ninguno se quedó por ahí, encendí el radio y en un noticiero local como comentario final y sin

interés mencionaron que los alumnos rechazados de la UNAM habían tomado nuevamente la rectoría, exigiendo que se cumplieran las garantías constitucionales que indicaban que todos tenían derecho a estudiar. De inmediato lo relacioné con la plática que había tenido minutos antes con mis sobrinos.

Si tomáramos en cuenta las enseñanzas de la naturaleza sobre la evolución y la conservación de la vida, seguramente que podríamos superar muchos conflictos en el desarrollo y la evolución como pueblo o nación, pero parece que el pueblo y nuestras autoridades quieren borrar, por decreto, cualquier viso de evolución. Es cierto que no se puede llegar al grado que indicaba Ilse, de abandonar a su suerte a los que no pueden ser suficientemente aptos para algo, pero también sería un grave error permitir que todos fueran médicos, sin tener la capacidad para serlo.

Pero decir que no todos pueden ser médicos o que no todos pueden ser profesionistas, si no se demuestra que se tiene una capacidad mínima, no quiere decir que se está haciendo una especie de racismo o formando una élite que no permite el ingreso de elementos ajenos a ella. La diferencia radica entre el "puede" y el "debe". Seguramente que es un acierto que a todo mundo se le dé la oportunidad de "poder" ser médico, pero es un grave error pensar que todo mundo "debe" serlo, debido a que dejaría fuera las características generales y los requerimientos mínimos que debe de tener un individuo que se quiere convertir en médico; imaginemos un médico sin una preparación sólida, sin motivación, sin vocación y, peor aún, sin capacidad intelectual.

Pero tal y como están las cosas, lo más probable es que tengamos que enfrentar este tipo de situaciones, porque amparándonos en la Constitución que interpretada inadecuadamente parece indicar que todo mundo "debe" de ser capaz de estudiar y de llegar a terminar una carrera, cuando tal vez lo que debería decir es que todos "pueden" tener esa oportunidad, pero que no es posible que por decreto un individuo "deba" tener las capacidades para hacerlo. Este hecho se reconoció desde la fundación de las primeras universidades europeas por medio de una frase colocada en el pórtico de la Universidad Española de Salamanca, donde decía, en latín: "Lo que la naturaleza no da, Salamanca no lo proporciona".

Sería terrible tener que pensar que un individuo no puede tener el derecho de que se le apoye porque tiene alguna enfermedad y que se pensara en dejarlo a que la naturaleza actúe sobre él de alguna manera. Tampoco sería sano pensar que todos deben de ser médicos, abogados o ingenieros, sin importar su capacidad, porque en poco tiempo su actividad profesional nos cobraría muy cara tal acción ya que estas actividades estarían regidas por personal sin preparación con las consecuencias en la ineficiencia de su actividad y posiblemente la integración de este tipo de profesionistas en el mismo proceso educativo como profesores, nos llevaría a disminuir aún más las exigencias de formación y con ello resultaría más laxo el ingreso de individuos con poca capacidad y una vez alcanzada una masa crítica se daría un colapso en la actividad global, como parece que ya está sucediendo.

No sabemos cuantas actividades humanas se han visto afectadas directa o indirectamente por este tipo de acciones. Claro que estas ideas pueden ser tomadas como con una intención fascista; pero no, son solamente ideas de sentido común. Cuántos de nosotros aceptaríamos poner a nuestros hijos o hermanos en manos de un médico que apoyado en la Constitución se tituló, sin haber demostrado capacidad y haberse sometido a los exámenes necesarios.

Esto no sólo es responsabilidad de la población, ya que muchas veces es producto de las decisiones políticas, administrativas o económicas de un grupo de gente que con la idea de poder aplicar los preceptos de la Constitución y las leyes o bien la demagogia, permiten o inducen que un gran número de individuos avancen en los grados académicos sin tener los merecimientos necesarios.

Ya hemos visto como la corrupción ha trastornado diferentes áreas de nuestro desarrollo como sociedad y seguramente el pase directo a las carreras profesionales, la ausencia de exámenes y de evaluaciones objetivas en diversas áreas, así como la posibilidad de tener una infinita cantidad de oportunidades para acreditar las materias de una carrera, han dañado la actividad profesional del país y lo seguirán haciendo. Los optimistas e irresponsables lo ven como un logro sindical o de la revolución o de la democracia mexicana o una salida sexenal al desempleo o, peor aún, como un logro demagógico para alcanzar popularidad, sin darse cuenta que detrás de ello se están formando masas de individuos sin la preparación ni la capacidad necesaria.

Afortunadamente, muchos de ellos no van a ejercer su profesión, pero qué pasa con los que sí llegan y deshonestamente trabajan; posiblemente la competencia en la iniciativa privada los desplace, pero qué de los que llegan al gobierno y son los encargados de ejercer acciones políticas, económicas o administrativas a cualquier nivel y que sólo hay que oírlos hablar un poco para saber que son producto de la aplicación equivocada de la Constitución y no de una preparación seria.

Y qué de aquellos que se insertan en el sistema educativo y están encargados de perpetuar un sistema de evaluación muy laxo, que justifique las enormes fallas en la enseñanza; ¿acaso no nos estamos sometiendo a un gran riesgo de sobrevivencia cuando deja-

mos que los menos capacitados tomen el camino evolutivo y que en ellos descanse la responsabilidad del futuro?

¿La sociedad estará atentando contra nosotros mismos? cuando permitimos si no es que exigimos, facilidades para cumplir con los requerimientos académicos, cuando el resultado son profesionistas que sienten que lo que lograron se los brindó el gobierno y no su esfuerzo y que en ese contexto se sienten parte del sistema y no se pueden convertir en críticos del mismo. Profesionistas que conocedores de su deficiente capacidad, prefieren perpetuar el engaño y fomentar la ineptitud, para cubrir de alguna manera la propia.

Parecería que sí, que poco a poco hemos llegado a modificar a tal grado el ambiente que ahora los "mejores" son los que se mueven sin problemas en este sistema y que cualquier posibilidad de cambio se ve como una mutación indeseable y una desadaptación al sistema.

Lo anterior no indica que los sistemas de evaluación que empleamos son los correctos, que no están viciados y que muchas veces no son transparentes, pero más que luchar porque se eliminen, con la idea de que todos "deben" de ser capaces de estudiar, debemos de luchar por que sean lo suficientemente honestos, para que realmente nos permitan seleccionar a los individuos capaces de establecer los sistemas profesionales que requiere, mejor dicho, le urge al país en todas las áreas.

¿Qué es lo que está pasando? ¿acaso ya nuestro ambiente está tan viciado que solamente se puede sobrevivir así y los más aptos son los que logran sortear la corrupción y alinearse a las ineficiencias, a las malas decisiones e incluso son capaces de alabarlas y defenderlas, para finalmente obtener una ganancia? En este contexto parecería que los organismos en extinción son aquellos que tienen valores y que luchan por obtener algo mejor, para finalmente tratar de mejorar el entorno. Pensando en esto vi a mis sobrinos cantando y jugando, totalmente ajenos a la selva en la que les tocará desarrollarse y en la que se internarán para establecer su lucha evolutiva y pensé que no deberíamos de dejar de hacer algo por ellos.

Cuando llegamos a la avenida Morelos viré a la izquierda y al avanzar unos metros un agente de tránsito salió de entre unos arbustos con una sonrisa burlona, haciéndome ver que circulaba en sentido contrario. –¿qué pasó jefe?, arriesgando a sus niños a un accidente–, –¿cuándo cambiaron el sentido de la circulación?– le contesté evidentemente molesto, –no se me enoje mi jefe, la cambiaron ayer, pero mire ahí está el disco que dice que no se debe de dar vuelta–. En efecto un enorme disco rojo indicaba que la circulación era de un solo sentido, pero estaba 10 metros al interior de la calle. Le hice ver esto, pero me dijo que eran cosas del ayuntamiento panista y que él por eso era priista, pero que de cualquier manera me tendría que quitar la placa y que como era viernes no podría recogerla sino hasta el lunes por la tarde. Me lo explicó, como si supiera que yo tenía que regresar a la ciudad de México el domingo.

Traté de negociar con él, explicándole lo que es el criterio de la autoridad, después lo traté de convencer de ser amigable con el turista y finalmente lo amenacé con hablar con algún conocido de la presidencia o con el papá de Robertito que trabaja con el gobernador del estado. Finalmente le di diez pesos para los refrescos, después de tragarme mi discurso en contra de la corrupción y 30 minutos perdidos al enfrentrarme con un organismo perfectamente entrenado para tomar a su víctima y no soltarla hasta lograr su objetivo; un organismo sordo, sin posibilidad de establecer un razonamiento lógico y que no le tiene miedo ni a su propia suegra, un ser perfectamente adaptado para sobrevivir en este ambiente, visto desde la perspectiva de la evolución "un buen organismo".

Mis sobrinos estaban entusiasmados con la idea de que iríamos a la cárcel, con la ilusión de conocer los yacuzis y las pantallas gigantes que han oído en las noticias que tienen los presos o tal vez con la excitante posibilidad de escaparse por los innumerables túneles que cavan diariamente los presos y que, por lo menos en Torreón, bien podrían ser aprovechados para construir el Metro, no sólo por lo numeroso, sino por lo amplio y confortables que dicen que son. Cuando por fin vieron que terminó la discusión y volvieron a gritar por la emoción de llegar a los jueguitos, Hectorín me dijo –¿qué tío, sobreviviendo en Torreón?-, –no m'ijo, adaptándome al país– le contesté con tristeza y sintiendo toda la impotencia del mundo, al tiempo que me felicitaba por haberlo convencido con sólo 10 pesos.

José Víctor Calderón Salinas
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

UNA REFLEXIÓN NECESARIA

Sí, me erguí en dos pies y he liberado mis manos. He visto hacia el horizonte y no me ha gustado.

Nací también como un pequeño; temeroso me aferraba al regazo de mi madre y como un chiquillo, en mi gran cariño a ella, le temía. Temía a la tormenta, sentía pavor al ver iluminada la noche por sus golpes y destellos. Me estremecía hasta el alma el movimiento de la tierra, y sentía el corazón salírseme cuando explotaba la montaña.

Pero la curiosidad creció conmigo. Y un día, después de tanto miedo, encontré en el fuego un poderoso aliado. Me acerqué entonces al poder de la naturaleza, y hasta hoy, el único en toda la creación que no muere de pavor ante las llamas del fuego.

Seguí jugueteando, explorando y probando, y encontré que una roca golpeaba más que mi puño, que lo mismo hacía un palo y mucho más ambos juntos.

Y en el regazo de la curiosidad se llegó hasta el hacha y un genio de la imaginación llegó hasta el arco.

Un pequeño mamífero comenzó a acercarse y un buen día logré tocarle; ya después me siguió a cualquier parte.

Perseguía a la comida, me tuviera que agachar para recogerla o apedrear para detenerla. Pero entonces me puse a cosechar y la encerré en un corral.

Y las herramientas se hicieron viejas, pero su inutilidad se olvidó cuando nuevas rocas y el fuego se combinaron en nuevas herramientas, y después otras nuevas, y después otras.

Así, con el avanzar del tiempo surgieron tantas cosas, como un adolescente se vinieron; contrariedades, discusiones y peleas. Odios y alegrías. Satisfacciones y penas. Y cambio tras cambio se fueron sucediendo.

Fue necesario tomar más de la naturaleza, más y más. Pero es que era tan inmensa.

Palmo a palmo se la fue conquistando, doblegando. Pero era necesario. Sí, monté en mi caballo, después en el carruaje que le he atado. Pero más tarde el caballo se tornó cansado, la carga era tanta que sólo una máquina logró soportarla.

Y el mundo pareció hacerse más pequeño, más propio.

Sí, todo eso. Pero es que era tan joven. Todo sucedió en tan poco tiempo y mis sueños se fueron diluyendo. Diluyendo porque hoy he de decir con tristeza, que lo acepto, que me molesta esta máscara contra gases pero me es necesaria, que me estoy escondiendo de la lluvia porque una sola gota me produce llagas, que también me veo huyendo de los rayos lacerantes del sol, y que comienzo a temer de mí mismo.

Mi único hogar y lo veo destruido. Y de la sabiduría de la vejez me veo aún tan lejos. No así de la muerte que me asecha a cada momento. Sí, soy tan culpable que participo en mi propia muerte.

Juan Carlos Zavala Olalde
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

LOS TRABAJOS DE MILLER Y FOX. SU INFLUENCIA SOBRE LAS IDEAS ACERCA DEL ORIGEN DE LA VIDA EN LA TIERRA

Una de las preguntas clásicas que el niño hace a sus padres o a su profesor es cómo llegó él aquí, y cómo sus padres, sus abuelos, su perro, las plantas y todo lo demás. Es una de las tantas preguntas que quedan sin respuesta, porque ésta no se tiene aún. Cómo se originó la vida es entonces algo que nos preocupa a todos, al menos, una vez en la vida.

A algunas personas, esta duda los ha empujado a desarrollar ideas de experimentos, simulando las condiciones en las que se cree que se encontraba la Tierra primitiva, para ver qué compuestos se forman y que pudieran tener relación con el origen de la vida.

Para realizar estos experimentos, se manipulan las condiciones en las que se han de llevar a cabo de acuerdo a especulaciones e hipótesis de cómo era la Tierra primitiva; así, se maneja una cierta composición química de la atmósfera, de la superficie, una cierta temperatura, las fuentes de energía que entonces existían y que podían catalizar reacciones y transformaciones en el planeta.

Para analizar los resultados, es necesario saber qué es lo que se está buscando, ya que entre todo lo que pudiese formarse en los experimentos, sólo algunas cosas tendrían sentido para el origen de la vida. Y para reconocerlas es necesario saber qué es esto que llamamos vida. Aparentemente, puede resultar difícil definir este concepto, pero no es así. La vida es un estado evolucionado de la materia, caracterizado por tener una unidad estructural-funcional: la célula. La célula, a su vez, se define como un conjunto de moléculas y elementos químicos organizados de tal forma que tienen las siguientes cuatro características:

a) Poseen una membrana que separa selectivamente el medio interno del externo.

b) Poseen una serie de aparatos, léase orgánulos o moléculas más simples, que le confieren una actividad metabólica.

c) Es un sistema termodinámicamente abierto, debido a que hay intercambio de materia y energía entre el medio interno y el externo.

d) Es capaz de reproducirse.

Durante los experimentos, se espera poder llegar a entender cómo y a partir de qué se formó la célula. Para ello, se requiere encontrar la materia prima que la constituye, es decir, las moléculas características de la vida en el planeta Tierra: los aminoácidos y los ácidos nucleicos principalmente.

En 1953 Stanley Miller realizó un experimento en el cual supuso que la atmósfera primitiva terrestre estaba constituida por cuatro gases: metano, amonio, vapor de agua e hidrógeno, y que, mediante descargas eléctricas que simularan los rayos que se forman en la atmósfera terrestre, y que pudieran jugar un papel importante en la fotodisociación de los gases permitiéndoles reaccionar, se formarían algunos de los compuestos orgánicos necesarios para la vida (Miller S L [1953]. A production of amino acids under possible primitive earth conditions, Science 117:528-529).

En el experimento se empleó un aparato en el cual el agua es calentada para que se evapore y se mezcle con el resto de los gases, se somete la mezcla a una serie de descargas eléctricas (en este caso fue durante una semana), luego pasa por un compartimento en donde se condensa y vuelve a caer al contenedor en donde es calentada; los compuestos que se forman durante las descargas eléctricas y son acarreados por el agua se acumulan en el compartimento si no son volátiles.

Al analizar los compuestos que se formaron, se hallaron casi la totalidad de los 20 aminoácidos (AA) esenciales para la vida. Esto representa el resultado más importante del experimento: el saber que existe una manera, ahora comprobada, de cómo se pudieron formar los AA en la Tierra primitiva, ésto si efectivamente las condiciones de la misma eran similares a las supuestas en el experimento.

Sidney Fox, algunos años más tarde (en 1958), realiza un experimento para ver cómo se pudieron formar sistemas parecidos a una célula a partir de lo que él llamó proteinoides mezclados con agua caliente (Fox S W [1959] Production of spherules from synthetic proteinoid and hot water, Science 129: 1221-1222). Los proteinoides son moléculas sintéticas, hechas con AA, que tienen propiedades físicas muy similares a las proteínas.

Fox pretende probar la hipótesis de que la célula pudo haberse originado en un medio muy caliente y que

a medida que éste se fue enfriando, se fue constituyendo con la forma y las propiedades que la caracterizan.

A partir del experimento de Miller, es fácil ligar el resultado al experimento de S. Fox, ya que, una vez formados los AA que son el esqueleto o unidad estructural de las proteínas, las proteínas se pudieron haber formado espontáneamente.

El experimento de S. Fox consiste en poner proteinoides en diferentes soluciones saturadas de NaCl (simulando el océano) con agua a altas temperaturas y dejar enfriar. El resultado es la formación de esférulas microscópicas, de tamaño y forma uniforme, elásticas, que mantienen su individualidad por varias semanas. Estas esférulas presentan cambios osmóticos si se las somete a medios hipo e hipertónicos. Con este experimento se demuestra que si las condiciones de la Tierra primitiva eran similares a la atmósfera que supone Miller y con la temperatura del agua que supone Fox, es probable que se hayan podido formar esférulas, las cuales hubieran podido encerrar en su interior proteínas con carácter enzimático y así formar entidades con un aparato probioquímico en su interior capaces de realizar algunas funciones protometabólicas.

Si bien dichas hipótesis conducen a un resultado muy interesante, estas esférulas están lejos de ser las primeras células. Son sólo un modelo de lo que podría ser un paso más en la evolución hacia ellas, es un escalón más en el proceso evolutivo, ya que una célula es un sistema muy complejo como para creer que se pudiera formar espontáneamente. Además de las esférulas de Fox, existen otros modelos a los que también se les considera protocélulas, como los coacervados de B. de Jong, que son gotitas microscópicas compuestas de macromoléculas de alto peso molecular, o bien los sulfobios y colpoides de Alfonso L. Herrera, que son estructuras microscópicas compuestas de aceite, gasolina y resinas.

Es probable que otros experimentos conduzcan a otras conclusiones y que en algún momento se entienda el mecanismo evolutivo que dio lugar a la formación de las primeras células, es decir, la vida. Algunos investigadores tienen esperanzas de poder formar en el laboratorio dichas células; sin embargo, tal vez esto no sea posible, y probablemente tampoco necesario, ya que si se va entendiendo cómo se fue formando cada una de las partes y características de una célula, sin que se den todas al mismo tiempo y en un mismo experimento, conjuntando todos los resultados se podrá deducir cómo se formó la primera célula. El estudio del origen de la vida se convirtió, a partir de estos experimentos, en una de las áreas científicas con más apogeo; de hecho Stanley Miller fue distinguido con el Premio Nobel por los trabajos realizados en este campo. En México, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), tres o cuatro grupos se dedican a la investigación de este campo; y en el mundo entero tienen tanta relevancia estos trabajos sobre el origen de la vida que cada tres años se realiza el Simposio Internacional sobre el origen de la vida, en el cual se discuten los resultados de nuevos experimentos que se llevan a cabo siguiendo nuevas hipótesis y se puede ver la influencia que va teniendo en el pensamiento de los investigadores.

Actualmente, este tipo de experimentos se realiza simulando no solamente las condiciones de la Tierra primitiva, las cuales no se conocen bien, son sólo hipótesis, sino también las condiciones que se presentan en otros cuerpos celestes de los que sí se sabe su composición y características físicas como temperatura, presión, energía, etcétera. La ventaja es que en estos astros, como por ejemplo: Venus, Tritón y Titán, algunas de sus condiciones actuales son como se cree que fueron en la Tierra primitiva y son muy propensos a que en ellos se estén formando distintos compuestos y que con las diferentes presiones de selección a las que sean sometidos, tal vez puedan dar lugar un día a algún tipo de vida que puede o no ser similar a la que nosotros conocemos.

La rama de la ciencia que estudia el origen y la evolución de la vida en el universo se llama Exobiología y permite por un lado corroborar las distintas hipótesis que se tienen sobre las condiciones de la Tierra primitiva, ya que si se dan ciertas reacciones y la formación de compuestos orgánicos necesarios para la vida en estos cuerpos celestes con esas condiciones, es altamente probable que esas mismas condiciones sean las que prevalecían en nuestro planeta cuando se formó la vida. Por otro lado, la Exobiología permite conocer la posibilidad de que se esté formando o se pueda dar en algún tiempo vida, más allá de nuestro planeta, que es otra de las preguntas que todo niño formula alguna vez y le queda sin respuesta por la imposibilidad de dársela, al menos por el momento: ¿Hay vida en algún otro lado o estamos solos en el universo?

Graciela Matrajt Arbetman
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

PREMIO AL LIBRO NEUROBIOLOGÍA DE LOS SISTEMAS SENSORIALES

En el marco de la **X FERIA INTERNACIONAL DEL LIBRO** de Guadalajara, Jal., el pasado 1o. de Diciembre, nuestra consocia la Dra. Graciela Meza Ruiz del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM recibió el Diploma correspondiente al PREMIO ARNALDO ORFILA REYNAL, versión 1996, a la EDICIÓN CIENTÍFICA UNIVERSITARIA, otorgado al libro "NEUROBIOLOGÍA DE LOS SISTEMAS SENSORIALES", recientemente publicado bajo los auspicios de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

La coordinación editorial de este libro estuvo a cargo de la Dra. Meza, quien conjuntó los trabajos de 29 autores nacionales y extranjeros, y el suyo propio, en el primer texto publicado en español sobre este tema.

Se espera que este libro sea utilizado como texto en los cursos de licenciatura y posgrado de Fisiología, Neurociencias y áreas afines.

INFORMACIÓN SOBRE EL XXIV TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

A los profesores de bioquímica y materias afines de todo el país.

El Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, invita a todos los profesores de bioquímica y materias afines a participar en el XXIV Taller de Actualización Bioquímica, que se realizará del 11 al 15 de agosto de 1997, en el Palacio de la Antigua Escuela de Medicina, ubicado en la Plaza de Santo Domingo, en el Distrito Federal.

Para mayores informes, favor de dirigirse a los miembros del Comité Organizador: Drs. Federico Martínez Montes, Marco Antonio Juárez Oropeza, Juan Pablo Pardo Vázquez o Sara Morales López, al Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, teléfonos: (5) 623-21-68, (5) 623-21-69, (5) 623-25-10 y (5) 623-24-08. Fax (5) 616-24-19, o al Apartado Postal 70-159, Coyoacán, CP 04510, México, DF.

Atentamente
El Comité Organizador

XXIV TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Semana del 11 al 15 de agosto de 1997

HORA	LUNES 11	MARTES 12	MIERCOLES 13	JUEVES 14	VIERNES 15
Coordina	Dra. Patricia del Arenal	Dr. Juan Pablo Pardo	Dra. Sara Morales	Dra. Martha Zentella	Dr. Federico Martínez
8:00	Inscripción				
9:00-9:15	Inauguración	Fosforilación oxidativa. Regulación. Dr. Rafael Moreno Sánchez, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".	Evaluación de la calidad estudiantil. Dra. Rosa Ma. Valle, Asesora de la Secretaría de Planeación y Evaluación, UNAM	Radicales libres (aspectos generales). Dr. Alberto Huberman, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".	Presencia de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.
9:15-10:45	Efecto de esteroides en el SNC. Dr. Vicente Díaz, INN "Salvador Zubirán".				
RECESO					
11:00-12:45	Hormonas proteínicas Mecanismos de acción Dra. Martha Robles, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM	Alteraciones estructura-función en mitocondrias. Dr. Alfonso Cárabez Trejo, IN, Qro. UNAM	La motivación como parte de la enseñanza en la Bioquímica. Panel de discusión. Coordina Dra. Sara Morales.	Radicales libres y las membranas biológicas. Dr. Edmundo Chávez. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".	Celebración del Departamento de Bioquímica en sus 40 años de estar en Ciudad Universitaria.
RECESO					Clausura: Dr. Enrique Piña
16:00-19:00	Aprendizaje basado en problemas (ABP). Taller	Aprendizaje basado en problemas (ABP). Taller	Aprendizaje basado en problemas (ABP). Taller	Aprendizaje basado en problemas (ABP). Taller	

RUMBO AL VI CONGRESO
Primer anuncio

Con base en los estatutos de nuestra Asociación, la mesa directiva de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica ha decidido posponer el VI CONGRESO de nuestra Asociación para el próximo año de 1998.

Para ser sede se requiere cubrir los siguientes requisitos:

—Una carta oficial solicitando la sede,

—Trámite con la SEP para solicitar apoyo económico para su realización,

—Definición de un Comité Local de organización y

—Una carta de compromiso en la que se especifiquen los rubros que cubrirá la sede.

Invitamos a los interesados a que manden los resúmenes de sus trabajos que deberán llegar a nuestra mesa editorial antes del 15 de diciembre de 1997.

Mesa Directiva
Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica
Apdo. Postal 70-281, Coyoacán CP 04510, México, D.F.

A LOS LECTORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

DONATIVO ANUAL 1997

El BEB entra en su décimo sexto año de publicación y debido a las condiciones económicas imperantes en México, nos permitimos solicitarles de la manera más atenta, el envío de un donativo extracuotas de $ 200.00 (docientos pesos) o bien $20.00 US dólares, que hará posible continuar con la elaboración y distribución del volumen 16 de nuestro Boletín.

El donativo puede hacerse mediante un depósito bancario a la cuenta número **1153813-9 de Bancomer**, o de un giro bancario a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C.

En espera de su comprensión y colaboración aprovechamos para enviarles un cordial saludo.

Atentamente
El Comité Editorial

¿TE INTERESARÍA SER CORRESPONSAL DEL BEB EN TU LOCALIDAD?

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A C o suscriptor del BEB y radicas fuera de la Ciudad de México o de su zona conurbada, TÚ PODRÍAS SER UN CORRESPONSAL DEL BEB. Nos gustaría contar con uno o varios corresponsales adscritos a las instituciones de Educación Superior de cada estado de la República Mexicana que nos permitan saber quiénes conforman la comunidad académica de la región y conocer las noticias y las actividades más relevantes que ocurran o vayan a ocurrir en su localidad o región (congresos, cursos, seminarios, necesidades de recursos humanos y materiales y otras noticias o acontecimientos de tipo académico). Queremos hacer extensiva esta invitación a nuestros colegas de Centro y Sudamérica, así como de otros países de habla hispana.

¿Te ha interesado esta invitación? Entonces envíanos tu propuesta directamente al Coordinador de Corresponsales, Comité Editorial del BEB, Apartado Postal 70-281, México 04510, D F, MÉXICO. O bien al Fax (525) 616 2419 o al correo electrónico sersan@servidor.unam.mx.

Atentamente
Sergio Sánchez Esquivel
Coordinador de Corresponsales
del Comité Editorial del BEB

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

1) El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos **"Winword"** o **"Wordperfect"**, con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Éste deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo.

2) Se deberá incluir un resumen en idioma español y uno en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.

3) Se aceptará un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas entre paréntesis en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener:
Nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen en cursivas y antecedido por dos puntos el número de la primera y últimas páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

Fraga C G y Oteiza P I (1995) Vitaminas antioxidantes: Bioquímica, Nutrición y participación en la prevención de ciertas patologías, Bol Educ Bioq (México) *14*(1):12-17.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: The molecular biology of immunosuppression. Editor: Thomson A W. John Willey and Sons Ltd, pp 81-104.

Los libros se citarán de acuerdo con este ejemplo y podrán incluir las páginas totales o las consultadas:

Lehninger A L, Nelson D L y Cox M M (1993) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

4) Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, figuras más tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o bien impresiones láser o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros. Las tablas se deberán presentar conforme alguna de las publicadas en los números de 1995.

5) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.

6) Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

II. OTRAS COMUNICACIONES

1) El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, etcétera.

2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita:

3) El trabajo deberá enviarse igual que como se específica en el inciso I-1.

4) Se aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso I-3. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I-4.

Los manuscritos serán leídos por tres revisores. Las correcciones y sugerencias, así como las pruebas de página se enviarán al primer autor. En caso necesario se recurrirá a revisores externos al Comité Editorial.

El disco y las tres copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal del BEB en su localidad.

BEB 97 Vol 16 Núm 1 Marzo de 1997

CONTENIDO

EDITORIAL

LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS
Sergio Sánchez Esquivel 3

ARTÍCULOS

BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS
Rosana Benítez y Julio O. Rojas 5

INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO, NITRÓGENO Y FOSFATOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS
Ricardo A. Azuaje B., Isbelia González, L. y Sergio Sánchez E. 11

AVANCES Y CONTRIBUCIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS
Ramón Méndez, Genaro Di Donna y Sergio Sánchez 17

OTRAS COMUNICACIONES

LA TEORÍA DE LA EVOLUCIÓN NO ES UN DECRETO
José Víctor Calderón Salinas 22

UNA REFLEXIÓN NECESARIA 26

LOS TRABAJOS DE MILLER Y FOX. SU INFLUENCIA SOBRE LAS IDEAS ACERCA DEL ORIGEN DE LA VIDA EN LA TIERRA
Graciela Matrajt Arbetman 27

PREMIO AL LIBRO NEUROBIOLOGÍA DE LOS SISTEMAS SENSORIALES 29

CONVOCATORIAS

XXIV TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA 30

RUMBO AL SEXTO CONGRESO
La Mesa Directiva 31

A LOS LECTORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA: DONATIVO ANUAL 1997
El Comité Editorial 31

¿TE INTERESARÍA SER CORRESPONSAL DEL BEB EN TU LOCALIDAD?
Sergio Sánchez Esquivel 31

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 32