

Tesis de Posgrado

Biosíntesis enzimática de porfirinógenos

Juknat, Adela Ana

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

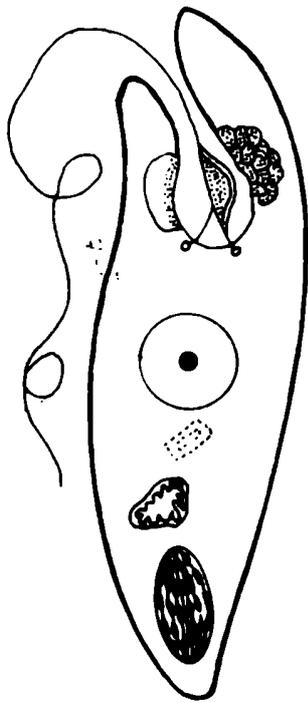
Cita tipo APA:

Juknat, Adela Ana. (1983). Biosíntesis enzimática de porfirinógenos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1781_Juknat.pdf

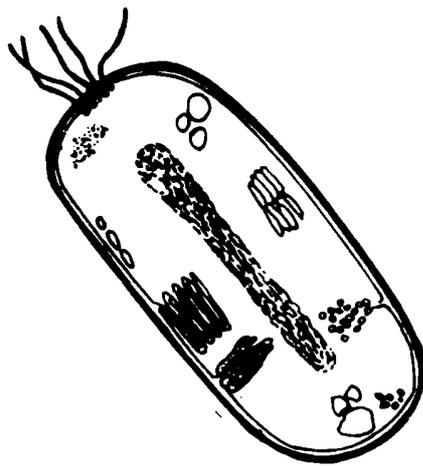
Cita tipo Chicago:

Juknat, Adela Ana. "Biosíntesis enzimática de porfirinógenos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1781_Juknat.pdf

BIOSINTESIS ENZIMATICA DE PORFIRINOGENOS



adela ana juknat
tesis



**centro de investigacion s sobre
porfirinas y porfirias « CIPYP »**

BIOSINTESIS ENZIMATICA DE PORFIRINOGENOS

por

ADELA ANA JUKNAT

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS de la
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

DIRECTOR: Dra. Alcira M. del C. Batlle de Albertoni

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas
y Porfirias (CIPYP)

Departamento de Química Biológica. Facultad
de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad
de Buenos Aires
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas
y Técnicas (CONICET)

TOMO I

BUENOS AIRES, JULIO DE 1983

1781
J. L.
Ej. 2

a Albertito

Gabriel

la memoria de mi padre

mi madre

Mónica

Gerardo

AGRADECIMIENTOS

A Alcira, en primer lugar, porque en todo momento estuvo a mi lado y porque sin su estímulo, constante disposición y guía permanente, no hubiera sido posible la concreción de este trabajo.

A María Victoria, principalmente por haberseme brindado al iniciarme en esta carrera y por lo mucho que de ella he aprendido.

A Mónica y Gerardo, por su generosa amistad y permanente ayuda a lo largo de todo este trabajo.

A Silvia y una vez más a Mónica, por los excelentes gráficos y esquemas que ilustran esta Tesis.

A Ana María Buzaleh, por su especial dedicación y esmero en la transcripción del manuscrito.

A Evi, por haber contado con su experiencia y conocimiento cada vez que recurrí a ella.

A Haydée, Ernesto y César, quienes en un cierto momento del trabajo me dedicaron parte de su tiempo.

Por haber dispuesto ilimitadamente del libro de cabecera de esta Tesis, mi sincero agradecimiento a Alberto Viale.

La especial presentación de esta obra se debe a la generosidad de Rubén Salguero y Hugo Blanco.

A Sullair Argentina S/A. mi particular reconocimiento por la impresión del manuscrito.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado una Beca de Perfeccionamiento en el transcurso de este estudio, realizado, además con subsidios provenientes del CONICET y de la SUBCYT.

Finalmente, a todos mis compañeros del CIPYP, quienes de una forma u otra pueden haber despertado cierta inquietud o aportado algún conocimiento, en la realización de este trabajo.

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

<i>Bcl</i>	Bacterioclorofila
<i>Chl</i>	<i>Chlorobium</i>
<i>Chr</i>	<i>Chromatium</i>
Cit's	Citocromos
<i>Cl's</i>	Clorofilas
Crm's	Cromatóforos
<i>E</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>
LPS	Lipopolisacáridos
M.E.	Membrana Externa
<i>P</i>	<i>Pelodyction</i>
P.C.	Pared Celular
<i>Rp</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Rs</i>	<i>Rhodospirillum</i>
S.M.I.	Sistema Membranoso Intracitoplasmático
<i>T</i>	<i>Thiocapsa</i>

OBJETIVOS

La Porfobilinogenasa (PBG-asa) es un complejo enzimático que cataliza la ciclotetramerización del monopirrol Porfobilinógeno (PBG) en el Uroporfirinógeno III (Urogen III), intermedio fisiológico en la síntesis de hemos, clorofilas y corrinas.

Está constituido por dos enzimas, la Deaminasa o Urogen I Sintetasa y la Isomerasa o Urogen III Cosintetasa. En ausencia o deficiencia de la segunda, la Deaminasa forma el Urogen I, que sólo se detecta naturalmente en condiciones anormales.

Por fallas en el camino metabólico de las porfirinas, se producen una familia de enfermedades conocidas como Porfirias. En ellas, una deficiencia enzimática específica y primaria, acompañada generalmente de un aumento secundario en la actividad de la enzima limitante ALA-Sintetasa, conduce a una síntesis anormal de precursores y/o porfirinas, responsables de los cuadros clínicos que caracterizan a las distintas porfirias.

En algunas de estas porfirias, la falla metabólica se localiza precisamente a nivel de la conversión del PBG en Uroporfirinógenos, como en la Porfiria Aguda Intermitente (PAI), Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE) y en algunos casos de intoxicación por plomo.

Este sistema enzimático se ha venido estudiando en nuestro laboratorio durante más de 20 años, desde múltiples puntos de vista y en los más variados sistemas. Entre ellos, uno de los más fascinantes ha sido el alga protozoo *Euglena gracilis* que en virtud de sus peculiares características ha constituido uno de los modelos experimentales más atractivos para la investigación de ciertos aspectos del metabolismo de los tetrapirroles.

Empleando justamente *Euglena gracilis*, hemos logrado pruebas acerca de la existencia de un factor regulador de la biosíntesis de porfirinas en este organismo, y el estudio de algunas de sus propiedades nos ha permitido identificarlo con un compuesto de naturaleza pteridínica, al tiempo que desarrollar una nueva terapia de la PAI, administrando ácido fólico a pacientes en fase aguda, luego de lo cual se ha logrado una positiva recuperación clínica y bioquímica.

En consecuencia, resultó importante continuar nuestros estudios acerca de este factor regulador. De manera que, entre los objetivos del presente trabajo nos habíamos propuesto:

Emplear como fuentes, además de *Euglena gracilis* por las razones conocidas, una bacteria fotosintética, que aparte de poder compartir algunas de las propiedades de la *Euglena* nos permitiera ampliar nuestros conocimientos acerca de la PBG-asa, poco investigada en estos organismos. Entre ellos, los datos existentes sobre las enzimas involucradas en la síntesis de porfirinas en *Rhodospseudomonas palustris* se refieren sólo al ALA-Sintetasa y también provienen de nuestro laboratorio; de manera que la elección de la segunda fuente fue simple y lógica. Este trabajo comprendía así, el uso de dos organismos diferentes para el logro de una serie de objetivos.

Como etapa previa se planteó entonces un estudio de las condiciones necesarias para la medición de la actividad de PBG-asa en *Rp. palustris* es decir, curvas de crecimiento y actividad en función de los días de desarrollo de las células, así como condiciones óptimas de extracción y medición de la enzima, en cuanto a atmósfera, tiempo, temperatura y pH de incubación.

Se desarrollaría luego un método para la obtención de preparaciones altamente purificadas sobre las cuales se planeaban estudiar algunas propiedades generales como peso molecular, cinética de la reacción y efecto de ciertos cationes y aniones.

Pero entre los fines de este trabajo se encontraba además, tratar de identificar y determinar en otros tejidos, la presencia de un factor regulador, análogo al encontrado en *Euglena gracilis* de manera, que se planearon una serie de experiencias en *Rp. palustris* tendientes al logro de este propósito.

Los estudios que se enfocarían en *Euglena gracilis* estaban principalmente relacionados con la obtención de mayores datos experimentales acerca del factor regulador. Se trataba de conocer sus efectos sobre la cinética de la reacción de diferentes preparaciones de la enzima.

De datos previos, nos interesó establecer su relación con ciertos compuestos como sulfas y derivados sulfurados.

Y dado el conocido efecto activante del factor de *Euglena* sobre la enzima de igual fuente y del ácido fólico en paciente

tes con PAI, se pretendía determinar el comportamiento de ambos compuestos frente a distintas preparaciones de la enzima proveniente de los orígenes más diversos, con el objeto de aclarar el posible mecanismo de acción de este factor regulador.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	ii
OBJETIVOS	iii

INTRODUCCION

A.- BACTERIAS FOTOSINTETICAS

Parte 1

INTRODUCCION

-Capítulo I: Ecología	1
-Capítulo II: Taxonomía. Propiedades fisiológicas generales	4

Parte 2

ESTRUCTURA

-Capítulo III: Sistemas membranosos intracitoplasmáticos	15
-Capítulo IV: Pared celular	30

Parte 3

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS MEMBRANAS FOTOSINTETICAS

-Capítulo V: Membranas fotosintéticas en bacterias purpúreas	49
---	----

Parte 4

QUIMICA DE LOS COMPONENTES CELULARES

-Capítulo VI: Bacterioclorofila y evolución fotosintética	75
-Capítulo VII: Pigmentos carotenoides	92

-Capítulo VIII: Citocromos	101
-Capítulo IX: Acidos grasos y complejos lipídicos	123

Parte 5

METABOLISMO

-Capítulo X: Metabolismo de materiales de reserva	144
-Capítulo XI: Metabolismo de compuestos azufrados	163
-Capítulo XII: Metabolismo del carbono	176
-Capítulo XIII: Metabolismo de compuestos orgánicos no aromáticos	191
-Capítulo XIV: Metabolismo de compuestos aromáticos	205
-Capítulo XV: Metabolismo del hidrógeno y fijación de nitrógeno	214

Parte 6

FISIOLOGIA

-Capítulo XVI: Respiración vs fotosíntesis	232
-Capítulo XVII: Crecimiento y metabolismo fermentativo	242

B.- EUGLENA

Parte 1

INTRODUCCION

-Capítulo I: Ecología	260
-Capítulo II: Taxonomía	271

Parte 2

MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

-Capítulo III: La célula de <i>Euglena</i>	284
--	-----

Parte 3

CULTIVO Y CRECIMIENTO DE EUGLENA

- Capítulo IV: Técnicas de cultivo y requerimientos para el desarrollo 309
- Capítulo V: Inhibidores del crecimiento y del metabolismo 346

Parte 4

METABOLISMO

- Capítulo VI: Metabolismo respiratorio 360
- Capítulo VII: Metabolismo de carbohidratos 375
- Capítulo VIII: Metabolismo fotosintético 392
- Capítulo IX: Fijación heterotrófica de CO₂ 406
- Capítulo X: Metabolismo de lípidos 413
- Capítulo XI: Metabolismo de ácidos nucleicos 420

Parte 5

CLOROFILA Y CLOROPLASTOS

- Capítulo XII: Estudios sobre clorofila 426
- Capítulo XIII: Cloroplastos 438
- Capítulo XIV: Inhibidores del sistema cloroplástico 453

C.- TETRAPIRROLES Y
COMPUESTOS
RELACIONADOS

Parte 1

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

- Capítulo I: Nomenclatura y estructura 472

-Capítulo II:	Propiedades	492
---------------	-------------	-----

Parte 2

BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

-Capítulo III:	Precursores e intermediarios de la biosíntesis de porfirinas. Acumulación de los mismos	503
-Capítulo IV:	Succinil-CoA sintetasa	512
-Capítulo V:	Acido delta amino levúlico sintetasa	516
-Capítulo VI:	Acido delta amino levúlico dehidrasa	524
-Capítulo VII:	Porfobilinogenasa	530
-Capítulo VIII:	Decarboxilasa	571
-Capítulo IX:	Coproporfirinoqenasa	580
-Capítulo X:	Protoporfirinoqenasa. Ferroquelatasa	589

Parte 3

RAMIFICACIONES DE LA BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

-Capítulo XI:	Biosíntesis de clorofila y bacterioclorofila	596
-Capítulo XII:	Biosíntesis de vitamina B ₁₂	609

Parte 4

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE LOS TETRAPIRROLES

-Capítulo XIII:	Regulación de la síntesis del hemo	622
-----------------	------------------------------------	-----

MATERIALES Y METODOS

<u>MATERIALES</u>	632
-------------------	-----

METODOS

-Capítulo I:	<i>Euglena gracilis</i>	635
--------------	-------------------------	-----

-Capítulo II:	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	639
-Capítulo III:	Determinación de la actividad enzimática	644
-Capítulo IV:	Determinación del tipo isomérico y de las porfirinas formadas	647

RESULTADOS Y DISCUSION

P.- BIOSINTESIS DE PORFIRINOGENOS EN *Rp. palustris*

-Capítulo P.I.:	Aislamiento y purificación de la PBG-asa de <i>Rp. palustris</i>	655
-Capítulo P.II.:	Algunas propiedades de la enzima	682
-Capítulo P.III:	Conclusiones	743

E.- BIOSINTESIS DE PORFIRINOGENOS EN *Euglena*

-Capítulo E.I.:	Cinética	746
-Capítulo E.II.:	Sobre el factor de regulación	753
-Capítulo E.III:	Conclusiones	790

INTRODUCCION

BACTERIAS FOTOSINTETICAS

PARTE 1

INTRODUCCION

CAPITULO I

ECOLOGIA

PARTE 1: INTRODUCCION

I. ECOLOGIA

Las bacterias fotosintéticas constituyen uno de los grupos más diversos de microorganismos y resultan interesantes por una gran variedad de motivos.

Son sumamente útiles para el estudio de los aspectos fundamentales del proceso fotosintético y tienen una gran importancia evolutiva además de ser de considerable interés, sus actividades ecológicas.

Las bacterias fotosintéticas se encuentran comúnmente en los manantiales sulfurosos, donde aparecen como floraciones masivas a pocos centímetros por debajo de la superficie del agua. También, se puede observar su presencia a lo largo de las costas marinas y en charcos poco profundos que no están en comunicación con el océano. En ellos, estas bacterias sulfato-reductoras inducen la producción de grandes cantidades de H_2S .

Sin embargo, el mayor número de estos microorganismos se encuentra en las profundidades de ciertos lagos, donde existen condiciones apropiadas para su crecimiento. Si hay un suministro adecuado de H_2S y el agua del lago es suficientemente clara como para que la luz penetre hasta la zona anaeróbica, puede desarrollarse una gruesa capa de bacterias fotosintéticas.

Los lagos que son más favorables para el crecimiento de estos microorganismos, son los llamados meromícticos, los cuales están permanentemente estratificados debido a la presencia de una mayor concentración de sales en el fondo de los mismos. En este tipo de lagos, existen floraciones durante todo el año. A menudo es tal la actividad fotosintética que desarrollan, que constituyen la fuente principal de materia orgánica para el ecosistema del mismo.

En general, el crecimiento de estas bacterias es más común en los lagos pequeños y en los charcos, que en las grandes masas de agua, debido principalmente a que la estratificación estable de estas últimas, se ve afectada por los vientos.

Los microorganismos fotosintéticos abundan no solamente en los ambientes acuáticos donde hay buena penetración de la

luz, sino también en las superficies de suelos y rocas.

En un lago u océano, la profundidad a la que penetra la luz en cantidad suficiente como para permitir el desarrollo de estos organismos, varía con la turbidez del agua. La intensidad luminosa para la cual la fotosíntesis tiene lugar a una velocidad suficiente como para equilibrar la respiración (en luz y oscuridad) recibe el nombre de punto de compensación.

Numerosos organismos fotosintéticos se dirigen hacia la luz, fenómeno llamado phototaxis. La ventaja de este proceso es que hace orientar al microorganismo para conseguir una fotosíntesis más eficaz.

La calidad espectral de la luz cambia con la profundidad, ya que el agua absorbe la luz roja más efectivamente que la azul. Esta absorción selectiva impone una limitación especial a las bacterias fotosintéticas, ya que los máximos de absorción de las clorofilas están en la región del rojo lejano.

Todas las especies de distintos organismos fotosintéticos absorben luz selectivamente a ciertas longitudes de onda.

La Figura 1.1 muestra los espectros de absorción de diversos microorganismos, obtenidos *in vivo*, sin extraer los pigmentos. Podemos observar que algunos absorben mejor la luz en regiones donde otros lo hacen pobremente y que esas diferencias tienen significado ecológico. Por ejemplo, las algas que son aerobias, crecen en la superficie del agua y absorben luz de las regiones azul y roja.

Las bacterias fotosintéticas son preferentemente anaerobias y pueden crecer en aguas profundas o sobre la superficie del fango, donde prevalecen dichas condiciones. Para sobrevivir deben absorber longitudes de onda más largas que las correspondientes para las algas, siendo por lo tanto, capaces de utilizar la luz que éstas no pueden absorber, principalmente de las regiones del rojo lejano y del infrarrojo.

Los diferentes espectros de absorción de los diversos grupos de microorganismos fotosintéticos tienen, por lo tanto, una base ecológica.

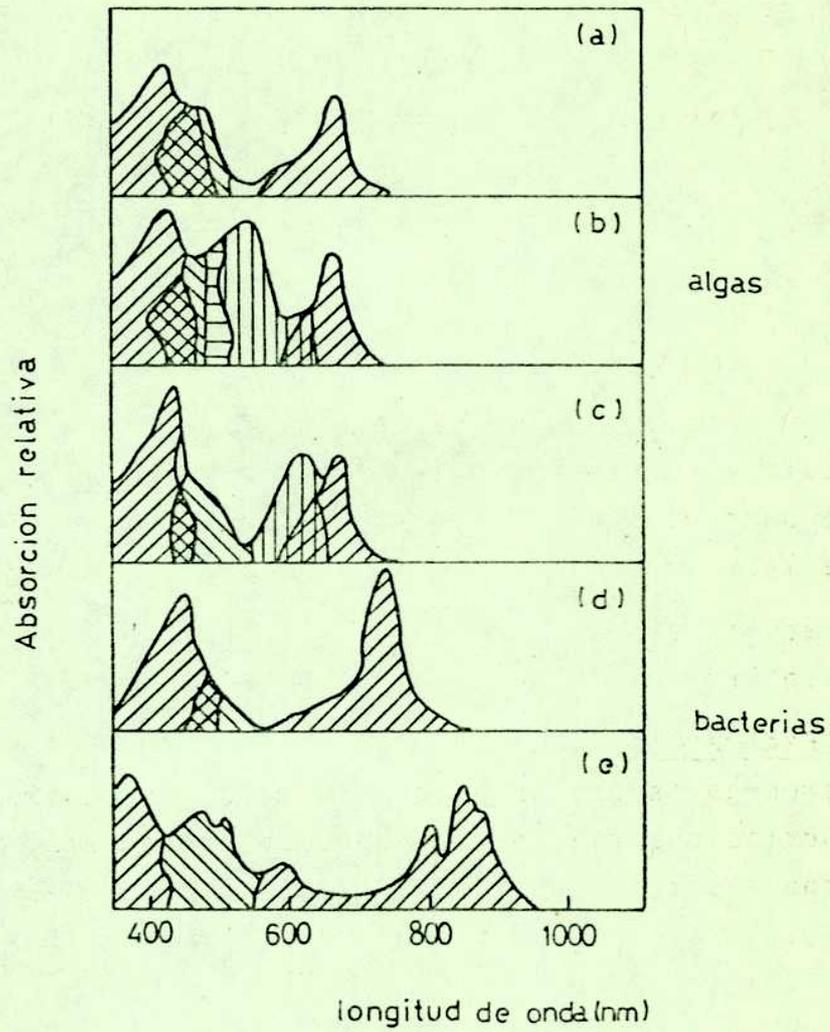


FIGURA 1.1.: Espectros de absorción de clorofilas y de pigmentos accesorios.

▨ clorofila; ▩ pigmentos accesorios.

(a) *Chlorella*; (b) *Porphyridium*;
(c) *Synechococcus*; (d) *Chlorobium*;
(e) *Rhodospseudomonas*.

CAPITULO II

TAXONOMIA. PROPIEDADES FISIOLOGICAS GENERALES

- II.1. Orden: Rhodospirillales
 - II.1.1. Suborden: Rhodospirillineae
 - II.1.1.1. Familia: Rhodospirillaceae
 - II.1.1.2. Familia: Chromatiaceae
 - II.1.2. Suborden: Chlorobineae
 - II.1.2.1. Familia: Chlorobiaceae
 - II.1.2.2. Familia: Chloroflexaceae
- II.2. Ultimas especies descriptas

II. TAXONOMIA. PROPIEDADES FISIOLÓGICAS GENERALES

II.1. Orden: Rhodospirillales

Este orden comprende los organismos que contienen bacterioclorofilas (Bcl's) y que llevan a cabo una fotosíntesis ano-xigénica (Pfennig y Trüper, 1971 c, 1974; Trüper, 1976).

Los dos subórdenes correspondientes son el Rhodospirillineae y el Chlorobiineae.

Las bacterias que poseen Bcl a ó b pertenecen al primer suborden antes mencionado. Estos pigmentos están siempre localizados en sistemas membranosos intracitoplasmáticos de diferentes tipos, que constituyen en realidad una continuidad de la membrana citoplasmática.

El suborden Chlorobiineae comprende aquellos microorganismos fotótrofos que contienen Bcl's c, d ó e. Dichos pigmentos están ubicados en organelas llamadas "chlorobium vesicles". Estas bacterias poseen también pequeñas cantidades de Bcl a.

II.1.1. Suborden: Rhodospirillineae

II.1.1.1. Familia: Rhodospirillaceae

Estos microorganismos han sido denominados bacterias purpúreas no sulfúreas ya que en un principio, se pensó que no podían utilizar el sulfuro. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que sí pueden hacerlo, siempre y cuando la concentración del mismo se mantenga a un nivel bajo. Aparentemente, las cantidades de sulfuro que son bien toleradas por las Chlorobiaceae y las Chromatiaceae son en cambio, tóxicas para las Rhodospirillaceae. Sin embargo, éstas difieren de los demás grupos de bacterias fotosintéticas en dos aspectos fundamentales:

- a) son incapaces de oxidar el azufre elemental a sulfato, aunque pueden oxidar el sulfuro a sulfato, sin la acumulación intermedia del S°;
- b) son fotótrofos facultativos, que pueden crecer en la oscuridad en forma aeróbica o a la luz, anaeróbicamente.

Algunas especies se desarrollan también en la oscuridad, de manera anaeróbica haciendo uso del metabolismo fermentativo.

En general, los organismos de esta familia son cultivados en condiciones preferentemente fotoorganoheterótrofas. Sólo existen dos especies que crecen en forma fotolitoautótrofa, en presencia de altas concentraciones de sulfuro: *Rhodopseudomonas sulfidophila* (Hansen y Veldkamp, 1973) y *Rp. sulfoviridis* (Keppen y Gorlenko, 1975).

Algunas cepas de otras especies también utilizan el sulfuro como dador de electrones, pero solamente en bajas concentraciones y preferentemente en cultivos continuos. Como productos de la oxidación del sulfuro, se pueden originar azufre elemental, sulfato o tetracionato. Todas las especies, excepto *Rhodopseudomonas globiformis* y *Rp. sulfoviridis* pueden usar el sulfato como fuente de azufre.

Ninguna de las Rhodospirillaceae estudiadas contenía adenilil sulfato reductasa (APS reductasa, EC 1.8.99.2).

La mayoría de los miembros de esta familia requieren además factores de crecimiento para su desarrollo, de manera que suele añadirse extracto de levadura o alguna otra fuente de vitaminas al medio de cultivo.

Cuando estos microorganismos se cultivan en forma aeróbica, no se forman, ni bacterioclorofila ni carotenoides, ya que su síntesis es inhibida por la presencia del O₂. Por esta causa, los cultivos crecidos en oscuridad y en aerobiosis, son incoloros. Bajo estas condiciones, las membranas fotosintéticas se reducen en forma considerable, siendo prácticamente no visibles.

En cuanto a la división celular, existen cinco especies que se reproducen por brotación: *Rhodopseudomonas palustris*, *Rp. viridis*, *Rp. acidophila*, *Rp. sulfoviridis* y *Rhodomicrobium vannielli*; todas las demás se dividen por fisión binaria. En las primeras tres especies antes nombradas, la célula hija se desarrolla en un extremo del tubo de división, el cual a su vez se origina en la célula madre, en el polo opuesto al que contiene el flagelo. En cambio, en *Rp. sulfoviridis* no se observa la formación de ningún tubo de división, apareciendo las células hijas directamente a partir de la madre.

En *Rhodomicrobium vannielli*, los tubos de división se originan en ambos polos de la célula materna, siendo aquellos ramificados y más largos que en otras especies. Como consecuencia de ésto, dichos tubos se conectan formando mallas extensas.

En la Tabla 2.1. se encuentran descriptas algunas características de 16 especies de Rhodospirillaceae.

A continuación se detallan ciertas propiedades importantes de algunos miembros de esta familia:

- a) *Rhodopseudomonas viridis* y *Rp. sulfoviridis* son las únicas que contienen Bcl b en lugar de Bcl a;
- b) *Rp. gelatinosa* licúa la gelatina;
- c) *Rhodocyclus purpureus* es la única especie no móvil (Pfennig, 1978);
- d) *Rhodomicrobium vannielli* produce exoesporas, siendo los quistes muy resistentes al calor;
- e) El espectro correspondiente a las células de *Rhodospirillum rubrum* es único en lo que se refiere a los siguientes aspectos:
 - i) Una banda característica de absorción a 550 nm debida a la presencia de spirilloxantina,
 - ii) una banda de absorción única y simétrica, de Bcl a, a 885 nm.

Todas las otras especies que contienen Bcl a, muestran dos o más bandas de absorción, en la región entre 800 y 890 nm.

II.1.1.2. Familia: Chromatiaceae

Estas bacterias fotosintéticas purpúreas (Pfennig y Trüper, 1971 b) llevan a cabo una fotosíntesis anoxigénica en la cual el sulfuro se oxida a sulfato, acumulándose azufre en vacuolas, dentro o fuera de la célula.

En general, las Chromatiaceae crecen a pH's algo más elevados que las bacterias fotosintéticas verdes y pueden ser enriquecidas a partir de muestras mixtas utilizando medios con un pH de 7.5.

TABLA 2.1.: Propiedades de las Rhodospirillaceae

ESPECIES	FORMA CELULAR ANCHO/LARGO(μ)	S. M. I.	COLOR CULTIVO ANAEROBICO	FACTORES DE CRECIMIENTO REQUERIDOS
<i>Rhodococcus ruber</i>	Circular 0,6-0,7/2,7-5	Tubular	Púrpura-violeta	Vit. B ₁₂ + PABA + Biotina
<i>Rhodocyclotobium vancouverense</i>	Ovoidea 1,0-1,2/2-2,8	Lamelar	Anaranjado-marrón	Ninguno
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	De varilla 1,0-1,3/2-5	Lamelar	Rojo-púrpura o anaranjado-marrón	Ninguno
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	De varilla/Esfera 0,5-1,2/2-2,5	Vesicular	Amarillo a marrón	Tiamina ± Biotina ± Niacina
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	De varilla 0,4-0,5/1-2	Tubular	Amarillo-marrón a rosado	Biotina + Tiamina
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Esfera: 1,6-1,8 De varilla	Vesicular Lamelar	Púrpura-rojo Rojo-marrón	Biotina + PABA PABA ± Biotina
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	0,6-0,9/1,2-2 Esfera/ovoidea 0,7/2-2,5	Vesicular	Verde-marrón a marrón	Biotina + Tiamina + Niacina
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	De varilla/Esfera 0,6-0,9/0,9-2,0	Vesicular	Amarillo amarrotado a rojo	Biotina + Tiamina + Niacina + PABA
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	De varilla 0,5-0,9/1,2-2	Lamelar	Verde oliva	Biotina + Piridoxina + PABA
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	De varilla 0,6-0,9/1,2-2	Lamelar	Verde	PABA + Biotina
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Espiralada 0,5-0,7/3,5	Sacos apilados	Marrón	PABA
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Espiralada 0,7-1,0/5-8	Sacos apilados	Marrón	Aminoácidos
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Espiralada 1,2-1,7/7-10	Sacos apilados	Marrón	Extracto de levadura
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Espiralada 0,8-1,0/7-10	Vesicular	Rojo	Biotina
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Espiralada 0,3-0,5/3-6	Tubular	Púrpura-Violeta o marrón-anaranjado	Ninguno

Los datos fueron recogidos de Hansen & Veldkamp (1973), Keppen & Gorkenko (1975), Mandel et al (1971), Maroc et al (1968), Pfennig (1974), Pfennig & Trüper (1971 d, 1974) y van Niel (1944). S.M.I. sistema membrano intracitoplasmático

Las especies que forman vacuolas gaseosas crecen mejor a bajas intensidades de luz.

El género *Ectothiorhodospira* es muy interesante porque además de depositar el azufre en forma externa, crece a concentraciones de cloruro de sodio cercanas a la saturación (crecimiento halofílico).

Los miembros de las Chromatiaceae que contienen Bcl b, pueden ser enriquecidos utilizando radiación infrarroja en lugar de luz visible, ya que la Bcl b tiene un máximo de absorción a 1.025 nm.

Todas las especies de esta familia pueden fotoasimilar compuestos orgánicos simples, siendo el acetato y el piruvato los más ampliamente usados.

La enzima adenilil sulfato reductasa (APS reductasa) se encuentra presente en estas bacterias.

En cuanto a la división celular, ocurre por fisión binaria. Los organismos móviles poseen células con flagelos polares. Algunos miembros forman agregados celulares característicos (Tabla 2.2.). Debido a diversas condiciones ambientales, numerosas especies se desarrollan como una única célula o formando agregados no móviles o racimos de tamaños y formas variables. Estas asociaciones no específicas pueden producir confusión en la identificación, la cual es confiable sólo en estudios con cultivos puros.

Las propiedades generales de las 24 especies de Chromatiaceae se encuentran descriptas en la Tabla 2.2.

Thiospirillum jenense, *Chromatium okenii*, *Chr. weissei*, *Chr. warmingii* y *Chr. buderii* difieren de las otras especies en tamaño, en su incapacidad de utilizar otros compuestos orgánicos que no sean el acetato y el piruvato y en sus requerimientos de vitamina B₁₂. Esta última también es necesaria para el crecimiento de *Amoebobacter roseus* y *Ectothiorhodospira mobilis*.

Existen algunas características específicas para ciertas especies, las cuales se detallan a continuación:

- a) *Thiocapsa pfennigii* es la única que contiene Bcl b; todas las demás poseen Bcl a. Por otro lado, su sistema membranoso intracitoplasmático tiene la forma de un manojo de tubos. To

TABLA 2.2.: Propiedades de las Chromatiaceae

ESPECIES	FORMA CELULAR ANCHO/LONG (μ)	MOTILIDAD	LIMO	AGREGADOS CELULARES	VACUOLAS GASEOSAS	COLOR DE LA SUSPENSION CELULAR
<i>Amoebobacter pendens</i> roseus	Esfera-1,5-2,5 Esfera-2,0-3,0		+		+	Rosa-rojo Rosa-rojo
<i>Chromatium budaxi</i>	De varilla-3,5-4,5/ /4,5-9		-			Púrpura-violeta
<i>gkacile minus</i>	De varilla-1,0-1,3/2-6		+			Marrón-rojo
<i>minutissimum</i>	De varilla-2,0/2,5-6		-			Púrpura-rojo
<i>ohenzi</i>	De varilla-1,0-1,2/2,0		-			Marrón-rojo
<i>vinosum</i>	De varilla-4,5-6,0/8-15		-			Púrpura-rojo
<i>violescens</i>	De varilla-2,0/2,5-6		-			Marrón-rojo
<i>wahmngii</i>	De varilla-3,5-4,0/5-11		-			Púrpura-violeta
<i>welssii</i>	De varilla-3,5-4,0/5-11		-			Púrpura-rojo
<i>Ectothiorhodospira halophila</i>	Espiralada-0,8/5,0		-			Rojo
<i>mobilis</i>	Espiralada-0,7-1/2-2,6		-			Marrón-rojo
<i>shaposhnikovii</i>	Espiralada-0,8-0,9/ /1,5-2,5		-			Marrón-rojo
<i>Lampyrogysia roseopersicina</i>	Esfera-3,0/3,5		-	racimos		Púrpura
<i>Thiocapsa pfeifferii</i>	Esfera-1,2-1,5		-	-		Anaranjado-marrón
<i>roseopersicina</i>	Esfera-1,2-3,0		+	-		Rosa-rojo
<i>Thiocapsa gelatinosa violacea</i>	Esfera-3,0 Esfera-2,5-3,0		+	racimos		Púrpura-rojo Púrpura-violeta
<i>Thiodictyon bacilliforme</i>	De varilla-1,5-2,0/3-6		-	racimos		Púrpura-violeta
<i>elegantis</i>	De varilla-1,5-2,0/3-8		-	mallas		Púrpura-violeta
<i>Thiopedia rosea</i>	Ovoidea-1,0-2,0/1,2/2,5		-	plaquetas		Púrpura-violeta
<i>Thiodactinia rosea</i>	Esfera-2,0-3,0		+	paquetes		Rosa-rojo
<i>Thiobacillum fenense</i>	Espiral-2,5-4,5/30-40	+	-			Anaranjado-marrón

Los datos fueron recogidos de Mandel et al (1971) y Pfenning & Trüper (1971 a, d; 1974).

das las otras especies, excepto el género *Ectothiorhodospira*, presentan vesículas membranosas;

- b) En las *Ectothiorhodospira*, las membranas intracitoplasmáticas se hallan en forma de una pila de discos (tilacoides). Sólo lamente este género produce depósitos externos de azufre;
- c) *Ectothiorhodospira halophila* es extremadamente halofílica, mientras que *Ectothiorhodospira mobilis*, *Chr. buderii* y *Chr. gracile* requieren concentraciones salinas moderadas.

II.1.2. Suborden: Chlorobiineae

II.1.2.1. Familia: Chlorobiaceae

Estos microorganismos han sido denominados bacterias fotosintéticas verdes. Son generalmente fotótrofos obligados incapaces de crecer en la oscuridad, independientemente de las condiciones de nutrición. Son también anaerobios obligados.

Los miembros de varios géneros producen vacuolas gaseosas, estructuras de flotación que capacitan al organismo para ajustar su profundidad en un lago. En general, las especies que forman dichas vacuolas se ubican en las capas acuosas donde la intensidad de la luz y la temperatura son más bajas.

El género *Pelodictyon* contiene organismos que se ramifican y permanecen unidos por un extremo, formándose así un retículo tridimensional. Estos pueden ser aislados incubando a intensidad luminosa, temperatura y concentración de sulfuro bajas, condiciones que son favorables, para su crecimiento pero que no lo son para el género más común de bacterias fotosintéticas verdes (*Chlorobium*). En los cultivos de enriquecimiento y debido a sus vacuolas gaseosas, las células de *Pelodictyon* se acumulan en la parte superior del frasco de crecimiento, donde pueden ser aisladas.

Las especies de esta familia poseen células de paredes rígidas, que se dividen por fisión binaria. Sólomente, en *Pelodictyon clathratiforme* ocurre por fisión ternaria.

Muchas cepas requieren vitamina B₁₂ para su crecimiento. Además, utilizan compuestos reducidos (sulfuro, azufre, tiosulfato) como dadores de electrones. El azufre elemental se forma

extracelularmente y se oxida a sulfato en una etapa posterior (Trüper y Pfennig, 1971).

La enzima APS reductasa se encuentra presente en estos microorganismos.

En la Tabla 2.3. se detallan algunas propiedades de las 10 especies de Chlorobiaceae estudiadas.

Ninguna de ellas es móvil.

II.1.2.2. Familia: Chloroflexaceae

Esta familia está morfológicamente relacionada con las flexibacterias, siendo sus propiedades básicas las correspondientes a las Chlorobiineae.

Uno de los miembros más interesantes de este grupo es Chloroflexis, organismo reptante filamentosos que también es termofílico.

Se encuentra comúnmente en los canales provenientes de fuentes termales, donde forma a menudo, gruesos acúmulos en asociación con algas cianofíceas.

Debido a que se desliza sobre superficies sólidas, puede aislarse recogiendo de los bordes de colonias impuras obtenidas de una muestra natural.

Chloroflexis no es un fotótrofo obligado. Puede crecer aeróbicamente en la oscuridad o anaeróbicamente a la luz.

Contiene Bcl's α y ϵ y β y γ carotenos. Su sistema fotosintético está dispuesto en vesículas, al igual que las demás bacterias de este grupo.

Pierson y Castenholz (1974) describieron una única especie: *Chloroflexus aurantiacus*.

Chloroflexis es de considerable interés evolutivo debido a que, como organismo deslizante, se parece morfológicamente a las cianofíceas, pero presenta un aparato fotosintético típico de bacterias. Puede, por lo tanto, representar un enlace entre las algas cianofíceas y las bacterias fotosintéticas.

TABLA 2.3.: Propiedades de las Chlorobiaceae

ESPECIES	FORMA CELULAR ANCHO/LONG (μ)	AGREGADOS EN CULTIVO PURO	VACUOLAS GASEOSAS	COLOR DE LA SUSPENSION CELULAR	BCC PREDOMINANTE *
<i>Chlorobium</i> <i>limicola</i> <i>vibriforme</i> <i>phaeobacterioides</i> <i>phaeovibrioides</i>	De varilla-0,7-1,0/0,9-1,5 Vibrio-0,5-0,7/1,0-1,2 De varilla-0,6-0,8/1,3-2,7 Vibrio-0,3-0,4/0,7-1,4	Cadenas Espirales Espirales		Verde Verde Marrón Marrón	c ó d d ó c e e
<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	Esfera-0,5-0,7/1,0-1,2	Cadenas		Verde	c
<i>Pelodictyon luteolum</i>	Ovoidea-0,6-0,9/1,2-2,0	Racimos, esferas		Verde	c ó d
<i>Cathartiforme platum</i>	De varilla-0,7-1,2/1,5-2,5 Vibrio-0,6-0,9/1,0-2,0	Mallas Espirales		Verde Marrón	c ó d e (7)
<i>Catitochloris sulfurea</i>	Esfera-0,5-1,5	Cuerdas (?)		Verde	ND
<i>Anaerochloris perglacialis</i>	Esfera-0,5-1,0	Microcolonias	+	Verde	ND

Los datos fueron recogidos de Gloe et al (1975), Gorlenko (1972), Gorlenko & Lebedeva (1971), Mandel et al (1971), Pfennig & Trüper (1971 d), y Trüper & Pfennig (1971). (*) (ND) No determinado.

11.2. Ultimas especies descriptas

Chromatiaceae:

- *Ectothiorhodospira halochloris* (Imhoff y Trüper; (1977) Arch. Microbiol. 114, 115-121).

Chlorobiaceae:

- *Chlorobium chlorovibrioides* (Gorlenko et al; (1974) Mikrobiologiya 43, 908-914).
- *Prosthecochloris phaeoasteroides* (Puchkova y Gorlenko; (1976) Mikrobiologiya 45, 655-659).

Chloroflexaceae:

- *Chloroflexus aurantiacus* f. *mesophilus* (Pivovarova y Gorlenko; (1977) Mikrobiologiya 46, 329-333).
- *Chloronema giganteum* (Dubinina y Gorlenko; (1975) Mikrobiologiya 44, 511-517).
- *Chloronema spiroideum* (Dubinina y Gorlenko; (1975) Mikrobiologiya 44, 511-517).
- *Oscillochloris chrysea* (Gorlenko y Pivovarova; (1977) Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. 3, 396-409).

Rhodospirillaceae:

- *Rhodocyclus purpureus* (Pfennig, N.; (1978) Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 283-288).

REFERENCIAS

- Gloe, A.; Pfennig, N.; Brockmann, H.; Jr. & Trowitzsch, W. (1975), Arch. Microbiol. 102, 103.
- Gorlenko, V.M. (1972), Mikrobiologiya 41, 370.
- Gorlenko, V.M. & Kuznetsov, S.J.; (1971) Mikrobiologiya 40, 746.
- Gorlenko, V.M. & Lebedeva, E.V. (1971), Mikrobiologiya 40, 1035.
- Hansen, T.A. & Veldkamp. H. (1973), Arch. Microbiol. 92, 45.
- Keppen, O.I. & Gorlenko, V.M. (1975), Mikrobiologiya 44, 258.
- Mandel, M.; Leadbetter, E.R.; Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 222.
- Maroc, J.; De Klerk, H. & Kamen, M.D.; (1968), Biochim. Biophys. Acta 162, 621.
- Pfennig, N. (1974), Arch. Microbiol. 100 , 197.
- Pfennig, N. (1978), Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 283.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971 a), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 11.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971 b), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 15.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971 c), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 17.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971 d), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 19.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1974), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. (R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, eds.), pp 24-64, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Pierson, B.K. & Castenholz, R.W. (1974), Arch. Microbiol. 100, 5.
- Trüper, H.G. (1976), Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 74.
- Trüper, H.G. & Pfennig, N.; (1971) Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 8.
- Van Niel, C.B. (1944), Bacteriol. Rev. 8, 1

PARTE 2

ESTRUCTURA

CAPITULO III

SISTEMAS MEMBRANOSOS INTRACITOPLASMATICOS (S.M.I.)

III.1. Generalidades

III.2. S.M.I. en la Familia Rhodospirillaceae

III.2.1. S.M.I. para las especies que se dividen por fisión binaria

a) Vesículas

b) Invaginaciones

c) Sistema membranoso lamelar apilado

III.2.2. S.M.I. para las especies que se reproducen por brotación

III.3. S.M.I. en la Familia Chromatiaceae

III.3.1. S.M.I. vesicular

III.3.2. S.M.I. tubular

III.3.3. Sistema membranoso lamelar apilado

III.4. Familia Chlorobiaceae: "chlorobium vesicles"

III.5. Otras estructuras

III.5.1. Estructuras internas: vacuolas gaseosas y grán- ulos de almacenamiento

PARTE 2: ESTRUCTURA

III. SISTEMAS MEMBRANOSOS INTRACITOPLASMATICOS

III.1. Generalidades

El aislamiento y la caracterización de las membranas de las bacterias fotosintéticas, comenzaron con el trabajo de French (1938) quien comparó el espectro de absorción de las células enteras de *Rhodospirillum rubrum* con los extractos metanólicos de las mismas. French observó que estos últimos no contenían spirilloxantina pero sí Bcl. De sus estudios concluyó que, en las células enteras la Bcl estaba unida a alguna proteína, extrayéndose aquella en metanol. Posteriormente, French (1940) informó la obtención del complejo Bcl-proteína, en extractos acuosos de dichas células.

Schachman et al (1952) trataron las células de *Rs. rubrum* con alúmina, aislando por ultracentrifugación la fracción particulada que contenía todos los pigmentos de las mismas. El coeficiente de sedimentación fue de 190 S y el tamaño de las partículas se estimó en 110 nm para los discos planos y 60 nm para las vesículas. El espectro de absorción de las células era idéntico al de estas partículas, que fueron llamadas cromatóforos (Crm's).

Frenkel (1954) demostró que, en presencia de ADP, fosfato inorgánico y luz, los Crm's llevaban a cabo la fotofosforilación.

Así, se aislaron de bacterias fotosintéticas las organelas que contenían la Bcl y los carotenoides de la célula total, las cuales eran fotoquímicamente activas.

Posteriormente, se realizaron experiencias con la finalidad de caracterizar la estructura y la función de estos Crm's.

El método de ruptura celular utilizado y las condiciones de aislamiento de estas organelas influyen en la composición de las mismas.

Newton y Newton (1957) usaron una variedad de métodos aislando dos fracciones por centrifugación diferencial: los cromatóforos (hasta 100 nm de diámetro) y las partículas pequeñas

(alrededor de 40 nm de diámetro). Ambas pueden llevar a cabo la fotofosforilación.

Otros investigadores utilizaron la centrifugación por gradiente de densidad (Frenkel y Hickman, 1959; Cohen-Bazire y Kunizawa, 1963; Worden y Sistro, 1964), separando dos bandas importantes muy pigmentadas, denominadas fracciones liviana y pesada de Crm's. Comparando ambas metodologías, se observó que la fracción Crm's de Newton y Newton (1957) correspondía a la banda pesada y las partículas pequeñas a la fracción liviana.

Hallazgos posteriores indicaron que la fracción Crm's de Newton estaba contaminada con material proveniente de la pared celular, concluyéndose que los Crm's correspondían a las pequeñas partículas halladas por Newton y Newton (1957) y a la banda liviana de Cohen -Bazire y Kunisawa (1963).

Los Crm's de todos los miembros estudiados de Rhodospirillaceae y Chromatiaceae son estructuras membranosas. Sin embargo, las bacterias sulfúreas verdes (Chlorobiaceae) poseen "cromatóforos" distintos por lo cual reciben el nombre de "chlorobium vesicles" (Cohen-Bazire, 1963; Cohen-Bazire et al, 1964).

Actualmente, en la literatura se puede encontrar una gran cantidad de micrografías electrónicas de bacterias fotosintéticas, pudiéndose obtener así una idea general de la estructura de las mismas.

La mayor parte de las membranas fotosintéticas surgen por invaginación de la membrana citoplasmática (M.C.). En algunas bacterias, dicha invaginación produce vesículas sueltas y en otras, éstas quedan unidas a la M.C., en forma tubular o de múltiples sacos aplanados y apilados. *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Cohen-Bazire, 1963) y *Rs. rubrum* (Vatter y Wolfe, 1958) presentan vesículas mientras que otras especies de esta familia muestran estructuras lamelares.

Dado que el término cromatóforo ha sido utilizado de distintas formas por diferentes autores, en el presente capítulo se usará la expresión sistema membranoso intracitoplasmático (S.M.I.) para describir las estructuras membranosas activas fotosintéticamente.

III.2. Sistemas Membranosos Intracitoplasmáticos en la Familia Rhodospirillaceae

La mayor parte de las bacterias purpúreas no sulfúreas son microaerófilas. Ha quedado claramente demostrado que un aumento en la concentración de O_2 produce una disminución del contenido del ftopigmento y del sistema membranoso intracitoplasmático.

La división celular de esta familia ocurre generalmente por fisión binaria, con excepción del género *Rhodomicrobium* y de las especies *Rp. palustris*, *Rp. viridis* y *Rp. acidophila*, las cuales se reproducen por brotación como ya fue mencionado en el capítulo anterior.

III.2.1. S.M.I. para las especies que se dividen por fisión binaria

a) Vesículas

Bajo condiciones aeróbicas, el desarrollo de la membrana citoplasmática es mínimo; el crecimiento se realiza por medio del metabolismo oxidativo y la síntesis de la Bcl está determinada por la presión parcial de O_2 .

Cuando las células crecen anaeróbicamente, a intensidades luminosas moderadas, se obtiene un buen desarrollo del S.M.I. vesicular.

Las Rhodospirillaceae que presentan este tipo de sistemas incluyen las *Rp. capsulata*, *Rp. globiformis*, *Rp. sphaeroides* y *Rhodospirillum rubrum*.

Se demostró bien claramente que las vesículas se forman siguiendo una serie de etapas: primero, aparece una simple protusión de la membrana, la cual luego se invagina y se estrecha, dando origen a una vesícula más o menos esférica, la que permanece unida a la membrana citoplasmática (Figura 3.1.) (Cohen-Bazire y Kunisawa, 1963; Drews y Giesbrecht, 1963; Holt y Marr, 1965 a-c; Boatman, 1964; Peters y Cellarius, 1972). Finalmente, estas protuberancias penetran profundamente en el citoplasma celular tomando apariencia tubular y proliferando en forma de red (Figura 3.2.)

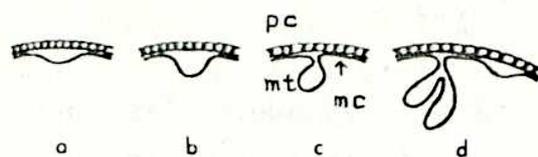


FIGURA 3.1.: Ilustración esquemática de la membrana citoplasmática (M.C.) para formar los cromatóforos (Peters y Cellarius, 1972)
 a: Protrusión de la M.C.; b: Invaginación; c: Constricción de la M.C.; d: Proliferación y nuevas protrusiones
 P.C.: pared celular
 M.T.: membrana tilacoïdal o del cromatóforo.

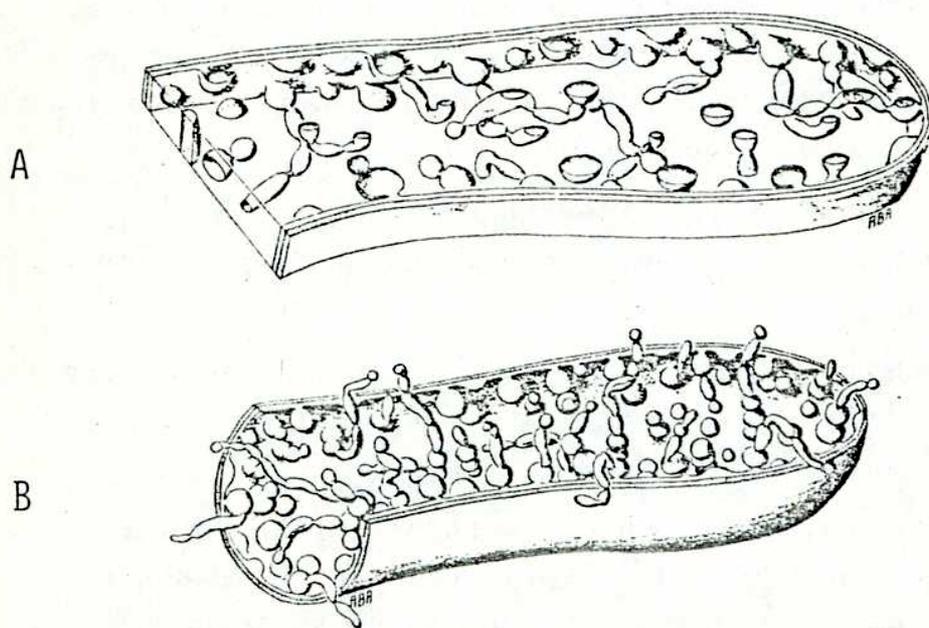


FIGURA 3.2.: A: Representación de una micrografía electroelectrónica de una sección de *Rhodospirillum rubrum*.
 B: Representación tridimensional hipotética del sistema membranoso interno de *Rhodospirillum rubrum* (Holt y Marr, 1965 a).

b) Invaginaciones

Rp. gelatinosa, *Rhodospirillum tenue* y *Rhodocyclus purpureus* muestran invaginaciones pequeñas, únicas e irregulares. Se han realizado muy pocos estudios con este grupo de bacterias, siendo *Rp. gelatinosa* (Weckesser et al, 1969) la que contribuye con la mayor cantidad de datos.

Estos autores concluyen que existe un escaso desarrollo del S.M.I. a pesar del contenido de Bcl (10-25 μg Bcl /mg proteína) sugiriendo que la membrana citoplasmática estaría incluida en el sistema del aparato fotosintético.

c) Sistema membranoso lamelar apilado

Las bacterias fotosintéticas marrones, estrictamente anaeróbicas, de la especie Rhodospirillum: *Rs. fulvum*, *Rs. molischi*anum y *Rs. photometricum* (Giesbrecht y Drews, 1962; Gibbs et al, 1965; Hickman y Frenkel, 1965) presentan un S.M.I. constituido por lamelas cortas apiladas, formadas por intrusión tubular de la M.C. Estas estructuras, que tienen forma de discos replegados no se encuentran ubicadas paralelamente a la membrana citoplasmática, sino formando un ángulo con la misma.

Hickman y Frenkel (1965) sugirieron que las lamelas fotosintéticas de *Rs. molischi*anum se originaban como una extensión de la M.C. dentro del protoplasma celular.

III.2.2. S.M.I. para las especies que se reproducen por brotación

El grupo de bacterias que se multiplican por brotación incluye el género Rhodomicrobium y tres especies de Rhodopseudomonas: *Rp. acidophila*, *Rp. palustris* y *Rp. viridis*. Las evidencias sugieren que la M.C. de estos microorganismos se extiende en forma de pares de lamelas ordenadas periféricamente en numerosas capas paralelas a aquella. *Rhodomicrobium vannielli* (Conti y Hirsch, 1965; Boatman y Douglas, 1961), *Rp. palustris* (Cohen-Bazire y Sistrom, 1966) y *Rp. viridis* (Giesbrecht y Drews, 1966) presentan lamelas que forman un anillo abierto, sugiriendo los autores que el área ocupada por las mismas se extiende gradualmente hasta formar anillos concéntricos.

III.3. S.M.I. en la Familia Chromatiaceae

Esta familia acumula el azufre elemental en vacuolas dentro de la célula, excepto el género *Ectothiorhodospira* que deposita el S° externamente.

Estas bacterias son anaerobias estrictas, con excepción de *Thiocapsa roseopersicina*, la cual puede crecer en la oscuridad, bajo condiciones microaerófilas.

Todas las especies se reproducen por fisión binaria.

Las Chromatiaceae pueden agruparse de acuerdo con el tipo de S.M.I. presente en sus células.

III.3.1. S.M.I. vesicular

Todas las especies de los géneros *Thiospirillum*, *Chromatium*, *Thiocystis*, *Thiosarcina*, *Lamprocystis*, *Thiodictyon*, *Thiopedia* y *Amoebobacter* presentan un S.M.I. vesicular. También *Thiocapsa roseopersicina* muestra un sistema membranoso de este tipo.

Además del S.M.I. vesicular, se pueden encontrar estructuras lamelares extendidas y dispersas en la célula o concentradas en su periferia. La presencia de estas membranas intracitoplasmáticas está relacionada probablemente, con la exposición de la célula a altas intensidades luminosas o en algunos casos, refleja un descenso general en las condiciones de cultivo.

Fuller et al (1963) encontraron en *Chr. vinosum* cepa D, bajo condiciones de elevada intensidad luminosa (7000 ft-c de luz incidente), pares de membranas que se ubicaban con mayor frecuencia en las áreas celulares periféricas. En cambio, utilizando bajas intensidades (100 ft-c ~ 1000 luxes de luz incidente) sólo se hallaron membranas intracitoplasmáticas vesiculares.

También se observó la presencia de estructuras lamelares en *Chr. buderii* (Remsen y Trüper, 1973), cuando las células crecieron a intensidades de 500-1000 luxes. Trüper y Schlegel (1964) mostraron que para *Chr. buderii* y *Chr. okenii*, estos luxes correspondían a intensidades entre óptimas y elevadas, en contraposición con lo afirmado por Fuller (1963).

III.3.2. S.M.I. tubular

En 1967, Eimhjellen et al describieron una especie nueva dentro de las bacterias sulfúreas fototróficas. Este organismo difería de todas las Chromatiaceae estudiadas, en su S.M.I. de tipo tubular, recibiendo el nombre de *Thiocapsa pfennigii* (Eimhjellen, 1970). El hecho más llamativo de estas células es la extensión de su sistema membranoso interno, el cual ocupa la mayor parte de la circunferencia externa celular.

Existen evidencias concluyentes que indican que dichos tubos se originan en la membrana citoplasmática (Eimhjellen et al, 1967). Estudios posteriores mostraron que estas membranas tubulares estaban compuestas por subunidades organizadas en hexágonos regulares, con una distancia de 12-13 nm entre los respectivos centros.

III.3.3. Sistema membranoso lamelar apilado

Dentro de este sistema se encuentran todas las especies del género *Ectothiorhodospira*. Una diferencia significativa entre este grupo y las demás Chromatiaceae es que todas las especies de *Ectothiorhodospira* depositan el azufre fuera de la célula. Esto estaría relacionado con el tipo de sistema membranoso presente. En *E. mobilis* (Remsen et al, 1968; Holt et al, 1968) y *E. halophila* (Raymond y Sistrom, 1967) se encontraron numerosas conexiones entre la membrana citoplasmática y las lamelas.

De acuerdo con Remsen et al (1968) la M.C. se pliega formando una conformación primaria semejante a un tubo o a un saco, los cuales posteriormente se estrechan y se dilatan constituyendo estructuras tipo discos (Figura 3.3.). Las invaginaciones secundarias pueden ocurrir en cualquier punto de la conformación anterior.

III.4. Familia Chlorobiaceae: "chlorobium vesicles"

Las bacterias verdes sulfúreas son estrictamente anaeróbicas, fotótrofas obligadas y no móviles.

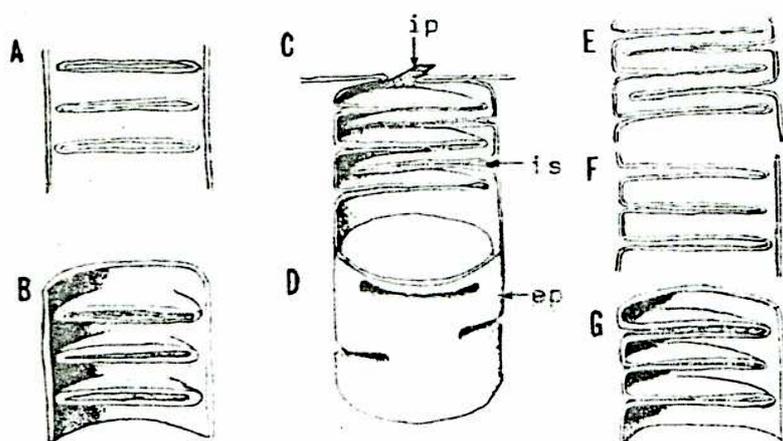


FIGURA 3.3.: Reconstrucción de la disposición espacial de las membranas de *Ectothiorhodospira mobilis*.
 A, E, F y B-D, G disposiciones bi y tridimensional respectivamente.
 I.P.: invaginaciones primarias; I.S.: invaginaciones secundarias; E.P.: estructura primaria.

Esta familia es única en cuanto a la presencia de ciertas organelas "chlorobium vesicles", las cuales contienen los pigmentos fotosintéticos.

De todas las bacterias fotosintéticas, éstas son las menos estudiadas y las más pobremente descritas.

Vatter y Wolfe (1958) analizaron una cepa de *Chlorobium limicola*. No pudieron detectar vesículas, pero observaron que el citoplasma contenía numerosos gránulos de 15-25 nm de diámetro, los que fueron considerados como los cromatóforos de dicha cepa. Una interpretación posterior llevó a considerar a estos gránulos como inclusiones de metafosfato, compuesto que siempre es abundante en las bacterias verdes crecidas en un medio que contiene exceso de fosfato inorgánico.

Bergeron y Fuller (1961) examinaron la cepa *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* y no distinguieron ni vesículas ni estructuras lamelares en el citoplasma. Además de los gránulos de metafosfato, estos investigadores observaron en el citoplasma, numerosas partículas de 15 nm de diámetro. Estos estudios iniciales fracasaron en cuanto a la identificación del aparato fotosintético, sugiriéndose que éste en bacterias verdes es diferente y considerablemente más complejo que el de las bacterias purpúreas.

El primer trabajo detallado acerca de la localización de los pigmentos fotosintéticos en un sistema libre de células fue llevado a cabo por Bergeron y Fuller (1961). Estos autores encontraron que el sistema pigmentario, en un extracto celular, estaba asociado a partículas de alrededor de 15 nm de diámetro, las cuales eran difíciles de separar de los ribosomas. Bergeron y Fuller relacionaron la ubicación de los pigmentos con estos elementos celulares. Cohen-Bazire (1963) en colaboración con Norbert Pfennig informó el hallazgo en todas las cepas de *Chlorobium*, de una estructura compleja, la que recibió el nombre de "chlorobium vesicles". Estas son relativamente grandes, de 100-150 nm de longitud y 30-40 nm de ancho. Presentan un sistema membranoso, el cual consiste de una o dos unidades de membrana. Observaciones posteriores indicaron que el sistema pigmentario se encontraba asociado a estas vesículas (Cohen-Bazire et al, 1964). Tomina y Federov (1967) y Pfennig y Cohen-Bazire (1967) confirmaron su presencia en *Chlorobium limicola* f. *thio-*

sulfatophilum y *Pelodictyon clathratiforme* respectivamente. Además de "chlorobium vesicles" y vacuolas gaseosas, *P. clathratiforme* contiene mesosomas y una organela fibrilar de función desconocida.

Las invaginaciones mesosomales de la membrana citoplasmática, en miembros de *Chlorobium* y *Pelodictyon*, son análogas a las estructuras observadas en numerosas bacterias no fotosintéticas. Estas formaciones parecen estar asociadas a la división celular (Cohen-Bazire et al, 1964; Pfennig y Cohen-Bazire, 1967).

Las especies de *Chlorobium* difieren de *P. clathratiforme* en la reproducción. Las primeras se multiplican por fisión binaria mientras que las últimas lo hacen por fisión ternaria precedida por una ramificación celular (Pfennig y Cohen-Bazire, 1967).

Gorlenko y Zhilina (1968) estudiaron la ultraestructura de *Prosthecochloris aestuarii*, confirmando la presencia de "chlorobium vesicles" y estableciendo que éstas corresponden al aparato fotosintético de las bacterias verdes.

Finalmente, el nuevo género descubierto: *Chloroflexus*, presenta también "chlorobium vesicles", S° y vacuolas externas conteniendo S° . De acuerdo con estas características, numerosos autores la han clasificado como un miembro de las Chlorobiaceae, no obstante su habilidad para crecer aeróbicamente en la oscuridad y su naturaleza filamentosas y deslizante. Según algunos investigadores, *Chloroflexus* formaría parte de otra familia: Chloroflexaceae (Pierson y Castenholz, 1974).

III.5. Otras estructuras

III.5.1. Estructuras internas: vacuolas gaseosas y gránulos de almacenamiento

Una de las estructuras más llamativas encontradas en las bacterias sulfúreas fotosintéticas es el gránulo que almacena S° . Estos gránulos están distribuidos, a menudo, en todo el citoplasma y pueden llegar a tener hasta 1,0 μ m de diámetro. En secciones finas, presentan las características de una vacuola vacía, con una membrana limitante.

La micrografía electrónica muestra que existe una asociación estrecha entre las vesículas y las membranas de estos gránulos, sugiriendo que la membrana limitante derivaría de la intracitoplasmática.

Nicholson y Schmidt (1971) y Schmidt et al (1971) describieron a la membrana limitante como una membrana proteica formada por componentes globulares de 2,5 nm, los cuales presentaban un peso molecular de 13.500 daltons para *Chr. vinosum* cepa D (Schmidt et al, 1971) y 18.500 daltons para *Chr. buderxi*, indicando que se trataba de una estructura posiblemente semejante a las "chlorobium vesicles" y a las vacuolas gaseosas.

De acuerdo con Pfennig (1967), las células de algunas cepas de bacterias purpúreas y verdes contienen estructuras de forma irregular y altamente refringentes: las vacuolas gaseosas (V.G), que les confieren la capacidad de flotar.

Las V.G. se resuelven mediante el microscopio electrónico, observándose grupos de vesículas cilíndricas, con extremos cónicos, ubicadas paralelamente.

Las V.G. difieren marcadamente en cuanto a su longitud, en los distintos organismos, pero su diámetro es de alrededor de 0,15 μ . Están rodeadas de una membrana que aparece como única capa, densa electrónicamente, de aproximadamente 2 nm de ancho. Esta membrana está compuesta sólo por proteína y consiste en subunidades repetidas, alineadas para formar una estructura rígida. Es impermeable al agua y a los solutos pero permeable a los gases. La rigidez de la membrana de la V.G. es esencial para que la estructura resista las presiones ejercidas sobre ella desde el exterior. Probablemente por este motivo, esté compuesta sólo por proteína, la que es capaz como ya dijimos de formar una membrana rígida.

En las células donde no se detectan V.G. por microscopía, las vesículas se encuentran colapsadas (Rhodospirillaceae).

III.5.2. Flagelos

Numerosas bacterias fotosintéticas son móviles. Esta capacidad se debe normalmente, a la presencia de orgánulos especiales llamados flagelos. Son apéndices largos y delgados, libres

por un extremo y unidos a la célula por el otro.

Los flagelos se disponen de modo diferente en las distintas bacterias. En los microorganismos fotosintéticos es común la presencia de los flagelos polares, los cuales se encuentran unidos a un extremo celular o a ambos.

Remsen et al (1968) estudiaron su estructura en *Ectothiorhodospira mobilis*. En la Figura 3.4. se encuentra ilustrado un flagelo con su cuerpo basal.

Su descripción está de acuerdo con las conclusiones obtenidas por Cohen-Bazire y London (1967).

El flagelo de *E. mobilis* parece originarse en una estructura esférica de aproximadamente 50 nm de diámetro, la cual formaría parte de una estructura mayor. Cada flagelo crece a partir de un cuerpo basal. Este se encuentra asociado a otro de mayor tamaño (placa polar).

Tauschel y Drews (1970) examinaron la estructura del flagelo de *Rp. palustris*. Este está constituido por dos regiones importantes: la filamentosa (4,5-5,5 μ de longitud) y el gancho flagelar (0,24-0,53 μ de longitud) (Figura 3.5.). Ambas zonas contienen una parte central de 12,5 nm de diámetro, que está compuesta por subunidades de una proteína: la flagelina.

Los flagelos pueden eliminarse fácilmente de un organismo agitando rápidamente una suspensión celular. La viabilidad no se ve afectada al desprenderse dichos orgánulos, pero sí la motilidad.

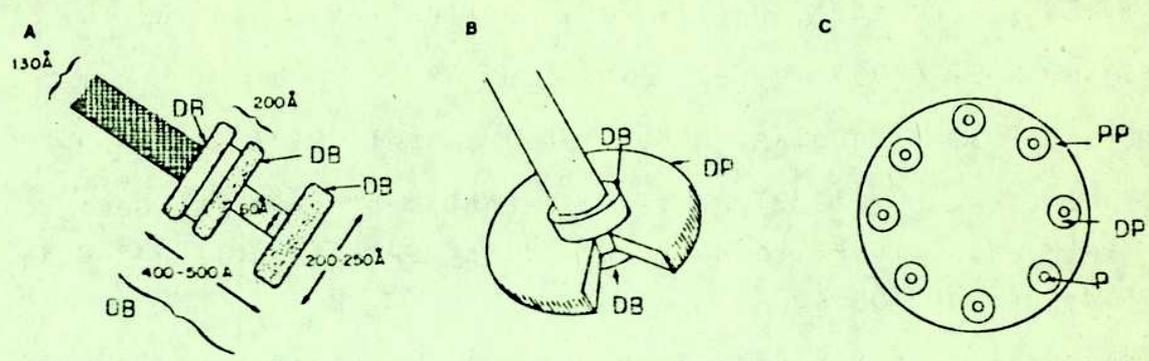


FIGURA 3.4.: A: Diagrama ilustrativo de la estructura de la porción basal del flagelo: disco basal (D.B.) y organela basal (O.B.)
 B: Inserción del flagelo en el disco polar (D.P.). Los discos basales (D.B.) permiten el "calce" del flagelo en los discos polares.
 C: Relación existente entre el disco polar (D.P.) y el plato polar (P.P.). El flagelo penetra en el disco polar (D.P.) a través de un poro central (P).

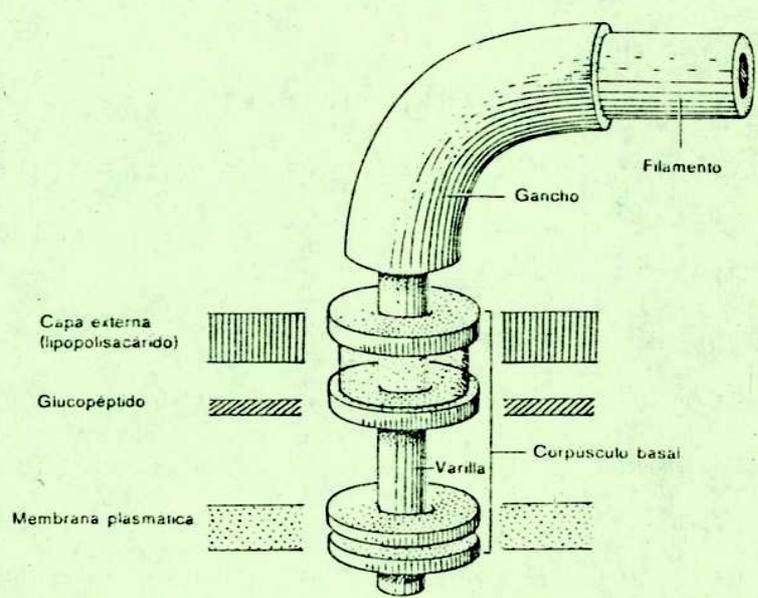


FIGURA 3.5.: Dibujo interpretativo de la forma más probable de unión del flagelo

REFERENCIAS

- Bergeron, J.A. & Fuller, R.C. (1961) Macromolecular Complexes (M.V. Edds. Jr, ed.), pp 179-202, Ronald Press, New York.
- Boatman, E.S. (1964) J.Cell Biol. 20, 297
- Boatman, E.S. & Douglas, H.C. (1961) J. Cell Biol. 11, 469
- Cohen-Bazire, G. (1963) Bacterial Photosynthesis (H. Gest, A. San Pietro y L.P. Vernon, eds.), pp 89-114, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.
- Cohen-Bazire, G. & Kunisawa, R. (1963) J. Cell Biol. 16, 401
- Cohen-Bazire, G. & London, J. (1967) J. Bacteriol. 94, 458
- Cohen-Bazire, G. & Sistrom, W.R. (1966) The Chlorophylls (L.P. Vernon y G.R. Seely, eds.), pp 313-341, Academic Press, New York)
- Cohen-Bazire, G.; Pfennig, N. & Kunisawa, R. (1964) J. Cell Biol. 22, 207
- Conti, S.F. & Hirsch, P. (1965) J. Bacteriol. 89, 503
- Drews, G. & Giesbrecht, P. (1963) Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig., Reihe A 190, 508.
- Eimhjellen, K.E. (1970) Arch. Mikrobiol. 73, 193
- Eimhjellen, K.E.; Steensland, H. & Traetteberg, J. (1967) Arch. Mikrobiol. 59, 82.
- French, C.S. (1938) Science 88, 60
- French, C.S. (1940) J. Gen. Physiol. 23, 469
- Frenkel, A.W. (1954) J. Am. Chem. Soc. 76, 5568
- Frenkel, A.W. & Hickman, D.D. (1959) J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 285
- Fuller, R.C.; Conti, S.F. & Mellin, D.B. (1963) Bacterial Photosynthesis (H.Gest, A. San Pietro y L.P. Vernon, eds.), pp. 71-87, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio
- Gibbs, S.P.; Sistrom, W.R. & Worden, P.B. (1965) J. Cell Biol. 26, 395
- Giesbrecht, P. & Drews, G. (1962) Arch. Mikrobiol. 43, 152

- Giesbrecht, P. & Drews, G. (1966) Arch. Mikrobiol. 54, 297
- Gorlenko, V.M. & Zhilina, T.N. (1968) Mikrobiologiya 37, 1052
- Hickman, D.D. & Frenkel, A.W. (1965) J. Cell Biol. 25, 261
- Holt, S.C. & Marr, A.G. (1965 a) J. Bacteriol. 89, 1402
- Holt, S.C. & Marr, A.G. (1965 b) J. Bacteriol. 89, 1413
- Holt, S.C. & Marr, A.G. (1965 c) J. Bacteriol. 89, 1421
- Holt, S.C.; Trüper, H.C. & Takacs, B.J. (1968) Arch. Mikrobiol. 62, 111
- Newton, J.W. & Newton, G.A. (1957) Arch. Biochem. Biophys. 71, 250
- Nicholson, G.I. & Schmidt, G.L. (1971) J. Bacteriol. 105, 1142
- Peters, G.A. & Cellarius, R.A. (1972) Bioenergetics 3, 345
- Pfennig, N. (1967) Annu. Rev. Microbiol. 21, 285
- Pfennig, N. & Cohen-Bazire, G. (1967) Arch. Mikrobiol. 59, 226
- Pierson, B.K. & Castenholz, R.W. (1974) Arch. Microbiol. 100, 5
- Raymond, J.C. & Sistro, W.R. (1967) Arch. Mikrobiol. 59, 255
- Remsen, C.C. & Trüper, H.G. (1973) Arch. Mikrobiol. 90, 269
- Remsen, C.C.; Watson, S.W.; Waterbury, J.B. & Trüper, H.G. (1968) J. Bacteriol. 95, 2374
- Schachman, H.K.; Pardee, A.B. & Stanier, R.Y. (1952) Arch. Biochem. 38, 213
- Schmidt, G.L.; Nicholson, G.L. & Kamen, M.D. (1971) J. Bacteriol. 105, 1137
- Tauschel, H.D. & Drews, G. (1970) Cytobiologie Z. Exp. Zellforsch. 2, 87
- Tomina, I.V. & Federov, V.D. (1967) Mikrobiologiya 36, 663
- Trüper, H.G. & Schlegel, H.G. (1964) J. Microbiol. Serol. 30, 225
- Vatter, A.E. & Wolfe, R.S. (1958) J. Bacteriol. 75, 480
- Weckesser, J.; Drews, G. & Tauschel, H.D. (1969) Arch. Mikrobiol. 65, 346

PARED CELULAR

IV.1. Función y propiedades

IV.2. Estructura

IV.3. Composición química

IV.3.1. Glicopéptidos (Mureína)

IV.3.2. Lipopolisacáridos

IV.3.2.1. Propiedades generales

IV.3.2.2. Procedimientos de Extracción

IV.3.2.3. Estado físico

IV.3.2.4. Constituyentes

a) Hidratos de Carbono

b) Acidos grasos

IV.3.3. Otros componentes

IV. PARED CELULAR

IV.1. Función y propiedades

Las células de las bacterias fotosintéticas pueden tener distintas formas: esféricas (*Thiocapsa*), de varilla o bastón (*Rhodopseudomonas*), de espiral (*Rhodospirillum*) u ovoides (*Rhodomicrobium*).

Dichas formas las proporciona la pared celular (P.C.), la cual es responsable también de la rigidez de la célula. Por otro lado, ésta soporta la presión osmótica del protoplasto y es esencial para mantener la integridad celular. La mayoría de los ambientes bacterianos tienen concentraciones de solutos considerablemente inferiores a las correspondientes al interior de la célula. Puesto que el agua pasa por ósmosis, hay una tendencia constante a la entrada de la misma y si no fuera por la rigidez de la P.C. la célula se hincharía y estallaría.

Si la concentración de soluto es mayor en el medio, las células se deshidratan, proceso denominado plasmolisis.

La P.C. de los procariotas es químicamente bastante diferente a la de cualquier célula eucariótica, siendo ésta una de las características distintivas entre ambos tipos de organismos.

La P.C. es difícil de observar con el microscopio óptico pero puede verse fácilmente en secciones finas de células, con el microscopio electrónico.

Las células Gram-negativas y Gram-positivas difieren considerablemente en la estructura de sus P.C, tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 4.1.

La P.C. de los organismos Gram-negativos es una estructura pluriestratificada y muy compleja mientras que la correspondiente a los Gram-positivos consiste en una única capa, a menudo mucho más gruesa.

Si bien la P.C. puede parecer suficientemente continua cuando se observa con el microscopio electrónico, contiene numerosos poros a través de los cuales pueden pasar el agua y diversas sustancias químicas. Sólo representa una barrera para moléculas muy grandes como las proteínas y los ácidos nucleicos.

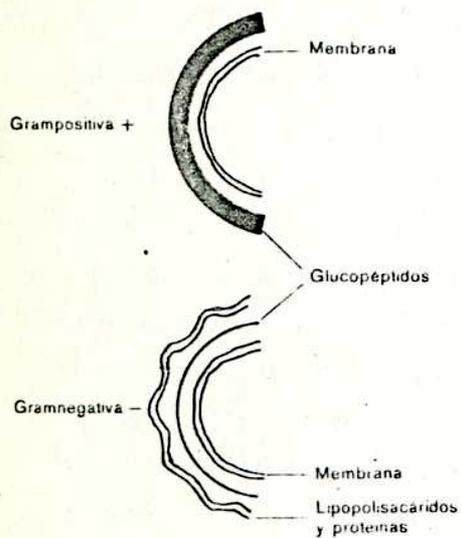


FIGURA 4.1.: Comparación de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

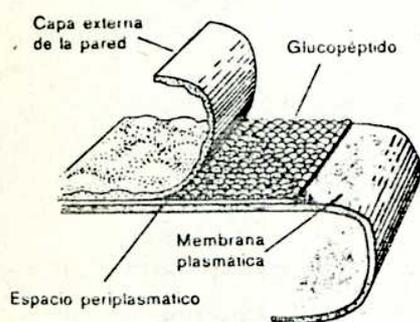


FIGURA 4.2.: Esquema de la pared celular de una bacteria Gram-negativa sencilla. En algunas bacterias Gram-negativas hay más capas.

Una consecuencia de la impermeabilidad de la P.C. para las proteínas es que ciertas enzimas liberadas a través de la membrana plasmática pueden acumularse entre ésta y la P.C. en una región llamada espacio periplasmático (Figura 4.2). Estas enzimas desempeñan papeles importantes en la nutrición celular.

La pared posee también áreas específicas de estructura química y carga determinadas, mediante las cuales se comunica con el exterior (receptores, O-antígenos, etc.).

IV.2. Estructura

Las bacterias fotosintéticas son Gram-negativas. Una típica P.C. correspondiente a un microorganismo Gram-negativo con tiene una capa básica, densa electrónicamente (3-8 nm de ancho) y una membrana externa (M.E.) (7,5 nm de ancho) (Glauert y Thornley, 1969; Costerton et al, 1974).

La capa densa básica (capa de mureína) puede resolverse pero con cierta dificultad. En numerosas oportunidades se encuentra asociada a la M.E., tal que se la puede observar como un en grosamiento de la superficie interna de esta última. A veces, se nota sólomente como una capa adicional, la cual se encuentra bordeando el contorno interno de la M.E.

En general, todas las bacterias fotosintéticas tienen una M.E. en la P.C., que aparece como una unidad de membrana, con un ancho de 7-8 nm.

En algunos organismos Gram-negativos existe una envoltu ra adicional externa a la M.E. (Glauert y Thornley, 1969), la cual cubre como consecuencia, los O-antígenos. *Ectothiorhodospira mobilis* y *Chromatium gracile* presentan una capa externa formada por partículas esféricas de 5 nm de diámetro y con una distancia de 8 nm entre centros (Remsen et al, 1968; 1970).

Algunas bacterias fotosintéticas, como *Thiocapsa*, producen grandes cantidades de una especie de limo, en donde se alo jan en forma unitaria o constituyendo agregados celulares. Este limo posee una estructura fibrilar y esponjosa.

IV.3. Composición Química

La composición química de la P.C. solamente puede determinarse con paredes purificadas, de las cuales se ha eliminado cualquier otro constituyente celular. El primer paso en esta purificación consiste normalmente en romper las células mecánicamente. Al desintegrarse la P.C. salen al exterior los componentes internos (proteínas, ácidos nucleicos, compuestos solubles, etc.) y quedan sólo las envolturas vacías. Mediante diversos tratamientos químicos se eliminan todos los materiales adheridos a la P.C.

IV.3.1. Glicopéptidos (Mureína)

Las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas contienen aparentemente un sólo tipo de glicopéptido: la mureína, que está compuesta por ácido N-acetilmurámico, N-acetilglucosamina, L-alanina, ácido D-glutámico, ácido m-diaminopimélico y D-alanina en relación molar 1:1:1:1:1:1 (Schleifer y Kandler, 1972). El ácido N-acetilmurámico está unido a la N-acetilglucosamina a través de un enlace β 1+4 glicosídico. La cadena peptídica se une al grupo carboxilo del ácido murámico a través del amino de la L-alanina (Martin, 1966).

Las Figuras 4.3 y 4.4 ilustran la estructura del glicopéptido mureína.

Esta estructura general ha sido discutida por numerosos autores, entre ellos Martin (1966), Ghuyssen et al (1968), Schleifer y Kandler (1972).

Como podemos observar, la conexión transversal tiene lugar normalmente, mediante un enlace peptídico directo del grupo amino del ácido m-diaminopimélico con el carboxilo de la alanina terminal.

Newton (1968) encontró este modelo característico de aminoácidos en el glicopéptido de *Rs. rubrum*.

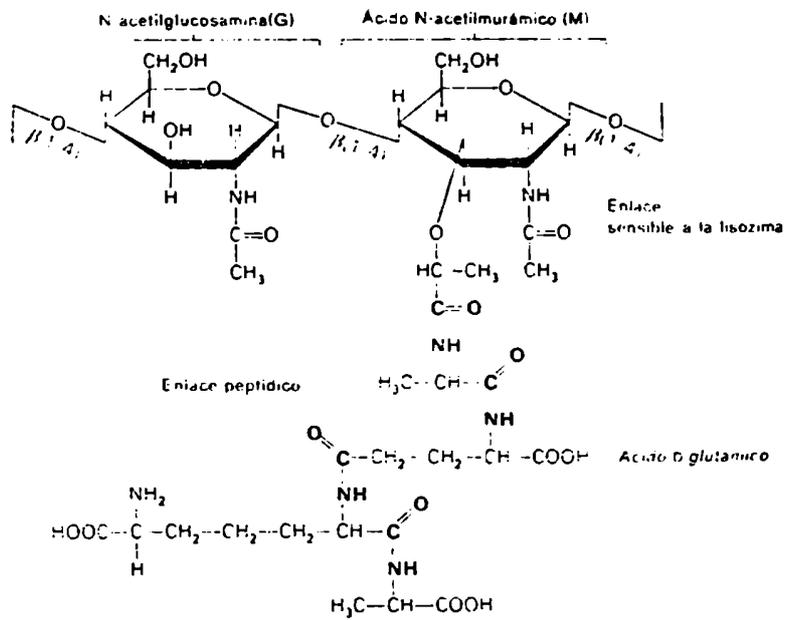


FIGURA 4.3.: Composición de una de las unidades repetitivas de la estructura glucopeptídica de la pared celular. La presente composición se encuentra en la mayoría de las bacterias Gram-negativas.

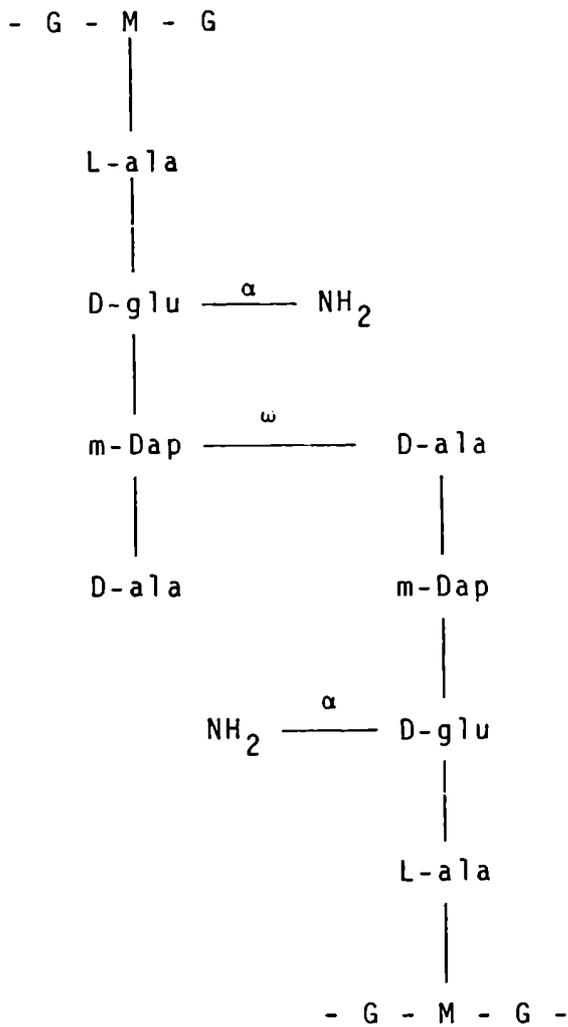


FIGURA 4.4.: Glicopéptido típico de la pared celular de las bacterias Gram-negativas
 G: N-acetilglucosamina; M: ácido N-acetilmurámico; L-ala: L-alanina; D-glu: ácido D-glutámico; m-Dap: ácido meso-diaminopimélico

IV.3.2. Lipopolisacáridos

IV.3.2.1. Propiedades generales

La presencia de lipopolisacáridos (LPS) en las paredes celulares de las bacterias fotosintéticas fue propuesta por Salton (1960) y Newton (1967). Estos autores encontraron glucosa, fucosa, ramnosa y un azúcar de estructura desconocida en la fracción LPS de *Rs. rubrum*. Weckesser et al (1972 a) aislaron LPS de *Rp. capsulata*, encontrándolos similares a los O-antígenos (antígenos de la pared celular) hallados en Enterobacteriales.

Los LPS constituyen uno de los principales componentes de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram-negativas (Figura 4.5). Estos heteropolímeros muestran la misma composición química general, que los ya bien investigados LPS de los Enterobacteriales. En diversas situaciones los LPS pueden ser tóxicos, por lo cual también se los denomina endotoxinas (Lüderitz et al, 1968; 1971).

Los LPS parecen estar unidos a la pared celular, mediante enlaces no covalentes (interacciones iónicas o hidrofóbicas) (Lüderitz et al, 1968; Shands, 1971). Se ha sugerido que los fosfolípidos y los LPS forman una membrana biestratificada; las proteínas principales se asocian y quedan embebidas en dicha matriz fosfolipídica (Figura 4.6) (Forge y Costerton, 1973; Forge et al, 1973; Shands, 1971).

La investigación química acerca de los LPS comenzó en cepas de Enterobacteriales. Debido a una clasificación serológica previa, de *Salmonella* y otros miembros de la familia Enterobacteraceae (Kauffmann, 1966) se facilitaron enormemente dichos estudios. Por lo tanto, no es sorprendente que los conocimientos detallados y acumulados durante los últimos años, acerca de la actividad serológica, composición química y su mutua relación, así como de la biosíntesis de LPS y su determinación genética, se utilicen generalmente como base para estudios de O-antígenos de bacterias pertenecientes a otros grupos taxonómicos.

La estructura general del LPS de *Salmonella* se encuentra en la Figura 4.7, donde se observa la existencia de tres subregiones distintas, sintetizadas independientemente, las cuales

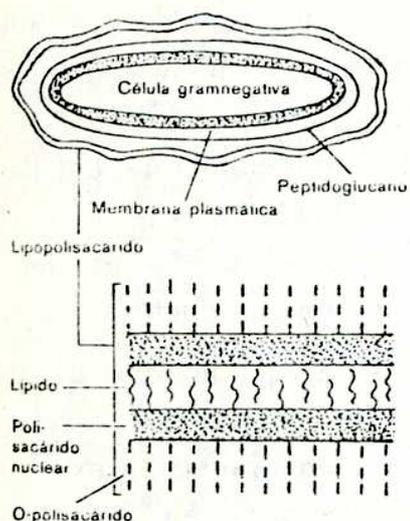


FIGURA 4.5.: Estructura general del lipopolisacárido que comprende la capa externa de bacterias Gramnegativas.

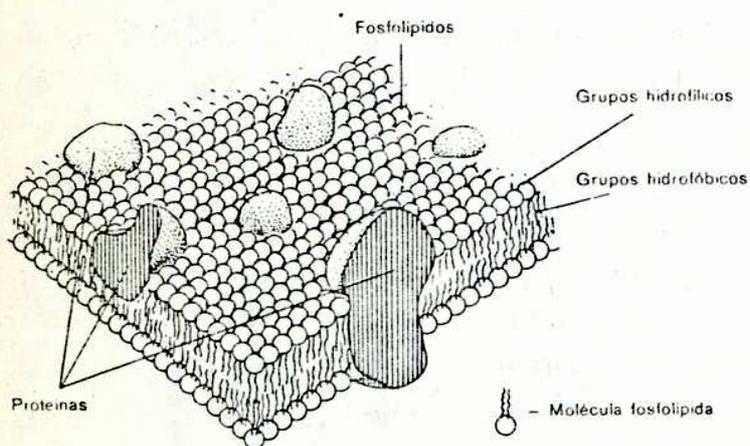


FIGURA 4.6.: Esquema de la composición de una membrana celular. La matriz está compuesta de fosfolípidos; embebidas en dicha matriz hay proteínas hidrofóbicas. Las proteínas hidrofílicas y otras sustancias cargadas tales como iones metálicos están adheridas a las superficies hidrofílicas.

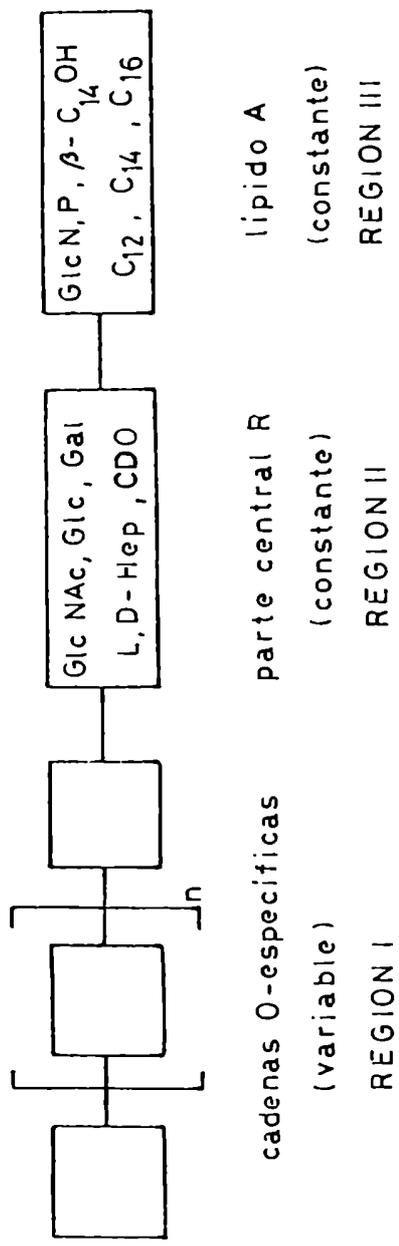


FIGURA 4.7.: Estructura general del LPS de *Salmonella* (Lüderitz et al, 1971)

se hallan bajo un control genético diferente (Stocker y Mäkelä, 1971). La mezcla lipídica (lípido A) está compuesta por un esqueleto de glucosamina-disacárido, al que se encuentran unidos largas cadenas de ácidos grasos, además de fósforo. Los ácidos grasos forman uniones tipo amida o éster, con el aminoazúcar. La L-glicero-D-manoheptosa y el 2-ceto-3-deoxioctonato (CDO) son los constituyentes característicos del oligosacárido de la Región II. El CDO forma la unión ácida lábil entre el lípido A y la mezcla de polisacáridos. En contraste, las unidades repetitivas de las cadenas específicas O, se distinguen por su alta diversidad en la composición de sus constituyentes azúcares.

En la siguiente discusión se utilizará esta terminología establecida para los LPS de Enterobacteriales, recordando que hasta el presente, el conocimiento de la estructura de los LPS en bacterias fotosintéticas es parcial.

IV.3.2.2. Procedimientos de extracción

De los numerosos procedimientos desarrollados para la extracción de los LPS, en bacterias Gram-negativas (Lüderitz et al, 1968) se mencionarán aquí solamente tres, ya que estos han sido utilizados en bacterias fotosintéticas.

El método más común emplea una mezcla de fenol/H₂O en caliente (Westphal et al, 1952). Se ha observado que los LPS de *Rp. palustris* (Weckesser et al, 1973) se extraen parcial o totalmente en la fase fenólica.

Galanos et al (1969) describieron un método especialmente útil para extraer glicolípidos lipofílicos de Enterobacteriales R-mutantes, que involucra una extracción con una mezcla de fenol/cloroformo/éter de petróleo. Este procedimiento de extracción dio buenos resultados con cepas del tipo salvaje de *Rp. gelatinosa* y *Rs. tenue*.

El tratamiento de suspensiones celulares acuosas con agentes quelantes tales como el EDTA o con soluciones salinas en caliente, también produce la liberación de LPS y proteínas (Weckesser et al, 1972 b).

Así, el comportamiento de los LPS frente a los distintos procedimientos de extracción, nos provee una primera información acerca de las propiedades físicas y químicas de las macromoléculas extraídas.

IV.3.2.3. Estado físico

Los LPS forman dispersiones turbias en H₂O. El tamaño y la forma de los agregados parece depender de las interacciones hidrofóbicas y del contenido de cationes polivalentes (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, putrescina, espermidina, etc) los cuales son capaces de producir un cross-linking entre cadenas compuestas por macromoléculas que contienen polianiones (Galanos y Lüderitz, 1975).

Se propuso que los LPS en solución acuosa, existen en forma de una bicapa formada por polisacáridos y lípidos, con la parte no polar ocupando el interior de la misma (Burge y Draper, 1967; de Petris, 1967; Shands et al, 1967).

IV.3.2.4. Constituyentes

a) Hidratos de Carbono

Se han efectuado numerosos estudios con el propósito de conocer la composición de los LPS presentes. Para tal efecto, se emplearon alrededor de 10 cepas de cada una de las siguientes especies: *Rp. palustris*, *Rp. viridis*, *Rp. gelatinosa* y *Rs. tenue*. Además, se estudiaron también algunas cepas de *Rs. rubrum*, *Rs. molischianum*, *Rp. sphaeroides*, *Rp. capsulata*, *Rhodomicrobium vannielii* y *Chr. vinosum* (Hurlbert et al, 1976; Hurlbert y Hurlbert, 1977).

Además de los constituyentes comunes que forman los LPS de las bacterias Gram-negativas, se encontraron y caracterizaron un número elevado de hidratos de carbono inusuales.

La hidrólisis en ácido acético 1%, de la fracción LPS de *Rp. capsulata* dio origen a la formación de dos fases: un material lipídico insoluble en H₂O (lípidos A) y una mezcla de polisacáridos solubles en H₂O. El análisis químico de esta última fracción reveló la presencia de los siguientes componentes: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, 3-O-metil-L-ramnosa (aco-

friosa), 2-ceto-3-deoxioctonato (CDO) y ácido neuramínico (Weckesser et al, 1972 b).

En la Tabla 4.1. se encuentran los constituyentes aislados de los LPS de bacterias fotosintéticas. Es notable, la aparición en casi todas las especies de los O-metil-éter-azúcares formados por varias clases de hidratos (Tabla 4.2.). Esto puede considerarse como una característica de los LPS de los organismos fotosintéticos, a pesar de que también aparecen en algunos LPS de otros grupos de bacterias (Lüderitz et al, 1971; Mayer et al, 1973; 1974).

b) Acidos grasos

Los ácidos grasos que componen los LPS de la mayoría de las bacterias Gram-negativas difieren de los fosfolípidos de la pared celular o de la membrana citoplasmática en una forma característica (Lüderitz et al, 1973; Schröder et al, 1969).

Por ejemplo, el lípido A de las Enterobacteriaceae está formado por D-glucosamina (20%), P (20%) y ácidos grasos (60%) tales como láurico (C₁₂), mirístico (C₁₄), palmítico (C₁₆), D-β-hidroximirístico y otros, que están unidos a los grupos -OH y amino de la glucosamina.

El modelo de ácidos grasos encontrados en los LPS de Rhodospirillaceae (Tabla 4.3) es similar al de las Enterobacteriaceae en muchos aspectos. Sin embargo, existen características diferenciales tales como el reemplazo del ácido β-hidroximirístico por el β-hidroxicáprico en cepas de *Rp.gelatinosa* y *Rs. tenue* y una carencia de cantidades significativas de ácidos grasos unidos a ésteres en *Rp. viridis*. Esta falta se explicaría por el hecho de que los LPS de esta especie no contienen D-glucosamina en su mezcla lipídica (lípido A) pero sí 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa (Roppel et al, 1975; Keilich et al, 1976).

IV.3.3. Otros componentes

Otros constituyentes de la pared celular de los organismos Gram-negativos son las proteínas (Costerton et al, 1974). Algunas son enzimas que se encuentran localizadas en el espacio periplasmático (Machtiger y Fox, 1973; Costerton et al,

TABLA 4.2.: Constituyentes azúcares de los LPS de distintas cepas de *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodopseudomonas viridis*

Cepa		4-O-Metil-D-xilosa	3-O-Metil-L-xilosa	3-O-Metil-D-manosa	3-O-Metil-6-deoxi-D-talosa	6-O-Metil-D-glucosamina	D-Manosa	D-Galactosa	D-Glucosa	D-Glucosamina	2,3-Diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa	Quinovosamina	2-Ceto-3-deoxioctonato	L-Glicero-D-manoheptosa	D-Galactosamina	Raminosa	6-Deoxitalosa	Xilosa	Acido 2-amino-2-deoxigalacturónico	Amino azúcares I Anfotéricos	Amino azúcares II Anfotéricos	
<i>Rp. palustris</i>																						
2/2	I	○					●	●	(●)	●	●	●	●	●							○	
K/1	I	○					●	●	(●)	●	●	●	●	●							○	
1e5	II	○		○			●	●	(●)	●	●	●	●	●			○	○				○
8/1	II	○		○			●	●	(●)	●	●	●	●	●			○	○				○
42	III					○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○						
15	III					○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○						
2/2	III					○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○						
1/2	III					○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○						
1a1	III					○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○						
16	III					○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○						
V ₂	III					○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○						
E51	III					○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○						
<i>Rp. viridis</i>																						
F			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
FV 103			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
FV 104			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
9350			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
E1P9.2			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
GPO1			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
2450			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
2750			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
P2F6			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
GP1 P10.4			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			
GKF7			○	○			●	●	●	●	●	●	●						○			

((●)) Presente en extracto fenol:agua, pero no en extracto fenol:cloroformo:éter de petróleo; (●) Azúcares presentes en todas las cepas; (○) Azúcares específicas de la cepa

TABLA 4.3.: Constituyentes característicos de lipopolisacáridos de Rhodospirillaceae

ESPECIES	P ^b	ACIDOS GRASOS PRINCIPALES								AMINO-AZUCAR EN EL LIPIDO A			HEPTOSAS ^d	
		β-OH-Acidos grasos				Acidos grasos saturados				GlcN	DAG ^c	CDO		
		C ₁₀ -OH	C ₁₄ -OH	C ₁₆ -OH	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	L,D-Hep			D,D-Hep		
<i>Rs. molischianum</i>	+	+	+			+			+	-	+	+		
<i>Rs. rubrum</i>	+	+							+	-	ND	+		
<i>Rs. tenue I</i>	++				+	+			+	-	+	+	-	
<i>Rs. tenue II</i>	++	+			+	+			+	-	+	+	+	
<i>Rs. fulvum</i>	+				+		+		ND	ND	ND	+		
<i>Rp. gelatinosa</i>	++	+			+		+		+	-	+	-		
<i>Rp. capsulata</i>	++	+			+		+		+	-	+	+		
<i>Rp. palustris</i>	+	+								+	+	+		
<i>Rp. viridis</i>	+	+							-	+	+	-		
<i>Rp. sphaerooides</i>	++	+							+	-	ND	ND	ND	

^a (+) Presente; (-) testeado, pero no presente; (ND) no determinado

^b P (fósforo) valores: (++) ≥ 0,5%; (+) ≤ 0,5%.

^c (DAG) 2,3-Diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa.

^d (L,D-Hep) L-Glicero-D-manoheptosa; (D,D-Hep) D-glicero-D-manoheptosa

1974).

En la actualidad, se conoce la estructura y la función de muy pocas de estas proteínas (Hantke y Braun, 1973; Braun y Hantke, 1974).

La electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, de fracciones de pared celular revelaron la existencia de distintas bandas proteicas. En *Rs. rubrum* predominan proteínas de 43.000 y 14.000 daltons (Oelze et al, 1975); en *Chr. vinosum* se observó una banda mayor correspondiente a 45.500 daltons (Hurlbert et al, 1974) y en *Rp. capsulata* apareció una única proteína de 60.000 daltons (Drews, 1974). El modelo de ácidos grasos de la pared celular es diferente del de la membrana citoplasmática (Drews, 1974; Hurlbert et al, 1974; Schröder et al, 1969). Esto se debería a que la membrana externa se encuentra enriquecida por LPS mientras que los fosfolípidos constituyen el mayor componente lipídico de la membrana citoplasmática.

REFERENCIAS

- Braun, B. & Hantke, K; (1974) Annu. Rev. Biochem. 43, 89.
- Burge, R.E. & Draper, J.C.; (1967) J. Mol. Biol. 28, 205.
- Costerton, J.W; Ingram, J.M. & Cheng, K. J. ; (1974) Bacteriol. Rev. 38, 87.
- de Petris, S.; (1967) J. Ultrastruct. Res. 19, 45.
- Drews, G.; (1974) Arch. Microbiol. 100, 397.
- Forge, A. & Costerton, J.W.; (1973) Can. J. Microbiol. 19, 451.
- Forge, A.; Costerton, J.W. & Kerr, K.A.; (1973) J. Bacteriol. 113, 445.
- Galanos, C. & Lüderitz, O.; (1975) Eur. J. Biochem. 54, 603.
- Galanos, C.; Lüderitz, O. & Westphal, O.; (1969) Eur. J. Biochem. 9, 245.
- Ghuysen, J.M.; Strominger, J. L. & Tipper, D.J.; (1968). Comprehensive Biochemistry (M. Florkin y E.H. Stotz, eds), Vol. 26 A, pp. 53-104, Elsevier Publishing Co., Amsterdam y New York.
- Glauert, A.M. & Thornley, M. J.; (1969) Annu. Rev. Microbiol. 23, 159.
- Hantke, K. & Braun, V.; (1973) Eur. J. Biochem. 34, 284.
- Hurlbert, R.E. & Hurlbert, I.M.; (1977) Infect. Immunity 16, 983.
- Hurlbert, R.E.; Golecki, J.R. & Drews, G.G; (1974) Arch. Microbiol. 101, 169.
- Hurlbert, R.E.; Weckesser, J.; Mayer, H. & Fromme, I.; (1976) Eur. J. Biochem. 68, 365.
- Kauffmann, F. (1966), The Bacteriology of Enterobacteriaceae, Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Keilich, G.; Roppel, J. & Mayer, H.; (1976) Carbohydr. Res. 51, 129.
- Lüderitz, O.; Jann, K. y Wheat, R.; (1968) Comprehensive Biochemistry (M. Florkin y E.H. Stotz, eds.), Vol. 26A, pp 105-228, Elsevier Publishing Co., Amsterdam y New York.

- Lüderitz, O.; Westphal, O.; Staub, A.M. & Nikaido, H. (1971) Microbial Toxins: A Comprehensive Treatise (G. Weinbaum, S. Kadis y S.J. Ajl, eds.), Vol. IV, pp 369-433, Academic Press, London y New York.
- Lüderitz, O.; Galanos, C.; Lehmann, V.; Nurminen, M.; Rietschel, E.T.; Rosenfelder, G.; Simon, M. & Westphal, O.; (1973) J. Infect. Dis. 128, 17.
- Machtiger, N.A. & Fox, C.F. (1973) Annu. Rev. Biochem. 42, 575.
- Martin, H.H. (1966) Annu. Rev. Biochem. 35, 457.
- Mayer, H.; Weckesser, J.; Roppel, J. & Drews, G. (1973) Abstracts of the Symposium on Prokaryotic Photosynthetic Organisms, Freiburg, pp.190-192.
- Mayer, H.; Framberg, K. & Weckesser, J. (1974) Eur. J. Biochem. 44, 181.
- Newton, J.W. (1967) Biochim. Biophys. Acta 141, 633.
- Newton, J.W. (1968) Biochim. Biophys. Acta 165, 534.
- Oelze, J.; Golecki, J.R.; Kleinig, H. & Weckesser, J.; (1975) J. Microbiol. Serol. 41, 273.
- Remsen, C.C.; Watson, S.W.; Waterbury, J.B. & Trüper, H. G.; (1968) J. Bacteriol. 95, 2374.
- Remsen, C.C.; Watson, S.W. & Trüper, H.G. ; (1970) J. Bacteriol. 103, 254.
- Roppel, J.; Mayer, H. & Weckesser, J.; (1975) Carbohydr. Res. 40, 31.
- Salton, M.R.J.; (1960) Biochim. Biophys. Acta 45, 364.
- Schleifer, K.H. & Kandler, O.; (1972) Bacteriol. Rev. 36, 407.
- Schröder, J.; Biedermann, M. & Drews, G. (1969) Arch. Mikrobiol. 66, 273.
- Shands, J.W.; (1971) Microbial Toxins: A Comprehensive Treatise (G.Weinbaum, S.Kadis y S.J.Ajl , eds.), Vol. IV, pp 127-144, Academic Press, New York y London.
- Shands, J.W.; Graham, J.A. & Nath, K.; (1967) J. Biol. 25, 15.

- Stocker, B.A.D. & Mäkelä, P.H.; (1971) Microbial Toxins: A Comprehensive Treatise (G. Weinbaum, S. Kadis, Y S.J. Ajl, eds.), Vol. IV, pp 394, Academic Press, New York y London.
- Weckesser, J.; Drews, G. & Fromme, I. (1972 a) J. Bacteriol. 109, 1106.
- Weckesser, J.; Drews, G. & Ladwig, R. (1972 b) J. Bacteriol. 110, 346.
- Weckesser, J.; Drews, G.; Fromme, I, & Mayer, H.; (1973) Arch. Mikrobiol. 92, 123.
- Westphal, O.; Lüderitz, O. & Bister, F.; (1952) Z. Naturforsch. 7b, 148.

PARTE 3

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS MEMBRANAS FOTOSINTETICAS

CAPITULO V

MEMBRANAS FOTOSINTETICAS EN BACTERIAS PURPUREAS

V.1. Aspectos generales

V.1.1. Asociación de los pigmentos fotosintéticos a proteínas solubles

V.1.2. Aparato fotosintético particulado

V.1.3. Aislamiento de cromatóforos

V.2. Caracterización de la membrana

V.2.1. Generalidades

V.2.2. Proteínas y Enzimas

V.2.3. Lípidos

V.3. Microscopía electrónica

V.4. Efectos de la intensidad luminosa y del estado de desarrollo del cromatóforo

V.5. Especulaciones acerca de la naturaleza estructural de la membrana de los Crm's *in vivo*

PARTE 3: PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS MEMBRANAS FOTOSINTETICAS

V. MEMBRANAS FOTOSINTETICAS EN BACTERIAS PURPUREAS

V.1. Aspectos generales

V.1.1. Asociación de los pigmentos fotosintéticos a proteínas solubles

En base a estudios fisicoquímicos realizados durante los últimos 25 años en bacterias fotosintéticas purpúreas, ha quedado firmemente establecido que los pigmentos fotosintéticos de estos organismos, la bacterioclorofila ($Bc\ell$) y los carotenoides, se encuentran localizados en el sistema membranoso intracitoplasmático (S.M.I.).

Sin embargo, estudios anteriores habían asegurado que estos pigmentos se encontraban localizados en el citoplasma, asociados a componentes solubles. Estas conclusiones se basaban en observaciones de los espectros de absorción de los pigmentos extraídos en solventes orgánicos. Además, la observación al microscopio sugería que dichos pigmentos estarían uniformemente distribuidos en todo el citoplasma.

La ruptura mecánica de numerosas bacterias purpúreas liberó carotenoides (French, 1940 a) y $Bc\ell$ (French, 1940 b, c; Katz y Wassink, 1939; Wassink et al, 1939) con bandas de absorción prácticamente idénticas a aquellas correspondientes a la célula entera, de la cual derivaban.

Esto llevó a la conclusión de que *in vivo*, los pigmentos existirían formando complejos con proteínas solubles.

A pesar de que en los últimos años se han aislado numerosos complejos carotenoides-proteína y $Bc\ell$ -proteína debe quedar claro que los mismos existirían normalmente como componentes integrales de las membranas fotosintéticas.

V.1.2. Aparato fotosintético particulado

Aproximadamente unos 10 años después de la aparición de los trabajos de French, Pardee et al (1952) reportaron que los pigmentos fotosintéticos de *Rhodospirillum rubrum* se encontraban asociados a una fracción particulada. Estos pigmentos particulados llamados cromatóforos (Crm's) sedimentaban más rápidamente que otros componentes subcelulares.

Las bandas de absorción en el IR cercano y en la región visible, correspondientes a la fracción de Crm's aislados, fueron idénticas a aquellas obtenidas con preparaciones de células enteras. Estas bandas no aparecieron cuando se prepararon los extractos a partir de células blanqueadas, crecidas en aerobiosis y en la oscuridad.

Frenkel (1954) demostró que la fracción de Crm's aislados participa directamente en las reacciones fotoquímicas. Entonces, estos Crm's representarían el aparato fotosintético bacteriano.

El concepto de que los pigmentos de las bacterias fotosintéticas se encuentran localizados en partículas discretas, se corroboró mediante estudios de microscopía electrónica (Vatter y Wolfe, 1958). En secciones ultrafinas de *Rs. rubrum*, *Rhodopseudomonas spheroides* y *Chromatium vinosum* cepa D, se observó que el citoplasma contenía numerosas vesículas discretas. Estas estructuras organizadas no se detectaron en *Rs. rubrum* crecida aeróbicamente (Schachman et al, 1952).

Las evidencias bioquímicas y ultraestructurales sugieren entonces, que los Crm's derivarían de la membrana citoplasmática, encontrándose muchas veces unidos a la misma y aún, en algunos casos, como estructuras independientes en la célula.

V.1.3. Aislamiento de Cromatóforos

Schachman et al (1952) purificaron los Crm's de *Rs. rubrum* por centrifugación diferencial. Newton y Newton (1957) también lo hicieron, utilizando procedimientos similares, a partir de *Chr. vinosum*.

Bull y Lascelles (1963) y Worden y Siström (1964) aplicaron la ultracentrifugación por gradiente de sacarosa para aislar Crm's de *Rp. sphaeroides*.

En general, se observó la aparición de dos bandas que contenían pigmentos, las cuales se designaron como fracción liviana y fracción pesada de Crm's. De acuerdo con estos resultados se concluyó que el aparato fotosintético existiría en dos formas distintas, dentro de la célula.

La fracción pesada es más heterogénea que la liviana y está formada por material proveniente de las membranas de los Crm's y de la pared celular. La existencia de este material ofrece una prueba directa que apoya la hipótesis acerca de que los Crm's se originan por invaginaciones de la membrana citoplasmática (Cohen-Bazire, 1963; Cohen-Bazire y Kunisawa, 1963; Stanier, 1963) y existen *in vivo* como una red tubular continua, unida a la periferia celular interna (Holt y Marr, 1965 a). Se sugirió entonces, que la fracción pesada derivaría de las membranas citoplasmáticas y representaría una estructura intermedia parcialmente diferenciada, la cual posteriormente originaría la membrana de los Crm's (Lascelles, 1968). Los pigmentos que aparecen en la fracción pesada resultan de la aplicación de gradientes con altas fuerzas iónicas; bajo condiciones cuidadosamente controladas, se pueden aislar toda la Bcl y los carotenoides, sólo a partir de la fracción liviana.

V.2. Caracterización de la membrana

V.2.1. Generalidades

La composición química general de distintas preparaciones de Crm's en diversas Rhodospirillaceae se encuentra detallada en la Tabla 5.1. Los lípidos y las proteínas se hallan en mayor proporción. Con la excepción de un 8% que corresponde a los pigmentos fotosintéticos, la composición química de estas membranas ya fue observada en una variedad de bacterias no fotosintéticas (Salton, 1967; Miura y Mizushima, 1968; Osborn et al., 1972). La variación que se advierte en el contenido de los fotopigmentos en las diversas preparaciones de Crm's se debe a los efectos producidos por diferentes condiciones de crecimiento

TABLA 5.1.: Composición química (% peso seco) de Cromatóforos aislados de Rhodospirillaceae

ORGANISMO	PROTEINA	LIPIDOS TOTALES*	FOSFOLI- PIDOS	FOSFORO TOTAL	BCL	CAROTE- NOIDES	CARBOHI- DRATOS	ACIDOS NUCLEICOS	REFERENCIAS
<i>Rp. sphaerooides</i>	58,4	24,6		0,68	2,7	1,0	4,2	0,90	Bull & Lascelles (1963)
	53,0	36,5		1,44	7,3	-	3,5	-	Schmitz (1967)
	62,0	26,7		1,03	4,0	2,0	4,0	0,10	Gorchein et al. (1968)
<i>Rp. viridis</i>	64,0		25,0		4,6		0,15	0,38	Fraker & Kaplan (1971)
	63,0	30,0		0,93	5,9	1,9	2,3	0,64	Niederman (1974)
	56,5	30,0		0,52			3,5		Drews (1968)
<i>Rs. rubrum</i>	46,5	32,0		0,83	4,7		14,0		Drews (1968); Schröder & Drews (1968)
	55,2		15,6	0,62	3,2		5,6	0,36	Collins & Nie- derman (1976b)

(*) Incluye pigmentos fotosintéticos.

(intensidad luminosa, etapa de crecimiento, "selfshading", etc.). Las disparidades encontradas en los valores de B_{cl} reflejan las diferencias en los coeficientes de extinción empleados. El bajo contenido en ácidos nucleicos indica que los Crm's aislados no se hallan contaminados ni con DNA ni con ribosomas.

La composición química de los Crm's aislados de Chromatiaceae (Tabla 5.2.) señala que estas preparaciones difieren de aquellas de Rhodospirillaceae en su alto contenido en lípidos.

Lascelles (1968) y Oelze y Drews (1972) sugirieron que los carbohidratos presentes en Crm's aislados provenían de una contaminación con componentes de la pared celular. Drews (1968) efectuó un análisis extenso de los azúcares hallados en Crm's purificados de preparaciones de *Rs. rubrum* y *Rp. viridis*. En la primera de ellas, el 90% corresponde a glucosa y el 10% restante a ramnosa y fucosa. En *Rp. viridis*, existe un 50% de glucosa atribuyéndose el resto a cantidades equivalentes de galactosa, manosa y ramnosa.

Los Crm's del grupo de las bacterias purpúreas no contienen monogalactosil-diglicérido, el cual fue encontrado en las membranas fotosintéticas de las Chlorobiaceae (Cruden y Stanier, 1970). En *T. roseopersicina* se hallan presentes los glucosil y ramnosil diglicéridos (Takacs y Holt, 1971 b). Schwenker y Gringas (1973) purificaron una preparación de carotenoides-proteína de *Rs. rubrum*. Aproximadamente el 14% del peso seco del material purificado corresponde a carbohidratos (Schwenker et al, 1974).

La presencia de cantidades significativas de citocromos asociados a hemo, de hierro no hémico y de ubiquinona, junto a ATP-asa, en Crm's aislados, sugiere que en estas estructuras ocurrirían la fotofosforilación y las reacciones asociadas a transferencia de electrones (Reed y Raveed, 1972).

V.2.2. Proteínas y Enzimas

Empleando las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, se lograron caracterizar las siguientes proteínas pertenecientes a los Crm's: tres polipéptidos asociados con los centros de reacción fotoquímicos en *Rp. sphaeroides* (Feher, 1971; Okamura et al, 1974; Clayton y

ORGANISMO	PROTEINA	LIPIDOS TOTALES*	BCL	CAROTENOIDES	CARBOHIDRATOS	REFERENCIAS
<i>Chromatium vinosum</i>	27,0	67,0	8,3	1,3	0,3	Cusanovich & Kamen (1968a)
<i>Thiocapsa blondiana</i> (ahora <i>T. roseopersicina</i>)	49,0	47,0	3,0		1,8	Takacs & Holt (1971)

(*) Incluye pigmentos fotosintéticos

Haselkorn, 1972; Takemoto y Lascelles, 1974); un polipéptido al cual se encuentra unida la *Bcl* correspondiente a la fracción liviana (LH *Bcl*) en *Rp. sphaeroides* (Fraker y Kaplan, 1972; Clayton y Clayton, 1972) y un complejo carotenoide-proteína de *Rs. rubrum* (Schwenker et al, 1974).

Richard et al (1975) encontraron una proteína con un peso molecular de 9000, la cual se excretaba asociada a precursores de la *Bcl*, en mutantes de *Rp. sphaeroides* deficientes en la síntesis de dicho pigmento. La *Bcl* libre desplazó al precursor tetrapirrólico presente en el compuesto excretado por una de las mutantes, convirtiéndose en Bacteriofeofitina y uniéndose a la proteína. El máximo de absorción para la Bacteriofeofitina se encuentra en la región de 840-865 nm. Se sugirió que este complejo pigmento-proteína contendría los mismos componentes proteicos que los asociados con la LH *Bcl* de la membrana de los Crm's de la cepa salvaje y que estos polipéptidos normalmente se combinarían con la *Bcl* al incorporarse a las membranas fotosintéticas en desarrollo. Shaw (1974) identificó a un agregado de este polipéptido como la mayor proteína de los Crm's de la cepa salvaje de *Rp. sphaeroides*: Bajo determinadas condiciones de adaptación, las cuales resultaron en una síntesis de *Bcl* más lenta, las células de las cepas salvajes excretaban también un complejo pigmento-proteína similar al de las mutantes.

El complejo pigmento-proteína aislado de *Rs. rubrum* por Schwenker y Gringas (1973) contenía una cierta cantidad de spirilloxantina de los Crm's. Dicho complejo aislado poseía 78% de proteína, 5,2% de spirilloxantina, 3,4% de fosfolípidos y 13,5% de carbohidratos. El complejo purificado migraba como una banda única en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Mediante inmunodifusión se demostró que la preparación se encontraba altamente purificada. La spirilloxantina se hallaba asociada al polipéptido en relación 1:1. El espectro de absorción visible del complejo aislado mostraba una única banda a 373 nm la cual no correspondía a la spirilloxantina. Otros autores relacionaron esta longitud de onda con complejos de carotenoides aislados de *Rs. rubrum* (Vernon y García, 1967; Fujimori, 1969; Hall et al, 1973). Como el pigmento se encontraba asociado a un componente proteico específico del Crm y como se aisló un complejo con las mismas propiedades espectrales, por una variedad de métodos, se concluyó que el material purificado

correspondería al complejo carotenoide-proteína proveniente de la membrana de los Crm's.

La estimación de los niveles de varios componentes proteicos de Crm's de *Rp. sphaeroides* indicó que los tres polipéptidos asociados con los centros de reacción estaban presentes en cantidades equimolares (Clayton y Haselkorn, 1972; Okamura et al, 1974), representando el 25% de las proteínas totales presentes en los Crm's. La proteína asociada a la LH-Bcl comprendía aproximadamente un 40-50% (Fraker y Kaplan, 1972). Evidencias inmunológicas (Fraker y Kaplan, 1972; Huang y Kaplan, 1973) y la ausencia de estos componentes proteicos en mutantes incompetentes fotosintéticamente (Takemoto y Lascelles, 1973, 1974) indicaron que los mismos se hallaban específicamente asociados con los Crm's y no aparecían en otras fracciones celulares.

En preparaciones purificadas de Crm's se han encontrado numerosas actividades enzimáticas. Estas incluyen succínico deshidrogenasa, NADH oxidasa y las enzimas que catalizan la fosforilación por ADP, además del factor acoplante de ATP-asa. También se observaron los citocromos tipo b y c.

Por sedimentación de las partículas subcelulares de *Rp. sphaeroides* crecida fototróficamente, se observó que la actividad de la succínico deshidrogenasa se encontraba distribuida en dos fracciones: en los Crm's y en la pared celular (Niederman, 1974). La actividad específica de la succínico deshidrogenasa de la fracción enriquecida en membrana citoplasmática de células fototróficas fue 5 veces mayor que la de los Crm's (Niederman et al, 1972). En células crecidas aeróbicamente, la mayor actividad de esta enzima se encontró localizada en la fracción enriquecida con membrana citoplasmática. Como consecuencia, esta proteína se usa como marcador específico de membrana en *Rp. sphaeroides*, siendo útil para detectar fracciones de membranas durante el proceso de aislamiento.

Un cuadro completamente diferente surgió cuando se estudió la distribución de esta enzima en *Rs. rubrum*. A pesar de que toda la actividad en células crecidas aeróbicamente, se localizó en la membrana citoplasmática (Oelze et al, 1975; Collins y Niederman, 1976 a), en extractos de células crecidas fototróficamente, la distribución de la enzima coincidió exactamente con una absorbancia a 880 nm, la cual está asociada con

los cromatóforos. En recientes experiencias efectuadas por Collins y Niederman (1976, no publicado) no se obtuvo actividad de succínico deshidrogenasa en extractos que contenían fragmentos de membrana citoplasmática de *Rs. rubrum* crecida fototróficamente, utilizando Sepharosa 2 B. Se concluyó entonces, que la succínico deshidrogenasa proveniente de *Rs. rubrum* crecida en condiciones fototróficas, es una proteína específica del Crm, la cual no está asociada a la membrana interna de la pared celular, como en otras bacterias Gram-negativas (Schnaitman, 1970 a). Simon y Siekevitz (1973) encontraron que en la fracción de Crm's aislados de *Rs. rubrum*, la actividad de la succínico deshidrogenasa es similar a la hallada en fracciones de membranas citoplasmáticas de células crecidas aeróbicamente, pero mayor que la correspondiente a la misma fracción proveniente de células crecidas fototróficamente. Se sugirió entonces, que durante la adaptación al fotometabolismo ocurrirían cambios en la composición de la membrana citoplasmática.

En base a la actividad específica constante hallada para la succínico deshidrogenasa en Crm's purificados de *Rs. rubrum* se concluyó que esta enzima formaría parte integral de la estructura membranosa de los mismos.

De todas las enzimas que catalizan la transferencia de electrones, sólo se detectó la actividad de la succínico deshidrogenasa luego de los extensos lavados y de los procedimientos de purificación aplicados para aislar los Crm's de *Chr. vinosum* (Cusanovich y Kamen, 1968 a). Tampoco se midió actividad de NADH oxidasa debido a los métodos de purificación empleados. Drews, Oelze y colaboradores investigaron la distribución de la NADH oxidasa en *Rs. rubrum* (Throm et al, 1970; Oelze y Drews, 1970 b; Irschik y Oelze, 1973) y en *Rp. capsulata* (Lampe y Drews, 1972). En base a estos estudios, se empleó la NADH oxidasa como marcador de componentes que transfieren electrones. Esta enzima provee una de las bases para un modelo de biogénesis de membranas de Crm's (Oelze y Drews, 1972), en el cual la actividad de tales componentes de la membrana citoplasmática alcanza gradualmente un nivel más bajo en el aparato fotosintético en desarrollo.

A pesar de que no ha sido posible encontrar velocidades de fotofosforilación significativas en Crm's de *Rp. sphaeroides*

(Gibson, 1965), se han aislado Crm's fotoquímicamente activos de extractos de *Rs. rubrum* (Frenkel y Hickman, 1959; Cohen-Bazire y Kunisawa, 1960). Tales partículas purificadas son capaces de catalizar la fosforilación del ADP, proceso luz dependiente, y de reducir el NAD en presencia de succinato a velocidades equivalentes a aquellas obtenidas con preparaciones crudas de Crm's (Frenkel y Hickman, 1959).

Estos hallazgos, sumados a la estimulación de la fotofosforilación por fenazina metasulfato y por succinato, en *Rs. rubrum* (Geller y Lipmann, 1960) establecieron que el Crm es la estructura donde se efectúan las reacciones fotoquímicas.

Sin embargo, se encontraron velocidades de fotofosforilación significativas en preparaciones de Crm's altamente purificadas de *Rs. molischianum* (Hickman et al, 1963) y *Rp. capsulata* (Lampe y Drews, 1972).

En estudios realizados con Crm's de Chromatiaceae, se halló una relativa alta actividad de fotofosforilación en *Chr. vinosum* (Cusanovich y Kamen, 1968 b).

Tabaks y Holt (1971 b) encontraron también actividad de fotofosforilación en preparaciones de Crm's purificadas de *T. roseopersicina*.

V.2.3. Lípidos

La mayoría de los lípidos presentes en las membranas de los Crm's de *Rp. sphaeroides* son fosfolípidos (Gorchein, 1968 b). Los componentes que se encuentran en mayor porcentaje son: fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y fosfatidilcolina, los cuales representan 35%, 34% y 23% respectivamente, del total de fosfolípidos. El remanente está compuesto por 3,3% de ácido fosfatídico y 3,9% de cardiolipina.

Gorchein (1964) detectó también un complejo lípido-ornitina en los Crm's. En estudios posteriores, se identificó este compuesto como ornitina esterificada con un derivado de un alcohol graso y N-acetilada con ácidos grasos de 16 y 18 carbonos (Gorchein, 1968 c).

De *Rs. rubrum* se aisló también, un complejo lípido-ornitina (De Pinto, 1967).

En *Chr. vinosum* se encontraron aproximadamente iguales cantidades de fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol en los fosfolípidos de los Crm's (Haverkate et al, 1965) mientras que en *T. roseopersicina* los mayores componentes lipídicos fueron lisofostatidiletanolamina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol (cardiolipina) y glicolípidos (Tabacs y Holt, 1971 b).

En la Tabla 5.3. se encuentra la composición de los ácidos grasos presentes en preparaciones de membranas de Crm's. Se observa que en las *Rhodospirillaceae*, el ácido vaccénico (18 carbonos) es el de mayor porcentaje mientras que en preparaciones de *Chr. vinosum* se encuentran cantidades aproximadamente iguales de los ácidos palmítico, palmitoleico y vaccénico.

V.3. Microscopía electrónica

Se efectuaron estudios de microscopía electrónica en bacterias fotosintéticas con la finalidad de analizar la morfología del sistema membranoso intracitoplasmático (S.M.I.), identificar fragmentos de membranas aisladas e investigar distintos aspectos de las mismas.

Dentro de los trabajos más importantes se encuentran las investigaciones realizadas con células enteras crecidas bajo distintas condiciones (Cohen-Bazire, 1963; Cohen-Bazire y Kunisawa, 1963; Holt y Marr, 1965 b; Peters y Cellarius, 1972).

Estos estudios no sólo sirvieron para identificar la naturaleza del aparato fotosintético *in vivo*, sino también para informar acerca de cómo actúan las membranas fotosintéticas en la célula.

La utilidad de los trabajos de microscopía electrónica con células enteras fue demostrada por Cohen-Bazire y sus colaboradores (Cohen-Bazire, 1963; Cohen-Bazire y Kunisawa, 1963; Cohen-Bazire y Sistrom, 1966). Estos investigadores examinaron secciones finas de *Rs. rubrum* y *Rp. sphaeroides* crecidas bajo una variedad de condiciones, desde oscuridad y aerobiosis hasta anaerobiosis bajo diferentes intensidades de iluminación. Se observó que las células crecidas anaeróbicamente, a intensidades entre bajas y moderadas, contenían en el citoplasma numerosas

TABLA 5.3.: Composición de ácidos grasos (% ácidos grasos totales) de preparaciones de membranas aisladas

ACIDOS GRASOS	CROMATOFOROS				CELULAS CRECIDAS AEROBICAMENTE (<i>Rs. tubum</i>)		
	<i>Rs. tubum</i>	<i>Rp. capsulata</i>	<i>Rp. sphaerooides</i>	<i>Chl. vinosum</i>	Membrana citoplasmática	Membrana externa	Membrana externa
14:0	2,6	-	-	2,8	2,9	2,5	12,8
15:0	0,9	-	-	-	a	0,2	a
15:1	-	-	-	-	a	-	a
16:0	10,4	2,1	4,6	28,5	10,3	13,1	17,4
16:1	30,8	1,7	2,1	30,3	37,8	32,3	20,4
17:1	0,2	-	-	-	a	0,4	a
18:0	1,4	1,4	9,7	3,1	1,6	1,2	6,9
18:1	53,3	94,6	76,8	35,3	47,4	50,1	40,5
19:0	-	-	6,8	-	a	-	a
19:1	-	-	-	-	a	-	a
20:0	-	-	-	-	a	0,1	a

(a) Los valores por debajo del 1% fueron omitidos

vesículas circulares. En cultivos crecidos a diferentes intensidades luminosas, aparecía una buena relación entre el número promedio de estas vesículas por célula y la concentración de *Bcl* en el tejido cosechado. En cambio, existían muy pocas vesículas en el citoplasma celular, en cultivos crecidos aeróbica o anaeróbicamente a elevadas intensidades luminosas.

Estos investigadores concluyeron que estas vesículas correspondían al aparato fotosintético celular.

Trabajos posteriores confirmaron estas conclusiones observándose vesículas similares morfológicamente en *Rp. capsulata* (Drews et al, 1969 b), en algunas especies de *Chromatium* (Cohen-Bazire, 1963; Kran et al, 1963; Fuller et al, 1963), en *Thiospirillum jenense* (Cohen-Bazire, 1963) y *T. roseopersicina* (Cohen-Bazire, 1963; Takacs y Holt, 1971 a).

Los diámetros de estas vesículas eran generalmente bastante uniformes dentro de los organismos de una misma cepa, pero variaban en un rango de 30-80 nm en diversas especies. A pesar de que la mayoría de las vesículas aparecían como entidades independientes, también se observó la presencia de vesículas parcialmente unidas a la membrana citoplasmática, siendo aparentemente una continuación o invaginación de la misma.

Estudios posteriores mostraron que existía una diversidad remarcable en la morfología del aparato fotosintético de las bacterias purpúreas. El sistema membranoso vesicular casi esférico característico de *Rp. sphaeroides* y *Rs. rubrum* se reemplaza por un sistema de membranas tubulares en *Thiocapsa pfennigii* (Eimhjellen et al, 1967), por una invaginación membranosa irregular en *Rp. gelatinosa* y *Rs. tenue* (Weckesser et al, 1969; de Boer, 1969) o por varios tipos de sistemas membranosos lamelares apilados en *Rs. molischianum*, otras especies de *Rhodospirillum*, *Rp. palustris*, *Rp. acidophila*, *Rhodomicrobium vannielli* y *Ectothiorhodospira*.

V.4. Efectos de la intensidad luminosa y del estado de desarrollo del cromatóforo

Un tema de extensa investigación es el efecto de la intensidad luminosa sobre la composición del aparato fotosintético

bacteriano (Cohen-Bazire y Siström, 1966; Lascelles, 1968).

Ketchum y Holt (1970) observaron un contenido específico constante de Bcl en Crm's purificados de cultivos en estado estacionario de *Rs. rubrum*, en los cuales la velocidad de crecimiento varió de 0,038 a 0,185 hrs⁻¹. Esto representaba un rango de intensidades luminosas de 100 a 3.100 ftc. Sin embargo, se obtuvo un aumento de 2 veces en el contenido de Bcl, en Crm's aislados de células en fase estacionaria, las cuales presentaban un "self-shading" significativo. En consecuencia, el factor crítico que determina el contenido de Bcl sería el estado fisiológico de tales cultivos en lugar de la intensidad de la luz incidente a la cual se encuentran expuestos. Estos hallazgos sugirieron que la relación indirecta existente entre la intensidad luminosa y el contenido específico de Bcl, observada en células de *Rs. rubrum* en estado estacionario (Holt y Marr, 1965 b; Ketchum y Holt, 1970) daría cuenta de cambios en la cantidad total de membrana presente en los Crm's en los cuales el contenido relativo de Bcl y proteína permanecen constantes. Esta posibilidad se encuentra confirmada por las observaciones realizadas en cortes finos de la célula entera (Cohen-Bazire y Kunisawa, 1963; Cohen-Bazire, 1963; Holt y Marr, 1965 b).

Ketchum y Holt (1970) observaron que en Crm's purificados, el contenido de fosfolípidos era directamente proporcional a la velocidad de crecimiento específico de los cultivos. Steiner et al (1970) encontraron que el contenido de Bcl por unidad de fosfolípido permanecía constante en *Rp. capsulata* crecida a diferentes intensidades luminosas. Lascelles y Szilágyi (1965) observaron que existía un aumento paralelo de la Bcl y de los fosfolípidos, en suspensiones de *Rp. sphaeroides* con baja aireación, en las cuales se indujo la formación de Crm's.

Resultados similares se produjeron en *Rs. rubrum* y *Rp. capsulata*, durante la inducción de la formación de Crm's (Schröder y Drews, 1968).

En base a los estudios efectuados sobre la regulación en la síntesis de Bcl, Aagaard y Siström (1972) trataron de atribuir las diferencias existentes en las respuestas de *Rs. rubrum* y *Rp. sphaeroides* a alteraciones en la intensidad luminosa.

A pesar de que la velocidad de crecimiento afectó el contenido de Bcl en forma similar en ambos organismos (Siström,

1962 b; Holt y Marr, 1965 b; Cohen-Bazire y Sistrom, 1966), se observó una relación inversa entre el contenido específico de la *Bcl* presente en los Crm's de *Rp. sphaeroides* y la intensidad luminosa a la cual se encontraban expuestos los cultivos (Worden y Sistrom, 1964; Gorchein, 1968 a). Se concluyó que, en *Rp. sphaeroides*, tanto la cantidad de membrana del Crm como el contenido específico de *Bcl* variaban en función de los cambios en los niveles celulares específicos de *Bcl*. Así, se han encontrado grandes cantidades de membranas de Crm's con alto contenido específico de *Bcl*, en células crecidas con baja intensidad luminosa. Aagaard y Sistrom (1972) sugirieron que las respuestas distintas de estos dos organismos reflejarían la manera en que se regulan los niveles de los componentes de la LH *Bcl*.

También se observaron cambios en la composición de preparaciones de Crm's aislados de Rhodospirillaceae aeróbicas facultativas, en las cuales la formación del aparato fotosintético se encontraba inducida por una tensión disminuída de O_2 o por una transición de un crecimiento aeróbico a uno fototrófico. En Crm's fotoquímicamente activos, purificados de *Rs. rubrum*, el contenido específico de *Bcl* aumentaba paralelamente al de los extractos crudos, por transferencia de condiciones de alta a baja aireación, (Cohen-Bazire y Kunisawa, 1960). Oelze et al (1969) informaron la aparición de tres distintas fases en la formación de las membranas de los Crm's, durante la adaptación de *Rs. rubrum* al crecimiento fototrófico. No se pudieron aislar Crm's en la fase inicial (aproximadamente de 3-6 hrs. de duración). Esto es una consecuencia de la incorporación a la membrana citoplasmática preexistente, del material específico del Crm, recientemente sintetizado. En el segundo estadio, se aislaron Crm's en los cuales el contenido específico de *Bcl* aumentaba en proporción directa a la adaptación celular. En la fase final, no se observó incremento en el contenido de *Bcl* en los Crm's, no obstante la acumulación continua de pigmento intracelular.

De estimaciones de los niveles de *Bcl* y proteínas en preparaciones de Crm's altamente purificados, se determinó que las membranas fotosintéticas de *Rp. sphaeroides* mantenían su composición constante, luego de las etapas iniciales de adaptación al crecimiento fototrófico (Huang y Kaplan, 1973). Estos autores

concluyeron que ocurría una síntesis coordinada de *Bcl* y de proteínas específicas del Crm. Los resultados de los análisis de la fluorescencia de la *Bcl*, durante la inducción de la formación de los Crm's en *Rp. sphaeroides* se interpretaron en términos de una unión sincrónica de todos los componentes de los pigmentos fotosintéticos (Cellarius y Peters, 1969). En contraste, estudios recientes de Niederman et al (1976) con suspensiones concentradas de *Rp. sphaeroides* en las cuales se indujo la formación de los pigmentos fotosintéticos mediante baja aireación, sugirieron una asociación no coordinada de todos los componentes accesorios y esenciales funcionalmente para el desarrollo del aparato fotosintético (Figura 5.1.).

Bajo estas condiciones la síntesis de los pigmentos fotosintéticos se inició sin la aparición de un lag significativo. Además, en las preparaciones de las células enteras, se observó un incremento paralelo de la *Bcl* y del carotenoide spheroidenona.

El espectro *in vivo* de *Rp. sphaeroides* contiene dos componentes LH *Bcl*, los cuales corresponden al 95% de la *Bcl* total: la B 850 con bandas de absorción a 800 y a 850 nm y la B 875 con una absorción máxima a 875 nm (Sistrom, 1964).

Un análisis de los niveles de los complejos LH-*Bcl* presentes en preparaciones altamente purificadas de Crm's indicó que la incorporación de estos componentes seguía un curso asincrónico (Figura 5.1. cuadro inferior).

La B 875 penetraría en los Crm's preferencialmente durante los estadios tempranos de la inducción, manteniendo su nivel posteriormente en un estado estacionario. Los citocromos b y c también se mantendrían esencialmente a niveles constantes.

La mayoría de estos compuestos cumplirían funciones esenciales en los eventos fotoquímicos primarios y en el flujo electrónico luz dependiente. El complejo B 875 sería sumamente importante ya que se encontró en cantidades fijas y estequiométricas con respecto a la *Bcl* relacionada con los centros de reacción (*Bcl*-CR) (Aagaard y Sistrom, 1972) en células donde variaba el contenido de *Bcl*; en cambio, sus niveles se redujeron en mutantes de *Rp. sphaeroides* carentes de *Bcl*-CR (Sistrom y Clayton, 1964; Sistrom, 1966).

Los niveles de los componentes LH accesorios, pheroidenona y B 850, conjuntamente con el polipéptido asociado al B850

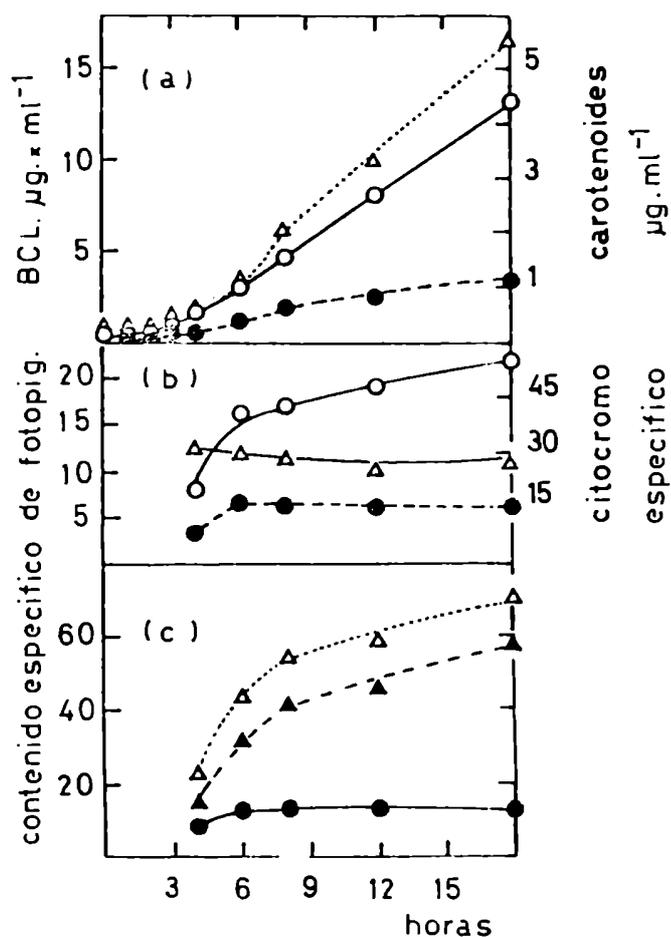


FIGURA 5.1.: Niveles de distintos pigmentos presentes en células enteras (a) y preparaciones de cromatóforos (b, c) durante la inducción de la formación de la membrana del cromatóforo en suspensiones de *Rp. sphaeroides* bajo condiciones de baja aereación (Niederman et al, 1976).
 (· Δ) Bcl; (· O ·) Sphe-roidenona; (· ● ·) Sphe-roidene; (· Δ ·) citocromo; (· ▲ ·) B 850; (· ● ·) B 875.

aumentaron de una manera coordinada, en los Crm's aislados. El incremento en el contenido específico de la Bcl se debió a la concentración elevada del componente B 850. Estos hallazgos estarían de acuerdo con la existencia de mecanismos regulatorios independientes que controlarían los niveles de los componentes esenciales funcionalmente y accesorios, dentro de la membrana.

Sistrom (1962 a), Bull y Lascelles (1963) y Drews (1965), demostraron que en Rhodospirillaceae existe un acoplamiento obligado entre la síntesis de Bcl y la de proteína. Se propuso entonces, que esto reflejaría una asociación específica entre la síntesis de la Bcl y la formación de proteínas involucradas en la ubicación de los fotopigmentos en la membrana (Lascelles, 1968). Takemoto y Lascelles (1973) demostraron que en *Rp. sphaeroides*, la formación de la Bcl se encontraba acoplada a la síntesis de por lo menos, cuatro proteínas específicas del Crm. Estas incluían LH Bcl-proteínas y las asociadas a los centros de reacción fotoquímicos (Takemoto y Lascelles, 1974). En cepas mutantes que no sintetizaban Bcl, estas proteínas estaban ausentes o en niveles reducidos significativamente.

Se han propuesto numerosos mecanismos para explicar los efectos de la intensidad luminosa y de la tensión de oxígeno, sobre la síntesis de la Bcl y de las membranas de los Crm's. Marrs y Gest (1973 b) determinaron el mecanismo mediante el cual, el oxígeno molecular inhibía reversiblemente la síntesis de Bcl, en mutantes de *Rp. capsulata*, con deficiencias respiratorias (Marrs y Gest, 1973 a). En las mutantes que carecían de actividad de citocromo-oxidasa, la formación de la Bcl se encontraba reprimida por el oxígeno, a niveles equivalentes a aquellos observados en la cepa parental. Esto no estaría de acuerdo con la proposición original de Cohen-Bazire et al (1957), en la cual el estado redox de un intermediario carrier de electrones, regularía la síntesis de los pigmentos. Se concluyó entonces, que el oxígeno molecular inactivaría directamente a algún factor requerido para la síntesis de la Bcl. Se pensó que cuando la tensión de oxígeno se encontraba suficientemente disminuída, el factor se reactivaría por un flujo de electrones desviado de la cadena respiratoria y proveniente del NADH o del succinato.

Se sugirió una modificación del mecanismo propuesto, para explicar la relación inversa entre la intensidad luminosa y

el contenido de Bcl en la célula entera. Es posible que la iluminación provoque una desviación de los electrones fuera del alcance del factor regulador propuesto, ya que Keister y Yike (1967) mostraron que la luz estimulaba una reversión del flujo electrónico. Esto explicaría la inhibición observada en la síntesis de la Bcl, a medida que aumenta la intensidad luminosa incidente.

V.5. Especulaciones acerca de la naturaleza estructural de la membrana de los Crm's *in vivo*

De acuerdo con los resultados de numerosas investigaciones morfológicas y bioquímicas, el término Cromatóforo (Crm) aplicado inicialmente por Pardee et al (1952) al aparato fotosintético bacteriano, sufrió considerables modificaciones. Oelze y Drews (1972) abandonaron dicha designación y la reemplazaron por "sistema membranoso intracitoplasmático" (SMI). Este último nombre resulta sumamente vago y ha sido utilizado también para designar numerosas estructuras de bacterias no fotosintéticas. Frenkel y Nelson (1971) señalaron que el término Crm no era lo suficientemente específico, debiéndose aclarar que las partículas derivaban de bacterias fotosintéticas. Considerando estos puntos, se sugirió que las membranas fotosintéticas aisladas y separadas del resto del material celular, se denominarían Crm's mientras que la estructura que existe *in vivo* se designaría como "membranas del Crm".

En cuanto a la cuestión de la continuidad física de la membrana del Crm con la membrana citoplasmática, ésta, aún no ha sido resuelta. Drews et al (1969 a) desarrollaron dos posibles interpretaciones para las invaginaciones provenientes de la membrana citoplasmática (M.C.). En el primer modelo, tanto el Crm como la M.C. estarían compuestos por los mismos componentes macromoleculares, pero en diferentes proporciones relativas. En el modelo alternativo, la membrana del Crm a pesar de hallarse unida a la M.C., sería una estructura altamente especializada y totalmente diferente en su composición con respecto a la membrana periférica. Oelze y Drews (1972) desarrollaron el primer modelo. En base a sus estudios con *Rs. rubrum*, sugirieron que durante la inducción de la formación del Crm, la M.C. comenzaría a diferenciarse,

debido al aumento de determinados compuestos asociados a reacciones luz-dependiente. Llegado al punto en que la velocidad de síntesis de la membrana citoplasmática diferenciada excedía a la de la pared celular, la M.C. iniciaría su invaginación lo cual resultaría en la formación de la membrana de los Crm's. A medida que el desarrollo proseguía, la diferenciación ocurría preferentemente en la membrana de los Crm's, estableciéndose un gradiente de actividad enzimática. Se propuso también, que este proceso de diferenciación sería reversible, cuando ocurre una transición del crecimiento fototrófico al quimiotrófico.

Sin embargo, investigaciones más recientes (Irschik y Oelze, 1973) sugirieron que la transición de una baja a una alta intensidad luminosa en *Rs. rubrum* crecidas fotosintéticamente, resultaría en una conservación estructural y funcional de la membrana de los Crm's. Estos resultados indicarían que no existe una intraconversión, formándose las membranas citoplasmáticas y del Crm en forma independiente.

El modelo alternativo estaría representado por los resultados obtenidos recientemente con *Rp. sphaeroides* (Huang y Kaplan, 1973; Kosakowski y Kaplan, 1974). Estos autores observaron que durante la adaptación al crecimiento fototrófico, existía una síntesis preferencial de proteínas solubles en 2-cloroetanol, específicas del Crm. Esta fracción daría cuenta del 95% de la proteína total del Crm, durante los últimos estadios de la inducción. En contraste, las proteínas insolubles en 2-cloroetanol, fueron diluyéndose gradualmente de la membrana del Crm, a medida que el proceso de adaptación continuaba. Esta última fracción representaría el sitio de unión del Crm a la membrana citoplasmática. Se concluyó entonces que, a pesar de que los pasos iniciales de formación del Crm ocurrían en la periferia celular, el crecimiento del aparato fotosintético sería independiente del correspondiente a la membrana citoplasmática.

Segen y Gibson (1971) propusieron que la membrana del Crm estaría formada por diversas partes, las cuales se sintetizarían en forma independiente.

Singer y Nicholson (1972) sugirieron que la proteína y la Bcl se insertaban en la membrana en crecimiento, en la forma de un compuesto extenso. Shaw y Richards (1971) y Gibson et al (1972) propusieron que los Crm's de *Rp. sphaeroides* deriva-

rían de una estructura precursora. Es muy posible que la misma se encuentre ubicada en una posición relativamente fija dentro de la membrana.

Como resultado de estudios bioquímicos y de microscopía electrónica, parecen haber quedado pocas dudas acerca de que el aparato fotosintético constituiría una unidad funcional integrada en la membrana citoplasmática. Sin embargo, estas investigaciones no establecieron firmemente si todas las regiones de la membrana del Crm se encuentran estructuralmente interconectadas. Se ha dejado abierta la posibilidad de que vesículas de Crm's consideradas "maduras" "brotarían" de la membrana.

REFERENCIAS

- Aagaard, J. & Sistrom, W.R. (1972), Photochem. Photobiol. 15, 209.
- Bull, M.J. & Lascelles, J. (1963), Biochem. J. 87, 15.
- Cellarius, R.A. & Peters, G.A. (1969), Biochim. Biophys. Acta 189, 234.
- Clayton, R.K. & Clayton, B.J. (1972), Biochim. Biophys. Acta 283, 492.
- Clayton, R.K. & Haselkorn, R. (1972), J. Mol. Biol. 68, 97.
- Cohen-Bazire, G. (1963) Bacterial Photosynthesis (H.Gest, A. San Pietro y L. P. Vernon, eds.); pp 89-110, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.
- Cohen-Bazire, G. & Kunisawa, R. (1960), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46, 1543.
- Cohen-Bazire, G. & Kunisawa, R. (1963), J. Cell Biol. 16, 401.
- Cohen-Bazire, G. & Sistrom, W.R. (1966), The Chlorophylls (G.R. Seeley y L. Vernon, eds.), pp 313-341, Academic Press, New York.
- Cohen-Bazire, G.; Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y. (1957), J. Cell Comp. Physiol. 49, 25.
- Collins, M.L.P. & Niederman, R.A. (1976 a), J. Bacteriol. 126, 1316.
- Collins, M.L.P. & Niederman, R.A. (1976 b), J. Bacteriol. 126, 1326.
- Cruden, D.L. & Stanier, R.Y. (1970), Arch. Mikrobiol. 72, 115.
- Cusanovich, M.A. & Kamen, M.D. (1968 a), Biochim. Biophys. Acta 153, 376.
- Cusanovich, M.A. & Kamen, M.D. (1968 b) Biochim. Biophys. Acta 153, 418.
- de Boer, W.E. (1969), J. Microbiol. Serol. 35, 241.
- De Pinto, J.A. (1967), Biochim. Biophys. Acta 144, 113.
- Drews, G. (1965), Arch. Mikrobiol. 51, 186.
- Drews, G. (1968), Z. Naturforsch. 23b, 671.

- Drews, G.; Biedermann, M. & Oelze, J. (1969 a) Prog. Photosynth. Res. 1, 204.
- Drews, G.; Lampe, H. & Ladwig, R. (1969 b) Arch. Mikrobiol. 65, 12.
- Eimhjellen, K.E.; Steensland, H. & Traetteberg, J. (1967), Arch. Mikrobiol. 59, 82.
- Feher, G. (1971), Photochem. Photobiol. 14, 373.
- Fraker, P.J. & Kaplan, S. (1971), J. Bacteriol. 108, 465.
- Fraker, P.J. & Kaplan, S. (1972), J. Biol.Chem. 247, 2732.
- French, C.S. (1940 a), Bot. Gaz. (Chicago) 102, 406.
- French, C.S. (1940 b), J. Gen. Physiol. 23, 469.
- French, C.S. (1940 c), J.Gen. Physiol. 23, 483.
- Frenkel, A. (1954), J. Am. Chem. Soc. 76, 5568.
- Frenkel, A.W. & Hickman, D.D. (1959), J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 285.
- Frenkel, A.W. & Nelson, R.A. (1971), Methods in Enzymology, Vol. 23 A (A. San Pietro, ed.) pp 256-268, Academic Press, New York.
- Fujimori, E. (1969), Biochim. Biophys. Acta 180, 360.
- Fuller, R.C.; Conti, S.F. & Mellin, D.B. (1963), Bacterial Photosynthesis (H. Gest, A. San Pietro y L.P. Vernon, eds.) pp. 71-87, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.
- Geller, D.M. & Lipmann, F. (1960), J. Biol. Chem. 235, 2478.
- Gibson, K.D. (1965), Biochemistry 4, 2042.
- Gibson, K.D.; Segen, B.J. & Niederman, R.A. (1972), Arch. Biochem. Biophys. 152, 561.
- Gorchein, A. (1964), Biochim. Biophys. Acta 84, 356.
- Gorchein, A. (1968 a), Proc. R. Soc. London Ser. B. 170, 247.
- Gorchein, A. (1968 b), Proc. R. Soc. London Ser. B. 170, 279.
- Gorchein, A. (1968 c), Biochim. Biophys. Acta 152, 358.
- Gorchein, A.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1968), Proc. R. Soc. London Ser. B. 170, 229.
- Hall, R.L.; Kung, M.C.; Fu, M.; Hales, B.J. & Loach, P.A. (1973), Photochem. Photobiol. 18, 505.
- Haverkate, F.; Teulings, F.A.G. & van Deenen, L.L.M. (1965),

- K. Ned. Akad Wet. Versl. Gewone Vergad. Afd. Naturkd. 68, 154.
- Hickman, D.D.; Frenkel, A.W. & Cost, K. (1963), Bacterial Photosynthesis (H.Gest, A. San Pietro y L.P. Vernon, eds), pp 111-114, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.
 - Holt, S.C. & Marr, A.G. (1965 a), J. Bacteriol. 89, 1402.
 - Holt, S.C. & Marr, A.G. (1965 b), J. Bacteriol. 89, 1421.
 - Huang, J.W. & Kaplan, S. (1973), Biochim. Biophys. Acta 307, 317.
 - Irschik, H. & Oelze, J. (1973), Biochim. Biophys. Acta 330, 80
 - Katz, E. & Wassink, E.C. (1939), Enzymología (Acta Biocatalytica) 7, 97.
 - Keister, D.L. & Yike, N.J. (1967), Arch. Biochem. Biophys. 121, 415.
 - Ketchum, P.A. & Holt, S.C. (1970), Biochim. Biophys. Acta, 196, 141.
 - Kosakowski, M.H. & Kaplan, S. (1974), J. Bacteriol. 118, 1144.
 - Kran, V.G.; Schlote, F.W. & Schlegel, H.G. (1963), Naturwissenschaften, 50, 728.
 - Lampe, H. & Drews, G. (1972), Arch. Mikrobiol. 84, 1.
 - Lascelles, J. (1968), Advances in Microbial Physiology, Vol 2, (A.H. Rose y J.F. Wilkinson, eds.), pp 1-42, Academic Press, New York.
 - Lascelles, J. & Szilágyi, J.F. (1965), J. Gen. Microbiol. 38, 55.
 - Marrs, B. & Gest, H. (1973 a), J. Bacteriol. 114, 1045.
 - Marrs, B. & Gest, H. (1973 b), J. Bacteriol. 114, 1052.
 - Niura, T. & Mizushima, S. (1968), Biochim. Biophys. Acta 150, 159.
 - Newton, J.W. & Newton, G.A. (1957), Arch. Biochim. Biophys. 71, 250.
 - Niederman, R.A. (1974), J. Bacteriol. 117, 19.
 - Niederman, R.A.; Segen, B. J. & Gibson, K.D. (1972), Arch. Biochem. Biophys. 152, 547.
 - Niederman, R.A.; Mallon, D.E. & Langan, J.J. (1976), Biochim. Biophys. Acta 440, 429.

- Oelze, J. & Drews, G. (1970 a), *Biochim. Biophys. Acta* 203, 189.
- Oelze, J. & Drews, G. (1970 b), *Biochim. Biophys. Acta* 219, 131.
- Oelze, J. & Drews, G. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 265, 209.
- Oelze, J.; Biedermann, M.; Freund-Mölbart, E. & Drews, G. (1969), *Arch. Mikrobiol.* 66, 154.
- Oelze, J.; Golecki, J.R.; Kleinig, H. & Weckesser, J. (1975), *J. Microbiol. Serol.* 41, 273.
- Okamura, M.Y. ; Steiner, L.A. & Feher, G. (1974), *Biochemistry*, 13, 1394.
- Osborn, M.J.; Gander, J.E.; Parisi, E. & Carson, J. (1972), *J. Biol. Chem.* 247, 3962.
- Pardee, A.B.; Schachman, H.K. & Stanier, R.Y. (1952), *Nature (London)* 169, 282.
- Peters, G.A. & Cellarius, R.A. (1972), *J. Bioenerg.* 3, 345.
- Reed, D.W. & Raveed, D. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, 283, 79.
- Richards, W.R.; Wallace, R.B.; Tsao, M.S. & Ho, E. (1975), *Biochemistry* 14, 5554.
- Salton, M.R. J. (1967), *Annu. Rev. Microbiol.* 21, 417.
- Schachman, H.K.; Pardee, A.B. & Stanier, R.Y. (1952), *Arch. Biochem. Biophys.* 38, 245.
- Schmitz, R. (1967), *Z. Naturforsch.* 22b, 645.
- Schnaitman, C.A. (1970 a), *J. Bacteriol* 104, 890.
- Schnaitman, C.A. (1970 b), *J. Bacteriol.* 104, 1404.
- Schröder, J. & Drews, G. (1968), *Arch. Mikrobiol.* 64, 59.
- Schwenker, U. & Gingras, G. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 94.
- Schwenker, U.; St-Onge, M. & Gingras, G. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 351, 246.
- Segen, B.J. & Gibson, K.D. (1971), *J. Bacteriol.* 105, 701.
- Shaw, M.A. (1974) Ph.D. thesis, Simon Fraser University, Burnaby, B.C., Canada.

- Shaw, M.A. & Richards, W.R. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 863.
- Simon, S.R. & Siekevitz, P. (1973), *Mechanisms in Bioenergetics* (G.F. Azzone, L. Ernster, S.Papa, E. Quagliariello y N Siliprandi, eds.), pp 3-31, Academic Press, New York.
- Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972), *Science* 175, 720.
- Siström, W.R. (1962 a), *J. Gen. Microbiol.* 28, 599.
- Siström, W.R. (1962 b), *J. Gen. Microbiol.* 28, 607.
- Siström, W. R. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 79, 419.
- Siström, W. R. (1966), *Photochem. Photobiol.* 5, 845.
- Siström, W.R. & Clayton, R.K. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 88, 61.
- Stanier, R.Y. (1963), *General Physiology of Cell Specialization* (D. Mazia & A. Tyler, eds.) , pp 242-252, Mc Graw-Hill, New York.
- Steiner, S.; Sojka, G.A.; Conti, S.F.; Gest, H. & Lester, R.L. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 203, 571.
- Takacs, B.J. & Holt, S.C. (1971 a), *Biochim. Biophys. Acta* 233, 258.
- Takacs , B.J. & Holt, S.C. (1971 b), *Biochim. Biophys. Acta* 233, 278.
- Takemoto, J. & Lascelles, J. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 799.
- Takemoto, J. & Lascelles, J. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 507.
- Throm, E.; Oelze, J. & Drews, G. (1970), *Arch. Mikrobiol.* 72, 361.
- Vatter, A.E. & Wolfe, R.S. (1958), *J. Bacteriol.* 75, 480.
- Vernon, L.P. & García, A.F. (1967), *Biochim. Biophys. Acta* 143, 144.
- Wassink, E.C.; Katz, E. & Dorrestein, R. (1939), *Enzymología (Acta Biocatalytica)* 7, 113.
- Weckesser, J.; Drews, G. & Tauschel, H. D. (1969), *Arch. Mikrobiol.* 65, 346.
- Worden, P.B. & Siström, W.R. (1964), *J. Cell Biol.* 23, 135.

PARTE 4

QUIMICA DE LOS COMPONENTES CELULARES

CAPITULO VI

BACTERIOCLOROFILA Y EVOLUCION FOTOSINTETICA

VI.1. Introducción

VI.2. Propiedades

VI.3. Estructura

VI.3.1. Bacterioclorofila y otras macromoléculas relacionadas

VI.3.2. Quelatos metálicos

VI.3.3. Biosíntesis

VI.4. Evolución

VI.4.1. Evolución de la fotosíntesis

VI.4.2. Evolución de la bacterioclorofila

PARTE 4: QUIMICA DE LOS COMPONENTES CELULARES

VI. BACTERIOCLOROFILA Y EVOLUCION FOTOSINTETICA

VI.1. Introducción

Las porfirinas son los pigmentos de la vida. Seleccionados por la evolución biológica, estos tetrapirroles poseen una estructura adecuada para la fotosíntesis y la conversión energética. Los mecanismos bioquímicos y físicos de estos procesos, así como también las propiedades físicas y químicas de estas moléculas se encuentran aún en una etapa inicial de estudio.

En el presente capítulo se tratará de analizar la relación entre la estructura y la función de la Bcl con su ubicación evolutiva.

VI.2. Propiedades

Las propiedades de estos pigmentos se hallan generalmente resumidas en trabajos relacionados con las Clorofilas (Cl's): Rabinowitch (1945, 1951, 1956), Smith y Benitez (1955), Vernon y Seely (1966), Gurenovich et al (1968).

Como sucede con las Cl's, la Bcl se aísla usualmente con una molécula de agua unida al magnesio. El color azul de las soluciones de estos pigmentos se debe a una banda de absorción bastante débil cercana a 590 nm y a la cola correspondiente a la transición a 760 nm.

Sauer et al (1966) y Ballschmitter y Katz (1969) determinaron el espectro de formas agregadas de Bcl.

La Bcl es una molécula sumamente inestable. Esta inestabilidad se debe a la rápida foto y autooxidación del pigmento en solución diluída, especialmente en metanol. Sin embargo, en soluciones concentradas de dietiléter suele ser bastante estable.

Por otra parte, la Bcl es muy resistente a la pérdida del Mg para formar Bacteriofeofitina (Bft). El orden de estabilidad creciente para los quelatos con Mg es el siguiente:

porfirina < clorina < bacterioclorina. Para convertir en forma rápida y cuantitativa la Bcl en Bft, se requiere alrededor de 0,1 M de ácido metanosulfónico en éter.

La Bft es mucho más estable a la luz que la Bcl; también es menos soluble pero se la puede obtener más fácilmente en forma microcristalina.

Además de la Bcl a (Figura 6.1) se encuentran otros pigmentos característicos en las bacterias fotosintéticas. Jensen et al (1964) informaron acerca de sus espectros y propiedades. La estructura de la Bcl b es la misma que la de la Bcl a, salvo el reemplazo del etilo por un grupo etiliden (Scheer et al, 1974). Esta Bcl es sumamente interesante ya que su banda de absorción *in vivo*, cercana a 1 μ m corresponde a la mayor longitud de onda para los pigmentos fotosintéticos conocidos.

Las bacterias verdes poseen como pigmentos fotoactivos además de la Bcl a, "chlorobium clorofilas". Estas absorben cerca de 650-660 nm (Holt, 1966).

Las Bcl's pueden aislarse mediante técnicas de extracción y cromatografía. Los procedimientos detallados se encuentran descritos por Strain y Svec (1966).

VI.3. Estructura

VI.3.1. Bacterioclorofila y otras macromoléculas relacionadas

La estructura de la Bcl se muestra en la Figura 6.1. Esencialmente es una macromolécula conjugada, cuyo anillo básico corresponde a una porfirina. El tamaño de la misma está determinado por el requerimiento de que el pigmento absorba radiación solar cercana a 600 nm. La simple ruptura de la simetría de la porfirina, por reducción de una doble ligadura en un anillo pirrólico, forma una Clorina, la cual presenta una absorción mucho mayor a 660 nm (Figura 6.2.). La repetición de esta reducción pero en uno de los anillos pirrólicos opuestos al anterior, origina la Bacterioclorina que absorbe fuertemente a 770 nm. Estas moléculas retienen las propiedades aromáticas y fotoquímicas requeridas para constituir un pigmento fotosintético. La reducción de los demás anillos pirrólicos o la interrupción de la conjugación

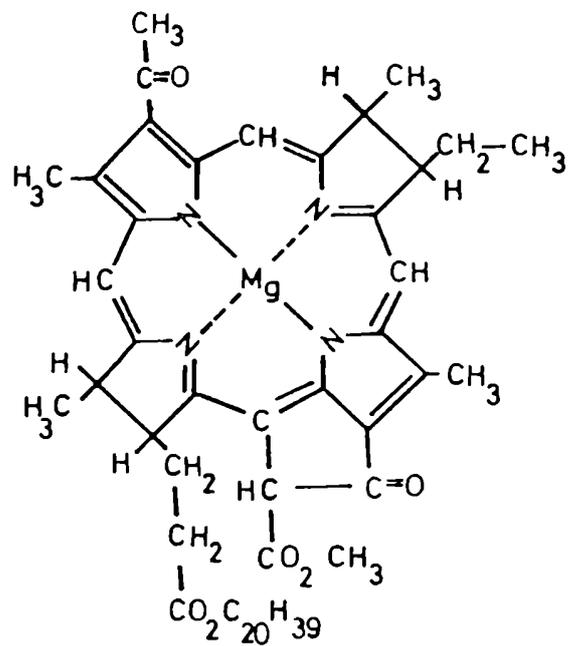
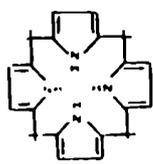
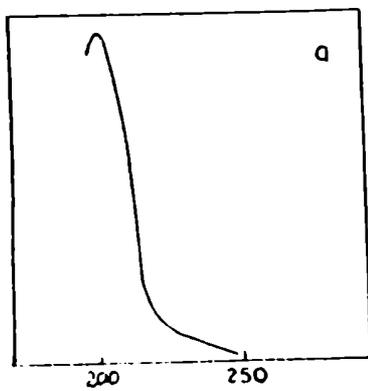
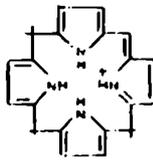
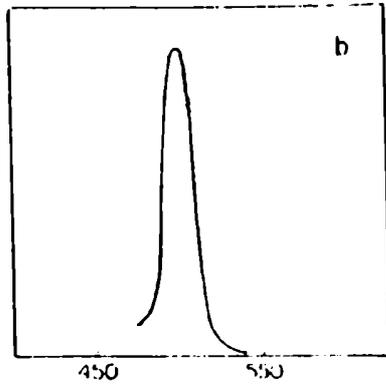


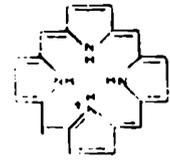
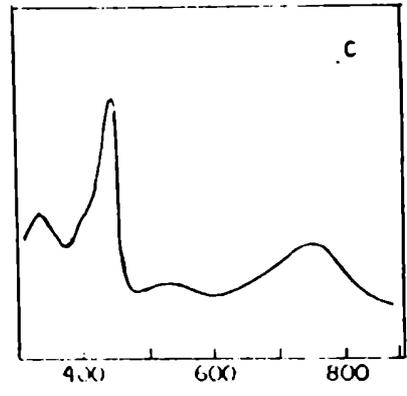
FIGURA 6.1.: Estructura de la *Chl a*



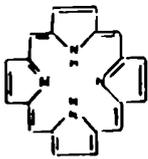
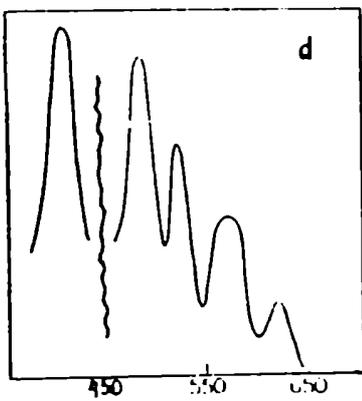
Hexahidroporfirina
(porfirinógeno)



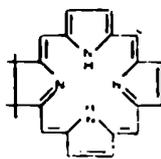
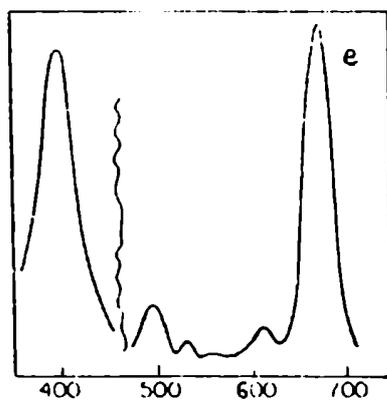
Cación
Tetrahidroporfirina
(porfometeno)



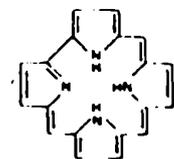
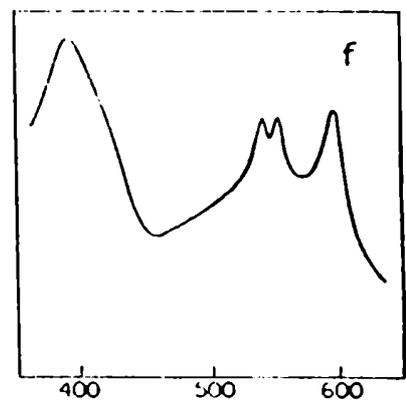
Dihidroporfirina
(florina)



Porfirina



Clorina



Corrol

FIGURA 6.2.: Estructuras básicas y espectros generales de algunos tetrapirroles

ción de la porfirina por reducción de los puentes meso (florinas, porfometenos y porfirinógenos) (Figura 6.2.), llevan a la formación de moléculas inestables con bandas de absorción a longitudes menores, las cuales no resultaron útiles durante la evolución (Mauzerall y Hong, 1975).

VI.3.2. Quelatos metálicos

Los quelatos Mg-porfirina se pueden sintetizar en el laboratorio sólo en condiciones anhidras. El mecanismo utilizado por la célula para su biosíntesis constituye aún un misterio.

Otros metales que también forman quelatos, como el hierro y el cobre, no son adecuados para la fotosíntesis.

Los quelatos Zn-porfirina poseen las mismas características fotoquímicas que los de Mg-porfirina; se forman muy fácilmente y en general, el Zn (como también el Cu) es uno de los principales contaminantes de las porfirinas libres.

VI.3.3. Biosíntesis

La biosíntesis de la Bc ℓ es un ejemplo excelente de como una molécula altamente compleja se puede sintetizar a partir de precursores muy simples (Figura 6.3.).

Nuestros conocimientos acerca de este camino biosintético se deben a los trabajos de June Lascelles (1964), los cuales serán reseñados en un capítulo posterior.

Las distintas cadenas laterales presentes en la Bc ℓ provienen de los residuos propionato y acetato, originales de la Uroporfirina (Figura 6.4.). Estos se transforman en grupos metilos y vinilos por decarboxilación y posterior decarboxilación oxidativa respectivamente. Uno de estos grupos vinilo se reduce a etilo, mientras que el otro se convierte en un grupo acetilo (Figura 6.1.). Una serie de complejas reacciones llevan a la formación del quinto anillo, el cual contiene los grupos carbonilo, carbometoxi y metileno.

Mauzerall (1976) publicó una variedad de sugerencias para explicar la función de este quinto anillo, en la C ℓ a.

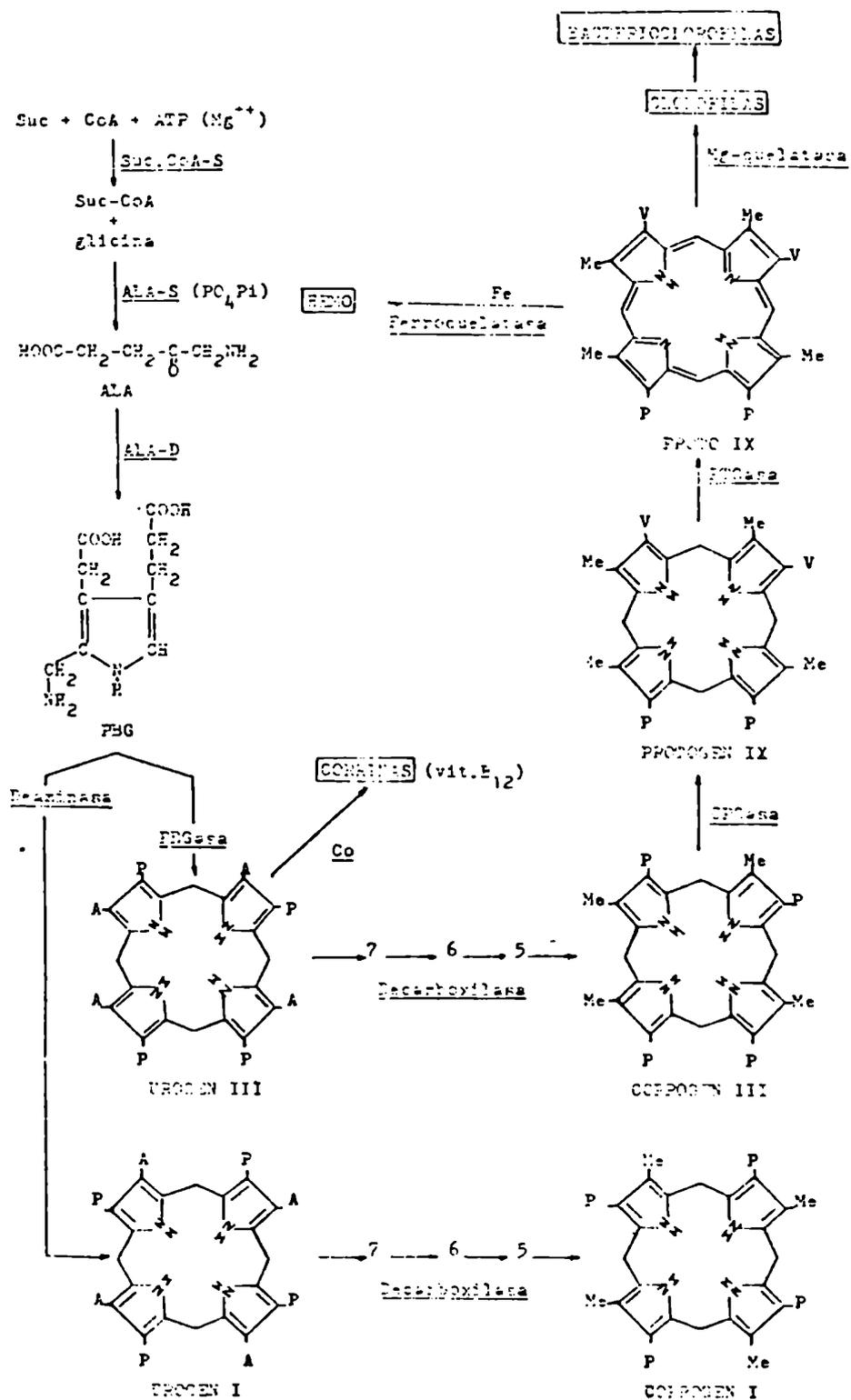


FIGURA 6.3.: Biosíntesis de Clorofila y Bacterioclorofila

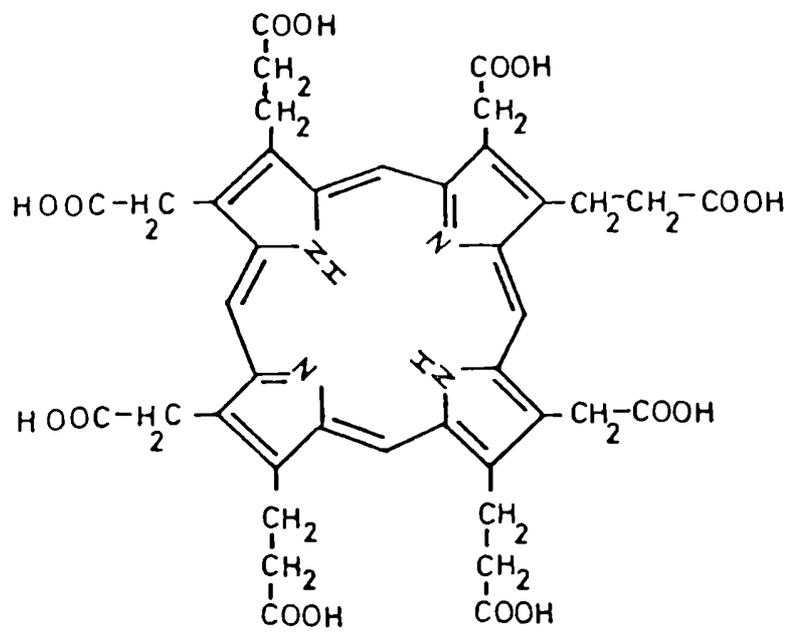


FIGURA 6.4.: Uroporfirina III

Finalmente, se incorpora el grupo fitilo o geranil-geranilo (Katz et al, 1972) los cuales refuerzan fuertemente las propiedades hidrofóbicas de la molécula.

Hasta el momento, se considera que la síntesis de la *C_l* precede a la de la *B_{cl}* (Figura 6.5.)

VI.4. Evolución

VI.4.1. Evolución de la fotosíntesis

El origen de la fotosíntesis ha sido un tema ampliamente investigado (Buvet y Ponnamperuna, 1971; Gaffron, 1965; Oparin et al, 1959; Krasnovsky, 1974; Olson, 1970).

Granick (1965) quien hizo hincapié en la fotoquímica prebiótica, concluyó que la fotosíntesis constituiría un proceso temprano de la evolución. Además, en 1957, Granick propuso un modelo utilizando SFe, mediante el cual pudo ubicar la fecha de la aparición de la ferredoxina bacteriana.

Como la vida tuvo su origen cuando la atmósfera terrestre se encontraba en estado reductor, las reacciones fotosintéticas útiles habrían sido las fotooxidaciones de los compuestos orgánicos reducidos y predominantes y la emisión de hidrógeno. Estos compuestos orgánicos oxidados serían los intermediarios reactivos necesarios para la biogénesis.

El primer tetrapirrol del camino biosintético es la Uroporfirina (Figura 6.4.). En soluciones acuosas, diluidas y neutras, esta porfirina libre fotooxidaría numerosos compuestos orgánicos (Mauzerall, 1960 a, b). Una vez efectuada la quelación con Mg o Zn, la foto-reacción favorecida sería la reducción de un aceptor y la oxidación del pigmento. Bajo condiciones reductoras, esta transferencia de electrones sería solamente utilizada para generar ATP. Sin embargo, una vez que la oxidación del pigmento se encuentre acoplada al último aceptor, el agua, se formaría oxígeno y comenzaría el ciclo de la fotosíntesis. La presencia de un gran gradiente de energía libre entre el oxígeno y los compuestos orgánicos reducidos, sería la que permite la existencia de formas de vida más complejas. La ventaja evolutiva de este gran gradiente es que favorece la selección de la

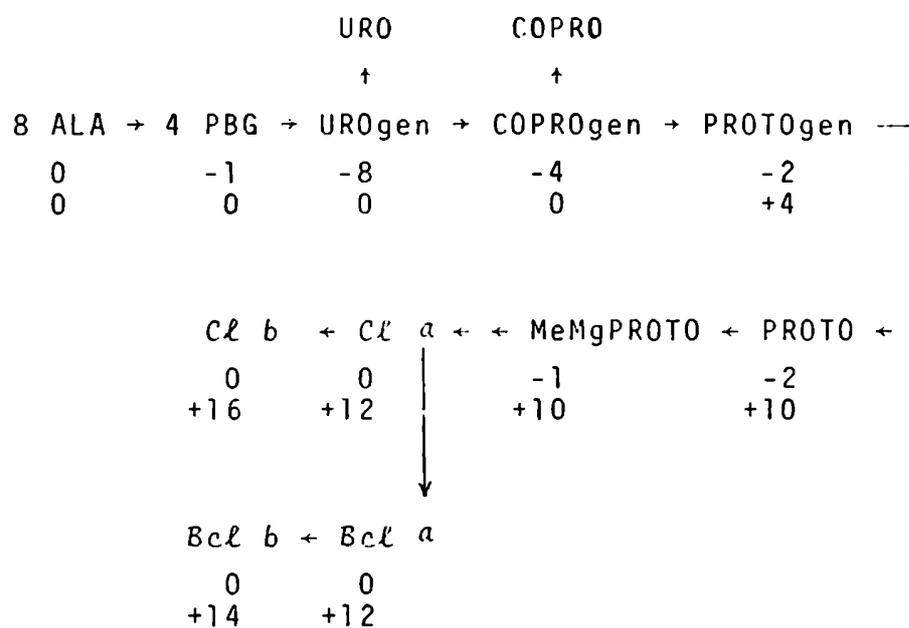


FIGURA 6.5.: Camino de biosíntesis de clorofilas y Bcl's.
 El número ubicado en forma superior indica la carga neta por molécula a pH 7; el segundo número corresponde al equivalente de oxidación relativo al sustrato original.

fotosíntesis moderna sobre las formas pasivas de utilización de la luz, por ejemplo, formación del ATP por foto-reacciones cíclicas o por bomba de protones de bacterio-rodopsina.

VI.4.2. Evolución de la Bacterioclorofila

Después de esta breve visión de la evolución fotosintética, quedaría otro problema a analizar: la ubicación de la *Bcl* frente a la *Cl*. De acuerdo con el camino biosintético (Figura 6.5.) la *Cl* precede a la *Bcl* mientras que las proposiciones usuales en evolución indican que la aparición de la *Cl* es posterior a la de la *Bcl*.

Sin embargo, el punto de vista moderno relaciona la estructura química con la función, lo cual posiblemente lleve a una revisión de las conclusiones de los estudios efectuados sobre la evolución fotosintética.

La complejidad y la especificidad de las estructuras químicas de la *Cl* y la *Bcl* indicarían que las mismas no provienen de reacciones químicas prebióticas. Siendo así, el camino biosintético no habría aparecido muy tardíamente. De hecho, se puede señalar con precisión en qué etapa finaliza la síntesis química simple y comienza la específica. Esto ocurre en la conversión del Coproporfirinógeno en Protoporfirinógeno. En esta etapa dos residuos propiónicos son atacados específicamente, dando origen a dos grupos vinilos más reactivos. Este paso es muy distinto a los anteriores, en los cuales existen condensaciones y decarboxilaciones simples, que originan siempre especies características más estables. La esterificación de un residuo propionato específico y la quelación con Mg constituyen un punto decisivo en la aparición de la función fotoquímica. La formación del anillo de cinco miembros en la Protoclorofila es una reacción altamente oxidante: se pierden seis equivalentes de reducción. En numerosas oportunidades se ha planteado que la *Bcl* es más reducida que la *Cl*: una tetrahydro versus una dihydro porfirina. Sin embargo, si consideramos la molécula total, la *Cl* y la *Bcl* poseen exactamente el mismo nivel redox (Figura 6.5.). Los dos hidrógenos extras que posee la *Bcl* se encuentran balanceados por los dos equivalentes de oxidación de la transformación del grupo vinilo en acetilo en la posición 2.

(Figura 6.6.). Así, el argumento de que la *Bcl* es más reducida y por lo tanto, más primitiva podría descartarse.

La oxidación del grupo metilo en la posición 3 a un grupo formilo en la *Cl b*, transforma a ésta en una molécula más oxidada (4 equivalentes) que la *Cl a* (Figura 6.5.). La *Bcl b* (Scheer et al, 1974) es 2 equivalentes más oxidada que la *Bcl a*. Aparentemente, habría un giro total en el camino biosintético, hacia la formación de moléculas con un mayor nivel de oxidación.

Generalmente, se piensa que la aparición de las bacterias fotosintéticas precede a la de las cianofíceas (algas azules), en la evolución (Brock, 1973; Schopf, 1974). Sin embargo, Olson (1970) sugirió la presencia de un pigmento similar a la *Cl a*, el cual sería un precursor común para ambas. Mauzerall (1978) concluyó en cambio, que la bacteria fotosintética moderna surgiría de una cianofícea unicelular primitiva. La similitud del fotosistema I de las cianofíceas y de las bacterias fotosintéticas se explicaría fácilmente según las conclusiones de Mauzerall (1978) pero también según las de Olson (1970).

El origen secundario de la fotosíntesis-*Bcl* explicaría la fuerza inductora evolutiva hacia un nicho ecológico (longitudes de onda) no ocupado por las cianofíceas.

Los pares de bases de las bacterias fotosintéticas coinciden con aquellos de las cianofíceas unicelulares del tipo 1-A. Tres cepas de *Chlorobium* contienen G + C (55±3%) mientras que las bacterias fotosintéticas comunes presentan un 66±5% de G + C (Normore, 1973). El contenido de G + C en las cianofíceas unicelulares de tipo 1-A muestra dos rangos distintos de distribución: 53±5% y 68±3% (Schiff, 1973). Estos datos estarían de acuerdo con una relación estrecha entre estos organismos y sugerirían una diversión evolutiva de las cianofíceas hacia estas bacterias.

La bacteria verde *Chlorobium* es un caso sumamente interesante. En estos organismos existe una gran antena de "chlorobium *Cl*" conectada a proteína correspondiente a la *Bcl* (Olson, 1971; Olson, 1978), y ésta a los centros de reacción característicos. Es interesante comparar esta antena-*Cl* con las ficobilinas, presentes en las cianofíceas primitivas. Las últimas

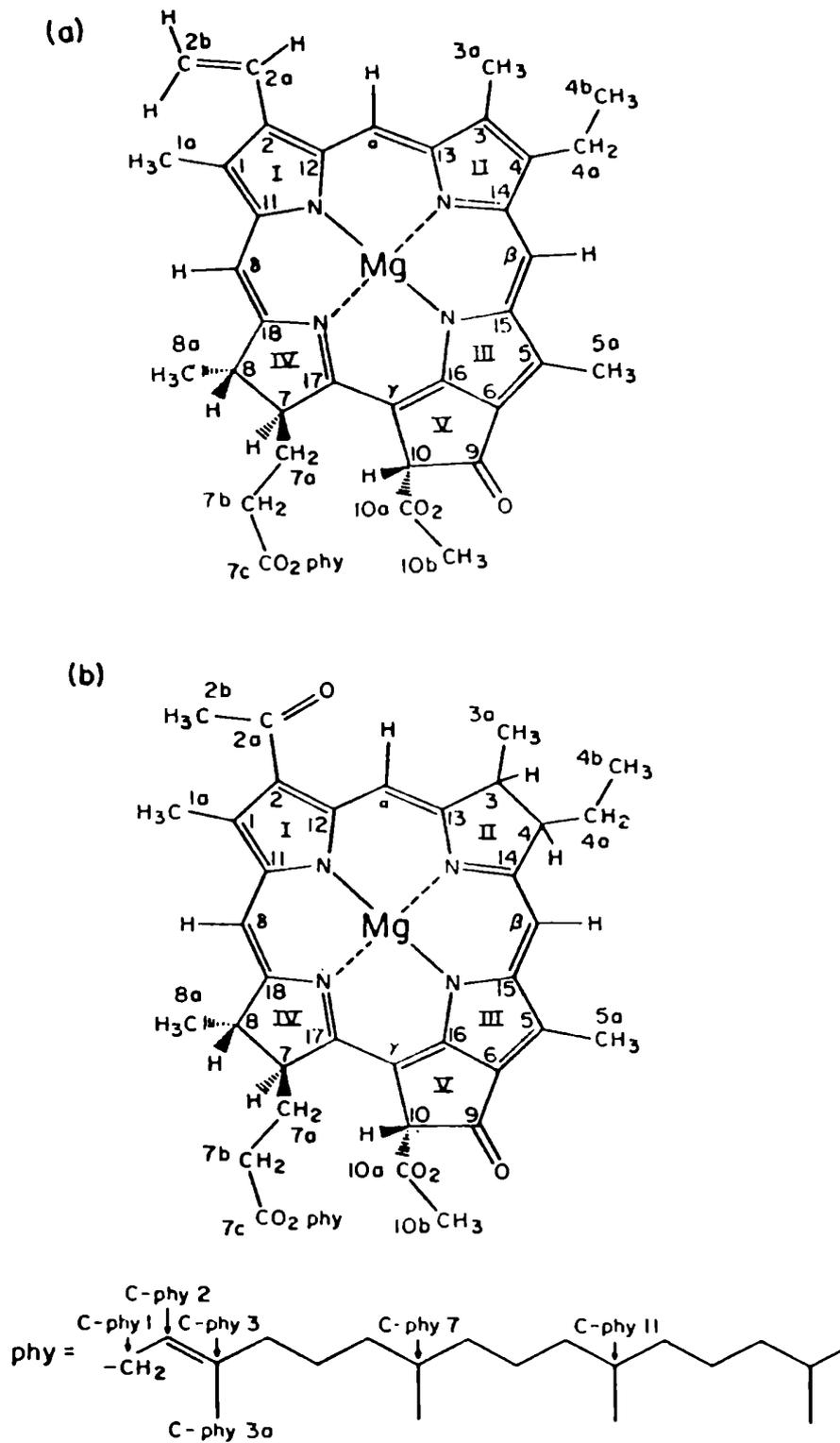


FIGURA 6.6.: Fórmulas estructurales de la Clorofila a (a) y de la Bcl a (b)

se forman por ruptura oxidativa de un intermediario macrocíclico, del camino biosintético de las *Cl*'s. *Chlorobium* adaptó el intermediario del camino de síntesis de *Bcl*, para la función de antena. Los cambios estructurales de la "*Chlorobium Cl*" (Mathewson et al, 1963; Holt, 1966) a partir de la *Cl* a serían: hidratación de los grupos vinilos, decarbometoxilación del quinto anillo y alquilación de los puentes meso. Estas variaciones serían una respuesta de los centros de reacción, los cuales requerirían una antena de menor energía que la provista por las ficobilinas. Así como las ficobilinas, se encontró una variedad de especies moleculares, cuyas estructuras serían críticas para la transformación fotoquímica, aunque no son únicas para la simple función de recoger fotones y transmitir la excitación.

La secuencia de aminoácidos de la ferredoxina y su composición restringida indicarían que provienen de un precursor común, (Hall et al, 1973). El tamaño de la ferredoxina parece aumentar al crecer la posición filogenética: *Clostridium* 55, *Chlorobium* 60, *Rhodospirillum* 66-75, *Chromatium* 81 y espinaca 97 residuos. Es interesante resaltar que la ferredoxina de *Chlorobium* (Tanaka et al, 1974) presenta un tamaño y una secuencia semejante a la de *Clostridium*. Esto indicaría el origen temprano de las bacterias fotosintéticas verdes. Sería interesante obtener datos acerca de la ferredoxina de las cianofíceas unicelulares.

Otro camino posible para distinguir entre las distintas hipótesis es el origen del ácido δ -aminolevúlico requerido para la biosíntesis de los pigmentos porfirínicos. Las bacterias fotosintéticas utilizan el camino glicina-succinato (Figura 6.3) así como los mamíferos. Sin embargo, las plantas superiores (Beale y Castelfranco, 1974) y las algas (Mauzerall, 1978) usarían un precursor diferente, probablemente el ácido glutámico.

Sería sumamente interesante averiguar cuál es el camino utilizado por las cianofíceas unicelulares. Si es el glicina-succinato, la relación entre las cianofíceas y las bacterias fotosintéticas sería más íntima; si es el de las plantas superiores el argumento más probable sería un origen no común.

En resumen, no se ha arribado a una conclusión clara acerca de la secuencia en la biosíntesis de la *Cl* y de la *Bcl* y

en la evolución fotosintética. Sin embargo, se ha podido relacionar la estructura de estos pigmentos con su función durante la fotosíntesis.

REFERENCIAS

- Ballschmiter, K. & Katz, J.J. (1969), J.Am. Chem. Soc. 91, 2661.
- Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1974), Plant Physiol. 53, 297.
- Brock, T.D. (1973), The Biology of Blue-Green Algae (N.G. Carr y B.A. Whitton, eds.), pp 487-500, University of California Press, Berkeley.
- Buvet, R. & Ponnampereuma, C. (eds), (1971), Chemical Evolution and the origin of life, Vol I, Molecular Evolution , Elsevier, New York.
- Gaffron, H. (1965), The Origins of Prebiological Systems (S. W. Fox, ed), pp 437-460, Academic Press, New York.
- Granick, S. (1957), Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 292.
- Granick, S. (1965), Evolving Genes and Proteins (V. Bryson y H. J. Vogel, eds.), pp 67-88, Academic Press, New York.
- Gurinovich, G.P.; Sevchenko, A.N. & Sol'vev, K.N., (1968), Spectroscopy of chlorophyll and related compounds, Atomic Energy Commission Translation 7199, Chemistry, Technical Information Division, 4500.
- Hall, D.O.; Camnack, and Rao, K.K. (1973), Pure Appl. Chem. 34, 553.
- Holt, A.S. (1966), The Chlorophylls (L.P. Vernon y G.R. Seely, eds.), pp 111-118, Academic Press, New York.
- Jensen, A.; Aasmusdrud, O. & Eimhjellen, K.E. (1964), Biochim. Biophys. Acta 88, 466.
- Katz, J.J.; Strain, H.H.; Harkness, A.L.; Studier, M.H.; Svec, W.A.; Janson, T.R. & Cope, B.T. (1972), J. Am.Chem.Soc. 94, 7938.
- Krasnovsky, A.A. (1974) The Origin of Life and Evolutionary Biochemistry (K.Dose, S.W. Fox, G.A. Deborin & T.E.Povlovskaya, eds), pp 233-244, Plenum Press, New York.
- Lascelles, J. (1964), Tetrapyrrole Biosynthesis and Its regulation, Benjamin, New York.

- Mathewson, J.W.; Richards, W.R. & Rapoport, H.; (1963), J. Am. Chem. Soc. 85, 364.
- Mauzerall, D. (1960 a), J. Am. Chem. Soc. 82, 2601.
- Mauzerall, D. (1960 b), J. Am. Chem. Soc. 82, 2605.
- Mauzerall, D. (1976), Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. 273, 287.
- Mauzerall, D. (1977 a), Brookhaven Symp. Biol., N°28, pp 64-73.
- Mauzerall, D. (1977b), Bioorganic Chemistry (E. Van Tamelen, ed.), Vol IV, pp.303-314, Academic Press, New York.
- Mauzerall, D. (1977 c), The Porphyrins (D. Dolphin, ed.), Vol. 5, Chapt. 2, pp 44-80, Academic Press, New York.
- Mauzerall, D. (1978), The Photosynthetic Bacteria (R.K. Clayton y W.R. Sistrom, eds.) Chapt 11, pp 223 -231, Plenum Press, New York.
- Mauzerall, D. & Hong, F.T. (1975) Porphyrins and Metalloporphyrins, (K.M. Smith, ed.), Chapt. 17, pp 701-725, Elsevier, Amsterdam.
- Normore, W.M. (1973), Handbook of Microbiology, (A.I. Laskin y H.W. Lechevalier, eds.) , pp 587-691, CRC Press, Cleveland.
- Olson, J.M. (1970), Science 168, 438.
- Olson, J.M. (1971), Methods in Enzymology, Vol XXIII, Photosynthesis, Part A (A. San Pietro, ed.), pp 636-644, Academic Press, New York.
- Olson, J.M. (1978), The Photosynthetic Bacteria (R.K. Clayton y W.R. Sistrom, eds.), Chapt.8, pp 161-178
- Oparin, A.I.; Pasyanskii, A.G.; Braunstein, A.E. & Pavoloskaya, T.E. (eds) (1959), The Origin of Life on the Earth, Pergamon Press, New York.
- Parson, W.W. & Cogdell, R.J. (1975), Biochim. Biophys. Acta 416, 105.
- Rabinowitch, E.I. (1945) Chemistry of Photosynthesis, Chemosynthesis and Related Processes in Vitro and in Vivo, Vol. I of Photosynthesis, Interscience, New York.

- Rabinowitch, E.I. (1951), Spectroscopy and Fluorescence of Photosynthetic Pigments; Kinetics of Photosynthesis, Vol. II Part 1, of Photosynthesis, Interscience, New York.
- Rabinowitch, E.I. (1956), Kinetics of Photosynthesis, addenda to Vol I y Vol II, Part 1 , Vol II, Part 2 of Photosynthesis, Interscience, New York .
- Sauer, K.; Smith, J.R.L. & Schutz, A.J. (1966), J. Am. Chem. Soc. 88, 2681.
- Scheer, H.; Svec, W.A.; Cope, B.T.; Studer, M.H.; Scott, R.G. & Katz, J.J. (1974) J. Am. Chem. Soc. 96, 3714.
- Schiff, J.A. (1973), Adv. Morphog. 10, 265.
- Schopf, J.W. (1974), Evol. Biol. 7, 1.
- Smith, J.H.C. & Benitez, A. (1955), Modern Methods of Plant Analysis (K.Paech y M.V. Tracey, eds.), Vol IV , p. 142, Springer-Verlag, Berlin.
- Strain, H.H. & Svec, W.A. (1966), The Chlorophylls, (L.P. Vernon y G.R. Seely, eds.), pp. 21-66, Academic Press, New York.
- Straley, S.C.; Parson, W.W.; Mauzerall, D. & Clayton, R.K. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 305, 597.
- Tanaka, M. ; Hanín, M.; Yasunobi, K.T.; Evans, M.C. & Wand Rao, K.K. (1974) Biochemistry 13, 2953.
- Vernon, L.P. & Seely, G.R. (eds.)(1966), The Chlorophylls, Academic Press, New York.

CAPITULO VII

PIGMENTOS CAROTENOIDES

VII.1. Introducción

VII.2. Estructura

VII.2.1. Definición y nomenclatura

VII.2.2. Carotenoides en bacterias fotosintéticas

VII.2.3. Aspectos taxonómicos y evolutivos

VII.3. Aislación

VII.4. Identificación y elucidación de la estructura

VII.4.1. Generalidades

VII.4.2. Métodos físicos y químicos

VII. PIGMENTOS CAROTENOIDES

VII.1. Introducción

Durante el año 1930, comenzaron los estudios de van Niel y Karrer, acerca de los carotenoides en las bacterias fotosintéticas. Posteriormente, en 1950, la escuela de Goodwin prosiguió con dichos trabajos.

La estructura y la síntesis total de los mismos fueron estudiadas por diferentes escuelas: Isler, Weedon y Surmatis.

La última actualización sobre carotenoides en bacterias fotosintéticas fue la de Liaaen-Yensen (1963). Posteriormente, aparecieron otros trabajos más extensos (Liaaen-Jensen, 1965; Liaaen-Jensen y Andrewes, 1972; Goodwin, 1973); sin embargo, éstos no fueron específicos de bacterias fotosintéticas.

En la monografía presentada por Isler (1971) se encuentran recopilados todos los trabajos acerca de este tema, hasta el año 1970.

VII.2. Estructura

VII.2.1. Definición y Nomenclatura

Reciben el nombre de Carotenoides cierta clase de hidrocarburos (Carotenos) y sus derivados oxigenados (Xantófilas o Xantinas). Estos compuestos presentan la característica de que sus esqueletos carbonados están formados por unidades de 5 carbonos, llamadas isoprenos o isoprenoides (Figura 7.1.).

Todos los carotenoides derivarían de la estructura básica del licopeno (Figura 7.2.(67)) por hidrogenación, dehidrogenación, ciclización, oxidación o combinación de alguno de estos procesos. El número que aparece en cada carotenoide en la Figura 7.2. corresponde a la lista efectuada por Liaaen-Jensen (1978).

También reciben el nombre de carotenoides los compuestos que provienen de una reestructuración del esqueleto 67 o de una remoción de parte de dicha estructura.

Todos los carotenoides se designan con nombres semisistemáticos (IUPAC y IUB, 1975), basados en un término común

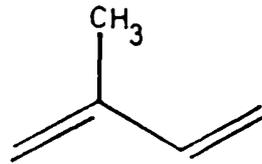


FIGURA 7.1.: Unidad isoprenoide

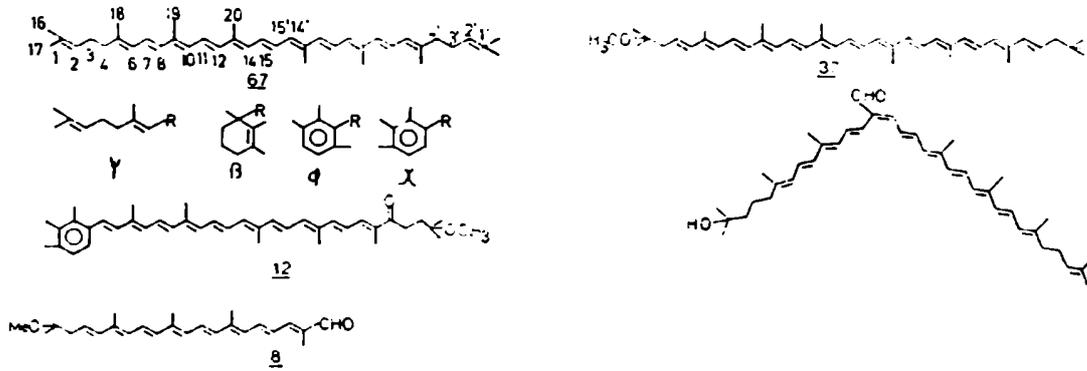


FIGURA 7.2.: Nomenclatura de carotenoides

(caroteno) y utilizando un doble prefijo de letras griegas (β, ϕ, ψ, χ) para describir una estructura determinada (Figura 7.2.). Así, el carotenoide (37) cuyo nombre trivial es Spirilloxantina, recibe la siguiente denominación según IUPAC: 1,1'-dimetoxi-3,4,3',4'-tetradehidro-1,2,1',2'-tetrahidro- ψ, ψ -caroteno; el (2) (Rodopinal): 13-cis-1-hidroxi-1,2-dihidro- ψ, ψ -caroten-20 al; el (12) (Okenona): 1'-metoxi-1',2'-dihidro- χ, ψ -caroten-4'-ona; el (8) (Thiothece-425): 1-metoxi-1,2-dihidro-12'-apo- ψ, ψ -caroten-12'-al). El prefijo apo indica una ruptura en el esqueleto de cuarenta carbonos.

Otra forma de representar estas estructuras consiste en usar fórmulas abreviadas para los grupos terminales y las unidades centrales (Figura 7.3.), Así la spirilloxantina se denomina j-F-j y el licopeno b-F-b.

VII.2.2. Carotenoides en Bacterias fotosintéticas

Las bacterias fotosintéticas sintetizan 78 de los 350 carotenoides naturales, cuyas estructuras ya han sido propuestas (Liaaen-Jensen, 1976). Estos carotenoides se encuentran recopilados formando grupos según las funciones que contienen: 1)aldehídos, 2) cetonas y ésteres, 3)metil éteres, 4) alcoholes y glicósidos y 5) hidrocarburos (carotenos), (Liaaen-Jensen, 1978).

Los carotenoides presentes en estos organismos tienen estructuras simples. Generalmente son alifáticos con algún grupo β o aromático en los extremos. Los grupos funcionales característicos son : hidroxi terciarios, glucosil oxi o metoxi (en posiciones 1,1'), ceto (en 2,2' o 4,4') y en los extremos 1,2,3-trimetilfenil y 1,2,5-trimetilfenil.

Los carotenoides metoxilados y los sustituidos en C_{20} se encuentran solamente en las bacterias fotosintéticas. En cambio, estructuras elementales como las alénicas o acetilénicas, epoxi o furanóxidos, nor-carotenoides (cartenoides en los cuales se han eliminado átomos de C del esqueleto) o carotenoides con 45 ó 50 C, no aparecen en estos microorganismos. Sólo se han hallado unos pocos apocarotenoides.

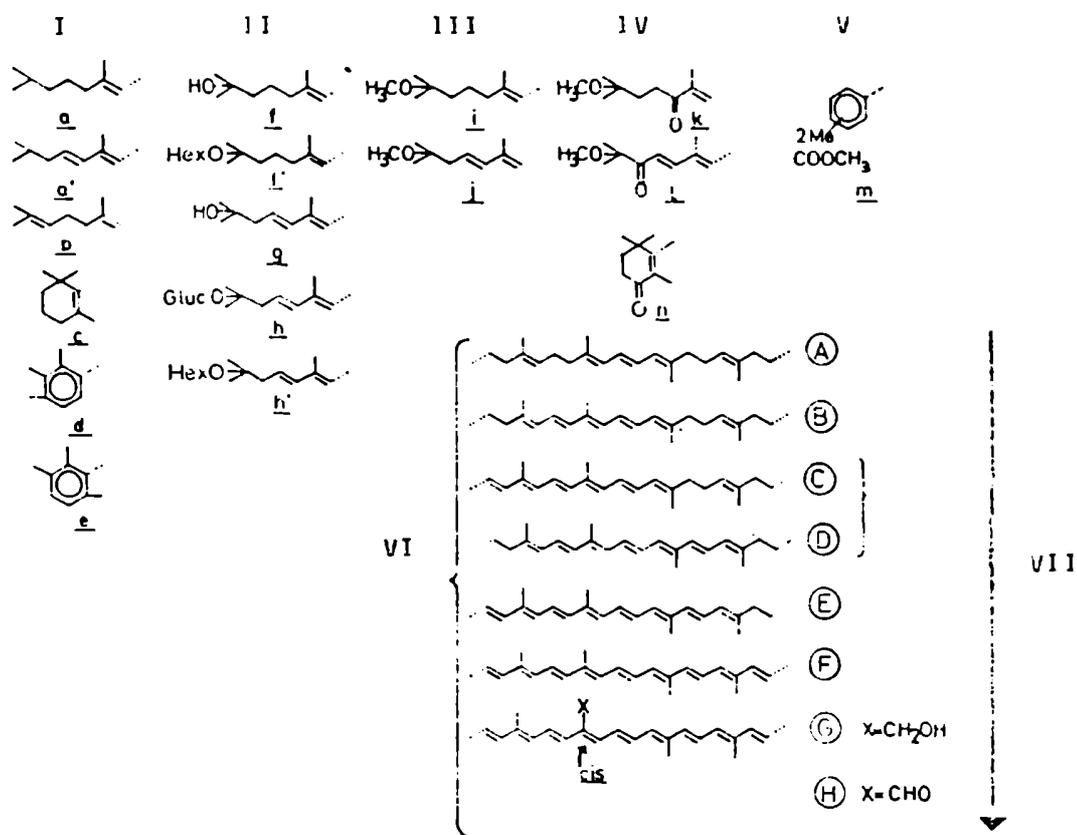


FIGURA 7.3.: Nomenclatura de carotenoides de bacterias fotosintéticas
 Grupos finales: (I) hidrocarbonados;
 (II) glucosídicos e hidroxilados;
 (III) metoxilados; (IV) cetónicos;
 (V) tipo éster
 (VI) Parte central de la molécula
 (VII) aumento del nivel de oxidación

VII.2.3. Aspectos taxonómicos y evolutivos

Liaaen-Jensen y Andrewes (1972) discutieron la posibilidad de usar los carotenoides como marcadores taxonómicos en bacterias fotosintéticas.

La identificación de carotenoides metoxilados en depósitos lacustres reveló la presencia de bacterias fotosintéticas primitivas.

La incapacidad general de estos microorganismos para ciclar o para introducir puntos de asimetría molecular en sus carotenoides los ubicaría en un nivel más primitivo que el de otros organismos fotosintéticos.

VII.3. Aislación

Liaaen-Jensen (1971) reseñó todos los métodos conocidos para la obtención de carotenoides de distintos materiales biológicos. También fueron descritos detalladamente, procedimientos cuantitativos de aislación, a partir de tejidos fotosintéticos (Liaaen-Jensen y Jensen, 1971).

Para la aislación de los carotenoides se han detallado precauciones generales (Liaaen-Jensen y Jensen, 1971), las cuales incluyen: atmósfera inerte (vacío, N_2 o CO_2), baja temperatura (-20 a 40 °C), oscuridad o luz amortiguada y condiciones libres de ácidos y peróxidos. Estos cuidados son necesarios debido a la naturaleza polieno de estos compuestos.

Algunos carotenoides se alteran aún en presencia de bases débiles; sin embargo, éstos no se encuentran en bacterias fotosintéticas.

Un esquema general empleado en la aislación de los carotenoides de las bacterias fotosintéticas es el detallado en la Figura 7.4. Para asegurar una obtención completa ya sea a partir de células frescas o liofilizadas, se repiten las extracciones con una mezcla acetona:metanol extrayéndose en el primero los carotenoides y en el segundo la clorofila.

La clorofila y los lípidos coloreados se remueven por saponificación. Previo a este tratamiento es necesario eliminar

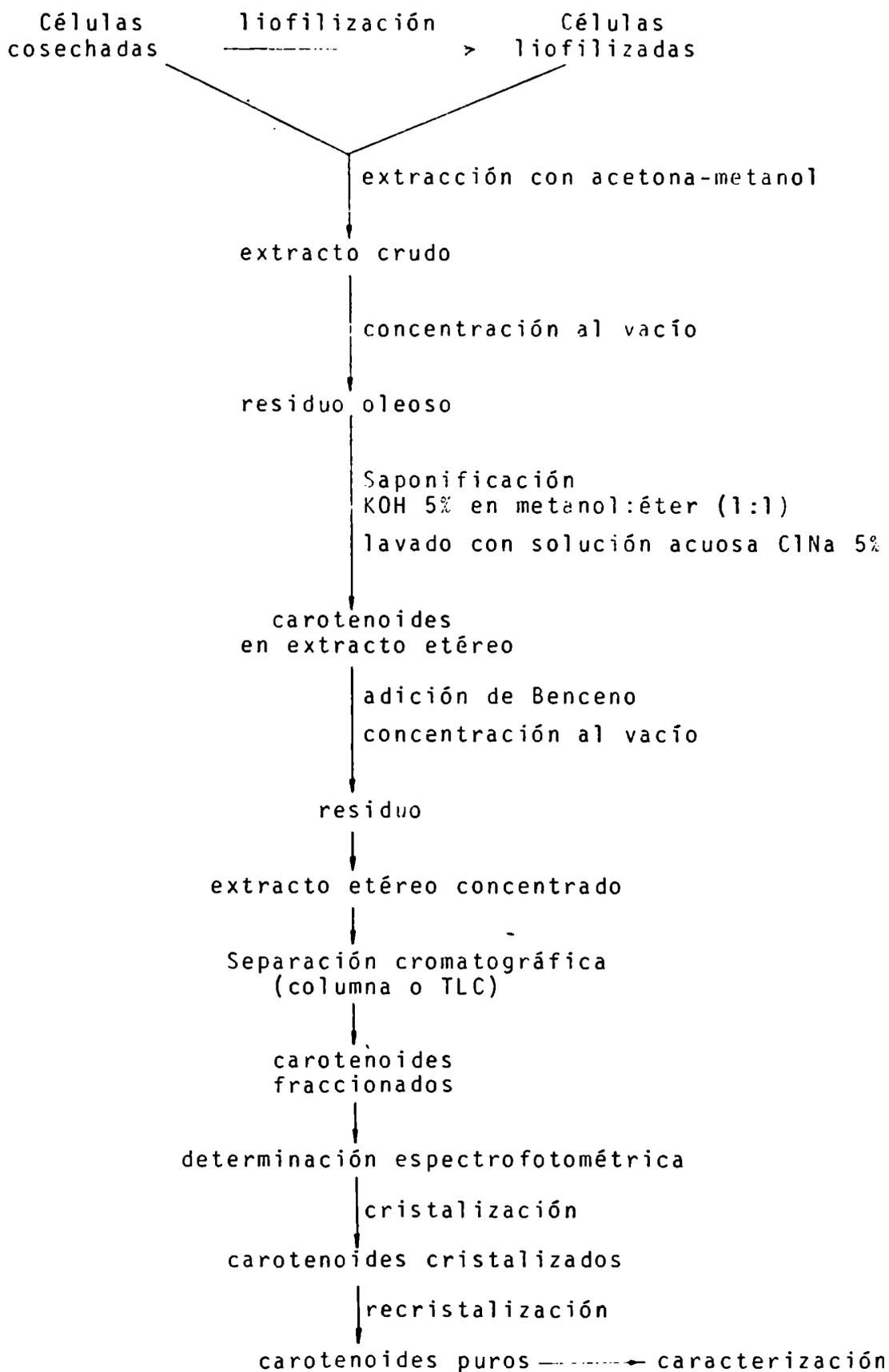


FIGURA 7.4.: Esquema general de aislamiento de carotenoides de bacterias fotosintéticas

toda la acetona ya que ésta forma productos de condensación con los carotenales en presencia de álcali (Schmidt et al, 1971).

Luego de la saponificación, se extraen los carotenoides en éter. Los extractos etéreos se concentran por destilación azeotrópica, en benceno al vacío y se cromatografían en placa delgada de sílica gel (Bolliger y König, 1969).

La determinación cuantitativa de cada componente se basa en su espectro visible y su coeficiente de extinción (Liaaen-Jensen y Jensen, 1971).

VII.4. Identificación y elucidación de la estructura

VII.4.1. Generalidades

El primer paso para la identificación de los carotenoides es el espectro de absorción visible, el cual indica la naturaleza del cromóforo y la polaridad relativa en un sistema cromatográfico conocido.

La medición de la polaridad en términos de relaciones de partición (Petracek y Zechmeister, 1956; Krinsky, 1963) ha perdido ya importancia en el campo de los carotenoides.

Una de las herramientas indispensables para su identificación es la espectrometría de masa. Sin embargo, hay que tener en cuenta la posible fragmentación de estos compuestos por impacto electrónico (Andrewes et al, 1973).

Una cocromatografía cuidadosa con material auténtico es un requerimiento necesario pero no suficiente para probar su identidad. Además, en este caso, se debe disponer de una colección de carotenoides de referencia.

Aunque se tomen precauciones, es inevitable la isomerización TRANS-CIS durante el procedimiento de aislación. Los isómeros CIS tienen espectros visibles distintos. La transformación en el isómero TRANS por catálisis con I_2 confirmaría la naturaleza CIS de estos compuestos (Zechmeister, 1962).

Solamente después de caracterizar por estereomutación, por espectroscopía de masa, con derivados químicos y por cocromatografía con carotenoides relacionados se puede concluir que un cromóforo no ha sido descripto previamente. Antes de di

Lucidar su estructura, un carotenoide no identificado recibe un nombre que involucra la fuente del mismo y la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción en el visible, medido en hexano; por ejemplo, Thiothece-474 es la denominación del carotenoide obtenido de las especies *Thiothece* cuyo $\lambda_{\text{máx}}$ se encuentra a 474 nm.

VII.4.2. Métodos físicos y químicos

Los primeros incluyen determinaciones de los puntos de fusión, cromatografías y estudios de comportamiento frente a la partición (Liaaen-Jensen, 1971), además de los espectros: infrarrojo, RMN, masa y de absorción en el visible (Vetter et al, 1971).

En cuanto a los métodos químicos para identificar carotenoides, se utilizan los derivados de los mismos (Liaaen-Jensen, 1978). Los valores de Rf y los espectros de masa y de absorción en el visible de estos últimos, nos permiten llegar a la conclusión final.

REFERENCIAS

- Andrewes, A.G.; Hertzberg, S.; Liaaen-Jensen, S. & Starr, M. P. (1973), *Acta Chem. Scand.* 27, 2383.
- Bolliger, H.R. & König, A. (1969), *Thin Layer Chromatography, a Laboratory Handbook* (E. Stahl, ed.), pp 259-311, 2nd Ed., Springer, Heidelberg.
- Goodwin, T.W. (1973), *Handbook of Microbiology, Vol III, Microbial Products* (A.I. Laskin y H.A. Lechevalier, eds.), pp 75-83, CRC Press, Cleveland.
- Isler, O. (ed.) (1971), *Carotenoids*, Birkhäuser, Basel.
- IUPAC & IUB (1975), *Biochemistry* 14, 1803.
- Krinsky, N. (1963), *Anal. Biochem.* 6, 293.
- Liaaen-Jensen, S. (1963), *Bacterial Photosynthesis* (H.Gest, A. San Pietro y L.P. Vernon, eds.), pp 19-34, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.
- Liaaen-Jensen, S. (1965), *Acta Chem. Scand.* 19, 1166.
- Liaaen-Jensen, S. (1971), *Carotenoids* (O. Isler, ed.), pp. 61-189, Birkhäuser, Basel.
- Liaaen-Jensen, S. (1976), *J. Pure Appl. Chem.* 47, 129.
- Liaaen-Jensen, S. (1978), *The Photosynthetic Bacteria* (R.K. Clayton y W.R. Sistrom, eds.), Chapt. 12, pp 233-247, Plenum Press, New York.
- Liaaen-Jensen, S. & Andrewes, A.G. (1972), *Annu. Rev. Microbiol.* 26, 225.
- Liaaen-Jensen, S. & Jensen, A. (1971), *Methods in Enzymol.* 23, 586.
- Petracek, F.J. & Zechmeister, L. (1956), *Anal. Chem.* 28, 1484.
- Schmidt, K.; Francis, G.W. & Liaaen-Jensen, S. (1971), *Acta Chem. Scand.* 25, 2476.
- Vetter, W.; Englert, G.; Rigassi, N. & Schwieter, U. (1971), *Carotenoids* (O. Isler, ed.), pp. 189-266, Birkhäuser, Basel.
- Zechmeister, L. (1962), *CIS-TRANS Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes*, Springer-Verlag, Vienna.

CAPITULO VIII

CITOCROMOS

- VIII.1. Introducción
- VIII.2. Nomenclatura
- VIII.3. Métodos de aislamiento y caracterización
 - VIII.3.1. Métodos de purificación
 - VIII.3.2. Aislamiento de cit's unidos a membranas
 - VIII.3.3. Medición de la concentración
- VIII.4. Distribución
 - VIII.4.1. Modelos
 - VIII.4.2. Localización
- VIII.5. Propiedades
 - VIII.5.1. Citocromos c solubles
 - VIII.5.1.1. Cit c₂
 - VIII.5.1.2. Cit c'
 - VIII.5.1.3. Cit c'-556
 - VIII.5.1.4. Cit c-554
 - VIII.5.1.5. Otras variedades
 - VIII.5.2. Citocromos C unidos a membrana
 - VIII.5.2.1. Complejo c-556, c-552
 - VIII.5.3. Citocromos b
 - VIII.5.3.1. Cit b-558
 - VIII.5.3.2. Cit b'
 - VIII.5.3.3. Cit B unido a membrana
 - VIII.5.4. Citocromo oxidasa

VIII. CITOCROMOS

VIII.1. Introducción

La presencia de citocromos (cit's) en las bacterias fotosintéticas fue reconocida por numerosos investigadores dedicados a la purificación y caracterización de estas hemo-proteínas (Vernon, 1953; Elsdén et al, 1953, Kamen y Vernon, 1954, 1955).

Duysens (1954) y Chancey Smith (1955) estudiaron reacciones redox luz dependientes que involucraban cit's y observaron cierta analogía con reacciones similares detectadas en cloroplastos de plantas verdes (Hill y Scarisbrick, 1951; Davenport y Hill, 1952).

Las bacterias fotosintéticas constituyen una fuente prolífica de cit's y favorecen el estudio de reacciones de transferencia de electrones, luz inducidas.

Se han escrito numerosos trabajos acerca de los cit's en bacterias fotosintéticas, entre los cuales merecen señalarse los siguientes; Bartsch (1968, 1971), Kamen y Horio (1970), Horio y Kamen (1970), Kamen et al (1972), Lemberg y Barrett (1973), Yamanaka y Okunuki (1974) y Kamen (1973).

Los fotofisiólogos interesados en el estudio de los cit's y de los agentes relacionados con la transferencia electrónica en bacterias fotosintéticas, se han dedicado en especial al análisis de aquellos componentes involucrados en las reacciones redox luz dependientes.

Uno de los puntos a tratar en el presente capítulo es la presencia en bacterias, de cit's adicionales, de interés químico y biológico. Un segundo tema es el reconocimiento de diferentes modelos de cit's existentes en los distintos grupos de estas bacterias, modelos que no corresponden estrictamente a la división taxonómica.

Se acepta actualmente que la absorción de un cuanto de luz ocurre durante un ciclo, en el cual un electrón del centro de reacción de la Bc₂ pasa a un aceptor primario, seguida rápidamente por la transferencia de otro electrón del ferrocitocromo c a la clorofila fotooxidada. El ciclo se completa por el pasaje de un electrón del aceptor reducido, vía otros componentes, tales como la ubiquinona y el cit b, restaurándose el es-

tado reducido del cit c.

Los cit's también están involucrados en la transferencia no cíclica de electrones.

De acuerdo con el tipo de cit c implicado en el proceso de transferencia electrónica cíclica luz dependiente, las bacterias fotosintéticas pueden dividirse en diversas categorías. La primera de ellas incluye aquellas bacterias pertenecientes a las Rhodospirillaceae que contienen el cit soluble c_2 . A una segunda categoría corresponden algunas especies en las cuales existen un cit c-556 y un cit c-552, de alto y bajo potencial rédox respectivamente, que se encuentran fuertemente unidos a la membrana citoplasmática. Dentro de este grupo se encuentran *Chromatium vinosum*, *Thiocapsa pennigii*, *Rhodospseudomonas gelatinosa* y *Rp. viridis*. La tercer categoría se halla limitada a las pocas especies de Chlorobiaceae estudiadas, así como *Chloroflexus aurantiacus*, donde los cit's c-552 y c-554, unidos a las membranas, son lo implicados en las reacciones rédox lux dependientes.

Muchas de las Rhodospirillaceae son capaces de crecer en la oscuridad en forma aeróbica, a pesar de que algunas muestran una baja tolerancia por el O_2 . En estos microorganismos, el mismo cit c_2 que está involucrado en los procesos de transferencia de electrones luz dependientes, también funcionaría en los oxidativos (Taniguchi y Kamen, 1965; Kikuchi et al, 1965). La concentración de algunos cit's encontrados en células crecidas a la luz, disminuye en forma considerable bajo condiciones de crecimiento aeróbico (Taniguchi y Kamen, 1965) y en algunas especies aparece una nueva oxidasa aeróbica (Kikuchi et al, 1965; Saunders y Jones, 1974) para suplementar el cit o-tipo oxidasa (Kelmme y Schlegel, 1969, Connelly et al, 1973).

Se ha estudiado el contenido de cit soluble en la mayoría de las especies de las Rhodospirillaceae; sin embargo se han determinado las propiedades químicas de sólo unos pocos cit's unidos a membrana.

VIII.2. Nomenclatura

Se utiliza la nomenclatura para citocromos del Comité IUB (Florkin y Stotz, 1965).

Los citocromos se definen como hemo-proteínas que participan en reacciones redox reversibles que involucran la cupla ferroso -férico del grupo prostético y desempeñan una función en la transferencia electrónica. Estos compuestos para los cuales el grupo hemo ha sido caracterizado, se denominan cit a, b ó c. El cit a contiene al hemo a (Figura 8.1.) , el cual posee un grupo formilo en posición 8; el cit b está compuesto por el protohemo y el cit c tiene su grupo hémico covalentemente unido a la proteína (Figura 8.2.).

El hemo de los cit's a y b puede ser extraído en acetona o metil-etil-cetona acidificada con HCl hasta pH 2, mientras que el que proviene del cit c puede ser separado de la proteína mediante la ruptura de la unión tioéter entre los residuos cisteína de la misma y las cadenas laterales de los vinilos sustituidos del hemo. Tal separación es más efectiva en presencia de sales de metales pesados, a bajos pH's (Ambler y Wynn, 1973).

El espectro de absorción de la piridina ferrohemocromo alcalina, provee uno de los métodos más simples para distinguir entre los distintos tipos de hemo. Después de la extracción del hemo, se evapora el solvente orgánico acidificado. La fracción hémica se disuelve en piridina 25% (v/v) en NaOH 0,2 M trazándose el espectro de absorción antes y después de la adición de ditionito de sodio para reducir el hemo a o el hemo b. El residuo de la extracción puede ser tratado en forma similar para detectar el contenido del hemo c.

El máximo de absorción del pico α del espectro de la piridina ferrohemocromo alcalina del hemo c, corresponde a 549-551 nm ($\epsilon_{mM} \simeq 29$), el del protohemo (hemo b) a 556-558 nm ($\epsilon_{mM} \simeq 34$) (Falk, 1964) y el del hemo a a 580-590 nm ($\epsilon_{mM} \simeq 26-30$) (Lemberg, 1969). Así, por medición del espectro de su hemo derivado es posible establecer la categoría a la cual pertenece el citocromo, además de su concentración (Figura 8.3.).

Las mezclas de protohemo y de hemo tipo c darán picos α de absorción máxima intermedia, así como también lo presentan las variantes de hemo tipo c, que se encuentran unidas por un sólo enlace tioéter, quedando un grupo vinilo libre (Pettigrew et al, 1975). Este tipo de cit c no ha sido hallado aún en bacterias fotosintéticas.

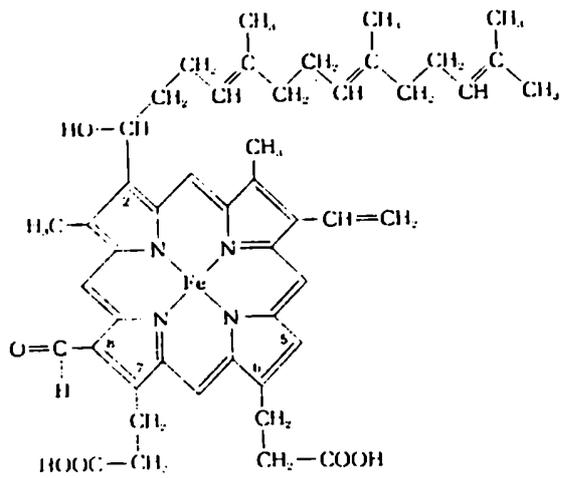


FIGURA 8.1.: Hemo a: grupo prostético del citocromo aa₃

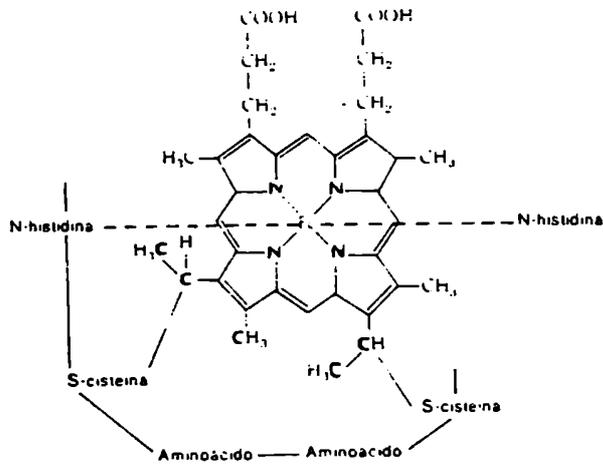


FIGURA 8.2.: Estructura del grupo prostético porfirina (hemo) del citocromo c

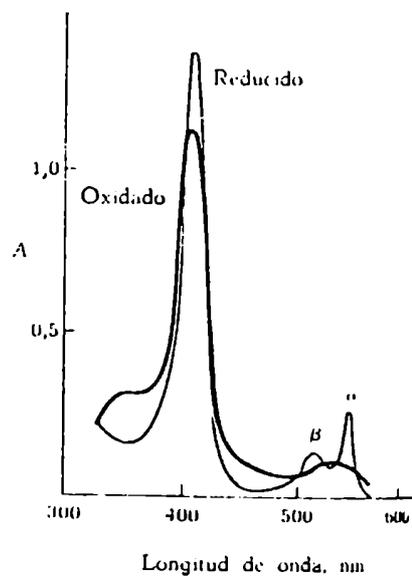


FIGURA 8.3.: Espectro de absorción del c_i tocromo c.

En general, se designa la longitud de onda correspondiente al pico α del cit en su forma reducida, especificando además en qué organismo se encuentra; por ejemplo, cit c-554 (*Rp. palustris*).

Debido a razones históricas, se mantienen las denominaciones de cit c_2 y cit c'. Este último ha recibido numerosos nombres, pero actualmente ha quedado el de cit c, correspondiendo el mismo a los cit's c' de alto spin.

Los cit's para los cuales no se ha identificado el grupo hemo, se denominan de acuerdo con la longitud de onda de su pico α , por ejemplo, cit-560 (*Rs. rubrum*).

VIII.3. Métodos de aislamiento y caracterización

VIII.3.1. Métodos de purificación

Existe un procedimiento general de purificación que ha sido exitosamente aplicado a numerosos cit's solubles presentes en bacterias fotosintéticas (Bartsch, 1971). Dicho método utiliza técnicas convencionales como por ejemplo el empleo de geles de Sephadex G-75 o G-100 y de resinas de intercambio iónico: DEAE-celulosa o CM-celulosa.

En muchas de las operaciones descritas, es necesario controlar el estado redox de los cit's para minimizar el número de especies cargadas diferencialmente, que pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico. Los cit's de alto potencial pueden ser mantenidos al estado reducido incluyendo un agente reductor como ser el 2-mercaptoetanol o el ditiotreitól.

Existen algunas propiedades que se utilizan para proyectar métodos de purificación: punto isoeléctrico, potencial redox, tamaño o peso molecular, etc.

VIII.3.2. Aislamiento de cit's unidos a membrana: cit B y cit C

Algunas de las Rhodospirillaceae, tales como *Rs. rubrum* y *Rp. palustris* parecen contener aunque en poca cantidad, cit C fuertemente unido a la membrana. Sin embargo, todos los miembros de este grupo presentan una cantidad apreciable de cit B,

conclusión obtenida en base a la diferencia espectral (estado reducido menos oxidado).

A pesar de que estos citocromos pueden ser solubilizados, dependiendo del tipo y concentración del detergente utilizado (Reed, 1969), no se han publicado trabajos acerca de purificaciones de los mismos.

Bartsch (1978) indicó que los cit B aislados de *Rs. rubrum*, *Rp. capsulata* y *Rp. palustris* eran muy inestables después de su solubilización con detergentes. Los métodos aplicados a la purificación del cit mitocondrial C₁ (Yu et al, 1972) serían los más adecuados para preservar el cit B bacteriano.

Kennel y Kamen (1971 a, b) purificaron el complejo cit-556 - cit-552, el cual constituye aproximadamente un 80% del hemo celular total de *Chr. vinosum*. Como los lípidos interfieren en los distintos pasos de purificación, se remueven previamente con acetona. Los cit's particulados se extraen en colato de sodio 2% (P/V) en cloruro de sodio 0,5 M más buffer TRIS-HCl 50 mM pH 8. La óptima solubilización de los cit's se logra utilizando en la extracción una solución con alta fuerza iónica.

El cit particulado c-554 de *Chloroflexus aurantiacus* se solubiliza por tratamiento con Tritón X-100 2% (P/V) en buffer TRIS HCl 50 mM pH 8, previa extracción de la fracción membranosas con acetona fría. Después de cromatografiar dicho cit en DEAE-celulosa, se obtiene un cit purificado, el cual no requiere agregado de detergente para permanecer en solución acuosa.

VIII.3.3. Medición de la concentración

La determinación de la concentración de los cit's es bastante compleja, especialmente en mezclas tales como células enteras, fracciones de membrana o en extractos de células libres. Así, encontramos estimaciones sólo aproximadas de los niveles de los cit's en numerosas bacterias (Tabla 8.1.).

Se han desarrollado varios ensayos para establecer la concentración de los cit's presentes en mezclas naturales. Kakuno et al (1971) determinaron las cantidades de cit c₂, c' y de protohemo (cit B) en cromatóforos. El cit c₂ se redujo en forma

selectiva, estimándose su concentración en virtud de su alto potencial rédox y de su espectro distintivo. A partir de las mediciones de la piridina hemocromo alcalina, se obtuvo el hemo c total, el cual dio el contenido del cit c' por diferencia con el cit c₂. La concentración del protohemo se determinó en forma separada.

Weaver (1974) usó una variación de este método donde la medición de las absorbancias del cit c' (reducido menos oxidado) se efectúa en sus puntos isosbéticos. De esta forma se permite la estimación de los cit c' y c₂ en extractos desprovistos de cit B.

Estos métodos simples no son útiles para mezclas complejas de cit c, con espectros y propiedades rédox similares.

Dutton y Jackson (1972) y Dutton y Wilson (1974) intentaron medir la cantidad relativa de cit en fracciones membranosas, en base a cambios en la absorbancia de cada especie postulada mediante titulaciones espectrofotométricas rédox. Para asegurar una buena medición es necesario identificar el cromatóforo responsable del cambio inducido de absorbancia y conocer los coeficientes de extinción para las numerosas especies involucradas.

En principio, cualquier método para determinar la estequiometría entre los electrones necesarios para la titulación de un compuesto rédox y la magnitud de los cambios en la absorbancia del mismo, da como resultado el valor esperado directamente; sin embargo, aún no se han desarrollado técnicas de medición de mezclas complejas.

Dutton et al (1975) midieron la estequiometría de sistemas rédox en los cuales se comparan los cambios relativos de absorbancia debidos a la fotooxidación del cit c₂ añadido en exceso, y del cit c mitocondrial. Si una preparación de centros de reacción oxida cantidades equivalentes de cit, entonces se puede calcular el coeficiente de extinción del cit c₂ en forma relativa al valor conocido del cit c.

VIII.4. Distribución

VIII.4.1. Modelos

En la Tabla 8.1. se encuentra la distribución de los cit's en bacterias fotosintéticas. Es evidente que no existe un modelo fijo en cuanto a la presencia de estas hemo-proteínas en los distintos microorganismos considerados. Se observa que aparecen variaciones aún en cepas de la misma especie; por ejemplo, hay que hacer notar las variedades de cit's encontradas en las distintas cepas de *Rp. palustris*.

Los modelos más simples se encuentran en *Rp. acidophila* y *Rhodcymicrobium vannielii*, donde el único cit soluble es el c_2 y el particulado predominante parece ser el cit C-554; en *Chloroflexus aurantiacus* existe también un único cit fuertemente unido a membrana: el c-554.

El rendimiento de los cit's solubles puede variar en un amplio rango, el cual depende del medio y de la forma de crecimiento, de la edad del cultivo y del método de extracción y purificación aplicado. Así el cit c' no se encuentra presente cuando *Rs. rubrum* (Taniguchi y Kamen, 1965) o *Rp. sphaeroides* (Kikuchi et al, 1965) crecen aeróbicamente. Además, los niveles de los cit's C_2 y c' de *Rp. sphaeroides* se hallan muy disminuidos cuando se limita la cantidad de hierro en el medio de crecimiento mientras que los cit's unidos a membrana parecen estar sólo levemente afectados (Agalidis et al, 1974).

VIII.4.2. Localización

En las Rhodospirillaceae, la mayoría de los cit's B de una cantidad variable de cit C se hallan unidos a membrana. Los cit's fácilmente extraídos parecen estar localizados en el espacio periplasmático celular (Prince et al, 1975, Hochman y Carmeli, 1974).

Por ruptura mecánica de las células bacterianas, se produce un encapsulamiento de por lo menos un tercio de estos cit's periplasmáticos. Dichas vesículas se forman por la liberación de fragmentos producidos durante la ruptura de la membrana.

Dutton et al (1975) sugirieron que los cromatóforos re presentarían una muestra de la asociación de los cit's con sus respectivas membranas naturales.

La mayoría de los cit's c_2 atrapados pueden actuar en reacciones de transferencia electrónica luz inducida, mientras que los cit's c' permanecen inactivos.

Prince et al (1975) postularon que los cit's periplasmáticos ocuparían preferentemente sitios de unión relacionados con compuestos dadores de electrones, por ejemplo NADH-cit c oxido reductasa o el sistema ubiquinona-cit b de transferencia de e lectrones.

Existe una analogía entre las localizaciones del cit c débilmente unido a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna y del cit c_2 en el espacio periplasmático celular.

Es razonable postular entonces que los cit's solubles de las bacterias fotosintéticas se encuentran localizados en el periplasma. Sin embargo, numerosas especies presentan cit's invlucrados en el sistema de transferencia electrónica luz dependiente, los cuales se hallan completamente confinados dentro de la zona hidrofóbica de la membrana. Están incluidos en este último grupo: *Chromatium vinosum*, *Rp. gelatinosa*, *Thiocapsa p^{er}ennigii*, *Rp. viridis* y posiblemente *Chloroflexus aurantiacus* y *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum*.

VIII.5. Propiedades

VIII.5.1. Citocromos solubles

VIII.5.1.1. Cit c_2

El primer cit aislado de bacterias fue el cit c de *Rs. rubrum* (Vernon, 1953), observándose que era diferente ²en numerosos aspectos al cit c mitocondrial (Elsden et al, 1953; Vernon y Kamen, 1954).

Se lo utiliza como modelo debido a que ha sido el más estudiado.

El cit c_2 puede definirse como el cit encontrado en las Rhodospirillaceae, presentando una estructura similar al cit mitocondrial c aunque sus funciones son distintas.

El espectro de estos cit presenta un pico reducido α a 549-552 nm y un pico γ a 416-418 nm. Su potencial redox $E_{m,7}$ oscila entre 290 y 400 mV. $E_{m,pH}$ es el símbolo que indica el potencial medio de óxido-reducción, voltaje al cual el agente de transferencia de electrones ha sido reducido en un 50%. Además, se indica el pH empleado durante la medición.

Con la excepción de *Rs. tenue* y *Rp. gelatinosa* que no poseen cit c_2 , se ha encontrado que este cit es la hemo-proteína soluble más común en las Rhodospirillaceae.

Generalmente, este cit funciona como el principal dador electrónico a los centros de reacción Bcl^+ en células fotosintéticas.

Rhodopseudomonas viridis es una excepción ya que los cit's que participan en las reacciones redox luz dependientes son los $c-557$ y $c-552$ y no el cit c_2 (Olson y Nadler, 1965; Case et al, 1970).

En *Rs. molischianum* existen dos cit's c , los cuales presentan espectros de absorción idénticos pero difieren en sus potenciales redox, en sus puntos isoeléctricos (Dus et al, 1970; Flatmark et al, 1970) y en la secuencia de aminoácidos. En base a estos datos, se designaron a estas proteínas como isocitocromos c_2 I y II (Flatmark et al, 1970) por analogía con el par de cit's c encontrados en *Saccharomyces cerevisiae* (Slonimski et al, 1965). Sería interesante determinar si ambos cit's se encuentran en el espacio periplasmático y si a pesar de la diferencia de aproximadamente 100 mV en E_m , pueden ejercer idénticas funciones y así ser auténticos isocitocromos.

A partir de numerosos datos disponibles se llegó a la conclusión de que los cit's c_2 se dividían en dos subgrupos estructurales. Los cit's c_2 de *Rm. vannielii*, *Rp. viridis* y *Rs. molischianum* son semejantes a los cit's c mitocondriales en cuanto a la longitud de la cadena y al número de residuos invariantes. Para el segundo subgrupo, el cual incluye *Rs. rubrum*, *Rp. palustris*, *Rp. sphaeroides* y *Rp. capsulata* se postuló la existencia de inserciones y deleciones dando entonces origen a citocromos

muy distintos a los mitocondriales.

Se analizó también el perfil de varias reacciones involucrando cit c. Uno de estos estudios comprendía el efecto del pH sobre el potencial rédox. Para los cit's mitocondriales, el E_m es independiente del pH entre los valores 2 y 8-9. Por encima de éste, el E_m disminuye a una velocidad de 60 mV/ unidad de pH (Rodkey y Ball, 1950; Margalit y Schejter, 1973). Así, los autores concluyeron que la ionización de grupos no afecta el potencial rédox en el rango fisiológico de pH. El cit c_2 de *Rhodopseudomonas capsulata* presenta un comportamiento similar (Bartsch, 1978) mientras que el proveniente de *Rs. rubrum* muestra una variación del E_m entre los pH's 4 y 8, hecho que sugiere que la ionización de dos o más grupos afectaría la parte hémica (Kakuno et al, 1973; Wood y Cusanovich, 1975). Saleme et al (1973 b) postularon la existencia de una unión hidrógeno entre el azufre de una metionina ligada al hemo y algún residuo polar ubicado en la superficie de la molécula del cit. Este tipo de unión explicaría la presencia de un mecanismo rédox dependiente de la ionización.

El tipo de estado (libre o unido) que presenta el cit también afecta las propiedades rédox. Así, el cit c_2 de *Rp. capsulata* contenido en una preparación fresca de vesículas membranosas muestra un potencial rédox dependiente del pH entre los valores 6 y 7 siendo independiente del mismo a pH's mayores que 7,5; este comportamiento es completamente diferente al hallado para los cit's solubles (Evans y Crofts, 1974).

VIII.5.1.2. Cit c'

Los cit's c' son predominantemente cit's de alto spin (Maltempo et al, 1974) con su grupo hemo unido covalentemente a la cadena peptídica (Barrett y Kamen, 1961). El modelo de unión hémica es semejante al de los cit's c de bajo spin, hallándose localizado el hemo cerca del carboxilo terminal de la proteína (Ambler, 1973; Meyer et al, 1975) y sugiriéndose que la histidina serviría como un ligando extraplanar.

El espectro de absorción de los cit's c' sufre cambios reversibles al variarse el pH (Horio y Kamen, 1961; Taniguchi y

Kamen, 1963). Algunos solventes orgánicos también producen cambios espectrales similares, por perturbación de las regiones hidrofóbicas de la proteína (Imai et al, 1969).

El espectro de absorción de los cit's c' presenta características que permiten distinguir esta clase de los otros cit's c. En la forma oxidada, aparecen bandas a 490-500 y a 630-650 nm y una banda ancha y cuyo máximo se encuentra a 390-400 nm, característica de los cit's de alto spin. En la forma reducida existe una absorción leve a 550-565 nm, la cual puede originar una confusión con el espectro del cit B, un pico y desdoblado con un máximo cercano a 425 nm y un hombro pronunciado a 430 nm (Figura 8.4.).

La mayoría de los cit's c' se han aislado en forma de dímeros, de pesos moleculares entre 28-30 kdaltons, los cuales pueden ser disociados bajo condiciones desnaturalizantes (Cusanovich, 1971). Sin embargo, se han obtenido formas monoméricas de aproximadamente 13-14 kdaltons, en algunas cepas de *Rp. palustris* (Dus et al, 1967).

Aún no se ha determinado la naturaleza de la unión responsable del carácter dímérico de los cit's c', aunque estas fuerzas no tienen efecto sobre los espectros de absorción.

Debido a numerosas dificultades halladas para la observación de los cit's c' de células intactas o de membranas vesiculares, Weaver (1974) sugirió que los cit's contenidos en los cromatóforos tendrían propiedades espectroscópicas diferentes de aquellos unidos a proteína libre. Así, el ferrocitocromo c' de vesículas de *Rs. rubrum* parece no reaccionar con CO y el espectro de absorción de sus formas reducidas y oxidadas se encuentra efectivamente enmascarado por la mayor absorción de los cit's tipo b (Kakuno et al, 1971).

Estos autores sugirieron que el cit c', estaría involucrado en el sistema de transferencia electrónica de la succínico deshidrogenasa. Sin embargo, Weaver (1974) encontró muy bajos niveles de cit c' en *Rs. rubrum* crecida con succinato como única fuente de carbono.

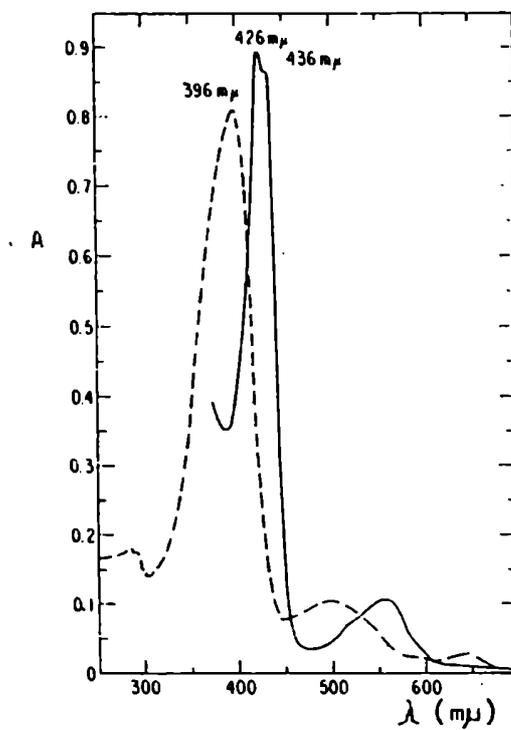


FIGURA 8.4.: Espectro de absorción correspondiente a las formas reducida (—) y oxidada (---) del citocromo c'.

VIII.5.1.3. Cit c-556

Los cit's c-556 característicos de *Rp. palustris* presentan el espectro típico de los cit's c de bajo spin, pero con ambas bandas máximas α y γ trasladadas a longitudes de onda más largas. Aparentemente dan origen a un espectro inestable dado que la banda α del cit c-556 de *Rp. palustris* cambia de 556 a 550 nm.

También en numerosas bacterias fotosintéticas marinas, incluyendo *Rp. sulfidophila*, la hemoproteína soluble predominante es el cit c-556.

VIII.5.1.4. Cit c-554

Estos cit's se han hallado en numerosas especies de *Rhodospseudomonas* aunque en muy pequeñas cantidades. Poseen un peso molecular elevado y se encuentran muy posiblemente en forma polimérica. Su espectro de absorción en *Rp. sphaeroides* y *Rp. palustris* es similar al c-556 de esta última especie, excepto en su pico α (Bartsch, 1978).

VIII.5.1.5. Otras variedades

Existen otros tipos de cit's solubles en bacterias fotosintéticas, como los cit's c_3 , f, c de alto spin, c-551 (Chlorobiaceae) y flavocitocromos c, los cuales no serán tratados en el presente trabajo.

VIII.5.2. Citocromos c unidos a membrana

VIII.5.2.1. Complejo c-556, c-552

Se han encontrado dos tipos de cit's c unidos a membrana, relacionados con la transferencia electrónica luz inducida en *Chr. vinosum* (Parson y Case, 1970), *Rp. gelatinosa* (Dutton, 1971), *Rp. viridis* (Case et al, 1970) y *Thiocapsa pinnigii* (Olson et al, 1969). Son los c-556 y c-552. Estos cit's de alto y bajo potencial se encuentran en una relación aproximada de

7:2 (c-552/c-556) en *Chr. vinosum* (Thornber, 1969). Aparentemente, el cit de alto potencial sería un componente del sistema cíclico de transferencia fotoelectrónica, mientras que el de bajo potencial formaría parte del flujo no cíclico.

VIII.5.3. Citocromo b

VIII.5.3.1. Cit b-558

Este citocromo ha sido aislado de *Rp. sphaeroides* (Orlando y Horio, 1961), *Rs. rubrum* (Bartsch et al, 1971), *Rp. palustris* y *Rs. tenue* (Bartsch, 1978). En todos los casos, el espectro de absorción, el peso molecular y el comportamiento rédox son muy similares a los hallados para el cit soluble b_1 de *Escherichia coli* (Deeb y Hager, 1964). Estos cit's son difíciles de reducir con ditionito de sodio, característica asociada a su naturaleza polimérica. Hasta el presente no se ha podido descubrir el rol funcional del cit soluble b en bacterias fotosintéticas.

VIII.5.3.2. Cit b'

El espectro de absorción de este cit presenta características de alto spin o sea bandas a 500 y 640 nm para la forma férrica y una a 560 nm para el estado ferroso. Además, la absorbancia del ferrocitocromo tiene sólo un 50% de la intensidad del ferricitocromo.

VIII.5.3.3. Citocromo B unido a membrana

En todos los grupos de bacterias fotosintéticas se ha identificado cit's B unidos a membrana. Se ha postulado que este cit B participa en la transferencia cíclica de electrones luz inducida, desde un aceptor secundario tal como la ubiquinona hacia el cit c, dador electrónico inmediato al centro de reacción (Prince y Dutton, 1975; Knaff y Buchanan, 1975).

VIII.5.4. Citocromo oxidasas

Se designa como cit o a los cit's autooxidables presentes en las células que se combinan con CO dando como resultado la formación de un espectro con una banda γ cercana a 415 nm y una α a 560-570 nm.

Cuando las células fotosintéticas crecen aeróbicamente, el nivel basal de este cit se halla incrementado mientras que los niveles del cit c', el cual también reacciona con CO, se encuentran inhibidos (Horio y Taylor, 1965; Sasaki et al, 1970).

En *Rp. sphaeroides* se ha detectado además del cit o una oxidasa. Cuando células de este organismo crecen aeróbicamente, aparece la cit a-a₃ oxidasa la cual dependiendo de las condiciones del cultivo, se expresa sólomente en células en fase logarítmica temprana (Kikuchi et al, 1965) o persiste a lo largo de toda la vida de la bacteria (Saunders y Jones, 1974).

Sasaki et al (1970) purificaron parcialmente una preparación de cit's y encontraron que la oxidasa era 10 veces más activa con el ferrocitocromo c mitocondrial que con los ferrocitocromos c₂ de *Rs. rubrum* y *Rp. sphaeroides*.

En *Rp. capsulata* (Connelly et al, 1973; Marrs y Gest, 1973) y en *Rp. palustris* existen dos caminos oxidativos terminales. Ambos son inhibidos por el ion cianuro aunque el más importante de los dos, no se afecta en presencia de CO. Zannoni et al (1974) concluyeron que esta última vía estaría formada por cit B-oxidasas las cuales difieren de los cit's o.

REFERENCIAS

- Agalidis, I; Jauneau, E. & Reiss-Husson, F. (1974), Eur. J. Biochem. 47, 573.
- Ambler, R.P. (1973), Biochem. J. 135, 751.
- Ambler, R.P. & Wynn, M. (1973), Biochem. J. 131, 485.
- Barrett, J. & Kamen, M.D. (1961), Biochim. Biophys. Acta 50, 573.
- Bartsch, R.G. (1968), Annu. Rev. Microbiol. 22, 181
- Bartsch, R.G. (1971), Methods in Enzymology, Photosynthesis, Part A (A. San Pietro, ed.) pp. 344-363, Academic Press, New York.
- Bartsch, R.G. (1978), The Photosynthetic Bacteria (R.K. Clayton y W.R. Sistrom, ed.), Chapt 13 pp 249-279, Plenum Press, New York.
- Bartsch, R.G.; Kakuno, T.; Horio, T. & Kamen, M.D. (1971), J. Biol. Chem. 246, 4489.
- Case, G.D.; Parson, W.W. & Thornber, J.P. (1970), Biochim. Biophys. Acta 223, 122.
- Chance, B. & Smith, L. (1955), Nature (London) 175, 803.
- Connelly, J.L.; Jones, O.T.G.; Saunders, V.A. & Yates, D.W. (1973), Biochim. Biophys. Acta 292, 644.
- Cusanovich, M.A. (1971), Biochim. Biophys. Acta 236, 238.
- Davenport, H.E. & Hill, R. (1952), Proc. R. Soc. London Ser. B. 139, 327.
- Deeb, S.S. & Hager, L.P. (1964), J. Biol. Chem. 239, 1024.
- Dus, K.; De Klerk, H.; Bartsch, R.G.; Horio, T. & Kamen, M.D. (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 367.
- Dus, K.; Flatmark, T.; De Klerk, H. & Kamen, M.D. (1970), Biochemistry 9, 1984.
- Dutton, P.L. (1971), Biochim. Biophys. Acta 226, 63.
- Dutton, P.L. & Jackson, J.B. (1972), Eur. J. Biochem. 30, 495.
- Dutton, P.L. & Wilson, D.F. (1974), Biochim. Biophys. Acta 346, 165.

- Dutton, P.L.; Petty, K.M.; Bonner, H.S. & Morse, S.F. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 387, 536.
- Duysens, L.N.M. (1954), *Nature (London)* 173, 692.
- Elsdon, S.; Kamen, M.D. & Vernon, L.P. (1953), *J. Am. Chem. Soc.* 75, 6347.
- Evans, E.H. & Crofts, A.R. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 357, 78.
- Falk, J.E. (1964), *Porhyrins and Metalloporhyrins*, p. 204, Elsevier, Amsterdam.
- Flatmark, T.; Dus, K.; De Klerk, H & Kamen, M.D. (1970), *Biochemistry* 9, 1991.
- Florkin, M. & Stotz, E.H. (eds.) (1965), *Comprehensive Biochemistry*, Vol 13, 2nd Ed., Chapt. 5, Elsevier, Amsterdam.
- Hill, R. & Scarisbrick, R. (1951), *New Phytol.* 50, 98.
- Hochman, A. & Carmeli, C. (1974), *Proceeding of the Third International Congress on Photosynthesis (M. Avron, ed.)* pp. 777-789, Elsevier, Amsterdam.
- Horio, T. & Kamen, M.D. (1961), *Biochim. Biophys. Acta* 48, 266.
- Horio, T. & Kamen, M.D. (1970), *Annu. Rev. Microbiol.* 24, 399.
- Horio, T. & Taylor, C.P.S. (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 1772.
- Imai, Y.; Imai, K.; Sato, R. & Horio, T. (1969), *J. Biochem.* 65, 225.
- Kakuno, T.; Bartsch, R.G.; Nishikawa, K. & Horio, T. (1971), *J. Biochem. (Tokyo)* 70, 79.
- Kakuno, T.; Hosoi, K.; Higuti, T. & Horio, T. (1973), *J. Biochem. (Tokyo)* 74, 1193.
- Kamen, M.D. (1973), *Proteins, Nucleic Acids, Enzymes (Tokyo)* 18, 753.
- Kamen, M.D. & Horio, T. (1970), *Annu. Rev. Biochem.* 39, 673.
- Kamen, M.D. & Vernon, L.P. (1954), *J. Bacteriol.* 67, 617.
- Kamen, M.D. & Vernon, L.P. (1955), *Biochim. Biophys. Acta* 17, 10.
- Kamen, M.D.; Dus, K.M.; Flatmark, T. & de Klerk, H. (1972), *Electron and Coupled Energy Transfer in Biological Systems*, Vol. I, Part A (T.E. King y M. Klingenberg, eds), pp. 243-324, Marcel Dekker, New York.

- Kennel, S.J. y Kamen, M.D. (1971 a), *Biochim. Biophys. Acta* 234, 458.
- Kennel, S.J. y Kamen, M.D. (1971 b), *Biochim. Biophys. Acta* 253, 153.
- Kikuchi, G.; Saito, Y. & Motokawa, Y. (1965), *Biochim. Biophys. Acta* 94, 1.
- King, M.T. & Drews, G. (1975), *Arch. Microbiol.* 102, 219.
- Klemme, J.H. & Schlegel, H.G. (1969), *Arch. Mikrobiol.* 68, 326.
- Knaff, D.B. & Buchanan, B.B. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 376, 549.
- Lemberg, M.R. (1969), *Physiol. Rev.* 49, 63.
- Lemberg, R. & Barrett, J. (1973), *Cytochromes*, Academic Press, New York.
- Maltempo, M.M.; Moss, T.H. & Cusanovich, M.A. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 342, 290.
- Margalit, R. & Schejter, A. (1973), *Eur. J. Biochem.* 32, 492.
- Marrs, B. & Gest, H. (1973), *J. Bacteriol.* 114, 1045.
- Meyer, T.E.; Ambler, R.P.; Bartsch, R.G. & Kamen, M.D. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 8416.
- Olson, J.M. & Nadler, K.D. (1965), *Photochem. Photobiol.* 4, 783.
- Olson, J.M.; Carroll, J.W.; Clayton, M.L.; Gardner, G.M.; Linkins, A.E. & Moreth, C.M.C. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 172, 338.
- Orlando, J.A. & Horio, T. (1961), *Biochim. Biophys. Acta* 50, 367.
- Parson, W.W. & Case, G.D. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 205, 232.
- Pettigrew, G.W.; Leaver, J.; Meyer, T.E. & Pyle, A.P. (1975), *Biochem. J.* 147, 291.
- Prince, R.C. & Dutton, P.L. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, 387, 609
- Prince, R.C.; Baccarini-Melandri, A.; Hauska, G.A.; Melandri, B.A. & Crofts, A.R. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 387, 212.

- Reed, D.W. (1969), J. Biol. Chem. 244, 4936.
- Rodkey, F.L. & Ball, E.G. (1950), J. Biol. Chem. 182, 17.
- Salemme, F.R.; Freer, S.T.; Xuong, Ng H.; Alden, R. & Krant, J. (1973 a), J. Biol. Chem. 248, 3910.
- Salemme, F.R.; Krant, J. & Kamen, M.D. (1973 b), J. Biol. Chem. 248, 7701.
- Sasaki, T.; Motokawa, Y. & Kikuchi, G. (1970), Biochim. Biophys. Acta 197, 284.
- Saunders, V.A. & Jones, O.T.G. (1974), Biochim. Biophys. Acta 333, 439.
- Slonimski, P.P.; Acher, R.; Péré, G.; Sels, A. & Somlo, M. (1965), Mécanismes de Regulation des Activités Cellulaires chez les Microorganismes, p. 435, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- Taniguchi, S. & Kamen, M.D. (1963), Biochim. Biophys. Acta 74, 438.
- Taniguchi, S. & Kamen, M.D. (1965), Biochim. Biophys. Acta 96, 395.
- Thornber, J.P. (1969), Biochemistry 9, 2688.
- Vernon, L.P. (1953), Arch. Biochem. Biophys. 43, 492.
- Vernon, L.P. & Kamen, M.D. (1954), J. Biol. Chem. 211, 643.
- Weaver, P. (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 136.
- Weaver, P.F. (1974), Ph. D. Thesis, University of California, San Diego.
- Wood, F.E. & Cusanovich, M.A. (1975), Bioinorg. Chem. 4, 337.
- Yamanaka, T. & Okunuki, K. (1974), Microbial Iron Metabolism (J. Nielsands, ed.), pp 349-400, Academic Press, New York.
- Yu, C.A.; Yu, L. & King, T.G. (1972), J. Biol. Chem. 247, 1012.
- Zannoni, D.; Baccarini-Melandri, A.; Melandri, B.A.; Prince, R.C. & Crofts, A.R. (1974), FEBS lett. 48, 153.

CAPITULO IX

ACIDOS GRASOS Y COMPLEJOS LIPIDICOS

- IX.1. Naturaleza química de los complejos lipídicos y de los ácidos grasos
 - IX.1.1. Complejos lipídicos
 - IX.1.1.1. Fosfolípidos
 - IX.1.1.2. Glicolípidos
 - IX.1.1.3. Lípidos de ornitina
 - IX.1.2. Acidos grasos
- IX.2. Distribución de los complejos lipídicos y comparación con otros grupos fotosintéticos
 - IX.2.1. Métodos de extracción
 - IX.2.2. Complejos lipídicos presentes en *Rp. palustris*
 - IX.2.3. Aspectos comparativos
- IX.3. Distribución de los ácidos grasos y comparación con otros grupos fotosintéticos
 - IX.3.1. Métodos de extracción
 - IX.3.2. Composición de ácidos grasos en *Rp. palustris*
 - IX.3.3. Aspectos comparativos
- IX.4. Biosíntesis de complejos lipídicos en bacterias fotosintéticas
- IX.5. Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias fotosintéticas

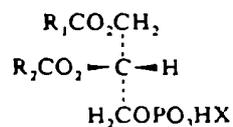
IX. ACIDOS GRASOS Y COMPLEJOS LIPIDICOS

IX.1. Naturaleza química de los complejos lipídicos y de los ácidos grasos

IX.1.1. Complejos lipídicos

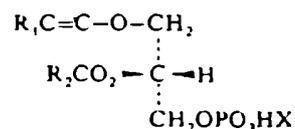
IX.1.1.1. Fosfolípidos

La estructura básica de la mayoría de los fosfolípidos encontrados en las bacterias fotosintéticas está formada por el glicerol-3-fosfato, el cual presenta un grupo -X unido al fosfato y residuos de ácidos grasos esterificados ligados a los carbonos 1 y 2 ($R_1CO_2^-$ y $R_2CO_2^-$):



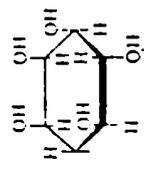
Los principales fosfolípidos hallados en estos microorganismos se encuentran resumidos en la Tabla 9.1.

Los plasmalógenos son otro tipo de fosfolípidos derivados también del glicerol-3-fosfato, en los cuales la posición 1 está sustituida por una cadena alquénil éter:



El resto de la molécula corresponde al descripto para el ácido fosfatídico y sus derivados (Tabla 9.1).

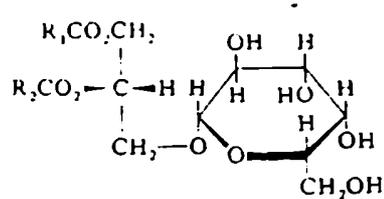
TABLA 9.1.: Fosforilación de bacterias fotosintéticas

ABREVIATURA	NOMBRE COMUN	NOMBRE GENERICO	-X	ESTRUCTURA DE -X
FA	Acido fosfatídico	Acido 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfórico	-H	-H
FG	Fosfatidilglicerol	3-sn-Fosfatidil-1'-sn-glicerol	L-glicerol	$ \begin{array}{c} \text{-CH}_2\text{-} \\ \\ \text{HCOH} \quad 1' \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \quad 2' \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \quad 3' \end{array} $
FE	Fosfatidil-etanolamina	3-sn-Fosfatidil-etanolamina	Etanolamina	-CH ₂ CH ₂ NH ₂
FC	Lecitina, fosfatidilcolina	3-sn-Fosfatidil-colina	Colina	-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₃
FS	Fosfatidilserina	3-sn-Fosfatidilserina	L-Serina	-CH ₂ CH(COO ⁻)NH ₂
CL	Cardiolipina, difosfatidilglicerol	1',3'-Di(3-sn-fosfatidil) glicerol	FG	$ \begin{array}{c} \text{COCOR}_1 \\ \\ \text{COCOR}_2 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-O-CH}_2\text{-} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{O} \end{array} $
FI	Fosfatidilinositol	3-sn-Fosfatidilinositol	Inositol	
bis-FA	bis-Acido fosfatídico	3-sn-Fosfatidil-1'-(2',3'-diacil-sn-glicerol)	2,3-Diacilglicerol	$ \begin{array}{c} \text{-CH}_2\text{-} \\ \\ \text{HCOCOR}_1 \\ \\ \text{H}_2\text{COCOR}_2 \end{array} $

IX.1.1.2. Glicolípidos

Los glicolípidos hallados en bacterias fotosintéticas son glicosildiglicéridos que no contienen fósforo.

a) Monogalactolípidos (Constantopoulos y Bloch, 1967)

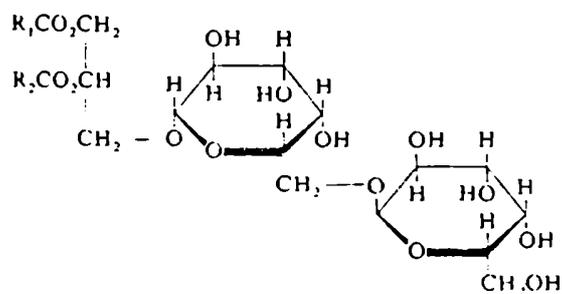


1,2-diacil-glicero-3 β -D-galactopiranosido
(MGDG, glicolípidos I o monogalactosildiglicérido)

b) Glicolípidos II (Constantopoulos y Bloch, 1967)

Este glicolípidos parece estar constituido por una mezcla de derivados diglicéridos que contienen galactosa, ramnosa y p_osiblemente otro hidrato de carbono no polar.

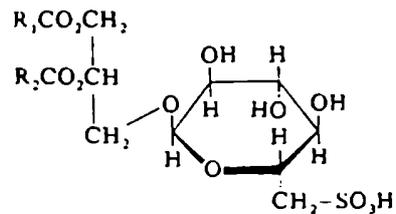
c) Digalactolípidos



1,2-diacil-glicero-3-(β -D-galactopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -D-galac
topiranosido)
(DGDG o digalactosildiglicérido)

Este lípido se ha encontrado en organismos eucarióticos foto sintéticos y en cianobacterias.

d) Sulfolípidos



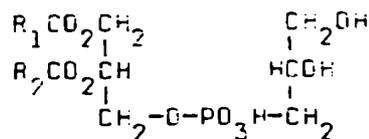
1,2-diacil-glicero-3-(6-sulfo- α -D-quinovopiranosido)
(SQDG)

IX.1.1.3. Lípidos de ornitina

Existen tres tipos de lípidos que contienen ornitina y que se hallan presentes en bacterias fotosintéticas.

a) Ornitina-fosfatidilglicerol (Macfarlane, 1962)

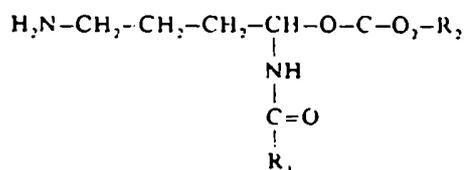
Este es un derivado del fosfatidilglicerol, en el cual la or nitina esterifica uno de los grupos hidroxilos libres del glicerol.



b) Ornitina-amida I (Gorschein, 1968 c)

Esta amida se ha encontrado en *Rp. sphaeroides*.
En este caso, un ácido graso de cadena larga forma una unión amida con el grupo α -amino de la ornitina y un alcohol con

un ciclopropano o un residuo metilo esterifica al carboxilo del aminoácido.

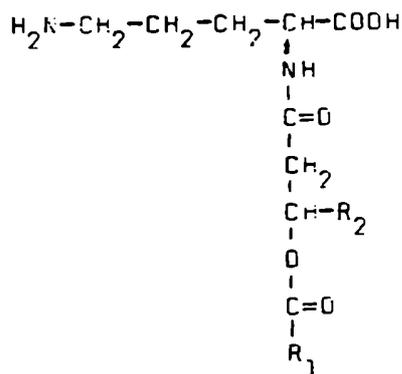


-COR₁: ácido graso

-OR₂: alcohol con un grupo ciclopropano o un residuo metilo

c) Ornitina-amida II (Brooks y Benson, 1972)

El tercer lípido-ornitina, encontrado en *Rs. rubrum*, es también una ornitina-amida, en la cual un ácido graso de cadena larga esterifica un hidroxilo de un 3 hidroxí-ácido graso, que es el que forma una unión amida con el grupo α-amino de la ornitina.



$\text{-O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}_1$: ácido graso de cadena larga

$\text{-O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{R}_2}{\text{CH}}-\text{O}-$: 3 hidroxí-ácido graso

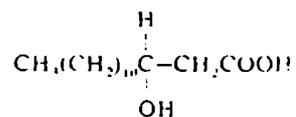
Los lípidos de ornitina poseen grupos amino libres y presentan un comportamiento cromatográfico similar, siendo distinguible el primer tipo descrito, por la presencia o ausencia de fósforo.

IX.1.2. Acidos grasos

La mayoría de los ácidos grasos encontrados en bacterias fotosintéticas poseen cadenas de 14 a 18 átomos de carbono (Tabla 9.2.).

Existen algunos microorganismos fotosintéticos que contienen otros tipos de ácidos grasos:

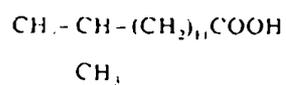
a) Acidos grasos hidroxilados



ácido β-hidroximirístico o ácido 3-hidroxitetradecanoico (14:OH)

En general, se encuentran ácidos grasos hidroxilados cuyas longitudes oscilan entre 10 y 14 átomos de carbono.

b) Acidos grasos de cadenas ramificadas



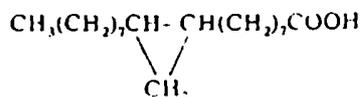
ácido isopentadecílico o ácido 13-metiltetradecanoico (15 br)

Los ácidos grasos de cadenas ramificadas hallados en estos microorganismos poseen 15 o 17 átomos de carbono.

TABLA 9.2.: Principales ácidos grasos en bacterias fotosintéticas

NOMBRE COMUN	NOMBRE SISTEMATICO	FORMULA	ABREVIATURA
Acido mirístico	Acido tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14:0
Acido palmítico	Acido hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0
Acido palmitoleico	Acido 9-hexadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16:1Δ9
Acido cis-vaccénico	Acido cis-11-octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	18:1Δ11
Acido oleico	Acido cis-9-octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1Δ9

c) Ácidos grasos que contienen ciclopropano



ácido lactobacílico o ácido ω -(2-n-octilciclopropil)-octanoico (19 cy)

Estos ácidos grasos que contienen un ciclopropano en su estructura tienen una cadena formada por 16, 18 o 20 átomos de carbono.

IX.2. Distribución de los complejos lipídicos y comparación con otros grupos fotosintéticos

IX.2.1. Métodos de extracción

Los lípidos presentes en las bacterias pueden dividirse en dos fracciones, según puedan o no ser extraídos con solventes lipídicos tales como cloroformo:metanol (2:1, v/v) sin tratamiento químico previo de las células.

Los lípidos extraíbles de las bacterias Gram-negativas provienen de la membrana y pared celulares y de las membranas intracitoplasmáticas.

Los lípidos no extraíbles se liberan del residuo remanente por tratamiento con ácidos o álcalis y posterior extracción con solventes lipídicos.

Si las células son pretratadas con ácidos o álcalis previamente a la primera extracción, se obtienen ambos tipos de lípidos.

La extracción con la mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v) y mediante el método de Bligh-Dyer (1959) produce los mayores rendimientos.

IX.2.2. Complejos lipídicos presentes en *Rp. palustris*

Wood et al (1965), Nichols y James (1965) y James y Nichols (1966) encontraron lecitina, fosfatidil-glicerol, fosfatidiletanolamina, cardiolipina y trazas de un lípido-ornitina en *Rp. palustris*.

Constantopoulos y Bloch (1967) confirmaron la ausencia de los glicolípidos MGDG y DGDG además del sulfolípidos SQDG.

Aaronson (1964) utilizó dos inhibidores, benzmalecena y triparanol, para determinar qué esteroides se hallaban presentes en este microorganismo. Teniendo en cuenta que el ergosterol, el escualeno y el ácido oleico anulan la inhibición del crecimiento en *Rp. palustris* producida por cada uno de los inhibidores a una cierta concentración, Aaronson dedujo que probablemente en estos microorganismos existían esteroides. Sin embargo, el autor no descarta la posibilidad de que estos inhibidores puedan actuar de alguna otra forma, posiblemente a nivel de membrana, acción revertida bajo condiciones apropiadas por el ácido oleico y los esteroides.

Jensen (1962) aisló un triterpeno (paluol) de una fracción no saponificable de dos cepas de *Rp. palustris*. Dado que éste es el único trabajo acerca de la existencia de triterpenos en estos microorganismos, su significado aún se desconoce.

IX.2.3. Aspectos comparativos.

Comparando la composición lipídica de las bacterias fotosintéticas entre sí, con otros grupos de organismos fotosintéticos y con otras bacterias, se revela que ciertos lípidos poseen un significado particular taxonómico y/o evolutivo (Tabla 9.3.).

Se ha encontrado fosfatidilglicerol (FG) en todos los organismos fotosintéticos estudiados hasta la fecha. El FG y a veces su derivado, la cardiolipina (CL) parecen ser los únicos fosfolípidos de mayor importancia cuantitativa en cianobacterias (Nichols et al, 1965) y en Chlorobiaceae.

Sin embargo, en todas las bacterias fotosintéticas, excepto Chlorobiaceae y *Chloroflexus*, en los organismos eucarióti

TABLA 9.3.: Complejos lipídicos en organismos fotosintéticos representativos

ORGANISMO		LIPIDO ^a									
Grupo	Género y especies	FC	FG	FI	FE	CL	Lípido ornitina	MGDG	Glycolípido	DGDG	SQDG
Plantas superiores	<i>Spinacea oleracea</i>	+	+	+	+			+	-	+	+
Algas verdes	<i>Chlorella vulgaris</i>	+	+	+	+			+	-	+	+
Euglena	<i>Euglena gracilis</i>	+	+	+	+	-		+	-	+	+
Algas rojas	<i>Porphyra umbilicalis</i>	+	+	+	+			+	-	+	+
Algas amarillas	<i>Monodus subterraneus</i>	+	+	+	+	Tr		+	-	+	+
Diatomeas marinas	<i>Nitzschia fraxinella</i>	+	+	+	Tr	Tr		+	-	+	+
Diatomeas	<i>Navicula pellucida</i>	+	+	-	-			+	-	+	-
Cianobacterias	<i>Synechococcus</i> sp.	-	+	-	-			+	-	+	-
BACTERIAS FOTOSINTEITICAS											
Rhodospirillaceae	<i>Rh. rubrum</i>	+	+	-?	+	+		Tr?		-	-
	<i>Rh. molischianum</i>	+	+	-	+	+		-		-	-
	<i>Rp. palustris</i>	+	+	-	+	+		-		-	-
	<i>Rp. viridis</i>	-	+	-	+	-		-		-	-
	<i>Rp. gelatinosa</i>	+	+	-	+	-		-		-	-
	<i>Rp. capsulata</i>	+	+	-	+	+		-		-	-
	<i>Rp. sphaeroides</i>	+	+	+	+	+		-		-	-
	<i>Rm. vannielii</i>	+	+	+	+	+		-		-	-
Chromatiaceae	<i>Chl. vinosum</i>	+	+	+	+	+		+		b	
	<i>T. roseopersicina</i>	+	+	+	+	+		+		b	
	<i>E. halophila</i>	+	+	+	+	+		+		+	
Chlorobiaceae	<i>Chl. limicola</i>	+	+	-	-	+		+		+	+
	<i>Chl. limicola</i>	+	+	-	-	+		+		+	+
	<i>Chl. thiosulfatophilum</i>	+	+	-	-	+		+		+	+
	<i>Chl. vibrioforme</i>	+	+	-	-	+		+		+	+
	<i>Chl. vibrioforme</i>	+	+	-	-	+		+		+	+
	<i>Chl. thiosulfatophilum</i>	+	+	-	-	+		+		+	+
	<i>Chl. phaeovibrioideis</i>	+	+	-	-	+		+		+	+
	<i>P. luteolum</i>	+	+	-	-	+		+		+	+
Chloroflexaceae	<i>C. aurantiacus</i>	+	+	+	-	+		+		+	+

(a): (+) presente; (-) ausente; (en blanco) no reportado. (b) No galactolípidos. (c) Galactosa y otro azúcar presente. (Tr) trazas.

cos fotosintéticos, salvo las algas rojas y las diatomeas, y en casi todas las bacterias Gram-negativas (Ikawa, 1967; Goldfine, 1972; Oliver y Colwell, 1973) la fosfatidil-etanolamina (FE) es el componente presente en mayor proporción de la fracción lipídica.

Esto implicaría que *Chloroflexus* y las Chlorobiaceae se hallan más íntimamente relacionadas entre sí y con las cianobacterias que con el resto de los grupos mencionados.

La lecitina o fosfatidilcolina (FC) se encuentra aparentemente en la mayoría de las Rhodospirillaceae, con la excepción de *Rs. rubrum* y *Rp. gelatinosa*, no habiendo informes acerca de su existencia en Chromatiaceae, Chlorobiaceae y *Chloroflexus*. Generalmente, este lípido es el mayor componente de las membranas de los organismos superiores, no hallándose presente en cianobacterias.

El hallazgo de fosfatidilinositol (FI) en *Chloroflexus* es de particular interés, pues este lípido es característico de células eucariotas y de algunas bacterias Gram-positivas (Goldfine, 1972). Sólo existen otros dos trabajos acerca de la presencia de FI en bacterias fotosintéticas, específicamente en *Rs. rubrum* (Benson et al, 1959; Benson y Strickland, 1960). Sin embargo, el significado de estos estudios es aún poco claro.

Otro punto sumamente atractivo es la ausencia de plasmalógenos en las bacterias fotosintéticas. Goldfine (1972) y Kamio et al (1969) enfatizaron el hecho de que estos compuestos se hallaron en organismos anaeróbicos estrictos y no en facultativos. Sin embargo, hasta el momento, no se han encontrado plasmalógenos en bacterias fotosintéticas estrictamente anaeróbicas.

En cuanto a los glicolípidos, también es significativa su distribución. En *Rp. palustris* se han hallado sólo trazas de MGDG. El resto de las Rhodospirillaceae no contiene glicolípidos, excepto el SQDG encontrado solamente en *Rp. sphaeroides*. En contraste, estos compuestos están presentes en *Chr. vinosum* y *Thiocapsa roseopersicina* pero no son del tipo de los hallados en plantas y bacterias verdes.

La identificación de MGDG en Chlorobiaceae y en *Chloroflexus* sugiere nuevamente que esta última está íntimamente relacionada con las cianobacterias y los organismos fotosintéticos eucariotas, todos los cuales contienen MGDG, DGDG y SQDG.

El glicolípido II es un componente de la membrana celular de *Chl. limicola*. Aparentemente, los glicolípidos que no contienen galactosa, en las Chromatiaceae, estarían asociados con las membranas no adaptadas específicamente para la fotosíntesis.

Existen pocos estudios que relacionan las condiciones de crecimiento con la composición de los fosfolípidos.

Diferentes grupos de laboratorio no siempre están de acuerdo con los efectos obtenidos con distintas condiciones de crecimiento. Se ha observado que no son fosfolípidos esenciales específicos para la función de los centros de reacción (Jolchine y Reiss-Husson, 1975), sin embargo se ha establecido que la diferenciación entre las especies involucra diferenciación entre los lípidos.

Klemme et al (1971) hallaron que la fosfolipasa A interrumpía la fotofosforilación y que la presencia de fosfolípidos restauraba este proceso.

Haverkate et al (1965) informaron que había más PC y menos CL en *Rs. rubrum* crecida aeróbicamente en la oscuridad, que en las células desarrolladas anaeróbicamente a la luz. Se observaron resultados similares en *Rp. capsulata* mientras que en varias cepas de *Rp. sphaeroides* no hubo variaciones existiendo sin embargo, dos cepas con datos discrepantes.

Así, parecería que de existir una diferenciación de la membrana respecto a la síntesis de Bcl, como respuesta al contenido de O₂ en el medio y a la luz, esto no implicaría una diferenciación de la membrana en cuanto a la composición de los lípidos.

La presencia de extracto de levadura en el medio de crecimiento produce un aumento en el contenido de Bcl en *Rp. viridis* no existiendo diferenciación en la composición de lípidos.

Todos estos resultados sugerirían que las discrepancias entre los grupos en cuanto a la composición lipídica, no se deben a los diferentes medios de crecimiento empleados sino al uso de cepas y métodos de análisis distintos.

Con respecto a la distribución de los lípidos en las fracciones subcelulares, Gorschein (1964, 1968 b) encontró una composición lipídica similar en las mismas excepto en la pared

celular. Se obtuvieron resultados semejantes comparando la composición en cromatóforos con la de las células enteras en *Chr. vinosum* y *Thiocapsa roseopersicina*.

IX.3. Distribución de los ácidos grasos y comparación con otros grupos fotosintéticos

IX.3.1. Métodos de extracción

Los ácidos grasos se obtienen generalmente a partir de la saponificación de los lípidos extraídos de la célula entera o de alguna fracción en particular. Posteriormente se metilan y los ésteres resultantes se separan por cromatografía gas-líquido (GLC). Hay que enfatizar aquí que no es suficiente el dato del tiempo de retención en una columna de GLC para identificar un ácido graso. Sin embargo, no discutiremos estos métodos en el presente trabajo.

IX.3.2. Composición de ácidos grasos en *Rp. palustris*

Wood et al (1965) y Constantopoulos y Bloch (1967) analizaron los ácidos grasos presentes en *Rp. palustris*.

Ambos grupos encontraron que el ácido graso que se hallaba en mayor cantidad correspondía al 18:1; sin embargo, en condiciones anaeróbicas de crecimiento aparecía el 18:0 en cantidades significativas.

Weckesser et al (1973) analizaron los ácidos grasos presentes en los lipopolisacáridos (LPS) de 12 cepas de *Rp. palustris*. Como los extractos fenólicos conteniendo LPS no pudieron purificarse completamente de los fosfolípidos contaminantes, no se pudo determinar con precisión la cantidad de ácidos grasos atribuibles a los LPS y a los fosfolípidos.

Sin embargo, en todas las cepas estudiadas, la composición de los ácidos grasos era prácticamente idéntica, con la excepción del contenido de los 18:0 y 18:1, los cuales variaban en un 0-9% del peso seco de los LPS. Así como en *Rs. rubrum*, esta especie también contiene mayor proporción de ácidos grasos saturados en los LPS que en los lípidos extraídos, siendo la

fracción 14:0H la más importante.

Los ácidos grasos son generalmente liberados de los LPS por tratamiento con HCl, efectuándose una metilación posterior con HCl-metanol.

IX.3.3. Aspectos comparativos

Las bacterias fotosintéticas constituyen un grupo único en cuanto a su carencia de ácidos grasos poli-no saturados 18 ó 20 átomos de carbono y del ácido trans-3-hexadecenoico (16:1 Δ 3 trans) característicos de los organismos eucariotas fotosintéticos.

Las bacterias fotosintéticas comparten la carencia de ácidos poli-no saturados con ciertos grupos de cianobacterias (la mayoría unicelulares) y con el resto de las bacterias, mientras que en todas las cianobacterias estudiadas el trans-3-hexadecenoato está ausente (Kenyon, 1972; Nichols, 1973).

Los únicos casos en los cuales se ha informado de la existencia de ácidos grasos 18:2 en bacterias fotosintéticas corresponden a células crecidas en presencia de extracto de levadura, que posee estos compuestos en su composición.

El significado funcional de esta división entre los organismos fotosintéticos aún no está aclarado, dado que aquellas cianobacterias que carecen de ácidos grasos poli-no saturados son capaces de efectuar la reacción de Hill como todos los organismos fotosintéticos altamente evolucionados.

En cuanto al significado evolutivo, parece ser que los organismos más primitivos, bacterias fotosintéticas y cianobacterias, carecen de ácidos grasos poli-no saturados.

Los ácidos grasos conteniendo un grupo ciclopropano no son comunes entre las bacterias fotosintéticas y no han sido encontrados ni en *Rs. rubrum* ni en *Rm. vannielii*, como tampoco en *Chloroflexus aurantiacus*. Goldfine (1972) enfatizó que estos compuestos son característicos de las bacterias Gram-negativas pertenecientes al orden Eubacteriales. Sin embargo, se halló 19cy como componente de los ácidos grasos de *Ectothiorhodospira halophila*.

En la Tabla 9.4. se hallan los datos correspondientes a los ácidos grasos presentes en los distintos grupos. Las Chlorobiaceae se distinguen por la presencia de 14:0 en mayor proporción. Para las Rhodospirillaceae y Chromatiaceae el predominio se encuentra en el 18:1. *Chloroflexus* es más similar en ciertas propiedades (cantidades bajas de 14:0 y 16:1 y elevadas de 18:0 y 18:1) a las Rhodospirillaceae que a las Chlorobiaceae (Pier-son y Castenholz, 1974; Kenyon y Gray, 1974).

La composición de los ácidos grasos es frecuentemente útil para clasificar un organismo desconocido, cuando dicha composición para ciertos grupos es suficientemente distintiva.

Oelze y Drews (1972) discutieron ciertos aspectos del sig-nificado funcional de la composición de los ácidos grasos, enfa-tizando nuevamente su utilidad en determinaciones taxonómicas. Sin embargo, la composición diferente hallada en ciertos orga-nismos de metabolismo y estructuras similares, llevaron a la conclusión de que existía una variedad de ácidos grasos que en combinación, producían un estado físico de la membrana, que fa-cilitaba una dada secuencia de reacciones.

Wood et al (1965) encontraron que el contenido celular de ácidos grasos saturados decrecía generalmente, en células crecidas aeróbicamente y en oscuridad, en comparación con las anaeróbicas desarrolladas a la luz, para *Rs. rubrum*, *Rp. palus-tris* y *Rp. gelatinosa*.

Cuando *Rp. viridis* crece en presencia de extracto de le-vadura, aumenta el contenido lipídico de 16:1 en la membrana, sugiriéndose que las variaciones en la composición de ácidos gra-sos no estarían controladas por el mismo mecanismo que el de la síntesis de Bcl.

IX.4. Biosíntesis de complejos lipídicos en bacterias fotosin-téticas

El camino utilizado por la mayoría de las bacterias para biosintetizar fosfo y glicolípidos ha sido ampliamente estudia-do (Goldfine, 1972; Lennarz, 1966).

Sin embargo, es poco lo que se conoce en cuanto a la biosíntesis de lípidos en bacterias fotosintéticas. Algunos

TABLA 9.4.: Cantidades relativas de ácidos grasos saturados e insaturados encontrados en células enteras de bacterias fotosintéticas crecidas a la luz en condiciones anaeróbicas

ORGANISMO	ACIDO GRASO *					
	14:0	16:0	18:0	16:1	18:1	
Rhodospirillaceae						
<i>Rs. rubrum</i>	+	++	+	+++	+++	+++
<i>Rs. molischanum</i>	+	+++	++	+++	+++	+++
<i>Rp. palustris</i>	+	++	+	+	+	+
<i>Rp. gelatinosa</i>	+	+++	+	+++	+++	+++
<i>Rp. capsulata</i>	+	+	+	+	+	+++
<i>Rp. sphaeroides</i>	+	++	++	+	+	+++
<i>Rm. vannielii</i>	+	++	+	+	+	+++
Chromatiaceae						
<i>Chr. vinosum</i>	+	+++	+	+++	+++	+++
<i>T. roseopersicina</i>	+	+++	+	+++	+++	+++
<i>E. halophila</i>		++	++	+		+++
Chlorobiaceae						
<i>Chl. limicola</i>	++	++	+	+++	+++	+
<i>Chl. limicola</i> f. <i>thiosulfatophilum</i>	+++	++	+	+++	+++	+
<i>Chl. vibrioforme</i> f. <i>thiosulfatophilum</i>	++	+++	+	+++	+++	+
<i>Chl. phaeobacteroides</i>	++	++	+	+++	+++	+
<i>Chl. phaeovibroides</i>	++	+++	+	+++	+++	+
<i>P. luteolum</i>	++	+++	+	+++	+++	+
Chloroflexaceae						
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	+	++	++	+	+	+++
J-10-fl.	+	++	++	+	+	+++
OK-70-fl.	+	++	+++	+	+	+++
OH-64-fl.	+	++	+++	+	+	+++

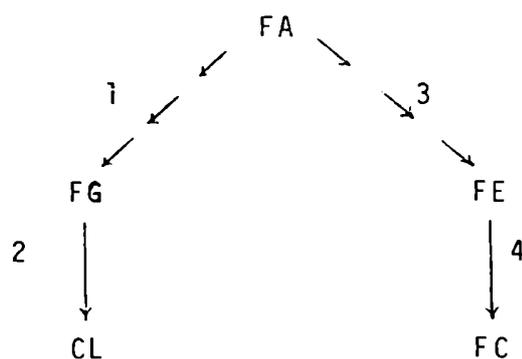
(*) (+) 5% o menos; (++) 6-20%; (+++) más del 20%

grupos estudiaron la formación de la membrana fotosintética y la síntesis de lípidos *in vivo* en especies de Rhodospirillaceae, existiendo hasta ahora un solo trabajo acerca de estudios *in vitro* (Lueking y Goldfine, 1975).

Las Rhodospirillaceae, debido a su adaptación al crecimiento anaeróbico, a la luz y al aeróbico, en oscuridad, son excelentes fuentes para el estudio de la formación de la membrana fotosintética y de los cambios en la composición de los fosfolípidos y en los pigmentos durante el transcurso de alta a baja aereación o de oscuridad a luz.

Lascelles y Szilagyi (1965) y Gorschein (1968 b) usaron fosfolípidos y pigmentos como trazadores en la formación de cromatóforos en *Rp. sphaeroides*. Ambos grupos de trabajo hallaron que la cantidad relativa de fosfolípidos era constante con baja o alta aereación, indicando que las membranas de los cromatóforos no se hallaban diferenciadas respecto a la membrana celular.

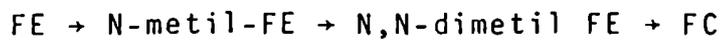
Los resultados obtenidos por distintos autores pueden interpretarse sobre la base de los siguientes caminos:



Esquema 1

Aparentemente existen cuatro sitios de control posibles por la intensidad luminosa, la aereación y la composición del medio. Durante la síntesis de la membrana fotosintética en *Rp. capsulata* se hallan estimuladas las reacciones 1 y 3 pero no la 4. En *Rp. viridis*, la presencia del extracto de levadura, afecta positivamente la síntesis de β cl y de FE (reacción 3). La síntesis de lípidos-ornitina también se halla estimulada bajo estas condiciones. Las reacciones 1, 2 y 4 proceden a la misma velocidad relativa, en estas especies, crecidas en ausencia o presencia de extracto de levadura.

Gorschein et al (1968 a) informaron que el camino para la síntesis de FC en *Rp. sphaeroides* es el siguiente:



La actividad metilante *in vitro* se hallaba asociada a material particulado de células crecidas aeróbica o anaeróbicamente pero no específicamente con los cromatóforos.

IX.5. Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias fotosintéticas

La biosíntesis de ácidos grasos en bacterias procede como en los organismos superiores, por adición sucesiva de unidades de 2 carbonos a una cadena hidrocarbonada. En este camino participan proteínas transportadoras de grupos acilos (ACP).

Según lo esperado, las bacterias fotosintéticas utilizarían el camino anaeróbico para la síntesis de los ácidos grasos no saturados. Esta hipótesis se ha confirmado recientemente aunque no ha sido demostrada la presencia de ACP libres.

El camino anaeróbico es la ruta usada para la síntesis de los ácidos grasos no saturados, en todas las bacterias estudiadas por Wood et al (1965): *Rp. sphaeroides*, *Rp. capsulata*, *Rp. palustris*, *Rp. gelatinosa* y *Rs. rubrum*, dado que 16:1, 19 y 18:1, Δ11 son los únicos monoenos o los de mayor proporción hallados.

Existen pocas evidencias concluyentes acerca del control sobre la naturaleza y cantidad total de ácidos grasos sintetizados en bacterias fotosintéticas. Como ya se ha mencionado, en algunas de estas bacterias la naturaleza de los ácidos grasos varía como respuesta a cambios de condiciones anaeróbicas a la luz a condiciones aeróbicas en oscuridad. Aún se desconoce el mecanismo de este control.

En cuanto a la regulación de la longitud de los ácidos grasos sintetizados, poco se ha estudiado al respecto. Mindich (1972, 1973) demostró que *Rp. capsulata* crecida auxotróficamente en glicerol, no acumulaba ácidos grasos libres durante la privación de dicho compuesto. Así, o la síntesis de ácidos grasos se halla reducida cuando no hay formación de lípidos o los

ácidos grasos se incorporan en los lípidos. Oelse y Drews (1969) sugirieron que la última hipótesis sería válida parcialmente para *Rs. rubrum*, en la cual existen más ácidos grasos de pared celular en células crecidas en oscuridad que en las desarrolladas a la luz.

REFERENCIAS

- Aaronson, S. (1964), J. Gen. Microbiol. 37, 225.
- Benson, A.A. & Strickland, E.H. (1960), Biochim. Biophys. Acta 41, 328.
- Benson, A.A.; Wintermans, J. F. G. M. & Wiser, R. (1959), Plant Physiol. 34, 315
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959), Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911.
- Brooks, J.L. & Benson, A.A. (1972), Arch. Biochem. Biophys. 152, 347.
- Constantopoulos, G. & Bloch, K. (1967), J. Bacteriol. 93, 1788.
- Goldfine, H. (1972), Adv. Microb. Physiol. 8, 1.
- Gorschein, A. (1964), Biochim. Biophys. Acta 84, 356.
- Gorschein, A. (1968 a), Proc. R. Soc. London Ser. B. 170, 265.
- Gorschein, A. (1968 b), Proc. R. Soc. London Ser. B. 170, 279.
- Gorschein, A. (1968 c), Biochim. Biophys. Acta 152, 358.
- Gorschein, A.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1968), Proc. R. Soc. London Ser. B. 170, 299.
- Haverkate, F.; Teulings, F.A.G. & van Deenen, L.L.M. (1965), K. Ned. Acad. Wet. Proc. Ser. B. 68, 154.
- Ikawa, M. (1967), Bacteriol. Rev. 31, 54.
- James, A.T. & Nichols, B.W. (1966), Nature (London) 210, 372.
- Jensen, S.L. (1962), K. Nor. Vidensk. Selsk. Skr. No.8, p 1.
- Jolchine, G. & Reiss-Husson, F. (1975), FEBS lett. 52, 33.
- Kamio, Y.; Kanegasaki, S. & Takahashi, H. (1969) J. Gen Appl. Microbiol. 15, 439.
- Kenyon, C.N. (1972), J. Bacteriol. 109, 827.
- Kenyon, C.N. & Gray, A.M. (1974), J. Bacteriol. 120, 131.
- Klemme, B.; Klemme, J.H. & San Pietro, A. (1971), Arch. Biochem. Biophys. 144, 339.
- Lascelles, J. & Szilagyi, J.F. (1965), J. Gen. Microbiol. 38, 55.

- Lennarz, W.J. (1966), *Adv. Lipid Res.* 4, 175.
- Lueking, D.R. & Goldfine, H. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 853.
- Macfarlane, M.G. (1962), *Nature (London)* 196, 136.
- Mindich, L. (1972), *J. Bacteriol.* 110, 96.
- Mindich, L. (1973), *Bacterial Membranes and Walls* (L. Leive, ed.), pp. 1-36, Marcel Dekker, New York.
- Nichols, B.W. (1973), *The Biology of Blue-Green Algae* (N. G. Carr y B.A. Whitton, eds.), pp. 144-161, University of California Press, Berkeley y Los Angeles.
- Nichols, B.W. & James, A.T. (1965), *Biochem. J.* 94, 22P.
- Nichols, B.W.; Harris, R.V. & James, A.T. (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20, 256.
- Oelze, J. & Drews, G. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 173, 448.
- Oelze, J. & Drews, G. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 265, 209.
- Oliver, J.D. & Colwell, R.R. (1973), *J. Bacteriol.* 114, 897.
- Pierson, B.K. & Castenholz, R.W. (1974), *Arch. Microbiol.* 100, 5.
- Weckesser, J.; Drews, G.; Fromme, I. & Mayer, H. (1973), *Arch. Mikrobiol.* 92, 123.
- Wood, B.J.B.; Nichols, B.W. & James, A.T. (1965), *Biochim. Biophys. Acta* 106, 261.

METABOLISMO

CAPITULO X

METABOLISMO DE MATERIALES DE RESERVA

X.1. Introducción

X.2. Glicógeno

X.2.1. Consideraciones generales

X.2.2. Estructura

X.2.3. Biosíntesis

X.2.4. Degradación

X.3. Poli- β -hidroxibutirato (PHB)

X.3.1. Consideraciones generales

X.3.2. Estructura química y composición de los gránulos

X.3.3. Biosíntesis

X.3.4. Degradación

X.4. Polifosfatos (poli-P)

X.4.1. Consideraciones generales

X.4.2. Estructura química y composición de los gránulos

X.4.3. Biosíntesis

X.4.4. Degradación

X.4.5. Acumulación y utilización

PARTE 5: METABOLISMO

X. METABOLISMO DE MATERIALES DE RESERVA

X.1. Introducción

El glicógeno, el poli- β -hidroxibutirato (PHB) y los polifosfatos constituyen los materiales de reserva más comunes en células procariotas. Existen organismos que pueden acumular más de un tipo de compuesto, por ejemplo glicógeno y PHB (*Rhodospirillum rubrum*) (Stanier et al, 1959) o glicógeno y polifosfatos (*E. coli*) (Holme y Palmstierna, 1956).

Generalmente, estas sustancias de reserva se sintetizan durante el crecimiento exponencial, alcanzando niveles máximos en la fase estacionaria temprana. En condiciones de privación o durante la fase estacionaria tardía, sus niveles decrecen en forma considerable.

Existen numerosos trabajos sobre este tema, siendo los más importantes los de Krebs y Preiss (1975), Shively (1974), Dawes y Senior (1973), Preiss (1969), Doudoroff (1966) y Harold (1966).

X.2. Glicógeno

X.2.1. Consideraciones generales

La acumulación de glicógeno en células bacterianas se observa generalmente cuando el crecimiento ocurre en presencia de un exceso de fuente exógena de carbono.

Rhodopseudomonas capsulata sintetiza glicógeno en luz y oscuridad, formándose niveles mayores en luz y durante el crecimiento en fase exponencial (Eidels y Preiss, 1970).

Los factores ambientales juegan un rol preponderante en la determinación del tipo de material de reserva que se acumula en organismos capaces de almacenar distintos compuestos.

Rhodospirillum rubrum puede acumular tanto glicógeno como PHB. Stanier et al (1959) demostraron que la naturaleza de la

fuelle de carbono empleada durante el crecimiento celular, inflúa sobre el tipo de material de reserva almacenado. Así, los sustratos que originan acetil-CoA sin la formación intermedia-ria de piruvato, producen predominantemente PHB, mientras que los que dan lugar a la aparición de piruvato, llevan a la acumulación de glicógeno.

La capacidad para acumular glicógeno permite mantener la integridad celular y la viabilidad bajo condiciones de privación. Así, por ejemplo el glicógeno bacteriano es utilizado por la célula como fuente de obtención de energía. Esta energía se requiere para numerosos procesos tales como el turnover del RNA y de las proteínas, la motilidad, la regulación osmótica, el mantenimiento del pH intracelular, etc., durante los estadios de privación.

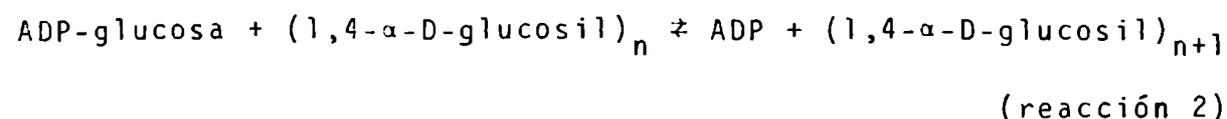
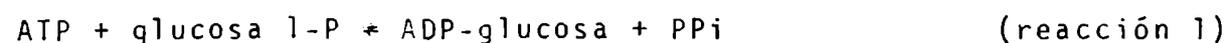
X.2.2. Estructura

La estructura del glicógeno bacteriano es semejante al encontrado en células eucarióticas. Está formado por residuos D-glucosa unidos por uniones α -1,4-glucosídicas; las ramificaciones ocurren a través de uniones α -1,6-glucosídicas.

Se han observado gránulos de glicógeno depositados en una gran variedad de bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas (Hara et al, 1973; Cohen-Bazire y Kunisawa, 1963; Wolk, 1973). Su tamaño varía entre 50 y 150 nm y no poseen membrana limitante que los rodee.

X.2.3. Biosíntesis

Se ha establecido que el ADP-glucosa es el dador de grupos glucosilos para la síntesis de glicógeno en procariotas. Las reacciones involucradas en la biosíntesis de ADP-glucosa y de glicógeno, descritas por Krebs y Preiss (1975) y Greenberg y Preiss (1965), son las siguientes:



catalizadas por la ADP-glucosa-pirofosforilasa y la glicógeno 4- α -glucosil transferasa o glicógeno sintetasa, respectivamente.

En la biosíntesis de almidón en plantas, también se utiliza al ADP-glucosa como dador de grupos glucosilos (Recondo y Leloir, 1961). Sin embargo, en eucariotas la biosíntesis de glicógeno ocurre vía UDP-glucosa.

Como ya se mencionó, el glicógeno se acumula en condiciones "no balanceadas" de crecimiento, donde existe un suministro limitado de nutrientes y un exceso de fuente de carbono. Así, numerosas bacterias almacenan glicógeno durante la fase estacionaria de desarrollo. Preiss (1969) demostró que ambas enzimas: la ADP-glucosa pirofosforilasa y la glicógeno sintetasa se hallaban de-reprimidas al finalizar la etapa exponencial.

En *Chr. vinosum* la acumulación de glicógeno durante las fases logarítmica tardía y estacionaria sigue un modelo similar al observado en otras bacterias (Hara et al, 1973). En cambio, en *Rhodopseudomonas capsulata*, la acumulación de glicógeno y las actividades de la ADP-glucosa pirofosforilasa y de la glicógeno sintetasa son máximas durante la fase logarítmica tanto para las células crecidas a la luz como para las desarrolladas en oscuridad.

La síntesis de glicógeno en bacterias se halla regulada aparentemente a nivel de la síntesis de ADP-glucosa (Krebs y Preiss, 1975). La ADP-glucosa constituye un precursor en este camino, siendo su formación el primer paso específico en la biosíntesis de glicógeno en procariotas. La regulación alostérica ejercida sobre la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa tiene como finalidad mantener la concentración óptima de ATP, requerida para la síntesis de la ADP-glucosa.

El AMP, ADP y Pi inhiben a la ADP-glucosa pirofosforilasa mientras que los intermediarios glicolíticos la activan. Un nivel energético elevado (altos niveles de ATP en relación a los adenin nucleótidos totales) favorece la síntesis de glicógeno.

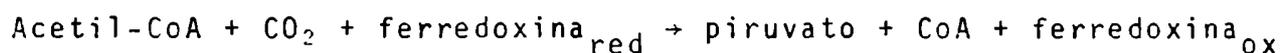
Krebs y Preiss (1975) y Preiss (1969) postularon la existencia de una relación entre los efectores que activan la ADP-glucosa pirofosforilasa y el metabolismo de los compuestos carbonados. Así *Rhodospirillum rubrum*, organismo que crece en pre

sencia de numerosos ácidos orgánicos, en luz u oscuridad, contiene una ADP-glucosa pirofosforilasa que es activada sólo por piruvato (Furlong y Preiss, 1969), independientemente de las condiciones de crecimiento.

En *Rp. capsulata* la ADP-glucosa pirofosforilasa es activada por piruvato y por fructosa 6-P; esto refleja la capacidad de este organismo de crecer con glucosa o con los intermediarios del ciclo de Krebs.

Stanier et al (1959) demostraron que determinados compuestos como succinato, malato o piruvato eran asimilados a glicógeno en células de *Rs. rubrum*, incubadas a la luz. Mediante el empleo de succinato marcado, estos autores concluyeron que las unidades de hexosa del polisacárido, eran sintetizadas por conversión del succinato en piruvato. Este último era transformado en hexosa por reversión del camino glicolítico.

El acetato en presencia de CO₂ también es asimilado a glicógeno en *Rs. rubrum*. En este caso la síntesis del polisacárido ocurre a partir de la formación de piruvato, de acuerdo con la siguiente reacción (Buchanan et al, 1967):



(reacción 3)

Aparentemente, el piruvato juega un rol central en la asimilación de compuestos carbonados en *Rs. rubrum* (y posiblemente también en *Rp. capsulata*).

Como el piruvato puede convertirse en fosfoenolpiruvato de acuerdo con la siguiente reacción (Buchanan y Evans, 1965):

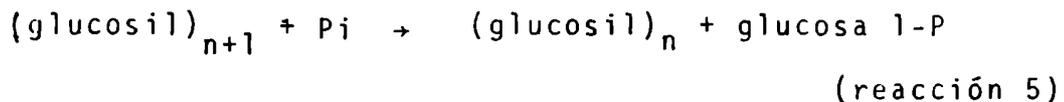


es posible considerarlo como el primer intermediario glicolítico en la gluconeogénesis en *Rs. rubrum*.

X.2.4. Degradación

La degradación del glicógeno en bacterias no ha sido estudiada con tanto detalle como su síntesis.

La reacción:



está catalizada por la glicógeno fosforilasa, cuya síntesis es independiente de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento, en contraste con la malto-dextrina fosforilasa. Esta última se halla presente en células crecidas con glucosa pero puede ser inducida a niveles superiores en células desarrolladas en maltosa. Ambas fosforilasas difieren en su especificidad por los sustratos. Así, la glicógeno fosforilasa emplea preferencialmente al glicógeno como sustrato mientras que la maltodextrina fosforilasa es más activa en presencia de oligosacáridos de cadenas cortas.

Ambas enzimas son estimuladas ligeramente por AMP.

ADP-glucosa, TDP-Glucosa y UDP-glucosa inhiben competitivamente a la glicógeno fosforilasa. Chen y Segel (1968) sugirieron que los compuestos nucleótido-glucosa intracelulares regulaban a esta enzima, ya que los niveles de estos compuestos tendían a aumentar en células en fase estacionaria, que acumulaban glicógeno en presencia de una fuente exógena de carbono. Estos niveles decrecían en cambio cuando se agotaba la fuente carbonada exógena, desapareciendo su acción inhibitoria sobre la glicógeno fosforilasa y permitiéndose así la degradación del glicógeno.

Palmer et al (1973) propusieron un esquema para la degradación del glicógeno bacteriano (Figura 10.1.). La acción combinada de las enzimas isoamilasa, glicógeno fosforilasa, maltodextrina fosforilasa y amilomaltasa resulta en la conversión del glicógeno a glucosa y glucosa 1-P. Dado que la reacción catalizada por la isoamilasa constituye el primer paso específico en la degradación del glicógeno, debería estar sujeta a un control metabólico, pero dicho tema aún no ha sido estudiado.

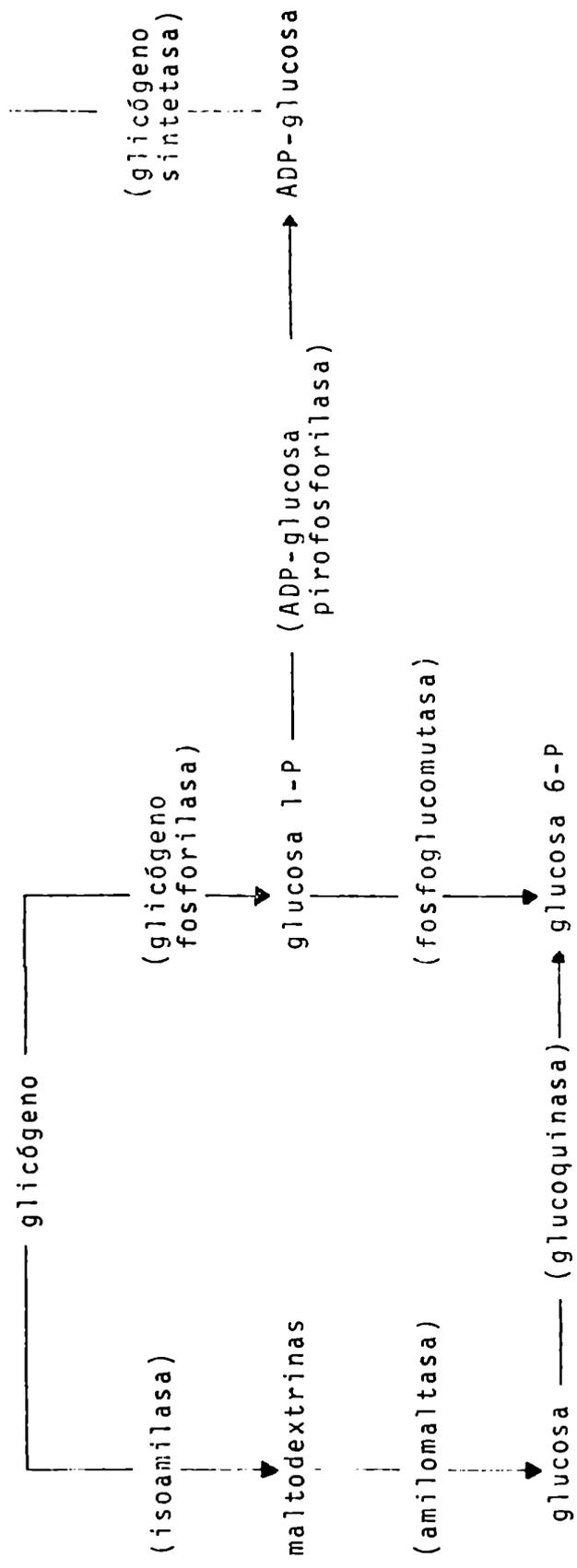


FIGURA 10.1.1.: Metabolismo del glicógeno bacteriano propuesto por Palmer et al (1973)

X.3. Poli-β-hidroxibutirato (PHB)

X.3.1. Consideraciones generales

El PHB es acumulado por numerosos y diversos microorganismos. Se lo ha detectado en bacterias fotosintéticas, aeróbicas, lito y organotróficas.

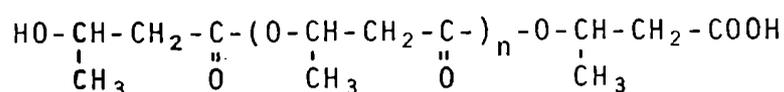
La capacidad de las células bacterianas para almacenar PHB en cantidades significativas provee a los organismos de una reserva de ácidos grasos, en forma osmóticamente inerte. En células procariotas, el PHB constituye el principal lípido de reserva, no existiendo generalmente acumulación de lípidos neutros como los triglicéridos.

Nuevamente, las condiciones de cultivo juegan un rol predominante en el almacenamiento de PHB, ya que éste se acumula como resultado de un desbalance nutricional. La naturaleza de la fuente exógena de carbono puede afectar la producción de PHB. *Rs. rubrum* fotometaboliza sustratos tales como lactato, piruvato, malato, succinato o CO₂ principalmente a glicógeno (Stanier et al, 1959), mientras que el acetato, β-hidroxibutirato o butirato que se metabolizan a acetyl-CoA, dan origen a la acumulación de PHB.

Las células de *Rs. rubrum* incubadas a la luz, requieren CO₂ para la conversión del PHB en carbohidratos y proteínas. Este requerimiento de CO₂ puede ser interpretado en términos de la carboxilación del acetylCoA a piruvato, ferredoxina dependiente (reacción 3).

X.3.2. Estructura química y composición de los gránulos

El PHB es un poliéster lineal de ácido D(-)β-hidroxibutírico, de la siguiente estructura:

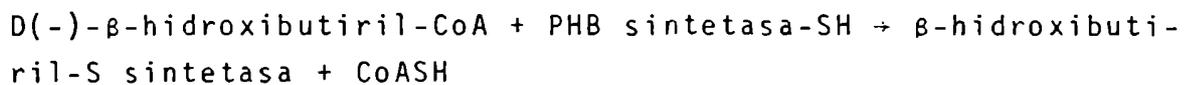


Se acumula en las células en gránulos discretos, que poseen una membrana de grosor variable (2,0 a 8,0 nm) según la especie (Boatman, 1964). Estos gránulos han sido purificados mediante centrifugación diferencial y en gradientes de densidad (Griebel et al, 1968). El PHB constituye el 97-98% del peso seco del gránulo, correspondiendo el remanente a proteínas (2%) y a lípidos (0,5%). Estas últimas sustancias serían presumiblemente los componentes de la membrana del gránulo, conteniendo la fracción lipídica ácido fosfatídico y un compuesto no identificado aún.

Los procedimientos usados en la purificación de estos gránulos son relativamente moderados y resultan en la obtención de preparaciones de "gránulos nativos de PHB" los cuales son susceptibles a una depolimerización enzimática por depolimerasas solubles y asociadas con la PHB sintetasa. A partir de estudios de depolimerización enzimática del PHB, Merrick y Doudoroff (1961) hallaron que una variedad de tratamientos físicos y químicos producían la inactivación de los gránulos de PHB transformándolos en sustratos inadecuados para las enzimas degradativas. Merrick et al (1965) observaron los gránulos inactivos por microscopía electrónica y en todos los casos, existían perturbaciones morfológicas: fragmentación de membrana, pérdida de la coalescencia y alteraciones de superficie.

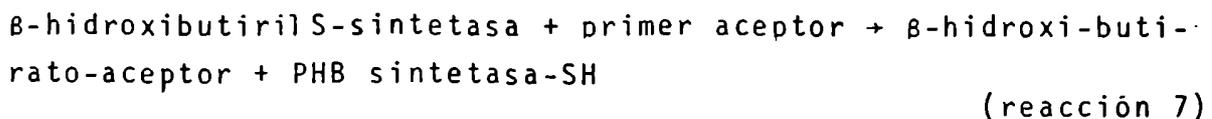
X.3.3. Biosíntesis

Griebel y Merrick (1971) propusieron que la síntesis del PHB ocurría en dos reacciones parciales, con la formación de un intermediario acil-enzima, en la primera de ellas:



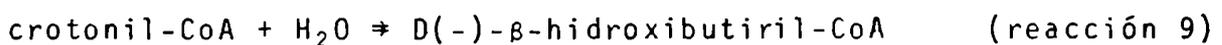
(reacción 6)

Este intermediario acil-enzima reacciona con un primer aceptor en la segunda etapa:

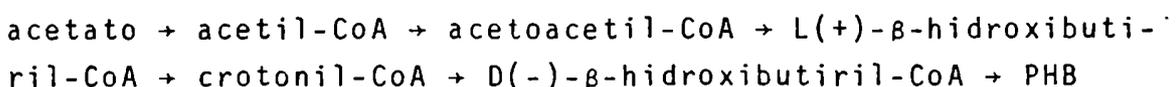


Ellar et al (1968) propusieron que las enzimas polímero-sintetizantes se agregaban formando micelas. Dentro de las mismas ocurría la síntesis del PHB dando origen a fibrillas paralelas. Por sucesivos enrollamientos y entrelazamientos se compactaban originando el gránulo. Así la cobertura superficial estaba compuesta, en una visualización primaria, por las moléculas polímero-sintetizantes.

Se ha informado acerca de la existencia de dos caminos diferentes en la síntesis de D(-)- β -hidroxibutiril-CoA (Moskowitz y Merrick, 1969). En *Rs. rubrum* se aislaron dos enoil-CoA hidrasas, cuya acción combinada resultó en la racemización del L(+)- β -hidroxibutiril-CoA a D(-)- β -hidroxibutiril-CoA de acuerdo con las reacciones:



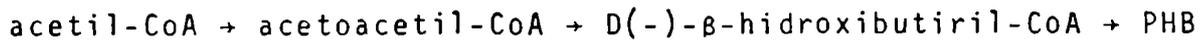
Moskowitz y Merrick (1969) propusieron el siguiente camino para la síntesis de PHB a partir de acetato en *Rs. rubrum*:



Las primeras enzimas de este camino han sido estudiadas en *Rs. rubrum* por Eisenberg (1955) (acetil-CoA quinasa) y por Stern y Del Campillo (1956) (tiolasa, L(+)- β -hidroxibutiril-CoA-dehidrogenasa).

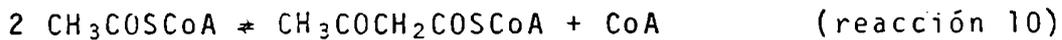
La síntesis de D(-)- β -hidroxibutiril-CoA en *A. beige-rinckii* difiere del camino ya descrito. Este organismo posee

una acetoacetyl-CoA reductasa que cataliza la reducci3n del acetoacetyl-CoA a D(-)-β-hidroxiacetyl-CoA utilizando el NADH o el NADPH como dadores de electrones (Ritchie et al, 1971), de acuerdo con la siguiente secuencia:



No existen evidencias de la presencia de enoil-CoA hidrasa en este organismo (Dawes y Senior, 1973).

A partir de datos cin3ticos, se propuso que la β-cetotio_lasa, que cataliza la siguiente condensaci3n:



desempeña un rol importante en la regulaci3n del metabolismo del PHB.

Durante el crecimiento exponencial, el acetyl-CoA se me_taboliza principalmente a trav3s del ciclo de Krebs generando energa y precursores de carbono para reacciones biosint3ticas. Asa, es esperable hallar una baja concentraci3n intracelular de acetyl-CoA y una elevada de CoA, como resultado de la actividad de la citrato sintetasa. Estas condiciones favorecen la inhibici3n de la β-cetotio_lasa y de la sntesis de PHB.

Cuando el crecimiento se retarda debido a la deficiencia en alg3n nutriente (por ejemplo, por agotamiento de fuente de nitrgeno), la concentraci3n de acetyl-CoA aumenta concomitantemente con la reducci3n del CoA libre. Bajo tales condiciones se sintetiza el PHB.

Senior et al (1972) informaron que existia una acumulaci3n muy importante de PHB bajo condiciones limitantes de O₂. Ellos sugirieron que en cultivos deficientes en O₂ se acumulaban nucle3tidos reducidos de nicotinamida que inhibian las acti_vidades de la citrato sintetasa y de la isocitrato deshidrogenasa (Senior y Dawes, 1971). En estas condiciones, se prevena la oxidaci3n del acetyl-CoA a trav3s del ciclo de Krebs, aumentando su concentraci3n y dirigi3ndose hacia la sntesis de PHB.

X.3.4. Degradación

Los requerimientos para la depolimerización incluyen un factor lábil asociado a los gránulos y los siguientes componentes solubles:

- 1) factor proteico termoestable (activador),
- 2) PHB-depolimerasa,
- 3) hidrolasa

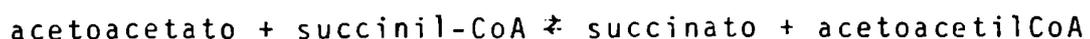
La acción sucesiva del activador y de la depolimerasa sobre los gránulos da como resultado la formación de β -hidroxibutirato como producto mayor, además de un isómero (15-20%). La hidrolasa actúa tanto sobre el dímero como sobre el trímero, pero no sobre PHB.

Griebel y Merrick (1971) propusieron que el PHB era hidrolizable solamente si mantenía un estado conformacional particular, el cual estaría favorecido por una asociación íntima con la proteína. La presencia de alguna alteración en esta asociación produciría un cambio en el estado físico del polímero, dando como resultado preparaciones no degradables por la depolimerasa.

El mecanismo de acción del activador termoestable no se conoce aún. Griebel y Merrick (1971) dedujeron que los gránulos de PHB estaban asociados a un inhibidor, presumiblemente proteico, el cual interferiría con la hidrólisis del PHB por la depolimerasa. Este inhibidor era destruido por proteólisis, extraído en álcali e inactivado por el activador de forma aún no determinada.

Como resultado de la acción de estas enzimas degradativas el PHB se hidroliza a D(-)- β -hidroxibutirato, el cual es posteriormente metabolizado a acetil-CoA según los siguientes pasos:

- 1) Oxidación del D(-)- β -hidroxibutirato a acetoacetato por la enzima D(-)- β -hidroxibutirato deshidrogenasa NAD específica.
- 2) Reacción de transferencia



(reacción 11)

catalizada por la acetoacetato-succinil CoA transferasa (Senior y Dawes, 1973).

3) Tiolisis del acetoacetyl-CoA a acetyl-CoA mediante la acción de la enzima β -cetotiolasa.

Esta enzima ocupa un rol central en el metabolismo del PHB dado que constituye la primera enzima de la síntesis y la última de su degradación.

El esquema del metabolismo del PHB se halla ilustrado en la Figura 10.2. (Oeding y Schlegel, 1973; Senior y Dawes, 1973).

Dawes y Senior (1973) propusieron que la degradación del polímero estaría regulada en el paso catalizado por la β -hidroxibutirato deshidrogenasa. Así, los inhibidores competitivos de esta enzima (piruvato y α -cetoglutarato) estarían en niveles elevados durante el crecimiento activo, produciendo una inhibición de la deshidrogenasa y previniendo la acumulación de PHB.

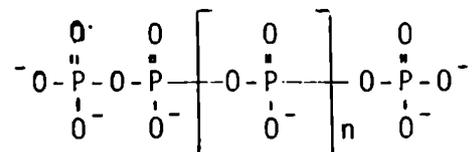
X.4. Polifosfatos (poli-P)

X.4.1. Consideraciones generales

Numerosos tipos de bacterias, así como también algas, hongos, levaduras y protozoos acumulan polifosfatos (poli-P) (Dawes y Senior, 1973; Kuhl, 1960). Existen también datos acerca de la presencia de poli-P en plantas superiores y animales (Harold, 1966).

X.4.2. Estructura química y composición de los gránulos

El poli-P es un polímero de ortofosfato con uniones del tipo del anhídrido fosfórico:



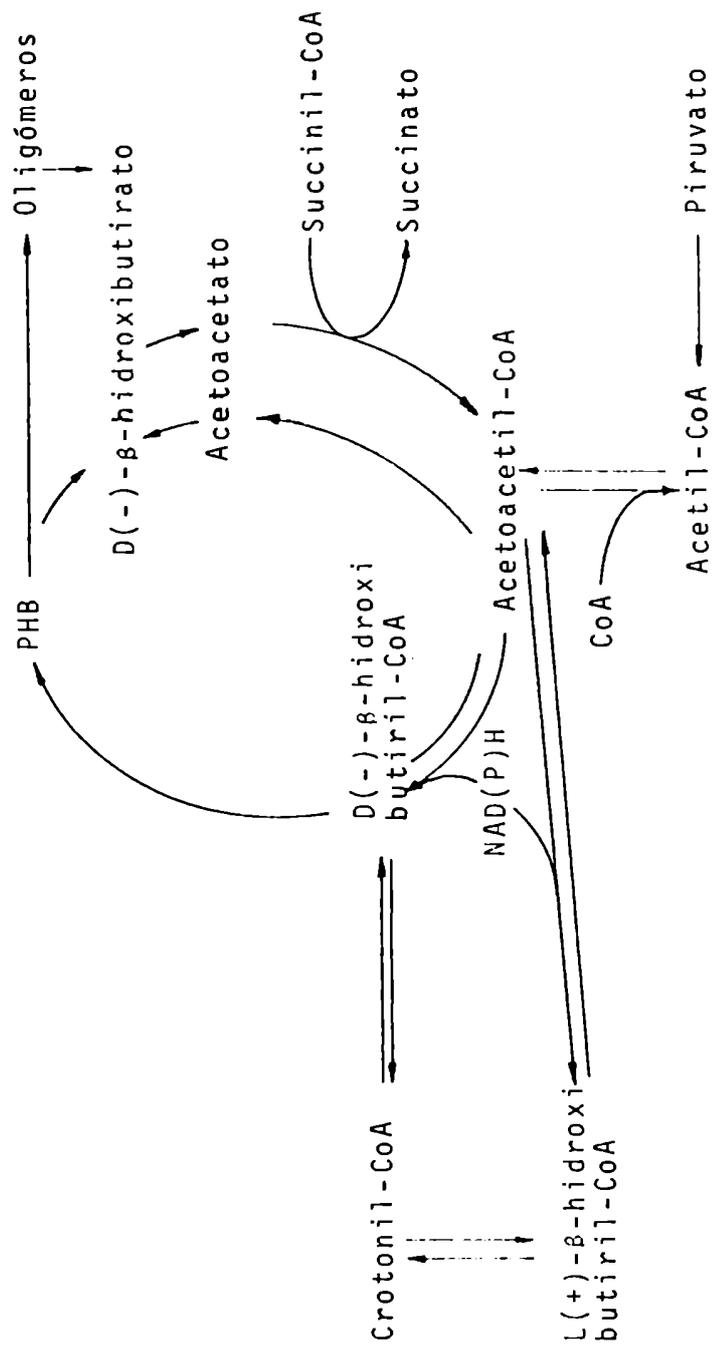


FIGURA 10.2.: Síntesis y degradación del PHB

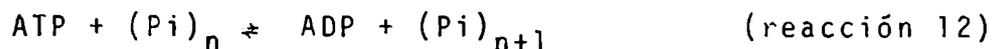
Esta estructura puede variar en la longitud de la cadena desde 2 (pirofosfato) hasta 10^4 . Estos compuestos son considerados de alta energía siendo la energía libre de hidrólisis para la unión anhídrido de aproximadamente 9 kcal/ unión fosfato a pH 5.

Los poli-P se hallan depositados en las células formando gránulos esféricos los cuales parecen carecer de membrana limitante. Estos gránulos de 40-80 nm de diámetro, están formados por 24% de proteína, 30% de lípidos, 27% de poli-P y pequeñas cantidades de RNA, carbohidratos y cationes polivalentes (Friedberg y Avigad, 1968).

X.4.3. Biosíntesis

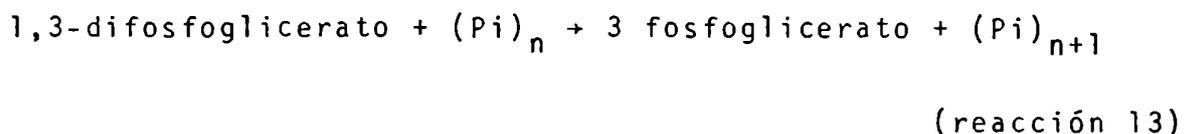
La biosíntesis de los poli-P parece ocurrir a través de dos caminos distintos: uno catalizado por la poli-P quinasa y otro por la 1,3-difosfoglicerato-poli-P fosfotransferasa.

1) La poli-P quinasa (ATP-poli-P fosfotransferasa) cataliza la transferencia de un grupo fosforilo terminal del ATP al poli-P de acuerdo con la siguiente reacción:



Esta quinasa se halla ampliamente distribuída entre los microorganismos, incluyendo la bacteria verde *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* (Cole y Hughes, 1965).

2) La 1,3-difosfoglicerato-poli-P fosfotransferasa cataliza la siguiente reacción:



Generalmente la poli-P quinasa presenta mayor actividad (3 a 10 veces superior) (Kulaev et al, 1971) que la 1,3-difosfoglicerato-poli-P fosfotransferasa.

La principal enzima responsable de la síntesis de poli-P en organismos que poseen ambas enzimas, resultó ser la 1,3-di-

fosfoglicerato-poli-P fosfotransferasa, conclusión a la que se llegó mediante estudios con mutantes (Kulaev et al, 1971; Kulaev y Bobyk, 1971).

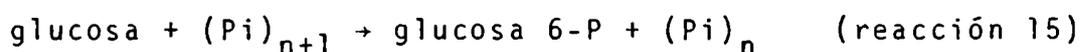
X.4.4. Degradación

Se han descripto tres enzimas que desempeñan un rol importante en la degradación de poli-P en microorganismos:

- 1) La poli-P quinasa posee una función dual ya que actúa tanto en la biosíntesis como en la degradación.
- 2) La poli-P-AMP fosfotransferasa transfiere grupos fosfatos desde el poli-P hacia el AMP, de acuerdo con



- 3) La poli-P glucoquinasa cataliza la siguiente reacción:



La función de esta enzima en la degradación del poli-P y en la fosforilación de las hexosas está aún en estudio. El trabajo con mutantes que carecen de esta proteína permitirá conocer mejor su rol fisiológico.

- 4) Las polifosfatasas que catalizan la hidrólisis de los poli-P a fosfatos inorgánicos, se hallan ampliamente distribuídas en numerosos organismos. Las mutantes carentes de polifosfatasas no pueden degradar el poli-P, sugiriéndose entonces que estas enzimas jugarían un rol primario en la degradación de los poli-P.

X.4.5. Acumulación y utilización

Los factores que favorecen la acumulación de poli-P son similares a aquellos observados para otras sustancias de reserva. Generalmente, las condiciones ambientales y el estado fisiológico celular determinan el grado de acumulación y degradación de poli-P.

El metabolismo de los poli-P no ha sido estudiado aún con profundidad en las bacterias fotosintéticas. En una publicación breve, Carr y Sandhu (1966) informaron que *Rp. sphaeroides* crecida aeróbica o fotosintéticamente e incubada bajo condiciones anaeróbicas a la oscuridad, degrada el poli-P. Por otro lado, las células crecidas fotosintéticamente e incubadas a la luz en un medio basal salino sin fuente de carbono, acumulan poli-P. Así, la presencia de una fuente de ATP en ausencia de fuente de carbono produce un almacenamiento de poli-P mientras que la privación de un mecanismo generador de ATP resulta en una degradación del poli-P.

Chl. limicola f. *thiosulfatophilum*, fotótrofo obligado, acumula poli-P durante las fases de crecimiento logarítmica y estacionaria (Cole y Hughes, 1965). Los autores sugirieron que esta situación reflejaría una producción en exceso de ATP por fotofosforilación bajo las condiciones de crecimiento utilizadas. Este organismo carecería aparentemente de polifosfatasa y la degradación del poli-P estaría mediada por la acción sucesiva de la poli-P quinasa y de la ATP-asa.

Kulaev et al (1974) observaron que *Rs. rubrum* crecida a la luz acumulaba pirofosfato así como también poli-P durante los estadios de crecimiento. También se halló almacenamiento de poli-P en células crecidas en oscuridad.

REFERENCIAS

- Boatman, E.S. (1964), J.Cell Biol. 20, 297.
- Buchanan, B.B. & Evans, M.C.W. (1965), Biochem. Biophys. Res. Commun, 22 , 484.
- Buchanan, B.B.; Evans, M.C.W. & Arnon, D.I. (1967), Arch. Mikrobiol. 59, 32.
- Carr, N.G. & Sandhu, G.R. (1966), Biochem. J. 99, 29 P.
- Chen, G.S. & Segel, I.H. (1968), Arch. Biochem. Biophys. 127, 175.
- Cohen-Bazire, G. & Kunisawa, R. (1963), J. Cell Biol. 16, 401.
- Cole, J.A. & Hughes, D.E. (1965), J. Gen. Microbiol. 38, 65.
- Dawes, E.A. & Senior, P.J. (1973), Advances in Microbial Physiology (A.H. Rose y D.W. Tempest, eds.), Vol 10, pp. 135-266, Academic Press, New York.
- Doudoroff, M. (1966) Current Aspects of Biochemical Energetics (N.O. Kaplan y E.P. Kennedy, eds.), pp. 385-400, Academic Press, New York.
- Eidels, L. & Preiss, J. (1970), Arch. Biochem. Biophys. 140 , 75.
- Eisenberg, M.A. (1955), Biochim. Biophys. Acta 16, 58.
- Ellar, D.; Lundgren, D.G.; Okamura, K. & Marchessault, R.H. (1968), J. Mol. Biol. 35, 489.
- Friedberg, I, & Avigad, G. (1968), J. Bacteriol. 96, 544.
- Furlong, C.E. & Preiss, J. (1969), J. Biol. Chem. 244, 2539.
- Greenberg, E. & Preiss, J. (1965), J. Biol. Chem. 240, 2341.
- Griebel, R.J. & Merrick, J.M. (1971), J. Bacteriol. 108, 782.
- Griebel, R.; Smith, Z. & Merrick, J.M. (1968), Biochemistry 7, 3676.
- Hara, F.; Akazawa, T. & Kojima, K. (1973), Plant Cell Physiol. 14, 737.
- Harold, F.M. (1966), Bacteriol. Rev. 30, 772.
- Holme, T. & Palmstierna, H. (1956), Acta Chem. Scand. 10, 578.

- Krebs, E.G. & Preiss, J. (1975) International Review of Science: Biochemistry (W.J. Whelan, ed.), Vol. 5, Biochemistry of Carbohydrates, Chapt 7, pp.337-389, University Park Press, Baltimore.
- Kuhl, A. (1960), *Ergeb. Biol.* 23, 144.
- Kulaev, I.S. & Bobyk, M.A. (1971) *Biochemistry (USSR) (English translation)* 36, 356.
- Kulaev, I.S.; Bobyk, M.A.; Nikolaev, N.N.; Sergeev, N.S. & Uryson, S.O. (1971), *Biochemistry (USSR) (English translation)* 36, 791.
- Kulaev, I.S.; Shadi, A. & Mansurova, S.E. (1974), *Biochemistry (USSR) (English translation)* 39, 656.
- Merrick, J.M. & Doudoroff, M. (1961) *Nature (London)* 189, 890.
- Merrick, J.M.; Lundgren, D.G. & Pfister, R.M. (1965), *J. Bacteriol.* 89, 234.
- Moskowitz, G.J. & Merrick, J.M. (1969), *Biochemistry* 8, 2748.
- Oeding, V. & Schlegel, H.G. (1973), *Biochem. J.* 134, 239.
- Palmer, T.N.; Wöber, G. & Whelan, W.J. (1973), *Eur. J. Biochem.* 39, 601.
- Preiss, J. (1969), *Current Topics in Cellular Regulation* (B.L. Horecker y E.R. Stadtman, eds.), Vol. 1, pp. 125-160, Academic Press, New York.
- Recondo, E. & Leloir, L.F. (1961), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 85.
- Ritchie, G.A.F.; Senior, P. J. & Dawes, E.A. (1971), *Biochem. J.* 121, 309.
- Senior, P.J. & Dawes, E.A. (1971), *Biochem. J.* 125, 55.
- Senior, P.J. & Dawes, E.A. (1973), *Biochem. J.* 134, 225.
- Senior, P.J.; Beech, G.A.; Ritchie, G.A.F. & Dawes, E.A. (1972), *Biochem. J.* 128, 1193.
- Shively, J.M. (1974), *Annu. Rev. Microbiol.* 28, 167.
- Stanier, R.Y.; Doudoroff, M.; Kunisawa, R. & Contopoulou, R. (1959), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45, 1246.

- Stern, J.R. & Del Campillo, A. (1956), J. Biol. Chem. 218, 985.
- Wolk, C.P. (1973), Bacteriol. Rev. 37, 32.

METABOLISMO DE COMPUESTOS AZUFRADOS

XI.1. Introducción

XI.2. Metabolismo disimilatorio

XI.2.1. Oxidación de sulfuro, azufre y sulfato

XI.2.2. Oxidación de tiosulfato y tetracionato

XI.3. Metabolismo asimilatorio

XI. METABOLISMO DE COMPUESTOS AZUFRADOS

XI.1. Introducción

La fotosíntesis anoxigénica requiere dadores de electrones distintos del H₂O. Las bacterias fototróficas utilizan compuestos azufrados a niveles de oxidación inferiores que el del sulfato, como dadores electrónicos.

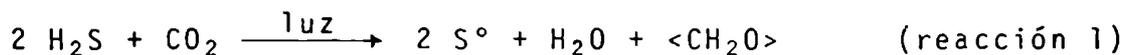
Por otro lado, tanto las bacterias fototróficas como las no fototróficas requieren azufre para la síntesis de compuestos celulares que contienen dicho elemento.

A pesar de que el camino de síntesis de estos compuestos, para ambos propósitos es casi idéntico, es útil diferenciar entre el metabolismo asimilatorio, en el cual están involucradas las reacciones dadoras de azufre con velocidades de turnover bajas, y el metabolismo disimilatorio, que corresponde a las reacciones que ceden electrones con altas velocidades de turnover.

XI.2. Metabolismo disimilatorio

XI.2.1. Oxidación de sulfuro, azufre y sulfito

La oxidación de sulfuro en Chromatiaceae y Chlorobiaceae procede por vía de un intermediario: el azufre elemental, y está en relación estrictamente estequiométrica con la fijación de CO₂ (Trüper, 1964 a) según:



El acoplamiento del metabolismo del azufre con la asimilación del carbono señala que el primero está regulado por la demanda de electrones del segundo.

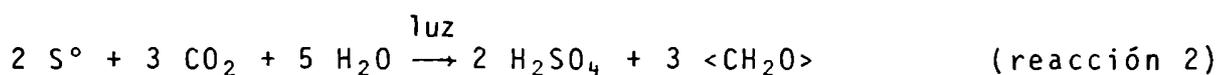
El azufre elemental aparece en forma de glóbulos fuera o dentro de la célula. Mientras que las Chlorobiaceae y las especies del género *Ectothiorhodospira* depositan el S[°] fuera de las células, las Chromatiaceae (excepto *Ectothiorhodospira*) forman glóbulos intracelulares. Nicholson y Schmidt (1971) analizaron la membrana de esta estructura en *Chromatium vinosum*. Es-

tos autores encontraron que consistía enteramente en una proteína con un peso molecular de 13.500 daltons. Una membrana similar ha sido hallada en vacuolas gaseosas de ciano y halobacterias.

Schmidt et al (1971) dedujeron que la membrana actuaría primariamente como una barrera que separaría al S° del interior celular y posiblemente tendría sitios de unión para las enzimas involucradas en el metabolismo del azufre.

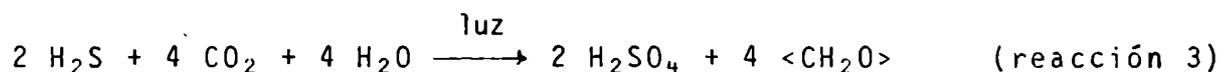
Mediante estudios de microscopía electrónica, Puchkova et al (1974) concluyeron que el S° depositado fuera de las flulas de las Chlorobiaceae, era liberado mediante sacos o invaginaciones formadas por la membrana citoplasmática.

La oxidación posterior del azufre elemental da origen a la formación de sulfato según:



La velocidad de fijación de carbono en presencia de sulfuro o de azufre es la misma (Trüper, 1964 b).

La ecuación total para la oxidación del sulfuro a sulfato es la siguiente:



Esta oxidación completa provee de 8 electrones por molécula de sulfato formada, para la fotosíntesis.

Las reacciones 1 y 2 representan la relación estequiométrica entre el turnover del azufre y la fijación de CO₂ en cultivos fotolitoautotróficos.

Trüper y Schlegel (1964) encontraron que la velocidad de fijación del CO₂ en *Chr. okenii* limitaba el turnover del sulfuro y del azufre a sulfato. Además, las reacciones 1 y 2 no ocurrían en estricta sucesión, dado que la formación de sulfato comenzaba mientras el sulfuro seguía aún oxidándose. Este overlapping también se observó en *Thiocapsa roseopersicina*. Por otro lado, en *Ectothiorhodospira mobilis* la oxidación del sulfuro y la oxidación extracelular del S° suceden en estricta sucesión.

El estudio de las enzimas de estas reacciones de transformación no ha sido aún profundizado. Teóricamente existirían dos posibles roles para el azufre elemental:

- 1) es el verdadero intermediario, en cuyo caso debería haber una enzima que oxide el azufre a sulfito;
- 2) pertenece a una reacción secundaria, por lo cual debería ser reducido a sulfuro, el que se oxidaría a sulfito vía una sulfito reductasa.

El rendimiento neto de electrones para la fotosíntesis es el mismo en ambos casos.

Las enzimas responsables de las reacciones de transformación no se conocen aún.

Durante el metabolismo anaeróbico, las células de Chromatiaceae crecidas en oscuridad, excretan sulfuro proveniente de los glóbulos intracelulares de S^0 (Trüper, 1964 a). Van Gemerden (1967, 1968) demostró que en *Chr. vinosum* crecida en las mismas condiciones antes citadas, existía un acople estequiométrico estricto entre la formación de sulfuro a partir de azufre y la transformación de poliglucosa en poli- β -hidroxibutirato. Esto significaría que la acumulación de azufre elemental bajo estas circunstancias serviría como depósito potencial de electrones; el sulfuro sería excretado y el ATP se formaría vía glucólisis. Así, sería posible el flujo electrónico del NADPH o NADH hacia el azufre.

Paschinger et al (1974) incubaron *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum* con S^0 en atmósfera de CO_2 libre de hidrógeno, a la luz. Estos autores observaron la formación simultánea de sulfuro y sulfato postulando que la oxidación de azufre a sulfato procedería vía una reducción inicial a sulfuro.

Thiele (1966) encontró que tanto las Chlorobiaceae como las Chromatiaceae ensayadas utilizaban el azufre elemental añadido al medio de crecimiento. Este hecho llevó a la conclusión de que las especies que depositan S^0 externamente y las que acumulan S^0 intracelularmente poseían sistemas enzimáticos similares de oxidación de sulfuro y utilización de S.

Los miembros del género *Ectothiorhodospira*, que prefieren pH's más alcalinos para crecer que las otras Chromatiaceae, forman intermediarios polisulfuros, cuando se desarrollan en me

dios que contienen sulfuro. Este fenómeno no aparece en cultivos de Chlorobiaceae, cuando crecen a un pH cercano al óptimo (6,5-6,8) ya que los polisulfuros son inestables a pH's ácidos.

En sulfobacterias fototróficas, el sulfito parece ser el intermediario verdadero en la oxidación del azufre, ya que es utilizado como dador de electrones para la fotosíntesis. Thiele (1966, 1968 b) encontró que estas bacterias no contenían sulfito oxidasa (sulfito: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.8.3.1).

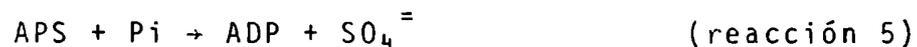
Peck (1966) halló formación de adenililsulfato (APS) en cromatóforos de *Chr. vinosum*. Trüper y Peck (1970) verificaron la síntesis de APS en extractos de numerosas cepas de Chromatiaceae y Chlorobiaceae:



La enzima que cataliza esta reacción es la adenilil sulfato reductasa (AMP, sulfito: ferricianuro oxidoreductasa, EC 1.8.99.2). Su actividad se halla localizada en una fracción particulada: los cromatóforos.

La APS reductasa ha sido purificada de *Thiocapsa roseopersicina* y sus propiedades fueron caracterizadas por Trüper y Rogers (1971). Además de la flavina, la APS reductasa de esta fuente contiene grupos hémicos, en relación 1:2 (flavina:hemo) por molécula de enzima.

La transformación del APS a sulfato está catalizada por la enzima ADP sulfurilasa (ADP: sulfato adenilil transferasa, EC 2.7.7.5):



En combinación con la adenilato quinasa (ATP:AMP fosfo transferasa, EC 2.7.4.3) las sulfobacterias fototróficas tienen en esta reacción la posibilidad de ganar 1 mol de ATP por cada dos moles de sulfato formados.

Hansen y van Gemerden (1972) informaron acerca de la utilización de sulfuro por parte de numerosas cepas de Rhodospirillaceae. *Rp. capsulata* puede tolerar una concentración elevada de sulfuro en la misma medida que lo hace *Chr. vinosum*, mientras que *Rp. sphaeroides*, *Rp. palustris* y *Rhodospirillum rubrum*

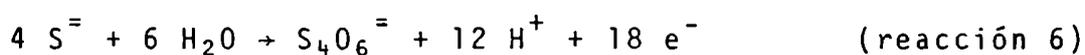
pueden soportar aproximadamente 1/5 de dicha concentración. Sin embargo, la adición de pequeñas cantidades de extracto de levadura al medio de crecimiento generalmente aumenta la tolerancia al sulfuro.

Hansen (1974) hizo crecer las especies antes nombradas, en cultivos con bajas concentraciones de sulfuro. Así, encontró que *Rs. rubrum*, *Rp. capsulata* y *Rp. sphaeroides* oxidaban el sulfuro a S° mientras que *Rp. palustris* lo transformaba en sulfato sin acumulación de S° u otros compuestos reducidos.

Las Rhodospirillaceae no contienen APS reductasa (Hansen, 1974). La existencia de especies que carecen de esta enzima pero capaces de oxidar sulfuro a sulfato, sin formación de S° intermedio, nos prueba que existen diferentes caminos para la oxidación disimilatoria de sulfuro, dentro de las bacterias fototróficas.

Hansen (1974) estudió también la utilización de sulfuro por *Rhodospirillum rubrum*. Esta cepa transformó un 65-80% del sulfuro en tiosulfato, pequeñas cantidades de politionatos y S° (cultivo en batch), no detectándose sulfatos. Cuando la misma cepa se hizo crecer en un quimostato, Hansen (1974) encontró un 86% de transformación del sulfuro en tetracionato y pequeñas cantidades de tiosulfato, no hallándose nuevamente sulfatos.

Como se sabe, el tetracionato reacciona con el sulfuro originando tiosulfato y S°:



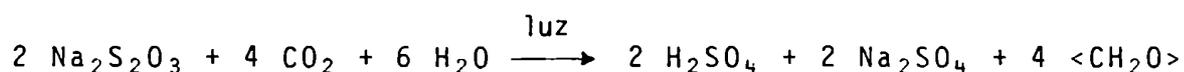
Como la concentración de sulfuro en el estado estacionario dentro del quimostato, es extremadamente baja, la reacción 7 no puede suceder en la forma en que lo hace en los cultivos en batch y entonces, el mayor producto de la oxidación es el tetracionato.

XI.2.2. Oxidación de tiosulfato y tetracionato

La mayoría de las especies de las Chromatiaceae, excepto *Chr. okenii*, *Chr. weissei*, *Chr. warmingii*, *Chr. buderii* y *Thiospirillum jenense*, son capaces de utilizar el tiosulfato como dador de electrones durante la fotosíntesis (Trüper y Jannasch, 1968).

En cuanto a las Rhodospirillaceae *Rp. palustris* (van Niel, 1944; Rolls y Lindstrom, 1967 b) y *Rp. sulfidophila* (Hansen y Veldkamp, 1973), pueden crecer fotolitoautotróficamente con tiosulfato como único dador de electrones.

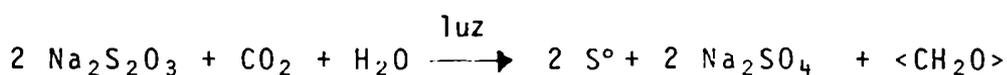
En analogía con la oxidación del sulfuro, van Niel (1931, 1936) describió la oxidación del tiosulfato en *Chr. vinosum* según la reacción:



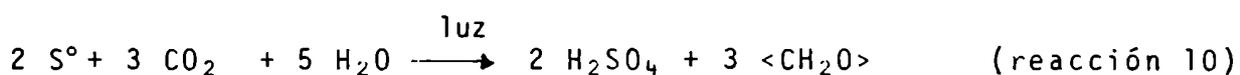
(reacción 8)

Los mismos resultados fueron obtenidos por Larsen (1953) con *Chl. limicola* f. *tiosulfatophilum*.

Algunos investigadores observaron un depósito intracelular transitorio de S° durante la oxidación del tiosulfato en *Chr. vinosum* y especies similares (van Niel, 1936; Petrova, 1959; Smith, 1965; Trüper y Pfennig, 1966):



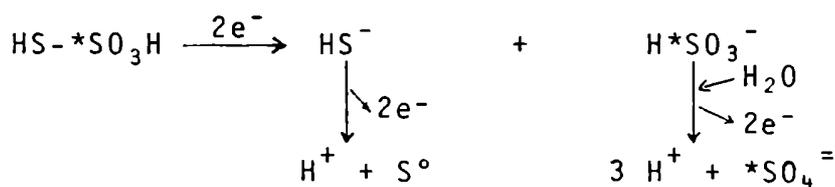
(reacción 9)



La comparación de estas ecuaciones con las correspondientes a la oxidación del sulfuro demuestra que para la fijación de una cierta cantidad de CO₂ se necesitan relaciones equimolares de sulfuro o de tiosulfato. Así, la velocidad de fijación de CO₂ en *T. roseopersicina* es idéntica en células crecidas con sulfuro o con tiosulfato (Trüper y Pfennig, 1966).

La reacción 8 muestra que la oxidación del tiosulfato provee 8 electrones por molécula oxidada, para la fotosíntesis.

Los dos átomos de azufre de la molécula de tiosulfato pertenecen a dos grupos distintos: HS- (grupo sulfano) y -SO₃H (grupo sulfon); por lo tanto, son tratados por las enzimas en forma diferente. El depósito de S° en Chromatiaceae crecidas a expensas del tiosulfato, sugiere un desdoblamiento de la molécula de S₂O₃⁼ en ambos grupos antes mencionados. Sólomente el grupo sulfano es rápidamente transformado en S° mientras que el -SO₃H se excreta inmediatamente en forma de sulfato (Smith, 1965; Trüper y Pfennig, 1966). Este proceso puede ser expresado según:



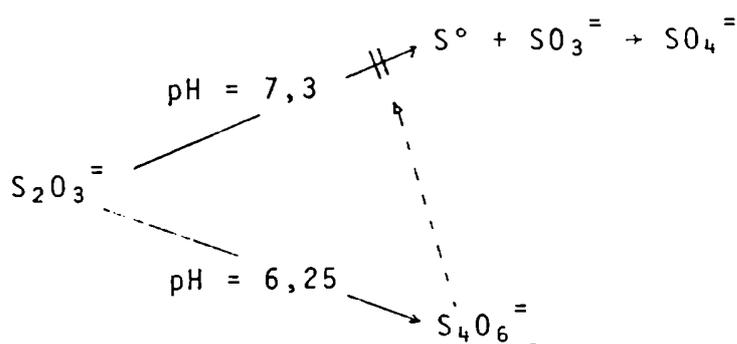
(reacción 11)

La capacidad de utilizar el tiosulfato se halla expresada por la existencia de una o dos enzimas: una que desdobla el tiosulfato y una tiosulfato permeasa. La naturaleza de la primera enzima ha sido recientemente estudiada. La detección de la rodenasa (tiosulfato: cianuro azufre transferasa, EC 2.8.1.1) en *Chr. vinosum* llevó a la conclusión que esta enzima es la responsable del clivaje del tiosulfato (Smith y Lascelles, 1966). La rodenasa también se encontró en *Rp. sphaeroides*, *Rs. rubrum* (Smith y Lascelles, 1966), *Rp. capsulata*, *Rp. palustris*, *Ectothiorhodospira mobilis* y *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum* (Yoch y Lindstrom, 1971). Hashwa (1972) halló que la utilización del tiosulfato no es ni inducible ni dependiente de las condiciones del cultivo sino que es constitutiva. Los extractos de *Chr. minus*, *Chr. vinosum* y *Rp. palustris* contenían tanto rodenasa como tiosulfato reductasa, y ambas actividades no se hallaban afectadas por crecimiento en presencia de tiosulfato.

Smith (1966) halló formación de tetracionato a partir de tiosulfato en *Chr. vinosum*. Este investigador encontró que el sulfato era progresivamente reemplazado por tetracionato como

producto final de la oxidación del tiosulfato, al variar el pH de 7,3 a 6,25. Dentro de este rango, el $S_4O_6^{=}$ no sufría oxidación posterior. Smith (1966) purificó la enzima que cataliza la oxidación del $S_2O_3^{=}$ a $S_4O_6^{=}$, utilizando ferricianuro como aceptor de electrones.

A pH 6,75 se acumula S° por utilización del tiosulfato y se forman sulfato y tetracionato. La adición de $S_4O_6^{=}$ inhibe el depósito de S° pero no la producción de tetracionato a partir de $S_2O_3^{=}$, ni la oxidación de S° a sulfato. Entonces, el tiosulfato se metaboliza en *Chr. vinosum* según dos caminos distintos, que dependen de las condiciones ambientales:



Esquema 1

Rolls y Lindstrom (1967 a) encontraron que en células de *Rp. palustris* crecidas en un medio con $S_2O_3^{=}$ éste inducía la utilización del tiosulfato. El producto de oxidación detectado era el tetracionato.

Knobloch et al (1971) hallaron una tiosulfato: citocromo C oxido-reductasa en una fracción aislada de *Rp. palustris* crecidas con $S_2O_3^{=}$.

Se ha estudiado también la influencia del oxígeno atmosférico en el metabolismo del S° en Chromatiaceae, tema de gran importancia ecológica.

Cuando células de *Chr. vinosum*, ricas en depósitos de S, se airean en luz u oscuridad, oxidan el S a sulfato (Breuker, 1964). La adición de CO_2 al aire produce un incremento en la velocidad de formación de sulfato.

En contraste, Hurlbert (1967) halló que el oxígeno inhibía la síntesis de $SO_4^{=}$ a partir del S° acumulado intracelularmente, en *Chr. vinosum*, mientras que no afectaba la utilización de $S_2O_3^{=}$ y la formación de S a partir del grupo sulfano.

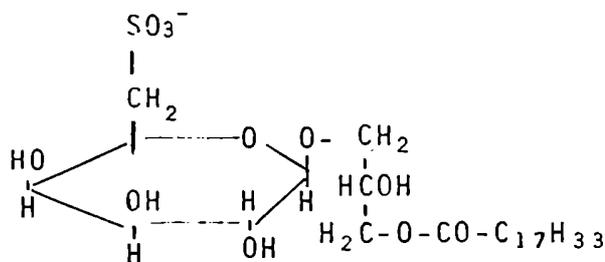
XI.3. Metabolismo asimilatorio

Las Rhodospirillaceae fotoorganotróficas dependen de la reducción asimilatoria de $\text{SO}_4^{=}$ para la síntesis de compuestos celulares que contienen S, tales como los aminoácidos cisteína, cistina y metionina y otros componentes como lipoatos, biotina, tiamina y CoA.

Las Chromatiaceae y Chlorobiaceae, que normalmente viven en habitats que contienen sulfuros, gastarían energía si utilizaran el sulfato en la síntesis de aminoácidos en lugar del sulfuro ya disponible.

Cuando se incubó *Chr. okenii* con sulfato marcado, las células no mostraban ninguna incorporación de radioactividad (Trüper y Schlegel, 1964). Thiele (1966), estudió una cantidad considerable de cepas y encontró que las especies *Chr. okenii*, *Chr. weissel*, *Chr. warmingii*, *Chr. minus* y *Thiocapsa* no poseen la capacidad de reducir sulfato en forma asimilatoria.

Las cepas de *Chlorobium* pueden asimilar cisteína pero no metionina, cistina, ácido cisteico, tioglicolato, tioacetamida y sulfito (Lippert, 1967; Lippert y Pfennig, 1969), cuando eran incubadas con hidrógeno como dador de electrones. A pesar de que la cisteína es utilizada como fuente de S celular en Chromatiaceae (Thiele, 1966) y Chlorobiaceae, en esta última familia dicho compuesto no puede mantener el crecimiento, dado que éste cesa luego de algunas generaciones (Lippert, 1967). De esta forma, la cisteína no puede ser considerada como una fuente de S suficiente en *Chlorobium*. Por otro lado, las cepas de *Chlorobium* son incapaces de asimilar sulfato. Lippert (1967) concluyó entonces que en presencia de cisteína e hidrógeno, se impedía la síntesis de algún componente celular conteniendo S al nivel de oxidación del sulfato. Tal compuesto podría ser un éster sulfato o sulfonatos. El más probable es un sulfolípido, aislado por Benson et al (1959), cuya estructura es:



1-O-(-6'-deoxy-aldohexopiranosil-6'-ácido sulfónico)-3-O-oleoil-glicerol

Este sulfolípidio fue encontrado por Wood et al (1965) en *Rp. sphaeroides*.

Muy poco se ha estudiado de este tema en Rhodospirillaceae. Ibanez y Lindstrom (1962) observaron que cromatóforos de *Rs. rubrum* sintetizaban 3'-fosfo-adenilil-sulfato (PAPS) ya sea en luz o con la adición de ATP en oscuridad. Sin embargo, llegaron a la conclusión de que *in vivo* el PAPS no era el verdadero sustrato para la reducción del sulfato en cromatóforos.

Thiele (1966 , 1968 a) estudió la distribución de la radiactividad en células de *T. roseopersicina* y *Chr. vinosum* crecidas con (³⁵S)sulfato y encontró la marcación en la cisteína y la metionina. Esta observación constituye una evidencia de la formación de aminoácidos azufrados a partir de $SO_4^{=}$.

Las células crecidas fotoheterotróficamente con $SO_4^{=}$ como fuente de S poseen una actividad considerable de APS reductasa. Thiele (1968 b) y Trüper y Peck (1970) sugirieron que esta enzima sería la responsable de la reducción asimilatoria de $SO_4^{=}$ en Chromatiaceae.

Chambers y Trudinger (1971) estudiaron la síntesis de cisteína a partir de sulfuros. La misma ocurre vía una serina acetiltransferasa (acetil-CoA: L-serina O-acetiltransferasa, EC 2.3.1.30) y una O-acetilserina sulfhidrilasa (O-acetil-L-serina acetato liasa, EC 4.2.99.8), según:

L-serina + acetil-CoA → O-acetilserina + CoA (reacción 15)

O-acetilserina + H₂S → cisteína + acetato (reacción 16)

Este camino fue hallado en *Rs. rubrum*, *Rs. fulvum*, *Rp. palustris*, *Rp. gelatinosa*, *Rp. globiformis*, *Chr. vinosum*, *T. roseopersicina*, *Ectothiorhodospira mobilis* y *Chl. vibrioforme f. thiosulfatophilum* (Hensel y Trüper, 1976).

Peck et al (1974) indicaron la presencia de una sulfito reductasa (H₂S: aceptor oxido-reductasa EC 1.8.99.1) en bacterias fotótrofas. Esta enzima se encontró tanto en células crecidas autotróficamente como también en las desarrolladas heterotróficamente (*Chr. vinosum*). La existencia de sulfito-reductasa en cultivos estrictamente fotolitoautótrofos de *Chl. limicola*, que es incapaz de reducir en forma asimilatoria el sulfato, así como también en cultivos de *Chr. vinosum* crecidos fotolitoautotróficamente, es una indicación de la posible función de esta enzima

en el metabolismo disimilatorio del S, por ejemplo oxidación del sulfuro o S⁰ a sulfito. Peck et al (1974) explicó la presencia de la sulfito reductasa en *Chr. vinosum* crecida fotolitoautotróficamente considerando que esta enzima no estaba sujeta a control feedback. Es necesario encontrar nuevas evidencias para resolver esta cuestión y también para dilucidar si la sulfito-reductasa de bacterias fotótrofas contienen el sirohemo hallado por Murphy y Siegel (1973).

Sandy et al (1975) introdujeron un nuevo aspecto en el metabolismo del azufre. Estos autores encontraron que la enzima 5'aminolevúlico sintetasa, correspondiente al camino biosintético de los tetrapirroles era activada por trisulfocompuestos del tipo de GSSSG y CySSSCy.

La oxigenación de cultivos anaeróbicos producía una disminución de los trisulfuros celulares y una subsiguiente inactivación de la enzima:

REFERENCIAS

- Benson, A.A.; Daniel, H. & Wiser, R. (1959), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 45, 1582.
- Breuker, E. (1964), Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2, 118, 561.
- Chambers, L.A. & Trudinger, P.A. (1971), Arch. Mikrobiol. 77, 165.
- Hansen, T.A. (1974), Doctoral Thesis, University of Groningen, The Netherlands.
- Hansen, T.A. & van Gemerden, H. (1972), Arch. Mikrobiol. 86, 49.
- Hansen, T.A. & Veldkamp. H. (1973), Arch. Mikrobiol. 92, 45.
- Hashwa, F. (1972), Doctoral Thesis, University of Göttingen, Germany.
- Hensel, G. & Trüper, H. (1976), Arch. Microbiol. 109, 101.
- Hurlbert, R.E. (1967), J. Bacteriol. 93, 1346.
- Ibanez, M.L. & Lindstrom, E.S. (1962), J. Bacteriol. 84, 451.
- Knobloch, K.; Eley, J. & Aleem, M.I.H. (1971), Arch. Mikrobiol. 80, 97.
- Larsen, H. (1953), K. Nor. Vidensk. Selsk. Skr. 1, 1.
- Lippert, K.D. (1967), Doctoral Thesis, University of Göttingen, Germany.
- Lippert, K.D. & Pfennig, N. (1969), Arch. Mikrobiol. 65, 29.
- Murphy, M.J. & Siegel, L.M. (1973), J. Biol. Chem. 248, 6911.
- Nicholson, G.L. & Schmidt, G.L. (1971), J. Bacteriol. 105, 1142.
- Paschinger, H.; Paschinger, J. & Gaffron, H. (1974), Arch. Microbiol. 96, 341.
- Peck, H.D., Jr. (1966), Lecture Series on Theoretical and Applied Aspects of Modern Microbiology, pp. 1-22, University of Maryland, College Park.
- Peck, H.D., Jr.; Tedro, S. & Kamen, M.D. (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2404.
- Petrova, E.A. (1959), Mikrobiologiya 28, 814.
- Puchkova, N.N.; Gorlenko, V.M. & Pivovarova, T.A. (1974), Mikrobiologiya 44, 108.

- Rolls, J.P. & Lindstrom, E.S. (1967 a), J. Bacteriol. 94, 784.
- Rolls, J.P. & Lindstrom, E.S. (1967 b), J. Bacteriol. 94, 860.
- Sandy, J.D.; Davies, R.C. & Neuberger, A. (1975), Biochem. J. 150, 245.
- Schmidt, G.L.; Nicholson, G.L. & Kamen, M.D. (1971), J. Bacteriol. 105, 1137.
- Smith, A.J. (1965), Biochem. J. 94, 27P.
- Smith, A.J. (1966), J. Gen. Microbiol. 42, 371.
- Smith, A.J. & Lascelles, J. (1966), J. Gen. Microbiol. 42, 357.
- Thiele, H.H. (1966), Doctoral thesis, University of Göttingen, Germany.
- Thiele, H.H. (1968 a), J. Microbiol. Serol. 34, 341.
- Thiele, H.H. (1968 b), J. Microbiol. Serol. 34, 350.
- Trüper, H.G. (1964 a), J. Microbiol. Serol. 30, 385.
- Trüper, H.G. (1964 b), Arch. Mikrobiol. 49, 23.
- Trüper, H.G. & Jannasch, H.W. (1968), Arch. Mikrobiol. 61, 363.
- Trüper, H.G. & Peck, H.D., Jr. (1970), Arch. Mikrobiol. 73, 125.
- Trüper, H.G. & Pfennig, N. (1966), J. Microbiol. Serol. 32, 261.
- Trüper, H.G. & Rogers, L.A. (1971), J. Bacteriol. 108, 1112.
- Trüper, H.G. & Schlegel, H.G. (1964), J. Microbiol. Serol. 30, 225.
- van Gemerden, H. (1967), Doctoral Thesis, University of Leiden, The Netherlands.
- van Gemerden, H. (1968), Arch. Mikrobiol. 64, 118.
- van Niel, C.B. (1931), Arch. Mikrobiol. 3, 1.
- van Niel, C.B. (1936), Arch. Mikrobiol. 7, 323.
- van Niel, C.B. (1944), Bacteriol. Rev. 8, 1.
- Wood, B.J.B.; Nichols, B.W. & James, A.T. (1965), Biochim. Biophys. Acta 106, 261.
- Yoch, D.C. & Lindstrom, E.S. (1971), J. Bacteriol. 106, 700.

CAPITULO XII

METABOLISMO DEL CARBONO

XII.1. Introducción

XII.2. Ciclo de Calvin en bacterias fotótrofas

XII.2.1. Consideraciones generales

XII.2.2. Evidencias de la existencia del ciclo de Calvin
en Chromatiaceae

XII.2.3. Evidencias de la existencia del ciclo de Calvin
en Rhodospirillaceae

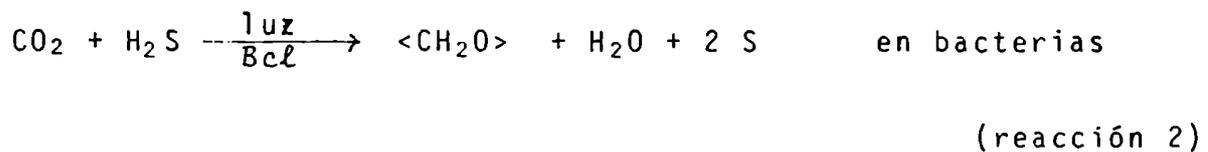
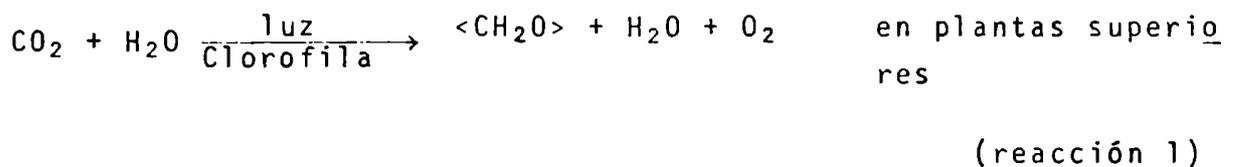
XII.2.4. Metabolismo del carbono en Chlorobiaceae

XII.2.5. Ribulosa Difosfatasa Carboxilasa

XII. METABOLISMO DEL CARBONO

XII.1. Introducción

Las publicaciones de van Niel de 1930, 1931 y 1935 constituyen el punto de partida de los estudios bioquímicos de la fijación de CO₂. Estos trabajos no sólo explican la bioquímica de las bacterias fotosintéticas sino que también comparan la fotosíntesis bacteriana con la de las algas y plantas superiores. Van Niel expresó la analogía de este proceso con dos ecuaciones simples:



El estudio del metabolismo del carbono en bacterias fotosintéticas es vital para el entendimiento del proceso de fotosíntesis. No sólo existe fijación y reducción de CO₂ sino también fotoasimilación de compuestos orgánicos, anaeróbicamente y crecimiento aeróbico en la oscuridad. En otras palabras, las bacterias fotosintéticas muestran un fuerte control metabólico y en consecuencia, regulación enzimática.

Existen numerosos estudios acerca de la fotoasimilación del carbono en bacterias, siendo algunos de los más importantes los publicados por van Niel (1941, 1944, 1954, 1957), Gest (1951), Stanier (1961), Elsdén (1962), Pfennig (1967), Fuller (1971) y Wiessner (1970).

A pesar de que existen más de 50 especies conocidas y descriptas de bacterias fotosintéticas, el estudio detallado de la fotoasimilación del carbono se ha realizado en unas pocas de ellas.

Todas las bacterias fotótrofas estudiadas hasta el momento pueden fijar el CO₂ por medio del ciclo de Calvin o ciclo reductivo de las pentosas.

La Figura 12.1 representa el ciclo de Calvin según actúa en plantas verdes, mostrando particularmente la relación entre este ciclo y otros mecanismos biosintéticos (Bassham y Kirk, 1969).

XII.2. Ciclo de Calvin en bacterias fotótrofas

XII.2.1. Consideraciones generales

Existen dos mecanismos de fijación de CO_2 relacionados con la fotosíntesis:

- 1) el ciclo de Calvin o ciclo reductivo de las pentosas, el cual no sólo fija y reduce el CO_2 , sino que también, mediante un mecanismo cíclico, regenera el sustrato ribulosa difosfato (RuDP) para una carboxilación posterior del mismo;
- 2) reacciones adicionales de fijación de CO_2 mediante el uso de compuestos reducidos como sustratos, los cuales son productos directos del ciclo de Calvin.

Las carboxilaciones individuales y aún los ciclos adicionales funcionarían como secuencias metabólicas aditivas para la síntesis celular pero son completamente dependientes de los intermediarios del ciclo de Calvin, los cuales son utilizados como sustratos.

La existencia de un camino o ciclo metabólico que funcione *in vivo* surge de las evidencias u observaciones obtenidas a partir de diversos hechos experimentales, entre ellos: necesidad metabólica de la presencia de dicho camino, existencia de cantidades razonables de las enzimas requeridas, análisis cinético de las reacciones y regulación de las enzimas en cuestión.

Las bacterias fotosintéticas constituyen un material experimental excelente para estos estudios, especialmente mediante el uso de $^{14}\text{CO}_2$ y de los mecanismos rápidos "switch" utilizando la luz y las condiciones de crecimiento como reguladoras.

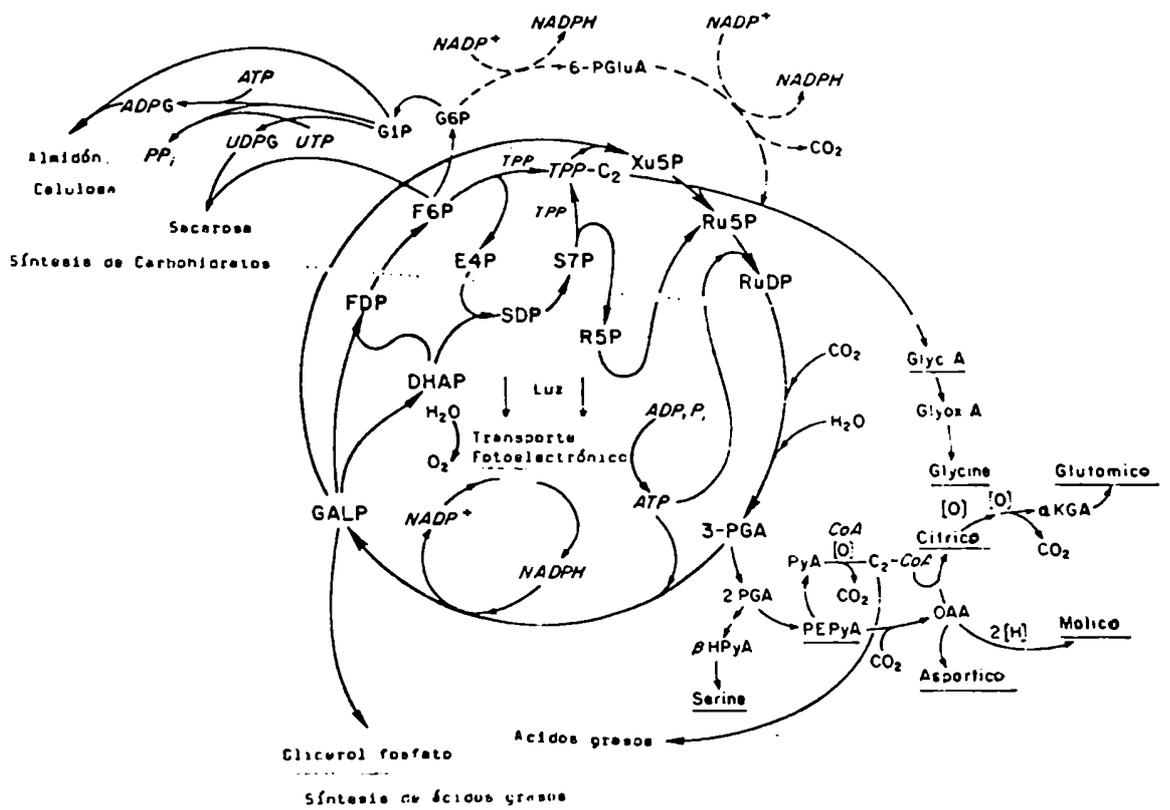


FIGURA 12.1.: Ciclo de Calvin o ciclo reductivo de las pentosas. Esta representación muestra el ciclo regenerativo y su relación con otros caminos biosintéticos (Bassham y Kirk, 1969).

XII.2.2. Evidencias de la existencia del ciclo de Calvin en Chromatiaceae

En todas las especies de Chromatiaceae investigadas se han encontrado fuertes evidencias del funcionamiento *in vivo* del ciclo de Calvin.

Los esquemas y resultados que se presentarán a continuación, demuestran la existencia de un mecanismo bioquímico altamente selectivo, que es utilizado por los organismos para la reproducción de sus componentes celulares en condiciones ambientales particulares.

A pesar de que las bacterias fotosintéticas acumulan productos tales como glicógeno (Hara et al, 1973) o poli- β -hidroxi butirato, el rol más importante no es la síntesis de estos compuestos sino la formación rápida de metabolitos necesarios para la síntesis de proteínas, lípidos y otras sustancias así como también el desarrollo y la reproducción celular.

El esquema correspondiente al ciclo del carbono en *Chr. vinosum* se ilustra en la Figura 12.2.

La fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en *Chr. vinosum* cepa D crecida autotróficamente muestra un porcentaje decreciente en la incorporación total de ^{14}C en ácido fosfoglicérico (AFG), indicando la carboxilación primaria de la RuDP, y un porcentaje creciente en la acumulación de ^{14}C en productos secundarios de dicha fijación. En estas experiencias tal incorporación "negativa" se observó también para el ácido aspártico pareciendo ser el resultado de una activa carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) a oxalacetato y su subsiguiente transaminación a aspartato. Esto es típico de las carboxilaciones especializadas que permiten a este organismo una incorporación rápida de carbono en aminoácidos y ácidos grasos, para la síntesis de productos utilizados para un crecimiento eficiente. *Chr. vinosum* cepa D posee un pool considerable de aspartato como fuente de carbono básica para tales reacciones.

La enzima RuDP-carboxilasa se encuentra inhibida en un 50-90% cuando las células de *Chr. vinosum* D se hacen crecer en condiciones fotoheterótroficas. Las enzimas del ciclo de Krebs involucradas en los pasos de producción de ATP (málico deshidrogenasa y α -cetoglutarico oxidasa) se hallan ausentes.

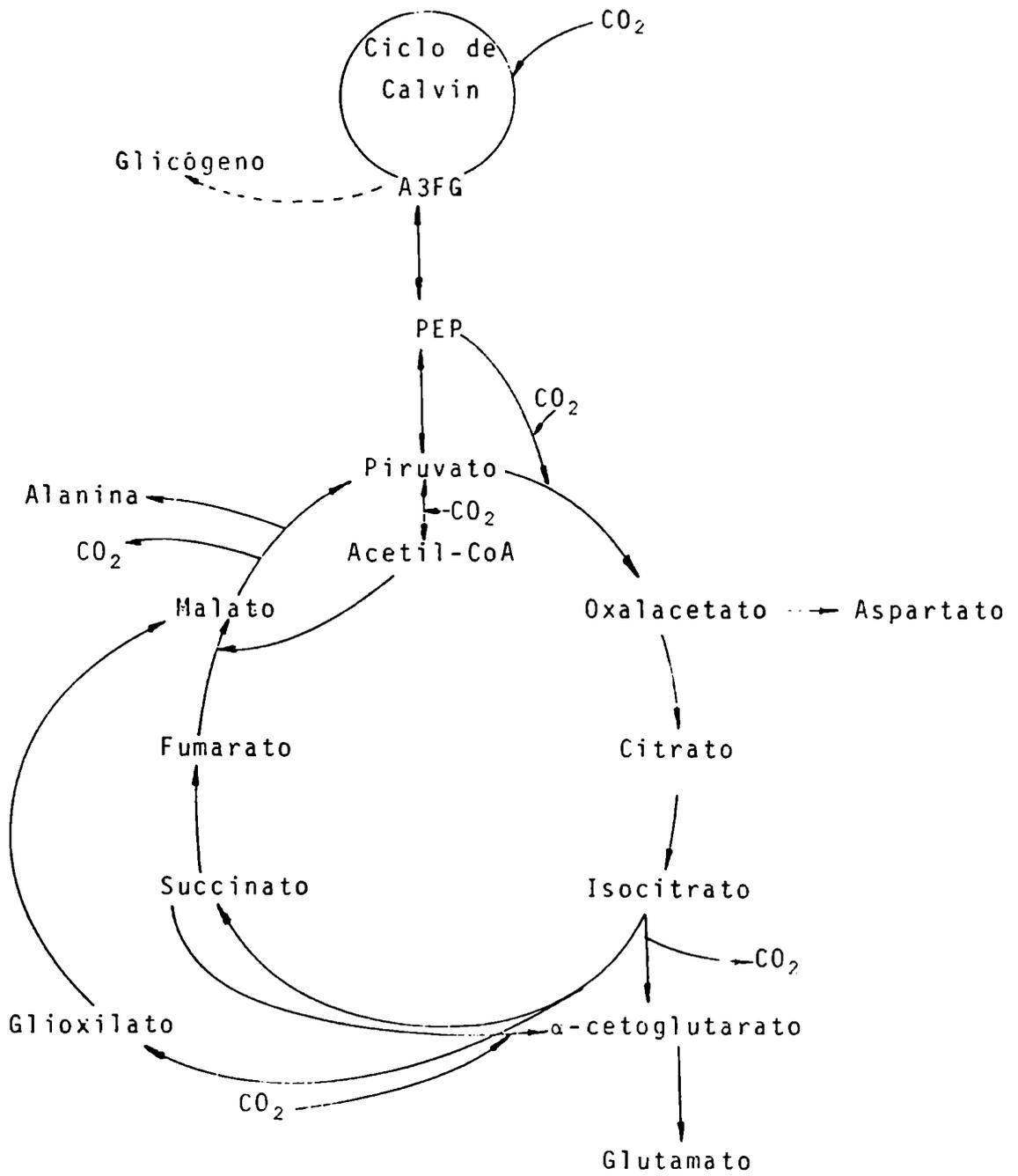


FIGURA 12.2.: Ciclo del carbono en *Chromatium vinosum* cepa D

Es importante hacer notar que en éste, así como en otros caminos metabólicos en bacterias fotosintéticas, todas las carboxilaciones y pasos biosintéticos no operan simultáneamente. Por ejemplo, el ciclo del glioxilato ocurre sólo cuando las células se hacen crecer en acetato como una única fuente de carbono y están inhibidas las enzimas del ciclo de Calvin.

Existen otros dos organismos de esta familia que también ya han sido estudiados: *Chr. okenii* (Pfennig y Trüper, 1974) y *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (Firsov et al, 1974). En estos organismos, así como en *Chr. vinosum*, las enzimas del ciclo de Calvin se hallan bajo control metabólico. Sin embargo, a diferencia de *Chr. vinosum* poseen un ciclo de glioxilato normal, incluyendo la enzima málico deshidrogenasa, el cual se halla deprimido cuando las células crecen en presencia de acetato. Estos organismos carecen de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa y por ende, del ciclo de Krebs.

XII.2.3. Evidencias de la existencia del ciclo de Calvin en Rhodospirillaceae

Estudios de incorporación de ^{14}C indicaron que el producto primario de la fijación autotrófica de CO_2 en *Rs. rubrum* es el 3-APG.

La presencia de las enzimas del ciclo de Calvin y la regulación de las mismas indica que el camino del carbono en *Rs. rubrum* durante el metabolismo autotrófico, involucra la fijación de CO_2 vía dicho ciclo, existiendo a su vez numerosas carboxilaciones adicionales.

Anderson y Fuller (1967 a - c) estudiaron el nivel de varias enzimas del ciclo de Calvin, en *Rs. rubrum* crecida en condiciones fotoautotróficas (a la luz y con CO_2 como única fuente de carbono) y fotoasimilatorias en presencia de acetato y malato, así como también en oscuridad y aerobiosis. El nivel de estas enzimas producía un camino diferente de incorporación de $^{14}\text{CO}_2$, dependiendo éste de las condiciones ambientales de crecimiento. *Rs. rubrum* puede crecer aeróbicamente en la oscuridad; esto implica que el ciclo de Krebs funciona perfectamente en esta situación. Es interesante hacer notar que este ciclo puede actuar también bajo condiciones anaeróbicas. El metabolismo de

Rs. rubrum es muy diferente al de *Chromatium*, en el cual faltan las enzimas del ciclo de Krebs y se induce un ciclo de glioxilato modificado, cuando las células crecen anaeróbicamente a la luz en presencia de acetato.

Se concluye entonces que en *Rs. rubrum* el ciclo de Calvin funciona como una ruta primaria de incorporación y reducción de CO_2 . El metabolismo adicional, que incluye el ciclo de Krebs, proviene de las necesidades de estos microorganismos.

Kondrat'eva (1974) estudió el metabolismo del carbono en *Rp. palustris*. La asimilación del CO_2 procede a través del ciclo de Calvin y se halla complementado por la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP). Así como *Rs. rubrum*, este microorganismo es aeróbico facultativo y puede crecer a la luz en presencia de acetato y a la oscuridad bajo condiciones aeróbicas.

La fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en *Rp. palustris* se halla estimulada por el acetato, pero sólo en cultivos crecidos a la luz.

En este microorganismo se encuentran presentes todas las enzimas del ciclo del glioxilato así como también las correspondientes al ciclo de Krebs.

Si *Rs. rubrum* crece con acetato como única fuente de carbono, el acetato se convierte en poli- β -hidroxibutirato y se acumula. En cambio, en presencia de CO_2 , el acetato se incorpora al ciclo de los ácidos tricarbónicos. Así, ambos caminos de fijación de CO_2 y de fotoasimilación del acetato son significativamente diferentes en ambos organismos tan íntimamente relacionados.

En la Figura 12.3. se encuentra el camino propuesto por Kondrat'eva (1974) para *Rp. palustris*.

La comparación de los metabolismos de estas dos Rhodospirillaceae enfatiza no sólo las diferencias existentes en los caminos biosintéticos y su maquinaria enzimática sino también el rol importante que cumplen las condiciones de crecimiento.

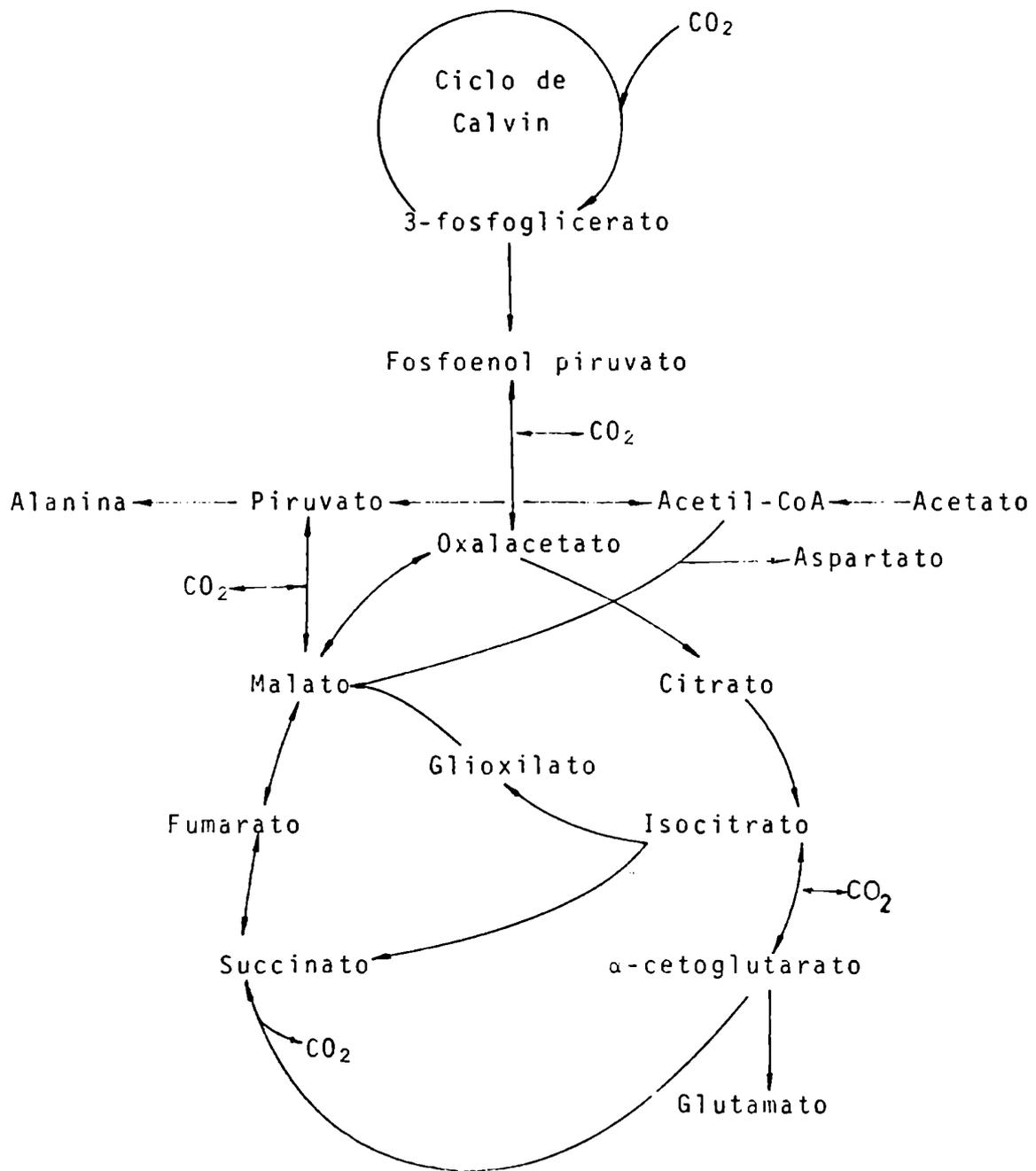


FIGURA 12.3.: Ciclo del carbono en *Rhodospseudomonas palustris* (Kondrat'eva, 1974)

XII.2.4. Metabolismo del carbono en Chlorobiaceae

El primer trabajo de asimilación del carbono en bacterias verdes fue realizado por Larsen (1951, 1952). En base a experiencias de fijación de $^{14}\text{CO}_2$, propuso una carboxilación del propionato a succinato.

La primer evidencia de la presencia de las enzimas del ciclo de Calvin fue descripta por Smillie y Fuller (1960) y Smillie et al (1962).

Sadler y Stanier (1960) estudiaron la asimilación del acetato en bacterias verdes. Estos investigadores demostraron que el acetato podía ser incorporado a componentes celulares durante el crecimiento a la luz; a diferencia de la situación en las bacterias purpúreas, esta incorporación era dependiente de la presencia de CO_2 .

Las enzimas del ciclo de Krebs también se hallan presentes y se sugirió entonces un mecanismo no cíclico de asimilación de CO_2 , dependiente de acetato más CO_2 (Fuller, 1978).

Evans et al (1966) propusieron en *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum* un nuevo ciclo reductivo, dependiente de ferredoxina reducida, denominado ciclo reductivo del ácido carboxílico (Figura 12.4.). Uno de los hechos principales que llevaron a la conclusión de que este ciclo constituía el mejor camino para la incorporación de CO_2 , fue la ausencia de RuDP carboxilasa en *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum* cepa Tassajara.

Las experiencias de fijación de CO_2 realizadas por Buchanan et al (1972) indicaron que el $^{14}\text{CO}_2$ se incorporaba primariamente en aminoácidos, en particular ácido glutámico en *Chlorobium*.

Existen evidencias acerca de la presencia de varias enzimas del ciclo reductivo del ácido carboxílico en *Chr. vinosum* y *Rs. rubrum* (Buchanan et al, 1967). Es difícil de entender que exista una necesidad metabólica de este ciclo en bacterias purpúreas mientras las enzimas del ciclo de Calvin se hallan desinhibidas bajo condiciones de crecimiento fotoautotrófico.

Uno de los mayores argumentos contra la existencia del ciclo reductivo del ácido carboxílico en bacterias verdes se basa en los trabajos de Hoare y Gibson (1964) que muestran que el

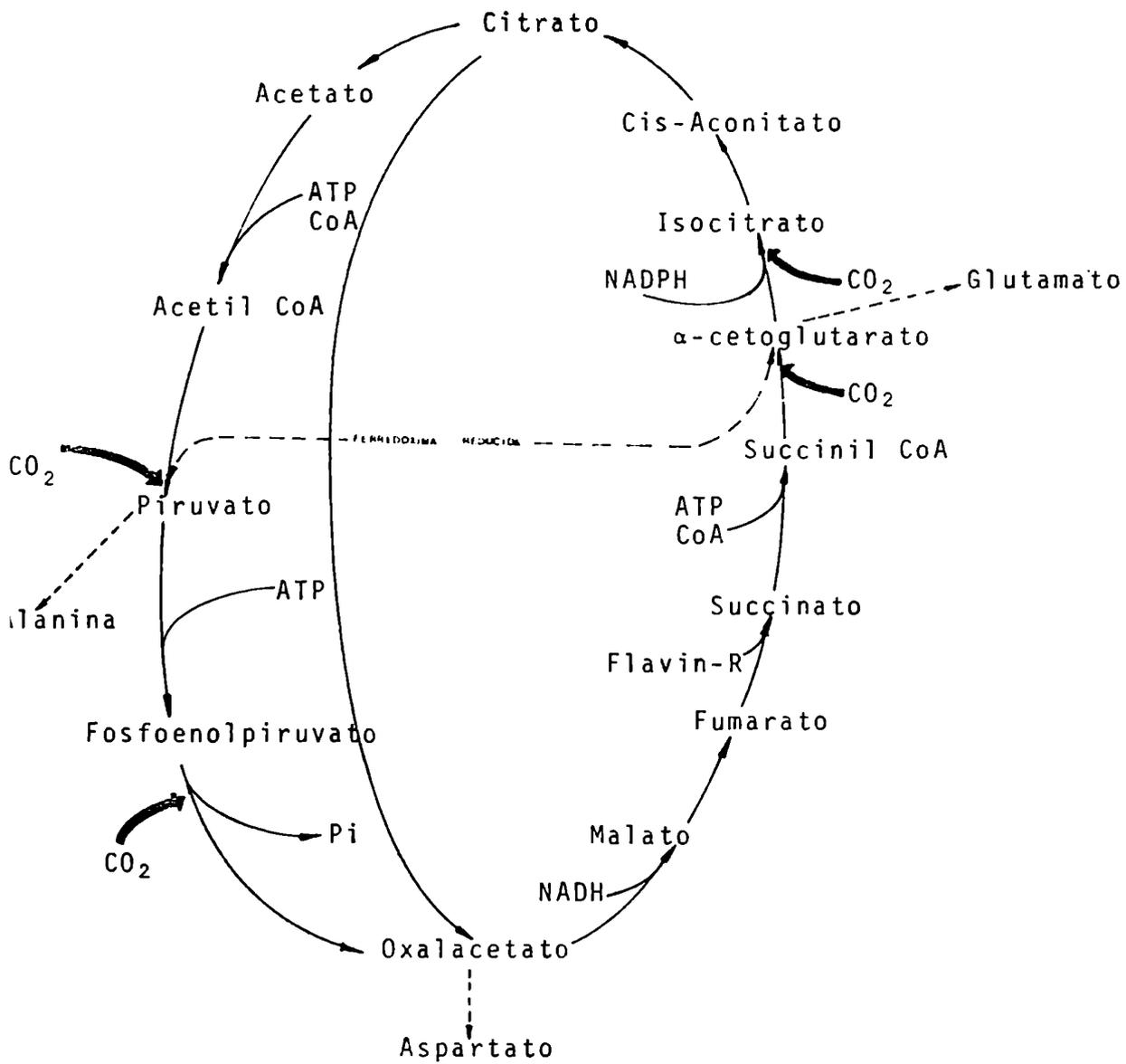


FIGURA 12.4.: Ciclo de Arnon o ciclo reductivo del ácido carboxílico (Evans et al, 1966)

carboxilo terminal del glutamato deriva del grupo carboxilo correspondiente al (^{14}C)acetato durante la fotosíntesis. Estos hallazgos son incompatibles con la acción del ciclo antes mencionado. Otra de las evidencias contra el ciclo reductivo del ácido carboxílico es el aislamiento y caracterización de la enzima RuDP carboxilasa de *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum* cepa Tassajara (Tabita et al, 1974). Es una enzima sumamente inestable lo cual explicaría la baja actividad o la ausencia de la misma hallada por otros investigadores.

En cuanto a las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, la citrato sintetasa se halla presente en las bacterias purpúreas y verdes. La citrato liasa ha sido encontrada solamente en *Rp. gelatinosa*, una de las pocas bacterias fotosintéticas que utilizan el ácido cítrico como fuente de carbono (Schaab et al, 1972).

Beuscher y Gottschalk (1972) demostraron que mientras la citrato sintetasa se encuentra presente en *Rs. rubrum* y *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum*, la citrato liasa no es detectable en otros microorganismos.

Existen entonces dos posibles formas de asimilación de CO_2 en bacterias fotosintéticas:

- 1) fotoasimilación autotrófica de CO_2 vía ciclo de Calvin;
- 2) coexistencia de dos ciclos: el de Calvin y el reductivo del ácido carboxílico.

Si se demuestra finalmente que la presencia de RuDP-carboxilasa no es general, se deberá proponer entonces algún nuevo mecanismo de fijación de CO_2 .

Sin embargo, la presencia de RuDP-carboxilasa y la ausencia de citrato liasa en bacterias verdes, sumado a otras evidencias negativas, hace pensar que es muy poco probable que el ciclo reductivo del ácido carboxílico sea el ciclo regenerador de carbono, de éstas y otras bacterias fotosintéticas.

XII.2.5. Ribulosa Difosfato Carboxilasa

La RuDP carboxilasa juega un rol sumamente importante tanto en la fotosíntesis bacteriana como en la de las plantas. Es una enzima que se encuentra bajo control metabólico y que desempeña una función vital en la regulación del funcionamiento del ciclo de Calvin. La presencia o ausencia de su actividad se ha utilizado como argumento en favor o no de la existencia del mecanismo de fijación y reducción de CO_2 .

Andrews et al (1973) informaron que esta enzima actuaría en algas, plantas y bacterias fotosintéticas como una carboxilasa o una oxigenasa. Estos autores mostraron que el 2,3-enediol de RuDP podía ser clivado tanto por la adición de O_2 como por la de CO_2 . Las dos reacciones propuestas se muestran en la Figura 12.5.

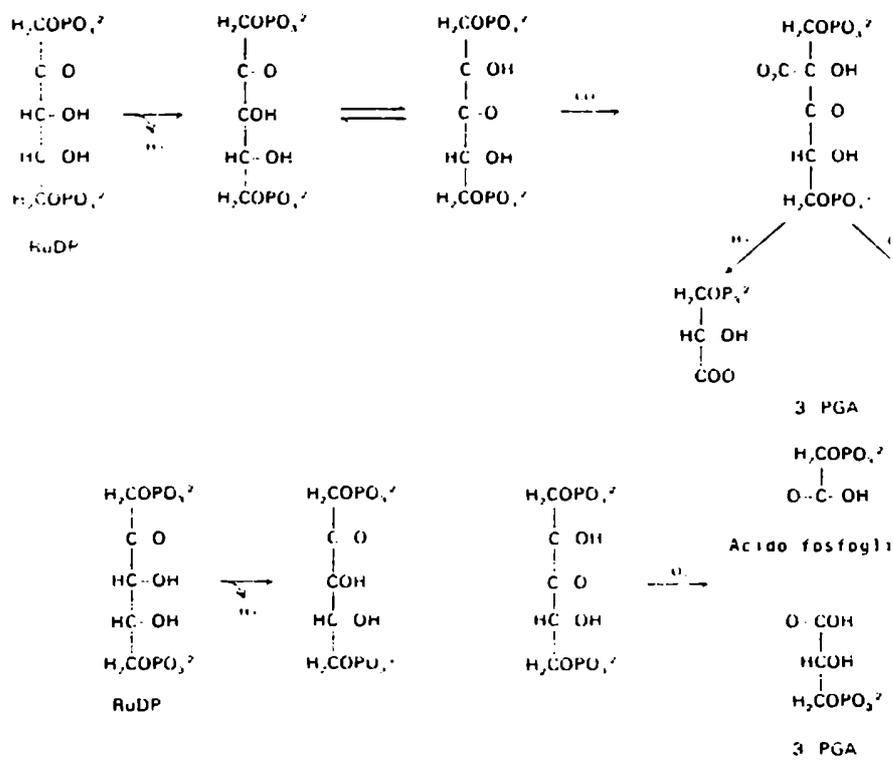


FIGURA 12.5.: Carboxilación (A) y oxigenación (B) de la ribulosa difosfato (RuDP)

REFERENCIAS

- Anderson, L. & Fuller, R.C. (1967 a), *Biochim. Biophys. Acta* 131, 198.
- Anderson, L. & Fuller, R.C. (1967 b), *Plant Physiol.* 42, 487.
- Anderson, L. & Fuller, R.C. (1967 c), *Plant Physiol.* 42, 491.
- Andrews, T.J.; Lorimen, G.H. & Tolbert, N.E. (1973), *Biochemistry*, 12, 11.
- Bassham, J.A. & Kirk, M. (1969), *Comparative Biochemistry of Photosynthesis* (K. Schibata, A. Takamiya, A.T. Jagendorf y R.C. Fuller, eds.), p. 365, University of Tokyo Press.
- Beuscher, N. & Gottschalk, C. (1972), *Z. Naturforsch.* 27b, 965.
- Buchanan, B.B.; Evans, M.C.W. & Arnon, D.I. (1967), *Arch. Mikrobiol.* 59, 32.
- Buchanan, B.B.; Shürmann, P. & Shanmugan, R.T. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 283, 136.
- Elsdén, S.R. (1962), *The Bacteria*, Vol. III (I.C. Gunsalus y R.Y. Stanier, eds.), p.1., Academic Press, New York.
- Evans, M.C.W.; Buchanan, B.B. & Arnon, D.I. (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55, 928.
- Firsov, N.N.; Chernjadiev, I.; Ivanovsky, R.N.; Kondrat'eva, E.N.; Vdovina, N.V. & Doman, N.G. (1974), *Mikrobiologiya* 43, 214.
- Fuller, R.C. (1971), *Biochemical Evolution and the Origin of Life*, p. 259, North-Holland, Amsterdam.
- Fuller, R.C. (1978), *The Photosynthetic Bacteria* (R.K. Clayton y W.R. Sistrom, eds.) Chapter 36, pp. 691-705, Plenum Press, New York-London.
- Gest, H. (1951), *Bacteriol. Rev.* 15, 183.
- Hara, F.; Akazawa, T. & Kojima, K. (1973), *Plant Cell Physiol.* 14, 737.
- Hoare, D.S. & Gibson, J. (1964), *Biochem. J.* 91, 546.
- Kondrat'eva, E.N. (1974), *Usp. Mikrobiol.* 9, 44.
- Larsen, H. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 167.

- Larsen, H. (1952), *J. Bacteriol.* 64, 187.
- Pfennig, N. (1967), *Annu. Rev. Microbiol.* 21, 285.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1974), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. (R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, eds.), Williams y Wilkins, Baltimore.
- Sadler, W.R. & Stanier, R.Y. (1960), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 146, 1328.
- Schaab, C.; Giffhorn, F.; Schobert, S.; Pfennig, N. & Gottschalk, G. (1972), *Z. Naturforsch.* 27, 962.
- Smillie, R.M. & Fuller, R.C. (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 368.
- Smillie, R.M.; Rigopoulos, N. & Kelly, H. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 56, 612.
- Stanier, R.Y. (1961), *Bacteriol. Rev.* 25, 1.
- Tabita, F. R. ; Mc Fadden, B.A. & Pfennig, N. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 341, 187.
- van Niel, C.B. (1930), *Contributions to Marine Biology*, p. 161, Stanford University Press, Stanford, California.
- van Niel, C.B. (1931), *Arch. Mikrobiol.* 3, 138.
- van Niel, C.B. (1935), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 3, 138.
- van Niel, C.B. (1941), *Advances in Enzymology Vol. VI* (F.F. Nord, ed.), p. 263, John Wiley & Sons, New York - London - Sydney.
- van Niel, C.B. (1944), *Bacteriol. Rev.* 8, 1.
- van Niel, C.B. (1954), *Annu. Rev. Microbiol.* 8, 105.
- van Niel, C.B. (1957), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., p: 35, Williams y Wilkins, Baltimore.
- Wiessner, W. (1970), *Photobiology of Microorganisms* (P. Halldal, ed.), pp. 95-135, Wiley - Interscience, London - New York.

CAPITULO XIII

METABOLISMO DE COMPUESTOS ORGANICOS NO AROMATICOS

XIII.1. Introducción

XIII.2. Utilización de compuestos orgánicos por las bacterias verdes sulfúreas

XIII.3. Metabolismo del carbono en miembros de la familia Chromatiaceae

XIII.3.1. Metabolismo del acetato

XIII.3.2. Utilización de los materiales de reserva en la oscuridad

XIII.4. Utilización de compuestos orgánicos por bacterias purpúreas no sulfúreas

XIII.4.1. Glucosa y fructosa

XIII.4.2. Glutamato y citrato

XIII.4.3. Glicerol

XIII.4.4. Acetato

XIII.4.5. Utilización de otros compuestos

XIII. METABOLISMO DE COMPUESTOS ORGANICOS NO AROMATICOS

XIII.1. Introducción

Este capítulo tratará de la utilización de compuestos carbonados no aromáticos en bacterias fotosintéticas, bajo condiciones anaeróbicas, a la luz y aeróbicas, en oscuridad.

Los propósitos primarios de los estudios realizados acerca de la utilización de fuentes carbonadas en bacterias fotosintéticas se centralizan en tres puntos fundamentales:

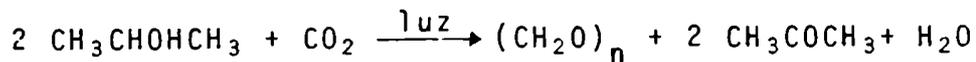
- 1) comprobar si el uso de compuestos orgánicos en la síntesis celular posee significado taxonómico;
- 2) verificar si existen bacterias fotosintéticas autótrofas obligadas;
- 3) estudiar el rol que desempeñan los compuestos orgánicos en el mecanismo de la fotosíntesis bacteriana.

Gaffron (1933, 1935) inició la investigación acerca de la función de los sustratos orgánicos en el crecimiento de las Rhodospirillaceae. Estos organismos, a diferencia de las Chlorobiaceae y Chromatiaceae requieren ordinariamente sustratos orgánicos para el crecimiento fotosintético anaeróbico. Gaffron encontró que cuando el sustrato orgánico se hallaba más oxidado que el material celular resultante, se producía CO_2 mientras que el crecimiento, en presencia de compuestos orgánicos más reducidos tenía lugar con un consumo del mismo. Con estos estudios, Gaffron descubrió el fotometabolismo reductivo del acetato con hidrógeno, en ausencia de CO_2 . Su interpretación de estos hallazgos fue, que el carbono del acetato era directamente asimilado a material celular sin convertirse previamente a CO_2 .

Van Niel (1936) interpretó estos resultados en forma diferente ya que concluyó que el sustrato orgánico funcionaba primariamente como un foto-reductor del CO_2 . Este autor opinaba que el CO_2 podría derivar de un sustrato orgánico y posteriormente incorporarse en el material celular mediante el mecanismo fotosintético de fijación de CO_2 .

Foster (1940) describió la oxidación incompleta, dependiente de luz del isopropanol acompañada por la reducción del

CO₂ a material celular. En esta situación, el isopropanol se convertía cuantitativamente en acetona, con reducción simultánea del CO₂, de acuerdo con la siguiente ecuación:



(reacción 1)

Así, se observa que el isopropanol actúa exclusivamente como un dador de hidrógenos para la reducción fotoquímica del CO₂. Los hallazgos de Gaffron (1935) acerca de miembros de las Rhodospirillaceae que pueden crecer autotróficamente en CO₂ con hidrógeno como reductor, parecen apoyar las hipótesis de van Niel, según las cuales el rol de los sustratos orgánicos en la fotosíntesis bacteriana, es primariamente el de dador de hidrógenos para las reacciones de fijación de carbono.

• Cuando *Rs. rubrum* crece anaeróticamente a la luz, en presencia de ¹⁴CO₂ y acetato o ¹⁴(C)acetato y CO₂, el ¹⁴C se incorpora a las proteínas celulares (Cutinelli et al, 1951).

Sin embargo, Ormerod (1956) observó que la fijación de CO₂ en *Rs. rubrum* se hallaba suprimida en presencia de acetato. Este mismo autor encontró que células "en reposo" de *Rs. rubrum* fotometabolizaban butirato en presencia de ¹⁴CO₂, existiendo un consumo completo del sustrato orgánico durante la incorporación celular de ¹⁴CO₂. Dado que la cantidad de ¹⁴CO₂ incorporada coincide exactamente con la determinación manométrica del consumo de CO₂, estos resultados sugieren que el butirato se incorpora a las células sin ser convertido previamente en CO₂.

Estudios realizados por Elsdén y Ormerod (1956) en presencia del inhibidor metabólico fluoroacetato sugirieron que a pesar de que el ciclo de los ácidos tricarbónicos funcionaba durante el metabolismo aeróbico, en la oscuridad, en *Rs. rubrum*, varios de estos compuestos orgánicos (propionato, succinato, fumarato, malato) no se oxidaban a CO₂ bajo condiciones anaeróbicas a la luz. Así, en estos casos parecería no cumplirse la teoría de van Niel de la completa oxidación de los sustratos orgánicos para generar poder reductor. Como resultado de estas experiencias, aún existen dudas acerca del rol desempeñado por estos compuestos en bacterias fotosintéticas.

Stanier et al (1959) presentaron evidencias de una fotosimilación directa de fuentes orgánicas de C, demostrando la incorporación de carbono exógeno en uno o dos de los materiales de reserva, cuando la velocidad de consumo de la fuente carbonada excede la velocidad de síntesis celular. Los sustratos orgánicos metabolizados directamente a unidades acetilo (acetato y butirato) dan origen generalmente al ácido poli- β -hidroxibutírico mientras que los compuestos metabolizados a piruvato (succinato, malato, propionato) contribuyen primariamente a la formación de polisacáridos de reserva.

Actualmente se ha llegado a la conclusión de que la función primaria de los sustratos orgánicos en la fotosíntesis, realizada por especies de Chromatiaceae y Rhodospirillaceae, es la de servir como fuente de carbono asimilable, como fuera sugerido por Gaffron, y no exclusivamente como fuente de poder reductor para la fijación de CO₂, según lo postulado por van Niel.

Sin embargo, existen casos especiales en los cuales sustratos orgánicos tales como ciertos alcoholes sirven específicamente como fotorreductores para la fijación de CO₂ (Foster, 1940; 1944).

XIII.2. Utilización de compuestos orgánicos por las bacterias verdes sulfúreas

Se han descrito especies de la familia Chlorobiaceae anaeróbicas obligatorias y absolutamente dependientes, para su crecimiento, de la luz, del CO₂ y del hidrógeno o de algún compuesto inorgánico de azufre oxidable.

En otras palabras, estos organismos pueden ser considerados fotoautótrofos obligados que requieren la fijación de CO₂ para su desarrollo. Sin embargo, existen considerables evidencias de que estos organismos pueden utilizar compuestos orgánicos simples. En ningún caso estas sustancias pueden reemplazar el requerimiento por el CO₂ y por el reductor inorgánico.

Las bases metabólicas para el crecimiento autotrófico obligado (en fotótrofos y quimiótrofos) constituyen un tema ampliamente investigado. La bacteria quimiolitotrófica *Thiobacillus thiooxidans* es incapaz de crecer en glucosa, debido a la acumulación de productos tóxicos en el medio cuando se desarrolla con este azúcar (Borichewski y Umbreit, 1966).

Smith et al (1967) estudiaron el crecimiento autotrófico

obligado en algas azul-verdosas. Estos autores encontraron un ciclo de Krebs incompleto. La enzima α -ceto glutarato deshidrogenasa se halla ausente y existen bajos niveles de málico y succínico deshidrogenasa. Esta deficiencia enzimática impide el normal desarrollo del ciclo de Krebs pero permite el funcionamiento de caminos anabólicos relacionados.

Hay ejemplos de algas azul-verdosas fotolitotróficas obligadas en las cuales parecen no existir las deficiencias metabólicas antes descritas. Carr (1973) sugirió que estos organismos serían fotótrofos obligados simplemente por carecer de flexibilidad metabólica para responder a la presencia de sustratos orgánicos exógenos.

Se ha observado que algunos miembros del género *Chlorobium* son incapaces de crecer a expensas de compuestos orgánicos cedidos por el medio de cultivo (van Niel, 1931; Sadler y Stanier, 1960). Sin embargo, Sadler y Stanier (1960) mostraron que *Chlorobium limicola* podía desarrollarse en presencia de bajas concentraciones de propionato, piruvato, lactato, glucosa, glutamato y especialmente acetato. En este último caso, se demostró una incorporación del 93% del carbono en material celular, después de 6 días de crecimiento. La cantidad de acetato asimilado por las células era estrictamente dependiente del CO_2 y del sulfuro suministrado. Estos hallazgos explican claramente que este organismo, a pesar de poder obtener el carbono a partir del acetato, es un fotoautótrofo obligado dado su absoluto requerimiento de fijación de CO_2 para el crecimiento. Sadler y Stanier concluyeron que *Chr. limicola* carecía de la capacidad enzimática para oxidar el acetato impidiendo así su utilización para generar CO_2 o poder reductor.

Hoare y Gibson (1964) encontraron que la fotoasimilación del acetato en *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum* dependía de la presencia de bicarbonato y de una fuente externa de poder reductor. Además, no pudieron detectar poli- β -hidroxibutirato aún en condiciones de crecimiento con acetato, que serían suficientes para producir la síntesis de este material de reserva en *Rs. rubrum*. Tanto el (1- ^{14}C) acetato como el (2- ^{14}C) acetato se incorporaban en los aminoácidos de estas células.

XIII.3. Metabolismo del carbono en miembros de la familia Chromatiaceae

Las bacterias purpúreas sulfúreas son capaces de crecer anaeróbicamente a la luz, a expensas de compuestos orgánicos o autotróficamente mediante la fijación de CO₂, empleando compuestos reducidos de azufre o H₂ como dadores de electrones (van Niel, 1936, 1944; Muller, 1933). La mayoría de estos organismos son incapaces de crecer como quimiótrofos con compuestos orgánicos en la oscuridad, y por lo tanto, son considerados fotótrofos obligados. Sin embargo, *Thiocapsa roseopersicina* puede crecer microaerofílicamente en la oscuridad.

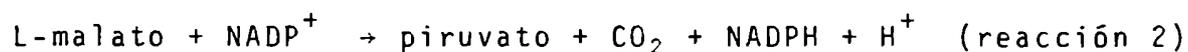
Existe un número considerable de fuentes de carbono, incluyendo alcoholes, ácidos grasos, aminoácidos y carbohidratos, que son utilizados por las especies de *Chromatium* en presencia de CO₂ (Muller, 1933; Gaffron, 1934). Es muy posible que el CO₂ no sea un requisito para la utilización de muchas fuentes de carbono. Según Muller (1933) los sustratos más oxidados que el material celular dan origen a CO₂, mientras que el crecimiento con sustratos más reducidos requiere la fijación del CO₂ acoplada a la oxidación del sustrato. Parece ser que el rol del CO₂ en cultivos de bacterias purpúreas sulfúreas que crecen en presencia de compuestos orgánicos, es el de un "depósito de electrones" que provee una salida para remover el exceso de poder reductor (Gaffron, 1935; Stanier, 1961).

XIII.3.1. Metabolismo del acetato

Losada et al (1960) informaron acerca del crecimiento de una cepa inespecífica de *Chr. vinosum* en acetato, en ausencia de CO₂. Utilizando (¹⁴C)-acetato, estos autores no encontraron incorporación significativa de carbono marcado, en la oscuridad, mientras que a la luz el acetato era directamente fotosintetizado a material celular, detectándose en aminoácidos, especialmente ácido glutámico. Estos investigadores hallaron evidencias de que la primera etapa en dicha incorporación era la formación de acetyl CoA, ATP dependiente, la cual podía condensarse con una variedad de moléculas sintetizando así el material celular.

Losada et al (1960) también encontraron pruebas de la condensación del acetyl-CoA con oxalacetato para formar citrato.

Cuando *Chromatium vinosum* cepa D se hace crecer en presencia de acetato como fuente de carbono, este organismo posee dos enzimas fundamentales del ciclo del glioxilato: isocitrato liasa y malato sintetasa (Fuller et al, 1961). La primera parece ser inducible, exhibiendo una alta actividad específica en células crecidas en acetato pero no en las desarrolladas en malato o bajo condiciones autotróficas, mientras que la malato sintetasa aparece como una enzima constitutiva. Debido a la ausencia de la malato deshidrogenasa, no podría funcionar el ciclo del glioxilato en estos organismos. Sin embargo, este bloqueo aparente está compensado con dos reacciones adicionales: una descarboxilación oxidativa, NADP dependiente, de malato a piruvato y una carboxilación, ATP dependiente, del piruvato a oxalacetato.



Estas reacciones junto con la de la citrato sintetasa, hacen posible entonces el funcionamiento completo del ciclo del glioxilato en células crecidas en acetato (Losada et al, 1960).

Hurlbert y Lascelles (1963) analizaron los niveles de la ribulosa-difosfato carboxilasa de *Chr. vinosum* cepa D crecida autotróficamente y en presencia de sustratos orgánicos. Como era de esperar, los niveles más altos se hallaron durante el crecimiento autotrófico. Estos autores dedujeron no sólo que el ciclo de las pentosas proveía un mecanismo de asimilación de CO₂ bajo condiciones autotróficas sino también que dicha fijación podía proporcionar una salida para el exceso de poder reductor formado durante la oxidación del sustrato.

XIII.3.2. Utilización de los materiales de reserva en la oscuridad

Las especies de Chromatiaceae enfrentan un interesante problema ecológico debido a su naturaleza fototrófica obligada. Estos organismos son capaces de formar cantidades significativas de ATP sólo cuando son iluminadas. La cuestión consiste en cómo satisface el organismo sus demandas de energía para la movilización, el mantenimiento celular y otros procesos, durante la noche.

Van Gemerden (1968 a-c) estudió el comportamiento de *Chr. vinosum* en dichas condiciones. Este microorganismo produce carbohidratos de reserva conteniendo glucosa, cuando crece a la luz en presencia de CO_2 y H_2S . En experiencias realizadas exponiendo las células alternativamente a la luz y a la oscuridad, durante períodos de varias horas, Van Gemerden observó que los carbohidratos almacenados durante la etapa luminosa, desaparecían durante los intervalos de oscuridad. Además, descubrió que esta desaparición coincidía con la síntesis del poli- β -hidroxibutirato. En estas experiencias, halló también que en la oscuridad, el H_2S se producía a expensas del S. Van Gemerden interpretó estos resultados proponiendo que en la oscuridad los carbohidratos de reserva se degradaban mediante la vía de Embden-Meyerhof, de glucosa a piruvato, resultando en una ganancia de ATP. El piruvato formado se convertía en poli- β -hidroxibutirato, vía acetil-CoA y acetoacetil-CoA con la pérdida concomitante de CO_2 . Los electrones liberados durante la degradación del carbohidrato y la síntesis del PHB eran captados por el S para formar H_2S , reacción mediada por la cupla NAD^+/NADH .

Este esquema provee una explicación para la aparición de CO_2 y sulfuro en cultivos de *Chromatium* crecidos en la oscuridad (Trüper y Schlegel, 1964). Además brinda una interpretación de la desaparición de los carbohidratos de reserva y de la síntesis de PHB en la oscuridad. Finalmente, proporciona un mecanismo para la liberación de energía a partir de los productos almacenados y formados a la luz.

XIII.4. Utilización de compuestos orgánicos por bacterias purpúreas no sulfúreas

Las especies de la familia Rhodospirillaceae se caracterizan por su capacidad de crecer en una amplia variedad de compuestos orgánicos: ácidos grasos, aminoácidos, alcoholes, intermediarios del ciclo de Krebs, hidratos de carbono, compuestos monocarbonados, acetato y piruvato.

Algunas especies (especialmente del género *Rhodopseudomonas* y ciertos miembros de *Rhodospirillum*) son capaces de llevar a cabo un metabolismo respiratorio no fotosintético en condiciones aeróbicas en la oscuridad. El ciclo de Krebs es el camino mediante el cual se oxidan los sustratos en la oscuridad (Elsden, 1962). Este ciclo también actúa anaeróbicamente a la luz en la mayoría de estos organismos (Ormerod y Gest, 1962).

XIII.4.1. Glucosa y Fructosa

El crecimiento de *Rp. sphaeroides* en glucosa, fructosa o manosa (Szymona y Doudoroff, 1960) es pobre, acumulándose productos ácidos como el ácido 2-ceto-3-deoxiglucónico.

La principal ruta metabólica de la glucosa en *Rp. capsulata* corresponde al camino inducible de Entner-Doudoroff (Eidels, 1969). Este microorganismo posee muy bajos niveles de fosfofructoquinasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, sugiriéndose entonces que los caminos de Embden-Meyerhof y de la hexosamonofosfato son de poco significado cuantitativo, en células crecidas en presencia de glucosa (Eidels y Preiss, 1970).

Rp. capsulata es un microorganismo cuyo comportamiento es inusual dado que metaboliza la glucosa por la vía Entner-Doudoroff mientras que asimila la fructosa mediante el camino Embden-Meyerhof (Conrad y Schlegel, 1974). En general, la mayoría de las bacterias metabolizan ambos sustratos utilizando la misma vía.

La etapa inicial del metabolismo de la fructosa en *Rp. capsulata* está catalizada por la enzima 1-fosfofructoquinasa. Saier et al (1971) encontraron que numerosas bacterias fotosintéticas transportaban la fructosa hacia la célula mediante un

sistema fosfotransferasa que formaba fructosa-1-P. Este sistema de transporte está compuesto por dos proteínas asociadas a membrana, las cuales catalizan la transferencia de fosfato desde el fosfoenolpiruvato a la fructosa, durante el proceso de translocación de este compuesto hacia la célula.

XIII.4.2. Glutamato y citrato

Rs. rubrum puede crecer anaeróbicamente a la luz y aeróbicamente en la oscuridad, en presencia de L- ó D-glutamato. Estudios realizados empleando (¹⁴C)-glutamato e inhibidores metabólicos sugieren que este sustrato se metaboliza principalmente a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Gibson y Wang, 1968).

Sin embargo, hay evidencias enzimológicas acerca de la existencia de una glutamato-mutasa, coenzima B₁₂ dependiente, hallada en *Rs. rubrum* y *Rp. sphaeroides* (Ohmori et al, 1974), y del metabolismo del glutamato según la vía:

glutamato → β-metilaspartato → mesaconato → citramalato → acetil-CoA + piruvato

la cual fue hallada también en otras bacterias (Barker, 1961).

La mayoría de las bacterias fotosintéticas son incapaces de utilizar el citrato como fuente de carbono. Sin embargo, *Rp. gelatinosa* puede crecer anaeróbicamente a la luz, en presencia de citrato. La citrato-liasa, enzima responsable de la asimilación del citrato, es inactiva bajo condiciones aeróbicas; por lo tanto, este microorganismo no puede desarrollarse aeróbicamente con citrato.

La citrato-liasa consume sustrato en forma descontrolada, acumulándose en el medio de cultivo, los productos de degradación: acetato y malato (Schaab et al, 1972). Una vez consumido completamente el citrato, aparece una fase lag sumamente corta en el crecimiento, luego de la cual continúa el desarrollo a expensas del malato y del acetato formados. Este período lag correspondería al tiempo requerido para la síntesis de las enzimas involucradas en la asimilación de los productos. El malato se consume preferentemente, no existiendo captación de acetato

hasta la completa remoción del malato del medio de cultivo.

La citrato-liasa de *Rp. gelatinosa* se inactiva rápidamente luego del agotamiento del citrato en el medio de crecimiento (Giffhorn et al, 1972). Esta inactivación es esencial para la utilización eficiente del malato y del acetato, dado que durante el desarrollo en presencia de estos dos sustratos, puede formarse citrato debido a la existencia de la citrato sintetasa. Así, la actividad simultánea de ambas enzimas daría lugar a un ciclo inútil de moléculas de dos, cuatro y seis átomos de carbono.

XIII.4.3. Glicerol

Rp. palustris y *Rp. sphaeroides* pueden crecer con glicerol como fuente de carbono.

• Este sustrato se metaboliza a glicerol-3-fosfato, el cual se convierte posteriormente en dihidroxiacetona fosfato (Pike y Sojka, 1975).

Cuando *Rp. sphaeroides* crece en un medio que contiene glicerol y malato, este último sustrato se consume en primer término, encontrándose inhibidas las enzimas correspondientes al metabolismo del glicerol. Una vez agotado el malato, aparece un lag en el crecimiento durante el cual se des-reprimen las enzimas relacionadas con la asimilación del glicerol. Después de varias horas, el desarrollo continúa a expensas del glicerol. Pike y Sojka (1975) sugirieron que estas enzimas estarían sujetas a una represión por catabolito, en este caso, el malato.

XIII.4.4. Acetato

Stanier et al (1959) demostraron en *Rs. rubrum* que el acetato era convertido predominantemente en poli- β -hidroxibutirato, en ausencia de CO₂, mientras que en su presencia, se incorporaba en polisacáridos.

A diferencia de otros organismos que utilizan el acetato como única fuente de carbono, *Rs. rubrum* no posee un ciclo del glioxilato activo. La enzima isocitrato-liasa, esencial para el funcionamiento de dicho ciclo, se halla ausente (Albers y Gottschalk, 1976).

A pesar de la profunda investigación en este tema, aún no se conoce el mecanismo mediante el cual *Rs. rubrum* es capaz de crecer fotosintéticamente con acetato en ausencia del ciclo del glioxilato.

Kornberg y Lascelles (1960) analizaron varias especies de la familia Rhodospirillaceae con respecto a la presencia o no del ciclo del glioxilato. Así, *Rp. palustris* y *Rp. capsulata*, crecidas en acetato o butirato, presentaban niveles significativos de isocitrato-liasa, en contraste con *Rs. rubrum* y *Rp. sphaeroides*, que no poseían esta enzima en ninguna de las condiciones ensayadas.

Albers y Gottschalk (1976) informaron que *Rhodomicrobium vannielii* y *Rp. palustris* contenían las enzimas isocitrato-liasa y malato-sintetasa.

XIII.4.5. Utilización de otros compuestos

Las bacterias purpúreas no sulfúreas habitan frecuentemente nichos anaeróbicos, donde se acumulan productos de fermentación de otros organismos. *Rhodospirillum rubrum* posee una alcohol deshidrogenasa inducible (Chaudhary, 1970) que puede facilitar el uso de estos productos de fermentación.

Qadri y Hoare (1968) hallaron una fórmico deshidrogenasa y una hidrogenasa particulada en *Rp. palustris*. Estos autores sugirieron que el crecimiento en presencia de formiato era esencialmente autotrófico, dado que la hidrógeno-liasa producía la ruptura de la molécula de formiato para formar H_2 y CO_2 , sus tratos necesarios para una fijación autotrófica. Yoch y Lindstrom (1967) hallaron que el CO_2 formado en *Rp. palustris* a partir de formiato era fijado vía el ciclo reductivo del ácido carboxílico (Evans et al, 1966).

El ácido málico es otra de las fuentes de carbono empleadas en cultivos de estas bacterias. El L-malato se metaboliza vía el ciclo de Krebs a través de la acción de la enzima málico-deshidrogenasa NAD dependiente, la cual es sumamente activa en extractos de estas células.

REFERENCIAS

- Albers, H. & Gottschalk, G. (1976), Arch. Microbiol. 111, 45.
- Barker, H.A. (1961), The Bacteria, Vol II (I.C. Gunsalus y R.Y. Stanier, eds), pp. 151-207, Academic Press, New York.
- Borichewsky, R.M. & Umbreit, W.W. (1966), Arch. Biochem. Biophys. 116, 97.
- Carr, N.G. (1973), The Biology of Blue-Green Algae (N.G. Carr y B.A. Whitton, eds.), pp. 39-65, Blackwell, Oxford.
- Chaudhary, A. (1970), Ph. D. thesis, University of Minnesota, Minneapolis.
- Conrad, R. & Schlegel, H.G. (1974), Biochim. Biophys. Acta 358, 221.
- Cutinelli, C.; Ehrensvärd, G.; Reio, L.; Saluste, E. & Stjernholm, R. (1951), Ark. Kemi 3, 315.
- Eidels, L. (1969), Ph. D. thesis, University of California, Davis.
- Eidels, L. & Preiss, J. (1970), J. Biol. Chem. 243, 2937.
- Elsdén, S.R. (1962), The Bacteria, Vol III (I.C. Gunsalus y R.Y. Stanier, eds.), pp 1-40, Academic Press, New York.
- Elsdén, S.R. & Ormerod, J.G. (1956), Biochem. J. 63, 691.
- Evans, M. C.W.; Buchanan, B.B. & Arnon, D.I. (1966), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55, 928.
- Foster, J.W. (1940), J. Gen. Physiol. 24, 123.
- Foster, J.W. (1944), J. Bacteriol. 47, 355.
- Fuller, R.C.; Smillie, R.M.; Sisler, E.C. & Kornberg, H.L. (1961), J. Biol. Chem. 236, 2140.
- Gaffron, H. (1933), Biochem. Z. 260, 1.
- Gaffron, H. (1934), Biochem. Z. 269, 447.
- Gaffron, H. (1935), Biochem. Z. 275, 301.
- Gibson, M.S. & Wang, C.H. (1968), Can. J. Microbiol. 14, 493.
- Giffhorn, F.; Beuscher, N. & Gottschalk, G. (1972), Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 467.
- Hoare, D.S. & Gibson, J. (1964), Biochem. J. 91, 546.

- Hurlbert, R.E. & Lascelles, J. (1963), J. Gen. Microbiol. 33, 445.
- Klemme , J.H. (1974), Arch. Microbiol. 100, 57.
- Kornberg, H.L. & Lascelles, J. (1960), J. Gen. Microbiol. 23, 511.
- Losada, M.; Trebst, A.V.; Ogata, S. & Arnon, D.I. (1960), Nature (London) 186, 753.
- Muller, F.M. (1933), Arch. Mikrobiol. 4, 131.
- Ohmori, H.; Ishitani, H.; Sato, K.; Shimizu, S. & Fukui, S. (1974), Agric. Biol. Chem. 38, 359.
- Ormerod, J.G. (1956), Biochem. J. 64, 373.
- Ormerod , J.G. & Gest, H. (1962), Bacteriol. Rev. 26, 51.
- Pike, L. & Sojka, G.A. (1975), J. Bacteriol. 124, 1101.
- Qadri, S.M.H. & Hoare, D.S. (1968), J. Bacteriol. 95, 2344.
- Sadler, W.R. & Stanier, R.Y. (1960), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46, 1328.
- Saier, M.H., Jr; Feucht, B.U. & Roseman, S. (1971), J. Biol. Chem. 246, 7819.
- Sandhu, G.R. & Carr, N.G. (1970), Arch. Mikrobiol. 70, 340.
- Schaab, C.; Giffhorn, F.; Schoberth, S.; Pfennig, N. & Gottschalk, G. (1972), Z. Naturforsch 27 b, 962.
- Smith, A.J.; London, J. & Stanier, R.Y. (1967), J. Bacteriol. 94, 972.
- Stanier, R.Y. (1961), Bacteriol. Rev. 25, 1.
- Stanier, R.Y.; Doudoroff, M.; Kunisawa, R. & Contopoulou, R. (1959), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 45, 1246.
- Szymona, M. & Doudoroff, M. (1960), J. Gen. Microbiol. 22, 167.
- Trüper, H.G. & Schlegel, H.G. (1964), J. Microbiol. Serol. 30, 225.
- van Gernerden, H. (1968 a), Arch. Mikrobiol. 64, 103.
- van Gernerden, H. (1968 b), Arch. Mikrobiol. 64, 111.
- van Gernerden, H. (1968 c), Arch. Mikrobiol. 64, 118.

van Niel, C.B. (1931), Arch. Mikrobiol. 3, 1.

van Niel, C.B. (1936), Arch. Mikrobiol. 7, 323.

van Niel, C.B. (1944), Bacteriol. Rev. 8, 1.

Yoch, D.C. & Lindstrom, E.S. (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 65.

CAPITULO XIV

METABOLISMO DE COMPUESTOS AROMATICOS

XIV.1. Introducción

XIV.2. Metabolismo aeróbico

XIV.3. Metabolismo fotosintético anaeróbico

XIV.3.1. Fotometabolismo anaeróbico del benzoato

XIV. METABOLISMO DE COMPUESTOS AROMATICOS

XIV.1. Introducción

Numerosas especies de la familia de las Rhodospirillaceae son capaces de crecer en presencia de un compuesto aromático simple como fuente de carbono, ya sea anaeróbicamente a la luz o aeróbicamente en oscuridad.

El presente capítulo describirá el metabolismo de compuestos aromáticos en Rhodospirillaceae, crecidas bajo condiciones fotosintéticas y de respiración.

Leadbetter y Hawk (1965) hallaron que *Rp. palustris* podía crecer anaeróbicamente a la luz en presencia de benzoato, siendo incapaz de desarrollarse aeróbicamente en la oscuridad. En la Tabla 14.1. se encuentran tabulados los sustratos ensayados con *Rp. palustris* (Dutton y Evans, 1969), *Rp. gelatinosa* y *Rp. capsulata* (Evans, 1977).

XIV.2. Metabolismo aeróbico

Rhodopseudomonas palustris crecida aeróbicamente en presencia de 4-hidroxibenzoato utiliza exclusivamente el mecanismo de ruptura "meta", el cual da origen a piruvato (Figura 14.1.) (Hegeman, 1967; Dutton y Evans, 1967, 1969).

En este mecanismo, uno de los átomos del O_2 se incorpora al anillo aromático como un hidroxilo, por medio de una monooxigenasa, formando el 3,4-dihidroxibenzoato (protocatechuate). En este punto, existen dos posibilidades de ruptura: "orto", entre los dos grupos hidroxilos y "meta" entre las posiciones 4 y 5. El primer camino origina el ácido tricarbóxico β -carboximucónico, el cual posteriormente lleva a la formación del ácido β -cetoadípico.

El metabolismo que utiliza el camino "meta" produce el compuesto α -hidroxi- γ -carboxi semialdehído mucónico, el cual origina en pasos posteriores, el piruvato (Evans, 1976; Dagley, 1976; Trudgill, 1976; Evans, 1977).

SUSTRATO	Rp. palustris		Rp. gelatinosa y Rp. capsulata
	Medio fotosintético	Medio aeróbico	
	Benzoato	+	
3-Hidroxibenzoato	+		+
2-Hidroxibenzoato	NT	-	NT
4-Hidroxibenzoato	+	+	+
3,4-Hidroxibenzoato	-	+	
Otros dihidroxibenzoatos	NT	NT	-
2,4,6-Trihidroxibenzoato	NT	NT	+
1,2-Dihidroxibenzoato	-	-	NT
1,3,5-Trihidroxibenceno	+	NT	+

(+) crece; (-) no crece; (NT) no testado

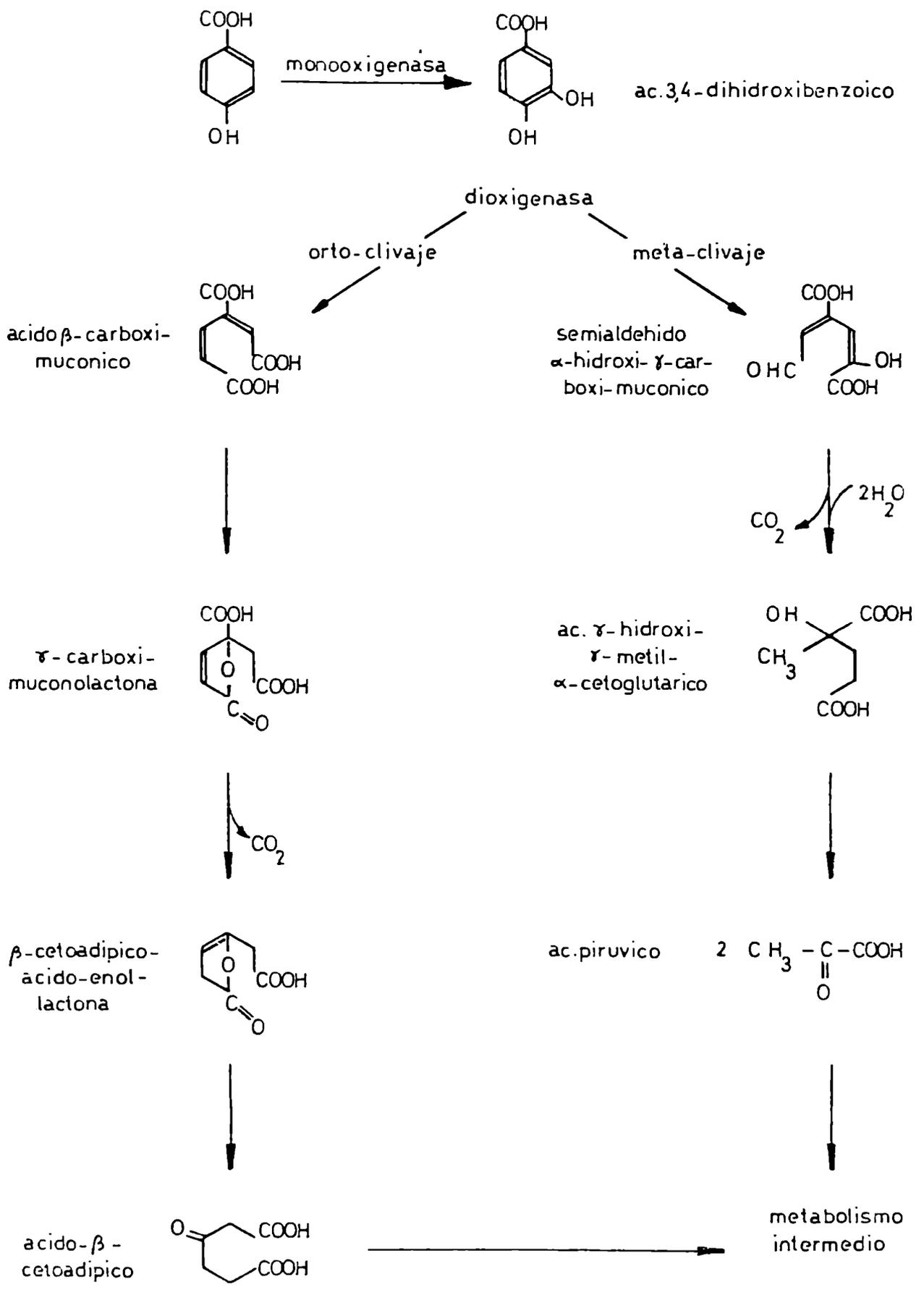


FIGURA 14.1.: Metabolismo de compuestos aromáticos en bacterias, bajo condiciones aeróbicas.

XIV.3. Metabolismo fotosintético anaeróbico

Leadbetter y Hawk (1965) y Dutton y Evans (1967) estudiaron el crecimiento fotosintético de *Rp. palustris* en benzoato y 3-hidroxibenzoato. Ninguno de estos dos sustratos era capaz de promover una actividad respiratoria en las células bajo condiciones aeróbicas.

La Figura 14.2. muestra el efecto del O_2 sobre el fotometabolismo del benzoato en células crecidas fotosintéticamente. Así, el O_2 inhibe totalmente la utilización del benzoato en luz u oscuridad (Dutton y Evans, 1969). El retorno a las condiciones iniciales de anaerobiosis y luz permiten nuevamente el consumo de benzoato, en forma rápida.

También se observa que los requerimientos de luz para la utilización anaeróbica del benzoato, son obligatorios. Sin embargo, no es comprensible por qué existe una fase lag después del retorno al estado iluminado ya que dicho período no aparece cuando las células se incuban en oscuridad sin benzoato.

XIV.3.1. Fotometabolismo anaeróbico del benzoato

La inhibición por oxígeno y la dependencia obligatoria de la luz fueron puntos claves para deducir que la secuencia de ruptura de los compuestos aromáticos en condiciones fotosintéticas era un proceso reductivo.

Guyer y Hegeman (1969) sugirieron, a partir de estudios con mutantes de *Rp. palustris* que las reacciones iniciales de ruptura del benzoato, luz dependientes, eran reductivas. Según estos autores estarían involucrados los ácidos ciclohexanocarboxílico y ciclohexen-1-carboxílico.

Dutton y Evans (1968, 1969) dilucidaron el camino del fotometabolismo anaeróbico del benzoato (Figura 14.3.) en *Rp. palustris*. La primera parte de dicha vía consiste en la reducción del anillo aromático y la segunda constituye una secuencia de reacciones similares a las bien conocidas para la β -oxidación de ácidos grasos. Como en este caso el sustrato es un compuesto cíclico, la β oxidación produce la ruptura del anillo entre las posiciones 1 y 2.

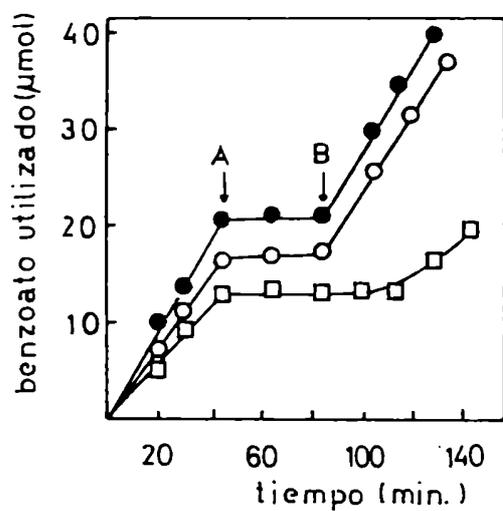


FIGURA 14.2.: Efecto de la presencia de O₂, en luz y oscuridad, sobre el fotometabolismo del benzoato en células de *Rp. palustris*. Las condiciones iniciales fueron de iluminación en anaerobiosis. En el período comprendido entre las flechas A y B, las condiciones fueron: O₂-luz (○), O₂-oscuridad (●) y anaerobiosis-oscuridad (□)

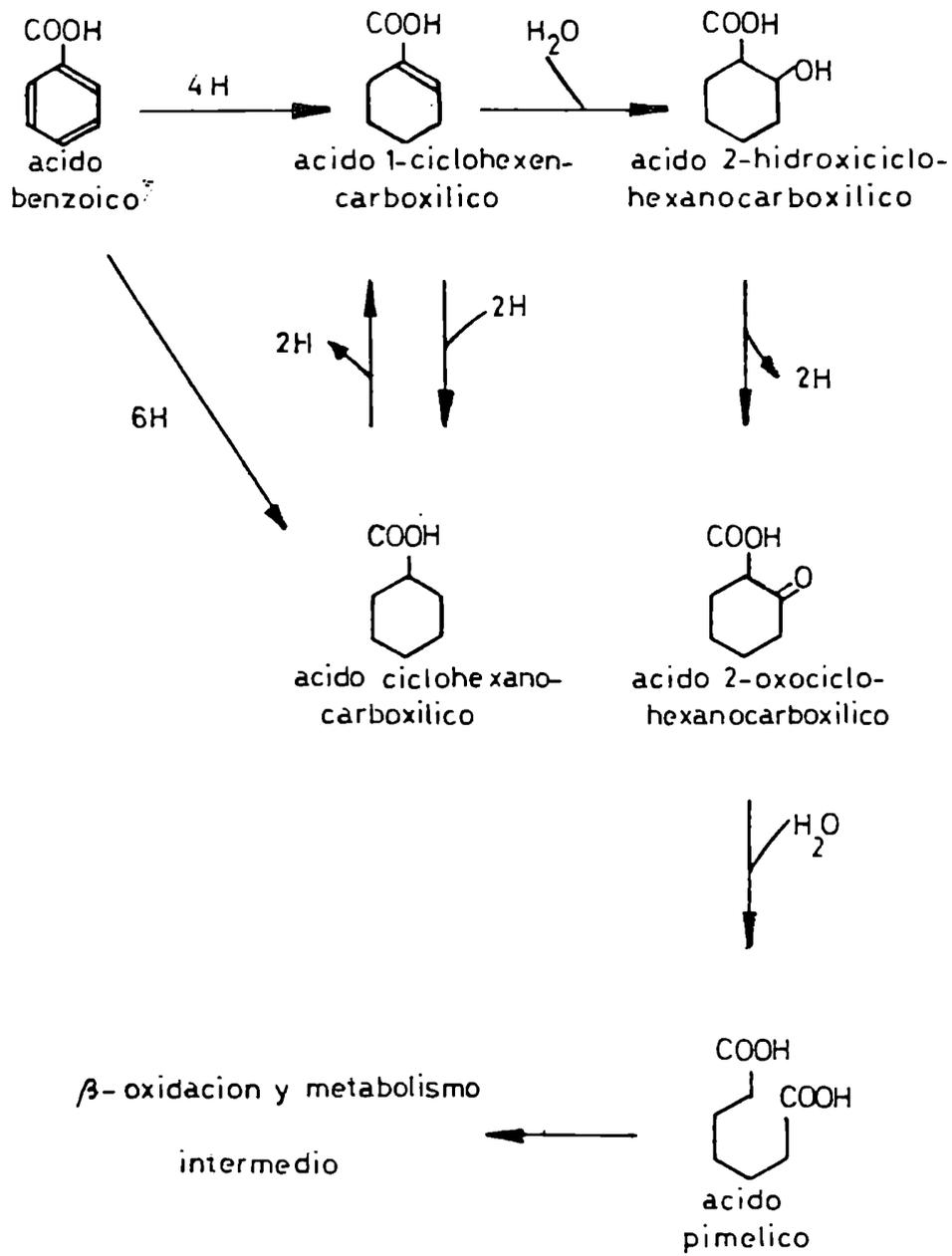
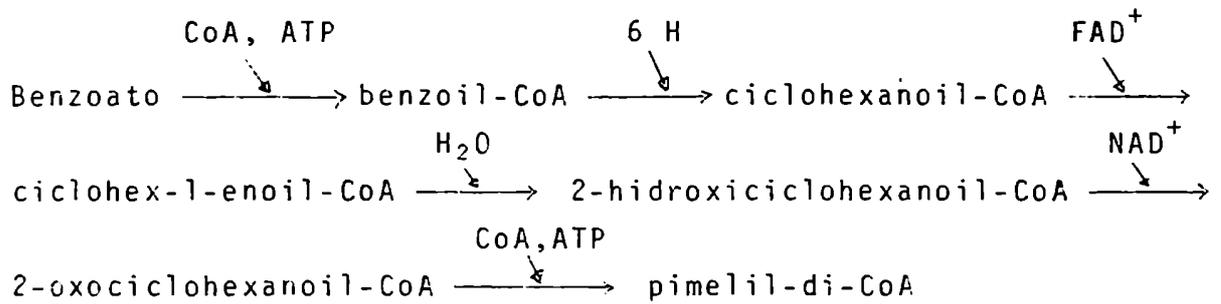


FIGURA 14.3.: Fotometabolismo anaeróbico del benzoato en *Rp. palustris*

Sin embargo, en el año 1970, Dutton y Evans sugirieron que los intermediarios del fotometabolismo del benzoato existirían como ésteres de CoA y Whittle et al (1976) demostraron que extractos de células de *Rp. palustris* crecidas fotosintéticamente en benzoato eran capaces de catalizar la tioesterificación del benzoato para formar benzoil-CoA (Figura 14.4.). De acuerdo con estos resultados, Whittle et al (1976) completaron el camino antes descrito según:



En general, parece ser que la energía necesaria para las reacciones endotérmicas de ruptura de los anillos aromáticos en bacterias fotosintéticas proviene del ATP generado en los eventos normales de transferencia de electrones y del metabolismo. El ATP es usado directamente en las reacciones de esterificación tales como aquellas que involucran la CoA, activando así al anillo aromático antes de la reducción y ruptura del mismo.

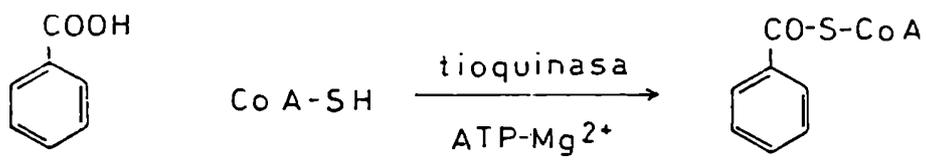


FIGURA 14.4.: Tioesterificación del benzoato en células de *Rp. palustris* crecidas fotosintéticamente

REFERENCIAS

- Dagley, S. (1976), *Biochem. Soc. Trans.* 4, 455.
- Dutton, P.L. & Evans, W.C. (1967), *Biochem. J.* 104, 30 P.
- Dutton, P.L. & Evans, W.C. (1968), *Biochem. J.* 107, 28 P.
- Dutton, P.L. & Evans, W.C. (1969), *Biochem. J.* 113, 525.
- Dutton, P.L. & Evans, W.C. (1970), *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 228.
- Evans, W.C. (1976), *Biochem. Soc. Trans.* 4, 452.
- Evans, W.C. (1977), *Nature* 270, 17.
- Guyer, M. & Hegeman, G.D. (1969), *J. Bacteriol.* 99, 906.
- Hegeman, G.D. (1967), *Arch. Mikrobiol.* 59, 143.
- Leadbetter, E.R. & Hawk, A. (1965), *J. Appl. Bacteriol.* 27, 448.
- Trudgill, P.W. (1976), *Biochem. Soc. Trans.* 4, 458.
- Whittle, P.J.; Lunt, D.O. & Evans, W.C. (1976), *Biochem. Soc. Trans.* 4, 490.

CAPITULO XV

METABOLISMO DEL HIDROGENO Y FIJACION DE NITROGENO

XV.1. Fijación de nitrógeno

XV.1.1. Fisiología de la fijación

XV.1.1.1. Fijación de nitrógeno a la luz

XV.1.1.2. Fijación de nitrógeno en oscuridad

XV.1.1.3. Amonio como producto y como inhibidor

XV.1.1.4. Dadores de electrones

XV.2. Fotoevolución del hidrógeno

XV.3. Bioquímica de la fijación de N_2

XV.3.1. Preparación de extractos activos

XV.3.2. Nitrogenasa

XV.3.3. Relación entre la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno

XV.4. Metabolismo del hidrógeno

XV.4.1. Crecimiento en presencia de H_2

XV.4.2. Evolución fermentativa en la oscuridad

XV.5. Metabolismo de otros compuestos nitrogenados

XV. METABOLISMO DEL HIDROGENO Y FIJACION DE NITROGENO

XV.1. Fijación de nitrógeno

Las bacterias fotosintéticas constituyen uno de los grupos capaces de reducir enzimáticamente el nitrógeno atmosférico a amonio.

Gest. y Kamen (1949 a) observaron que tanto el N_2 como el NH_4^+ inhibían la fotoevolución del H_2 en *Rs. rubrum* sugiriendo que debía haber cierta similitud con las bacterias fijadoras de N_2 , en las cuales existe una relación entre el metabolismo del H_2 y la fijación de N_2 (Lee y Wilson, 1943). Lindstrom et al (1949) confirmaron que había fijación de N_2 en *Rs. rubrum*.

Después de estas observaciones iniciales, se encontró que este proceso ocurría en otras bacterias como *Rp. sphaeroides*, *Rp. capsulata*, *Rp. gelatinosa* y *Rp. palustris* (Lindstrom et al, 1951; Okuda et al, 1960), *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum* (Lindstrom et al, 1949, 1950) y en algunas especies de *Chromatium*.

Aún no se ha establecido que todas las bacterias fotosintéticas sean fijadoras de N_2 , sin embargo, todas las cepas de Rhodospirillaceae ensayadas son capaces de realizar este proceso (Stewart, 1973).

XV.1.1. Fisiología de la fijación

XV.1.1.1. Fijación de nitrógeno a la luz

Las bacterias fotosintéticas fijan N_2 a velocidades óptimas solamente bajo condiciones anaeróbicas, a la luz (Kamen y Gest, 1949; Lindstrom et al, 1949, 1951).

Pratt y Frenkel (1959) observaron que existía una estrecha relación entre la fijación de N_2 y la fotosíntesis. Paschinger (1974) demostró que el consumo de $^{15}N_2$ por *Rs. rubrum* se detenía inmediatamente cuando desaparecía la luz.

XV.1.1.2. Fijación de nitrógeno en oscuridad

A pesar de que la fijación de N_2 es óptima en condiciones luminosas, en anaerobiosis y oscuridad *Rs. rubrum* fija también N_2 , en cantidades pequeñas pero significativas (Lindstrom et al, 1951).

Bennett et al (1964) encontraron que cuando la luz desaparece, el consumo de N_2 en *Chr. vinosum* cepa D no cesa inmediatamente. Estos autores utilizaron un equipo alternador luz-oscuridad-luz.

Benemann y Valentine (1972) observaron que en la oscuridad las células de *Rs. rubrum* podían mantener la reducción de acetileno (medida de la actividad de la nitrogenasa) durante períodos de hasta 24 horas, a una velocidad de apenas un 5% comparada con la observada en la luz.

• Se atribuye esa pequeña pero significativa fijación del N_2 en oscuridad, a una acumulación de intermediarios fotosintéticos a la luz (Schick, 1971 a). Aparentemente, durante períodos más largos de fijación de N_2 en oscuridad, estos microorganismos son capaces de actuar sobre sus carbohidratos de reserva, a través de un proceso fermentativo, para abastecer los requerimientos de ATP y de compuestos reductores para la actividad de la nitrogenasa.

El O_2 inhibe completamente la fijación de N_2 en bacterias fotosintéticas. Esto era lo esperado ya que:

- 1) el O_2 inhibe irreversiblemente a la enzima nitrogenasa;
- 2) el O_2 oxida fácilmente a los reductores (ferredoxina reducida) requeridos para la actividad de la nitrogenasa.

XV.1.1.3. Amonio como producto y como inhibidor

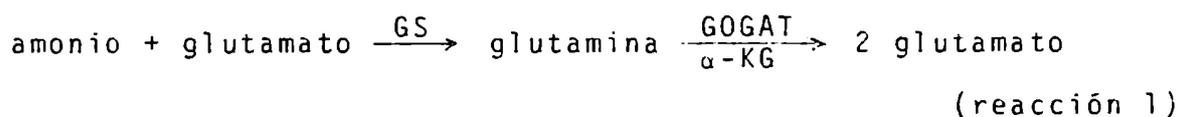
Cuando *Rs. rubrum*, *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum* y algunas especies de *Chromatium* se trataban con $^{15}N_2$, el NH_4^+ y el ácido glutámico eran los productos que contenían mayor marca (Wall et al, 1952). Cuando estos microorganismos se exponían a $^{15}NH_4^+$, se observaron altos niveles de ácido glutámico marcado con ^{15}N . Los autores concluyeron que estas bacterias reducían N_2 a NH_4^+ teniendo lugar luego una aminación

reductiva del ácido α -cetoglutarato a ácido glutámico. La adición de ClNH_4 a cultivos de *Rs. rubrum* fijadores de N_2 , producía una inhibición de la misma (Kamen y Gest, 1949; Lindstrom et al, 1949). Este efecto inhibitorio ha sido interpretado en términos de una nitrogenasa inducible, cuya síntesis se encuentra inhibida por el NH_4^+ (Strandberg y Wilson, 1968).

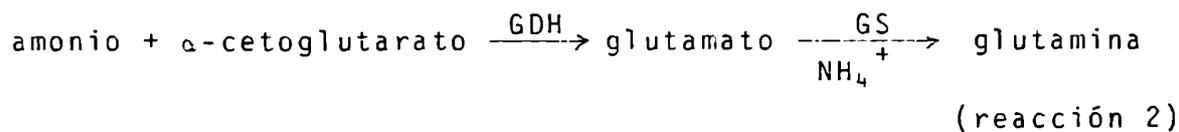
Cultivos continuos de *Rs. rubrum* suplementados con concentraciones limitantes de NH_4^+ dieron origen a extractos celulares más activos en cuanto a la fijación de N_2 , que las células crecidas en N_2 , indicando esto que el proceso de fijación de N_2 producía cantidad suficiente de NH_4^+ como para inhibir parcialmente la síntesis de la nitrogenasa (Munson y Burris, 1969).

Debido a que la inhibición de la fijación de N_2 por el NH_4^+ en *Rs. rubrum* era sumamente rápida (Schick, 1971 a), Stewart (1973) sugirió que el NH_4^+ no sólo inhibiría la síntesis de la nitrogenasa sino que también funcionaría como una toxina celular o como un inhibidor de la fotofosforilación cíclica. Sin embargo, esta hipótesis parece poco probable ya que *Rs. rubrum* crece perfectamente bien en presencia de altas concentraciones de amonio.

Nagatani et al (1971) propusieron que en condiciones de fijación de N_2 , las bacterias fotosintéticas incorporaban NH_4^+ en la vía del glutamato mediante un nuevo camino descubierto por Tempest et al (1970). Según estos autores las enzimas involucradas serían la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintetasa (GOGAT) en combinación con el α -cetoglutarato (α -KG) según:



Tempest et al (1970) propusieron que este camino era más probable que el convencional de la glutamato deshidrogenasa (GDH):



Chr. vinosum cepa D y *Rs. rubrum* poseen altos niveles de actividad de GS. Esta enzima tiene una elevada afinidad por el NH_4^+ , lo cual permite a las células fijadoras de N_2 mantener bajo el nivel interno de NH_4^+ previniendo así la inhibición de la nitrogenasa. Shanmugam y Valentine (1975) obtuvieron evidencias acerca de la función regulatoria de la GS en el metabolismo del N_2 .

XV.1.1.4. Dadores de electrones

Tanto el ATP y el poder reductor, como la fijación de N_2 y la reducción de CO_2 son necesarios para los distintos procesos bioquímicos. Las bacterias fotosintéticas requieren un sustrato oxidable como fuente de electrones, para generar los reductores de dichos procesos (piridín nucleótidos y ferredoxina). Así, los ácidos orgánicos como malato y acetato, y los compuestos reducidos de azufre tales como tiosulfato y sulfuro pueden oxidarse generando los electrones necesarios para estos procesos.

Arnon et al (1961) demostraron que la fijación de N_2 en *Chr. vinosum* era estrictamente dependiente no sólo de la luz sino también del tiosulfato como dador de electrones. Yoch et al (1968) mostraron que este compuesto tenía la misma función en *Rp. palustris*. En este organismo se observó un requerimiento diferencial de poder reductor que dependía del tipo de metabolismo (fijación de N_2 o asimilación de NH_4^+) (Figura 15.1.). Utilizando piruvato (5 mM) como dador de electrones, *Rp. palustris* aumenta en un 30% su densidad celular, en presencia de NH_4^+ respecto al N_2 como fuentes de nitrógeno.

Los ácidos orgánicos sirven no sólo como dadores de electrones para la reducción del N_2 a NH_4^+ sino también como aceptores de NH_4^+ . De lo contrario, el exceso de NH_4^+ acumulado inhibiría la fijación de N_2 en *Chr. vinosum* (Arnon et al, 1961) y en *Rs. rubrum* (Schick, 1971 c).

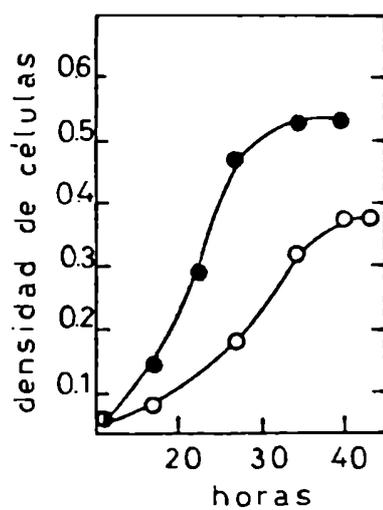


FIGURA 15.1.: Efecto del metabolismo del nitrógeno sobre el crecimiento de *Rp. palustris* (Yoch et al, 1968).

XV.2. Fotoevolución del hidrógeno

Gest y Kamen (1949 a, b) fueron los primeros en observar la fotoevolución del H_2 en bacterias fotosintéticas.

Existe un número importante de factores, incluyendo las condiciones de cultivo, que afectan la fotoevolución del H_2 en estos microorganismos. Cuando se hace crecer *Rs. rubrum* fotosintéticamente en un medio conteniendo malato, fumarato o piruvato y N_2 , glutamato o aspartato como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, el cultivo no sólo produce CO_2 sino que también muestra una formación vigorosa de H_2 (Gest y Kamen, 1949 a, b; Gest et al, 1950; Ormerod et al, 1961). El NH_4^+ , altas concentraciones de extracto de levadura o peptona (Gest y Kamen, 1949 b) y aminoácidos tales como alanina y serina (Bregoff y Kamen, 1952), inhiben completamente dicha fotoevolución. Si el NH_4^+ se mantiene en el cultivo a un nivel bajo pero constante, la fotoevolución del H_2 no se ve afectada (Ormerod et al, 1961).

La fase gaseosa presente en la suspensión celular también tiene un efecto significativo en este proceso. Cuando la atmósfera está compuesta de helio, hidrógeno o argón, la formación de H_2 ocurre fácilmente a la luz, mientras que en presencia de N_2 dicha evolución se detiene abruptamente (Gest y Kamen, 1949 a).

Existen evidencias de que el sistema enzimático responsable de la fotoproducción de H_2 es sensible al O_2 debido a que la aireación del cultivo producía un significativo lag en esta reacción (Ormerod et al, 1961).

Ormerod et al (1961) transfirieron cultivos de *Rs. rubrum* de un medio conteniendo NH_4^+ (donde no había producción de H_2) a uno libre de nitrógeno (en el cual la evolución del H_2 era normal) y demostraron que la adición de:

- 1) cloramfenicol al medio, inhibía permanentemente este proceso;
- 2) glutamato producía una considerable aceleración de la velocidad de formación de H_2 , posiblemente por proveer de aminoácidos para la síntesis enzimática;
- 3) análogos de los aminoácidos aumentaban el período lag, antes de la liberación de H_2 .

Estas observaciones estaban de acuerdo con la hipótesis expresada por Gest et al (1950) según la cual el NH_4^+ inhibe la síntesis de una o más enzimas requeridas específicamente para la producción de H_2 a la luz. Durante el curso de estos estudios, Gest y Kamen (1949 a, b) y Gest et al (1950) dedujeron que el CO_2 que se formaba simultáneamente con el H_2 , jugaba un rol importante en este fenómeno. Newton y Wilson (1953) propusieron que el CO_2 se condensaría con compuestos de cuatro carbonos para formar α -cetoglutarato, el cual serviría como fuente de H_2 .

Bulen et al (1965) demostraron en *Rs. rubrum* que los cofactores requeridos para la fijación de N_2 también se utilizan en una nueva actividad de hidrogenasa encontrada en extractos de organismos fijadores de N_2 . Este tipo de hidrogenasa ATP-dependiente es distinto de las hidrogenasas convencionales que funcionan en organismos heterotróficos produciendo H_2 en la oscuridad, en varios aspectos:

- 1) no se halla influenciada por la presión parcial de H_2 ;
- 2) no es reversible;
- 3) es insensible al CO , inhibidor común de las hidrogenasas;
- 4) se detecta sólo en extractos de células crecidas en N_2 (Bulen et al, 1965).

A partir de extractos de *Rs. rubrum*, estos autores concluyeron que tanto las reacciones de reducción de N_2 como las de evolución de H_2 (ATP dependientes) eran catalizadas por la misma enzima: la nitrogenasa. Así, aparentemente la fotoevolución del H_2 en bacterias fotosintéticas sería una manifestación de la actividad de la nitrogenasa ATP-dependiente.

Gest (1972) propuso que la fotoevolución del H_2 sería un recurso, mediante el cual las bacterias fotosintéticas regularían sus niveles intracelulares de ATP y su poder reductor durante períodos en los que no ocurren los procesos sintéticos.

Queda aún por determinar si la nitrogenasa posee realmente esa función regulatoria en la naturaleza, ya que las elevadas concentraciones de N_2 de la biosfera inhibirían probablemente la evolución del H_2 ; por otra parte si el NH_4^+ presente en el medio ambiente celular reprimiera la nitrogenasa, no existirían entonces funciones regulatorias.

XV.3. Bioquímica de la fijación de N₂

XV 3.1. Preparación de extractos activos

Bulen et al (1965) obtuvieron extractos activos para la fijación de N₂ de *Rs. rubrum* cuando estos fueron suplementados con los cofactores necesarios (ATP y reductores). La presencia de esta actividad depende fundamentalmente del pH del extracto (Burns y Bulen, 1966; Yoch y Arnon, 1975). Cuando se produce la ruptura celular de *Rs. rubrum*, el pH disminuye rápidamente a un valor aproximado de 5,0. Se ha propuesto que esto se debería a una degradación a ácidos orgánicos de los productos de reserva, tales como el poli- ϵ -hidroxibutirato.

Munson y Burris (1969) hicieron crecer *Rs. rubrum* en presencia de bajas concentraciones de NH₄⁺, obteniendo también extractos activos (la nitrogenasa se halla de-reprimida cuando el NH₄⁺ se encuentra a bajos niveles).

Para la medición de la actividad de nitrogenasa en extractos de bacterias fotosintéticas se requieren las siguientes condiciones:

- 1) anaerobiosis en todas las fases operacionales;
- 2) ATP sintetizado endógenamente o suplementado mediante un sistema regenerador;
- 3) reductor de bajo potencial: ferredoxina reducida, flavodoxina o un reductor químico no fisiológico tal como el ditionito de sodio.

XV.3.2. Nitrogenasa

Nitrogenasa es el nombre aplicado a la enzima que reduce el N₂ a NH₄⁺. Wilson y Burris (1947) sospecharon que se trataba de una metaloenzima, pero recién lo demostraron Bulen y Le Comte en 1966. Estos autores encontraron que la nitrogenasa era un complejo enzimático formado por una Mo-Fe-proteína y por una Fe-proteína; en forma independiente ninguna de las dos proteínas poseía actividad.

Esta enzima es una transferasa multielectrónica (6 electrones por N₂ reducido) en la cual el Fe y el Mo juegan un rol

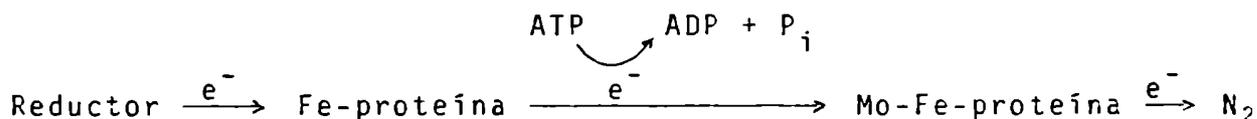
esencial (Brintzinger, 1966; Hardy et al, 1971). Debido a que estos metales son paramagnéticos, el método ideal para estudiar el mecanismo de transferencia de esta enzima es la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (ERP).

A partir de estudios de unión de sustrato y de ATP-Mg (Bui y Mortenson, 1968) y del análisis ERP (Zumft et al, 1973; Mortenson et al, 1973) se dedujo que durante la fijación de N_2 tenía lugar la siguiente secuencia de reacciones:

- 1) la Fe-proteína reducida une Mg-ATP, el cual contribuye a disminuir el potencial redox de la misma;
- 2) el complejo Fe-proteína reducida-Mg-ATP reduce a la Mo-Fe-proteína;
- 3) la Mo-Fe proteína reducida es reoxidada por el sustrato.

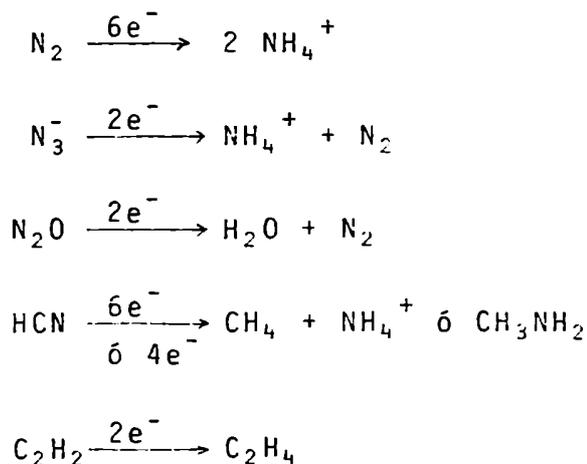
El complejo Fe-proteína reducida-Mg-ATP también es reoxidado, posiblemente a través de la Mo-Fe-proteína.

El transporte electrónico estaría representado por el siguiente esquema:



(reacción 3)

La nitrogenasa es una enzima altamente versátil en cuanto a su capacidad para reducir sustratos (Hardy y Burns, 1968):



(reacción 4)

Además, los protones son reducidos a H₂ (evolución de H₂, ATP dependiente).

El descubrimiento de que la nitrogenasa reduce el acetileno a etileno (Schöllhorn y Burris, 1966, Dilworth, 1966) con los mismos requerimientos de ATP y reductores como para la reducción de N₂, llevó a desarrollar un ensayo rápido, sensible y económico para la medición de la actividad de la nitrogenasa, representando esto un avance significativo en la metodología relacionada con la fijación de N₂ (se pueden llegar a detectar concentraciones de etileno de 10⁻¹²M) (Hardy et al, 1968).

Hallazgos recientes de Ludden y Burris (1976) y Nordlund et al (1977) demostraron que la nitrogenasa de *Rs. rubrum* requiere, a diferencia de otras nitrogenasas, un factor proteico activante unido a cromatóforos (FA) y Mn²⁺ para el comienzo de la actividad enzimática. El FA actuaría solamente sobre la Fe-proteína.

Yoch (1978) sugirió la existencia de dos formas de nitrogenasas: la activa (N₂asa A) y la reguladora (N₂asa R). Cuando *Rs. rubrum* crece en presencia de sustratos nitrogenados los cuales permiten la de-represión de la nitrogenasa, este microorganismo puede regular el turnover de esta enzima (N₂asa R). Por otro lado, las células privadas de nitrógeno producen una enzima (N₂asa A) que es siempre activa y parece no estar sujeta a regulación.

XV.3.3. Relación entre la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno

La relación básica entre la fijación de N₂ y la fotosíntesis (fijación de CO₂) es que ambas requieren energía (ATP) y reductores de bajo potencial. Uno esperaría que en las bacterias fotosintéticas, ambos procesos utilicen los productos primarios (ATP y reductores) de la reacción luminosa. Sin embargo, aún no se ha demostrado que la energía lumínica pueda ser utilizada por los cromatóforos para generar el ATP y los reductores requeridos para la actividad de la nitrogenasa.

Existen evidencias de que el ATP necesario para la fijación de N₂ en bacterias fotosintéticas puede ser generado fotoquímicamente (Yoch y Arnon, 1970). Así, en extractos de *Chr. viscosum* cepa D la fotofosforilación cíclica en los cromatóforos

da origen a ATP. En estas experiencias fue preciso añadir un reductor exógeno, para la fijación del N₂.

Se acepta que la ferredoxina (o la flavodoxina) constituye el verdadero agente reductor (Yoch, 1978). En bacterias fotosintéticas, la ferredoxina puede ser reducida según alguno de estos caminos:

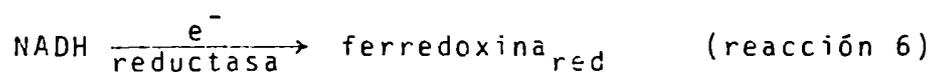
- 1) fotoquímicamente, como aceptor primario o secundario de electrones, en la reacción luminosa,
- 2) por NADH (generado fotoquímicamente) acoplado a la ferredoxina por una NADH-ferredoxina oxidoreductasa;
- 3) acoplada a la oxidación en la oscuridad, de un sustrato tal como el H₂ o el piruvato.

Bennett et al (1964) propusieron que *Chromatium* generaría ferredoxina reducida para la fijación de N₂, utilizando la energía luminosa solamente para la síntesis de ATP. Sin embargo, un organismo que utiliza ferredoxina reducida para sintetizar piruvato a partir de acetil-CoA y CO₂ (Bachofen et al, 1964) no usaría el piruvato para la reducción de la ferredoxina utilizada en la fijación de N₂.

Se ha propuesto (Gest, 1972) que el ATP generado por fotofosforilación cíclica estimularía la reducción fotoquímica de NAD⁺ por succinato, según:



El segundo paso sería la reducción de la ferredoxina termodinámicamente desfavorable pero posible para una relación NADH/NAD⁺ elevada:



XV.4. Metabolismo del hidrógeno

Existen dos tipos de metabolismo para el H₂:

- 1) fotoevolución de H₂ efectuada por la nitrogenasa insensible al CO; esta clase de actividad de "hidrogenasa", se halla solamente en células privadas de nitrógeno o en aquellas cultivadas con glutamato o aspartato como fuente de N₂. En ambas situaciones la nitrogenasa se encuentra de-reprimida y la célula la sintetiza normalmente,
- 2) consumo de H₂ y evolución mediante una hidrogenasa fuertemente inhibida por CO.

Las bacterias fotosintéticas que contienen nitrogenasa pueden evolucionar utilizando ambas enzimas, pero las células crecidas en presencia de amonio solamente pueden usar la hidrogenasa convencional.

XV.4.1. Crecimiento en presencia de H₂

Roelofsen (1935) fue el primero en observar en bacterias purpúreas sulfúreas que el H₂ podía servir como fuente de poder reductor para la foto-reducción del CO₂.

Thiele (1966) informó que bacterias sulfúreas que podían crecer fotoautotróficamente con H₂ como dador de electrones, poseían una hidrogenasa muy activa. Debido a que las especies de *Chlorobium* no reducen sulfato, se requieren pequeñas cantidades de sulfuro en el medio para la biosíntesis de aminoácidos.

En cuanto a las bacterias purpúreas no sulfúreas, *Rp. pallustris* (Qadri y Hoare, 1968), *Rp. capsulata* (Klemme y Schlegel, 1967) y *Rp. gelatinosa* (Wertlieb y Vishniac, 1967) pueden crecer también fotoautotróficamente con H₂ como dador de electrones. La reducción del CO₂ por el H₂ parece estar controlada por la disponibilidad de sustratos orgánicos, dado que el consumo de H₂ y CO₂ en cultivos de *Rs. rubrum* no ocurre antes de que el sustrato orgánico se haya agotado (Schick, 1971 b).

Evidencias preliminares sugirieron que el H₂ funcionaría también como un reductor de la fijación de N₂ en la oscuridad, en extractos de *Chr. vinosum* (Arnon et al, 1961). La utilización del H₂ como dador de electrones tanto para la reducción del

CO₂ como para la fijación de N₂ sugirieron la existencia de una hidrogenasa funcional y un aceptor de electrones acoplado a la enzima en cuestión.

XV.4.2. Evolución fermentativa en la oscuridad

Gest y Kamen (1960) recopilaron datos acerca de la evolución del H₂ en la oscuridad, en bacterias purpúreas que metabolizan compuestos orgánicos tales como formiato, glucosa, glicerol, glicerofosfato y piruvato, asociándola con la ruptura del ácido fórmico.

El N₂ y el NH₄⁺ no inhiben esta evolución demostrando así que ocurre en forma diferente a la reacción dependiente de la luz.

Suspensiones celulares de *Rs. rubrum* descomponen el formiato en CO₂ e H₂ (Kohlmiller y Gest, 1951; Bennett et al, 1964) lo cual indica actividad de formiato hidrogenoliasa.

Qadri y Hoare (1968) también detectaron actividad de esta enzima en extractos de *Rp. palustris*. A pesar de que *Chr. minutissimum* fermenta anaeróbicamente el formiato a CO₂ e H₂ en la oscuridad, las suspensiones celulares y los extractos de *Chr. vinosum* cepa D no fueron capaces de degradar el formiato de igual forma (Bennett et al, 1964). Sin embargo, *Chr. vinosum* produce en la oscuridad la ruptura del piruvato en cantidades equimolares de H₂, CO₂ y acetyl-CoA, lo cual sugeriría la presencia de un sistema fosforoclastico (piruvato deshidrogenasa + hidrogenasa) (Bennett et al, 1964).

Uffen (1973), Schön y Biederman (1973) y Schön y Voelskow (1976) informaron acerca de la evolución del H₂ y del CO₂ en cepas de *Rs. rubrum* crecidas anaeróbicamente a la oscuridad, en presencia de piruvato. Schön y Biedermann (1973) sugirieron que este sustrato se degradaría a acetato y formiato, por medio de la piruvato-formiato liasa. Posteriormente, la formiato hidrogenoliasa transformaría el formiato en CO₂ e H₂. Debido a que la aparición del gas ocurre varias horas después de la formación del formiato, Schön y Voelskow (1976) sugirieron que las enzimas responsables serían inducidas por el formiato.

XV.5. Metabolismo de otros compuestos nitrogenados

Las bacterias fotosintéticas crecen en medios conteniendo NH_4^+ (van Niel, 1931, 1944) y la mayoría de estos microorganismos pueden fijar N_2 .

Chromatium y varias especies de *Rhodospseudomonas* no pueden utilizar otros compuestos nitrogenados como nitrato o nitrato (Kondrat'eva, 1963).

Sin embargo, Taniguchi y Kamen (1963) informaron que *Rs. rubrum* podía adaptarse a un crecimiento fotosintético con reducción asimilatoria de NO_3^- si los cultivos habían sido previamente mantenidos a través de sucesivas transferencias en un medio conteniendo NO_3^- como única fuente de nitrógeno. El crecimiento con NO_3^- es mucho más lento comparado con el desarrollo en presencia de NH_4^+ . En extractos libres de células crecidas con NO_3^- se obtuvo una actividad considerable de nitrato reductasa, siendo los piridín-nucleótidos reducidos los dadores electrónicos fisiológicos de esta enzima.

A pesar de que la nitrato reductasa en *Rs. rubrum* es adaptativa, se postuló que en *Rp. sphaeroides* sería una enzima constitutiva de baja actividad. Sin embargo, el agregado de NO_3^- al medio de crecimiento, no produjo un aumento de la actividad de la nitrato reductasa; suponiéndose entonces que la actividad medida no correspondería a la de una verdadera nitrato reductasa sino que sería probablemente un artificio sin significado fisiológico.

Katoh (1963) informó acerca del crecimiento de *Rs. rubrum* aeróbicamente en la oscuridad o fotosintéticamente con nitrato como única fuente de nitrógeno, pero solamente luego de una adaptación del cultivo a la utilización de compuestos nitrogenados.

Katoh (1963) halló actividad de nitrato reductasa asociada a los cromatóforos. La enzima utiliza NADH como dador de electrones y se considera que contiene citocromo tipo b, flavina y hierro no hémico. La misma enzima es responsable de los procesos asimilatorios de reducción de NO_3^- (crecimiento en presencia de NO_3^-) y de los involucrados en la respiración.

REFERENCIAS

- Arnon, D.I. (1961), Light and Life (W.D. Mc Elroy and B. Glass, eds.), pp 489-566, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Arnon, D.I.; Losada, M.; Nozaki, M. & Tagawa, K. (1961) Nature (London) 190, 601.
- Bachofen, R.; Buchanan, B.B. & Arnon, D.I. (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 51, 690.
- Benemann, J.R. & Valentine, R.C. (1972), Adv. Microb. Physiol. 8, 59.
- Bennett, R.; Rigopoulos, N. & Fuller, R.C. (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 52, 762.
- Bregoff, H.M. & Kamen, M.D. (1952), Arch. Biochem. Biophys. 36, 202.
- Brintzinger, H. (1966), Biochemistry 5, 3947.
- Bui, P.T. & Mortenson, L.E. (1968), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 1021.
- Bulen, W.A. & Le Comte, J.R. (1966), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 56, 979.
- Bulen, W.A.; Burns, R.C. & Le Comte, J.R. (1965), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 53, 532.
- Burns, R.C. & Bulen, W.A. (1966), Arch. Biochem. Biophys. 113, 461.
- Dilworth, M. (1966), Biochim. Biophys. Acta 127, 285.
- Gest, H. (1972), Adv. Microb. Physiol. 7, 243.
- Gest, H. & Kamen, M.D. (1949 a), Science 109, 558.
- Gest, H. & Kamen, M.D. (1949 b), J. Bacteriol. 58, 239.
- Gest, H. & Kamen, M.D. (1960), Encycl. Plant Physiol. 2, 568.
- Gest, H.; Kamen, M.D. & Bregoff, H.M. (1950), J. Biol. Chem. 182, 153.
- Hardy, R.W.F. & Burns, R.C. (1968), Annu. Rev. Biochem. 37, 331.
- Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K. & Burns, R.C. (1968), Plant Physiol. 43, 1185.

- Hardy, R.W.F.; Burns, R.C. & Parshall, G.W. (1971), Adv. Chem. Ser., N° 100, Bio-organic Chemistry, pp 219-247.
- Kamen, M.D. & Gest, H. (1949), Science 109, 560.
- Katoh, T. (1963), Plant Cell Physiol. 4, 13.
- Klemme, J.H. & Schlegel, H.G. (1967), Arch. Mikrobiol. 59, 185.
- Kohlmler, E.F.; Jr. & Gest, H. (1951), J. Bacteriol. 61, 269.
- Kondrat'eva, E.N. (1963), Photosynthetic Bacteria Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem, 243 pp.
- Lee, S.B. & Wilson, P.W. (1943), J. Biol. Chem. 151, 377.
- Lindstrom, E.S.; Burris, R.H. & Wilson, P.W. (1949), J. Bacteriol. 58, 313.
- Lindstrom, E.S.; Lewis, S.M. & Pnisky, M.J. (1951), J. Bacteriol. 61, 481.
- Ludden, P.W. & Burris, R.H. (1976), Science, 194, 424.
- Mortenson, L.E.; Zumft, W.G. & Palmer, G. (1973), Biochim. Biophys. Acta 292, 422.
- Munson, T.P. & Burris, R.H. (1969), J. Bacteriol. 97, 1093.
- Nagatani, H.; Shimizu, M. & Valentine, R.C. (1971), Arch. Mikrobiol. 79, 164.
- Newton, J.W. & Wilson, P.W. (1953), J. Microbiol. Serol. 19, 71.
- Nordlund, S.; Eriksson, U. & Baltscheffsky, H. (1977), Biochim. Biophys. Acta 462, 187.
- Okuda, A.; Yamaguchi, M. & Kobayashi, M. (1960), Soil. Plant Food (Tokyo) 5, 73.
- Ormerod, J.G.; Ormerod, K.S. & Gest, H. (1961), Arch. Biochem. Biophys. 94, 449.
- Paschinger, H. (1974), Arch. Mikrobiol. 101, 379.
- Pfennig, N. (1967), Annu. Rev. Microbiol. 21, 285.
- Pratt, D.C. & Frenkel, A.W. (1959), J. Plant Physiol. 34, 333.
- Qadri, S.M.H. & Hoare, D.S. (1968), J. Bacteriol. 95, 2344.
- Roelofsen, P.A. (1935), Doctoral thesis, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.

- Schick, H.J. (1971 a), Arch. Mikrobiol. 75, 89.
- Schick, H.J. (1971 b), Arch. Mikrobiol. 75, 102.
- Schick, H.J. (1971 c), Arch. Mikrobiol. 75, 110.
- Schöllhorn, R. & Burris, R.H. (1966), Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 24, 710.
- Schön, G. & Biedermann, M. (1973), Biochim. Biophys. Acta 304, 65.
- Schön, G. & Voelskow, H. (1976), Arch. Mikrobiol. 107, 87.
- Schanmugam, K.T. & Valentine, R.C. (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 136.
- Stewart, W.D.P. (1973), Annu. Rev. Microbiol. 27, 283.
- Strandberg, G.W. & Wilson, P.W. (1968), Can. J. Microbiol. 14, 25.
- Taniguchi, S. & Kamen, M.D. (1963), Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria (edited by the Japanese Society of Plant Physiologists), pp 465-484, The University of Tokyo Press, Tokyo.
- Tempest, D.W.; Meers, J.L. & Brown, C.M. (1970), Biochem. J. 117, 405.
- Thiele, H.H. (1966), Doctoral thesis, University of Göttingen citado por Pfennig (1967).
- Uffer, R.L. (1973), J. Bacteriol. 116, 874.
- van Niel, C.B. (1931), Arch. Mikrobiol. 3, 1.
- van Niel, C.B. (1944), Bacteriol. Rev. 8, 1.
- Wall, J.S.; Wagenknecht, A.C.; Newton, J.W. & Burris, R.H. (1952), J. Bacteriol. 63, 563.
- Wertlieb, D. & Vishniac, W. (1967), J. Bacteriol. 93, 1722.
- Wilson, P.W. & Burris, R.H. (1947), Bacteriol. Rev. 11, 41.
- Yoch, D.C. (1978), A Treatise on Dinitrogen (N₂) Fixation (R.C. Burns y R.W.F. Hardy, eds) John Wiley & Sons, New York.
- Yoch, D.C. & Arnon, D.I. (1970), Biochim. Biophys. Acta 197, 180.
- Yoch, D.C. & Arnon, D.I. (1975), J. Bacteriol. 121, 743.

Yoch, D.C.; Mortensen, R.F. & Lindstrom, E.S. (1968), Bacteriol
Proc., p. 133.

Zumft, W.G.; Palmer, G. & Mortensen, L.E. (1973), Biochim.
Biophys. Acta 292, 413.

FISIOLOGIA

CAPITULO XVI

RESPIRACION VS FOTOSINTESIS

XVI.1. Introducción

XVI.2. Crecimiento aeróbico

XVI.3. Fotótrofos obligados

XVI.4. Efecto de la luz en la respiración

PARTE 6: FISILOGIA

XVI. RESPIRACION VERSUS FOTOSINTESIS

XVI.1. Introducción

Bajo condiciones naturales, los microorganismos fotosintéticos reciben luz solar durante sólo una parte del día y aun que su crecimiento se limite a este período, se espera que desarrollen algún metabolismo durante los intervalos de oscuridad.

En condiciones aeróbicas, las bacterias purpúreas incluyendo las anaeróbicas obligadas (Chromatiaceae) son capaces de aceptar el oxígeno (Nakamura, 1937). Con la excepción de *Thiocapsa roseopersicina*, ninguna de las Chromatiaceae puede crecer en oscuridad; sin embargo numerosas especies de las Rhodospirillaceae pueden hacerlo aeróbicamente, en ausencia de luz. Con respecto a las bacterias verdes, no se han observado procesos de respiración salvo en *Chloroflexus aurantiacus*.

La capacidad de crecer en la oscuridad es de poca importancia ecológica, dado que estos organismos no se desarrollan en la oscuridad en condiciones naturales, salvo que exista una disponibilidad periódica de luz. La presencia de este potencial nos permite entender cómo las bacterias purpúreas pueden sobrevivir en medios naturales donde hay poca o ninguna penetración luminosa.

XVI.2. Crecimiento aeróbico

Existen ocho especies de *Rhodopseudomonas* y *Rhodospirillum* (*Rp. palustris*, *Rp. capsulata*, *Rp. sphaeroides*, *Rp. gelatinosa*, *Rp. acidofila*, *Rp. sulfidophila*, *Rs. rubrum* y *Rs. tenue*) que pueden crecer aeróbicamente en la oscuridad, a presiones parciales de O₂ normales o ligeramente reducidas.

Pfennig (1970) demostró que otras cinco especies, consideradas anaeróbicas estrictas, pueden también desarrollarse en la oscuridad en condiciones microaerofílicas: *Rp. viridis*, *Rs. fulvum*, *Rs. molischianum*, *Rs. photometricum* y *Rm. vannielli*. Más sorprendente fue su hallazgo de que *Thiocapsa roseopersicina*

podía crecer organotróficamente en la oscuridad en un medio microaerofílico.

Pfennig postuló la existencia de modos diferentes de crecimiento proponiendo que en la oscuridad podrían funcionar dos mecanismos oxidativos:

- 1) vía cadena de transporte fotosintético de electrones, en organismos pigmentados;
- 2) vía cadena de transporte oxidativo de electrones, en organismos incoloros.

El medio que permite el desarrollo de los microorganismos en la oscuridad es esencialmente el mismo que aquel en el cual crecen a la luz. Los factores de crecimiento requeridos no varían. La mayor diferencia estriba en el metabolismo; bajo condiciones anaeróbicas a la luz, el CO_2 sirve como aceptor de hidrógenos para la oxidación de los sustratos y el carbono reducido se utiliza para la producción de material celular. Cuando el O_2 es el aceptor de hidrógenos, los sustratos orgánicos se descomponen liberando CO_2 y el rendimiento respecto al material celular a partir de la misma cantidad de sustrato, es mucho menor que cuando el crecimiento ocurre anaeróbicamente a la luz.

XVI.3. Fotótrofos obligados

Sóloamente las Chromatiaceae y Chlorobiaceae son fotótrofos anaeróbicos obligados, pero como se indicó anteriormente, *Thiocapsa roseopersicina* y la bacteria verde *Chloroflexus aurantiacus* pueden crecer en la oscuridad.

Numerosas especies de Chromatiaceae se encuentran naturalmente en medios acuosos extremadamente turbios, en los cuales deben ubicarse cerca de la superficie para obtener luz. De esta forma se hallan frecuentemente expuestas a la acción del O_2 .

Hurlbert (1967) demostró que el O_2 no afectaba la viabilidad y motilidad de las células de *Chr. vinosum* durante períodos de hasta 21 horas.

El hecho de que la motilidad se mantenga en presencia del O_2 implica que el metabolismo energético no se halla afectado

en forma considerable; sin embargo, *Chromatium* no puede crecer en la oscuridad en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (tampoco puede hacerlo a la luz en aerobiosis).

Existen tres clases de procesos generadores de ATP en Chromatiaceae:

- 1) respiración aeróbica;
- 2) fermentación;
- 3) fotofosforilación.

Como ya hemos mencionado, las Chromatiaceae tienen capacidad de aceptar O_2 . La velocidad de respiración de las bacterias purpúreas es baja, como ocurre en *Chr. vinosum* D; pero en presencia de sulfuro o tiosulfato es sólo ligeramente menor que la correspondiente a *Rp. sphaeroides*, organismo que puede crecer aeróbicamente, con malato como sustrato (Gibson, 1967).

La velocidad de oxidación del malato en *Chr. vinosum* es aproximadamente la mitad de la del tiosulfato. Por lo tanto, las bajas velocidades de consumo de O_2 no son una explicación suficiente para la falta de crecimiento aeróbico.

Las Chromatiaceae no poseen pigmentos característicos tipo citocromo oxidasa y tampoco se ha demostrado la existencia de fosforilación oxidativa. Sin embargo, Gibson (1967) obtuvo una relación P/O de aproximadamente 1.0, en ciertas experiencias con células enteras en las cuales se midió el ATP intracelular; esto sugeriría que *Chr. vinosum* tendría cierta capacidad para fosforilar oxidativamente. Esta relación es mucho menor que aquella obtenida por Ramírez y Smith (1968) (P/O = 2,8) en células enteras de *Rs. rubrum* que pueden crecer aeróbicamente.

Una posible explicación para esta baja eficiencia surgiría analizando la región de los citocromos en la cadena de transferencia de electrones en *Chr. vinosum*. Olson y Chance (1960) y Morita et al (1965) encontraron dos componentes citocromicos que eran autooxidables (Cusanovich et al, 1968). Las características espectrales de estos pigmentos correspondían a aquellas de los citocromos aislados por Bartscih y Kamen (1960), cuyos potenciales medios son de 0 V. Los componentes autooxidables se oxidan en suspensiones celulares, en ausencia de sustrato y se reducen en presencia del mismo. Comparada con organismos que contienen sistemas típicos de transporte de electrones, con

citocromos b, c y a, en los cuales se encuentra una relación P/O de 2, la oxidación por componentes con potenciales medios de 0 V es ineficiente en cuanto a la conversión de energía.

Estas consideraciones llevaron a Gibson (1967) a concluir que no existe un único factor para explicar el crecimiento de *Chr. vinosum*, aeróbicamente en la oscuridad; sino que este hecho es una combinación de elementos que incluyen la baja velocidad de consumo de O₂ y la ineficiencia de la fosforilación aeróbica.

El segundo proceso generador de energía es la fermentación anaeróbica. Van Gernerden (1968) demostró que en *Chromatium*, los carbohidratos almacenados y sintetizados a la luz se convertían en poli-β-hidroxibutirato en la oscuridad. Durante esta transformación, el azufre elemental intracelular se reduce a sulfuro y se libera CO₂. Van Gernerden postuló que los carbohidratos acumulados se metabolizaban a piruvato vía el camino de Embden-Meyerhof, seguido de la síntesis de PHB vía acetyl-CoA y acetoacetylCoA. Dicha conversión rinde 3 ATP por unidad glucosídica. Este proceso provee a la célula de la energía necesaria para su mantenimiento y motilidad en la oscuridad, pero el rendimiento está limitado por la cantidad de carbohidratos almacenados disponibles.

El hecho de que *Chromatium* no crezca aeróbicamente a la luz puede deberse al efecto del O₂ sobre la síntesis de la Bcl. Hurlbert (1967) halló que el O₂ inhibe la formación de Bcl en *Chromatium*. Esta acción es en sí suficiente para explicar sus características de fotótrofo anaeróbico obligado.

Sistrom (1965) observó que en *Rs. molischianum* el O₂ inhibía la síntesis de Bcl y carotenoides. Este microorganismo no puede desarrollarse por tiempo prolongado, en presencia de aire. El crecimiento, medido en función del incremento en la densidad óptica, y la síntesis de proteínas continúan a la luz hasta que la inhibición en la formación de la Bcl impide el desarrollo.

En *Chr. vinosum*, Hurlbert (1967) encontró que el O₂ inhibía la división celular pero no la síntesis de proteínas. A pesar de que el O₂ tiene cierto efecto sobre la utilización del piruvato y del tiosulfato, Hurlbert concluyó que este hecho no es suficiente para dar cuenta de la inmediata inhibición de la división celular. Por lo tanto, sugirió que el O₂ actuaría

sobre algún proceso esencial, tal como la síntesis del DNA.

Existen numerosas hipótesis que tratan de explicar la sensibilidad de las bacterias anaeróbicas obligadas hacia el O_2 . Estas fueron discutidas en detalle por Morris (1975) y trataremos de analizarlas brevemente:

1) El O_2 es un agente tóxico.

Esta hipótesis no es aplicable dado que se han estudiado miembros de las bacterias purpúreas que retienen su viabilidad en presencia de O_2 durante períodos considerables.

2) La célula contiene componentes indispensables que poseen grupos SH; la oxidación de los mismos para formar -S-S- impide el crecimiento celular.

Aún no se han efectuado estudios respecto a este tema en Chromatiaceae.

3) El O_2 controla la actividad celular determinando la concentración intracelular o el estado de oxidación de algún regulador metabólico, tal como una cupla rédox sujeta a oxidación directa o en equilibrio con otra similar.

Esta hipótesis fue propuesta originalmente para explicar el control de la síntesis de Bcl por el O_2 . Cohen-Bazire et al (1957) y Davies et al (1973) sugirieron que el estado rédox de algún componente celular era el factor que regulaba la síntesis de la Bcl. Sin embargo, existen estudios que indican que el ATP es el compuesto más importante (Fanica-Gaignier, 1971; Schmidt y Kamen, 1971). En contraste, Oelze y Kamen (1971) no pudieron demostrar la función regulatoria del ATP durante la transición de la fase aeróbica a la anaeróbica.

4) La presencia del O_2 previene la obtención y el mantenimiento del potencial rédox bajo (E_h) necesario para el crecimiento. En condiciones naturales, las Chromatiaceae crecen en un intervalo de E_h de -230 a +320 mV (Baas-Becking y Wood, 1955). Es característico durante el crecimiento de las bacterias purpúreas observar un cambio en el E_h del medio pero este hecho depende más del sustrato empleado que del organismo. Según estos resultados se puede excluir al E_h como factor preponderante durante el crecimiento.

5) Reducción preferencial del O_2 consumiendo el poder reductor celular en forma improductiva.

Esta hipótesis sugiere que el O_2 oxida al NAD(P)H en forma más rápida que en la que es generado, desbalanceando el pool celular de poder reductor. No existe hasta el momento, ninguna información acerca de este tema en Chromatiaceae, a pesar de que la baja relación P/O encontrada en células enteras, indicaría que esta suposición podría ser cierta (Gibson, 1967).

En resumen, los estudios realizados no pueden explicar aún la inhibición inmediata del desarrollo producida por el O_2 , en *Chr. vinosum* crecida a la luz.

Es probable que, en la oscuridad, exista una combinación de factores tales como una velocidad de respiración baja acoplada a una eficiencia pobre en la fosforilación, que previenen el crecimiento. Por lo tanto, dado que el O_2 inhibe la síntesis de Bcl, las Chromatiaceae son fotótrofos anaeróbicos (o microaerofílicos) obligados.

XVI.4. Efecto de la luz en la respiración

Nakamura (1937) advirtió que la velocidad de consumo de O_2 en *Rp. palustris* disminuía durante la iluminación. Este autor interpretó estos resultados como evidencias de la producción fotoquímica de O_2 en la bacteria y no como un decrecimiento en el consumo del mismo.

En *Rs. rubrum* se ha observado frecuentemente una supresión completa de la utilización del O_2 mientras que en *Rp. sphaeroides* y *Rp. capsulata* se ha encontrado sólo una inhibición parcial de la misma. Sin embargo, por tratamiento de las células con períodos secuenciales cortos de luz y oscuridad, se obtiene también una inhibición completa. Este cambio está acompañado de un incremento de la respiración en la oscuridad (Fork y Goedheer, 1964; Ramírez y Smith, 1968). Además, el crecimiento continúa a la misma velocidad tanto en presencia de aire como en anaerobiosis (Cohen-Bazire et al, 1957)

Según van Niel (1941) y Morita (1955) la utilización de los sustratos no varía. Así el consumo de acetato es el mismo

en suspensiones iluminadas en presencia de aire o nitrógeno, mientras la captación de O_2 se halla totalmente suprimida. Según Clayton (1955), existe una velocidad diferente de consumo de succinato en luz y oscuridad. Más aún, Clayton demostró que el succinato utilizado vía respiración o fotosíntesis dependía de la intensidad luminosa y de la tensión de oxígeno. El modo preferencial de uso del sustrato fue a través de la fotosíntesis. Van Niel interpretó estas observaciones sugiriendo que la luz inhibía la respiración.

No existen dudas acerca de que la disminución en el consumo de O_2 en la luz, es el resultado de una interacción entre los procesos respiratorio y fotosintético. White y Vernon (1958) consideraron la posibilidad de que este efecto podía estar relacionado con la fotofosforilación. Si la oxidación se halla acoplada a la fosforilación como en las mitocondrias de mamíferos, la competencia entre la fotofosforilación y la fosforilación oxidativa podría explicar la inhibición de la respiración por parte de la luz. De acuerdo con esta hipótesis, Ramírez y Smith (1968) encontraron que los compuestos 2-n-heptil-4-hidroxi-quinolina-N-óxido (HQNO) y carbonil-cianuro trifluorometoxifenilhidrazina (FCCP) prevenían dicha inhibición en células enteras de *Rs. rubrum*. HQNO es un inhibidor del transporte de electrones de la fotosíntesis y FCCP es un desacoplante de la fosforilación. Un segundo mecanismo para explicar el efecto de la luz está relacionado con la idea de que el transporte electrónico involucrado en la fotosíntesis y el oxidativo compiten por el hidrógeno o por dadores de electrones (van Niel, 1941; Clayton, 1955; Morita, 1955; Fork y Goedheer, 1964).

Horio y Kamen (1962 b) sugirieron que la presencia de una sola cadena oxidativa como carrier electrónico, era suficiente para responder a ambos transportes. En cambio, Ramírez y Smith (1968) y Welsch y Smith (1969) postularon la existencia de dos cadenas separadas para el transporte de electrones, de acuerdo con sus observaciones de la síntesis de ATP en células intactas crecidas fotosintéticamente.

Estudios realizados por Pfennig (1970) mostraron que las especies marrones de *Rhodospirillum* (*fulvum*, *molischianum* y *photometricum*) las cuales eran consideradas anaerobias obligadas, podían crecer en la oscuridad provistas de una tensión de O_2

lo suficientemente baja como para permitir la síntesis de pigmentos. Estos hallazgos son incompatibles con la idea de dos cadenas separadas de transporte de electrones, en estas especies. Pfennig supuso que estas bacterias obtenían el ATP por fosforilación oxidativa vía la cadena de transporte electrónico involucrada en la fotosíntesis.

Un tercer mecanismo que trata de explicar la inhibición de la respiración por la luz resulta de los trabajos de Thore et al (1969) y Keister y Minton (1971). Estos autores postularon que la inhibición la producía un cambio, inducido por la luz, en el estado redox del carrier electrónico. Thore et al (1969) hallaron que la luz inhibía reversiblemente la oxidación del NADH en cromatóforos de *Rs. rubrum* crecidas a la luz. La combinación de un desacoplante de la fosforilación y de un inhibidor del transporte de electrones, no sólo previene la inhibición sino que también estimula sinérgicamente la oxidación del NADH a la luz.

El mecanismo de estos efectos no se halla aún totalmente dilucidado. El transporte de electrones *in vitro* es sumamente sensible al estado redox de los carriers y la presencia de un medio sobreoxidante o sobre-reductor inhiben la fotofosforilación (Horio y Kamen, 1962 a; Bose y Gest, 1963).

En conclusión, la luz inhibe la oxidación del NADH en cromatóforos y las etapas correspondientes a las deshidrogenasas en la cadena de transporte de electrones son los sitios probables para dicho efecto.

Bajo ciertas condiciones a la luz, la oxidación del NADH y del succinato ocurren predominantemente vía el sistema fotosintético. Estas observaciones junto con los hallazgos de Thore et al (1969) sugirieron que dichas etapas son comunes a ambos sistemas fotosintéticos y respiratorio.

Según Thore et al (1969) la única actividad, asociada al transporte de electrones, que aumenta durante la transición luz-oscuridad en *Rs. rubrum*, es la oxidasa terminal (posiblemente citocromo o). Así, ambos sistemas divergerían a nivel de la oxidasa.

REFERENCIAS

- Baas-Becking, L.G.M. & Wood, E.J. (1955), Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. B 3, 160.
- Bartsch, R.G. & Kamen, M.D. (1960), J. Biol. Chem. 235, 825.
- Bose, S.K. & Gest, H. (1963), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 49, 337.
- Clayton, R.K. (1955), Arch. Mikrobiol. 22, 195.
- Cohen-Bazire, G.; Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y. (1957), J. Cell. Comp. Physiol. 49, 25.
- Cusanovich, M.A.; Bartsch, R.G. & Kamen, M.D. (1968), Biochim. Biophys. Acta 153, 397.
- Davies, R.C.; Gorchein, A.; Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G.H. (1973), Nature (London), 245, 15.
- Fanica-Gaignier, M. (1971), Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research (G. Forti, M. Avron y A. Melandri, eds.), pp 2721-2726, Dr. W. Junk, The Hague.
- Fork, D.C. & Goedheer, J.C. (1964), Biochim. Biophys. Acta 79, 249.
- Gibson, J. (1967), Arch. Mikrobiol. 59, 104.
- Horio, T. & Kamen, M.D. (1962 a), Biochemistry 1, 144.
- Horio, T. & Kamen, M.D. (1962 b), Biochemistry 1, 1141.
- Hurlbert, R.E. (1967), J. Bacteriol. 93, 1346.
- Keister, D.L. & Minton, M.J. (1971), Energy Transduction in Respiration and Photosynthesis (E. Quagliariello, S. Papa y C.S. Rossi, eds.), pp. 375-384, Adriatica Editrice, Bari, Italy.
- Morita, S. (1955), J. Biochem. (Tokyo) 42, 533.
- Morita, S.; Edwards, M. & Gibson, J. (1965), Biochim. Biophys. Acta, 109, 45.
- Morris, J.G. (1975), Adv. Microb. Physiol. 12, 159.
- Nakamura, H. (1937), Acta Phytochim. 9, 189.
- Oelze, J. & Kamen, M.D. (1971), Biochim. Biophys. Acta 234, 137.

- Olson, J.M. & Chance, B. (1960), Arch. Biochem. Biophys. 88, 26.
- Pfennig, N. (1970), J. Gen Microbiol. 61, ii.
- Ramírez, J. & Smith, L. (1968), Biochim. Biophys. Acta 153, 466.
- Schmidt, G.L. & Kamen, M.D. (1971), Arch. Mikrobiol. 76, 51.
- Siström, W.R. (1965), J. Bacteriol. 89, 403.
- Thore, A.; Keister, D.L. & San Pietro, A. (1969), Arch. Mikrobiol. 67, 378.
- van Gemerden, H. (1968), Arch. Mikrobiol. 64, 118.
- van Niel, C.B. (1941), Adv. Enzymol. 1, 263.
- Welsch, F. & Smith, L. (1969), Biochemistry 8, 3403.
- White, F.G. & Vernon, L.P. (1958), J. Biol. Chem. 233, 217.

CAPITULO XVII

CRECIMIENTO Y METABOLISMO FERMENTATIVO

XVII.1. Introducción

XVII.2. Rhodospirillacea

XVII.2.1. Metabolismo anaeróbico en la oscuridad

XVII.2.1.1. *Rhodospseudomonas palustris*

XVII.2.1.2. *Rhodospirillum rubrum*

XVII.2.2. Crecimiento anaeróbico en la oscuridad

XVII.2.2.1. Rhodopseudomonas

XVII.2.2.2. *Rhodospirillum rubrum*

XVII.3. Chromatiaceae

XVII.3.1. Metabolismo anaeróbico en oscuridad

XVII.3.1.1. Producción de ácidos

XVII.3.1.2. Metabolismo de compuestos inorgánicos

XVII.3.2. Crecimiento anaeróbico en oscuridad

XVII. CRECIMIENTO Y METABOLISMO FERMENTATIVO

XVII.1. Introducción

Las bacterias fototróficas anoxigénicas representan un gran grupo de microorganismos que poseen la capacidad de crecer anaeróbiamente a la luz y fotosintetizar. Sin embargo, existen algunas Rhodospirillaceae que pueden desarrollarse bajo condiciones aeróbicas, en la oscuridad. Uffen y Wolfe (1970) descubrieron que ciertas especies de esta familia también podían crecer en anaerobiosis y en oscuridad. Estas reacciones recibieron una atención limitada y en consecuencia, aún no ha sido evaluado su significado.

En el presente capítulo trataremos de discutir brevemente este tema.

XVII.2. Rhodospirillaceae

XVII.2.1. Metabolismo anaeróbico en la oscuridad

Hasta 1930, se consideraba que las Rhodospirillaceae crecían anaeróbiamente a la luz y metabolizaban una amplia variedad de sustratos orgánicos. Ciertas observaciones realizadas por Gaffron (1933) y Roelofsen (1934) sugirieron que podría existir desarrollo anaeróbico en la oscuridad. Estos investigadores intentaron determinar las condiciones nutricionales para mantener dicho desarrollo y dedujeron que las reacciones que ocurrían en oscuridad correspondían a un metabolismo endógeno "peculiar" el cual proveía de energía a la célula para su mantenimiento durante los períodos de oscuridad (Muller, 1933; Roelofsen, 1934; van Niel, 1944). Aparentemente, los sustratos se convertían primero en material de reserva durante el crecimiento anaeróbico, a la luz que luego se degradaba cuando las células se hallaban en oscuridad.

Nakamura (1937, 1939, 1941) observó que en suspensiones de *Rp. palustris* incubadas anaeróbiamente, en la oscuridad, el consumo y la evolución del H₂ eran estimulados por la adición de una variedad de compuestos orgánicos.

Diez años más tarde, Kohlmeier y Gest (1951) informaron que el metabolismo anaeróbico y en oscuridad, de células de *Rs. rubrum* se podía estimular en forma análoga, durante incubaciones con piruvato.

XVII.2.1.1. Rhodospseudomonas palustris

Nakamura (1937, 1941) estudió la estimulación del metabolismo anaeróbico, en oscuridad, usando *Rp. palustris* crecidas fotoheterotróficamente. La adición de compuestos tales como formiato, piruvato y glucosa dieron como resultado un incremento en la formación de H_2 y CO_2 , mientras que sustratos del tipo malato, fumarato, L-asparagina, gliceraldehído y fructosa-1-6-difosfato estimulaban el consumo de H_2 . Es de particular interés, la capacidad de *Rp. palustris* para metabolizar formiato y piruvato en la oscuridad. Nakamura (1937, 1939, 1941) concluyó que el piruvato se degradaba a acetato, cuando células de *Rp. palustris* crecidas fotosintéticamente se colocaban en condiciones anaeróbicas, a la oscuridad.

Yoch y Lindstrom (1969) purificaron parcialmente la formiato deshidrogenasa de este microorganismo, después que las células habían crecido fotosintéticamente en un medio suplementado con pequeñas cantidades de formiato. En estos estudios, la degradación enzimática del formiato ocurría de igual forma tanto en luz como en oscuridad, utilizando NAD^+ como oxidante.

Qadri y Hoare (1968) midieron la actividad de la enzima formiato deshidrogenasa en células crecidas fotosintéticamente. En estos estudios la hidrogenasa presente en los extractos celulares se acopló con la enzima formiato deshidrogenasa y se produjo la oxidación del formiato a CO_2 e H_2 . Estas observaciones indicaron que en *Rp. palustris* se desarrollaba actividad de fórmico hidrogenliasa.

Sin embargo, en 1973, Qadri y Hoare sugirieron que *Rp. palustris* degradaba el piruvato mediante un proceso fermentativo vía una piruvato decarboxilasa con producción de CO_2 , acetaldehído y acetoína. Actividades similares de esta enzima se observaron también en otras Rhodospirillaceae.

Desafortunadamente aún no se han hallado las condiciones

para mantener el crecimiento anaeróbico y en la oscuridad de *Rp. palustris*. Además, se desconoce si para la producción de energía en estas condiciones funciona el camino de la piruvato decarboxilasa o de la piruvato-formiato liasa o de ambas.

XVII.2.1.2. Rhodospirillum rubrum

En 1951, Kohlmler y Gest publicaron resultados de estudios acerca del metabolismo anaeróbico, en la oscuridad de Rhodospirillaceae. Estos investigadores realizaron experiencias usando suspensiones de *Rs. rubrum* crecidas en medios suplementados con malato y glutamato, bajo condiciones anaeróbicas, con luz y aeróbicas, en oscuridad. Estas células poseen la capacidad de fermentar compuestos orgánicos tales como lactato, succinato, fumarato o malato; sin embargo, se ha usado en forma predominante el piruvato.

Cuando células de *Rs. rubrum* crecidas anaeróbicamente, a la luz, se suspendieron en buffer fosfato con piruvato y, se incubaron anaeróbicamente, en oscuridad, se observó la formación de CO₂, ácidos acético y propiónico y trazas de H₂.

Las suspensiones de células crecidas aeróbicamente, en la oscuridad también fermentan el piruvato en forma análoga, excepto que el consumo de sustrato produce grandes cantidades de H₂, detectándose masas pequeñas pero significativas de butirato, valerato y caproato.

De acuerdo con estos datos, Kohlmler y Gest (1951) concluyeron que *Rs. rubrum* fermentaba el piruvato anaeróbicamente, en la oscuridad, en forma similar a la de las bacterias del ácido propiónico.

Schön (1968) y Schön y Biedermann (1972, 1973) realizaron experiencias semejantes utilizando *Rs. rubrum* crecida en forma aeróbica en la oscuridad y luego adaptada a condiciones anaeróbicas. Estos investigadores observaron que la cantidad de acetato y propionato formada, particularmente con fructosa como sustrato no se hallaba de acuerdo con los valores teóricos calculados en base al conocimiento del metabolismo fermentativo en bacterias del ácido propiónico (Wood, 1961). Los autores propusieron que las discrepancias se podían explicar teniendo en cuenta las condiciones de cultivo y el sustrato empleados antes

de la adaptación anaeróbica. Dado que estas células formaban cantidades variables de propionato y como *Rs. rubrum* crecida anaeróbicamente en la oscuridad producía solamente ácidos fórmico y acético, a partir de piruvato (la fructosa no puede mantener el crecimiento fermentativo anaeróbico, en oscuridad), no se encontró una causa para la formación del propionato en la generación energética (Uffen, 1973 a).

De estos resultados se concluye que el propionato funciona como un intermediario durante el metabolismo fotosintético celular. Si así fuera, cuando las células se trasladan a condiciones anaeróbicas, en oscuridad, la formación del propionato ocurriría durante la represión del sistema enzimático fotosintético, en los estadios tempranos de la transición del metabolismo fermentativo (Uffen, 1973 a). La aparición de propionato se relaciona también con el aumento del tiempo generacional de *Rs. rubrum* (Uffen, 1973 b) cuando las células crecidas fotosintéticamente se transfieren a condiciones de oscuridad o baja intensidad luminosa.

Cuando se incuban suspensiones de células crecidas anaeróbicamente a la luz o aeróbicamente en oscuridad, con formiato como sustrato, en condiciones anaeróbicas y en oscuridad, se forman cantidades equimolares de CO_2 e H_2 . Estos resultados sugieren que las células oxidan el formiato mediante una formiato-hidrógeno liasa. Jungermann y Schön (1974) presentaron evidencias adicionales. Según estos autores, suspensiones de células enteras adaptadas a la oscuridad degradarían el (^{14}C)piruvato con producción de formiato. Dado que esta actividad se detectó apenas, en células no adaptadas a la oscuridad, Jungermann y Schön (1974) concluyeron que la capacidad de producir ácidos volátiles mediante la piruvato formiato liasa, era un evento celular importante que ocurría durante el período de adaptación a la oscuridad. Esta reacción parece ser esencial en células crecidas anaeróbicamente, en oscuridad (Gorrelly Uffen, 1977). Sin embargo, no se puede aún descartar la existencia de algún camino alternativo de degradación del piruvato durante la transición de luz a oscuridad en el desarrollo anaeróbico. Específicamente, podría haber actividad de piruvato-ferredoxina oxidoreductasa en células fermentativas, aún después de un largo período de crecimiento anaeróbico en oscuridad.

XVII.2.2. Crecimiento anaeróbico en la oscuridad

XVII.2.2.1. Rhodopseudomonas

Mientras numerosas especies de *Rhodopseudomonas* crecen lentamente en anaerobiosis y oscuridad, en medio sólido (Uffen y Wolfe, 1970), *Rp. gelatinosa* se desarrolla rápidamente en estas mismas condiciones en medio líquido. Estudios preliminares sugirieron que las células metabolizaban el piruvato en forma diferente a las de *Rs. rubrum*, dado que no se producía H_2 durante el crecimiento en oscuridad.

Además, tres cepas de ciertas especies de *Rhodopseudomonas* que metabolizan activamente la gelatina durante el crecimiento fotosintético, muestran capacidad para crecer metilotróficamente bajo condiciones anaeróbicas, en oscuridad, con CO (Uffen, 1976). El desarrollo de la cepa 1 en anaerobiosis y oscuridad era CO-dependiente. Así, no existía crecimiento cuando células de esta cepa se incubaban anaeróbicamente en oscuridad con metano, metanol, formaldehído, formiato o una mezcla gaseosa de H_2 -CO₂. Como era de esperar, cuando suspensiones de la cepa 1 crecida en CO, se incubaban en oscuridad con metano, metanol, formaldehído o formiato no se detectó actividad oxidante, medida como formación de H_2 .

La interacción entre la luz y el CO en el metabolismo celular es sumamente compleja. Cuando células de la cepa 1 crecidas en CO se colocaron a la luz, continuaron su desarrollo y metabolizaron el CO en la misma medida que lo hacían en anaerobiosis y oscuridad. Además, formaban cantidades similares de Bcl a en luz y en oscuridad (7,5 y 7,8 nmoles/mg proteína respectivamente). Estos resultados sugirieron que la actividad oxidante de CO en la cepa 1 era inducible e insensible a la luz. Por otro lado, cuando esta cepa se colocaba a la luz (aproximadamente 1300 lux) bajo atmósfera de argón en lugar de CO, se perdía dicha actividad oxidante, la concentración de Bcl a se incrementaba a 30 nmoles/mg proteína y el crecimiento ocurría fotosintéticamente. La transferencia de estas células nuevamente a las condiciones anteriores (luz u oscuridad, en presencia de CO) no dio lugar a la reaparición de las reacciones específicas para el CO (Dashkevicz y Uffen, resultados no publicados).

Entonces, a pesar de que la cepa 1 posee la capacidad de metabolizar y crecer en CO₂, dicha actividad no vuelve a expresarse después que las células han sido desarrolladas en presencia de argón, a la luz.

(VII.2.2.2. Rhodospirillum rubrum)

Numerosas especies de Rhodospirillaceae crecen lentamente en oscuridad y desarrollan colonias pigmentadas en la superficie de medios sólidos, preparados anaeróbicamente por una modificación de la técnica de Hungate (Uffen y Wolfe, 1970). Estas especies incluyen *Rp. palustris*, *Rp. sphaeroides*, *Rp. viridis* y *Rs. rubrum*.

Cuando células de *Rs. rubrum* crecidas anaeróbicamente a la luz se transfieren a condiciones anaeróbicas y oscuridad, la síntesis de proteínas continúa, las células muestran un tiempo generacional mayor y después de aproximadamente 20 divisiones celulares la concentración de Bcl a disminuye de 28 a 14 nmoles/mg proteína.

Luego de un prolongado crecimiento en oscuridad, la concentración de Bcl a disminuye lentamente hasta 0,3-0,5 nmoles/mg proteína, decreciendo también el tiempo generacional (Uffen et al, 1971; Uffen, 1973 a).

Se sugirió que la pérdida de pigmentación en cultivos en oscuridad y anaerobiosis ocurría demasiado lentamente como para ser explicada por una simple dilución durante el crecimiento donde las células producían una represión ineficiente. Se observó que células obtenidas a partir de cultivos no pigmentados (condiciones de anaerobiosis y oscuridad) desarrollaban una variedad de colonias coloreadas de rosa a rojo, durante el crecimiento en medio sólido en anaerobiosis (Uffen y Wolfe, 1970) e incubadas sin luz. De acuerdo con la pigmentación, se seleccionaron mutantes fenotípicas C y G1. Durante el crecimiento en oscuridad, la mutante C producía colonias de color rojo y sintetizaba 5-10 nmoles Bcl a/mg proteína. Bajo similares condiciones de desarrollo, la mutante G1 formaba colonias ligeramente rosadas que contenían sólo trazas de Bcl a.

Uffen et al (1971), Uffen (1973 a) y Gorrelly y Uffen (1977)

estudiaron las propiedades de crecimiento, las reacciones de oxidación inducidas por luz y el metabolismo del piruvato en estas mutantes fenotípicas.

a) Propiedades de crecimiento

Las células de las mutantes C pueden desarrollarse igualmente bien en aerobiosis o anaerobiosis en oscuridad o anaeróbicamente a la luz.

La mutante G1 puede crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis pero es sensible a la luz. Por otro lado, cuando estas células se desarrollan en condiciones aeróbicas y oscuridad y luego son transferidas a la luz en forma anaeróbica, el número de las mismas capaces de crecer y formar colonias coloreadas es considerable. Aún no se conocen las variaciones que ocurren en oscuridad, en los cultivos aeróbicos de G1, los cuales parecen favorecer el desarrollo de células insensibles a la luz y potencialmente capaces de fotosintetizar.

b) Reacciones de oxidación inducidas por la luz

La lenta respuesta de la Bcl a a la luz en la mutante G1 y la ausencia de reacciones de oxidación de citocromos sugirieron que las trazas de ftopigmento presentes no se hallaban directamente involucradas con el crecimiento fermentativo en la oscuridad. En contraste se midieron reacciones rápidas de oxidación inducidas por luz en la mutante pigmentada C crecida en fase semilogarítmica, pero los cambios de absorción no eran típicos de *Rs. rubrum* activa fotosintéticamente. Tampoco se detectó la oxidación inducida por luz del citocromo c₂ asociado con la actividad fotosintética. Como se puede deducir, aún no está aclarada la función de estas reacciones sensibles a la luz. Se considera que sería necesario un estudio de *Rs. rubrum* crecida en condiciones fermentativas, para poder determinar la calidad de luz que funciona para de-reprimir la síntesis de pigmentos y regular los cambios en la absorción, característicos de células durante el desarrollo fotosintético.

c) Metabolismo del piruvato

Rs. rubrum crece rápidamente en medios complejos (Uffen y Wolfe, 1970) o químicamente definidos (Uffen et al, 1971) libres de O₂ y conteniendo piruvato. Uffen (1973 a) observó que

en oscuridad las células producían formiato, acetato y cantidades equimolares de H_2 y CO_2 . Como la mayoría de los microorganismos que fermentan, *Rs. rubrum* incorporaba sólo un pequeño porcentaje del sustrato en material celular y en productos de reserva como poli- β -hidroxibutirato. El 96% restante del piruvato se utilizó en el metabolismo energético y rindió aproximadamente 1 mol ATP por mol consumido (Uffen, 1973 a).

El conocimiento de los productos de fermentación y la acumulación de poli- β -hidroxibutirato en las células durante el crecimiento en oscuridad, sugirió que el sustrato se degradaba por medio de la piruvato formiato-liasa o mediante el camino de la piruvato-ferredoxina óxido-reductasa o ambos.

En la Figura 17.1, se encuentra una descripción completa de las reacciones que metabolizan al piruvato en *Rs. rubrum* crecida anaeróbicamente, en oscuridad (Orrell y Uffe, 1977).

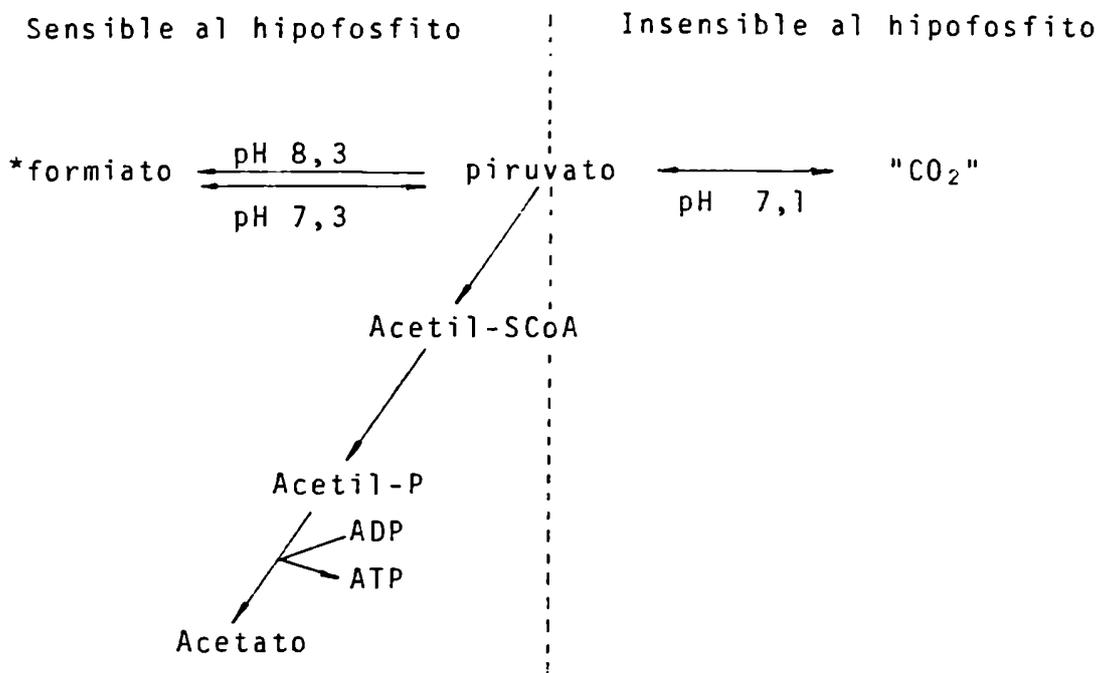
La presencia de ferredoxinas, la síntesis de poli- β -hidroxibutirato y la detección de actividad de piruvato sintetasa en células crecidas fotosintéticamente sugirieron que podría existir el camino de la piruvato-ferredoxina óxido-reductasa en *Rs. rubrum* desarrollada en oscuridad y anaerobiosis. Suspensiones de células enteras y extractos libres de células de las mutantes G1 y C crecidas anaeróbicamente en oscuridad, catalizan el intercambio de (^{14}C) bicarbonato en piruvato. Esta reacción parece ser específica para el bicarbonato y no se halla afectada por la adición de hipofosfito de sodio 9mM, potente inhibidor de la piruvato-formiato liasa (Thauer et al, 1972).

Por otro lado, este intercambio no es una propiedad única de células fermentativas.

Experiencias realizadas con extractos libres de células de G1 sugirieron que la piruvato ferredoxina óxido-reductasa no funcionaba como una reacción productora de energía, durante el crecimiento anaeróbico y en oscuridad, ya que no se observó acumulación de acetyl-fosfato (Ac-P), intermediario energético de este camino.

La producción de formiato a partir de piruvato, en cultivos anaeróbicos, en oscuridad sugirió el funcionamiento de una piruvato formiato-liasa. A diferencia del intercambio con bicarbonato, el hipofosfito de sodio inhibe fuertemente esta reacción.

Para determinar si existe actividad de piruvato formiato-



(*) Caminos alternativos de degradación de formiato:

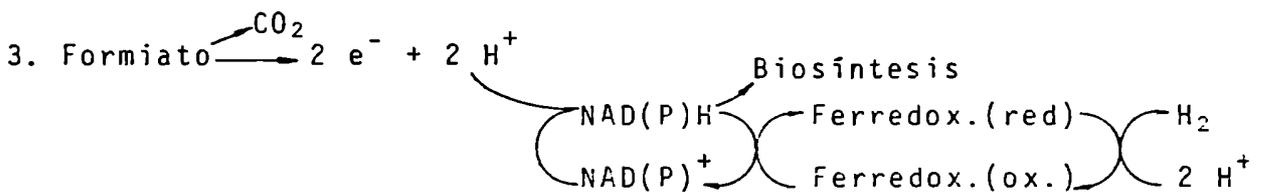
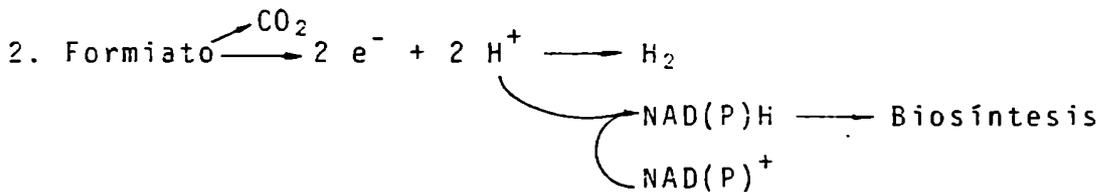
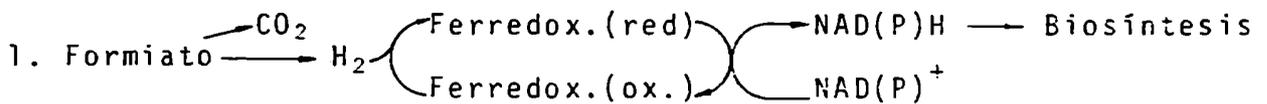


FIGURA 17.1.: Fermentación del piruvato en *Rhodospirillum rubrum* crecida en oscuridad

liasa durante el desarrollo fotosintético, se midió el intercambio utilizando la mutante C y el tipo salvaje S1 de *Rs. rubrum* crecidos a la luz en un medio conteniendo piruvato, extracto de levadura y peptona. Los resultados muestran que ambos catalizan el intercambio de (¹⁴C)formiato. Nuevamente esta reacción parece ser exclusiva de células fermentativas. Estos datos estarían en contradicción con los hallados por Jungermann y Schön (1974) quienes sugirieron que la piruvato formiato-liasa existía sólo en células de *Rs. rubrum* adaptadas a la oscuridad. Gorrell y Uffen (1978) explicaron esta discrepancia proponiendo que para que la piruvato formiato-liasa se desarrollara durante el crecimiento anaeróbico, a la luz, era necesaria la presencia de piruvato en el medio.

Experiencias adicionales indicaron que esta reacción estaba asociada a la generación de energía.

A semejanza con la reacción de intercambio del formiato, el hipofosfito de sodio 9 mM también inhibe la degradación del piruvato. La producción de Ac-P y de formiato sugirieron que *Rs. rubrum* metabolizaba el piruvato mediante una piruvato formiatoliasa similar a la hallada en *E. coli* crecida anaeróbicamente (Knappe et al, 1974). La regulación de este camino en *Rs. rubrum* se encuentra influenciada por los cambios de pH durante el crecimiento y desarrollo celular.

Las actividades metabólicas discutidas hasta este punto se han encontrado también en células fotosintéticas de *Rs. rubrum*. Una de las diferencias existentes entre el crecimiento anaeróbico en luz y oscuridad, consiste en que las células fermentativas no requieren luz para producir H₂ a partir de piruvato (Gest, 1951, 1972).

Utilizando suspensiones de *Rs. rubrum* crecidas anaeróbicamente en la oscuridad, se observó que las células producían cantidades equimolares de CO₂ e H₂ a partir de piruvato o formiato. En presencia de hipofosfito de sodio 2 mM, no hubo desprendimiento gaseoso a partir de piruvato.

La producción de H₂ en células de *Rs. rubrum* crecidas anaeróbicamente en oscuridad, parece ser similar a la presente en otros microorganismos heterotróficos anaerobios (Thauer et al, 1972, 1974). Es decir, la formación de H₂ a partir de formiato está inhibida por CO y la reacción de oxidación no requiere ATP. En contraste, en células de *Rs. rubrum* crecidas anaeróbicamente

a la luz, la producción de H_2 es insensible al CO y constituye una reacción ATP-dependiente, asociada al sistema de nitrogenasas (Dalton y Morterson, 1972; Watt et al, 1975). En estas células se ha medido la actividad de la nitrogenasa por reducción del acetileno a etileno.

A pesar de que el formiato produce H_2 en *Rs. rubrum* crecida con piruvato, en anaerobiosis y en oscuridad, aún no se conoce el mecanismo de la oxidación del formiato. Este compuesto también se metaboliza para proveer de piridín nucleótidos reducidos durante el crecimiento celular. En la Figura 17.1, se muestran los posibles caminos para la oxidación del formiato. Así, el formiato puede oxidarse directamente a H_2 y CO_2 mediante la formico hidrógeno-liasa. El H_2 formado puede actuar para reducir el $NAD(P)^+$ como sustrato en presencia de ferredoxina (Yoch et al, 1975).

Por otro lado, las células pueden oxidar mayor cantidad de formiato a productos gaseosos pero la formiato deshidrogenasa funcionaría también para reducir directamente las cantidades requeridas de piridín nucleótidos.

Finalmente el formiato podría oxidarse exclusivamente, por una formiato deshidrogenasa $NAD(P)$ -dependiente. El exceso de piridín nucleótidos reducidos se oxidarían con liberación de H_2 a través de una $NAD(P)H$ -ferredoxina reductasa (Jungermann et al, 1971; Thauer et al, 1971), en asociación con la piruvato-ferredoxina óxido-reductasa. Sin embargo estas especulaciones no encontraron apoyo experimental, por cuanto no se detectó la formación de $NAD(P)H$ asociada con la oxidación del formiato, como tampoco actividad de piruvato-ferredoxina óxido-reductasa. Gorrell y Uffen (1977) concluyeron que la piruvato formiato hidrogen-liasa y la piruvato-lipoato óxido-reductasa operaban en forma concertada originando ATP y NADH respectivamente y manteniendo el crecimiento celular fermentativo.

Recordemos que numerosos investigadores encontraron que *Rs. rubrum* crecida fotosintéticamente producía H_2 a partir de ciertos sustratos, solamente a la luz (Gest, 1951, 1972). Bajo estas condiciones, la formación de H_2 luz-dependiente era insensible al CO . Resultados similares se obtuvieron usando *Rs. rubrum* SI expuesta a piruvato, luego de un crecimiento en medio definido conteniendo malato y glutamato (Kohlmiller y Gest, 1951).

Sin embargo, la cepa S1 crecida en el mismo medio complejo usado para mantener el crecimiento anaeróbico y en oscuridad de las cepas G1 o C producía sólo trazas de H_2 y tenía baja actividad de fijación de nitrógeno. A pesar de que aún no se han podido explicar estas variaciones en el metabolismo de S1, los resultados indicarían que *Rs. rubrum* metabolizaría el H_2 mediante dos mecanismos diferentes, que dependerían de la disponibilidad de la luz durante el crecimiento celular. Mientras las células crecidas fotosintéticamente requieren energía luminosa (o ATP), las desarrolladas en anaerobiosis y oscuridad pueden formar H_2 mediante reacciones independientes de la luz (y posiblemente también independientes de ATP).

En contraste con la cepa salvaje S1, la mutante C crecida anaeróbicamente a la luz mostraba actividad de hidrogenasa tanto independiente como dependiente de la luz (Gorrell y Uffen, 1978). Además esta mutante poseía actividad de nitrogenasa, medida como reducción de acetileno, mientras que la crecida en la oscuridad carecía de la misma.

El descubrimiento de que ambas reacciones de hidrogenasa (fermentativa y ATP-dependiente) existían en la mutante C de *Rs. rubrum* crecida en anaerobiosis a la luz fue de suma importancia.

Desde un punto de vista ecológico, la existencia de ambas actividades en la mutante C provee a las células de una ventaja selectiva durante el crecimiento bajo condiciones de luz diurna, en un medio natural. Esta mutante sería representativa de lo que ocurre normalmente con células de *Rs. rubrum* en su habitat.

Como conclusión, si las células de *Rs. rubrum* crecidas fotosintéticamente se trasladan a un medio estrictamente anaeróbico. en oscuridad, las mismas pueden seguir creciendo y mantener los pigmentos y las propiedades de las membranas, características de las células fotosintéticas. Bajo estas condiciones, metaboliza el H_2 . Una vez que la reacción de formación de H_2 (independiente de la luz) se ha expresado durante el crecimiento en la oscuridad, ésta tiene lugar al mismo tiempo que su análoga (luz dependiente), normalmente presente en células fotosintéticas.

XVII.3. Chromatiaceae

XVII.3.1. Metabolismo anaeróbico en la oscuridad

Las Chromatiaceae son anaeróbicas estrictas, con excepción de *Thiocapsa roseopersicina* la cual puede respirar bajo condiciones microaerofílicas en la oscuridad (Pfennig y Trüper, 1974). Las Chromatiaceae pueden utilizar compuestos orgánicos o inorgánicos durante el desarrollo fotosintético.

Así como ocurre con las Rhodospirillaceae, cuando las Chromatiaceae crecidas a la luz se transfieren a la oscuridad, las células metabolizan y producen ácidos y productos gaseosos. Más aún, bajo ciertas condiciones las células reducen compuestos azufrados o nitrogenados.

XVII.3.1.1. Producción de ácidos

Experiencias realizadas por van Niel (1931) mostraron que las Chromatiaceae usaban compuestos reducidos del azufre o sustancias orgánicas como dadores de electrones durante el crecimiento fotosintético.

Dado que no hubo crecimiento durante incubaciones en oscuridad, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en medio suplementado con glucosa, fructosa, lactato, extracto de levadura y mezclas de estos compuestos, van Niel concluyó que las Chromatiaceae no podían fermentar compuestos orgánicos ni sintetizar material celular en ausencia de energía luminosa.

Sin embargo, Gaffron (1934, 1935) y Roelofsen (1934) observaron que suspensiones de células crecidas fotoautotróficamente formaban CO₂ y ácidos (especialmente acético) durante las incubaciones en oscuridad bajo atmósfera de N₂ o de una mezcla N₂-CO₂.

Experiencias posteriores para determinar qué sustratos se utilizaban en el proceso fermentativo, dieron resultados negativos. En consecuencia, Roelofsen (1934) postuló que algún material de reserva, depositado dentro de la célula durante el crecimiento a la luz, podría actuar como sustrato de un proceso de "autofermentación", independiente de la luz, que provee-

ría la energía necesaria para mantener las células en oscuridad.

Van Gemerden (1968 a, b) encontró que *Chromatium vinosum* cepa D depositaba poliglucosa durante el desarrollo fotosintético. que luego era metabolizada a poli- β -hidroxibutirato en la oscuridad.

En estudios realizados con *Chr. vinosum* cepa D se observó la existencia del camino piruvato-ferredoxina óxido-reductasa en células crecidas fotoheterotróficamente con L-malato. Este mecanismo es independiente de la luz y da origen a acetato y a cantidades equimolares de H_2 y CO_2 .

XVII.3.1.2. Metabolismo de compuestos inorgánicos

Además de la actividad fermentativa, las Chromaticaceae pueden respirar en la oscuridad utilizando compuestos azufrados oxidados o nitrogenados como aceptores de electrones.

a) Compuestos del azufre:

Gaffron (1934, 1935) informó que cuando se colocaban sus pensiones de células anaeróbicamente a la oscuridad, el ion sulfato se reducía a SH_2 . La adición de glucosa, hexosafosfato, butirato o malato a las mezclas de reacción estimulaba la formación de CO_2 y SH_2 . Gaffron interpretó estos datos proponiendo que en la oscuridad existían ciertas reacciones de degradación; pero a la luz las Chromatiaceae sintetizaban el material celular autotróficamente a partir de CO_2 utilizando el H_2S como reductor.

Van Niel (1936) trató de confirmar esta hipótesis experimentalmente utilizando cultivos puros de *Chr. vinosum* cepa D. Van Niel usó células libres de azufre, crecidas fotoheterotróficamente con L-malato. (de esta forma no sería posible la producción de SH_2 a partir del azufre acumulado en el interior celular) y midió entonces el SH_2 formado en las mezclas de reacción después de la incubación en oscuridad con sulfato, tiosulfato o azufre. Los resultados indicaron que el azufre era el mejor sustrato para la producción de SH_2 . De los datos y observaciones de van Niel (1936) resultó evidente que en oscuridad, las células debían formar otro material reducido distinto del SH_2 .

b) Nitrito y Nitrato:

Nakamura (1939) informó que el consumo de H_2 en *Chr. minutissimum* crecida fotoautotróficamente se hallaba estimulado no sólo por la adición de compuestos azufrados oxidados a suspensiones celulares durante la incubación en oscuridad, sino también por nitrito y nitrato de potasio.

Se propuso entonces que los compuestos nitrogenados se reducían a amonio, en presencia de H_2 . Sin embargo, esta hipótesis aún no se ha comprobado experimentalmente.

c) Hidrógeno:

El H_2 sirve como sustrato en ciertas reacciones independientes de la luz, que involucran compuestos azufrados. Cuando células crecidas fotoheterotróficamente se colocan a la oscuridad en presencia de compuestos orgánicos reducidos, se forma H_2 .

Chr. minutissimum (Nakamura, 1939, 1941) oxida rápidamente formiato, piruvato, glicerol, glicerolfosfato o glucosa.

Chr. vinosum cepa D origina H_2 y CO_2 durante la incubación en oscuridad en presencia de piruvato (Bennett y Fuller, 1964).

Estos datos y la demostración de la existencia de la piruvato-ferredoxina oxido-reductasa en *Chr. vinosum* cepa D y de la hidrogenasa sumados a la evidencia de que *Chr. minutissimum* degradaba el formiato y el piruvato mediante la piruvato formiato-liasa, sugirieron que ciertas Chromatiaceae crecerían en oscuridad en forma fermentativa.

XVII.3.2. Crecimiento anaeróbico en oscuridad

Numerosos trabajos acerca de la distribución de las Chromatiaceae en la naturaleza, sugieren que estas células se desarrollan en oscuridad.

Hendley (1955) reconoció la posibilidad de que las células respiraran anaeróbicamente, en oscuridad, con azufre.

Van Gemerden (1968 a, b) informó que *Chr. vinosum* cepa D mantenía su motilidad durante largos períodos en oscuridad y metabolizaba poliglucosa a poli- β -hidroxibutirato. Bajo estas

condiciones de oscuridad, la reducción del azufre a SH_2 procedería demasiado lentamente como para proveer la energía adecuada para el crecimiento celular.

Roelofsen (1934) observó que células crecidas fotoheterotróficamente e incubadas en oscuridad, formaban H_2 en ausencia de azufre. *Chr. vinosum* cepa D muestra actividad de piruvato-ferredoxina oxido-reductasa y de hidrogenasa, en presencia de azufre se forma SH_2 , en lugar de H_2 durante la degradación del piruvato (Hendley, 1955). Así, el azufre tendría un rol complejo en el metabolismo celular en oscuridad, aún no determinado.

REFERENCIAS

- Bennett, R. & Fuller, R.C. (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 300.
- Dalton, H. & Mortenson, L.E. (1972), *Bacteriol. Rev.* 36, 237.
- Gaffron, H. (1933), *Biochem. Z.* 260, 1.
- Gaffron, H. (1934), *Biochem. Z.* 269, 447.
- Gaffron, H. (1935), *Biochem. Z.* 279, 1.
- van Gemerden, H. (1968 a) *Arch. Mikrobiol.* 64, 111.
- van Gemerden, H. (1968 b), *Arch. Mikrobiol.* 64, 118.
- Gest, H. (1951), *Bacteriol. Rev.* 15, 183.
- Gest, H. (1972), *Advances in Microbial Physiology* (A.H. Rose y D.W. Tempest, eds.), Vol 7, pp. 243-282, Academic Press, New York.
- Gorrell, T.E. & Uffen, R.L. (1977), *J. Bacteriol.* 131, 533.
- Gorrell, T.E. & Uffen, R.L. (1978), *Photochem. Photobiol.* 27, 351.
- Hendley, D.D. (1955), *J. Bacteriol.* 70, 625.
- Jungermann, K. & Schön, G. (1974), *Arch. Mikrobiol.* 99, 109.
- Jungermann, K.; Rupprecht, E.; Ohrloff, C.; Thauer, R. & Decker, K. (1971), *J. Biol. Chem.* 246, 960.
- Knappe, J. ; Blaschkowski, H.P.; Gröbner, P. & Schmitt, T. (1974), *Eur. J. Biochem.* 50, 253.
- Kohlmeier, E.F., Jr. & Gest, H. (1951), *J. Bacteriol.* 61, 269.
- Muller, F.M. (1933), *Arch. Mikrobiol.* 4, 131.
- Nakamura, H. (1937), *Acta Photochim. (Jpn)* 10, 211.
- Nakamura, H. (1939), *Acta Phytochim. (Jpn.)* 11, 109.
- Nakamura, H. (1941), *Acta Phytochim. (Jpn.)* 12, 43.
- van Niel, C.B. (1931), *Arch. Mikrobiol.* 3, 1.
- van Niel, C.B. (1936), *Arch. Mikrobiol.* 7, 323.
- van Niel, C.B. (1944), *Bacteriol. Rev.* 8, 1.

- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1974), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, eds.), 8th Ed., pp. 24-75, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Qadri, S.M. H. & Hoare, D.S. (1968), *J. Bacteriol.* 95, 2344.
- Qadri, S.M.H. & Hoare, D.S. (1973), *Can J. Microbiol.* 19, 1137.
- Roelofsen, P.A. (1934), *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 37, 660.
- Schön, G. (1968), *Arch. Mikrobiol.* 63, 362.
- Schön, G. & Biedermann, M. (1972), *Arch. Mikrobiol.* 85, 77.
- Schön, G. & Biedermann, M. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 304, 65.
- Thauer, R.K.; Ruprecht, E.; Ohrloff, C.; Jungermann, K. & Decker, K. (1971), *J. Biol. Chem.* 246, 954.
- Thauer, R.K.; Kirchinawy, F.H. & Jungermann, K.A. (1972), *Eur. J. Biochem.* 27, 282.
- Thauer, R.K. & Käufer, B.; Zähringer, M. & Jungermann, K. (1974), *Eur. J. Biochem.* 42, 447.
- Uffen, R.L. (1973 a), *J. Bacteriol.* 116, 874.
- Uffen, R.L. (1973 b), *J. Bacteriol.* 116, 1086.
- Uffen, R.L. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3298.
- Uffen, R.L. & Wolfe, R.S. (1970), *Bacteriol.* 104, 462.
- Uffen, R.L.; Sybesma, C. & Wolfe, R.S. (1971), *J. Bacteriol.* 108, 1348.
- Watt, G.D.; Bulen, W.A.; Burns, A. & La Mont Hadfield, K. (1975), *Biochemistry* 14, 4266.
- Wood, W.A. (1961), *The Bacteria* (I.C. Gunsalus y R.Y. Stanier, eds.), Vol 2, pp. 59-149, Academic Press, New York.
- Yoch, D.C. & Lindstrom, E.S. (1969), *Arch. Mikrobiol.* 67, 182.
- Yoch, D.C.; Arnon, D.I. & Sweeney, W.V. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 8330.

B



PARTE 1

INTRODUCCION

CAPITULO I

ECOLOGIA

I.1. Generalidades

I.2. Habitats

I.2.1. Especies de *Euglena* de aguas saladas

I.2.2. Especies de *Euglena* de aguas frescas

I.2.3. Colonización de nuevos habitats

I.3. Naturaleza de los habitats acuáticos

I.3.1. Existencia de especies planctónicas de *Euglena*

I.4. Factores inherentes a los habitats acuáticos

I.4.1. Corrientes

I.4.2. Luz

I.4.3. Aguas duras

I.4.4. Oxígeno

I.5. *Euglena* y contaminación

I.5.1. Excreciones de animales

I.5.2. Tipos específicos de contaminación

I.5.2.1. Medios ácidos

I.5.2.2. Ciénagas y escombros

I.5.2.3. Radioactividad

I.6. Otros tipos de habitats

I.6.1. Nieve

I.6.2. Cavidades en árboles

I.6.3. Desiertos y montañas

I.7. Simbiosis y parasitismo

I.8. *Euglena* como alimento

PARTE 1: INTRODUCCION

I. ECOLOGIA

I.1. Generalidades

Euglena constituye todavía en la actualidad un enigma sumamente atrayente.

Sus características correspondientes tanto al reino animal como al vegetal, la convierten en un verdadero problema taxonómico. Los zoólogos consideran a *Euglena* como un protozoo mientras que los botánicos la tratan como un alga.

Sin embargo, debido a sus propiedades, lo correcto es incluir la en el reino protista, creado por Haeckel en 1866.

El género *Euglena* posee una gran cantidad de formas taxonómicas estables y habita en una amplia variedad de nichos ecológicos, los cuales incluyen: aguas frescas y salobres, ácidas y alcalinas, aeróbicas y anaeróbicas y también tropicales. Algunas especies pueden además, producir floraciones en la nieve. Estas propiedades, junto con la formación de cepas incoloras y con la ausencia de sexualidad, transforman a *Euglena* en un organismo sumamente interesante para la investigación.

Gojdics (1953) describió e ilustró 155 especies de *Euglena*. Huber-Pestalozzi (1955) estudió 101 especies y Pringsheim (1956) informó acerca de la presencia de 200. Actualmente, el número total asciende a 250.

Existen tres razones fundamentales por las cuales no se posee un conocimiento profundo de la ecología de numerosas especies de *Euglena*. Ellas son:

- a) confusión acerca de la validez de ciertas especies;
- b) registro infrecuente de la existencia de algunas especies,
- c) carencia de observaciones ecológicas detalladas.

1.2. Habitats

Según lo esperado, los habitats de *Euglena* son muy variados, debido a la gran cantidad de especies existentes.

Pueden clasificarse de acuerdo con la salinidad de los mismos.

1.2.1. Especies de aguas saladas

Gojdics (1953) informó acerca de la presencia de nueve especies, capaces de habitar aguas saladas de las cuales Pringsheim (1956) aceptó solamente dos.

De acuerdo con la descripción taxonómica de monografías recientes *E. mutabilis* (*E. vermiformis*) existe en abundancia en aguas saladas. Sin embargo, parece contradictorio esperar que la misma *Euglena* exista en número considerable, en efluentes de minas de carbón, de pH aproximadamente 2,5 y en las aguas alcalinas de los océanos. Es más razonable pensar que están involucradas dos especies íntimamente relacionadas en el aspecto morfológico. Así, la especie de agua salada (*E. vermiformis*) es generalmente, un poco más larga y presenta ocho cromatóforos. En cambio, *E. mutabilis* posee de 2 a 4 cromatóforos y existe en un amplio rango de tamaños (Lackey, 1968).

Otras de las especies que aparecen en este habitat con cierta regularidad y en número considerable son *E. fenestrata* (Gojdics, 1953) y menos frecuentemente *E. sanguinea* (Lackey, 1968).

Existen otras especies que toleran aguas saladas pero sólo durante ciertos períodos de tiempo: *E. viridis*, *E. pisciformis* y *E. deses*. Aunque mantienen su actividad de movimiento, ninguna de ellas se multiplica aún en bajas concentraciones salinas.

1.2.2. Especies de aguas frescas

La mayoría de las especies conocidas de este habitat (*E. oxyuris*, *E. pisciformis*, *E. viridis*, *E. gracilis*) se hallan ampliamente distribuidas.

E. oxyuris fue encontrada en toda Europa occidental, Asia y Australia, y junto con *E. clara*, *E. gracilis*, *E. mutabilis* y *E. pisciformis* se hallaron en mayor proporción en Honolulu, Isla Oahu de Hawaii.

1.2.3. Colonización de nuevos habitats

Existen numerosas especulaciones acerca de cómo llegó *E. oxyuris* a la Isla de Oahu. De los abundantes especímenes observados todos presentaban el máximo tamaño informado (400 μ) Schlichting (1960) encontró dos o más especies de *Euglena* en patos, no conociéndose si las mismas se hallaban ya presentes en el lugar de origen de estos animales. Existen también algunos pájaros migratorios que podrían haber transportado dichas especies en sus patas, por ejemplo los "golden plovers" que efectúan una parada en Oahu durante sus viajes entre el Artico y Sudamérica. Lamentablemente, no se ha encontrado *E. oxyuris* en ninguno de estos dos últimos puntos geográficos nombrados.

En cuanto a las especies marinas, se efectuó un solo registro, pudiendo haber influido en este caso la presencia de algas marinas, de desechos arrastrados por las corrientes y también de los pájaros migratorios.

1.3. Naturaleza de los habitats acuáticos

Las especies de aguas frescas son típicamente formas que habitan aguas tranquilas (charcos, estanques, lagunas y lagos); sin embargo, existen algunas presentes en los ríos.

E. sanguinea colorea la superficie de las lagunas de rojo ladrillo a rojo brillante. Estas floraciones se encuentran temporariamente a nivel de la superficie, migrando al anochecer a zonas más profundas, generalmente hasta el fondo.

Lund (1942) halló 18 especies de *Euglena* en los restos marginales de cinco lagunas.

1.3.1. Existencia de especies planctónicas de Euglena

Hay numerosas dudas acerca de la existencia de especies planctónicas de *Euglena*.

Pringsheim (1956) definió a *E. tiscac*, *E. variabilis*, *E. spirogyra* y *E. tripteris* como "especies nadadoras".

Lackey (1968) encontró *E. acus*, *E. spirogyra* y *E. tripteris* tanto en el agua como en el material de la interfase; las dos últimas mencionadas se hallaron frecuentemente deslizando debido a una leve torsión de sus células, las cuales muchas veces no presentaban ni un signo de sus flagelos. Este autor observó a *E. pisciformis*, *E. gracilis*, *E. clara* y *E. velata* "nadando" vigorosamente y tendiendo a formar floraciones en la superficie.

La mayoría de las especies, tanto de aguas frescas como saladas, estudiadas por Lackey (1968) tendían a habitar en la interfase. Esto se debería a la relación existente entre una acción flagelar débil o un flagelo sumamente corto y el tamaño celular.

1.4. Factores innerentes a los habitats acuáticos

1.4.1. Corrientes

Muy poco se conoce actualmente acerca de la influencia de las corrientes. En general, la vida de estos organismos parece ser independiente de la presencia de corrientes o aguas tranquilas, siempre y cuando éstas permitan a la especie mantener su posición.

1.4.2. Luz

Según numerosos estudios realizados parece ser de suma importancia la cantidad de luz disponible.

E. spirogyra y algunas variedades de *E. chrenbergii* existen muy frecuentemente en zonas sombreadas de charcos y lagunas mientras que *E. sanguínea* habita en la superficie de lagos y estanques iluminados por el sol, donde es susceptible a daños pro-

ducidos por la luz ultravioleta.

A pesar de las experiencias realizadas, muy poco se conoce acerca de la relación temperatura-crecimiento y desarrollo de los euglenoides, en condiciones naturales.

Jahn (1946) informó acerca de la periodicidad de *Euglena* relacionada con la intensidad luminosa; sin embargo, las investigaciones de laboratorio han permanecido hasta el momento inconclusas.

1.4.3. Aguas duras

Aparentemente parece ser que las mismas especies que pueden habitar en aguas normales pueden hacerlo también en aguas duras. Esto sugeriría que el crecimiento y desarrollo de *Euglena* es independiente del pH pero además indicaría una cierta tolerancia a elevados niveles de CO_2 y $\text{CO}_3^{=}$.

Fritsch (1931) citó textos de Tannrenther según el cual *E. gracilis* crecía en medios alcalinos y de Skadowsky, quien expresó que estas especies poseían un pH óptimo de aproximadamente 4.

1.4.4. Oxígeno

Hasta el momento se ha investigado relativamente poco acerca de la relación existente entre el crecimiento y desarrollo de *Euglena* y el oxígeno disuelto en el medio acuoso.

Se ha observado que cultivos densos de *E. gracilis* que han perdido su clorofila, persisten durante muchos días ya sea en una cuba abierta o en una cubierta de una gruesa capa de parafina, a pesar de que la única vía de obtención del oxígeno sea por difusión.

El mayor número de especies de *Euglena* se desarrollan en habitats que contienen oxígeno. A pesar de que pueden tolerar bajas tensiones de oxígeno, los ambientes oxigenados se aproximan a los óptimos.

Las especies de aguas saladas suelen encontrarse en la superficie del material marino de interfase. Si se hallan en

época de marea baja, penetran en dicha interfase probablemente anaeróbica, pero sólo unos milímetros por debajo de la superficie. Allí cohabitan con euglenoides incoloros, con ciertos zooflagelados, con algunas algas azul-verdosas y con bacterias sulfúreas.

Evidentemente, es una característica de *Euglena* el adaptarse a un amplio rango de tensiones de oxígeno.

1.5. Euglena y Contaminación

1.5.1. Excreciones de Animales

Es un hecho ya demostrado que uno de los requerimientos para el crecimiento de *Euglena* es la materia orgánica, incluyendo la cobalamina.

Las especies de *Euglena* han sido mencionadas en numerosas ocasiones, como organismos indicadores de la contaminación orgánica. Este fenómeno es simplemente una respuesta del tipo "nutritiva".

La presencia de excrementos y orina de ganado tiende a desarrollar rápidamente poblaciones densas de euglenoides, además de otros organismos. Lo mismo ocurre con las aguas servidas domésticas, pero no en forma inmediata sino luego de una considerable acción bacteriana.

Las diferentes especies de *Euglena* presentan un comportamiento distinto frente a la contaminación animal en comparación con los desechos domésticos. Una de las explicaciones sería la naturaleza diferente de la materia fecal animal, la cual contiene una gran cantidad de celulosa y derivados y materia nitrogenada más reducida. Leedale et al (1965) informó acerca del incremento en el desarrollo de *E. spirogyra* en aguas servidas que contenían fosfato de magnesio y amonio. Posiblemente, los desechos humanos se degraden a ortofosfato y a nitrato.

1.5.2. Tipos específicos de contaminación

1.5.2.1. Medios ácidos

Algunas especies de *Euglena* muestran diversas reacciones con ciertos tipos particulares de contaminación. Ya se ha mencionado la presencia de *E. mutabilis* en residuos ácidos de las minas de carbón (Lackey, 1941). Se encontraron *Euglenas* en este medio, aún a pH's tan bajos como 0,9.

Estas mismas especies se hallan también en manantiales que poseen hierro o en las orillas de pequeñas corrientes que contienen hidróxido férrico.

1.5.2.2. Ciénagas y escombros

Euglena puede hallarse oculta bajo ciénagas y materiales fibrosos tales como restos de asbestos y amianto. Algunas especies forman una capa externa mucilaginososa a la cual se adhiere el cieno y son viables dentro de este medio por numerosos días.

Radioactividad

Observaciones efectuadas en un área con hoyos de desechos radioactivos en los cuales existía un escape, mostraron que numerosas especies de este género, como así también otras algas y protozoos, que habrían estado expuestas a dosis masivas de radiación durante algunos años, no presentaban formas anormales. Una pequeña laguna ubicada en dicha área, se encontraba tan irradiada que la dosis humana de tolerancia se alcanzaba en una hora aproximadamente. Esta laguna albergó durante todo el verano a una densa población de *E. limnophila*. Sin embargo, los microorganismos de esta especie eran en general de mayor longitud (200 μ).

Entosiphon sulcatum, euglenoide incoloro, fue irradiado con ^{60}Co (Lackey y Bennett, 1962) durante 60 generaciones. Durante dicho tiempo su viabilidad fue normal y su velocidad de reproducción no se vio afectada.

I.6. Otros tipos de habitats

Existen ciertos ambientes específicos que favorecen el desarrollo de *Euglena*. Uno de estos es la comúnmente llamada infusión de heno. Cuando esta infusión entra en contacto con una pequeña cantidad de detritus obtenidos de lagunas o charcos, se desarrollan cultivos densos que incluyen a *E. acus*, *E. gracilis* y *E. pisciformis*. Bajo tales condiciones, *E. gracilis* crece en forma incolora, así como también *E. acus* pero en menor grado. Esta pérdida de clorofila les permite vivir como organismos autótrofos o heterótrofos. En realidad, la existencia normal de numerosas especies de *Euglena* constituye una combinación de ambos tipos de obtención de carbono celular.

I.6.1. Nieve

Kiener (1944) encontró fibriciones de color verde correspondientes a especies no determinadas de *Euglena*, en planicies nevadas.

Estas observaciones son sumamente importantes ya que indican que algunas especies son viables en ciertas condiciones y pueden colonizar ambientes en los cuales su origen es un misterio.

I.6.2. Cavidades de árboles

Los euglenoides constituyen una parte importante de la alimentación de las larvas de ciertos mosquitos.

Se encontró que existían poblaciones densas de *E. velata* en las aguas contenidas en huecos de árboles cercanos a pantanos. En dicho ambiente se halló también larvas de *Anopheles barberti* (Shields y Lackey, 1938), que se alimentan de euglenoides (Senior-White, 1928).

Queda el interrogante acerca del grado en que son digeridos ya que estos microorganismos pasan a través del tracto digestivo en estado viable.

1.6.3. Desiertos y montañas

En las 30 localidades desérticas examinadas no se encontró ninguna especie de *Euglena*, a pesar de que se halló un número significativo de algas y protozoos.

Tampoco se observó la presencia de especies de *Euglena* a grandes altitudes (Durrell y Norton, 1960), es decir más de 2.700 m.

Esta ausencia de *Euglena* podría deberse a las grandes variaciones de temperatura y a cambios en la presión atmosférica.

1.7. Simbiosis y parasitismo

Aparentemente no existirían casos de simbiosis en este género. Sin embargo, Gojdics (1953) reportó la presencia de *E. cyclopicola* en pequeños copépodos y otros invertebrados. Esta especie poseía un estado libre que "nadaba".

Pringsheim (1956) discrepó con Gojdics, asegurando que *E. cyclopicola* había sido confundida con *Colacium*.

Existen ciertas formas del tipo de *Euglena* que frecuentemente se encuentran en el tracto digestivo de renacuajos.

Weinrich (1924) describió a *Euglenamorpha hegneri* presente en el intestino de *Rana pipiens*. Es necesario poseer mayor información sobre sus condiciones de vida como ente libre para poder definir su existencia como simbiótica o parásita.

E. leucops es el único caso de verdadero parasitismo (Hall, 1931) ya que puede habitar en ciertos gusanos planos (*Stenostomum predatorum*).

1.8. *Euglena* como alimento

Numerosos miembros de este género sirven como alimento para muchos invertebrados ya que existen en abundancia, poseen un tamaño adecuado, contienen vitaminas, habitan en planctons y en los desechos ubicados en las orillas de lagunas, estanques

y lagos.

Como ya se mencionó (ítem I.6.2.), existen ciertas larvas de mosquitos que se alimentan de euglenoides. Lackey (1968) observó que estos microorganismos eran ingeridos también por larvas de otros insectos, por gusanos planos, por ciliados, etc. Sin embargo, los euglenoides son sumamente resistentes. Se ha recuperado *Euglena* viable de materia fecal de copépodos, de renacuajos y de larvas de mosquitos. También se han hallado en disecciones del tracto digestivo de estos dos últimos organismos. No se conoce exactamente el mecanismo que produce esta resistencia; sólo es importante mencionar que mientras otros protozoos y algas son digeridos, un alto porcentaje de células de *Euglena* atraviesan el tracto digestivo en forma viable.

Una de las explicaciones de esta resistencia sería la presencia de la envoltura mucilaginosa que protegería a la célula. Otra posibilidad sería que la película externa fuera de estructura muy resistente e impenetrable a la acción de las enzimas digestivas.

REFERENCIAS

- Durrell, L.W. & Norton, C. (1960), Trans. Am. Microscop. Soc. 79, 160
- Fritsch, F.E. (1931), J. Ecol. 21, 16.
- Gojdics, M. (1953), "The Genus *Euglena*", Univ. of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.
- Hall, S.R. (1931), Biol. Bull. 60, 327.
- Huber-Pestalozzi, G. (1955), "Die Binnengewässer", (A. Theinemann, ed.), Vol 16, Part 4, Schweizerbart'sche Verlagbuchhandlung, Stuttgart.
- Jahn, T.L. (1946), Quart. Rev. Biol. 21, 246.
- Kiener, W. (1944), Proc. Nebraska Acad. Sci. 54th. Ann. Meeting 12, 1.
- Lackey, J.B. (1940), Ohio J. Sci. 40, 126.
- Lackey, J.B. (1941), Public Health Rept. (U.S.) 54, 740.
- Lackey, J.B. (1968), "The Biology of *Euglena*" Vol 1, Chapter 2, pp 27-44, Academic Press, London.
- Lackey, J.B. & Bennett, C. (1962), Proc. Natl. Symp. Radioecology, 1st., Denver, Colorado, 1958.
- Leedale, G.F.; Meeuse, B.J.D. & Pringsheim, E.G. (1965), Arch. Mikrobiol. 50, 133.
- Lund, W.J.G. (1942), J. Ecol. 30, 245.
- Pringsheim, E.G. (1956), Nova Acta Leopoldina 18 no. 125, 1.
- Schlichting, H.E., Jr. (1960), Trans. Am. Microscop. Soc. 7, 160.
- Shields, S.E. & Lackey, J.B. (1938), J. Econ. Entomol. 31, 95.
- Senior-White, R. (1928), Indian J. Med. Res. 15, 969.
- Weinrich, D.H. (1924), Biol. Bull. 47, 149.

CAPITULO II

TAXONOMIA

II.1. Generalidades

II.2. Orden: Euglenales

II.2.1. Familia: Euglenidae o Euglenaceae

II.2.1.1. Género: *Euglena*

II.2.1.1.1. Rigidae

II.2.1.1.2. Lentiferae

II.2.1.1.3. Catilliferae

II.2.1.1.4. Radiatae

II.2.1.1.5. Serpentes

II.2.1.1.6. Limpidae

II. TAXONOMIA

II.1. Generalidades

En 1883, Klebs consideró a los euglenoides como algas en base a su color verde.

Chadefaud (1937, 1938) señaló las similitudes existentes entre los euglenoides y los dinoflagelados, considerando las estructuras de los respectivos citoplasmas. Posteriormente, este autor relacionó a los euglenoides con las algas marrones en lugar de las verdes (Chadefaud, 1962).

La presencia de clorofilas *a* y *b* y la ausencia de clorofila *c* en *Euglena* anula toda suposición acerca de una cierta afinidad con las algas marrones; sin embargo, Krinsky (1964) informó de la existencia de por lo menos una xantina en *E. gracilis*.

Los grupos de Goodwin y Jamikorn (1954), Krinsky y Goldsmith (1960) y Green (1963) estudiaron la síntesis de pigmentos y analizaron sus espectros, en euglenoides.

Scagel et al (1965) ubicaron a estos protistas en un grupo separado de las algas, reconociendo sólo una clase: *Euglenophyceae*.

II.2. Orden Euglenales

Hollande (1952) dividió a este orden en varias familias: *Euglenidae*, el cual incluye el género incoloro *Astasia*, *Peranemidae*, *Anisonemidae* y *Petalomonidae*. A su vez, la familia *Euglenidae* se dividió en tres subfamilias: *Eutreptiinae*, *Eugleninae* y *Euglenamorphinae*, las cuales poseen dos, uno y tres o más flagelos funcionales respectivamente.

En 1966, Kudo enumeró las siguientes familias: *Euglenidae*, *Astasiidae* y *Anisonemidae*; las dos últimas incluyen las formas incoloras.

Chadefaud (1962) se aproximó a la clasificación efectuada por Kudo, sustituyendo la familia *Anisonemidae* por *Peranemenes*.

El sistema propuesto por Hollande (1952) es el que más

se acerca a una relación natural, especialmente considerando las formas incoloras. Sin embargo, es cuestionable que el número de flagelos externos sea una característica suficiente para diferenciar familias ya que el género *Euglena* posee dos flagelos, uno externo y otro interno.

II.2.1. Familia: Euglenidae o Euglenaceae

En 1883 Klebs dividió a las Euglenaceae en Euglenae y Astasiae. Dentro del primer grupo se encontraban los géneros *Euglena*, *Phacus*, *Eutreptia*, *Ascoelena*, *Trachelomonas* y *Colacium*, mientras que los géneros incoloros *Astasia*, *Rhabdomonas*, *Mencidium*, *Potamoema* y *Anisozema* se hallaban dentro del segundo grupo.

Hollande (1952) incluyó dentro de las Eugleninae los siguientes géneros: *Euglena*, *Mencidium*, *Ascoelena*, *Trachelomonas*, *Strombomonas*, *Phacus*, *Lepocinclis* y *Colacium*.

En 1956, Pringsheim enumeró 11 géneros pertenecientes a esta familia: *Euglena*, *Colacium*, *Eutreptia*, *Eutreptiella*, *Phacus*, *Lepocinclis*, *Cryptoglena*, *Trachelomonas*, *Strombomonas*, *Ascoelena* y *Klebsiella*.

Los típicos géneros pertenecientes a la familia Euglenaceae se ilustran en la Figura 2.1.

Lepocinclis (A) y *Phacus* (B) poseen numerosas características en común: cromatóforos pequeños con forma de disco, sin pirenoides, cuerpo rígido, distribución flagelar típica de *Euglena* y estrías espiraladas.

Los géneros *Colacium* (D), *Strombomonas* (H) y *Trachelomonas* (G) tienen cromatóforos de igual forma que los nombrados anteriormente. Estos contienen pirenoides, en la mayoría de las especies estudiadas. En *Colacium*, dichos pirenoides se encuentran cubiertos con paramilon.

En cambio, en *Ascoelena* (E) y en *Klebsiella* (F), los pirenoides pueden o no estar presentes en cromatóforos de forma de disco. Estos dos géneros poseen cubiertas protectoras con aspecto de jarrón. La similitud entre la estructura del protoplasto de estos géneros y la de *Trachelomonas* es una evidencia más para corroborar la hipótesis del ancestro común.

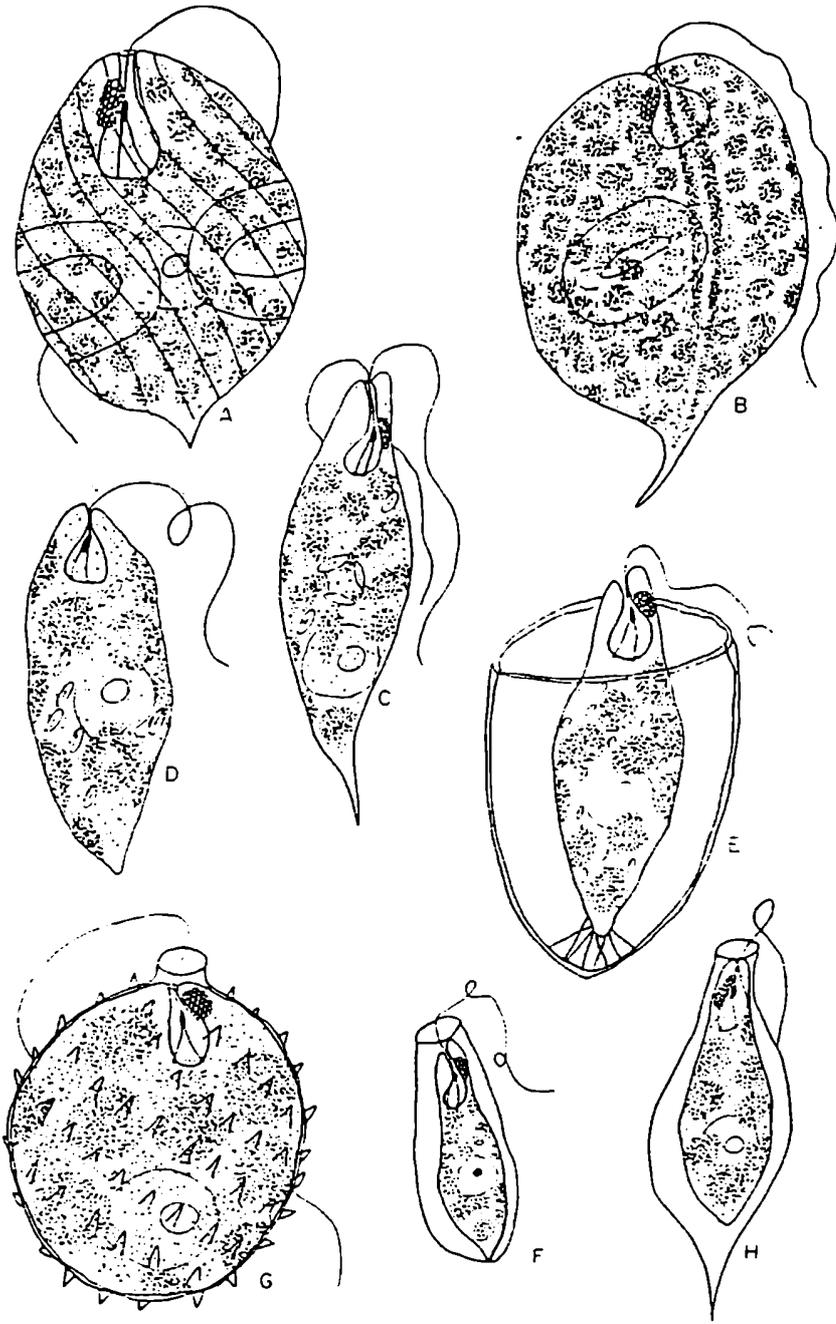


FIGURA 2.1.: Géneros de la familia Euglenidae:
 A: *Lepocinclis*; B: *Phacus*; C: *Eutreptia*; D: *Colacium*; E: *Ascoglena*;
 F: *Klebsiella*; G: *Trachelomonas*;
 H: *Strombomonas*

II.2.1.1. Género: Euglena

Lemmerman (1913) dividió al género *Euglena* en tres grandes grupos en base a la morfología de los cromatóforos (Tabla 2.1.).

Chu (1947) y Gojdics (1953) también utilizaron la estructura del cromatóforo para clasificar a este género.

En 1956, Pringsheim presentó un análisis de las afinidades de las distintas especies de *Euglena*. Continuando el trabajo de Chu (1947), se basó en el aspecto de los cromatóforos y la relación con la forma del cuerpo y con su movilidad. Así formó seis grupos siendo cada uno de ellos un subgénero (Tabla 2.2.).

Jahn (1946) describió dos grupos importantes en base a aspectos nutricionales: fototróficos y heterotróficos. Todas las *Euglenas* verdes son fotótrofas. Las formas fotoautotróficas son capaces de utilizar compuestos de nitrato y amonio como fuentes de nitrógeno, las fotomesotróficas requieren aminoácidos y las fotometatróficas usan peptonas o proteínas.

Las formas heterotróficas pueden subdividirse de manera similar.

Birdsey y Lynch (1962) informaron acerca de la incapacidad de *Euglena gracilis* de crecer en presencia de nitratos como fuente de nitrógeno, a pesar de que esta especie podía reducir el nitrato a nitrito.

Describiremos brevemente los grupos considerados por Pringsheim (1956) (Tabla 2.2.).

II.2.1.1.1. Rigidae

Este primer grupo se caracteriza por sus cuerpos no flexibles. Los cromatóforos son pequeños y tienen forma de discos. No se han encontrado pirenoides y los cuerpos de paramylon presentan estructuras alargadas.

Los organismos representativos de este grupo se ilustran en la Figura 2.2.

TABLA 2.1.1.: Clasificación en grupos de acuerdo a la estructura de los cromatóforos

GRUPO	ESTRUCTURA DEL CROMATOFORO	EJEMPLO
I	en forma de cinta	<i>E. elongata</i> ; <i>E. terricola</i>
II	en forma de estrella	<i>E. vitidis</i> ; <i>E. sanguinae</i>
III	en forma de plato	<i>E. acus</i> ; <i>E. deses</i>

Grupos descritos por Pringsheim

ESPECIES TIPO	NOMBRE TENTATIVO DEL GRUPO (Taxón o Subgénero)
<i>E. acus</i>	Rigidae
<i>E. proxima</i>	Lentiferae
<i>E. gracilis</i>	Catilliferae
<i>E. viridis</i>	Raciatae
<i>E. deses</i>	Serpentes
<i>Astasia</i>	Limpidae

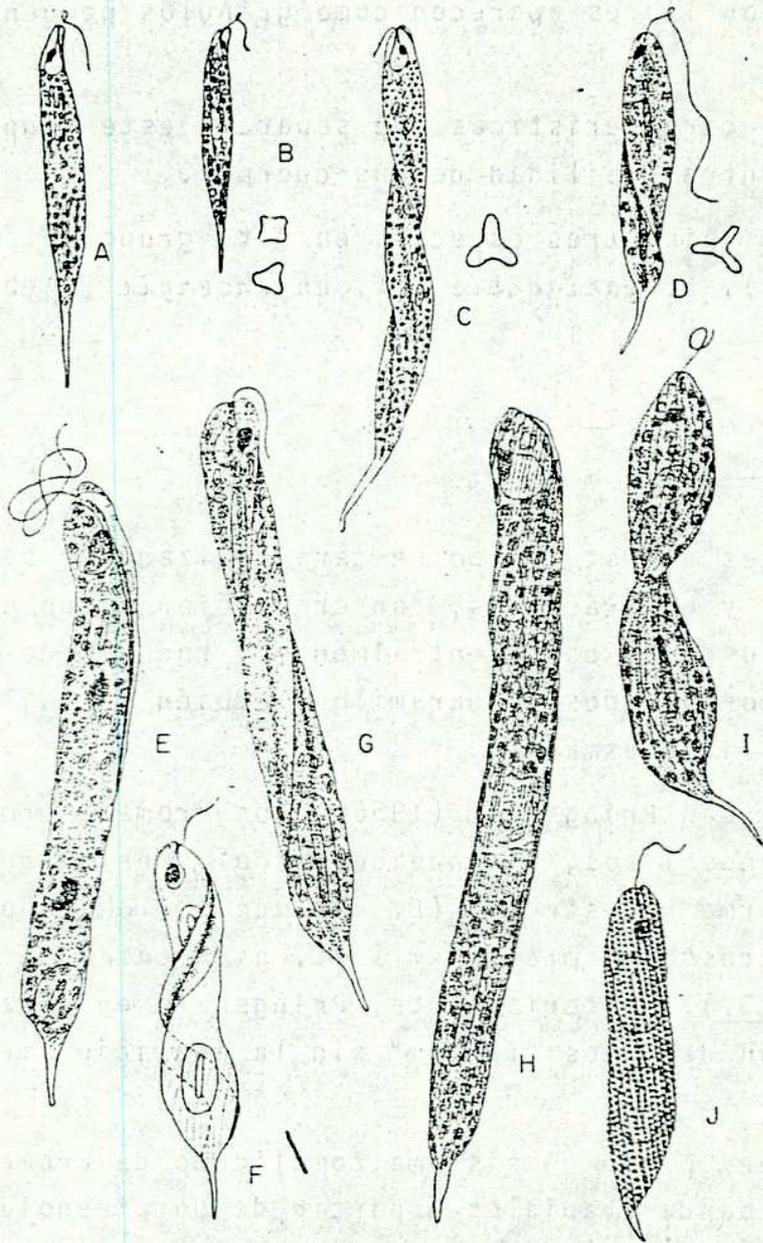


FIGURA 2.2.: Grupo Rigididae.

A: *E. acus*; B: *E. acus* var. *angularis*; C: *E. trisulcata*; D: *E. tripteris*; E, F, G: *E. oxyuris*; H: *E. antefossa*; I: *E. spirogyra* var. *suprema*; J: *E. spirogyra* var. *marchica*.

II.2.1.1.2. Lentiferae

El grupo II descrito por Pringsheim (1956) posee cromatóforos similares a los de Rigididae, siendo los ubicados marginalmente, más largos y angostos. No se observan pirenoides y los cuerpos de paramilon libres aparecen como gránulos pequeños o varillas alargadas.

Una de las características que separa a este grupo del anterior, es la contractibilidad de sus cuerpos.

Pringsheim ubicó tres especies en este grupo: *E. proxima* (Dangeard, 1901), *E. variabilis* y *E. ehrenbergii* (Klebs, 1883) (Figura 2.3.).

II.2.1.1.3. Catilliferae

Las especies de este grupo se caracterizan por poseer cuerpos fusiformes y contráctiles, con cromatóforos que contienen un doble pirenoide ubicado centralmente y rodeado de una capa de paramilon. Los cuerpos de paramilon también se hallan en forma libre en el citoplasma.

De acuerdo con Pringsheim (1956), los cromatóforos pueden ser: de contornos lisos, redondeados o poligonales como en *E. gracilis*, de forma de estrella (*E. olivacea*), lobulado (*E. velata*) y con "flecós" (*E. pisciformis*, *E. granulata* y *E. sanguinea*) (Figura 2.3.). Posteriormente, Pringsheim enfatizó acerca de la retracción de estos "flecós" sin la aparición de daño alguno.

E. sanguinea posee un sistema complicado de cromatóforos; éstos constituyen bandas radiales a partir de un pirenoide central.

Euglena granulata (Schmitz, 1884) puede ser fácilmente distinguible de los otros miembros de esta serie por la presencia de hileras de gránulos en el periplasto y de cuerpos globulares mucíferos dispuestos en filas paralelas a las anteriores.

Pringsheim (1956) sugirió que *E. rubra* (Hardy, 1911) sería un sinónimo de *E. sanguinea*. Sin embargo, a pesar de poseer ambas las mismas características estructurales generales, los cromatóforos de *E. rubra* no muestran la existencia de pirenoides

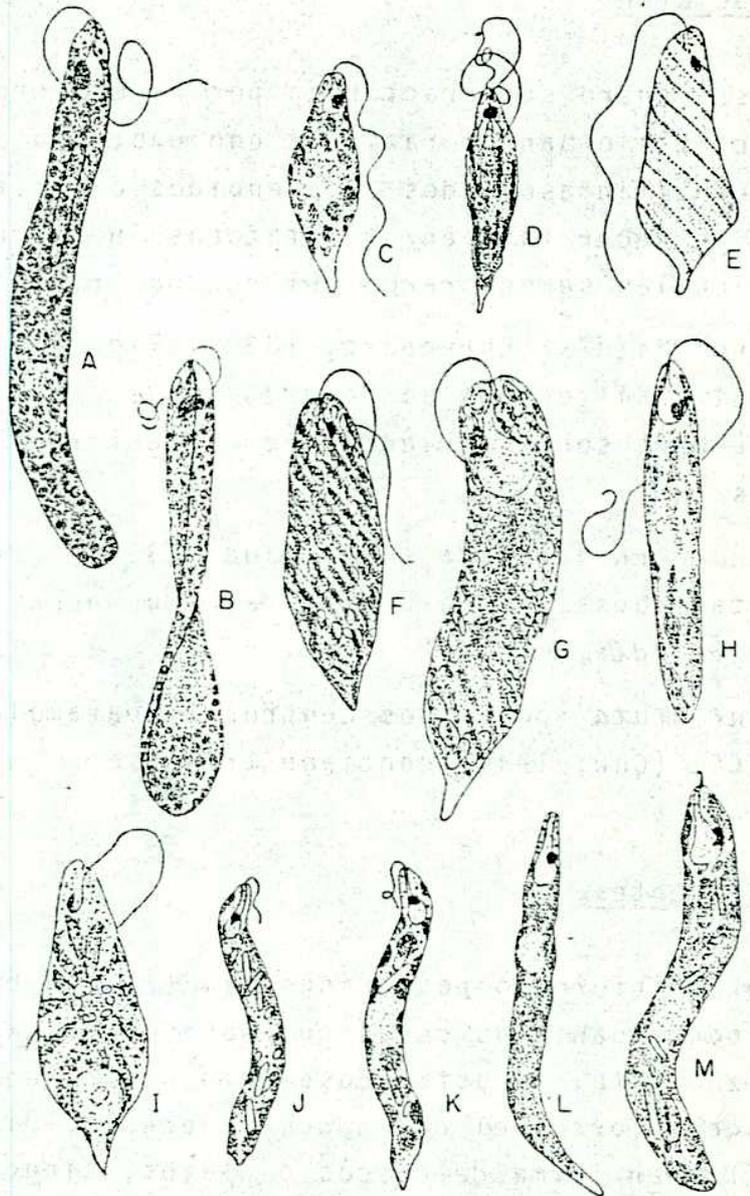


FIGURA 2.3.: *Euglena* perteneciente a los grupos Lentiferae, Catilliferae, Radiatae y Serpentes. A, B: *E. ehrenbergii*; C: *E. proxima*; D, E: *E. granulata*; F: *E. velata*; G: *E. rubra*; H: *E. gracilis*; I: *E. viridis*; J, K: *E. in termedia*; L, M: *E. deses*

mientras que sí se observan en *E. sanguinea*. Se concluyó entonces que *E. rubra* era una especie real, que podría haber derivado de *E. sanguinea* por pérdida de los pirenoides y separación de las bandas de los cromatóforos en unidades.

II.2.1.1.4. Radiatae

Este subgénero se caracteriza por poseer cromatóforos con forma de cintas o bandas radiales con uno, dos o tres centros. Estos se hallan asociados a pirenoides o a cuerpos de paramilon. Pueden aparecer también cromatóforos individuales, sin pirenoides, los cuales se separaron del cuerpo principal.

Euglena viridis (Ehrenberg, 1830) (Figura 2.3.) posee un sólo centro, al cual rodean las bandas de los cromatóforos. Sus cuerpos muciferosos son esféricos y se encuentran alineados en cuatro hileras.

Euglena pseudoviridis (Chadefaud, 1937) carece de estos cuerpos. Por tal causa, se la considera como un período del ciclo de vida de *E. viridis*.

E. geniculata posee dos centros de paramilon mientras *tristelia* (Chu, 1947) contiene tres.

Serpentes

Según lo informado por Pringsheim (1956), este subgénero está formado por organismos cuyos cuerpos son largos. Se movilizan por deslizamiento, arrastrándose como si fueran serpientes. Poseen un flagelo corto, el cual muchas veces se pierde. Los cromatóforos tienen forma de discos o platos, siendo de mayor tamaño que los de *Rigidiae* y *Lentiferae* pero menores que los de *Catilliferae*. Existen pirenoides localizados centralmente pero el paramilon se encuentra ausente.

Este grupo incluye a *E. deses* (Ehrenberg, 1833), *E. mutabilis* (Schmitz, 1884) y *E. intermedia* (Schmitz, 1884) (Figura 2.3.).

II.2.1.1.6. Limpidae

Este grupo involucra las formas incoloras, pero no es un subgénero natural de *Euglena*. Existen numerosas formas no coloreadas, las cuales tienen una afinidad directa con alguno de los cinco subgéneros anteriormente tratados. Existen otros géneros de la familia Euglenidae que también poseen formas incoloras.

Hasta el momento, se han encontrado únicamente los siguientes tipos de *Euglena* no coloreados: *Astasia*, *Khawkinia* o *Euglena* sp. *hyalina*. Filogenéticamente, sería ideal identificar de qué especie de *Euglena* proviene cada una de estas formas. Blum et al (1965) se cuestionan si esto es realmente posible, existiendo una aparición natural de estos tipos incoloros.

Johnson (1968) recomienda designar a las especies no coloreadas relacionadas con *Euglena*, como *E.*(especie) var. *Khawkinia*. Los organismos correspondientes a especies aún no conocidas, deben agruparse dentro de los géneros *Astasia* y *Khawkinia* hasta que se hayan determinado sus relaciones ancestrales.

REFERENCIAS

- Birdsey, E.C. & Lynch, V.H. (1962), Science 137, 763.
- Blum, J.S.; Sommer, J.R. & Kahn, V. (1965), J. Protozool. 12, 202.
- Chadeffaud, M. (1937), Botaniste 28, 85.
- Chadeffaud, M. (1938), Rev. Algologique 11, 189.
- Chadeffaud, M. (1962), "Les Végétaux Non Vasculaires (Cryptogamie)", Vol I. Masson, Paris.
- Chu, S.P. (1947), Sinensia 17, 75.
- Dangeard, P.A. (1901), Botaniste 8, 97.
- Ehrenberg, C.G. (1830), Physik. Abhandl. Kgl. Akad. Wiss. Berlin, 1830, p.1.
- Ehrenberg, C.G. (1833), Physik. Abhandl. Kgl. Akad. Wiss. Berlin, 1833, p. 145.
- Gojdics, M. (1953), "The Genus Euglena". Univ. of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.
- Goodwin, T.W. & Jamikorn, M. (1954), J. Protozool. 1, 216.
- Green, J. (1963), Comp. Biochem. Physiol. 9, 313.
- Hardy, A.D. (1911), Vict. Nat. 27, 215.
- Hollande, A. (1952), In "Traité De Zoologie". Grassé) Fasc. I, pp. 238-284 Masson, Paris.
- Huber-Pestalozzi, G. (1955) In "Die Binnengewasser" (A. Thienemann, ed.), Vol 16, pp 1-606. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Jahn, T. L. (1946), Quart. Rev. Biol. 21, 246.
- Johnson, L.P. (1968), "The Biology of Euglena", (D.Buetow, ed) Vol 1, Chapter I, pp. 1-25, Academic Press, New York.
- Klebs, G. (1883), Untersuch. Botan. Inst. Tübingen 1, 233.
- Krinsky, N.E. (1964), Plant Physiol. 39, 441.
- Krinsky, N.I. & Goldsmith, T.H. (1960), Arch. Biochem. Biophys. 91, 271.
- Kudo, R.R. (1966), "Protozoology", 5th ed. Thomas, Springfield, Illinois.

- Lemmerman, E. (1913), In "Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz" (A. Pascher, ed.), Vol II, pp. 115-174. Fischer, Jena.
- Pringsheim, E.G. (1956), Nova Acta Leopoldina 18, 1.
- Scagel, R.F., Bandoni, R.J., Rouse, G.E., Schofield, W.B., Stein, J.R. & Taylor, T.M.C. (1965), "An Evolutionary Survey of the Plant Kingdom". Wadsworth, Belmont, California.
- Schmitz, F. (1884), Jahrb. Wiss. Bot. 15, 1.

PARTE 2

MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

CAPITULO III

LA CELULA DE *Euglena*

III.1. Aspectos generales

- III.1.1. Tamaño y forma
- III.1.2. Color

III.2. Complejo pelicular y estructuras asociadas

- III.2.1. Películas, plasmalemma y protuberancias
- III.2.2. Actividad de fosfatasa ácida pelicular
- III.2.3. Cuerpos de mucus
- III.2.4. Quistes
 - III.2.4.1. Quistes protectores
 - III.2.4.2. Quistes reproductivos
 - III.2.4.3. Quistes temporarios
 - III.2.4.4. Quistes de pared delgada

III.3. Organelas

- III.3.1. Canal y reservorio
- III.3.2. Vacuolas contráctiles
- III.3.4. Flagelos
- III.3.5. Estigma
- III.3.6. Cuerpo paraflagelar o swelling flagelar
- III.3.7. Cloroplastos y pirenoides
- III.3.8. Mitocondrias
- III.3.9. Aparato de Golgi
- III.3.10. Lisosomas, vacuolas autofágicas y peroxisomas
- III.3.11. Retículo endoplasmático y ribosomas
- III.3.12. Microtúbulos
- III.3.12. Inclusiones celulares
 - III.3.13.1 Paramilon
 - III.3.13.2 Otras inclusiones
- III.3.14. Núcleo

PARTE 2: MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

III. LA CELULA DE *Euglena*

III.1. Aspectos generales

Actualmente existen numerosos trabajos acerca de la ultraestructura de *Euglena*; algunos se encuentran relacionados con estudios sobre especies particulares de este género, especialmente *E. spirogyra* (Leedale et al, 1965 a) y *E. gracilis* (Buetow, 1968) y otros se hallan dentro de las experiencias de reconocimiento de euglenoides flagelados (Leedale, 1967 a, 1967 b, 1971).

El presente capítulo tratará de resumir los estudios realizados en este campo, especialmente en cuanto a la distribución de las organelas y su estructura.

III.1.1. Tamaño y forma

La distribución de las organelas de una célula de *Euglena gracilis* se ilustra en la Figura 3.1. Su tamaño es de aproximadamente 50 μ de longitud por 10 μ de ancho, siendo su forma la de un cigarro.

En cuanto a otras especies, el tamaño es variable: desde 12 x 15 μ en *Euglena minuta* hasta 530 x 40 μ en *Euglena oxyuris*.

Este tamaño no es necesariamente constante; puede haber variaciones aún entre miembros de una misma especie. Esta diversidad depende de una amplia variedad de condiciones, por ejemplo, cambios definidos efectuados durante el ciclo de crecimiento o transferencia del cultivo a un medio fresco (Corbett, 1957).

Por lo tanto, no se puede utilizar esta propiedad en las células de *Euglena* para diferenciar las distintas especies.

En cuanto a la forma, los miembros de este género pueden variar desde casi esféricas (*E. inflata*) hasta cilíndricas (*E. acus* y *E. deses*). Sin embargo, la mayoría de las especies son fusiformes o "spindle-shaped".

Gojdic (1953), Huber-Pestalozzi (1955) y Pringsheim (1956) informaron acerca de los tamaños y formas de la mayoría de las

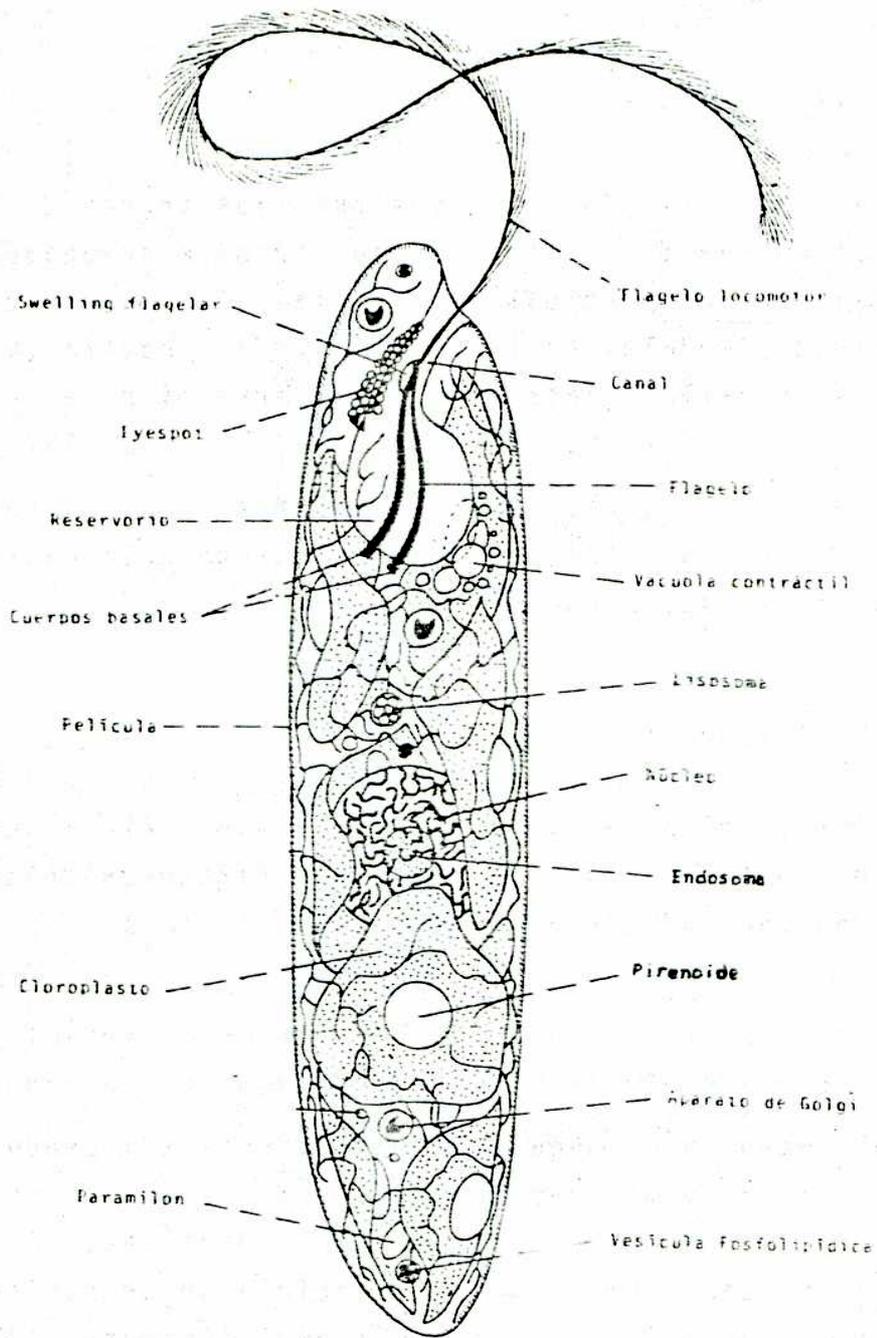


FIGURA 3.1.: *Euglena gracilis*

especies existentes. Pringsheim efectuó comentarios tratando de relacionar estas variables con la identificación de los distintos organismos.

III.1.2. Color

Debido a la presencia de clorofila, casi todas las especies son verdes. La clorofila se encuentra agrupada en los cloroplastos, existiendo una gran diversidad en cuanto al número y a la forma de los mismos, según la especie.

También existen algunas especies coloreadas por la presencia de gránulos rojos, de aproximadamente 0,5 μ de diámetro, llamados hematocromos (Jahn, 1946; Gojdics, 1953). Estos gránulos pueden estar concentrados en el centro de la célula, conservando ésta su color verde debido a una distribución periférica de los cloroplastos. Si en cambio, las vesículas se hallan dispersas, la célula toma un color rojo.

Las especies rojas son abundantes en ciertos habitats durante períodos prolongados de clima caluroso (Hardy, 1911; Kol, 1929; Johnson, 1939; Gojdics, 1953).

Johnson (1939) informó acerca del cambio de color de *Euglena rubra*, de verde a rojo al amanecer y de rojo a verde en el ocaso. Aparentemente, estas observaciones sugieren que el pigmento protege las células contra el calor y la luz excesiva (Jahn 1946; Gojdics, 1953).

Por otro lado, como consecuencia de un blanqueamiento o "bleaching" mediante agentes tales como la estreptomycin y las temperaturas elevadas, las células pueden aparecer como incolores.

III.2. Complejo pelicular y estructuras asociadas

III.2.1. Película, plasmalemma y protuberancias

La zona más externa del citoplasma de los euglenoides se encuentra diferenciada o engrosada, constituyendo el llamado complejo pelicular, película o periplasto.

Esta película puede ser lo suficientemente flexible como para que varíe la forma de la célula durante el movimiento euglenoide, como en *E. gracilis* y *E. deses*; puede ser ligeramente flexible como para minimizar dicho movimiento (*E. trisulcata* y *E. triptera*) o rígida de tal manera que la forma celular sea fija (*Phacus*).

En algunas especies esta película es lisa o finamente estriada (*Astasia torta*); en otras, aparece estriada y también presenta protuberancias, las cuales pueden ser de estructura simple (*E. spirogyra*, *Phacus monilata*) o compleja (*E. fusca*) (Jahn, 1951).

Mediante micrografías electrónicas, se ha revelado la presencia de crestas y ranuras o canales peliulares, observándose que la célula entera está recubierta de una membrana "tripartita" denominada plasmalemma.

Algunos autores utilizaron las protuberancias presentes a lo largo de las estrias del complejo peliular, para definir ciertas *Euglenas*. Sin embargo, estas protuberancias no pueden emplearse para caracterizaciones taxonómicas pues en algunos casos no se hallan presentes y en otros pueden variar de acuerdo con las condiciones de crecimiento del cultivo.

• En *E. spirogyra*, estas protuberancias contienen compuestos férricos (Klebs, 1883; Leedale et al, 1965 b) y posiblemente también manganeso, el cual produciría ese tinte marrón característico de la película (Pringsheim, 1946).

En 1956, Pringsheim sugirió que las protuberancias contendrían geles inorgánicos, mientras que otros autores opinaban que recogían los exudados a través de los poros de las membranas.

En *Euglena gracilis* Z este complejo peliular estaría formado por:

- a) una densa capa externa o plasmalemma de aproximadamente 90 Å;
- b) un espacio de 80 Å de ancho (fibrillas o microtúbulos);
- c) una densa capa interna de 60-80 Å (retículo endoplasmático sub-peliular que está en conexión con el citoplasma).

El plasmalemma es una tricapa de unidades de membrana; es continua y cubre lomos, cavernas, flagelos, reservorios, etc.; en algunas células está recubierto por material granular.

Cuando se priva de una fuente de carbono, las células de los cultivos de *E. gracilis* entran en un estado estacionario prolongado, post-mitótico; todo el cultivo puede permanecer viable por aproximadamente 13 días. Durante este período, las células se redondean y se achican, llevando a cabo una gran variedad de cambios degradativos (Blum y Buetow, 1963). Sin embargo, la película retiene su rigidez y sus lomos y cavernas características (Malkoff y Buetow, 1964; Brandes et al, 1964).

La célula adulta de *E. gracilis* posee aproximadamente 40 complejos peliculares (Blum et al, 1965). Sommer y Blum (1965 a) sugirieron que este número sería una característica taxonómica de la familia Euglenaceae, ya que variaba con la especie, en oposición a las teorías de Kirk y Juniper (1964) quienes informaron un número variable de complejos peliculares en *E. gracilis*.

III.2.2. Actividad de fosfatasa ácida pelicular

Cuando los cultivos de *E. gracilis* se privan de ortofosfato, las células inducen la enzima fosfatasa ácida (Price, 1962; Blum, 1965). Las células de *E. gracilis* crecidas en un medio normal en cuanto al contenido de ortofosfato poseen una actividad constitutiva de fosfatasa ácida, especialmente en los corpúsculos de Golgi (Brandes et al, 1964; Sommer y Blum, 1965 b), alrededor de los gránulos de paramilon y del reservorio y en algunas mitocondrias (Brandes et al, 1964). Así, en estas células, que ya poseen una actividad constitutiva, la actividad inducida se encuentra también presente en la película (Sommer y Blum, 1965 b) y está localizada en las cavernas o hendiduras de cada complejo pelicular cerca del retículo endoplasmático subpelicular.

La localización de la actividad de la enzima inducida, cerca de la superficie celular indicaría que su función es la de una hidrolasa no específica de fosfatos orgánicos, que actuaría durante la privación externa de ortofosfato.

III.2.3. Cuerpos de mucus

La superficie de las células de *Euglena* está recubierta de mucílado el cual es secretado por los cuerpos de mucus, a través de canales.

Los cuerpos de mucus son estructuras subpeliculares esféricas o elongadas; junto con el espacio perinuclear y el retículo endoplasmático forman un sistema continuo en *E. gracilis*.

En algunas especies, la mucina secretada produce una capa extensa (*E. viridis*) la cual se puede transformar en un quiste; en otras se reduce a fibras delgadas que se fusionan formando cuerdas a lo largo de las estrías peliculares de la célula (Rosowski, 1977). En *E. spirogyra*, la mucina sirve como ornamentación extracelular; en *Trachelomonas*, está involucrada en la formación de las envolturas extracelulares (Leedale, 1975 a) y en *Colacium* es esencial para el habitat de este género (Rosowski y Willey, 1977).

III.2.4. Quistes

Hollande (1942) informó acerca de la formación de quistes como resultado de una gradual condensación de la cubierta de mucina, la cual fue secretada luego de la irritación de la célula.

Jahn (1951) observó la aparición de quistes en células de *E. gracilis* en ciertas condiciones ambientales, por ejemplo en medios que contienen etanol a pH's entre 5 y 7. Dentro del quiste, la célula puede dividirse. A pH's más ácidos, esta cubierta no se forma.

La pared de estos quistes en *Euglena* está compuesta por un hidrato de carbono no identificado aún (Jahn, 1951; Fritsch, 1965).

Generalmente, los quistes son esféricos, existiendo también algunos pentagonales o de forma de botella (*E. orientalis*, *E. tuba*).

Las especies de *Euglena* pueden formar diversos tipos de quistes; Jahn (1951) los clasificó en: protectores, reproductivos, temporarios o de reposo o transitorios y quistes de pared delgada.

III.2.4.1. Quistes protectores

Generalmente estos quistes poseen una pared importante,

a veces estratificada y contienen una sola célula. Estas cubiertas aparecen como una respuesta a condiciones no favorables, por ejemplo en cultivos viejos.

Dichos quistes también se han encontrado en *E. deses* a 0-4 °C.

III.2.4.2. Quistes reproductivos

Estos quistes tienen una membrana elástica, fina y permeable y aumentan su diámetro a medida que las células se dividen. En *E. gracilis* y *E. viridis*, los quistes pueden llegar a contener de 32 a 64 células (Jahn, 1951), las que no poseen flagelos.

III.2.4.3. Quistes temporarios

Los quistes temporarios poseen una pared impermeable al agua, pero que contiene pequeños poros. Las células permanecen flageladas y tienen libertad de movimiento dentro de la cavidad.

Estas envolturas surgen como respuesta a grandes amplitudes térmicas. Günther (1928) propuso que aquellas protegerían a las células contra la desecación, aunque también aparecen en las especies que habitan pantanos (*E. terricola*, *E. geniculata* y *E. sanguinea*).

III.2.4.4. Quistes de pared delgada

Existe una sola especie (*E. tuba*) que se encuentra dentro de esta categoría, no pudiendo dividirse durante el enquistamiento.

III.3. Organelas

III.3.1. Canal y reservorio

Los euglenoides flagelados poseen una invaginación anterior de la cual emerge el flagelo locomotor (Pringheim, 1956; Fritsch, 1965). Esta invaginación está formada por dos partes:

el canal o gullet (también llamado cytopnarynx) y el reservorio interno. La apertura anterior del canal, que comunica con el exterior, se denomina citostoma.

Ni el canal ni el reservorio están involucrados con la ingestión de partículas sólidas, ya que no existe ninguna especie de *Euglena* que sea holozoica.

Sin embargo, posteriormente Miler y Miler (1978) observaron preparaciones de membranas del reservorio, obteniendo imágenes consistentes con la existencia de endo y exocitosis. Kivic y Vesik (1974) demostraron experimentalmente la presencia de pinocitosis, la cual sería un mecanismo para la recuperación de moléculas grandes perdidas durante la descarga de las vacuolas contráctiles.

El reservorio está permanentemente conectado al exterior por intermedio del canal. Este es un tubo rígido subapical (Leedale, 1967 a) que se encuentra localizado sobre el lado opuesto al "eyespot" (Figura 3.1.).

Está recubierto de material pelicular, apareciendo numerosos microtúbulos subyacentes al plasmalemma. La región posterior del canal y el reservorio están cubiertos solamente de plasmalemma.

El reservorio es una cámara colectora dentro de la cual las vacuolas contráctiles vacían sus contenidos. Estas a su vez, los toman de las vacuolas secundarias o accesorias que extraen el fluido del citoplasma.

La disposición y ubicación de este sistema excretor es característico de las especies y de la forma de las células.

III.3.2. Vacuolas contráctiles

En *E. gracilis* la vacuola contráctil está limitada por una membrana de 80-100 Å de espesor y se halla ubicada cerca del reservorio (Gibbs, 1960).

La descarga de la vacuola contráctil en el reservorio ocurre en 20-30 segundos, a temperatura ambiente. Durante dicho intervalo las membranas de ambos se hallan fusionadas y el fluido de la vacuola se vacía dentro del reservorio. Este retorna

inmediatamente a su forma y se origina posteriormente una nueva vacuola contráctil a partir de las vacuolas secundarias (Leedale et al, 1965 a).

Cerca de las vacuolas accesorias, se encuentran vesículas esféricas de 1000 Å de diámetro, las cuales se hallan solamente en esta región del citoplasma. Estas vesículas pueden fusionarse con las vacuolas secundarias, con la principal y también con el reservorio. Según Leedale et al (1965 a) están involucradas en la retención de solutos del citoplasma y en la secreción de agua y productos de deshecho hacia las vacuolas. En esta zona del citoplasma también se encuentran corpúsculos de Golgi, los cuales tendrían una actividad osmo-regulatoria

III.3.4. Flagelos

Euglena tiene dos flagelos. Los cuerpos basales, de los cuáles surgen los flagelos, se denominan kinetosomas. Estos se hallan localizados debajo de la membrana del reservorio.

De los dos flagelos, el más largo posee movimiento flagelar, empleándose así en la locomoción. Se extiende a lo largo del canal, llegando por la apertura anterior hasta el exterior. Este flagelo constituye además una estructura fotosensible a nivel del "eyespot".

El otro flagelo no posee movimiento. Es más delgado y corto que el locomotor, hallándose contenido dentro del reservorio. Se encuentra adherido o unido al otro flagelo a la altura del "eyespot", de tal forma que ambos parecen una estructura flagelar bifurcada.

En algunas especies de *Euglena*, ambos flagelos no emergen (*E. obtusa*) y los organismos poseen movimientos reptantes.

Aún entre los miembros de una misma especie, la longitud del flagelo locomotor puede ser variable (40-60 μ). El segundo flagelo mide 7-8 μ de longitud.

En situaciones de stress o irritación, el flagelo puede perderse fácilmente; sin embargo, suele regenerarse en condiciones apropiadas. Algunas especies poseen flagelos más resistentes, por ejemplo en *E. gracilis* Z, el movimiento flagelar continúa aún exponiéndose las células a elevadas presiones hidrostáticas

(Byrne y Marsland, 1965), mientras que a bajas presiones el mismo cesa.

III.3.5. Estigma

El estigma o "eyespot" se halla presente en todas las especies normalmente verdes de *Euglena*. Se encuentra localizado en la superficie del reservorio cercano a la salida de éste y enfrentado al cuerpo paraflagelar o foto-receptor (Gibbs, 1960; Pitelka, 1963). Numerosas Euglenaceae no coloreadas también poseen "eyespot", aunque en *A. longa* no aparece (Pringsheim 1956).

En *E. gracilis* los estigmas parecen glóbulos o corpúsculos homogéneos y densos, de diámetro variable (150-660 m μ). Wolken y Palade (1953) informaron acerca de la presencia de estigmas de aproximadamente 2 μ de diámetro y 3 μ de longitud, los cuales contienen de 30 a 50 gránulos de tamaños dispares (100 a 300 m μ) (Wolken, 1958).

Ueda (1958) encontró que cada uno de estos gránulos estaba rodeado de una membrana. Estos parecían estar libres en el citoplasma formando parte de una estructura flojamente empaquetada en lugar de un conjunto embebido en una matriz, como había sido descrito por Wolken y Palade (1953). Entre los gránulos del estigma y la membrana limitante del reservorio existe una formación paralela de túbulos, de aproximadamente 180-250 Å de diámetro (Roth, 1958; de Haller, 1959; Gibbs, 1960).

Wolken (1956) estimó que el "eyespot" contenía de 5×10^5 a 10^6 moléculas de pigmento. Batra y Tollin (1964) aislaron los gránulos del estigma de *E. gracilis* Z, que por microscopía electrónica aparecían como esferas huecas de variados tamaños.

Existen evidencias acerca de que el estigma es una organela funcionalmente especializada, ya que:

- 1) durante la división celular, se reproduce (Jahn, 1951);
- 2) es completamente independiente de los cloroplastos (Pitelka, 1963; Leedale et al, 1965 a);
- 3) se pierde irreversiblemente por tratamiento de las células con estreptomicina o con temperaturas de 34-35 °C (Pringsheim y Pringsheim, 1952).

Batra y Tollin (1964) identificaron los pigmentos aislados de los "eyespot" de *E. gracilis* Z de acuerdo con sus comportamientos cromatográficos y espectrofotométricos y sus coeficientes de partición. La luteína (o probablemente la anteraxantina) y la criptoxantina comprenden el 83% de los pigmentos. El resto está compuesto por β -caroteno y un compuesto no identificado.

El calor y la estreptomycin, bajo condiciones que permiten la división celular (Mego y Buetow, 1966, 1967) blanquean a *Euglena* afectando el desarrollo de los cloroplastos; sin embargo, se obtienen resultados variables con el estigma. En algunos clones de *E. gracilis* permanentemente blanqueados por calor, el "eyespot" persiste mientras las células estén iluminadas (Pringsheim y Pringsheim, 1952). Conviene aclarar aquí que el espectro de acción para la preservación del "eyespot" corresponde a la luz absorbida por los carotenoides del estigma. Estos mismos clones, aún después de seis meses de blanqueamiento y de varios subcultivos, sólo llegaron a perder el estigma cuando las células se colocaron en la oscuridad. Así, en la mayoría de las células de *Euglena* blanqueadas por calor, el estigma desaparece en la oscuridad y se preserva en la luz. Los cloroplastos pueden ser destruidos y el "eyespot" preservado, pero lo opuesto nunca ocurre ; no se han encontrado células verdes sin "eyespot".

La estreptomycin tiene un efecto similar sobre el "eyespot" y los cloroplastos (Pringsheim y Pringsheim, 1952); tanto uno como otro, una vez perdidos no se regeneran.

Sin embargo, la nutrición heterotrófica y el vigor reproductivo no se encuentran afectados en cepas blanqueadas por tratamiento con estreptomycin o temperaturas elevadas.

Estudios más detallados acerca de la estructura del estigma, sus pigmentos y la relación existente con otras organelas se hallan recopilados en el trabajo de Walne (1980).

III.3.6. Cuerpo paraflagelar o swelling flagelar

El cuerpo paraflagelar también llamado swellingflagelar es una estructura cristalina que se encuentra ubicada dentro de la membrana flagelar, a nivel del "eyespot" (Leedale, 1967 a ;

Walne y Arnot, 1967; Walne, 1971; Kivic y Vesik, 1972).

Este cuerpo desaparece junto con el "eyespot" y los cloroplastos (Pringsheim, 1956) cuando diferentes cepas de *Euglena* son tratadas con estreptomycinina o expuestas a temperaturas elevadas. Sin embargo, Vavra (1956) encontró una cepa de *E. gracilis* en la cual este cuerpo se conservaba cuando se aplicaba un tratamiento de estreptomycinina que destruía el "eyespot" y los cloroplastos.

Wager (1900) descubrió que el cuerpo paraflagelar se hallaba asociado al "eyespot". Mast (1911, 1917) concluyó que el cuerpo paraflagelar formaba parte del estigma y lo consideró como foto-receptor del sistema. Sin embargo, actualmente se ha determinado que el "eyespot" y el cuerpo paraflagelar constituyen estructuras independientes y separadas. La evidencia concluyente de que el swelling flagelar es el verdadero foto-receptor proviene de Tchakhotine (1936), quien irradió con luz U.V. determinadas zonas de *E. gracilis* logrando destruir el estigma. Dichas células se movían desde la luz hacia la oscuridad mientras que aquellas que poseían el estigma intacto no lo hacían.

Aparentemente, parecería que el estigma funciona como una pantalla que absorbe y selecciona los rayos luminosos que llegan a la célula, protegiendo de esta forma el cuerpo paraflagelar que sería el verdadero foto-receptor (Jana, 1951; Gibbs, 1960; Leedale, 1966 a).

La estructura fina del foto-receptor aún no ha sido resuelta; sin embargo, existen ya algunos trabajos al respecto. Benedetti et al (1976) informaron que el swelling flagelar contenía flavinas. Piccini y Mammi (1978) estudiaron la naturaleza de los cristales del cuerpo paraflagelar y West et al (1980) encontraron una relación estructural compleja entre este cuerpo y el sistema paraflagelar en el género *Trachelomonas*.

III.3.7. Cloroplastos y pirenoides

Los cloroplastos de *E. gracilis* están formados por bandas moderadamente densas o lamelas (10 a 45), las cuales varían en espesor de 27 a 210 m μ (Gibbs, 1960). Cada banda consiste en un paquete o grupo de dos a cinco discos (generalmente tres).

La matriz que contiene a estos discos está formada por material granular irregular.

Regularmente se observan gotas de lípidos y a veces aparecen vacuolas vacías.

El pirenoide es una región de la matriz, de material más denso, formada por bandas ampliamente espaciadas, consistiendo cada una de un disco simple o doble.

El pirenoide está recubierto de paramilon y su tamaño varía considerablemente dependiendo del estado de desarrollo del cloroplasto.

En *E. gracilis*, los cloroplastos contienen una única especie de DNA y existen evidencias de la presencia de RNA.

Gibbs (1978) reveló que el cloroplasto se halla rodeado de una membrana densa (150-200 Å), la cual puede ser resuelta en tres membranas, por microscopía electrónica. Las dos membranas internas corresponderían a la envoltura propia del cloroplasto y la externa sería el plasmalemma. Según Gibbs, éstas serían evidencias que apoyan la teoría simbiótica según la cual los cloroplastos serían el resultado de una simbiosis entre un microorganismo autótrofo, susceptible a capturar la energía luminosa y una célula huésped heterotrófica.

III.3.8. Mitocondrias

El sistema mitocondrial de *E. gracilis* consiste en un único retículo (Leedale y Buetow, 1970) que se ramifica a lo largo de toda la célula. Así, forma una especie de malla cuyas fibras poseen un espesor de 0,4-0,6 μ las cuales crecen y se dividen con la célula, constituyendo aproximadamente un 6% del volumen celular (Pellegrini, 1980 a).

Bajo condiciones de privación de fuentes de carbono (Leedale y Buetow, 1970) o durante el blanqueamiento (Pellegrini, 1980 b) la morfología, el volumen y los componentes del retículo pueden variar. Así, cuando a células de *Euglena* se las priva de una fuente de carbono, a los siete días aparecen mitocondrias extremadamente largas, ubicadas rodeando la periferia celular. Si se repone la fuente de carbono a los ocho días, la capacidad oxidativa aumenta, alcanzándose los valores iniciales dentro

de las 20-25 horas (Blum y Buetow, 1963). Durante este período de normalización se hallan numerosas mitocondrias hipertrofiadas (Malkoff y Buetow, 1964). Pasadas las 49 horas, sólo se observan mitocondrias de tamaño y formas normales.

Cuando se blanquean células de *E. gracilis* por acción de la estreptomycin y se privan de una fuente de carbono, tal como el acetato, se encapsulan numerosas mitocondrias en cavidades rodeadas por una membrana. Estas son comparables a los citolisomas (vacuolas autofágicas) encontrados en células de organismos superiores. Las mitocondrias encapsuladas son digeridas (Brandes et al, 1964) mientras que las remanentes permanecen normales aunque en su mayoría se distribuyen linealmente a lo largo de la periferia celular (Figura 3.2.).

Reger y Beams (1954) informaron acerca de la presencia de gránulos densos de significado desconocido, en mitocondrias de *E. gracilis* y Brandes et al (1964) encontraron actividad de fosfatasa ácida, apareciendo los sitios de reacción como grupos o racimos separados ya sea en las crestas, en la matriz o en ambas.

Fringsheim y Hovasse (1948) hallaron que las mitocondrias de las células de *Astasia* (género no coloreado naturalmente) así como las de numerosas *Euglenas* etioladas se encontraban más desarrolladas que las correspondientes células verdes. También existe un considerable incremento en el número de estas organelas en condiciones de bajo contenido de cloroplastos. Sin embargo, la organización de las mitocondrias de *E. gracilis* adaptada a crecer en presencia o ausencia de luz, es la misma (Wolken y Palade, 1953).

Por otro lado, cultivos de *E. gracilis* Z en fase estacionaria (9-12 días) muestran células cuyas mitocondrias poseen crestas estructuralmente alteradas (Siegesmund et al, 1962).

En conclusión, las mitocondrias de *Euglena* muestran la arquitectura básica común a todas ellas; parecen ser elásticas, mostrando cambios en tamaño, forma y número, de acuerdo con las condiciones externas.

La información más reciente acerca de la morfología, ultraestructura, aislamiento, fisiología y función de estas organelas se encuentra en los trabajos de Pellegrini (1980 a, b).

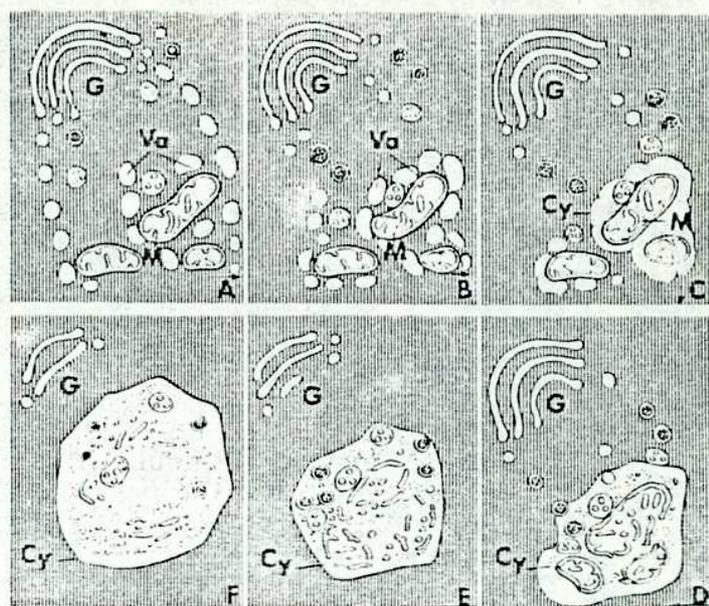


Diagrama 1

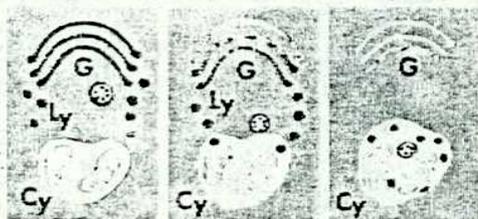


Diagrama 2

FIGURA 3.2.: Diagrama 1: Secuencia de formación de citolisomas (Cy) en *E. gracilis* var. *bacillaris*, privada de fuente de carbono.
 A: Vacuolas y vesículas de Golgi (G,Va); B, C: Fusión de vacuolas de Golgi, encapsulando mitocondrias (M) y formando el citolisoma (Cy). Durante este proceso, son atrapados también otros componentes del citoplasma;
 D-F: Degradación progresiva de diversas estructuras dentro del citolisoma.

Diagrama 2: Los lisosomas (Ly) provenientes del aparato de Golgi se incorporan al citolisoma y proveen los componentes enzimáticos para el proceso lítico (Brandes et al, 1964).

III.3.9. Aparato de Golgi

Las especies de *Euglena* contienen numerosos cuerpos de Golgi o dictiosomas, número que aumenta con el tamaño celular.

Estas organelas están bien desarrolladas y distribuidas a través de todo el citoplasma celular, pero existe siempre una mayor concentración en la región que rodea al reservorio. Posiblemente esté relacionado con la endo y exocitosis, con la secreción pelicular, con la osmo-regulación y con otras funciones celulares asociadas al reservorio.

Cada aparato de Golgi es una estructura que consiste de 15 a 30 cisternas planas o lamelas, de más de 1 μ de diámetro, las cuales muestran dilataciones saculares en uno o ambos extremos. También se suelen encontrar vesículas o vacuolas concentradas alrededor de esta organela, de aproximadamente 25 a 80 μ de diámetro.

Los cuerpos de Golgi están involucrados en la conversión de metabolitos y en la actividad secretora, como en otros eucariotas. Se ha observado que contienen fosfatasa ácida (Brandes et al, 1964; Sommer y Blum, 1965 b) localizada ocasionalmente en el retículo endoplasmático pelicular y alrededor del reservorio. Esta ubicación sugiere la existencia de una interrelación funcional entre las tres estructuras antes mencionadas.

Los aparatos de Golgi también están implicados en la formación de lisosomas bajo condiciones de privación de carbono (Malkoff y Buetow, 1964). Así, en ausencia de acetato, el cuerpo de Golgi se hipertrofia, apareciendo distensiones saculares en ambos extremos de las cisternas, originando de este modo numerosas vesículas o vacuolas que se mueven en el citoplasma. El aplanamiento y fusión de estas vacuolas dan como resultado el aislamiento de algunas mitocondrias y otros componentes celulares citoplasmáticos dentro de dichas vesículas unidas a la membrana, las cuales son comparables a los citolisomas descritos en el punto anterior. El material encapsulado es progresivamente hidrolizado, aportando el cuerpo de Golgi una hidrolasa ácida (fosfatasa ácida) al citolisoma (Figura 3.2.). Este proceso de autódigestión representa un mecanismo para proveer a la célula de productos de degradación, que serían utilizados para mantener los procesos metabólicos basales durante la privación

de fuentes externas o ayuno (Brandes et al., 1964; Bertini et al., 1965).

Recientemente, Triemer (1980) informó acerca del rol del aparato de Golgi en la producción de mucílago y en la formación de quistes en *E. gracilis*.

Es interesante notar que cuanto más activo es el cuerpo de Golgi, menor es el número de cisternas de la organela (Leedale, 1968).

III.3.10. Lisosomas, vacuolas autofágicas y peroxisomas

Bajo condiciones de privación de fuentes de carbono, las células de *E. gracilis* blanqueadas con estreptomycin, forman numerosas vacuolas autofágicas o citolisomas (Leedale y Buetow, 1976) dentro de las cuales se hallan elementos pertenecientes a las mitocondrias y a los cloroplastos, restos de otras membranas y gránulos citoplasmáticos.

El sistema retículo endoplasmático es el implicado aparentemente en la formación de las membranas de los citolisomas.

El fenómeno de envejecimiento celular está acompañado de una drástica disminución del tamaño de la célula, rápida digestión del paramylon, engrosamiento de los cromosomas, pérdida del flagelo externo y del swelling flagelar, y progresivo decrecimiento de los niveles de hidratos de carbono, proteínas, RNA y DNA. La célula así reducida mantiene su viabilidad durante algunas semanas, retornando a la normalidad si se repone la fuente de carbono. La prolongada privación origina la lisis de numerosas células, las que liberan fuentes de carbono al medio permitiendo la recuperación de otras. De esta forma la población puede sobrevivir durante numerosos meses, sin fuente de carbono.

En *Euglena* también existen inclusiones pequeñas, de menos de 1 μ de diámetro, que contienen gránulos o enzimas (peroxidasa, catalasa y oxidasa). Estas inclusiones de una sola membrana, se denominan microcuerpos o peroxisomas.

III.3.11. Retículo endoplasmático y ribosomas

El citoplasma de *E. gracilis* contiene un sistema de túbulos (liso) y vesículas (rugoso) limitado por membranas denominado retículo endoplasmático. Los estudios realizados informan acerca de la presencia de elementos tubulares y vesiculares discretos de 200 a 600 Å de diámetro, siendo la mayoría del retículo endoplasmático de *E. gracilis* del tipo liso.

Leedale (1967 a) demostró que elementos del retículo tubular estaban asociados con los cuerpos de Golgi, la envoltura nuclear, las membranas de los gránulos de paramylon y otras estructuras. Sin embargo, no se halló ninguna conexión entre el retículo y las membranas de los cloroplastos (Gibbs, 1978).

En micrografías electrónicas de células de *E. gracilis* privadas de una fuente de carbono, se puede observar una pronunciada vacuolización del retículo endoplasmático, como consecuencia del agotamiento de los gránulos de paramylon (Malikoff Buetow, 1964). Trabajos posteriores modificaron esta interpretación. La vacuolización del citoplasma ocurre efectivamente, pero las cavidades conteniendo paramylon según lo observado en células normales, parecerían ser independientes del sistema retículo endotelial (Brandes et al, 1964). Así las grandes vacuolas confluentes encontradas en células de *Euglena* crecidas en condiciones de privación de acetato parecerían derivar de la fusión de cavidades cuyo contenido de paramylon se ha agotado, con vacuolas de paredes complejas y con citolisomas vacíos (Brandes et al, 1964).

En cuanto a los ribosomas, se ha encontrado una gran cantidad de ellos distribuidos en todo el citoplasma.

III.3.12. Microtúbulos

En *E. gracilis* aparece una hilera simple de 70 a 80 fibrillas circulares o microtúbulos, ubicados alrededor del canal (Sommer, 1965). También existen fibrillas longitudinales (Roth, 1958; Sommer, 1965) acomodadas por pares en una única fila, situadas en la misma zona por debajo de la membrana celular. Estos microtúbulos constituyen una continuidad de las fibrillas encontradas en las crestas del complejo pelicular.

En algunas células, las fibrillas longitudinales se hallan separadas de las circulares por una matriz filamentosa sumamente densa. En la mayoría de los casos, esta matriz es especialmente importante en la unión del canal con el citostoma.

El reservorio posee también una única capa de estructuras idénticas ubicadas por debajo del plasmalemma (Leedale et al, 1965 a).

Existen además microtúbulos dispuestos en la base de los flagelos y conectados con el extenso sistema de fibrillas del reservorio (Grimstone, 1961; Sleigh, 1962).

Se han sugerido distintas funciones para los microtúbulos citoplasmáticos, siendo las siguientes las más importantes:

- 1) rol estructural, ya que estas fibrillas forman el citoesqueleto celular (Mignot, 1965).
- 2) contracción periódica que origina apertura y cierre del canal (Leedale et al, 1965 a);
- 3) acción durante el movimiento euglenoide (Jahn y Bovee, 1968).

III.3.13. Inclusiones celulares

III.3.13.1. Paramilon

El paramilon constituye el carbohidrato de reserva característico de *Euglena*. Es un β -1,3-glucano (Leedale et al, 1965 b) el cual se hidroliza a D-glucosa.

Los gránulos de paramilon se distribuyen ampliamente en el citoplasma (*E. gracilis* var. *bacillaris*), sobre los pirenoides (*E. gracilis* Klebs), en forma de cúmulos (*E. viridis*) o pueden ser pocos y largos, localizados en una posición fija (*E. spirogyra*) (Gojdics, 1953). En *E. gracilis*, el número de estos gránulos aumenta cuando las células crecen en presencia de exceso de acetato (Buetow, 1967) y disminuye si se priva a las mismas de fuentes de carbono (Brandes et al, 1964).

Sommer y Blum (1965 b) utilizando técnicas de citoquímica electrónica encontraron actividad constitutiva de fosfatasa ácida alrededor de los gránulos de paramilon.

Barras y Stone (1968) recopilaron todos los datos referentes a tamaño, forma, estructura, localización y bioquímica de estos gránulos.

III.3.13.2. Otras Inclusiones

Numerosos autores comentaron la presencia en el citoplasma de vesículas y vacuolas, de contenidos variables que en numerosos casos tienen aún función desconocida.

Leedale et al (1965 a) describieron vesículas de fosfolípidos de 0,5 a 2 μ de diámetro. Estas organelas contenían pigmentos, lípidos, mielinas y proliferación de membranas. Leedale (1967 a) equiparó estas vacuolas con gránulos metacrómicos (volutina) presentes en algas y con gránulos de lipofucsina hallados en células de mamíferos.

Siegesmund et al (1962) informaron acerca de la existencia de cloroplastos en degeneración, los cuales aparecían cuando se mantenían las células de *Euglena* en oscuridad o cuando se trataban con estreptomycin (Vavra, 1961). Estas estructuras denominadas membranelas por Leedale y Buetow (1976) poseían las tres membranas clásicas de la envoltura de los cloroplastos. A pesar de la carencia de la función fotosintética, estas membranelas se replican y se mantienen en cepas blanqueadas de *E. gracilis*.

III.3.14. Núcleo

Leedale (1968) recopiló los trabajos existentes acerca de la citología y la ultraestructura de *Euglena*, en especial con referencia a la interfase, mitosis, amitosis y meiosis.

La división nuclear en *Euglena* ocurre por mitosis. En tres especies de este género se ha registrado una amitosis, siendo ésta una fragmentación nuclear no relacionada con la reproducción.

La envoltura nuclear consiste de dos unidades de membrana separadas por el espacio perinuclear y atravesadas por poros. Cada membrana posee un grosor de aproximadamente 80 Å y el espacio perinuclear tiene unos 200 Å de ancho. En algunas especies este espacio se halla hinchado, como en *E. ehrenbergii*, encontrándose

infiltrado con material de naturaleza desconocida.

La mayoría de los estudios realizados con el núcleo de *Euglena* en la última década, involucran la variación en la estructura del endosoma (nucleolo) y de los cromosomas a través del ciclo celular (Chaley et al, 1977), las alteraciones debidas a la privación de fuentes de carbono (Leedale, 1975 b) y a la deficiencia de vitamina B₁₂, el aislamiento de los núcleo (Buetow, 1968) y la bioquímica del DNA, del RNA y de las nucleoproteínas.

En la interfase los cromosomas están condensados y los endosomas son perfectamente visibles. La cromatina se halla en forma de gránulos o filamentos.

El endosoma no desaparece durante la mitosis sino que permanece, se divide y retiene el RNA.

Hasta el momento no se cuenta con evidencias valederas y suficientes acerca de la sexualidad de *Euglena*; así la mitosis tiene lugar sin meiosis. Sin embargo, permanece latente la posibilidad de que ésta ocurra en algunos casos excepcionales; de todos modos, un proceso sexual no es una característica normal ni regular del ciclo de vida del género *Euglena*.

REFERENCIAS

- Barras, D.R. & Stone, B.A. (1968), In "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol II, pp 149-191. Academic Pres, New York.
- Batra, P.P. & Tollin, G. (1964), Biochim. Biophys. Acta 79, 371.
- Benedetti, P.A.; Bianchini, G.; Checucci, A.; Ferrara, R.; Grassi, S. & Percival, D. (1976), Arch. Mikrobiol. 111, 73.
- Bertini, F.; Brandes, D. & Buetow, D.E. (1965), Biochim. Biophys. Acta, 107, 171.
- Blum, J.J. (1965), J. Cell Biol. 24, 223.
- Blum, J.J. & Buetow, D.E. (1963), Expt. Cell Res. 29, 407.
- Blum, J.J.; Sommer, J.R. & Kahn, V. (1965), J. Protozool. 12, 202.
- Brandes, D.; Buetow, D.E.; Bertini, F. & Malkoff, D.B. (1964), Exp. Mol. Pathol. 3, 583.
- Buetow, D.E. (1967), Nature 213, 1127.
- Buetow, D.E. (1968), In " The Biology of *Euglena*" (D. Buetow, ed.), Vol I, pp.109-184. Academic Press, New York.
- Byrne, J. & Marsland, D. (1965), J. Cellular Comp. Physiol. 65, 277.
- Corbett, J.J. (1957), J. Protozool. 4, 71.
- Chaley, N.; Lord, A. & Fontaine, F.G. (1977), J. Cell. Sci. 27, 23.
- de Haller, G. (1959), Arch. Sci. (Geneva) 12, 309.
- Fritsch, F.E. (1965), "The Structure and Function of the Algae", Vol I (reprint de la edición de 1935). Cambridge Univ. Press, London y New York.
- Gibbs, S.P. (1960), J. Ultrastruct. Res. 4, 127.
- Gibbs, S.P. (1978), Can J. Bot. 56, 2883.
- Gojdics, M. (1953), "The Genus *Euglena*". Univ. of Wisconsin Press, Madison.
- Grimstone, A.V. (1961), Biol. Rev. 36, 97.
- Günther, F. (1928), Arch. Protistenk, 60, 511.

- Hardy, A.D. (1911), *Victoria Naturalist* 27, 215.
- Hollande, A. (1942), *Arch. Zool. Exptl. Gen.* 83, 1.
- Huber-Pestalozzi, G. (1955), In "Die Binnengewässer" (A. Thienemann, ed.), Vol 16, pp 1-606. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Jahn, T.L. (1946), *Quart. Rev. Biol.* 21, 246.
- Jahn, T.L. (1951), In "Manual of Phycology" (G.M. Smith, ed.), pp 69-81. *Chronica Botanica*, Waltham, Massachusetts.
- Jahn, T.L. & Bovee, E.C. (1968), In "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol I, pp. 45-99, Academic Press, New York.
- Johnson, L.P. (1939), *Trans. Am. Microscop. Soc.* 58, 42.
- Kirk, J.T.O & Juniper, B. (1964), *J. Roy. Microscop. Soc.* 82, 205.
- Kivic, P.A. & Vesik, M. (1972), *J. Exp. Bot.* 23, 1070.
- Kivic, P.A. & Vesik, M. (1974), *Arch. Mikrobiol.* 96, 155.
- Klebs, G. (1883), *Untersuch. Botan. Inst. Tübingen* 1, 233.
- Kol, E. (1929), *Arch. Protistenk.* 66, 515.
- Leedale, G.F. (1966 a), *Advan. Sci.* 23, 22.
- Leedale, G.F. (1966 b), *J. Protozool.* 13, Suppl., 22.
- Leedale, G.F. (1967 a), "Euglenoid Flagellates", Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Leedale, G.F. (1967 b), *Ann. Rev. Microbiol.* 21, 31.
- Leedale, G.F. (1968), In "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol I, pp. 185-242. Academic Press, New York.
- Leedale, G.F. (1971) In "Oxford Biology Readers" (J.J. Head y O.E. Lowenstein, eds.), N° 5, pp 1-16. Oxford Univ. Press, London y New York.
- Leedale, G.F. (1975 a), *Br. Phycol. J.* 10, 17.
- Leedale, G.F. (1975 b), *Colloq. Internat. CNRS* 240, 285.
- Leedale, G.F. & Buetow, D.E. (1970), *Cytobiologie* 1, 195.
- Leedale, G.F. & Buetow, D.E. (1976), *J. Microsc. Biol. Cell.* 25, 149.
- Leedale, G.F.; Meeuse, B.J.D. & Pringsheim, E.G. (1965 a) *Arch. Mikrobiol.* 50, 68.

- Leedale, G.F.; Meeuse, B.J.D. & Pringsheim, E.G. (1965 b), Arch. Mikrobiol. 50, 133.
- Malkoff, D.B. & Buetow, D.E. (1964), Exptl Cell Res. 35, 58
- Mast, S.O. (1911), "Light and Behavior of Organisms", Wiley, New York.
- Mast, S.O. (1917), J. Exptl. Zool. 22, 471.
- Mego, J.L. & Buetow, D.E. (1967), In " Le Chloroplaste: Croissance et Vieillesse" (C. Sironval, ed.), pp. 274- 290. Masson, Paris.
- Mignot, J.P. (1965), Protistologica I, Parte 1, 5.
- Miller, K.R. y Miller, G.J. (1978), Protoplasma 95, 11.
- Pellegrini, M. (1980 a), J. Cell Sci. 43, 137.
- Pellegrini, M. (1980 b), J. Cell Sci. 46, 313.
- Piccinni, E. & Mammi, M. (1978), Boll. Sool. 45, 405.
- Pitelka, D.R. (1963), "Electron Microscopic Structure of Protozoa" Pergamon, Oxford.
- Price, C.A. (1962), Science 135, 46.
- Pringsheim, E.G. (1946), J. Ecol. 33, 193.
- Pringsheim, E.G. (1956), Nova Acta Leopoldina 18 (125),
- Pringsheim, E.G. & Hovasse, R. (1948), New Phytologist 47, 52.
- Pringsheim, E.G. & Pringsheim, O. (1952), New Phytologist 51, 65.
- Reger, J.F. & Beams, H.W. (1954), Proc. Iowa Acad. Sci. 61, 593.
- Rosowski, J.R. (1977), J. Phycol. 13, 323.
- Rosowski, J.R. & Willey, R.L. (1977), J. Phycol 13, 16.
- Roth, L.E. (1968), J. Ultrastruct. Res. 1, 223.
- Siegesmund, K. A. ; Rosen, W.G. & Gawlik, S.R. (1962), Am. J. Botany 49, 137.
- Silverman, H. & Hikida, R.S. (1976), Protoplasma 87, 237.
- Sleigh, M.A. (1962), "The Biology of Cilia and Flagella". Pergamon, Oxford.

- Sommer, J.R. (1965), J. Cell Biol. 24, 253.
- Sommer, J.R. & Blum, J.J. (1965 a), Exptl. Cell Res. 39, 504.
- Sommer, J.R. & Blum, J.J. (1965 b) J. Cell Biol. 24, 235.
- Tchakhotine, S. (1936), Compt. Rend. Soc. Biol. 121, 1162.
- Triener, R.E. (1980), J. Phycol. 16, 46.
- Ueda, K (1958), Cytologia (Tokyo), 23, 56.
- Vavra, J. (1956), Quoted por Pringsheim (1956).
- Vavra, J. (1961), In "Progress in Protozoology", Proc. Intern. Congr. Protozool., 1st Prague, pp. 189-190. Academic Press, New York.
- Wager, H. (1900), J. Linnean Soc. (London), Zool. 27, 463.
- Walne, P.L. (1971), In " Contributions in Phycology" (B.C. Parker y R.M. Brown, eds.) , pp. 107-120. Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Walne, P.L. (1980), In "Phytoflagellates" (E.Cox, ed.), 165-212. Elsevier, Amsterdam.
- Walne, P.L. & Arnott, H.J. (1967), Planta 77, 325.
- West, L.K.; Walne, P.L. & Rosowski, J.R. (1980) J. Phycol. 16, 489.
- Wolken, J.J. (1956), J. Protozool. 3, 211.
- Wolken, J.J. (1958), Ann. N.Y. Acad. Sci. 74, 164.
- Wolken, J.J. & Palade, G.E. (1953), Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 873.

PARTE 3

CULTIVO Y CRECIMIENTO DE *Euglena*

CAPITULO IV

TECNICAS DE CULTIVO Y REQUERIMIENTOS PARA EL DESARROLLO

- IV.1. Introducción
- IV.2. Cultivos sincrónicos
 - IV.2.1. Sincronización por luz
 - IV.2.2. Sincronización por temperatura
 - IV.2.2.1. Shocks de calor
 - IV.2.2.2. Shocks fríos
- IV.3. Composición química básica
- IV.4. Requerimientos para el crecimiento
 - IV.4.1. Inorgánicos
 - IV.4.1.1. Azufre
 - IV.4.1.2. Hierro
 - IV.4.1.3. Zinc
 - IV.4.1.4. Magnesio
 - IV.4.1.5. Nitrógeno
 - IV.4.1.6. Fósforo
 - IV.4.1.7. Dióxido de carbono
 - IV.4.1.8. Oxígeno
 - IV.4.1.9. Otros requerimientos inorgánicos
 - IV.4.2. Vitamínicos
 - IV.4.2.1. Vitamina B₁
 - IV.4.2.2. Vitamina B₁₂
 - IV.4.3. Fuentes exógenas de carbono
- IV.5. Influencia de *Euglena* sobre el medio ambiente
 - IV.5.1. Variación en el pH
 - IV.5.2. Agotamiento de nutrientes
- IV.6. Efectos del medio ambiente sobre *Euglena*
 - IV.6.1. pH inicial
 - IV.6.2. Fuente exógena de carbono
 - IV.6.3. Efecto de la luz
 - IV.6.3.1. Crecimiento fototrófico
 - IV.6.3.2. División celular
 - IV.6.3.3. Formación de cloroplastos
 - IV.6.4. Efecto de la temperatura

PARTE III: CULTIVO Y CRECIMIENTO DE *Euglena*

IV. TECNICAS DE CULTIVO Y REQUERIMIENTOS PARA EL DESARROLLO

IV.1. Introducción

Las propiedades de *Euglena* dependen de las condiciones empleadas en el cultivo. De esta manera, *Euglena gracilis* puede ser grande o pequeña, verde o amarilla y puede dividirse rápida o lentamente, según el deseo del investigador.

La flexibilidad fisiológica y bioquímica de *Euglena*, unida a su flexibilidad morfológica justifica su "creciente popularidad" entre los estudiosos, como un organismo sumamente útil para una amplia gama de investigaciones bioquímicas. Una de las grandes ventajas de trabajar con *Euglena* reside en que sus requerimientos químicos son simples. El medio ambiente puede ser rigurosamente controlado en cuanto a los factores químicos y físicos, de modo que es posible modificarlo en forma y grado conocidos.

Por tal causa se deben emplear cultivos axénicos (puros), ya que los cambios producidos en el medio por los contaminantes modifican las características de *Euglena*. Los contaminantes usuales del laboratorio son las bacterias y los hongos, que poseen velocidades de crecimiento mucho mayores que las de *Euglena*, produciendo un agotamiento rápido del medio e inhibiendo así el crecimiento de esta última.

Entre los diversos métodos de obtención de cultivos axénicos, el más importante es el que emplea antibióticos o drogas que anulan o reducen la velocidad de crecimiento de los contaminantes pero no afectan la de *Euglena*.

El crecimiento autótrofo en medios salinos, método preferencial para obtener cultivos axénicos de bacterias fotosintéticas, en general no es utilizado en euglenoides pues su medio normalmente contiene un compuesto orgánico en elevada concentración (como sustrato de crecimiento o agente quelante) y pequeñas cantidades de vitamina B₁₂.

Entre los antibióticos más empleados se incluyen la es-

estreptomomicina y la penicilina. Sin embargo, la primera tiene acción blanqueadora (Provasoli et al, 1948) y afecta la motilidad de *Euglena* (Goodwin, 1951). También se observan efectos comparables a concentraciones mayores de 10.000 unidades/ml de penicilina (Goodwin, 1951). Loefer y Mefferd (1955) estudiaron en forma exhaustiva los efectos de la estreptomomicina sobre la citología y el crecimiento de *Euglena*.

Bowne (1964) demostró que *Euglena* es más resistente a la cafeína que otros microorganismos, proponiendo su uso en la obtención de cultivos axénicos.

Generalmente, *Euglena* se hace crecer en medio líquido pero la mayoría de las cepas también se desarrollan en medios semi-sólidos o sólidos. Los stocks se pueden mantener tanto en agar como en medio líquido, siendo preferible el primero.

La peptona (1-2%) produce un buen crecimiento de las distintas cepas y si éstas se conservan a 14-15 °C no es necesario hacer repiques muy frecuentes.

Aparentemente, la luz no es esencial para el mantenimiento de los cultivos stocks, salvo en el caso de los fotótrofos obligados. Así, se han guardado cultivos stock de *E. gracilis* 2 y *E. gracilis* var *bacillaris*, durante 10 años a la oscuridad, sin pérdida de su capacidad fotosintética.

La estimación de la densidad de la población se realiza por conteo directo o por método fotométrico. El primero es el más utilizado ya que puede presentar menor fuente de error. En el método fotosensible influyen no sólo la densidad celular sino también el tamaño de las células y la concentración de pigmentos. Dado que el tamaño celular y el perfil bioquímico varían con la edad del cultivo, la determinación fotométrica no es siempre proporcional al número de células (Elliot, 1949).

IV.2. Cultivos sincrónicos

IV.2.1. Sincronización por luz

Leedale (1959) informó acerca del crecimiento autotrófico de *Euglena* en ciclos de luz-oscuridad. Durante este desarrollo, dependiente de la fotosíntesis, las células se dividían durante los períodos de oscuridad. Este método permite la sincronización en el laboratorio, manteniendo la temperatura constante (Huling, 1960; Edmunds, 1964).

Si se elige apropiadamente la duración de los períodos de luz-oscuridad, cerca del 100% de las células se dividirán en cada ciclo, durante los intervalos de oscuridad. Desde ya que la obtención de las condiciones óptimas depende de la cepa empleada. Así para *E. gracilis* Z la temperatura es de 21,5 °C y los ciclos de luz-oscuridad corresponden a 14-10 horas (Cook, 1966). Hoogenhout (1963) recopiló todos los trabajos existentes acerca de cultivos sincrónicos en células verdes, incluyendo *Euglena*.

IV.2.2. Sincronización por temperatura

IV.2.2.1. Shocks de calor

Cuando cultivos de *E. gracilis* Z se hacen crecer heterotróficamente en un medio orgánico complejo, las células se dividen sincrónicamente luego de ser sometidas a shocks de temperaturas supraóptimas (Pogo y Arce, 1964).

Este método consiste en un tratamiento de 11 horas a 24 °C y de 13 horas a temperaturas mayores; a 36-38 °C se bloquea la división celular, mientras que a 24 °C el número de células se duplica en cada período.

Shocks de temperaturas a 35 °C o menores no son efectivos para esta sincronización.

Estos autores encontraron que la sincronización por shocks de calor no disminuye el crecimiento celular medido en términos del aumento de volumen.

IV.2.2.2. Shocks fríos

Las temperaturas bajas también bloquean la división celular. Así se puede sincronizar el crecimiento del cultivo, llevando las células de una temperatura óptima (29°- 30 °C) a una mucho menor.

La sincronización por shocks de calor produce el blanqueamiento celular; Pogo y Arce (1964) informaron que tras siete shocks de calor a 37 °C se obtuvo un 14% de células blanqueadas. Debido a esta limitación se prefiere utilizar los shocks fríos.

Neal et al (1968) estudiaron la sincronización de *Euglena* crecida heterotróficamente en la oscuridad, mediante shocks de temperatura de 14,5 °C durante 18 horas y de 28,5 °C, durante 6 horas, sin que las células resulten afectadas ya que eran capaces de formar cloroplastos a una velocidad normal, cuando se exponían a la luz.

IV.3. Composición química básica

Las condiciones de cultivo y el estado de crecimiento en que se hallan las células influyen en forma considerable en el perfil bioquímico de *Euglena*.

La Tabla 4.1. resume la composición bioquímica de *Euglena gracilis*. Los datos tabulados corresponden a promedios de los valores hallados para células crecidas en una amplia variedad de condiciones. Así, el contenido de DNA representa un 2-4% de la masa total, dependiendo de la forma en que se hagan crecer las células.

El DNA cloroplástico es aproximadamente un 3% del DNA total (Edelman et al, 1964) y contiene un 75% de A + T (Ray y Hanawalt, 1964) en contraste con el DNA nuclear el cual tiene un 45-50% de A+ T. Además, estos autores intentaron utilizar la relación existente entre las bases como una ayuda para el estudio taxonómico y evolutivo de protozoos y algas.

TABLA 4.1: Composición bioquímica de *E. gracilis*

FRACCION	mg/10 ⁶ CELULAS
Peso seco total	0,7-1,0
Proteína	0,2-0,4
Paramilon	0,04-0,4
Lípido	0,11-0,3
Clorofila	0-0,035
RNA	0,015-0,045
DNA	0,0027-0,0043

Estos rangos fueron estimados de una amplia variedad de fuentes. Estas células fueron, en general, crecidas bajo condiciones óptimas y no representan valores extremos que pueden ser encontrados bajo otras condiciones de crecimiento.

IV.4. Requerimientos para el crecimiento

IV.4.1. Inorgánicos

IV.4.1.1. Azufre

La mayoría de las células animales requieren azufre en su forma más reducida, pero *Euglena*, en común con las plantas superiores y con numerosos microorganismos, utiliza el sulfato, tanto en luz como en oscuridad.

El sulfato presente como traza contaminante de diversas sales permite un crecimiento considerable de *E. gracilis* var. *bacillaris* blanqueada con estreptomycinina (Buetow, 1965).

Metionina se puede utilizar también en lugar del sulfato, ya que rinde una densidad celular final semejante; la cisteína y la homocisteína mantienen el crecimiento pero a concentraciones finales reducidas mientras que la taurina y el ácido homocisteico no son fuentes adecuadas para el desarrollo de este microorganismo (Buetow, 1965).

Kempner y Miller (1965) y Buetow (1965) analizaron la distribución de ^{35}S en *Euglena*, hallando que la proteína contenía un 40-50% del azufre total mientras que los solventes de lípidos removían un 5-15% de la marca total y la fracción de ácidos nucleicos tenía un 10-25%.

Después de un día y medio de privación de fuente de azufre, comienzan a morir las células de *Euglena* y luego de 15 días, sólo un 25% permanece viable. Buetow (1965) concluye que las células sobrevivientes son aquellas capaces de regular la redistribución de las reservas de azufre.

Goodman y Schiff (1964) estudiaron los productos formados a partir de sulfato radioactivo en *E. gracilis* var. *bacillaris* crecidas a la luz en el medio de Hutner a pH 3,5. Estos autores encontraron marca en cisteína, cistina y glutatión en los pools solubles, pero no en metionina, ni en homocisteína o adenosilmetionina, sugiriendo entonces que la concentración de metionina era demasiado pequeña como para poder detectarla debido a la elevada demanda de síntesis proteica. Debemos recordar que este aminoácido forma parte de todas las proteínas de *Euglena*.

Además, se han hallado en este microorganismo nucleótidos o nucleótidos-péptidos que contienen azufre. Davies et al (1966) informaron acerca de la presencia de un "sulfato activo", el 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS).

Los lípidos también contienen una cantidad considerable del azufre total de *Euglena* (Kempner y Miller, 1965). El sulfolípido de mayor importancia en células fotosintéticas es el 6-sulfo-6-deoxi- α -D-glucopiranosil-1,1'-diglicérido (6-sulfoquinovosil diglicérido). De los ácidos grasos, el palmítico y el linoleico son los que se encuentran en mayor proporción.

Los niveles de este sulfolípido son bajos, en células etioladas de *Euglena*, aumentando su contenido durante el verdeo o sea cuando se expone el tejido a la luz (Benson et al, 1962). Davies et al (1966) determinaron que dicho incremento era de 5 veces, a pesar de que la incorporación total de ^{35}S era aproximadamente igual en células verdes y etioladas.

Abraham y Bachhawat (1965) encontraron también que la velocidad de incorporación de sulfato en sulfolípidos, en *Euglena* era mayor en células fotosintéticas que en etioladas y superior aún que la hallada en células blanqueadas con estreptomina.

Esto sugirió que el sulfolípido sería un componente fundamental de las estructuras fotosintéticas activas y que estaría relacionado en forma íntima con el metabolismo de los carbohidratos del cloroplasto (Benson et al, 1962).

Davies et al (1966) informaron acerca del uso del azufre del ácido cisteico como fuente de unidades C-S para la biosíntesis de sulfolípidos, mientras que el que provenía de la cisteína no era empleado para tal fin. Estos autores también hallaron que el molibdato inhibía la incorporación de sulfato en sulfolípidos. Como la formación de adenosina 5'-sulfofosfato y de PAPS se encontraban inhibidas en presencia de molibdato, sugirieron que el PAPS se hallaría en la ruta de incorporación del sulfato en sulfolípidos en *Euglena*.

La estimulación de la incorporación de sulfato por la luz y su inhibición por dinitrofenol y azida (Abraham y Bachhawat, 1965) implica que éste es un proceso que requiere energía. La reducción de sulfato en *Euglena* así como en otros organismos

(Robbins y Lipmann, 1956), involucra la formación inicial de un intermediario de alta energía: el PAPS.

IV.4.1.2. Hierro

La velocidad de formación de clorofila se halla relacionada en forma lineal con la concentración intracelular de hierro.

Price y Carell (1964) estudiaron la acción del hierro sobre la conversión del coproporfirinógeno en proto IX, encontrando que en *Euglena* así como en otros microorganismos, el hierro es necesario para tal conversión (Carell y Price, 1965).

Según Karali y Price (1963) es muy poco probable que el hierro esté involucrado en dicho paso, ya que entonces la velocidad de formación de proto estaría disminuída en células deficientes en hierro, lo cual no ocurre en *E. gracilis*.

Cuando *E. gracilis* se hace crecer primero en presencia de intensidades bajas de luz y luego se la ilumina con altas intensidades, en un buffer no nutriente, las células sintetizan rápidamente clorofila, dependiendo esta formación del contenido de hierro de las mismas. Además, el crecimiento depende de la concentración de hierro intracelular, aunque Price y Carell (1964) encontraron que estos microorganismos podían sintetizar clorofila independientemente del desarrollo. Estos hechos sugirieron que el hierro requerido para el crecimiento estaría asociado a sitios distintos de aquellos en los cuales actuaría para la síntesis de clorofila.

Hay que destacar que la concentración de hierro requerida para dicha síntesis es mayor que la necesaria para el crecimiento celular.

IV.4.1.3. Zinc

Price y Vallee (1962) consideraron a *E. gracilis* como el organismo más apropiado para estudiar el metabolismo del zinc.

Esto se debería, según Wacker (1962 a, b) a que la *Euglena* reúne determinadas características: una nutrición mediante

la cual se puede controlar fácilmente el contenido del metal en el medio de crecimiento y en el interior de las células; una ruptura celular que permite el aislamiento y caracterización en forma rápida del material subcelular; un crecimiento y un metabolismo vigorosos con los cuales se intensifican las alteraciones producidas por la carencia del metal; una homogeneidad de las poblaciones celulares que permite interpretaciones claras de los cambios ocasionados por tal deficiencia y una gran facilidad de crecimiento en un medio definido simple.

La densidad celular final de poblaciones de *E. gracilis* Z resulta ser una función lineal de la concentración de zinc añadida inicialmente en el medio de crecimiento, en un rango de 0-15 $\mu\text{g/l}$ (Price y Vallee, 1962). Según estos autores, sólo el Zn limita el desarrollo de *E. gracilis*, respecto de los otros metales nutrientes.

Dado que las deshidrogenasas piridín-nucleótido dependientes son zinc-metaloenzimas, Millar y Price (1960) y Price y Millar (1962) analizaron la posibilidad de que bajos niveles de este metal limitaran el desarrollo por reducción en la respiración. Sin embargo, hallaron que el consumo de oxígeno, en condiciones deficientes de Zn, era lo suficientemente elevado como para obtener un crecimiento aún mayor que el observado. Además, la velocidad de oxidación del etanol determinada en deficiencia de zinc, no explicaba el cese del crecimiento celular. Así, llegaron a la conclusión de que estas deshidrogenasas se encontrarían presentes en concentraciones relativamente elevadas aún en células carentes de este metal.

Sin embargo, Price (1961) demostró que la actividad de la enzima D-lactato deshidrogenasa se hallaba disminuida en *E. gracilis* Z crecida en un medio zinc-deficiente. Además de una gran reducción del crecimiento, según lo demostrado por Price y Vallee (1962), Wacker (1962 a, b) encontró que la carencia de este metal producía también grandes cambios en el contenido de proteínas y ácidos nucleicos debido a una alteración en la síntesis de los mismos sugerida por un aumento de la cantidad de aminoácidos y una disminución del RNA.

Según Wacker (1962 a, b) estos resultados permitirían postular que los efectos observados en el metabolismo de las proteínas y ácidos nucleicos, son una consecuencia directa de la de

ficiencia de zinc en el RNA de estos microorganismos. Dado que este metal es un componente funcional de numerosas enzimas, es posible que su ausencia provoque algún problema enzimático desconocido, en la síntesis de un compuesto relacionado con el proceso de formación de proteínas.

Además, se observó que los efectos ocasionados por la deficiencia de Zn no eran revertidos por el agregado de aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros nucleótidos, lo que sugeriría que dicho efecto no provenía primariamente de un defecto en la síntesis de estos precursores.

También la deficiencia de zinc produce una acumulación masiva de polifosfatos insolubles en ácidos, los cuales son sintetizados a partir de ATP. Así, el incremento de estos compuestos de alta energía en las células deficientes es una evidencia de que posiblemente estén compitiendo sistemas generadores de energía.

Mudd et al (1958) consideraron la acumulación de polifosfatos como una consecuencia específica de un bloqueo o inhibición en su utilización en la síntesis de RNA y proteínas.

Finalmente, Wacker (1962 b) sugirió que las lesiones producidas por una deficiencia de Zn, reflejaban la participación de este metal en el proceso de biosíntesis de proteínas a nivel de RNA.

Prosk y Donald (1971) observaron que la carencia de zinc en *E. gracilis* Z crecida en ausencia de luz, daba origen a la desaparición de los ribosomas citoplasmáticos. Estos autores postularon que estaría involucrado un proceso de desintegración relacionado con el bajo contenido de zinc en los ribosomas ya que su reaparición requería la adición del metal. Prosk y Donald (1971) consideraron que una adecuada cantidad de Zn era esencial para mantener la estructura normal de los ribosomas citoplasmáticos.

IV.4.1.4. Magnesio

La deficiencia de magnesio en numerosas algas fotosintéticas incluyendo *E. gracilis* produce un aumento de tamaño debido al cese de la división celular y una continuación del creci-

miento citoplasmático.

Wolken et al (1955) demostraron que células de *Euglena* adoptaban una forma esférica (8-10 μ) y un aspecto no coloreado, luego de tres transferencias en medios deficientes de magnesio.

Dubash y Rege (1967) estudiaron el efecto de esta carencia sobre el crecimiento de células de *E. gracilis*, en presencia y ausencia de luz y en un medio suplementado con glucosa 1%. Así, observaron que las células crecidas a la luz tenían un tamaño mayor y una velocidad de multiplicación menor, tendiendo a depositarse en el fondo y habiendo perdido la motilidad.

Las células crecidas en oscuridad no mostraban aparentemente una dependencia con la disponibilidad de Mg; sin embargo, presentaban considerables cambios cuando eran privadas de dicha fuente por tiempo prolongado. Así, perdieron para siempre su capacidad de regenerar cloroplastos, aunque luego se las transfiriera a un medio con Mg, en presencia de luz. A pesar de que en la oscuridad la glucosa puede subsanar la deficiencia de Mg y de fotosíntesis y en la luz puede actuar sinérgicamente con dicho proceso, no puede reemplazarla completamente mientras las células posean cloroplastos capaces de sintetizar clorofila.

El blanqueamiento permanente de *Euglena* por privación de Mg parecería ser aparentemente un caso indirecto de mutación citoplasmática. Según Dubash y Rege (1967), la irreversibilidad de este efecto sugeriría que en estas células el DNA satélite (presente en aquellas capaces de formar cloroplastos y ausente en las que carecen de tal propiedad) ya no existe o no sería funcionalmente activo.

Los autores concluyeron que el Mg cumpliría un rol importante en la conservación de la capacidad potencial para sintetizar clorofila. Así, células adaptadas a crecer en la oscuridad durante 6 años, en un medio con Mg, aún poseen trazas significativas de clorofila y retienen la habilidad para resintetizarla, si son expuestas a la luz. Sin duda, el Mg está asociado con la conservación de la estructura del proplástido. Zielinski y Price (1978) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de Mg sobre las relaciones existentes entre este metal, el crecimiento, la síntesis proteica y el contenido de polisomas citoplasmáticos en *E. gracilis* Z. Observaron que tanto la síntesis de proteínas como la de clorofila seguían una cinética exponen-

cial, a todos los valores de concentraciones empleadas. Además, la velocidad de síntesis de clorofila excedía siempre la formación de proteínas y las células más deficientes en Mg contenían, proporcionalmente, más clorofila que las no deficientes.

En cuanto a los polisomas citoplasmáticos aislados de células deficientes en Mg presentaban las mismas características de los provenientes de las células controles.

Por lo tanto, los autores concluyeron que la disminución de la velocidad de la síntesis proteica precede y es posiblemente la causa de la disminución de la velocidad de síntesis de clorofila pero que el mecanismo de tal efecto no está aún esclarecido.

IV.4.1.5. Nitrógeno

Estudios preliminares indicaron que en *Euglena*, las sales de amonio eran mejores fuentes de nitrógeno que las de nitrato.

Huzisige y Satoh (1960) informaron que en presencia de nitrito no se mantenía la multiplicación celular de *E. gracilis* var. *bacilliaris*; por otro lado, las células crecidas con amonio como fuente de nitrógeno presentaban elevadas concentraciones de nitrito reductasa. Durante estas reacciones no se acumulaba ni hidroxilamina ni amonio, por lo tanto los autores dedujeron que la reducción del nitrito era de tipo asimilativo. La velocidad de esta reducción se aceleraba en presencia de luz o por adición de dadores de protones siendo el malato el donador más efectivo. En numerosos sistemas celulares la reducción de nitrato y nitrito se halla relacionada con la maquinaria respiratoria (Nason, 1962) y con el aparato fotoquímico (Evans y Nason, 1953); por lo tanto, se sugirió que la utilización de nitrato y nitrito en *Euglena* estaría involucrada en otros procesos además del de multiplicación celular.

Frecuentemente, se añaden aminoácidos al medio de cultivo como fuente de carbono. Buetow (1966) demostró que algunos de éstos servían también como fuente de nitrógeno para ciertas cepas de *E. gracilis*. Considerando el crecimiento celular, los aminoácidos más apropiados son los alifáticos neutros y los dicarboxílicos, con sus amidas. No sirven como tales los aromáticos, los aminoácidos básicos y los que contienen grupos amino

secundarios o azufre.

Es de interés hacer notar que si bien algunos aminoácidos no se utilizan como fuente de nitrógeno, pueden penetrar perfectamente las células de *Euglena*.

IV.4.1.6. Fósforo

Albaum et al (1950) identificaron cerca de una docena de compuestos fosforados en *Euglena*, incluyendo algunos intermedios fosforilados de la glicólisis así como también metafosfatos y pirofosfatos inorgánicos.

Además, se detectaron gránulos de polifosfatos (volutina) distribuidos en todo el citoplasma. Contrariamente a lo hallado en otras algas, Smillie y Krotkov (1960) encontraron niveles elevados de polifosfatos en *E. gracilis* Z cuando la síntesis de los plástidos se hallaba reprimida.

El contenido total de fósforo en *Euglena* varía también con las condiciones de crecimiento. Así, en células blanqueadas con estreptomycin, crecidas a la luz y con una fuente orgánica de carbono, el contenido de fósforo era el doble, atribuyéndose la diferencia a la mayor cantidad de fósforo soluble en ácido y de polifosfatos. Smillie y Krotkov (1960) sugirieron que estos resultados se debían a la presencia de bajos niveles de síntesis de RNA en células blanqueadas, ya que el RNA contiene la mayor fracción de fósforo total en *Euglena*, junto con los lípidos.

Hay que hacer notar que el contenido total de fósforo no está en general, co-relacionado con la velocidad de crecimiento, si se la expresa en función del peso seco. Como éste también varía con las condiciones de desarrollo del cultivo, cuando los datos son expresados por célula (en referencia al contenido de DNA) se observan diferencias menores en la cantidad de fósforo total en células crecidas en distintas condiciones experimentales (luz, oscuridad, crecimiento autotrófico, heterotrófico, etc.).

Según Blum (1965) y Price (1962) la privación de fosfato induce la síntesis de la fosfatasa ácida, localizada en la superficie celular. Los resultados obtenidos por Blum (1966) sugirieron que la incorporación de fosfato era un proceso de trans

porte activo involucrando a la fosfatasa inducible. Además, según este autor, se pueden hallar las condiciones experimentales que inhiban la incorporación de fosfato sin interferir con la actividad de la fosfatasa; en cambio no pudo demostrarse lo contrario, es decir que la inhibición de la enzima estaba siempre relacionada con una inhibición en la incorporación de fosfato.

Buetow y Schuit (1968) hallaron que células de *Euglena* transferidas de un medio conteniendo fósforo a uno deficiente en este compuesto, eran capaces de sobrevivir de 6 a 7 días. Esta supervivencia se atribuyó a una habilidad para concentrar fósforo, que luego sería empleado en condiciones de privación del mismo. Estos autores encontraron también que células blanqueadas de *E. gracilis* podían inducir una fosfatasa ácida no específica en estas condiciones, lo cual permitiría obtener fósforo por hidrólisis de compuestos orgánicos de fosfato intra y extracelulares.

14.4.1.7. Dióxido de Carbono

Algunas especies de *Euglena* pueden fijar CO_2 heterotróficamente siendo ésta un requerimiento que favorece la división celular.

Heinrich (1966) observó que *E. gracilis* Z crecida con glucosa o acetato permanecía en fase logarítmica por un período de tiempo más prolongado cuando se enriquecía el aire con CO_2 5%, debiéndose parte de este efecto a la acción buffer del CO_2 .

Cultivos heterotróficos de *E. gracilis* crecidos con glucosa fijaban el CO_2 aproximadamente dos veces más rápido que células crecidas con acetato como fuente de carbono, a pesar de que la actividad de la enzima málica era considerablemente mayor en el segundo caso.

Además se observaron diferencias cualitativas en los primeros productos de la fijación heterotrófica de CO_2 , según las células hayan crecido en un medio que contuviera una u otra fuente de carbono. Si ésta es acetato, la fijación es menos importante como medio de regeneración de intermediarios de Krebs convertidos en aminoácidos, etc. ya que por el by-pass del glioxilato (inducido por acetato) se llega al mismo resultado.

IV.4.1.8. Oxígeno

Los requerimientos de oxígeno para el crecimiento óptimo de *Euglena* dependen de la fuente de carbono empleada en el medio de cultivo. Así, si las células se hacen crecer en presencia de acetato o etanol, consumen de tres a cinco veces más oxígeno durante la fase logarítmica, que si se utiliza glucosa como fuente de carbono, a pesar de que ésta mantiene la misma velocidad de crecimiento y las células presentan idéntico perfil bioquímico.

IV.4.1.9. Otros requerimientos inorgánicos

A pesar de que *Euglena* presenta requerimientos de trazas de otros nutrientes inorgánicos, aún no se han realizado estudios sistemáticos de sus niveles mínimos.

Mientras que en algunos medios se necesitan agregar cobre, molibdato, manganeso, boro, etc. , en otros no es necesario añadirlos ya que el requerimiento de estos elementos se encuentra cubierto por las trazas contaminantes de los mismos en otras sales.

Knezek y Maier (1971) estudiaron la influencia de la cantidad y de la fuente de hierro, agregados al medio de crecimiento de *E. gracilis*, sobre el contenido en Fe, Cu, Mn y N, durante el desarrollo celular.

Estos autores hallaron que el uso del quelato férrico del ácido etilendiaminodil o hidroxifenilacético (Fe-E-DDHA) promovía la división celular mientras que el empleo de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ inducía un agrandamiento celular luego de 7 días. En el primer caso se encontró un mayor contenido de nitrógeno. Además observaron que el SO_4Fe inhibía la incorporación de Mn en mayor grado que el quelato. En cuanto al contenido de Cu, éste estaba directamente relacionado con el tamaño celular, siendo superior en las células más grandes.

La incorporación de hierro era semejante para ambas fuentes del metal, cuando se agregaba en cantidades pequeñas (1 ppm). Cuando se trabajaba a concentraciones mayores (10 ppm), el contenido de hierro intracelular era superior a partir de la fuente inorgánica.

Nakano et al (1978) estudiaron las actividades biológicas del Zn y del Cd en *E. gracilis* Z crecida en medios normales o deficientes en Zn.

El Cd no está involucrado en el metabolismo celular normal de *E. gracilis* crecida en medios deficientes en Zn, ni tampoco lo reemplaza.

El antagonismo entre estos dos metales se evidencia en el crecimiento, el tamaño celular y en la incorporación del Cd en las células. Su toxicidad es mayor en los medios deficientes en Zn que en los normales, dado que penetra mucho más fácilmente. Así, se observó que dicha toxicidad era reducida por el Zn, dando como resultado un menor contenido intracelular de Cd.

Los efectos tóxicos del Cd se evidencian morfológicamente, produciendo inhibición de la fisión celular y originando células anormales.

Algunas de las alteraciones producidas por este metal se asemejan a las que se encuentran en medios deficientes en vitamina B₁₂. Sin embargo, la diferencia entre ambos es que el Cd no inhibe la síntesis de DNA en *E. gracilis*.

IV.4.2. Vitamínicos

IV.4.2.1. Vitamina B₁

La tiamina, que interviene en la decarboxilación de los α -cetoácidos como pirofosfato de tiamina, no es un requerimiento para todas las especies de *Euglena*.

Cramer y Myers (1952) encontraron que la vitamina B₁ era necesaria para el crecimiento de *E. gracilis* var. *bacillaris* y para la cepa *E. vischer*, fracasando todos los intentos de reemplazarla por distintos aminoácidos y ácidos orgánicos.

IV.4.2.2. Vitamina B₁₂

Este compuesto es un requerimiento esencial para el crecimiento de numerosos microorganismos, incluyendo *E. gracilis* Z, siendo esta cepa la más sensible a su deficiencia.

La vitamina B₁₂ o cianocobalamina puede ser autoclavada a 120 °C, con la pérdida de sólo un 1-2% de actividad. Es sensi

ble a la luz; por iluminación se libera cianuro y se produce hidroxicobalamina; este efecto se revierte en la oscuridad. Una exposición prolongada produce sin embargo, un daño irreversible.

La forma funcionalmente activa en muchas reacciones mediadas por la vitamina B₁₂ es la coenzima 5'-deoxiadenosil cobalamina, la cual es extremadamente sensible a la luz (Smith, 1965).

Existen numerosos análogos de la vitamina B₁₂ que pueden reemplazarla y mantener el crecimiento de *Euglena*. Esta carencia de especificidad parecería indicar que no todas las enzimas requeridas para su síntesis faltan en este microorganismo.

Muto (1957) demostró que homogenatos de *Euglena* pueden sintetizar vit B₁₂ a partir de una cobalto-porfirina y de 5,6-dimetilbenzimidazol. Sin embargo, Nathan y Funk (1962) encontraron que el factor B (vit B₁₂ sin el nucleótido) más benzimidazol o 5-metilbenzimidazol no podían sustituir a la vit B₁₂ durante el crecimiento de *Euglena*.

La vit B₁₂ participa en una amplia cantidad de reacciones, incluyendo el metabolismo de algunos aminoácidos (Arnstein y Neuberger, 1953; Guest, 1959), ácidos grasos (Stern y Fridman, 1960) y nucleósidos (Downing y Schweigert, 1956).

Epstein et al (1962) encontraron que la velocidad de crecimiento de *E. gracilis* era directamente proporcional a la concentración de vit B₁₂, mientras que el tamaño celular estaba inversamente relacionado con la misma. Así, una deficiencia severa de vit B₁₂ producía células gigantes y tiempos de generación prolongados, hallándose la velocidad de multiplicación disminuída. Aparentemente, estos efectos eran el resultado de una síntesis continua de RNA y proteínas sin replicación celular y mitosis adecuadas.

Epstein y Timmis (1963) analizaron aproximadamente 300 compuestos "anti-vit B₁₂", encontrando un antagonismo competitivo de vit B₁₂ entre estructuras variadas incluyendo purinas, pteridinas y nicotinamida, a pesar de que ninguna de ellas tenía una analogía estructural con la cianocobalamina.

Si bien *Euglena* puede crecer perfectamente en presencia de una amplia variedad de análogos de la vit B₁₂, los cuales difieren en la parte benzoimidazólica, los benzoimidazoles de por sí son tóxicos (Epstein, 1960; Funk y Nathan, 1958).

Soldo (1955) halló que concentraciones subóptimas de vit B₁₂ producían niveles reducidos de RNA y DNA en células de *Euglena*, sin observarse aparentemente una acumulación de paramilon o carotenoides, comparadas con células normales.

Venkataraman et al (1965) demostraron que la vit B₁₂ estimulaba la incorporación de (¹⁴C)formiato en RNA, DNA, proteínas, serina, metionina y timina. Los autores interpretaron estos resultados como una indicación de que la vit B₁₂ cumpliría un rol más importante en la reducción de ribótidos a deoxiribótidos que en la reducción de formiato a metil-timina.

En 1969, Carell demostró que cuando *E. gracilis* Z crecía en un medio deficiente de vit B₁₂, la cantidad de proteína y de clorofila por célula aumentaba a medida que disminuía la concentración de vit B₁₂. El incremento en las proteínas celulares era proporcional al aumento en el número de cloroplastos por célula. Sin embargo, esta replicación de las organelas bajo condiciones deficientes de vit B₁₂ no estaba acompañada de una división celular o nuclear. Así, este autor concluyó que la replicación de los cloroplastos de *E. gracilis* era un hecho independiente de la división celular y nuclear, por lo menos bajo esas condiciones experimentales.

Sin embargo, Bré y Lefort-Tran (1974) llegaron a resultados que difieren de los obtenidos por Carell (1969). Estos investigadores hallaron que la carencia de vit B₁₂ en *E. gracilis* Z, crecida con lactato, inducía un incremento de tamaño celular, del número de mitocondrias y del de cloroplastos pero observaron que la evolución de la relación proteínas cloroplásticas a proteínas celulares permitía pensar que, a pesar del cese de las divisiones, el control nuclear continuaba ejerciéndose sobre la evolución de la masa cloroplástica.

Sherata y Kempner (1978) analizaron los cambios secuenciales en el volumen celular de *E. gracilis* durante la privación de vit B₁₂ y observaron que además de un aumento significativo en la forma de las células, existía una aparición progresiva de dos clases de formas celulares. Alrededor de las 100 horas de privación, comenzaba a desarrollarse un segundo tipo de células más grandes. Esta distribución bimodal es típica de los últimos estadios en un ayuno de vit B₁₂.

Los autores observaron que en un cultivo deficiente en vit B₁₂, el incremento en el volumen total de material celular era mucho mayor que la velocidad con la cual aumentaba el número de células. Evidentemente existía una inhibición parcial en un paso previo a la división celular. Así, tendría que estar bloqueada la síntesis de DNA ya que de lo contrario se formarían células binucleadas. Los autores encontraron solamente un 1% de estas células, y concluyeron, que esta inhibición diferencial de la síntesis de DNA apoyaba la hipótesis de que la vit B₁₂ estaría involucrada en uno de los últimos pasos de la formación del DNA, lo cual inhibiría la división celular.

Desde hace varios años, se emplea a *E. gracilis* para dosar la concentración de vit B₁₂ en suero, por cuanto esta vitamina es un requerimiento esencial para su crecimiento. De todas las cepas, la más apropiada es *E. gracilis* Z debido a que es la más sensible a la deficiencia en vit B₁₂.

Los resultados de este ensayo empleando *E. gracilis* se ven afectados por la presencia de agentes antimicrobianos en el suero (Lie et al, 1969). Por ejemplo, las sulfonamidas inhiben el crecimiento de *Euglena*, en concentraciones accesibles en el suero durante el tratamiento (como veremos más adelante), mientras que la estreptomycin, clortetraciclina, eritromicina, kanamicina y los nitrofuranos son agentes blanqueantes, aunque para ello se requieren concentraciones mayores que las correspondientes al pico normal de los niveles sanguíneos terapéuticos. Por supuesto, la presencia de estos compuestos inhibidores y/o blanqueantes, darán resultados más bajos de vit B₁₂ sérica. Se pueden evitar estos errores comprobando la existencia de estas sustancias, por observación microscópica de los cultivos y recuento del número de células de *Euglena* (Lie et al, 1969).

Benson (1972) informó acerca de los valores de vit B₁₂ obtenidos utilizando *E. gracilis*. Estos pueden ser erróneamente más altos o más bajos que los reales debido a la presencia de diferentes iones en los buffers empleados en las cromatografías de las distintas fracciones séricas. Esto se debe a que el crecimiento de este microorganismo es mayor cuando el medio contiene determinada cantidad de sales, pero concentraciones superiores lo inhiben.

IV.4.3. Fuentes exógenas de carbono

Entre las distintas cepas de *E. gracilis* existen grandes diferencias en su capacidad de emplear las fuentes exógenas de carbono para su crecimiento. Algunas son fotótrofas obligadas, mientras que otras pueden crecer en la oscuridad sólo en presencia de una cantidad limitada de fuentes de carbono. Existen euglenoides flagelados que se desarrollan heterotróficamente utilizando una gran variedad de fuentes de carbono.

Euglena gracilis Z y *E. gracilis* var. *bacillaris* son cepas que muestran un fuerte crecimiento heterotrófico pudiendo emplear una cantidad amplia de fuentes de carbono: glucosa, fructosa, piruvato, succinato, fumarato, malato, etanol, acetato, butirato y glutarato.

IV.5. Influencia de Euglena sobre el medio ambiente

IV.5.1. Variaciones en el pH

A medida que *Euglena* va consumiendo los distintos componentes del medio de cultivo, necesarios para su desarrollo, el pH del medio se va modificando. Por ejemplo, el crecimiento heterotrófico de *E. gracilis* Z en un medio de pH inicial de 5,5, conteniendo glucosa como única fuente de carbono, da origen a un pH final igual o menor que 3 (Figura 4.1.). El buffer empleado en esta experiencia es el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, utilizándose la primera sal como fuente de nitrógeno; la variación encontrada en el pH final, se debe a la remoción del amonio.

Si en cambio, se reemplaza la glucosa por acetato como fuente de carbono se obtiene un aumento en el pH durante el crecimiento celular (Figura 4.1.). En este caso la utilización del amonio se halla compensada por la del acetato.

E. gracilis crece muy poco en medios alcalinos, siendo los más apropiados los neutros o ligeramente ácidos; así si se emplea acetato de sodio como fuente de carbono se deben tomar todas las precauciones necesarias para mantener el pH en el valor adecuado.

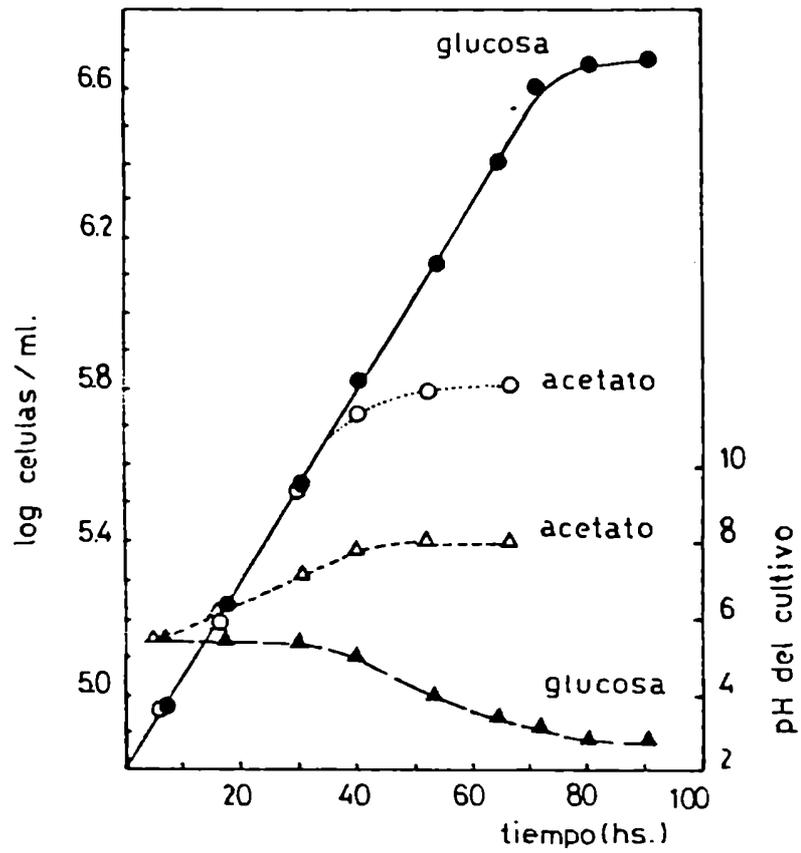


FIGURA 4.1.: Variaciones en el pH del medio durante el crecimiento de *E. gracilis* Z en cultivos aeróbicos. Las células se hicieron crecer heterotróficamente a 30 °C con glucosa o acetato como única fuente de carbono (Cook y Heinrich, 1965).
 log células/ml (●), (○)
 pH del cultivo (▲), (△)

IV.5.2. Agotamiento de nutrientes

En general, la velocidad a la cual los nutrientes son consumidos es proporcional a la velocidad de incremento de la masa celular.

Además, resulta complicado determinar cuál es el nutriente limitante a medida que el cultivo entra en fase estacionaria, suponiendo que no existen otros efectos, como ser cambios en el pH del medio.

Tampoco puede descartarse la posibilidad de que haya uno o más productos de excreción que inhiban el crecimiento o la división celular (Mc Calla, 1963).

IV.6. Efectos del medio ambiente sobre *Euglena*

IV.6.1. pH inicial

Se han realizado numerosos estudios acerca de los efectos de ciertas variables ambientales, que alteran directamente el crecimiento y la fisiología de *Euglena*.

Uno de los temas más analizados es el pH inicial empleado. Como ya se mencionó en el ítem IV.5.1., *Euglena* crece mejor en medios ácidos. El rango de valores de pH's que posibilitan un crecimiento óptimo depende principalmente de la composición del medio y de la fuente exógena de carbono.

Además hay que hacer notar que no siempre coincide el pH correspondiente al consumo óptimo de O_2 con el que origina un crecimiento óptimo. Así, en algunos casos la respiración procede a una acidez tal que no permite el desarrollo (por ejemplo, malato a pH 3,5), mientras que en otros, la respiración es despreciable a valores de pH que producen una velocidad de crecimiento óptima (por ejemplo, succinato a pH 7).

Cook y Heinrich (1965) estudiaron el efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento de *E. gracilis* 2 utilizando acetato o glucosa como única fuente de carbono. Para el caso de la glucosa, el pH óptimo de crecimiento era de 3 a 4 mientras que el tiempo de generación se incrementaba significativamente a pH's mayores que 7.

Cuando se empleó acetato como fuente de carbono se observaron muy pocas variaciones en el tiempo de generación, al utilizar valores iniciales de pH entre 6 y 9. Además la densidad máxima obtenida era mucho menor cuando el pH inicial era superior a 7 (Cook y Heinrich, 1965). Estos autores observaron también que la densidad máxima disminuía al aumentar el pH inicial de los cultivos, hecho que adjudicaron a un incremento posterior del pH durante el crecimiento, como resultado del consumo de acetato.

El crecimiento empleando etanol como fuente de carbono, da origen a un cultivo mucho más denso que el obtenido a partir de acetato; sin embargo, las células presentan generalmente el mismo perfil bioquímico y fisiológico (Buetow y Padilla, 1963).

IV.6.2. Fuente exógena de carbono

Este tema ya fue tratado en la sección IV.4.3. Como ya se mencionó, la fuente exógena de carbono tiene una gran influencia sobre el crecimiento, la fisiología respiratoria y el metabolismo de *E. gracilis*.

Levedahl y Wilson (1965) estudiaron el crecimiento celular en función del agregado de succinato, acetato o etanol como fuentes de carbono. Estos autores observaron que la población celular final era proporcional a la concentración inicial de dichos compuestos, desde 1,0 hasta 5,0 mM a 24 °C, como sería de esperar si el crecimiento estuviese limitado por la concentración de la fuente de carbono.

El etanol es el sustrato más efectivo para el desarrollo de *E. gracilis* considerando el peso seco del material formado; éste disminuye a la mitad y al tercio cuando se emplean acetato y succinato respectivamente.

Sin embargo, la velocidad de división celular era mayor con acetato que con etanol o succinato.

La fuente de carbono agregada al medio de cultivo tiene también un efecto muy importante sobre la fisiología respiratoria de *E. gracilis*. Así, los compuestos formados por dos átomos de carbono (etanol y acetato) originan niveles muy elevados de consumo de oxígeno mientras que los intermediarios del ciclo de

Krebs (Danforth, 1953) y la glucosa (Cook y Heinrich, 1965), no estimulan la respiración, aunque pueden mantener las velocidades de crecimiento aproximadamente iguales. Según Cook (1965) la respuesta respiratoria al acetato es "adaptativa" y en células previamente crecidas con nutrición autotrófica, se necesitan aproximadamente cinco generaciones para lograr una adaptación completa.

Cook y Heinrich (1965) observaron diferencias importantes entre células crecidas con glucosa y con acetato, especialmente en su fisiología, actividad respiratoria, densidad máxima celular y contenido en RNA. Estos autores hallaron que tanto la glucosa como el acetato mantenían las mismas velocidades de crecimiento considerando la masa total y la síntesis de en *E. gracilis* Z crecida a la oscuridad y utilizando de pH y la concentración de sustrato óptimos. Sin embargo, la glucosa producía una densidad de población 10 veces mayor que el acetato pero no estimulaba la respiración por encima de los niveles endógenos. En cuanto a la presencia de acetato como fuente de carbono, el consumo de oxígeno era cuatro veces mayor que el endógeno y el contenido de RNA era un 50% mayor con respecto a *Euglena* crecida con glucosa.

Cook y Heinrich (1965) observaron también que células adaptadas a un crecimiento con glucosa, el etanol y el acetato no tenían efecto sobre la respiración. Esta ausencia de estimulación no era debido a un fenómeno de permeabilidad ya que el etanol y el acetato podían penetrar libremente en la célula. Según estos autores se requería un período de adaptación en presencia de acetato, antes que la respiración de células adaptadas a crecer con glucosa fuera estimulada por el acetato.

Buetow (1967) empleó células de *Euglena gracilis* Z para estudiar el efecto del acetato sobre la síntesis de clorofila y observó que el acetato agregado en exceso al medio de cultivo inhibía la formación de dicho pigmento y producía un efecto similar en la síntesis de paramilon. Este efecto sería probablemente adaptativo ya que las células deben utilizar el material de reserva para la síntesis de cloroplastos y para el metabolismo basal, cuando el acetato externo haya sido consumido. Esta conclusión se basa en el hecho de que el carbono fijado en la fotosíntesis se emplea casi exclusivamente para la

teica, cuando se halla presente el acetato en el medio de cultivo, mientras que el acetato incorporado a partir de éste se utiliza especialmente para la síntesis de lípidos y polisacáridos.

La inhibición máxima de la síntesis de clorofila es de aproximadamente un 75% a concentraciones de acetato iguales o mayores que 47,5 mM. Esto parecería indicar que existe un mecanismo de control que previene la represión total de la síntesis del pigmento por el acetato. Según Buetow (1967) el acetato puede reprimir ciertas enzimas relacionadas con el proceso final de maduración de los cloroplastos.

El ciclo del glioxilato está muy relacionado con la utilización de acetato o etanol en *E. gracilis* (Cook y Carver, 1966; Heinrich y Cook, 1966). Esta secuencia, en la cual el isocitrato se metaboliza a succinato y glioxilato, seguida de la condensación del glioxilato con acetil-CoA para formar malato, es anaeróbica (Figura 4.2.).

Hay que hacer notar que la actividad de la malato deshidrogenasa, isoenzima que requiere O_2 en *Euglena*, común a ambos ciclos: el del glioxilato y el de los ácidos tricarbónicos, es superior en células crecidas con acetato que con glucosa o con desarrollo autotrófico, pero las diferencias no permiten explicar el consumo total de O_2 en células de *Euglena* crecidas en presencia de acetato. Por otro lado el acetato no aumenta la actividad de la isocitrato deshidrogenasa (y posiblemente de ninguna de las enzimas del ciclo TCA); una situación anómala aparece cuando al inducirse una serie de reacciones anaeróbicas del glioxilato, aumenta el consumo de O_2 , sin que se produzca un incremento concomitante en la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs.

Cook y Carver (1966) y Heinrich y Cook (1966) sugirieron que el O_2 estaría involucrado en determinadas reacciones (desconocidas) directamente relacionadas con el ciclo del glioxilato, en células de *Euglena* crecidas con acetato, además de servir como aceptor de electrones en la cadena respiratoria.

Es interesante observar que el propionato y el butirato, los cuales se condensan con el glioxilato en forma similar que el acetato (Rabin et al, 1965) también estimulan el consumo de O_2 en *Euglena* (Danforth, 1953).

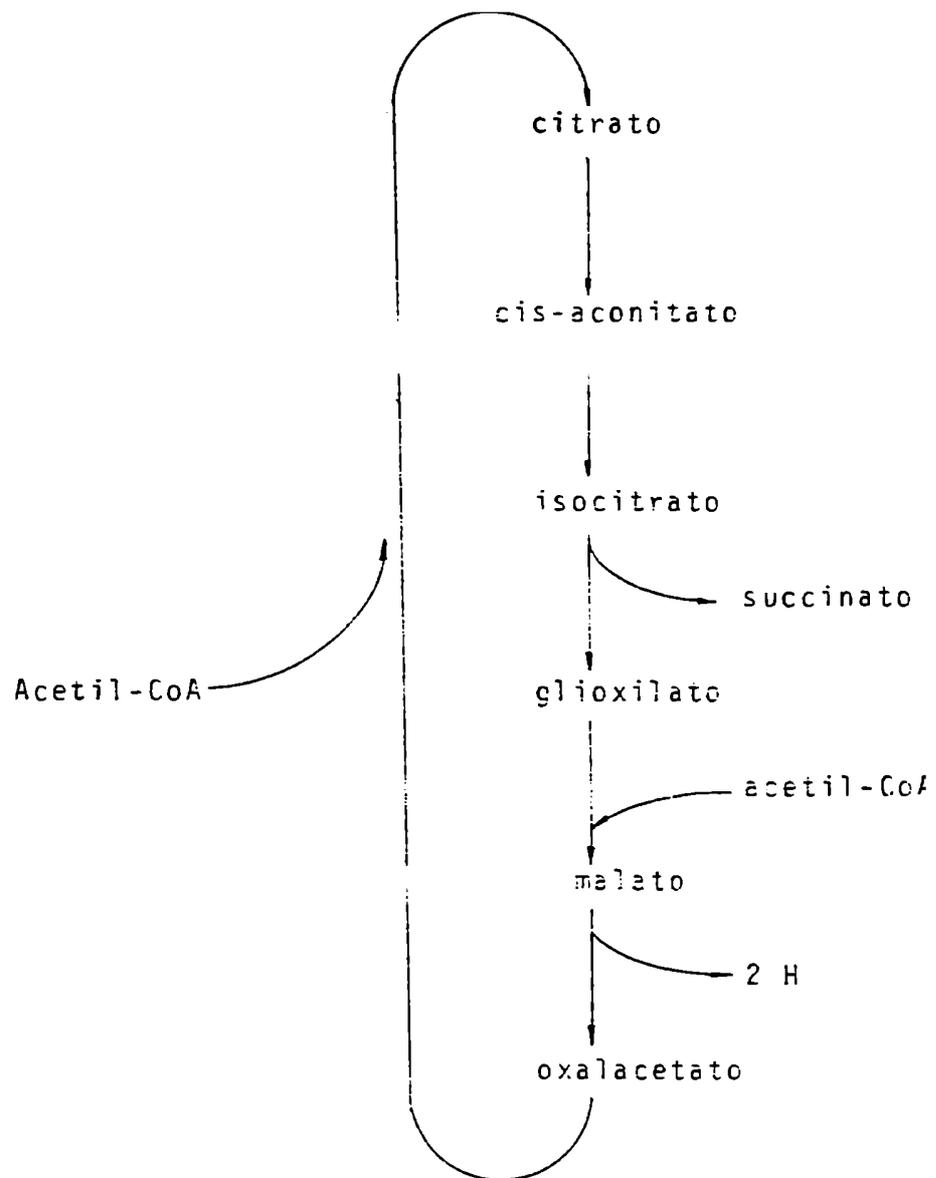


FIGURA 4.2.: Ciclo del glioxilato

IV.6.3. Efecto de la luz

IV.6.3.1. Crecimiento fototrófico

La velocidad de crecimiento de *E. gracilis* Z en cultivos estrictamente fototróficos es óptima en el rango de 400-1200 ft-c (Cook, 1963).

Las intensidades de luz menores que 400 ft-c mantienen una velocidad de crecimiento reducida mientras que las superiores a 3000 ft-c son ligeramente inhibitorias.

El contenido de clorofila en las células es inversamente proporcional a la intensidad luminosa. Curiosamente, el volumen celular se incrementa a bajas intensidades (65 ft-c) a pesar de que la masa se halla disminuída. Esta adaptación a bajas intensidades de luz, con aumento de la concentración de clorofila y del volumen celular originado por dispersión de los cloroplastos, tiene como finalidad aumentar la cantidad de luz que puede ser absorbida, logrando así una velocidad óptima de crecimiento en esa intensidad luminosa reducida. Sin embargo, a pesar del incremento en la capacidad fotosintética, las condiciones no son las apropiadas para mantener velocidades biosintéticas óptimas.

La masa celular disminuye por debajo de 1200 ft-c, en forma proporcional a la velocidad de fotosíntesis observada (Cook, 1963). La mayoría de las variaciones en la masa de las células, con la intensidad luminosa, se deben a los grados variables de acumulación de paramylon. El contenido proteico y de RNA permanecen constantes, aún a 120 ft-c, mientras que los lípidos aumentan ligeramente, lo cual es debido a que la mayoría de ellos están asociados al aparato fotosintético (Figura 4.3.).

Ciertas especies de *Euglena* (por ejemplo, *E. pisciformis*) son fotótrofas obligadas (Lwoff, 1951) mientras que algunas cepas de *E. gracilis* (por ejemplo *E. gracilis Vischer*) pueden crecer en oscuridad con un número restringido de fuentes de carbono (Cramer y Myers, 1952).

En aquellas cepas de *E. gracilis* que muestran un marcado crecimiento heterotrófico, la presencia de acetato durante el desarrollo a la luz da origen a un modelo de fijación de CO₂ fuertemente alterado. Así, más del 90% del (¹⁴C)-bicarbonato fijado

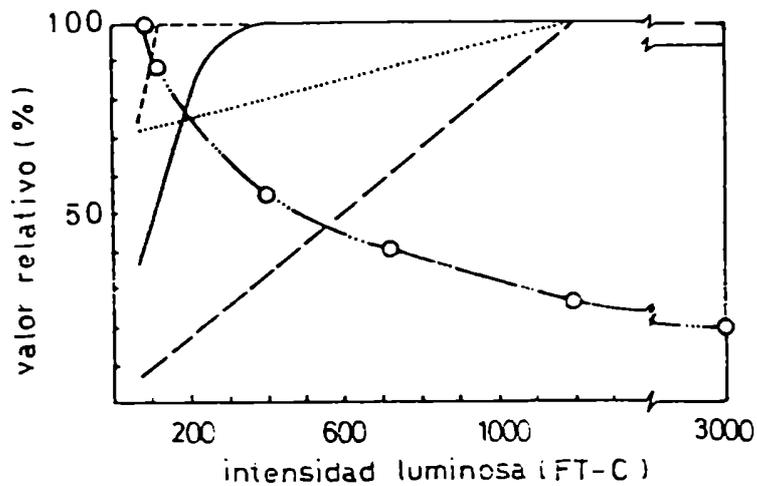


FIGURA 4.3.: Características del crecimiento logarítmico de *E. gracilis* Z a 25 °C, con nutrición fototrófica, en función de diferentes intensidades luminosas. Los valores del 100% en pg/célula corresponden a: masa total (.....) 820; proteína (----) 240; paramilon (---) 380 y clorofila (—○—) 33. La máxima velocidad de división (—) ($\ln 2/\text{tiempo generacional}$) fue de 0,065 (Cook, 1963).

por *E. gracilis* Z crecida en dichas condiciones, se incorpora a proteínas, mientras que en cultivos estrictamente autotróficos la marcación se halla distribuída en forma equitativa entre los lípidos y el paramilon (Cook, 1965).

Cuando las células crecen en presencia de luz y acetato radioactivo, la marca se incorpora casi totalmente en los mismos compuestos (lípidos y paramilon) y sólo un 6% en proteínas. Sin embargo, en cultivos estrictamente heterotróficos el 70% de la marcación se halla en las proteínas.

Estos resultados están de acuerdo con los datos de Russell y Gibbs (1966) quienes hallaron que el acetato inhibía numerosas enzimas del camino fotosintético en algas de crecimiento fototrófico obligado. Los mecanismos de control que afectan la utilización concomitante de la fotosíntesis y de las fuentes exógenas de carbono, no han sido aún estudiados en detalle.

IV.6.3.2. División celular

La luz visible inhibe la división celular (Cook, 1960). En cultivos autotróficos esta inhibición no es fácilmente detectable pero puede ser muy importante en células etioladas expuestas a la luz. En estas células con capacidad de enverdecimiento, la inhibición se supera luego de algunas generaciones, encontrándose esta recuperación asociada al desarrollo del aparato fotosintético.

Aparentemente, la luz destruiría o prevendría la formación de algún intermediario necesario para la división celular de *Euglena*. Este efecto es menos severo en las células verdes, lo cual podría deberse a una protección ejercida por los pigmentos o a que los caminos biosintéticos afectados serían menos importantes durante el crecimiento autotrófico.

IV.6.3.3. Formación de cloroplastos

El efecto más importante de la luz sobre *Euglena* crecida en la oscuridad, es la inducción de la síntesis de clorofila y del desarrollo de los cloroplastos. Asociada con este proceso se halla la síntesis de gran cantidad de RNA y proteínas, corres

pondientes a los plástidos (Brawerman et al, 1962).

La luz estimula también la síntesis del DNA cloroplástico y el turn-over del DNA citoplasmático (Cook, 1968).

Schiff (1973, 1974, 1975) y Bingham y Schiff (1976) han demostrado que en *E. gracilis* var. *bacillaris* crecida continuamente a la luz, existen 10 cloroplastos los cuales se dividen de tal manera que se mantiene el número en forma constante, de una generación a otra. Cuando esta cepa crece en la oscuridad, los plástidos se convierten en proplástidos y su número se conserva constante durante la división celular.

Si las células crecidas en la oscuridad se colocan en un medio sin los nutrientes esenciales para el desarrollo, la división celular cesa; por exposición de estos cultivos a la luz, los proplástidos de estas células en reposo se transforman en verdaderos cloroplastos en un período de 72 a 96 horas, constituyendo este sistema un excelente medio para estudiar el desarrollo de estas organelas.

IV.6.4. Efecto de la temperatura

Una de las propiedades más afectadas por cambios de temperatura es la velocidad de división celular.

Aquellas especies de *Euglena* que muestran un fuerte crecimiento heterotrófico parecen tolerar mejor las altas temperaturas (Baker et al, 1955), estando relacionada con esta característica la capacidad de utilizar una gran cantidad de sustratos y una mayor tolerancia, en contraposición con las llamadas cepas de "baja temperatura".

Buetow (1962) encontró que altas temperaturas favorecían la división celular mientras que las bajas incrementaban el crecimiento protoplasmático.

En contraste con otros organismos, el consumo de O_2 en *Euglena* crecida en presencia de acetato, aumentaba linealmente con la temperatura, en lugar de hacerlo exponencialmente (Buetow, 1963), mientras que el nivel respiratorio endógeno permanecía constante. Así, el autor concluyó que la temperatura podía "distinguir" entre el consumo endógeno de O_2 y el estimulado por el acetato. Sería interesante entonces conocer cómo afecta la

temperatura a la respiración en *Euglena* crecida heterotróficamente con sustratos que no estimulan el consumo de O_2 . Cook y Heinrich (1965) interpretaron estos hechos en términos de dos vías principales para la utilización del O_2 : una, como aceptor electrónico en la cadena de citocromos y otra en reacciones no respiratorias asociadas con el crecimiento en acetato.

Las temperaturas por sobre $30\text{ }^\circ\text{C}$. son consideradas en *E. gracilis* como supraóptimas (Buetow, 1962; Cook, 1968). Se definen temperaturas supraóptimas como aquellas superiores a la que produce una velocidad óptima de división celular.

Sin embargo, existen algunas cepas de "baja temperatura" las cuales se multiplican en forma óptima a aproximadamente $25\text{-}26\text{ }^\circ\text{C}$.

Mientras que las temperaturas supraóptimas inhiben los procesos de división celular, no necesariamente afectan la capacidad de crecimiento protoplasmático, por lo menos hasta $36\text{-}37\text{ }^\circ\text{C}$ en *E. gracilis* Z. Este fenómeno ha hecho posible sincronizar la división celular en *Euglena* mediante reiteradas variaciones en la temperatura (Pogo y Arce, 1964).

Gross y Jahn (1962) y Gross (1962) estudiaron el efecto de las temperaturas elevadas sobre la morfología y fisiología de *Euglena* y determinaron el rango en el cual la luz ejerce acción inhibitoria. Emplearon cultivos crecidos en un medio orgánico complejo, en oscuridad y a varias intensidades luminosas (entre 15 y 150 ft-c) y a temperaturas desde 20 a $35\text{ }^\circ\text{C}$. Así, encontraron que por debajo de $32,5\text{ }^\circ\text{C}$ el crecimiento era independiente de la luz, mientras que a $35\text{ }^\circ\text{C}$ era inversamente proporcional a la intensidad luminosa. Además, a esta temperatura observaron la aparición de células anormales (gigantes y multinucleadas) obteniéndose un mayor porcentaje de éstas a las intensidades más elevadas. Hallaron también algunos cultivos crecidos en ausencia de luz, a $35\text{ }^\circ\text{C}$.

Los autores postularon la desnaturalización de una proteína termosensible y esencial para la división celular. En cuanto a la luz, ésta tendría un rol sinérgico indirecto en este fenómeno.

La luz, por otro lado, podría ejercer un efecto sobre la clorofila y los cloroplastos, al ser transformada en calor in-

traplastídico a través de los carotenoides y teniendo así un papel indirecto en este fenómeno.

Uno de los efectos más importantes producidos por las temperaturas supraóptimas es el blanqueamiento permanente de *Euglena*, existiendo discrepancias entre las diferentes cepas en cuanto a la respuesta al mismo.

Brawerman y Chargaff (1960) estudiaron el blanqueamiento por temperaturas elevadas en *E. gracilis* Z, cepa de "alta temperatura". Estos autores encontraron que la pérdida de la capacidad para sintetizar clorofila estaba íntimamente relacionada con la velocidad de multiplicación celular.

Wolken et al (1955) indicaron que las temperaturas elevadas producían la remoción del magnesio de la clorofila y su transformación en feofitina.

REFERENCIAS

- Abraham, A. & Bachhawat, B.K. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* 70, 104.
- Abraham, A. & Bachhawat, B.K. (1965), *Indian J. Biochem.* 1, 192.
- Albaum, H.G.; Schatz, A.; Hutner, S.H. & Hirschfeld, A. (1950), *Arch. Biochem.* 29, 210.
- Arnstein, H.R.V. & Neuberger, A. (1953), *Biochem. J.* 55, 259.
- Baker, H.S.; Hutner, S.H. & Sobotka, H. (1955), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 62, 351.
- Benson, A.A.; Cook, J.R. & Yagi, T. (1962), *Plant Physiol.* 37, Suppl. 44.
- Benson, R.E. (1972), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 139 (4), 1096.
- Bingham, S. & Schiff, J.A. (1976), "Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria"; Eds. Bücher, Th. et al., Elsevier - Amsterdam, p. 79.
- Blum, J.J. (1965), *J. Cell Biol.* 24, 223.
- Blum, J.J. (1966), *J. Gen. Physiol.* 6, 1125.
- Bowne, S.W., Jr. (1954), *Nature* 204, 801.
- Brawerman, G. & Chargaff, E. (1960), *Biochim. Biophys. Acta* 37, 221.
- Brawerman, G.; Pogo, A.O. & Chargaff, E. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 55, 326.
- Bre, M.H. & Lefort-Tran, M. (1974), *Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 248 Serie D, 1349.
- Buetow, D.E. (1962), *Exptl. Cell Res.* 27, 137.
- Buetow, D.E. (1963), *Nature* 199, 196.
- Buetow, D.E. (1965), *J. Cellular Comp. Physiol.* 66, 235.
- Buetow, D.E. (1966), *J. Protozool.* 13, 585.
- Buetow, D.E. (1967), *Nature* 213, 1127.
- Buetow, D.E. & Padilla, G.M. (1963), *J. Protozool.* 10, 121.
- Buetow, D.E. & Schuit, K. E. (1968), *J. Protozool.* 15 (4), 770.

- Carell, E.F. (1969), J. Cell Biol. 41, 431.
- Carell, E.F. & Price, C.A. (1965), Plant Physiol. 40, 1.
- Cook, J.R. (1960), Ph. D. Thesis, Univ. of California, Los Angeles, California.
- Cook, J.R. (1963), J. Protozool. 10, 436.
- Cook, J.R. (1965), Plant Cell Physiol (Tokyo) 6, 301.
- Cook, J.R. (1966), Plant Physiol. 41, 821.
- Cook, J.R. (1968), "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol I, pp 243-314. Academic Press, New York.
- Cook, J.R. & Carver, M. (1966), Plant Cell Physiol. (Tokyo) 7, 377.
- Cook, J.R. & Heinrich, B. (1965), J. Protozool. 12, 581.
- Cramer, M. & Myers, J. (1952), Arch. Mikrobiol. 17, 384.
- Chancellor-Maddison, J. & Noll, C.F. (1963), Science 142, 60.
- Danforth, W. (1953), Arch. Biochem. Biophys. 46, 164.
- Davies, W.H.; Mercer, E.I. & Goodwin, T.W. (1966), Biochem. J. 98, 369.
- Downing, M. & Schweigert, B.S. (1955), J. Biol. Chem. 220, 521.
- Dubash, P.J. & Rege, D.W. (1967), Biochim. Biophys. Acta 136, 185.
- Edelman, M.; Cowan, C.A.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1964), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52, 1214.
- Edmunds, L.N.; Jr. (1964), Science 145, 266.
- Elliott, A.M. (1949), Trans. Am. Microscop. Soc. 68, 228.
- Epstein, S.S. (1960), Nature 188, 143.
- Epstein, S.S. & Timmis, G.M. (1963), J. Protozool. 10, 63.
- Epstein, S.S.; Weiss, J.B.; Causey, D. & Bush, P. (1962), J. Protozool. 9, 336.
- Evans, H.J. & Nason, A. (1953), Plant Physiol. 28, 233.
- Funk, H.B. & Nathan, H.A. (1958), Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 99, 394.
- Goodman, N.S. & Schiff, J.A. (1964), J. Protozool. 11, 120.

- Goodwin, C.M. (1951), Proc. Iowa Acad. Sci. 58, 451.
- Gross, J.A. (1962), J. Protozool. 9, 415.
- Gross, J.A. & Jahn, T.L. (1962), J. Protozool. 9, 340.
- Guest, J.R. (1959), Biochem J. 72, 5 pp.
- Heinrich, B. (1966), M.S. Thesis, Univ. of Maine, Orono, Maine.
- Heinrich, B. & Cook, J.R. (1966), J. Protozool. 14 (4), 548.
- Hoogenhout, H. (1963), Phycologist 2, 136.
- Huling, R.T. (1960), Trans. Am. Microscop. Soc. 79, 384.
- Huzisige, H. & Satoh, K. (1960), Biol. J. Okayama Univ. 6, 71.
- Iwamura, T. (1960), Biochem. Biophys. Acta 42, 161.
- Karali, E.F. & Price, C.A. (1963), Nature 198, 708.
- Kempner, E.S. & Miller, J. H. (1965), Biochim. Biophys. Acta 104, 18.
- Knezek, B.D. & Maier, R.H. (1971), Soil Sci. Plant Anal. 2, 37.
- Leedale, G.F. (1959), Biol. Bull. 116, 162.
- Levedahl, B.H. & Wilson, B. W. (1965), Exptl. Cell Res. 39, 242.
- Lie, J.T.; Ungar, B. & Cowling, D.C. (1969), J. Clin. Pathol. 22, 153.
- Loefer, J.B. & Mefferd, R.B., Jr. (1955), Proc. Intern. Congr. Microbiol., 6th, Rome, (1953) 5, 357.
- Lwoff, A. (1951), In "Biochemistry and Physiology of Protozoa", Vol 1, pp 1-26. Academic Press, New York.
- Mc Calla, D.R. (1963), J. Protozool. 10, 491.
- Millar, E. & Price, C.A. (1960), Plant Physiol. 35, Suppl., XXiii.
- Mudd, S.; Yoshida, A. & Koike, M. (1958), J. Bacteriol. 75, 224.
- Muto, T. (1957), J. Vitaminol. (Kyoto), 3, 50.
- Nakano, J.; Okamoto, K.; Toda, S. & Fuwa, K. (1978), Agric. Biol. Chem. 42 (5), 901.

- Nason, A. (1962), *Bacteriol. Rev.* 26, 16.
- Nathan, H.A. & Funk, H.B. (1962), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 109, 213.
- Neal, W.K.; Funkhouser, E.A. & Price, C.A. (1968), *J. Protozool.* 15 (4), 671.
- Pogo, A.O. & Arce, A. (1964), *Exptl. Cell Res.* 36, 390.
- Price, C.A. (1961), *Biochem. J.* 82, 61.
- Price, C.A. (1962), *Science* 135, 46.
- Price, C.A. & Carell, E.F. (1964), *Plant Physiol.* 39, 862.
- Price, C.A. & Millar, E. (1962), *Plant Physiol.* 37, 423.
- Price, C.A. & Vallee, B.L. (1962), *Plant Physiol.* 37, 428.
- Prosk, J.A. & Donald, J.P. (1971), *Plant Physiol.* 48 (2),
- Prqvasoli, L.; Hutner, S.H. & Schatz, A. (1948), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 69, 279.
- Rabin, R.; Reeves, H.C.; Wegener, W.S.; Megraw, R.E. & Ajl, S.J. (1965), *Science* 150, 1548.
- Ray, D.S. & Hanawalt, P.C. (1964), *J. Mol. Biol.* 9, 812.
- Robbins, P.W. & Lipmann, F. (1956), *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2652.
- Russell, G.K. & Gibbs, M. (1966), *Plant Physiol.* 41, 885.
- Schiff, J.A. (1973), In "Advances in Morphogenesis" Vol 10, pp. 265. Academic Press, New York - London.
- Schiff, J. A. (1974), In "Proc. Third Int. Congress on Photosynthesis", M. Avron (Ed.) p. 1691. Elsevier, Amsterdam.
- Schiff, J.A. (1975), In "Les Cycles Cellulaires et Leurs Blocage chez Plusieurs Protistes", C.N.R.S., p. 79 Gif-Sur-Yvette, France.
- Sherata, T.E. & Kempner, E.S. (1978), *J. Bacteriol.* 133, 396.
- Smillie, R.M. & Krotkov, G. (1960), *Arch. Biochem. Biophys.* 29, 83.
- Smith, E.L. (1965), "Vitamin B₁₂", 3rd Ed., pp 1-180. Wiley, New York.
- Soldo, A.T. (1955), *Arch. Biochem. Biophys.* 55, 71.
- Stern, J.R. & Friedman, D.L. (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, 82.

- Venkataraman, S.; Netrawali, M.S. & Sreenivasan, A. (1965), Biochem. J. 96, 552.
- Wacker, W.E.C. (1962 a), Federation Proc. 21, 379.
- Wacker, W.E.C. (1962 b), Biochemistry 1, 859.
- Wolken, J.J.; Mellon, A.D. & Greenblatt, C.L. (1955), J.. Protozool. 2, 89.
- Zielinski, R.E. & Price, C.A. (1978), Plant Physiol. 61, 624.

CAPITULO V

INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO Y DEL METABOLISMO

V.1. Antibióticos

- V.1.1. Estreptomina
- V.1.2. Cloramfenicol
- V.1.3. Cicloheximida
- V.1.4. Puromicina
- V.1.5. Actinomicina D
- V.1.6. Antimicina A
- V.1.7. Mismicina
- V.1.8. Lincomicina
- V.1.9. Rifampicina
- V.1.10. Nigericina
- V.1.11. Mitomicina

V.2. Agentes antitumorales

V.3. Análogos de las purinas y pirimidinas

V.4. Desacoplantes e inhibidores de la fosforilación oxidativa

Agua pesada

V.6. Antihistaminas

V.7. Pesticidas

V.8. DCMU

V. INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO Y DEL METABOLISMO

V.1. Antibióticos

En un excelente trabajo, Schmidt y Lyman (1976) describieron los efectos de una variedad de compuestos en *Euglena*. En el mismo, se encuentran detallados los modos de acción y la especificidad de numerosas drogas respecto a la síntesis de DNA y proteínas en citoplasma, mitocondrias y cloroplastos.

Ebringer (1971, 1972 a) seleccionó un gran número de antibióticos y estudió la síntesis de clorofila, el blanqueamiento celular y la muerte de *Euglena* por efecto de los mismos.

Existen tres drogas extensamente estudiadas: la estreptomina, el cloramfenicol y la cicloheximida.

V.1.1. Estreptomina

Este antibiótico produce un blanqueamiento permanente de *Euglena* y ha dado origen a una variedad de cepas ampliamente utilizadas en la actualidad.

Ebringer et al (1970) y Freyssinet (1977) informaron recientemente resultados de los efectos de la estreptomina en *Euglena*, los cuales son consistentes con su mecanismo de acción.

Sin embargo, todavía no está totalmente comprobado que la estreptomina afecte la síntesis del α -tocoferol, metabolito que se encuentra normalmente en cloroplastos de *Euglena* (Prigretti, 1973).

V.1.2. Cloramfenicol

Este antibiótico de amplio espectro, aumenta ligeramente la proporción de células blanqueadas de *E. gracilis* e inhibe el verdeo de *Euglena* etiolada (Aaronson et al, 1967).

Se requieren concentraciones elevadas (1-2 mg/ml) para inhibir el crecimiento de *Euglena* en un medio con peptona (Pogo y Pogo, 1965), mientras que en uno definido se necesitan concentraciones menores para producir el mismo efecto (de Kloet, 1966).

El cloramfenicol afecta la síntesis proteica tanto en mitocondrias como en cloroplastos (Stewart y Gregory, 1969).

Hovenkamp-Obbema y Stegwee (1974) observaron que la presencia de este antibiótico inhibía la síntesis de las enzimas ribulosa-difosfato carboxilasa y NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

V.1.3. Cicloheximida

La cicloheximida, antibiótico tóxico para todos los eucariotas, actúa sobre *Euglena* inhibiendo la síntesis proteica (Umezawa, 1964).

La fenilalanina-tRNA sintetasa existe en *Euglena* en tres formas independientes: citoplasmática, mitocondrial y cloroplástica. Los efectos de la cicloheximida sobre la actividad de estas enzimas son muy complejos y Spare et al (1978) concluyeron que el análisis del control de la síntesis de estas enzimas no era simple.

La cicloheximida inhibe totalmente las RNA polimerasas específicas de la síntesis del RNA ribosomal citoplasmático, sugiriéndose un origen citoplasmático para estas enzimas, las cuales expresarían su actividad donde se sintetiza el RNA (Ledoigt y Calvayrac, 1974).

Ben-Shaul y Ophir (1970) encontraron que esta droga reducía el número de tilacoides por cloroplasto. En células en verde, la cicloheximida inhibe la división celular pero afecta sólo parcialmente el desarrollo de los cloroplastos. Estos autores concluyeron que bajo estas condiciones, el máximo efecto de la droga se debía al origen citoplasmático del sistema membranoso de los cloroplastos, siendo secundaria la acción sobre la síntesis de clorofila.

Evans (1971) descubrió en *Euglena* que la cicloheximida poseía un efecto adicional, independiente de la síntesis proteica. Este antibiótico inhibe la captación de glucosa y de 2,4-dinitrofenol debido posiblemente a efectos sobre el transporte a través de la membrana celular, por variación del gradiente de pH a lo largo de la misma o por acción sobre la membrana en sí.

El cloramfenicol y la cicloheximida bloquean la síntesis

proteica de los ribosomas 70 S (cloroplásticos) y 80 S (citoplasmáticos) respectivamente. Debido a esta especificidad, se utilizan frecuentemente para establecer el sitio de síntesis de una proteína específica. Existen numerosos trabajos que recopilan datos acerca de este tema, siendo los más actuales los de Davies y Merrett (1975); Lord et al (1975); Woodward y Merrett (1975) y Matson y Kimura (1976).

V.1.4. Puromicina

La puromicina, como el cloramfenicol, es ampliamente utilizada como inhibidor de síntesis proteica, actuando probablemente como un análogo de los grupos aminoacilos, en el RNA de transferencia (Goldberg, 1965).

Según trabajos preliminares de Selsky (1964), este antibiótico no afecta el verdeo de *Euglena*, en un medio neutro.

V.1.5. Actinomicina D

Altas concentraciones de este antibiótico (10 $\mu\text{g/ml}$) inhiben la incorporación de nucleótidos tritiados en el DNA cloroplástico, en cloroplastos aislados de *Euglena* (Scott et al, 1968).

O'Donnell-Alvela (1968) estudió la variedad de efectos que produce esta droga en *E. gracilis* cuando se añade directamente al medio de cultivo en concentraciones de hasta 2 $\mu\text{g/ml}$. Después de 6 horas de exposición, el metabolismo celular se reduce mientras que la división celular se detiene completamente en un 30% de las células tratadas con la mayor concentración.

Dentro de las 2 a 6 horas, la división nuclear se detiene, principalmente en la profase o en la anafase temprana.

La actinomicina D, cuya acción consiste en bloquear la síntesis del RNA, no tiene efecto sobre el material nucleolar pre-existente y la cromatina pero previenen la acumulación de dicho material.

Bovarnick et al (1969) observaron que elevadas concentraciones de actinomicina D (45 $\mu\text{g/ml}$) bloqueaban la síntesis de clorofila en *Euglena*.

V.1.6. Antimicina A

El tratamiento de mitocondrias aisladas de *Euglena* con Antimicina A reduce específicamente la concentración de citocromos tipo b.

La velocidad de respiración de células intactas de *Euglena* disminuye a los pocos minutos de la adición de la Antimicina A (0,5 ug/ml) al cultivo; el aumento exponencial en el número de células se detiene pero luego de una fase lag de 20 horas, el crecimiento se reanuda debido a un proceso de adaptación (Sharpless y Butow, 1970 b). La velocidad de desarrollo en presencia del inhibidor depende de la fuente carbonada (Sharpless y Butow, 1970 a); con etanol, puede llegar a ser del orden de la velocidad de control.

A las pocas horas de exposición a la antimicina A, se observan mitocondrias gigantes; mediante cultivos subsiguientes en ausencia del inhibidor se recupera rápidamente la respiración celular y reaparecen las mitocondrias normales (Calvayrac y Butow, 1971).

Calvayrac y Claisse (1973) identificaron un citocromo nuevo: cit 556, cuya síntesis cesa con la adición de antimicina A y no se recupera al iniciarse el crecimiento posterior a la adaptación.

V.1.7. Miomicina

La miomicina parece tener poco efecto en células verdes de *Euglena* crecidas heterotróficamente a la luz, a pesar de que se encuentra levemente inhibida la síntesis de clorofila. Sin embargo, en corto tiempo comienzan a aparecer colonias blanqueadas y después de 5 días de exposición, el blanqueamiento es total. La microscopía de fluorescencia indicó una degeneración de los plástidos; Fasulo et al (1976) confirmaron la desintegración de los mismos por microscopía electrónica, observando en este caso núcleos y mitocondrias normales.

Vannini et al (1978) postularon que este antibiótico actuaría como un inhibidor de la síntesis de proteínas en ribosomas cloroplástidos.

No se detectó clorofila en células blanqueadas por crecimiento continuo en presencia de mioromicina.

V.1.8. Lincomicina

La lincomicina (2 mg/ml) no afecta el crecimiento heterotrófico de *Euglena* a la luz; sin embargo, la mayoría de las células se blanquean, y esta acción es irreversible (Stewart y Gregory, 1969).

Ebringer y Foltinova (1976) estudiaron el efecto de concentraciones menores de lincomicina y de los 7-halo y 7-oxi derivados. A pesar de que no aparecieron colonias blanqueadas a una concentración de 500 μ g/ml de lincomicina, empleando 1.500 μ g/ml el blanqueo fue total. Los 7-haloderivados resultaron ser más efectivos en dicho proceso y algo más tóxicos para *Euglena* que los 7-oxiderivados.

Freyssinet (1977) observó un pequeño efecto en la captación e incorporación de carbonato, leucina y sulfato, en presencia de lincomicina (2 mg/ml). Sin embargo, en preparaciones libres de células, con una concentración 20 veces menor de inhibidor, la lincomicina inhibe los cloroplastos y los ribosomas cloroplásticos, con poco efecto sobre la actividad de los ribosomas citoplasmáticos.

V.1.9. Rifampicina

La rifampicina no tiene efecto sobre el crecimiento de *Euglena* en medio de pH neutro, en luz u oscuridad (Ishida et al, 1973 a,b), pero inhibe la incorporación de uracilos en forma equivalente en ambas condiciones (Ishida et al, 1973 b).

En medios neutros o ácidos, la rifampicina no afecta la síntesis de clorofila (Theiss-Seuberling, 1973), el crecimiento celular y la síntesis de RNA salvo que se la añada en forma conjunta con dimetilsulfóxido (DMSO). (Brown et al, 1969).

La rifampicina (20 μ g/ml) con DMSO 1% ejerce una profunda acción sobre la estructura de *Euglena*: aparición de cloroplastos irregulares y mitocondrias segmentadas con apariencia vacuolar.

V.1.10. Nigericina

La nigericina es un ionóforo cuya acción primaria es estimular el intercambio transmembrana de protones y metales alcalinos. Sin embargo, en *Euglena* estos efectos parecen diferir. Evans (1971) informó que la nigericina (1,4 μ M) producía un de crecimiento en los polirribosomas con un aumento concomitante del número de ribosomas libres, no afectando el desarrollo de los cloroplastos ni la respiración.

A esta baja concentración, la nigericina inhibe la captación de glucosa y de 2,4-dinitrofenol.

V.1.11. Mitomicina

La mitomicina interactúa con el DNA celular, produciendo un cross-linking del mismo.

Las mitomicinas A y C presentan una alta afinidad por el DNA nuclear de *Euglena* y son tóxicas a bajas concentraciones. Otros derivados (B, N-metil o porfiromicina) no son tan tóxicos pero producen blanqueamiento celular (Ebringer et al, 1969).

V.2. Agentes antitumorales

Se ha estudiado también la sensibilidad de las células de *Euglena* a ciertos compuestos citotóxicos de gran interés como los agentes antitumorales.

En un medio definido a pH 3,5, *E. gracilis* es sensible a ametopterina, azoserina, 6-mercaptopurina, anfotericina B y 6-diazo-5-oxo-L-norleucina pero no a 8-azoguanina.

No ejercen sobre ella ningún efecto los siguientes compuestos: myleran, colchicina y cortisona; sin embargo, la 5-fluor nicotinamida es tóxica.

La inhibición producida por el agente antitumoral hadacidina (ácido N-formil-hidroxi-aminoacético) es contrarrestada por adenina y aspartato (Mego, 1964).

Euglena es insensible a la penicilina mientras que la tirotricina y la patulina resultan drogas tóxicas cuando se en-

sayan en un medio que contiene peptona y acetato.

Otro agente antitumoral, la hidroxurea, a concentraciones de 0,02 a 0,035 M inhibe en un 50% la síntesis de la clorofila y la división celular, en *E. gracilis* Z crecida en luz u oscuridad, siendo la síntesis de DNA más sensible que la de RNA y la de proteínas (Buetow y Mego, 1967).

V.3. Análogos de las purinas y pirimidinas

Euglena puede captar del medio de crecimiento timina y timidina, pero no uridina y citidina. Las células verdes incorporan más timidina que las blanqueadas (Sagan, 1965). Esto evidenciaría la presencia de un sistema de transporte para nucleósidos así como también para las bases libres.

Sagan (1965) observó que *Euglena* también puede captar guanina y adenina.

El 5-fluoruracilo, análogo efectivo de las pirimidinas, inhibe el enverdecimiento de *E. gracilis* Z siendo revertido este efecto por uracilo (Evans y Smillie, 1962). La incorporación de bromouracilo da origen a mutaciones plásticas (Scher y Collinge, 1965).

Evans y Smillie (1971) estudiaron los efectos del 5-fluoruracilo sobre la síntesis de clorofila y la actividad enzimática citoplasmática, en células etioladas expuestas a la luz. Estos autores hallaron que el tratamiento con este compuesto 48 horas antes de la transferencia a la luz, no tenía efecto sobre la síntesis de clorofila. Sin embargo, la exposición al 5-fluoruracilo, a la luz, produce una inhibición en la síntesis de clorofila y de cit c.

La actividad de las enzimas citoplasmáticas continúa en aumento durante las primeras 12 horas de exposición a la luz, para luego disminuir al acelerarse la síntesis de los cloroplastos (Figura 5.1.). Los autores sugirieron que dicho decrecimiento se debería a la hidrólisis de las proteínas citoplasmáticas que proveerían aminoácidos para la síntesis de las proteínas cloroplásticas.

La 8-azoguanina no tiene efecto sobre *Euglena* (Kahn y

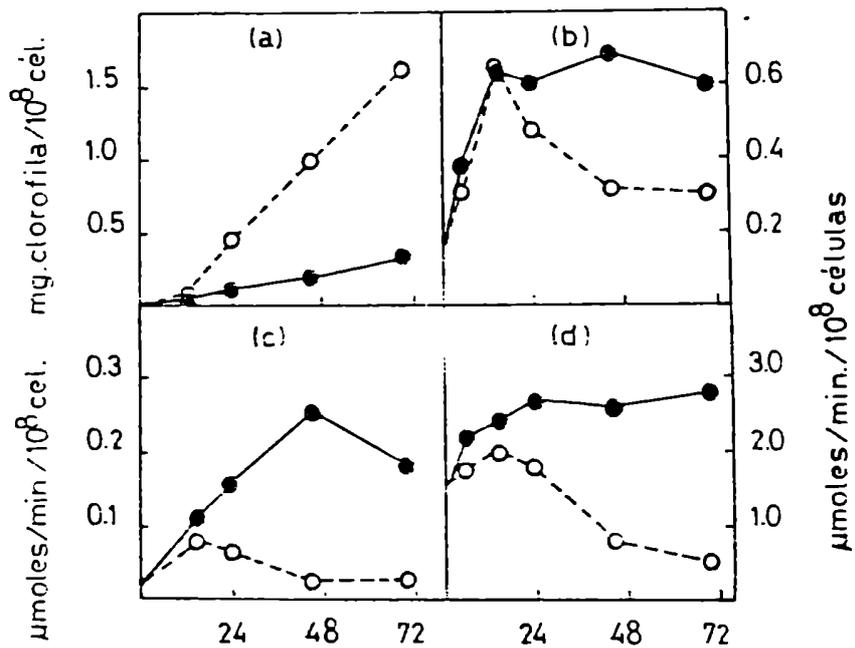


FIGURA 5.1.: Efecto del 5-fluoruracilo en la síntesis celular de: (a) clorofila; (b) glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; (c) NADP-isocitrato deshidrogenasa y (d) NADPH-glutation reductasa, en presencia (●) o ausencia (○) del mismo. Las células crecidas heterotróficamente en oscuridad se cosecharon y se resuspendieron en un medio autotrófico. Después de 2 días de crecimiento, se añadió el 5-fluoruracilo y se midió en función de las horas de iluminación.

Blum, 1965). Dicha insensibilidad no se puede explicar por falta de la guanina pirofosforilasa, ni por una disminución de la permeabilidad ni por degradación del compuesto, ya que se ha comprobado que células de *Euglena* convierten guanina, adenina, hipoxantina y 8-azoguanina en los nucleótidos correspondientes y además pueden incorporar 8-azoguanina en su RNA.

La 6-mercaptopurina y numerosos benzimidazoles compiten con la vitamina B₁₂ en el crecimiento de *Euglena*, en un medio que contiene la cantidad mínima necesaria de vit B₁₂ para el desarrollo (Epstein y Timmis, 1963). Aún no se conoce con exactitud si estos análogos compiten con la parte dimetil-benzimidazol o deoxiadenina.

V.4. Desacoplantes e inhibidores de la fosforilación oxidativa

E. gracilis puede adaptarse reversiblemente al crecimiento en presencia de 2,4-dinitrofenol (DNF). Las células resultantes difieren sólo en pocos aspectos con respecto a las no-adaptadas (Kann, 1973). Esta adaptación no involucra una mutación ya que una gran parte de la población celular total se adapta y aquella desaparece al removerse el DNF. Las células adaptadas pierden el control respiratorio.

En un trabajo posterior, Kahn (1974) observó la resistencia de *Euglena* adaptada al crecimiento en presencia de DNF, a otros desacoplantes o inhibidores de la fosforilación oxidativa carbonil-cianuro, m-clorofenilhidrazona, oligomicina, tri-n-butilclorotina y 1,7-hexafluoro-2,6-dihidroxi-2,6-bis (trifluorometil)-4-heptanona ("1799"). Kahn (1974) concluyó que esta adaptación se debería a una modificación en el camino de la fosforilación oxidativa o a la formación de una membrana mitocondrial alterada impermeable a numerosos desacoplantes e inhibidores. Kahn y Mc Connell (1977) demostraron que esta adaptación no involucraba una síntesis preferencial de nuevas proteínas mitocondriales de membrana pero observaron un daño a nivel del sistema de transporte de los azúcares y aminoácidos celulares.

V.5. Agua pesada

Una vez que *E. gracilis* Z ha sido adaptada a crecer en un medio simple con glucosa, puede desarrollarse en presencia de D₂O. Las células que se forman en estas condiciones, son más cortas y anchas y tienen menor número de cloroplastos (Mandeville et al, 1964). Aparentemente, el deuterio actuaría como un solvente hidrofílico, disminuyendo la protonación de algún sitio activo en la cadena respiratoria (Tyler y Estabrook, 1966).

V.6. Antihistaminas

Estos compuestos son agentes albinizantes pero su toxicidad no tiene porqué estar relacionada con este efecto.

Tong et al (1965) observaron que algunas líneas de *gracilis* var. *bacillaris* albinizadas con piribenzamina y crecidas en un medio con peptona y extracto de levadura, poseían una viabilidad disminuída. Sin embargo, Zahalsky et al (1962) observaron que cepas blanqueadas con las antihistaminas tripelinamina y pirrilamina, en un medio definido, no mostraban alteraciones en su viabilidad.

V.7. Pesticidas

Moore (1970) estudió el efecto de los pesticidas sobre el crecimiento y la sobrevivencia de *E. gracilis* Z.

El Nabam resultó ser el pesticida más tóxico para este microorganismo. Su efecto letal no podía prevenirse por la presencia de cationes divalentes.

El Nabam y el Vapam inhiben la fotosíntesis y el crecimiento en un grado mayor que el maration y el paration.

Concentraciones de 10 ppm de Paration, Vapam o Nabam no afectaban la respiración durante un período de 80' en presencia de 0,01 M de glucosa.

V.8. DCMU

: La (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) (DCMU) inhibe la síntesis de clorofila pero no el desarrollo de los cloroplastos.

Los subcultivos sucesivos en presencia de DCMU originan en un período de 10 semanas, células de *Euglena* resistentes al DCMU. En estas células adaptadas se observa una aparición de cloroplastos casi normal, un incremento en la proteína celular y una disminución del paramylon (Calvayrac et al, 1979 a). Esta resistencia se mantiene indefinidamente en ausencia de DCMU, sin existir evidencias de reversión (Calvayrac et al, 1979 b).

REFERENCIAS

- Aaronson, S.; Ellenbogen, B.B.; Yellen, L.K. & Hutner, S.H. (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 535.
- Ben-Shaul, Y. & Ophir, I. (1970), *Can. J. Bot.* 48, 929.
- Bovarnick, J.G.; Zeldin, M.H. & Schiff, J.A. (1969), *Dev. Biol.* 19, 321.
- Brown, R.D.; Bastia, D. & Haselkorn, R. (1969), "RNA-Polymerase and Transcription" (L. Silvestri, ed.), pp. 309-328. North-Holland Publ. Amsterdam.
- Buetow, D.E. & Mego, J.L. (1967), *Biochim. Biophys. Acta* 134, 395.
- Calvayrac, R. & Buetow, R.A. (1971), *Arch. Mikrobiol.* 80, 62.
- Calvayrac, R.; Bomsel, J.L. & Laval-Martin, D. (1979 a) *Plant Physiol.* 63, 857.
- Calvayrac, R.; Laval-Martin, D.; Dubertret, G. & Bomsel, J. L. (1979 b), *Plant Physiol.* 63, 866.
- Calvayrac, R.M. & Claisse, M.L. (1973), *Planta* 112, 17.
- Davies, B. & Merrett, M.J. (1975), *Plant Physiol.* 55, 30.
- De Kloeet, S.R. (1968), *Biochem. J.* 99, 566.
- Ebringer, L. (1971), *Experientia* 27, 586.
- Ebringer, L. (1972), *J. Gen. Microbiol.* 71, 35.
- Ebringer, L. & Foltinova, P. (1976), *Acta i Rerum Nat. Univ. Comeniana, Microbiol.* 5, 113.
- Ebringer, L.; Mego, J.L. & Jurasek, A. (1969), *Arch. Mikrobiol.* 64, 229.
- Ebringer, L.; Nemeč, P.; Santova, H. & Foltinova, R. (1970), *Arch. Mikrobiol.* 73, 268.
- Epstein, S.S. & Timmis, G. M. (1963), *J. Protozool.* 10, 63.
- Evans, W.R. (1971), *J. Biol. Chem.* 246, 6144.
- Evans, W.R. & Smillie, R. M. (1962), *Plant Physiol.* 37 (Suppl.), 38.
- Evans, W.R. & Smillie, R.M. (1971), *J. Exp. Bot.* 22, 371.
- Fasulo, M.P.; Vannini, G.L.; Bruni, A. & Mares, D. (1976), *Z. Pflanzenphysiol.* 80, 407.

- Freyssinet, G. (1977), *Biol. Cell.* 30, 17.
- Goldberg, I.H. (1965), *Am. J. Med.* 39, 722.
- Hovenkamp-Obbema, R. & Stegwee, D. (1974), *Z. Pflanzenphysiol.* 73, 430.
- Ishida, M.R.; Kikuchi, T.; Matsubara, T.; Tsushimoto, G. & Mizuma, N. (1973 a), *Annu. Rep. Res. React. Inst., Kyoto Univ.* 6, 24.
- Ishida, M.R.; Kikuchi, T.; Matsubara, T.; Tsushimoto, G. & Mizuma, N. (1973 b), *Annu. Rep. Res. React. Inst., Kyoto Univ.* 6, 78.
- Kahn, J.S. (1973), *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 646.
- Kahn, J.S. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 266.
- Kahn, J.S. & Mc Connell, R.T. (1977), *J. Bioenerg. Biomembr.* 9, 363.
- Kahn, V. & Blum, J.J. (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 4435.
- Ledoigt, G. & Calvayrac, R. (1974), *Planta* 121, 181.
- Lord, J.M.; Armitage, T.L. & Merrett, M.J. (1975), *Plant Physiol.* 56, 600.
- Mandeville, S.E.; Crespi, H.L. & Katz, J.J. (1964), *Science* 146, 769.
- Matson, R.S. & Kimura, T. (1976), *Biochim. Biophys. Acta* 442, 76.
- Mego, J.L. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 79, 221.
- Moore, R.B. (1970), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5 (3), 226.
- O'Donnell-Alvela, E. (1968), *Cytologia* 32, 568.
- Pigretti, M.M. (1973). *Rev. Latinoam. Microbiol.* 15, 99.
- Pogo, B. & Pogo, A.O. (1965) *J. Protozool.* 12, 96.
- Sagan, L. (1965), *J. Protozool.* 12, 105.
- Scher, S. & Collinge, J.C. (1965), *Nature* 205, 828.
- Schmidt, G.W. & Lyman, H. (1976), *Bot. Monogr. (Oxford)* 12, 257.
- Scott, N.S.; Shah, V.C. & Smillie, R.M. (1968), *J. Cell Biol.* 38, 151.

- Selsky, M.I. (1964), J. Protozool. 11 (Suppl.), 26.
- Sharpless, T.K. & Butow, R.A. (1970 a), J. Biol. Chem. 245, 50.
- Sharpless, T.K. & Butow, R.A. (1970 b), J. Biol. Chem. 245, 58.
- Spare, W.; Lesiewicz, J.L. & Herson, D.S. (1978), Arch. Microbiol. 118, 289.
- Stewart, P.R. & Gregory, P. (1969), Microbios 3, 253.
- Theiss-Seuberling, H.B. (1973), Arch. Mikrobiol. 92, 331.
- Tong, N.C.H.L.; Gross, J.A. & Jahn, T.L. (1965), J. Protozool. 12, 153.
- Tyler, D.D. & Estabrook, R.W. (1966), J. Biol. Chem. 241,
- Umezawa, H. (1964), "Recent Advances in Chemistry and Biochemistry of Antibiotics", Microbiol. Chem. Res. Found, Tokyo.
- Vannini, G.L.; Fasulo, M.P.; Bruni, A. & Dall'Olivo, G. (1978). Protoplasma 96, 335.
- Woodward, J. & Merrett, M.J. (1975), Eur. J. Biochem. 55, 555.
- Zahalsky, A.C.; Hutner, S.H.; Keane, M. & Burger, R.M. (1962), Arch. Mikrobiol. 4, 36.

PARTE 4

METABOLISMO

CAPITULO VI

METABOLISMO RESPIRATORIO

VI.1. Introducción

VI.2. Enzimas del metabolismo respiratorio

VI.2.1. Síntesis y ruptura de los polisacáridos de reserva

VI.2.2. Glicolisis

VI.2.3. Camino oxidativo de las pentosas

VI.2.4. Ciclo de Krebs

VI.2.5. Gluconeogénesis

VI.2.6. Asimilación de acetato y ciclo del glioxilato

VI.2.7. Transferencia de electrones en mitocondrias

VI.2.7.1. Citocromo 556

VI.2.7.2. Citocromo tipo a 605

VI.3. Transferencia de electrones y fosforilación oxidativa

VI.4. Vías de oxidación y asimilación oxidativa

VI.5. Respiración endógena

VI.6. Utilización de sustratos exógenos

VI.6.1. Consideraciones generales

VI.6.2. Asimilación oxidativa del etano?

VI.6.3. Relación entre la asimilación oxidativa y el crecimiento

VI. METABOLISMO RESPIRATORIO

VI.1. Introducción

Como ya hemos mencionado anteriormente, *Euglena* puede crecer en una amplia variedad de condiciones como fotoautótrofa o como heterótrofa en presencia de acetato, succinato, etanol y glucosa.

El desarrollo de los cloroplastos se encuentra inhibido en células de *Euglena* crecidas en continua oscuridad y en la actualidad, se dispone de una serie de mutantes que contienen cloroplastos deficientes o que son incapaces de formarlos.

Por estas razones se ha elegido a *Euglena* como un organismo experimental para la investigación del metabolismo respiratorio y fotosintético. La mayoría de los estudios enzimáticos en este organismo se ha realizado con enzimas involucradas con los procesos antes mencionados.

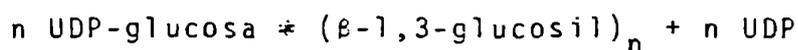
VI.2. Enzimas del metabolismo respiratorio

En esta sección se incluyen aquellas enzimas que catalizan la síntesis y ruptura de los carbohidratos, las que están involucradas en los ciclos de Krebs y del glioxilato y en las reacciones respiratorias de transferencia de electrones.

VI.2.1. Síntesis y ruptura de los polisacáridos de reserva

El principal carbohidrato de reserva es el paramilon, cuya estructura química es la correspondiente a un β -1,3-glucano.

Marechal y Goldemberg (1964) aislaron de *Euglena* la enzima uridina difosfato glucosa- β -1,3-glucan β -3-glucosiltransferasa o β -1,3-glucan sintetasa (Paramilon sintetasa), que cataliza la siguiente reacción:



(reacción 1)

Generalmente, las enzimas involucradas en la síntesis de carbohidratos de reserva (almidón y glicógeno) son insolubles y se hallan unidas a membranas asociadas con el mismo polisacárido. Sin embargo, la β -1,3-glucan sintetasa de *Euglena* no parece estar asociada a los gránulos de paramilon. Otra característica poco común de esta enzima de *Euglena* es que no requiere de un "primer" para ejercer su acción, como sucede en plantas superiores donde esta actividad necesita de la presencia de D-glucosa o de ciertos D-glucósidos como iniciadores de la reacción (Feingold et al, 1958).

Las células que acumulan grandes cantidades de paramilon presentan también una elevada actividad de esta sintetasa. Además el contenido de paramilon en células crecidas a la luz es menor que el de las desarrolladas en oscuridad y correspondientemente la actividad de la sintetasa está disminuida en las primeras. Esta diferencia se debería según algunos autores, a la existencia de un inhibidor de la glucan sintetasa presente en células verdes.

En extractos libres de células de *Euglena*, también se ha detectado la β -1,3-glucanohidrolasa (Fellig, 1960; Tocher, 1962; Meeuse, 1964), la cual libera glucosa a partir del β -1,3-glucano y cuya función sería posiblemente la utilización del carbohidrato de reserva.

Vogel y Barber (1968) purificaron una enzima de *Euglena*, que era capaz de degradar el paramilon a residuos glucosa. Estos autores denominaron a esta enzima 1,3-glucanasa y encontraron que la misma se hallaba fuertemente unida al sustrato (paramilon) liberado mediante hidrólisis básica pero no a los gránulos intactos. Su actividad específica se duplica al llegar los cultivos a la fase estacionaria, en la cual comienza la utilización del carbohidrato de reserva.

Otra de las enzimas aisladas de *Euglena* es la β -1,3-oligo glucano: ortofosfato glucosiltransferasa (laminaribiosa fosforilasa) que cataliza la siguiente reacción:



(reacción 2)

Esta enzima fue purificada por Goldemberg et al (1966), quienes propusieron que el mecanismo de acción era similar al de las maltosa y celobiosa fosforilasas, en cuanto a que no se forma un complejo intermediario glucosil-enzima sino que la reacción ocurría por un simple desplazamiento.

También han sido detectadas en *Euglena* la UDP-glucosa pirofosforilasa y la fosfoglucomutasa (Smillie, 1963).

VI.2.2. Glicolisis

En extractos de *Euglena* se ha confirmado la presencia de todas las enzimas del camino de Embden-Meyerhof-Parnas; sin embargo sólo unas pocas se han estudiado en detalle.

La hexoquinasa, que cataliza la siguiente reacción:



(reacción 3)

puede fosforilar tanto la glucosa exógena como la proveniente de la hidrólisis del glucano de reserva (Belsky y Schultz, 1962; Hurlbert y Rittenberg, 1962). A diferencia de lo que sucede en plantas superiores, la hexoquinasa de *Euglena* no está asociada a mitocondrias.

Rutter (1964) distinguió la presencia de dos tipos de fructosa-1,6-difosfato aldolasas (clase I y clase II), las cuales mostraban características moleculares y mecanismos catalíticos diferentes. La aldolasa clase II contiene un metal divalente esencial para su actividad; se inhibe por quelantes y requiere la presencia de reactivos sulfhidrúlicos para su máxima actividad. La Aldolasa clase I muestra una actividad apreciable con fructosa 1-fosfato mientras que la de la clase II es más específica para la fructosa 1,6-difosfato. También existen diferencias en sus pesos moleculares y en sus constantes de sedimentación.

Es interesante señalar la distribución filogenética de estas dos aldolasas. La clase I se encuentra en animales, plantas y protozoos mientras que la clase II se halla en hongos, levaduras, bacterias y algas azules. Sin embargo, *Euglena gracilis*

y *Chlamydomonas reinhardtii* poseen ambas clases de aldolasas.

Se ha tratado de establecer cuál de las dos es la activa durante la glicolisis. Así, mediante variaciones en los niveles de ambas enzimas como respuesta a un crecimiento bajo distintas condiciones ambientales, se sugirió que la aldolasa clase I estaría involucrada en la fotosíntesis mientras que la de la clase II pertenecería a los procesos de glicólisis y gluconeogénesis.

Price (1962) demostró la presencia de dos lactato deshidrogenasas en extractos de *Euglena*: una soluble, NAD^+ dependiente y otra particulada cuya actividad se encontraba significativamente disminuída en deficiencia de Zn.

VI.2.3. Camino oxidativo de las pentosas

En *Euglena*, se hallan presentes todas las enzimas de este camino, pero aún se sabe poco acerca de sus propiedades.

VI.2.4. Ciclo de Krebs

Las enzimas pertenecientes a este ciclo también han sido encontradas en *Euglena*. Buetow y Buchanan (1965) hallaron que fracciones mitocondriales de este microorganismo podían llevar a cabo la fosforilación del ADP acoplada a la oxidación de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC).

VI.2.5. Gluconeogénesis

Tanto las células verdes como las blanqueadas de *Euglena* poseen la enzima fructosa-1,6-difosfatasa, que exhibe su máxima actividad en un pH cercano a la neutralidad. Esta enzima, denominada como fructosa-1,6-difosfatasa neutra, tiene un rol análogo al de la fructosa-1,6-difosfatasa alcalina de hígado (Smillie, 1960).

VI.2.6. Asimilación de acetato y ciclo del glioxilato

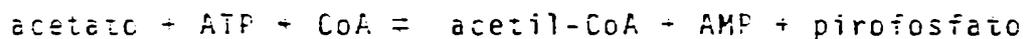
Como ocurre en numerosos microorganismos capaces de crecer

en presencia de acetato como única fuente de carbono, también en *Euglena* el ciclo del glioxilato provee una vía para la asimilación de dicho sustrato (Danforth, 1961).

En *Euglena* se ha demostrado la existencia de dos enzimas importantes de este ciclo: la isocitrato liasa y la malato sintetasa. El crecimiento en acetato no es un requerimiento esencial para la formación de la isocitrato liasa, ya que también se la encuentra en células crecidas con etanol (Haigh y Beevers, 1964) y no se detecta en cambio, en células desarrolladas autotróficamente.

Las demás enzimas del ciclo del glioxilato forman parte del ciclo de Krebs, al cual ya nos hemos referido.

El acetato penetra en el ciclo del glioxilato como un derivado de la CoA, obtenido por acción de la acetato tioquinasa, según:



(reacción 4)

Berg (1956) estudió el mecanismo de acción de esta enzima en levaduras y en base a estudios con reacciones de intercambio de ^{32}P y con acetiladenilato sintético, propuso los siguientes pasos:



(reacción 5)



(reacción 6)

Evidencias experimentales obtenidas por Abraham y Bachhawat (1962) y Ohmann (1964) indicaron que en *Euglena* esta enzima también actuaría vía el intermediario acetiladenilato.

VI.2.7. Transferencia de electrones en mitocondrias

Buetow y Buchanan (1965) encontraron que fracciones particuladas que contenían mitocondrias de *Euglena*, eran capaces de llevar a cabo la fosforilación oxidativa.

Por ciertas características, el camino de transferencia de electrones en *Euglena* parece diferir de los hallados en levaduras y mitocondrias de músculo cardíaco. El cianuro (1 mM) inhibía la respiración de *Euglena* mientras que el CO a concentraciones elevadas (95%) poseía sólo un efecto lateral (Perini et al, 1964 a, b).

VI.2.7.1. Citocromo 556

En extractos de *Euglena* crecida en oscuridad, Gross y Wolkén (1960) detectaron por primera vez la presencia de un citocromo con un máximo para la banda α a 556 m μ .

Perini et al (1964 a) señalaron que a pesar de que la banda α se hallaba centrada a 556 m μ , el pico no era simétrico, encontrándose el máximo a 558 m μ y existiendo un hombro a 554,5 m μ .

El cit 556 no participa en la fotosíntesis pero está claramente asociado con el mecanismo respiratorio.

La adición de succinato o acetato a una suspensión celular produce una reducción espectroscópicamente medible del cit 556, la cual puede revertirse aereando la suspensión.

La identificación del cit 556 como un cit tipo c es aún especulativa.

VI.2.7.2. Citocromo tipo a 605

Euglena contiene otro cit involucrado en la respiración, cuyo grupo prostético es un hemo a (Perini et al, 1964 a). Su concentración celular es similar aproximadamente a la del cit 556 y muestra absorción máxima en la forma reducida, a 605 m μ (banda α) y a 442-444 m μ (banda γ). Es reducido *in vivo* por succinato y este efecto desaparece en presencia de cianuro 0,5 mM.

VI.3. Transferencia de electrones y fosforilación oxidativa

La respiración es un proceso de "asimilación oxidativa" (Griffiths, 1965), en el cual un único sustrato orgánico provee de carbono y energía para el crecimiento.

Existen evidencias que señalan la presencia de cuatro pigmentos citocrómicos en *Euglena*: cit. c 552, cit tipo c 556, cit b 561 y cit tipo a 605. De estos cuatro, sólo dos son considerados como componentes del sistema de transporte electrónico respiratorio, dado que el cit c 552 y el cit b 561 están localizados en los cloroplastos y no se encuentran presentes en cepas no fotosintéticas o en células de *Euglena* crecidas en oscuridad (Perini et al, 1964 a, b; Wolken y Gross, 1963; Smillie, 1963).

Los cit's tipo a y c difieren en sus propiedades de los cit's de plantas superiores, mamíferos y aún de otras algas verdes.

Buetow y Buchanan (1964, 1965) estudiaron la fosforilación oxidativa acoplada a la transferencia electrónica, en mitocondrias aisladas de *Euglena*. A pesar de que éstas son capaces de fosforilar, el acople no es fuerte; eso significa que la oxidación de los sustratos y la transferencia de electrones al O_2 ocurre a la misma velocidad, esté o no bloqueada la fosforilación por ausencia de un aceptor de fosfatos.

En otros organismos, el acoplamiento fuerte entre ambos procesos juega un rol sumamente importante en la regulación del metabolismo respiratorio (Lehninger, 1964), limitando la velocidad de consumo de sustrato con respecto a la velocidad a la cual el aceptor de fosfatos es liberado por reacciones que consumen energía.

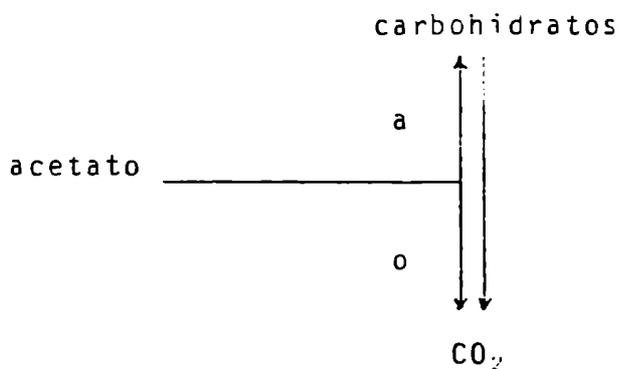
Si la pérdida de tal acoplamiento es una característica de la mitocondria de *Euglena in vivo*, así como también *in vitro*, este mecanismo de control presumiblemente no estaría presente o no sería necesario para el metabolismo regulatorio de este microorganismo.

Los efectos del 2,4-dinitrofenol, amital, antimicina A y rotenona sobre las mitocondrias de *Euglena* son semejantes a los hallados en dichas organelas de plantas superiores y animales,

esto sugeriría que a pesar de las diferencias existentes, el sistema de la fosforilación oxidativa en euglenoides posee algunas reacciones en común con los organismos multicelulares.

VI.4. Vías de oxidación y asimilación oxidativa

En la Figura 6.1. se encuentran las vías metabólicas involucradas en la asimilación oxidativa. Con muy pocas excepciones, todas las enzimas responsables de estas reacciones se hallan presentes en *Euglena*. Es conveniente considerar estas reacciones como integrantes de tres caminos funcionales: oxidación de carbohidratos de reserva (paramilon), oxidación de sustratos de bajo peso molecular (acetato, etanol, intermediarios del ciclo de Krebs) y asimilación de sustratos de bajo peso molecular. Estos tres caminos funcionales pueden esquematizarse según:



esquem

considerando al acetato agregado como fuente de carbono (Danforth, 1968), donde a, o y r poseen el mismo significado de la Figura 6.1.

Barry (1962) indicó que los carbohidratos añadidos exógenamente eran oxidados a través del camino de Embden-Meyerhof-Parnas, por esta misma vía se oxidarían también los carbohidratos endógenos. El piruvato así formado se oxida posteriormente a CO₂ vía el ciclo de Krebs (Hunter y Lee, 1962). Existen dos rutas posibles mediante las cuales el piruvato penetraría en dicho ciclo. Como en levaduras, este compuesto puede decarboxilarse a acetaldehído, éste oxidarse a acetato y el acetato convertirse en acetil-CoA. Alternativamente, como en tejidos animales, el

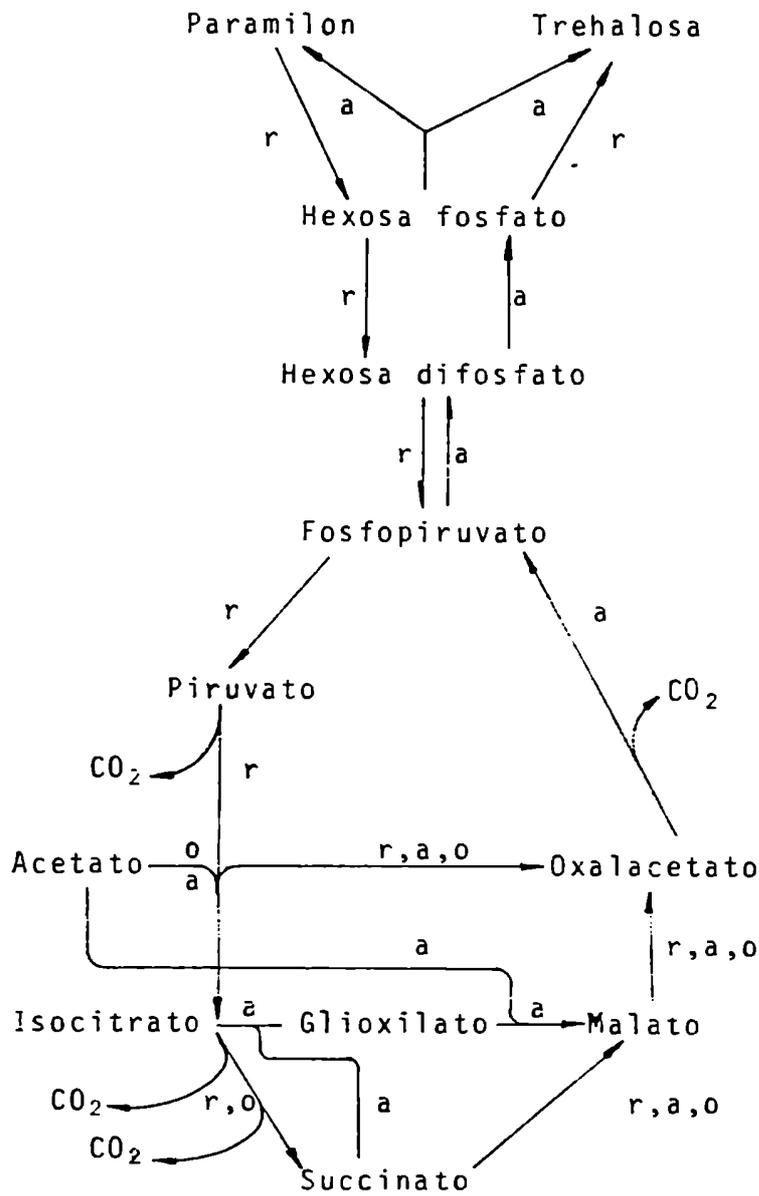


FIGURA 6.1.: Posibles caminos enzimáticos relacionados con el metabolismo respiratorio de *Euglena*. Se considera al acetato como un sustrato exógeno. r: caminos oxidativos de reserva; o: caminos de oxidación de sustratos; a: vías de asimilación de sustratos.

piruvato puede decarboxilarse oxidativamente a acetil-CoA en una sola reacción enzimática compleja. En *Euglena* se han detectado sólo las enzimas correspondientes al camino utilizado en levaduras (Ohmann, 1964).

Cuando el sustrato exógeno es el acetato, éste es convertido en acetil-CoA mediante una acetato tioquinasa (Ohmann, 1964). En cuanto al etanol, también seguiría la misma ruta después de su conversión a acetato, mediante la alcohol deshidrogenasa y la acetaldehído deshidrogenasa. Para el caso del acetato, los pasos iniciales de asimilación del sustrato ocurren por la vía del ciclo del glioxilato, el cual convierte dos moléculas de acetato en una de oxalacetato, siendo el último decarboxilado y fosforilado para formar fosfopiruvato. Este es probablemente convertido en carbohidratos mediante el camino glicolítico inverso (Krebs y Kornberg, 1957). Sin embargo, por razones energéticas es imposible una reversión exacta de la glicólisis; por lo tanto, existen reacciones alternativas requeridas las tres etapas del camino glicolítico que involucran los mayores cambios de energía.

Estudios efectuados por Danforth (1961) acerca de la distribución de los carbonos del acetato durante la asimilación oxidativa son consistentes con la vía de asimilación del acetato.

El grado de superposición de estos caminos es variable. El ciclo de Krebs funciona para la oxidación tanto de los materiales de reserva como de los sustratos. Sus reacciones, con excepción de dos de ellas, forman parte también del ciclo del glioxilato correspondiente al camino de asimilación de sustratos.

En forma similar, varias de las enzimas glicolíticas que funcionan en la oxidación de sustratos, probablemente también actúen en la asimilación de los mismos.

VI.5. Respiración endógena

En ausencia de sustrato, *Euglena* presenta una respiración endógena, sugiriéndose entonces el uso de carbohidratos de reserva como sustratos endógenos (Danforth y Wilson, 1961). Estos

autores presentaron evidencias acerca de que las reservas de hidratos de carbono recientemente acumuladas y formadas por asimilación de sustrato eran las primeras en ser reoxidadas mediante el camino de oxidación de los materiales de reserva. Así, propusieron la existencia de una "reserva lábil" constituida por los carbohidratos recientemente sintetizados, los cuales se intercambiarían pero sólo en forma muy lenta, con un pool mayor de "reserva estable". La trehalosa, carbohidrato de reserva secundario, formaría parte de la "reserva lábil", a la cual también contribuiría el paramilon. Dado que éste se distribuye en la célula en forma de gránulos densos e insolubles, es muy posible que las capas superficiales de los mismos sean las últimas en ser sintetizadas pero las primeras en ser utilizadas.

VI.6. Utilización de sustratos exógenos

VI.6.1. Consideraciones generales

La capacidad de los euglenoides de utilizar sustratos exógenos como fuente de carbono y energía es limitada y varía significativamente entre especies y aún entre cepas.

Si bien no existe una explicación simple para esta especificidad en la utilización de los sustratos, es indudable que la permeabilidad constituye uno de los factores más importantes que limita la disponibilidad de los sustratos. Así, como resultado de diversos estudios surgió que los compuestos más rápidamente utilizados eran los ácidos acético y butírico y sus correspondientes alcoholes; los ácidos dicarboxílicos eran raramente empleados mientras que los tricarboxílicos no constituían sustrato para ninguna cepa.

La estimulación respiratoria es generalmente menor en medios neutros con sustratos acídicos, pero se incrementa a medida que el pH disminuye (Hunter y Lee, 1962) posiblemente debido a que las moléculas no ionizadas penetran más rápidamente que los iones polares. A pH's aún menores, los ácidos débiles son marcadamente tóxicos. La utilización de sustratos no iónicos como el etanol, es independiente del pH (Eshlman y Danforth, 1964) pero fuertemente dependiente de la concentración.

Todos estos resultados están de acuerdo con la regla general de que las moléculas pequeñas y débilmente polares penetran más fácilmente la membrana celular que aquellas grandes o altamente polares.

Danforth y Wilson (1957) encontraron evidencias de la existencia de dos mecanismos de penetración del acetato en *E. gracilis* var. *bacillaris*. El primero corresponde a las reglas discutidas anteriormente y el segundo propone un sistema de transporte tipo permeasa, específico para aniones acetato.

Estas limitaciones en la permeabilidad constituirían adaptaciones ecológicas a los habitats altamente ácidos o ricos en productos de fermentación (Hutner y Provasoli, 1951).

VI.6.2. Asimilación oxidativa del etanol

Así como el acetato, el etanol también puede servir como única fuente de carbono y energía para el crecimiento de la mayoría de los euglenoides.

Las evidencias existentes sugieren que la oxidación de las reservas intracelulares continúa durante el metabolismo del etanol, hecho ya observado en cultivos desarrollados en presencia de acetato.

Datos experimentales muestran que por cada mol de etanol consumido, se utilizan 0,97 moles de O_2 y se producen 0,29 moles de CO_2 . Esta estequiometría no puede ser explicada considerando que todo el etanol asimilado es convertido en carbohidratos. Se requieren cantidades considerables de producto más reducido que los carbohidratos para balancear la ecuación (Eshleman y Danforth, 1964). Existen evidencias de que se libera acetaldehído durante el metabolismo del etanol, pero las cantidades producidas no son suficientes para dar cuenta de dicho balance. La formación de CO_2 a partir de etanol es menor que la esperada si todo el etanol se asimilara vía ciclo del glioxilato. Así, si este ciclo funcionara completamente en este metabolismo, el etanol difícilmente se oxidaría mediante el ciclo de Krebs. Parece ser que el ciclo de los ácidos tricarbóxicos se halla detenido durante la utilización del etanol.

VI.6.3. Relación entre la asimilación oxidativa y el crecimiento

El descubrimiento de que los carbohidratos eran prácticamente los únicos productos directos de la asimilación del acetato originó serias dudas acerca del efecto del proceso de asimilación oxidativa sobre el crecimiento celular.

Como ya fue mencionado anteriormente, el acetato puede servir como única fuente de carbono. De acuerdo con esto, dicho sustrato debe ser convertido en todos los constituyentes orgánicos en proporción correspondiente a una célula normal. Sin embargo, por períodos de hasta 6 horas, durante el metabolismo del acetato, se forma predominantemente paramilon (Marzullo y Danforth, 1964). Si éste fuera el único proceso involucrado con el crecimiento, las células se convertirían en simples reservorios de paramilon. Aparentemente, todo el acetato asimilado se transformaría en paramilon, siendo éste posteriormente utilizado para formar otros constituyentes celulares. De acuerdo con estos resultados, el material para la síntesis de proteínas, lípidos, etc. provendría de la oxidación de los compuestos de reserva y no a través del camino primario del sustrato. Si es así, el metabolismo primario del sustrato sería un mecanismo de captura rápida con transformación y almacenamiento del mismo para un uso futuro.

REFERENCIAS

- Abraham, A. & Bachhawat, B.K. (1962), Biochim. Biophys. Acta 62, 376.
- Barry, S.C. (1962), J. Protozool. 9, 395.
- Belsky, M.M. & Schultz, J. (1962), J. Protozool. 9, 195.
- Berg, P. (1956), J. Biol. Chem. 222, 991.
- Buetow, D.E. & Buchanan, P.J. (1964), Exptl. Cell Res. 36, 204.
- Buetow, D.E. & Buchanan, P.J. (1965), Biochim. Biophys. Acta 96, 9.
- Danforth, W.F. (1961), J. Protozool. 8, 152.
- Danforth, W.F. (1968), "The Biology of *Euglena*" Vol II, Chapter 2, pp 55-71, (D.E. Buetow, ed.), Academic Press, New York - London.
- Danforth, W.F. & Wilson, B.W. (1957), J. Protozool. 4, 52.
- Danforth, W.F. & Wilson, B.W. (1961), J. Gen. Microbiol. 24, 95.
- Eshleman, J.N. & Danforth, W.F. (1964), J. Protozool. 11, 394.
- Feingold, D.S.; Neufeld, E.F. & Hassid, W.Z. (1958), J. Biol. Chem. 233, 783.
- Fellig, J. (1960), Science 131, 832.
- Griffiths, D.J. (1965), Sci. Progr. (London) 53, 553.
- Goldemberg, S.H.; Marechal, L.R. & De Souza, B.C. (1966), J. Biol. Chem. 241, 45.
- Gross, J. A. & Wolken, J.J. (1960), Science 132, 357.
- Haigh, W.G. & Beevers, H. (1964), Arch. Biochem. Biophys. 107, 147.
- Hunter, F.R. & Lee, J.W. (1962), J. Protozool. 9, 74.
- Hurlbert, R.E. & Rittenberg, S.C. (1962), J. Protozool. 9, 170.
- Hutner, S.H. & Provasoli, L. (1951), "Physiology and Biochemistry of Protozoa" (A. Lwoff, ed.), Vol I, pp 27-128, Academic Pres, New York.
- Krebs, H.A. & Kornberg, H. L. (1957), Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exptl. Pharmakol. 49, 212.

- Lehninger, A.L. (1964), "The Mitochondrion" pp. 132-139. Benjamin, New York.
- Marechal, L.R. & Goldemberg, S.H. (1964), J. Biol. Chem. 239, 3163.
- Marzullo, G. & Danforth, W.F. (1964), J. Gen. Microbiol. 34, 21.
- Meeuse, B.J.D. (1964), Bacteria 28, 67.
- Ohmann, E. (1964), Biochim. Biophys. Acta 82, 325.
- Perini, F.; Kamen, M.D. & Schiff, J.A. (1964 a), Biochim. Biophys. Acta 88, 74.
- Perini, F.; Schiff, J.A. & Kamen, M.D. (1964 b), Biochim. Biophys. Acta 88, 91.
- Price, C.A. (1962), Biochem. J. 82, 61.
- Rutter, W.J. (1964), Federation Proc. 23, 1248.
- Smillie, R.M. (1960), Plant Physiol. 35 (Suppl), XX.
- Smillie, R.M. (1963), Can. J. Botany 41, 123.
- Tocher, R.D. (1962), Master's Thesis, Univ. of Washington, Seattle, Washington.
- Vogel, K. & Barber, A.A. (1968), J. Protozool. 15 (4), 657.
- Wolken, J.J. & Gross, J.A. (1963), J. Protozool. 10, 189.

CAPITULO VII

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

VII.1. Introducción

VII.2. Distintas vías de metabolización de carbohidratos

VII.3. Incorporación y utilización de hexosas

VII.4. Gluconeogénesis

VII.5. Metabolismo del paramilon

VII.5.1. Función del paramilon

VII.5.2. Síntesis del paramilon

VII.5.3. Depolimerización del paramilon

VII.5.4. Control del metabolismo del paramilon

VII. METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

VII.1. Introducción

Los carbohidratos constituyen aproximadamente el 50% del peso seco de las células de *Euglena*. Lógicamente, esta proporción varía con las condiciones nutricionales y la fase de crecimiento del cultivo.

Entre los hidratos de carbono presentes se halla el pool endógeno de azúcares, oligosacáridos y azúcares fosforilados, pero el carbohidrato más importante cuantitativamente es el paramilon, encontrado en forma de inclusiones granulares.

Además, en los cloroplastos existen también carbohidratos asociados a galacto y sulfolípidos. Por otra parte, los productos segregados por los cuerpos mucíferos son en gran parte carbohidratos.

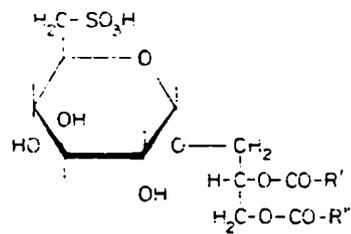
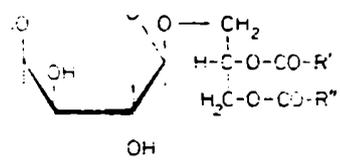
Carter y colaboradores (1961) aislaron monogalactosil glicerol de *E. gracilis* Z. Este parece haberse formado por deacilación de un diglicérido cuya estructura corresponde a la Figura 7.1.a. Los grupos acilos son derivados de ácidos grasos de cadena larga, particularmente ácidos poliinsaturados como el ácido α -linoleico (Hulanicka et al, 1964). James y Nichols (1966) encontraron en *Euglena* un digalactosil-diglicérido.

El único sulfolípido aislado e identificado en *E. gracilis* es el 2,3-diacil-1-(6-sulfo- α -D-quinovopiranosil)-D-glicerol (Rosenberg, 1963) (Figura 7.1.b).

Ambos glicolípidos se hallan en mayor cantidad en células verdes que en etioladas, encontrándose principalmente en cloroplastos.

Cramer y Myers (1952) midieron cuantitativamente la capacidad de *Euglena* para crecer en presencia de carbohidratos, usando un medio esencialmente autotrófico (Hutner et al, 1966). Así, observaron que *E. gracilis* var. *bacillaris* crecía perfectamente en glucosa a pH 4,5 mientras que la cepa Vischer bajo las mismas condiciones, era incapaz de utilizar la glucosa.

El consumo de glucosa depende de ciertos factores ambientales así como también de la cepa usada. De manera que:



b

FIGURA 7.1.: Estructura de glicolípidos identificados en *Euglena*
 a: Monogalactosil diglicérido (2,3-diacil-1-(D-galactopiranosil)-D-glicerol); b: 2,3-diacil-1-(6-sulfo-α-D-quinovopiranosil)-D-glicerol.

- 1) un incremento de la tensión de CO_2 a valores aproximadamente de un 5% produce un aumento en el crecimiento celular (Hurlbert y Rittenberg, 1962);
- 2) el pH del medio es crítico; la glucosa debe ser utilizada a pH 4,5 y no a 6,8 (Hurlbert y Rittenberg, 1962; Cook y Heinrich, 1965);
- 3) la concentración de glucosa es sumamente importante; no existe desarrollo a concentraciones menores que 0,2%, por encima de dicho valor, la velocidad de crecimiento aumenta con la concentración de glucosa, hasta 1%, siendo ésta la mayor utilizada;
- 4) las células crecidas en oscuridad, en un medio con glucosa se desarrollan inmediatamente al ser transferidas a un medio fresco con glucosa, mientras que las células autotróficas necesitan aproximadamente 10 días para crecer en un medio con glucosa en oscuridad.

No se ha observado desarrollo de *Euglena* en presencia de galactosa, manosa, glicerol, manitol y polímeros de hidratos; sin embargo, existen algunos datos acerca del crecimiento de *Euglena* en sacarosa (Hutner et al, 1956; Belsky, 1957) y en almidón (Hutner y Provasoli, 1951).

VII.2. Distintas vías de metabolización de carbohidratos

Durante el crecimiento fotoautotrófico, el CO_2 es la fuente primaria para la incorporación de carbono en metabolitos celulares y compuestos estructurales. El camino de la síntesis reductiva de carbohidratos en cloroplastos, a partir de CO_2 será tratado en el capítulo siguiente.

Los euglenoides heterótrofos obligados son capaces de incorporar el carbono de ácidos grasos y alcoholes de cadenas cortas, de ciertos aminoácidos y en algunos casos de azúcares en constituyentes celulares, incluyendo carbohidratos, así como también utilizar sustratos exógenos en procesos energéticamente positivos. El metabolismo oxidativo de estos sustratos ya fue tratado en el capítulo anterior.

Los datos existentes sugieren que en *Euglena*, tanto la hexosa exógena como la sintetizada autotrófica y heterotrófica-

mente se cataboliza mediante la vía de Embden-Meyerhof y el camino oxidativo de la pentosa fosfato. Aún no existen evidencias concluyentes como para excluir otros caminos, como la vía del ácido glucurónico (Landau y Katz, 1965).

VII.3. Incorporación y utilización de hexosas

La capacidad de utilizar hexosas varía según las especies y aún las cepas. El pasaje de estos sustratos y otras moléculas exógenas pequeñas a través de la membrana celular es probablemente un proceso selectivo y activo (Cirillo, 1961). Aún después de haber pasado esta barrera, las moléculas serán metabolizadas sólo si se hallan presentes los sistemas enzimáticos apropiados para su entrada en los caminos metabólicos intermedios. Así, dado el potencial genético existen células incapaces de utilizar ciertos compuestos, ya sea debido a la pérdida del sistema de transporte necesario en la membrana celular o a la falta del sistema enzimático metabolizante adecuado o a ambos, pero que pueden adaptarse al consumo de dichos sustratos. En el caso de las hexosas (en especial la glucosa), las condiciones ambientales del cultivo pueden influir facilitando o impidiendo su entrada y utilización.

Existen evidencias de que algunas cepas no pueden usar glucosa debido a la ausencia de la hexoquinasa (Hutner y Provasoli, 1951). Ohmann (1963) encontró que una determinada cepa de *E. gracilis* era incapaz de utilizar glucosa o glucosa-1-fosfato pero sí fructosa-1,6-difosfato. Este autor demostró la ausencia de las enzimas hexoquinasa y fosfofructoquinasa. El hecho de que no exista hexoquinasa explica la incapacidad de utilizar la glucosa, pero es difícil de entender la ausencia de fosfofructoquinasa ya que *Euglena* puede utilizar hexosa-fosfatos endógenos.

Numerosos investigadores (Cramer y Myers, 1952; App y Jagendorf, 1963; Cook y Heinrich, 1965) observaron la adaptación de *E. gracilis* a un medio conteniendo glucosa, debido posiblemente a una inducción de la hexoquinasa, la cual fue definida como "lábil" en ausencia de glucosa (Belsky, 1957). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la adaptación pueda deberse a una síntesis inducida del sistema de transporte

de la membrana celular.

VII.4. Gluconeogénesis

Como ya se mencionó anteriormente los euglenoides pueden crecer en presencia de numerosas fuentes de carbono que no sean carbohidratos. Los sustratos más estudiados son acetato, etanol y succinato habiéndose demostrado que los mismos se asimilan formando carbohidratos (hexosa fosfato y paramilon).

Euglena puede crecer también en presencia de ciertos intermediarios del ciclo de Krebs y de algunos aminoácidos que dan lugar a la formación de los mismos. En la Figura 7.2. se encuentran todas las rutas posibles hacia la formación de los productos hexosa fosfatos y paramilon.

Los pasos que llevan de fosfopiruvato a hexosafosfato involucran los mismos intermediarios que el camino glicolítico catabólico, con una sola excepción en cuanto a las enzimas relacionadas: la reacción catalizada por la fosfofructoquinasa es irreversible y se requiere una fosfatasa para hidrolizar la unión éster 1-fosfato. La enzima encargada de efectuar esta reacción es la fructosa-1,6-difosfatasa (Smillie, 1960, 1963, 1964).

En la Figura 7.2. se observa que los átomos de carbono de otros intermediarios del ciclo de Krebs pueden llegar al oxalacetato ya sea mediante las enzimas del ciclo de los ATC o por vía del glioxilato.

En *E. gracilis* se hallan presentes también la isocitrato-liasa, cuya actividad depende del estado nutricional de las células teniendo las autotróficas niveles menores que las heterotróficas, y la malato sintetasa. Estas enzimas, junto con las demás del ciclo del glioxilato, permiten que ácidos grasos de cadena corta, incluyendo el acetato, puedan metabolizarse a carbohidratos.

Otros ácidos grasos y alcoholes, en presencia de los cuales puede crecer *Euglena*, podrían ser convertidos en acetyl-CoA por procesos β -oxidativos y entrar en el camino gluconeogénico a través del ciclo del glioxilato.

Debe hacerse notar que son pocos los datos disponibles para poder efectuar un análisis de los distintos caminos gluco-

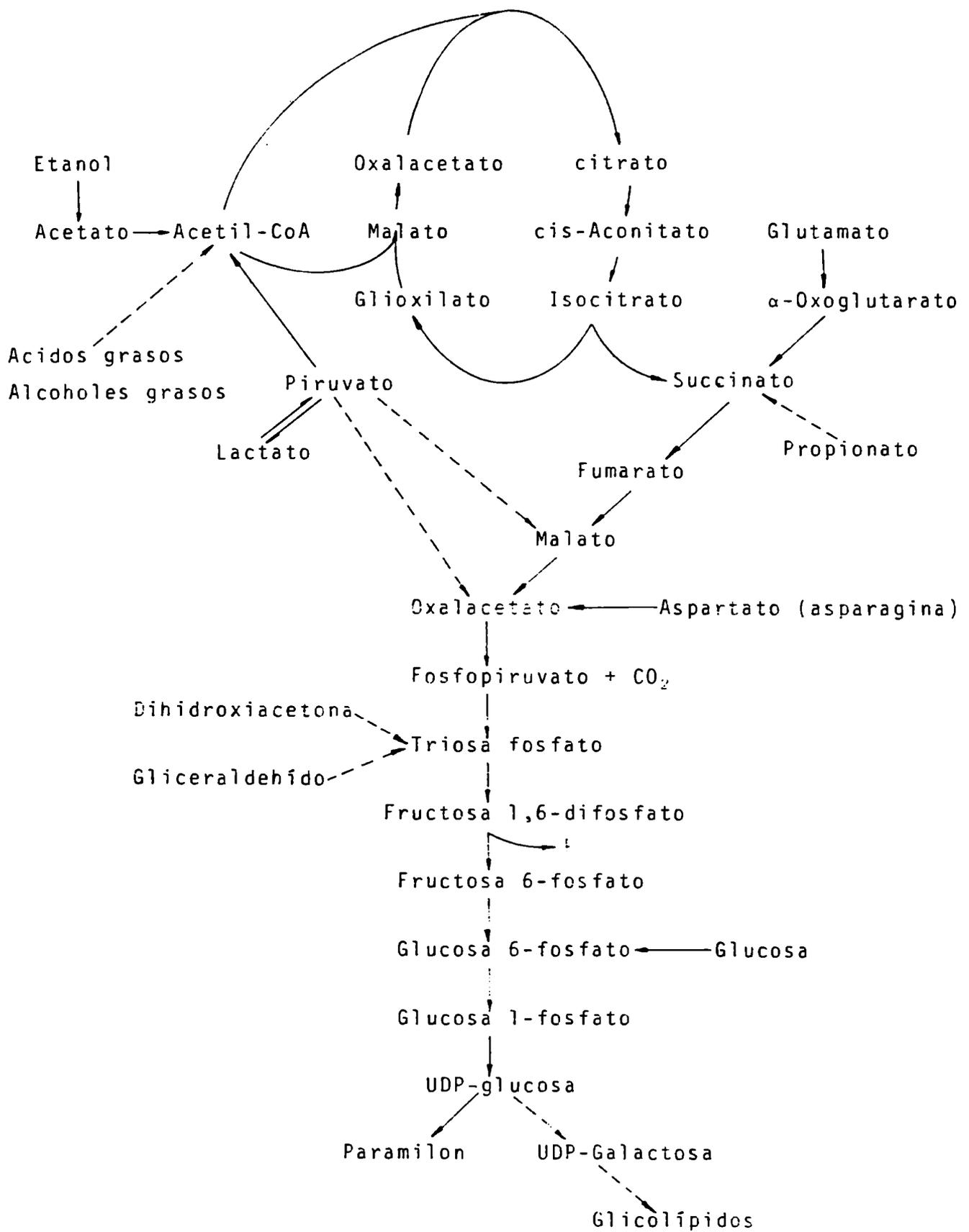


FIGURA 7.2.: Metabolismo general de Gluconeogénesis

neogenéticos en *Euglena*, de manera que para presentar un esquema metabólico definitivo se necesitan más evidencias. Haigh y Beevers (1964) sugirieron la existencia de vías desconocidas, dado que el isocitrato puede convertirse rápidamente en piruvato y también en glioxilato.

Wilson y Danforth (1958) estudiaron la gluconeogénesis a partir de acetato concluyendo que el 42% del sustrato utilizado era oxidado a CO_2 y el 58% remanente era asimilado a carbohidratos.

Estudios efectuados por Danforth (1961) con acetato marcado en el átomo de carbono del metilo o del carboxilo revelaron una distribución del ^{14}C en distintos carbohidratos, lo cual estaría demostrando el pasaje de dicho átomo a través del ciclo del glioxilato.

La utilización del acetato en la oscuridad por células crecidas autotróficamente requiere un período lag, para la adaptación que se obtiene completamente después de cuatro generaciones (Cook, 1965). Esto reflejaría una inducción de la acetatoquinasa la cual convierte el acetato en acetil-CoA (Abramam y Bachhawat, 1962; Ohmann, 1964) y también de la isocitrato liasa y de la malato sintetasa, enzimas que presentan una actividad alta en células crecidas con acetato (Reeves et al, 1962).

Wilson y Danforth (1958) demostraron que el etanol podía servir como única fuente de carbono para el crecimiento de *E. gracilis*. Aproximadamente el 71% del etanol utilizado por la var. *bacillaris* era asimilado a carbohidratos y posiblemente lípidos (Eshleman y Danforth, 1964).

En cuanto al succinato, éste parece penetrar la célula mediante un proceso de transporte activo específico (Levedahl, 1965). Este sustrato entraría directamente en el camino gluconeogénico vía el ciclo del glioxilato (Figura 7.2.).

Lynch y Calvin (1953) estudiaron la ruta heterotrófica de fijación de CO_2 . Estos autores demostraron que la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en la oscuridad originaba intermediarios del ciclo de Krebs y aminoácidos relacionados, así como también hexosas y triosafosfatos.

El hecho de que el malonato no inhibiera la incorporación de CO_2 y la falta de marcación en el C-6 de la glucosa fosfato formada durante la fijación en oscuridad, sugirió que esta ruta no sería la misma que la empleada durante la fotosíntesis.

VII.5. Metabolismo del paramilon

VII.5.1. Función del paramilon

Pringsheim (1956, 1963) observó la desaparición de los gránulos de paramilon en células de *Euglena* bajo condiciones de privación y en oscuridad, y su reaparición al exponerlas a la luz.

Blum y Buetow (1963) estudiaron la desaparición del paramilon después de la transferencia de *E. gracilis* var *bacillaris* blanqueada con estreptomycin, de un medio conteniendo acetato a uno careciendo de fuente de carbono. La división celular continuó durante 4-5 días y en ese lapso el contenido de paramilon decreció un 50%. 13 días después del cese de la división celular, el 90-95% de las células permanecía viable mientras que el contenido en material de reserva disminuyó un 90%. También se observó un decrecimiento en la cantidad de RNA y proteínas celulares, indicando esto que el paramilon no contribuiría a la síntesis neta de los constituyentes celulares bajo estas condiciones, pero sí actuaría como una fuente endógena de energía.

Utilizando cultivos sincrónicos de *E. gracilis* 2 crecida autotróficamente, Cook (1963) estudió el efecto de la luz sobre la acumulación y consumo de paramilon. Las células recibieron ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Durante la primera fase obtuvieron suficiente energía luminosa como para satisfacer todos los requerimientos para el crecimiento celular básico y un exceso como para permitir la acumulación de paramilon. Dicho período no tuvo la duración necesaria como para completar la síntesis de RNA y proteínas requeridas para la división celular. Así, durante el ciclo de oscuridad, en el cual ocurría división celular las reservas de paramilon fueron rápida y completamente agotadas.

Smillie et al (1963) investigaron la formación de cloroplastos en células crecidas en oscuridad y expuestas posterior-

mente a la luz. El paramilon constituía el 25-50% del peso seco de las células desarrolladas en oscuridad. Durante dicho período era consumido, agotándose totalmente en las primeras 24 horas de iluminación. En este tiempo existe un rápido incremento de las proteínas no cloroplásticas seguido de la formación de las correspondientes proteínas de los cloroplastos, probablemente a expensas de las citoplasmáticas. Dado que las células se suspendieron en un medio autotrófico, el paramilon fue utilizado como fuente de carbono para la síntesis de aminoácidos celulares y proteínas cloroplásticas.

Así, se concluyó que el paramilon constituía la reserva metabólica de hexosas para la producción oxidativa de energía y la fuente de carbono celular.

VII.5.2. Síntesis de paramilon

Hurlbert y Rittenberg (1962) y Smillie (1963) detectaron en *E. gracilis* las enzimas necesarias para convertir la G-6-P en UDPG: fosfoglucomutasa y UDPG-pirofosforilasa.

Goldemberg y Marechal (1963) y Marechal y Goldemberg (1964) describieron la transferencia enzimática de la glucosa marcada (pero no del UDPG, IDPG o UDP-3G) en un glucano con las propiedades del paramilon. Aparentemente, esta enzima no necesitaría de un "primer" para la reacción, si bien es posible que exista un "primer" endógeno en íntima asociación con la proteína enzimática.

En cuanto a la paramilon sintetasa, los glucósidos de bajo peso molecular y los oligosacáridos incluyendo la laminari-biosa, activan a esta enzima en un 20-30%. En ninguno de los casos se observó incorporación de dichos activadores en el polímero sintetizado. Feingold et al (1958) sugirieron que este proceso sería de naturaleza alostérica mientras que Leloir (1955) dedujo que los activadores serían intermediarios en la transferencia de la glucosa al polímero.

En la Figura 7.3. se detallan las reacciones involucradas en la síntesis de paramilon.

Sommer y Blum (1965) presentaron evidencias citoquímicas acerca de la presencia de una fosfatasa ácida ubicada en la su

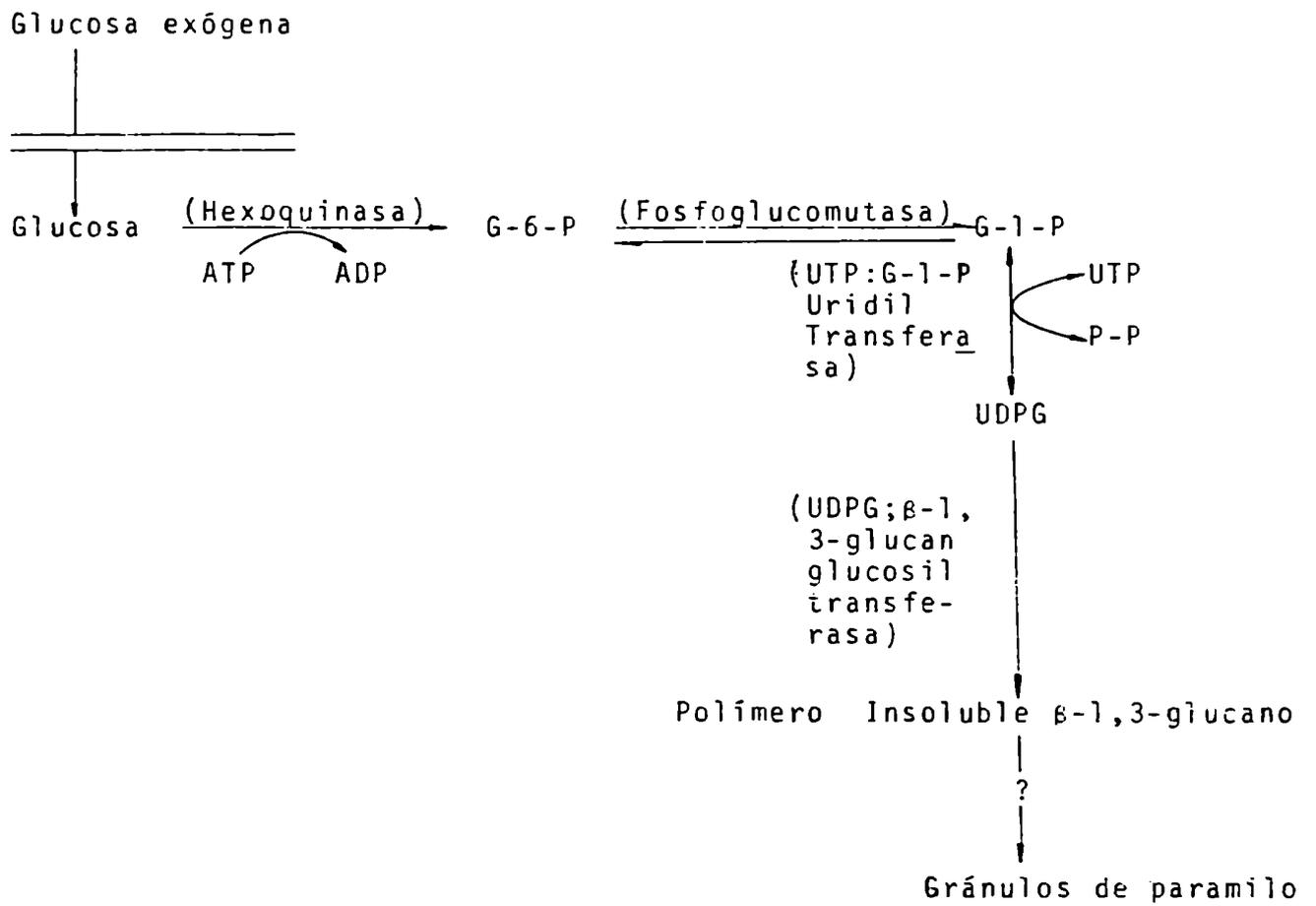


FIGURA 7.3.: Reacciones involucradas en la síntesis de paramilon

perficie de los gránulos de paramilon. Por otro lado, encontraron indicaciones de la existencia de una fuente endógena de fosfato ubicada también en dicha superficie. Esto podría deberse a la acción de una UDPG-pirofosforilasa localizada en la superficie seguida de una hidrólisis enzimática del pirofosfato liberado. Sin embargo, no existen evidencias directas de una asociación del sistema sintetizante de paramilon con el gránulo del mismo.

Por otro lado, se observó que durante el crecimiento autotrófico el paramilon se hallaba asociado a los pirenoides de los cloroplastos. Gibbs (1960) consideró que el pirenoide podría constituir un área de concentración enzimática que contendría parte de las enzimas del camino de síntesis del paramilon. Hollande (1942) sugirió que en ciertos casos los pirenoides se separarían de los cloroplastos y servirían como centros de síntesis de paramilon en el citoplasma.

Sin embargo, en la mayoría de las especies, los gránulos de paramilon no parecen estar asociados con ninguna estructura citoplasmática organizada y se encuentran libres en el citoplasma.

Blum y Buetow (1963) siguieron química y ultraestructuralmente la deposición de paramilon en células de *E. gracilis* var. *bacillaris* blanqueadas con estreptomycin y recuperadas de un período de privación de fuente de carbono. Estos investigadores midieron los niveles de paramilon al tratar las células privadas, con un medio suplementado con acetato y encontraron que la síntesis comenzaba a las pocas horas en células privadas durante 8 días o menos, mientras que existía un lag de 8 horas, para las células ayunadas durante 13 días. Después de 23-49 horas se evidenció nuevamente en el citoplasma la presencia de los gránulos de paramilon.

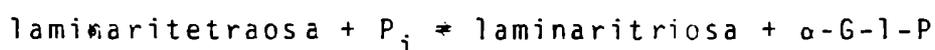
VII.5.3. Depolimerización del paramilon

Fellig (1960) detectó en *E. gracilis* Z la enzima β -1,3-glucano hidrolasa soluble, la cual depolimeriza la laminarina.

Marechal y Goldemberg (1964) encontraron que extractos de *E. gracilis* Z preparados con el método de Fellig (1960) degradaban al producto de la paramilon sintetasa liberando glucosa.

Barras y Stone (resultados no publicados) estudiaron el sistema de la β -1,3-glucano hidrolasa, en *E. gracilis* var. *bacillaris* blanqueada con luz U.V. A pesar de que los extractos crudos liberaban glucosa rápidamente a partir de la laminarina insoluble, se obtuvo muy poco producto a partir de laminarina modificada por oxidación con periodato y posterior reducción con borhidruro (Nelson et al, 1963). Así, se obtuvo una cantidad pequeña pero significativa de otros hidratos además de glucosa. Estos datos sugirieron la presencia en los extractos de endo y exohidrolasas.

La enzima laminaribiosa fosforilasa, aislada de *E. gracilis* Z (Marechal y Goldemberg, 1963; Goldemberg et al, 1966) produce la ruptura fosforolítica de los β ,3-glucosa oligosacáridos según:



(reacción 1)

Esta enzima es incapaz de atacar los gránulos nativos de paramilon, los gránulos tratados con álcali o el producto de la paramilon sintetasa durante su formación (Goldemberg y Marechal, 1963; Goldemberg et al, 1966).

En la Figura 7.4. se presenta un esquema tentativo de la depolimerización multienzimática del paramilon.

VII.5.4. Control del metabolismo del paramilon

En cepas crecidas bajo condiciones autotróficas, la acumulación de paramilon se halla controlada por la disponibilidad de energía fotoquímica. Una vez comenzada la síntesis de paramilon, su velocidad aumenta con el incremento de intensidad luminosa hasta llegar a un máximo observado a una intensidad saturante para todos los aspectos del crecimiento.

Por otro lado, el estudio de la distribución de ^{14}C a partir de bicarbonato o acetato marcado en diferentes fracciones obtenidas en diversas condiciones de crecimiento, aportó evidencias precisas del control estricto que la célula ejercería sobre la incorporación del carbono asimilado en paramilon y sobre su utilización selectiva durante la privación de fuentes exógenas de carbono (Blum y Buetow, 1963).

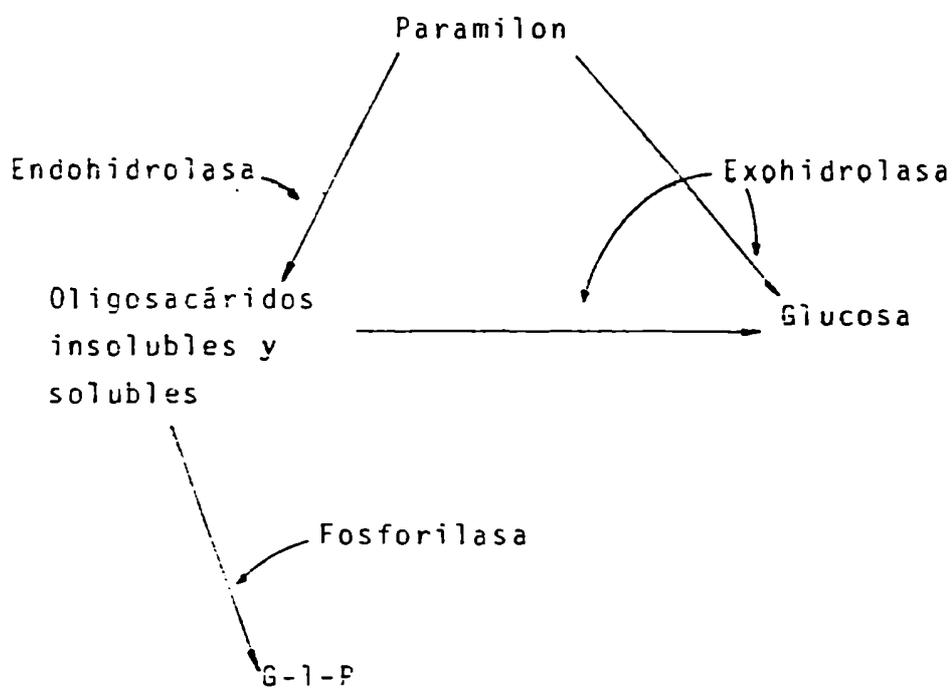


FIGURA 7.4.: Esquema tentativo de la depolimerización multienzimática del paramilon

Existen indicaciones (Smillie et al, 1963) de que en células en las cuales los cloroplastos se encuentran en desarrollo, el aumento en la velocidad de degradación del paramilon se debería a la síntesis de enzimas depolimerizantes. El incremento en la velocidad de síntesis del paramilon con el aumento de la intensidad luminosa (Cook, 1963) podría deberse a la síntesis de enzimas asociadas con la formación de paramilon o a la activación de las enzimas ya presentes.

REFERENCIAS

- Abraham, A. & Bachhawat, B.K. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 62, 376.
- App, A.A. & Jagendorf, A.T. (1963), *J. Protozool.* 10, 340.
- Belsky, M.M. (1957), *Bacteriol. Proc.* 57 (P47), 123.
- Blum, J.J. & Buetow, D.E. (1963), *Exptl. Cell Res.* 29, 407.
- Carter, H.E.; Ohno, K.; Nojima, S.; Tipton, C.L. & Stanacev, N.Z. (1961), *J. Lipid Res.* 2, 215.
- Cirillo, V.P. (1961), *Ann. Rev. Microbiol.* 15, 197.
- Cook, J.R. (1963), *J. Protozool.* 10, 436.
- Cook, J.R. (1965), *Plant Cell Physiol. (Tokyo)* 6, 301.
- Cook, J.R. & Heinrich, B. (1965), *J. Protozool.* 12, 581.
- Cramer, M. & Myers, J. (1952), *Arch. Mikrobiol.* 17, 384.
- Danforth, W.F. (1961), *J. Protozool.* 8, 152.
- Eshleman, J.N. & Danforth, W.F. (1964), *J. Protozool.* 11, 394.
- Feingold, D.S.; Neufeld, E.F. & Hassid, W.Z. (1958), *J. Biol. Chem.* 233, 783.
- Fellig, J. (1960), *Science* 131, 832.
- Gibbs, S.P. (1960), *J. Ultrastruct. Res.* 4, 127.
- Goldemberg, S.H. & Marechal, L.R. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* 71, 743.
- Goldemberg, S.H.; Marechal, L.R. & De Souza, B.C. (1966), *J. Biol. Chem.* 241, 45.
- Haigh, W.G. & Beevers, H. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 107, 147.
- Hollande, A. (1942), *Arch. Zool. Exptl. Gen.* 83, 1.
- Hulanicka, D.; Erwin, J. & Bloch, K. (1964), *J. Biol. Chem.* 239, 2778.
- Hurlbert, R.E. & Rittenberg, S.C. (1962), *J. Protozool.* 9, 170.
- Hutner, S.H. & Provasoli, L. (1951), "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (S.H. Hutner y A. Lwoff, eds.), Vol 1, p. 27. Academic Press, New York.

- Hutner, S.H.; Bach, M.K. & Ross, G.I.M. (1956), J. Protozool. 3, 101.
- Hutner, S.H.; Zahalsky, A.C.; Aaronson, S.; Baker, H. & Frank, O. (1966), "Methods in Cell Physiology" (D.W. Prescott, ed.), Vol 2, p. 217, Academic Press, New York.
- James, A.T. & Nichols, B.W. (1966), Nature 210, 372.
- Landau, B.R. & Katz, J. (1965), "Handbook of Physiology", Sect. 5: Adipose Tissue (A.E. Renold y G.F. Cahill, Sect. eds.), p. 253, Am. Physiol. Soc., Washington, D.C.
- Leloir, L.F. (1955), Proc. 3rd. Intern. Congr. Biochem. Brussels p.154, Academic Press, New York.
- Levedahl, B.H. (1965), Exptl. Cell Res. 39, 233.
- Lynch, V.H. & Calvin, M. (1953), Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 890.
- Marechal, L.R. & Goldemberg, S.H. (1963), Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 106.
- Marechal, L.R. & Goldemberg, S.H. (1964), J. Biol. Chem. 239, 5163.
- Nelson, T.E.; Scalletti, J.V.; Smith, F. & Kirkwood, S. (1963), Can. J. Chem. 41, 1671.
- Ohmann, E. (1963), Naturwissenschaften 50, 552.
- Ohmann, E. (1964), Biochim. Biophys. Acta 82, 325.
- Pringsheim, E.G. (1956), Nova Acta Leopoldina 18, 1.
- Pringsheim, E.G. (1963), "Farblose Algen" Fischer, Stuttgart.
- Reeves, H.C.; Kadis, S. & Ajl, S. (1962), Biochim. Biophys. Acta 57, 403.
- Rosenberg, A. (1963), Biochemistry 2, 1148.
- Smillie, R.M. (1960), Nature 187, 1024.
- Smillie, R.M. (1963), U.S. At. Energy Comm. BNL-6945.
- Smillie, R.M. (1964), "Fructose-1,6-diphosphatase and its role in gluconeogenesis" (R.M. Mc Gilvery y B.M. Pogell, eds.), p. 31. The American Institute of Biological Sciences, Baltimore, Maryland.
- Smillie, R.M.; Evans, W.R. & Lyman, H. (1963), Brookhaven Symp. Biol. 16, 89.

- Sommer, J.R. & Blum, J.J. (1965), J. Cell Biol. 24, 235.
- Wilson, B.W. & Danforth, W.F. (1958), J. Gen. Microbiol. 18, 535.

CAPITULO VIII

METABOLISMO FOTOSINTETICO

- VIII.1. Enzimas involucradas en el proceso de fotosíntesis
 - VIII.1.1. Ciclo reductivo del carbono
 - VIII.1.2. Transferencia fotosintética de electrones
- VIII.2. Componentes cloroplásticos involucrados en la fotosíntesis
 - VIII.2.1. Pigmentos
 - VIII.2.2. Lípidos
- VIII.3. Característica de la reacción de Hill
- VIII.4. Fotofosforilación

VIII. METABOLISMO FOTOSINTETICO

VIII.1. Enzimas involucradas en el proceso de fotosíntesis

VIII.1.1. Ciclo reductivo del carbono

El camino de fijación fotosintética de CO_2 en *Euglena* parece ser el típico encontrado en *Chlorella* y en numerosas plantas superiores. Esto se demostró por la aparición de compuestos marcados durante el crecimiento fotosintético de células de *Euglena* en presencia de $^{14}\text{CO}_2$ (Lynch y Calvin, 1953; Norris et al, 1955), hallándose presentes todas las enzimas del ciclo de Calvin. Algunas de estas enzimas, como la aldolasa son comunes a ambos sistemas: el camino reductivo fotosintético y la vía oxidativa respiratoria, aunque hay que destacar que tales proteínas no son necesariamente idénticas. A pesar de que el contenido de la aldolasa en células auto y heterotróficas es comparable, los estudios de distribución intracelular revelaron que el pasaje de un cultivo heterotrófico a uno autotrófico estaba acompañado de un marcado incremento en el contenido de esta enzima en cloroplastos y de una disminución de la cantidad de la aldolasa no plástica (Smillie, 1963). Una explicación para este comportamiento sería que la enzima citoplasmática penetrara en los cloroplastos mediante algún mecanismo desconocido o alternativamente que fuera inactivada o degradada con una síntesis paralela de una nueva aldolasa cloroplástica.

Esta última posibilidad parece ser la correcta ya que Rutter (1964) encontró en *Euglena* dos aldolasas distintas, una que requiere un metal divalente y otra que es independiente de la presencia de metales para expresar su actividad.

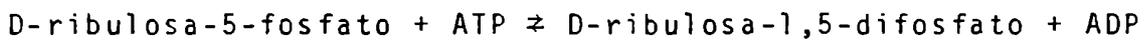
No es sorprendente entonces, que otras enzimas funcionales de los procesos de fotosíntesis y respiración incluyendo las triosafosfato y ribosafosfato isomerasas, la 3-fosfoglicerato quinasa y la transcetolasa existan en más de una forma en células autotróficas, difiriendo ligeramente en su estructura y propiedades catalíticas.

En organismos eucariotas como *E. gracilis*, numerosas enzimas del ciclo de Calvin parecen estar funcionalmente restringidas a los cloroplastos. Entre ellas han sido estudiadas las si

guientes:

- 1) D-ribulosa-5-fosfato quinasa;
- 2) D-ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa (carboxidismutasa);
- 3) NADP^+ -gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa;
- 4) fructosa-1,6-difosfatasa y sedoheptulosa-1,7-difosfatasa.

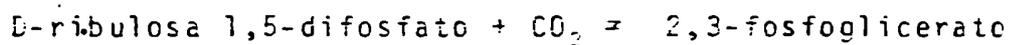
La D-ribulosa-5-fosfatoquinasa cataliza la fosforilación de la D-ribulosa-5-fosfato según:



(reacción 1)

Esta enzima ha sido medida en extractos de *Euglena* siguiendo la producción de ADP mediante un sistema enzimático acoplado conteniendo piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato y NADH. La oxidación del NADH se midió espectrofotométricamente.

La enzima D-ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa ha sido detectada en extractos de células crecidas autotróficamente, catalizando la reacción:



(reacción 2)

Las células heterotróficas crecidas en oscuridad contenían sólo trazas de esta enzima (Fuller y Gibbs, 1959).

La carboxidismutasa ha sido frecuentemente identificada con la mayor fracción proteica soluble de los cloroplastos conocida como Fracción I (Trown, 1965).

La enzima NADP^+ -gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa involucrada en la siguiente reacción:



(reacción 3)

es funcionalmente activa en el ciclo de Calvin. Esta enzima pue

de estar ausente o presente sólo en trazas, en *Euglena* adaptada a la oscuridad y en mutantes blanqueadas con estreptomycin (Fuller y Gibbs, 1959), siendo su síntesis rápidamente inducida cuando las células etioladas se exponen a la luz (Smillie et al, 1963; Hudock y Fuller, 1965).

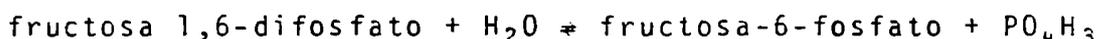
A pesar de que existe una coincidencia general entre los investigadores, acerca de que la enzima dependiente de NADP^+ es activa durante la fotosíntesis, no se puede aún asegurar que la misma enzima dependiente de NAD^+ no sea funcional en la fijación fotosintética del CO_2 . Así, en extractos preparados a partir de células autótrofas de *Euglena*, la NAD^+ -gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa es la más activa de las dos.

Smillie et al (1962) hallaron que esta última enzima era la única presente en bacterias fotosintéticas sulfúreas.

Hudock y Fuller (1965) consideraron la posibilidad de una interconversión de las dos enzimas *in vivo*, pero estos resultados no fueron corroborados en *Euglena*.

La sedoheptulosa-1,7-difosfatasa es una fosfatasa específica que convierte la sedoheptulosa-1,7-difosfato en sedoheptulosa 7-fosfato. Esta enzima funciona en el camino de fijación fotosintética de CO_2 , pero su actividad es relativamente baja.

Euglena posee dos hidrolasas que son específicas para el fosfato unido al carbono 1 de la fructosa 1,6-difosfato. Ambas catalizan la siguiente reacción:



(reacción 4)

Una de las enzimas muestra máxima actividad cerca de la neutralidad, mientras que la otra lo hace a pH's alcalinos.

En *Euglena* y también en plantas superiores, parece ser que la fructosa-1,6-difosfatasa neutra funciona durante la gluconeogénesis ligada a los mecanismos respiratorios.

En *Euglena*, esta enzima muestra 10 veces mayor afinidad para la fructosa-1,6-difosfato que la misma hidrolasa alcalina.

Ambas enzimas de *Euglena* son inhibidas por altas concentraciones de sustrato (5 mM o superiores).

La fructosa 1,6-difosfatasa alcalina es una enzima integral del ciclo reductivo del carbono, involucrado en el proceso de fotosíntesis. En mutantes blanqueadas con estreptomycin, esta proteína suele estar ausente o presente sólo en trazas.

En células autotróficas, la fructosa-1,6-difosfatasa alcalina se halla localizada en los cloroplastos.

Durante el verdeo de células etioladas (App y Jagendorf, 1963) o durante la adaptación de un medio heterótrofo a la luz a uno autotrófico (Smillie, 1963), su actividad varía en forma paralela a los cambios producidos en la clorofila.

En cuanto a sus propiedades, son semejantes a las de la fructosa-1,6-difosfatasa neutra, salvo su pH óptimo que es más alcalino y su constante de Michaelis que es mayor.

VIII.1.2. Transferencia fotosintética de electrones

Entre las proteínas pertenecientes al camino de transferencia fotosintética de electrones han sido identificadas y estudiadas principalmente las siguientes: la ferredoxina cloroplástica, una piridín-nucleótido transhidrogenasa y los cit's 552, b₆ y 558.

La ferredoxina cloroplástica (piridín-nucleótido reductasa) es una proteína que contiene Fe y participa en la fotorreducción del NADP⁺ por lamelas aisladas de cloroplastos (San Pietro y Lang, 1958). Shapiro (1961) y Smillie (1963) informaron acerca de su presencia en *Euglena*.

Esta enzima funciona entre la reducción del NADP⁺ y las reacciones foto-reductivas en los cloroplastos de *Euglena* y de numerosas otras fuentes.

En *Euglena*, la ferredoxina cloroplástica es autooxidable y contiene grupos Fe y S ácido-lábiles. Es reducida bajo condiciones anaeróbicas por ditionito o por una mezcla de transhidrogenasa cloroplástica y NADPH, lo cual da como resultado la desaparición de los picos de absorción a 420 y 460 mμ.

En cuanto a los cit's, existen dos que son fundamentales en cloroplastos de plantas superiores: el cit f, íntimamente relacionado con los cit's tipo c (Davenport y Hill, 1952) y un.

cit tipo b denominado por Hill (1954) cit b_6 . El cit f funciona en el fotosistema I posiblemente en un punto íntimamente relacionado con el fotoacto primario (Bonner y Chance, 1963).

En *Euglena*, Olson y Smillie (1963) encontraron un cit con una banda máxima α a 552 m μ en el estado reducido que presentaba un rol similar al cit f durante la fotosíntesis. Según estudios de distribución intracelular, el cit 552 se halla asociado enteramente a los cloroplastos (Smillie, 1963; Perini et al, 1964 b).

El cit 552 se considera un cit tipo c. Las propiedades de absorción de los piridina y cianuro hemocromos son similares a las de los hemocromos preparados a partir de los cit's de mamíferos y el tratamiento con Ag_2SO_4 da origen al hemo c (Perini et al, 1964 a). El cit 552 difiere de otros cit's tipo c de bajo peso molecular, por poseer una banda de absorción α asimétrica y un mayor contenido de triptofano (Perini et al, 1964 a). Wildner y Hauska (1974 a) informaron que cloroplastos aislados de *E. gracilis* Z retenían hasta un 50% del cit 552 comparado con el contenido en las células, lo cual dependía del proceso de aislación de los cloroplastos. Los autores concluyeron que este cit no estaba fuertemente unido a la membrana sino "atrapado" en los tilacoides de los cloroplastos. El cit 552 funcionaría como dador electrónico para el fotosistema I, mediando el flujo desde el cit 558.

Wildner y Hauska (1974 b) estudiaron la localización del cit 552 en la membrana cloroplástica empleando anticuerpos anti-cit 552. Estos investigadores dedujeron que el sitio de acción y la localización de estos cit's era dentro de los tilacoides.

El cit 552 contiene sólo un hemo como grupo prostético por molécula a diferencia del cit f que posee dos. Ben-Hayyim y Schejter (1973) estudiaron las propiedades del hemo ligado al cit 552 con el fin de compararlo con el cit c de mamíferos. A partir de sus resultados experimentales concluyeron que ambos cit's tenían aproximadamente el mismo peso molecular y en los dos casos, uno de los ligandos del Fe es un azufre de un resto metionina, debido a que presentan una banda de absorción a 695 nm, en su estado oxidado, lo cual indica que el sexto ligando del Fe hémico es un átomo de azufre de un residuo metionina.

Las células verdes de *Euglena* contienen un cit tipo b el cual correspondería al cit b₆ de los cloroplastos de plantas superiores (Hill, 1954). No se conoce mucho acerca de las propiedades de este cit de *Euglena*. Su grupo prostético sería probablemente el protohemo (Perini et al, 1964 a) y sus máximos de absorción para la forma reducida aparecen a 561, 530 y 432 m μ .

Ikegami et al (1970) informaron que este cit se reducía rápidamente cuando los cloroplastos se incubaban a pH 9,5; así, a pH's alcalinos, algunos reductores endógenos contenidos en los cloroplastos eran capaces de reducir este cit en la oscuridad, debido probablemente a un cambio en el potencial rédox del cit o de los reductores endógenos. Bajo las distintas condiciones experimentales empleadas durante este estudio, no se observaron diferencias apreciables en el comportamiento del cit 561 y otro cit tipo b llamado cit 558.

Ikegami et al (1970) postularon que el cit 558 presente en la cadena de transporte de electrones que también contiene al cit 552, puede ser fotooxidado rápidamente por el fotosistema I, mientras que en ausencia del cit 552 es oxidado lentamente, a través de una difusión de electrones entre cadenas adyacentes.

Además, estos autores demostraron la presencia de dos "pools" de transportadores de electrones, uno de los cuales estaría ubicado del lado reductor del fotosistema II (pool A) y otro del extremo oxidante (pool D).

En cuanto a la piridín-nucleótido transhidrogenasa, es una flavoproteína cloroplástica que puede utilizar NADH y NADPH como sustrato. Debido a la baja afinidad del primero por la enzima, su significado fisiológico es dudoso. En presencia de NADPH, la enzima reduce una variedad de aceptores, los cuales incluyen NADP⁺, ciertos análogos estructurales del NADP⁺, 2,6-diclorofenolindofenol, ferredoxina cloroplástica, cit f ó 552 (pero no el cit c de mamíferos), plastocianina, fitoflavina y flavinadenin nucleótidos.

La reacción es reversible y la enzima funciona *in vivo* como proteína terminal del camino fotosintético de transporte de electrones, transfiriendo los mismos desde la ferredoxina cloroplástica al NADP⁺

Las células de *Euglena* adaptadas al crecimiento en oscuridad y las permanentemente blanqueadas poseen una apreciable actividad de transhidrogenasa. Estudios efectuados por Smillie (1963) sugirieron que la enzima podría estar presente en los cloroplastos de las células verdes, así como también en el citoplasma.

La iluminación de células adaptadas a la oscuridad dio origen a un rápido incremento en la actividad de la transhidrogenasa después de una fase lag inicial de 10 a 14 horas (Lazzarini y San Pietro, 1963).

VIII.2. Componentes cloroplásticos involucrados en la fotosíntesis

VIII.2.1. Pigmentos

Euglena contiene clorofila b (absorción a 650 m μ) y clorofila a (absorción a 670 y 680 m μ). Cuando las células crecen a bajas intensidades luminosas (200 ft-c) se desarrolla otra forma de la clorofila a, que absorbe a 695 m μ .

Brown (1963) sugirió que posiblemente parte de la forma 670 de la clorofila a se convertiría en la forma 695 con el objeto de aprovechar energía luminosa adicional.

Olson (1963) presentó evidencias de la existencia de un pigmento el cual sería una forma de la clorofila a que "atrapa" energía. Olson relacionó este compuesto con la clorofila a 705 (Butler, 1961), el P700 (Kok y Hoch, 1961) y la clorofila a 695 (Brown y French, 1961).

Los estudios efectuados por Olson y Smillie (1963) llevaron a la conclusión de que existían dos sistemas pigmentarios funcionales, denominados sistema I y sistema II según la nomenclatura de Duysens y Amez (1962).

La clorofila a de larga longitud de onda, que absorbe a 683 m μ y otros pigmentos relacionados con ella constituyen el sistema I, mientras que el sistema II está formado por los pigmentos que absorben a cortas longitudes de onda: clorofila b y clorofila a 670, así como también los pigmentos accesorios que transfieren la energía luminosa a la clorofila a 670.

Krinsky et al (1964) determinaron la composición de los carotenoides en células crecidas en luz y oscuridad. La neoxantina se encuentra sólo en las células crecidas a la luz. La secuencia de su formación y desarrollo durante el enverdecimiento de cultivos etiolados sugirió que este carotenoide se hallaba íntimamente relacionado con el proceso de fotosíntesis.

Krinsky (1966) propuso que un ciclo-epóxido, involucrando zeaxantina y anteraxantina podrían proteger a las células de las oxidaciones fotosensibilizadas letales, ya que demostró que la epoxidación de la zeaxantina podía ocurrir sólo bajo ciertas condiciones (luz y O_2) las cuales producen fotosensibilización.

Posteriormente, la zeaxantina es regenerada en oscuridad por una de-epoxidación enzimática de la anteraxantina.

VIII.2.2. Lípidos

La información relativa al rol que poseen los lípidos en la fotosíntesis, ha sido obtenida comparando la composición lipídica de células verdes y etioladas. La diferencia más importante entre ellas es el porcentaje de la fracción de lípidos totales asociado con los fosfolípidos y los galactolípidos.

En células crecidas autotróficamente, el 70% de los lípidos totales se encuentra en la denominada "fracción pigmento", la cual está compuesta por galactosil-glicéridos, mientras que en células heterótrofas desarrolladas en oscuridad, sólo el 6% de los lípidos totales está asociado a esta fracción. En contraste, el contenido de fosfolípidos totales en células etioladas es un 74% del total de lípidos comparado con sólo un 21% en células autotróficas (Hulanicka et al, 1964). Más aún, la "fracción pigmento" de células crecidas en ausencia de luz, está desprovista completamente de lípidos que contienen galactosa (Hulanicka et al, 1964). Rosenberg (1963) demostró la presencia de lípidos conteniendo galactosa en células crecidas en oscuridad y en células blanqueadas, a pesar de que las primeras contenían sólo un 17% de la galactosa en la fracción lípidos totales comparado con las células verdes.

El sulfolípidos 6-sulfoquinovosil (1-1') diglicérido ha

sido detectado en ambos tipos de cultivo (Davies et al., 1965). En células verdes, los sulfolípidos se separan junto con la clorofila sugiriéndose que la mayor proporción de estos compuestos está localizada en los cloroplastos (Davies et al., 1965). Rosenberg y Parker (1964) demostraron que durante el proceso de verdeo, la cantidad de sulfolípidos se triplica. Aparentemente, la mayor función de los lípidos superficiales (galactosil glicéridos y sulfolípidos) parece ser la de estabilizar las membranas lipoproteicas (Weier y Benson, 1966).

Numerosos autores estudiaron qué tipo de ácidos grasos se encontraban presentes en células cultivadas en luz y oscuridad. Se observó así una relación directa entre el contenido de ácido α -linoleico y la capacidad de producir O_2 . En células crecidas en ausencia de luz, dicho contenido correspondía a un 0,8% de los ácidos grasos totales mientras que en células desarrolladas autotróficamente, este compuesto constituía el 32% del total antes indicado (Erwin y Bloch, 1963).

Aproximadamente, el 70% del α -linolenato encontrado en células verdes, se halla asociado a galactosil-glicéridos (Hulanicka et al., 1964), y más del 85% del mismo se encuentra localizado en los cloroplastos (Erwin y Bloch, 1963).

La cantidad de α -linolenato encontrada es función no sólo de las condiciones de crecimiento (luz u oscuridad) sino también de la concentración de CO_2 utilizada durante el desarrollo autotrófico (Erwin y Bloch, 1964).

Otro de los ácidos grasos hallado sólo en células verdes es el trans- Δ^3 -hexadecenoico (Van Deenen y Haverkate, 1966) esterificado exclusivamente con fosfatidil glicerol. Holton et al. (1964) sugirieron que los ácidos poliinsaturados serían probablemente componentes integrales de la membrana cloroplástica y su función sería de naturaleza estructural y no relacionada con la reacción bioquímica específica.

Threfall y Goodwin (1964) aislaron plastoquinona, α -tocoferol, α -tocoferol quinona y plastoquinona c, de células crecidas autotróficamente. Estudios de distribución intracelular indicaron que estas quinonas se hallaban localizadas en los cloroplastos.

VIII.3. Características de la reacción de Hill

Los estudios efectuados por Olson y Smillie (1963) y Katoh y San Pietro (1967 a, b, c) sugirieron la existencia de dos foto-reacciones conectadas por una cadena de transporte de electrones, que involucra cit's (Hill y Bendall, 1960). El reacoplamiento del sistema II al sistema I mediante el cit 552 parece reafirmar el esquema propuesto. Katoh y San Pietro (1967 a) propusieron dos mecanismos independientes para la inhibición de la reacción de Hill por efecto del calor y de los inhibidores 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) y atrazina. Estos autores sugirieron que el calentamiento destruiría la capacidad de los cloroplastos de oxidar H_2O pero permitiría la oxidación de sustancias más reducidas, como el ascorbato. La inhibición producida por los inhibidores antes nombrados, se debería a un bloqueo de la transferencia de electrones desde el sistema II hasta el cit 552.

Aparentemente el sistema de transporte de electrones en cloroplastos de *Euglena* sería semejante al encontrado en otros organismos fotosintéticos. Hasta el momento se ha aceptado el esquema propuesto por Ikegami et al (1970) (Figura 8.1.).

VIII.4. Fotofosforilación

Eversole y Wolken (1958) fueron los primeros en estudiar la fotofosforilación en *Euglena*.

Kahn (1966) observó que cloroplastos aislados eran capaces de catalizar la fotofosforilación no cíclica con ferricianuro. Kahn indicó también que la velocidad de fosforilación era la misma en dichas organelas tanto para las células crecidas autotrófica como para las desarrolladas heterotróficamente. Aparentemente, la baja velocidad observada se debería a un lento transporte de electrones y no a un posible desacoplamiento.

Chang y Kahn (1966) aislaron de cloroplastos un posible factor de acoplamiento de la fotofosforilación. Aparentemente esta enzima podría actuar también como una ATP-asa dependiente de Ca.

Aún no se ha podido establecer si la fotofosforilación ocurre en el sistema I ó II ó quizás en ambos.

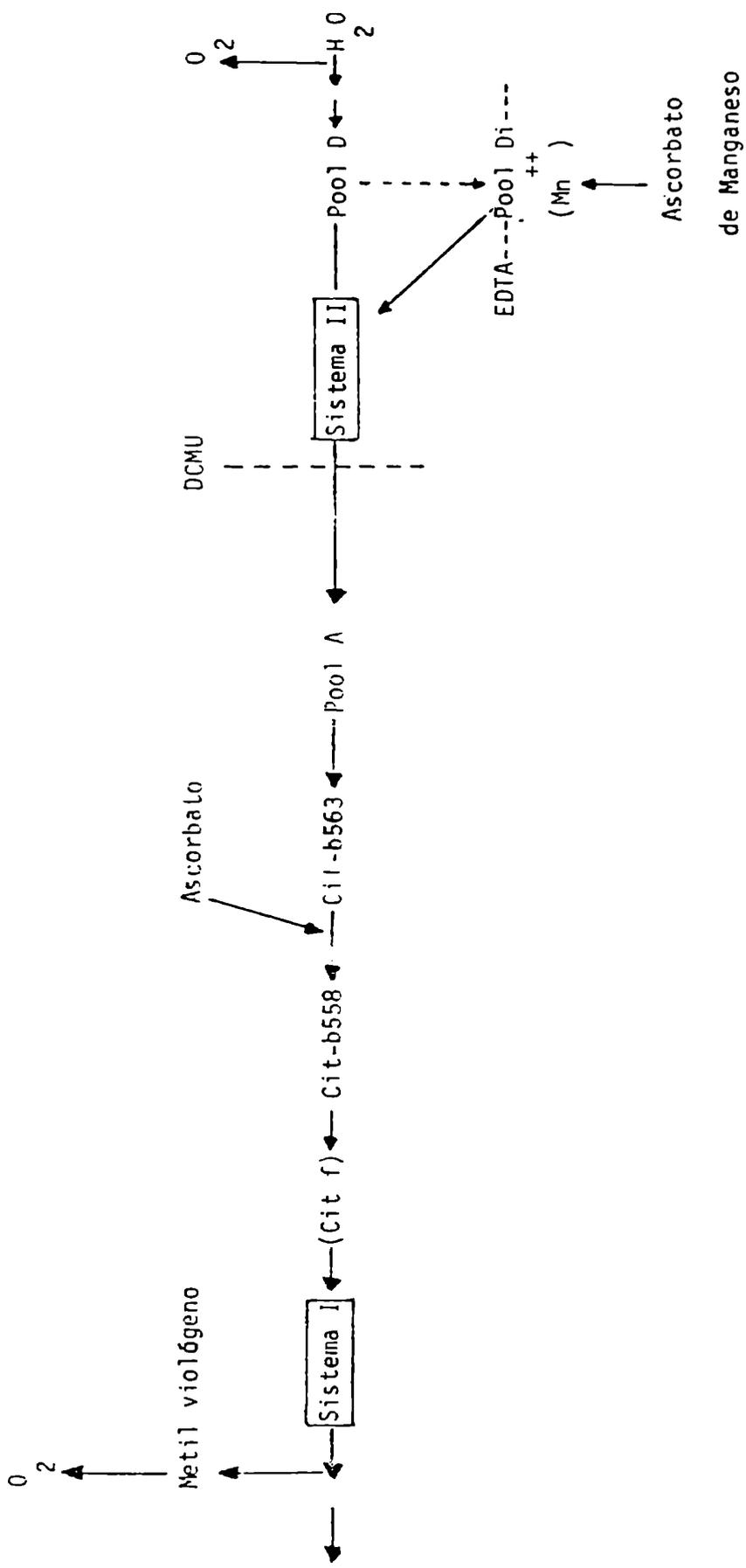


FIGURA 8.1.: Esquema tentativo para el transporte de electrones en cloroplastos de *Euglena*

REFERENCIAS

- App, A.A. & Jagendorf, A.T. (1963), J. Protozool. 10, 340.
- Ben-Hayyim, G. & Schejter, A. (1973), Eur. J. Biochem. 46, 569.
- Bonner, W.D. Jr, & Chance, B. (1963), "Photosynthetic Mechanisms of Green Plants ", Publ. 1145, p. 66, Natl. Acad. Sci. - Natl. Res. Council, Washington, D.C.
- Brown, J.S. (1963), Photochem. Photobiol. 2, 159.
- Brown, J.S. & French, C.S. (1961), Biophys. J. 1, 539.
- Butler, W.L. (1961), Arch. Biochem. Biophys. 93, 413.
- Carter, H.E.; Ohno, K.; Nojima, S.; Tipton, C.L. & Stanacev, N.Z. (1961), J. Lipid Res. 2, 215.
- Chang, J.C. & Kahn, J.S. (1966), Arch. Biochem. Biophys. 117, 282.
- Davenport, H.E. & Hill, R. (1952), Proc. Royal Soc. B 139, 327.
- Davies, W.H.; Mercer, E.D. & Goodman, T.W. (1965), Phytochemistry 4; 741.
- Duysens, L.N.M. & Amez, J. (1962), Biochim. Biophys. Acta 64, 243.
- Erwin, J.A. & Bloch, K. (1963), Biochem. Z. 338, 496.
- Erwin, J.A. & Bloch, K. (1964), Science 143, 1006.
- Eversole, R.A. & Wolken, J.J. (1958), Science 127, 1287.
- Fuller, R.C. & Gibbs, M. (1959), Plant Physiol. 34, 324.
- Hill, R. (1954), Nature 174 ,501.
- Hill, R. & Bendall, F. (1960), Nature 186, 136.
- Holton, R.W.; Blecker, H.H. & Onor, M. (1964), Phytochemistry 3, 595.
- Hudock, G.A. & Fuller, R.C. (1965), Plant Physiol. 40, 1205.
- Hulanicka, D.; Erwin, J. & Bloch, K. (1964), J. Biol. Chem. 239, 2778.
- Ikegami, I.; Katoh, S. & Takamiya, A. (1970), Plant Cell Physiol. 11, 777.
- Kahn, J.S. (1966), Biochem. Biophys. Res. Commun, 24, 329.

- Katoh, S. & San Pietro, A. (1967 a), Arch. Biochem. Biophys. 118, 488.
- Katoh, S. & San Pietro, A. (1967 b), Arch. Biochem. Biophys. 121, 211.
- Katoh, S. & San Pietro, A. (1967 c), Arch. Biochem. Biophys. 122, 144.
- Kok, B. & Hoch, G. (1961), "A Symposium on Light and Life" (W. D. Mc Elroy and B. Glass, eds.), p. 397, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
- Krinsky, N.I. (1966), "Biochemistry of Chloroplasts" (T.W. Goodwin, ed.), Vol I, p. 423. Academic Press, New York.
- Krinsky, N.I. ; Gordon, A. & Stern, A.I. (1964), Plant Physiol. 39, 441.
- Lazzarini, R.A. & San Pietro, A. (1963), "Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria", p. 453, Japan. Soc. Plant Physiologist, Univ. of Tokyo Press, Tokyo.
- Lynch, V.H. & Calvin, M. (1953), Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 890.
- Norris, L.; Norris, R.E. & Calvin, M. (1955), J. Exptl. Botany 6, 64.
- Olson, J.M. & Smillie, R.M. (1963), "Photosynthetic Mechanisms of Green Plants", Publ. 1145, p.56, Natl. Acad. Sci. Natl. Res. Council, Washington, D.C.
- Olson, R.A. (1963), "Photosynthetic Mechanisms of Green Plants" p. 545, Publ. 1145, Natl. Acad. Sci. - Natl. Res. Council, Washington, D.C.
- Perini, F.; Kamen, M.D. & Schiff, J.A. (1964 a), Biochim. Biophys. Acta 88, 74.
- Perini, F.; Schiff, J.A. & Kamen, M.D. (1964 b), Biochim. Biophys. Acta 88, 91.
- Rosenberg, A. (1963), Biochemistry 2, 1148.
- Rosenberg, A. & Parker, M. (1964), Biochemistry 3, 254.
- Rutter, W.J. (1964), Federation Proc. 23, 1248.
- San Pietro, A. & Lang, H.M. (1958), J. Biol. Chem. 231, 211.
- Shapiro, D.M. (1961), Ph. D. Thesis, Johns Hopkins, Univ. Baltimore, Maryland.

- Smillie, R.M. (1963), *Can.J. Botany* 41, 123.
- Smillie, R.M.; Rigopoulos, N. & Kelly, H. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 56, 612.
- Smillie, R.M.; Evans, W.R. & Lyman, H. (1963), In *Brookhaven Symp. Biol.* 16, 89.
- Threfall, D.R. & Goodwin, T.W. (1964), *Biochem. J.* 90, 40 p.
- Trown, P.W. (1965), *Biochemistry* 4, 908.
- Van Deenen, L.L. M. & Haverkate, F. (1966), " *Biochemistry of the Chloroplasts*" (T.W. Goodwin, ed.), Vol I, p. 117. Academic Press, New York.
- Weier, T.E. & Benson, A.A. (1966), " *Biochemistry of Chloroplasts*" (T.W. Goodwin, ed.) p. 91, Academic Press, New York.
- Wildner, G.H. & Hauska, G. (1974 a), *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 127.
- Wildner, G.H. & Hauska, G. (1974 b), *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 136.

CAPITULO IX

FIJACION HETEROTROFICA DE CO₂

IX.1. Introducción

IX.2. Fijación heterotrófica de CO₂

IX. FIJACION HETEROTROFICA DE CO₂

IX.1. Introducción

Lynch y Calvin (1953) observaron que los productos formados durante la fijación de CO₂ en oscuridad en *Euglena gracilis* eran diferentes que los de otros microorganismos investigados, ya sean fotosintéticos o no. Según el estudio de estos autores, no sólo se formaron los productos característicos de la fijación en oscuridad (ácidos málico, cítrico, aspártico y glutámico) sino también numerosos compuestos fosforilados típicos de la asimilación del CO₂ a la luz.

En el presente capítulo se tratarán de resumir las experiencias realizadas acerca de la fijación no fotosintética de CO₂ en *Euglena*.

IX.2. Fijación heterotrófica de CO₂

Lynch y Calvin (1953) efectuaron estudios cinéticos de fijación de CO₂ en oscuridad, utilizando *E. gracilis* var. *bacillaris*. Estos autores determinaron que la aparición temprana de compuestos fosforilados marcados no podía explicarse en términos de "efectos de preiluminación" pero representaba una diferencia notable entre la fijación de CO₂ en ausencia de luz en *Euglena* y en otros microorganismos investigados. La incorporación de CO₂ en condiciones de luz y oscuridad se ilustra en la Figura 9.1. A pesar de que el tiempo de incorporación fue distinto para las asimilaciones en ausencia y en presencia de luz (40 y 5 minutos respectivamente) y los resultados no son cuantitativamente comparables, se aprecian claramente diferencias cualitativamente importantes.

Primero, bajo condiciones de fijación fotosintética, los azúcares monofosfatos, los nucleótidos y las dextrinas representan un gran porcentaje de actividad (Figura 9.1.) y segundo, dicho porcentaje es mayor considerando succinato, malato, citrato, glutamato y alanina, durante la fijación en oscuridad. Sin embargo, los datos presentados no eliminan la posibilidad de que la asimilación de CO₂ en ausencia de luz con formación de azúcares fosforilados ocurra a través del mismo camino utilizado durante la fotosíntesis. Así, el CO₂ formaría parte de compuestos fosfo

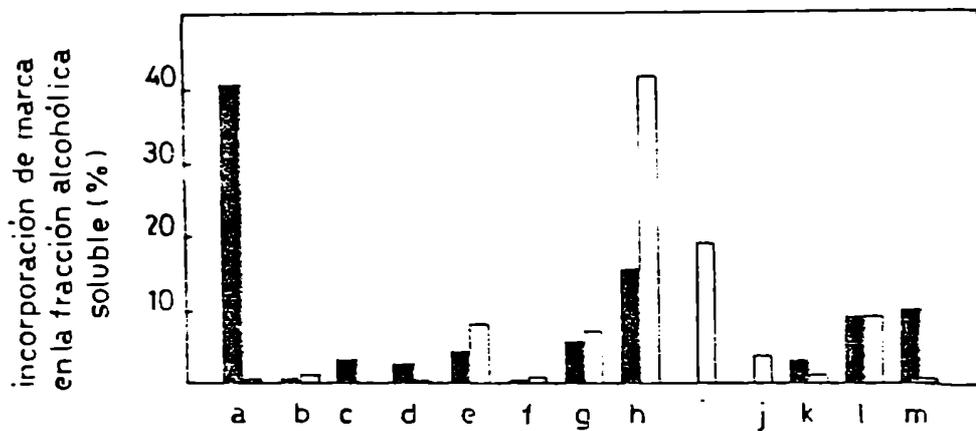


FIGURA 9.1.: Distribución del ^{14}C durante la fijación de CO_2 en *Euphonia gracilis* var. *bacillaris* (Lynch y Calvin, 1953).

■ Productos de la fijación de CO_2 después de 40 minutos; □ Productos de la fijación fotosintética de CO_2 después de 5 minutos.

a: succínico, b: fumárico; c: málico, d: cítrico, e: aspártico, f: fosfopirúvico, g: fosfoglicérico, h: azúcar monofosfato, i: nucleótidos, j: dextrinas, k: glutámico, k: serina y glicina, m: alanina.

rilados por su incorporación directa en ácido fosfoglicérido siendo la respiración o la fermentación los mecanismos proveedores de energía. La enzima necesaria para esta reacción ha sido identificada en numerosos organismos no fotosintéticos (Fuller, 1957) y en *E. gracilis* Z (Smillie, 1963; Hudock y Fuller, 1965).

Sin embargo, Moses et al (1959) comparando la incorporación de CO_2 en *Chlorella pyrenoidosa* y *Nostoc muscorum*, sugirieron que la incorporación de ^{14}C en azúcares durante la fijación en oscuridad, en *Euglena* se explicaría por reacción a través del ácido fosfogluconico antes que por carboxilación de la ribulosa difosfato para formar ácido fosfoglicérico.

Lynch y Calvin (1953) llevaron a cabo estudios de incorporación de 2- (^{14}C) -acetato a la luz en *Euglena*. Dicho compuesto se incorpora principalmente en lípidos (47% de actividad soluble) en presencia de luz y en menor grado (18%) en oscuridad. En la Figura 9.2. se comparan estos resultados con los de Cook (1965) quien estudió la incorporación de acetato en *E. gracilis* Z y con los de Levedahl (1965) quien utilizó *E. gracilis* var. *bacillaris* blanqueada con estreptomycin.

Según estos datos, la incorporación de acetato en lípidos aumenta por acción de la luz en organismos fotosintéticos. La fijación heterotrófica de CO_2 en cepas blanqueadas (Levedahl, 1966) no influye en la incorporación de acetato. Parecería ser que la fijación de CO_2 en células verdes no está relacionada con la conversión del acetato en lípidos o que el método de fijación sería diferente en células blanqueadas.

Si se acepta la explicación (Moses et al, 1959) de la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ en azúcares fosforilados en *Euglena*, aún existe el problema de cómo ocurre la "entrada" de dicho $^{14}\text{CO}_2$ en compuestos del ciclo de Krebs y ácidos relacionados. Moses et al (1959) sugirieron como alternativa que la principal carboxilación correspondería al ácido pirúvico.

Según trabajos originales de Wood y Werkman (1936), la fijación de CO_2 daría como resultado la formación de ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos. Las posibles rutas para la entrada de CO_2 son las siguientes:

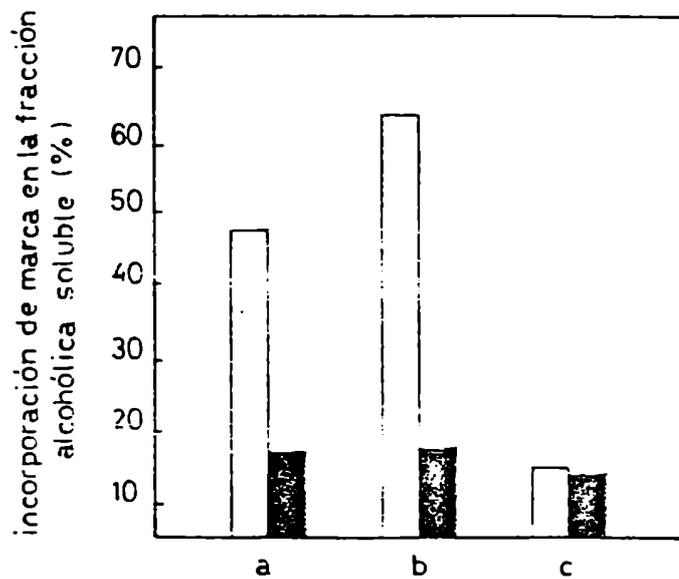
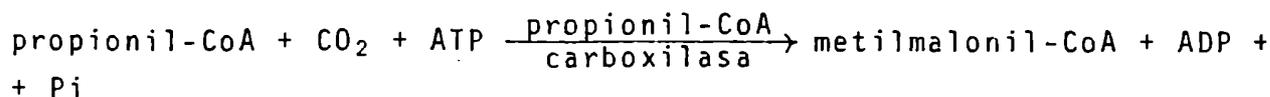
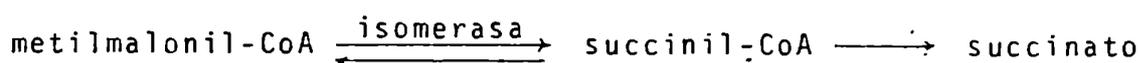


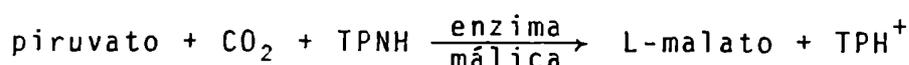
FIGURA 9.2.: Incorporación de acetato en lípidos en *Euglena*.
a: Resultados de Lynch y Calvin (1953) empleando *E. gracilis* var. *bacillaris*. □ : luz; ■ oscuridad.
b: Resultados de Cook (1965) utilizando *E. gracilis* Z. □ : luz; ■ oscuridad.
c: Resultados de Levedahl (1966) empleando *E. gracilis* var. *bacillaris* blanqueada con estreptomina. □ : aire; ■ aire + CO₂



(reacción 1)



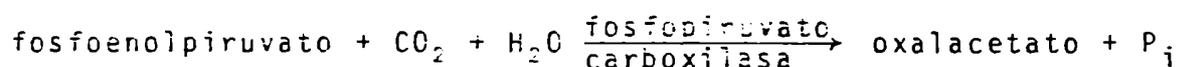
(reacción 2)



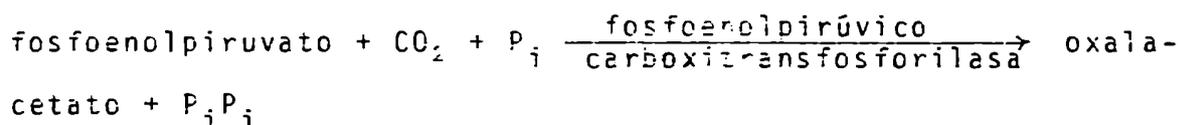
(reacción 3)



(reacción 4)



(reacción 5)



(reacción 6)

De todas estas enzimas, sólo se ha identificado y estudiado en *Euglena* la involucrada en la reacción 3 (Smillie, 1963).

Si el CO₂ se fija mediante la acción de la propionil-CoA carboxilasa, se esperaría que las características de crecimiento de *Euglena* adaptada al desarrollo en propionato, se encuentren afectadas por la adición de CO₂ (Abraham y Bachhawat, 1962). Sin embargo, este no es el caso, por lo menos para una mezcla CO₂-aire (10%-90%).

Las demás enzimas nombradas no han sido encontradas en *Euglena*. Levedahl (1967) trató de interpretar los efectos del CO₂ en el metabolismo del succinato suponiendo que se hallaban presentes todas estas enzimas.

Cuando *Euglena* metaboliza el 2-3(¹⁴C)-succinato, aproxi

madamente el 47% de este carbono aparece en los lípidos, durante un período de 15', si se burbujea aire a través de la mezcla de incubación. Sin embargo, si se utiliza una mezcla CO₂-aire (5%-95%), los carbonos del succinato se distribuyen en forma distinta.

Los efectos del CO₂ en el metabolismo del succinato en *Euglena* resultan de su influencia en numerosas reacciones independientes dentro del organismo.

Aparentemente, *Euglena* sería un ejemplo de un modelo particular de fijación de CO₂ en oscuridad o heterótrofamente. Este modelo mostraría dos vías directas de incorporación de CO₂. La primera correspondería a la reacción vía ácido fosfogluónico (Moses et al, 1959) mientras que la segunda sería la incorporación en oxalacetato probablemente a través del fosfoenolpiruvato (Levedahl, 1968). Sin embargo, hasta el momento, todavía quedan numerosos aspectos por resolver. Lo que sí se halla claro es que la presencia del CO₂ modifica el metabolismo de diferentes fuentes de carbono, en forma distinta.

REFERENCIAS

- Abraham, A. & Bachhawat, B.K. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 62, 376.
- Cook, J.R. (1965), *Plant Cell Physiol (Tokyo)* 6, 301.
- Fuller, R.C. (1957), *Brookhaven Natl. Lab. Rept.* BNL -3415.
- Hudock, G.A. & Fuller, R.C. (1965), *Plant Physiol.* 40, 1205.
- Levedahl, B.H. (1966), *Exptl. Cell Res.* 44, 393.
- Levedahl, B.H. (1967), *Exptl. Cell Res.* 48, 125.
- Levedahl, B.H. (1968), "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol II, Chapter 4, pp 85-96. Academic Press, New York - London.
- Lynch, V. & Calvin, M. (1953), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 56, 890.
- Moses, V.; Holm-Hansen, O. & Calvin, M. (1959), *J. Bacteriol.* 77, 78.
- Smillie, R.C. (1963), *Can J. Botany* 41, 123.
- Wood, H.G. & Werkman, C.H. (1936) *Biochem. J.* 30, 48.

CAPITULO X

METABOLISMO DE LIPIDOS

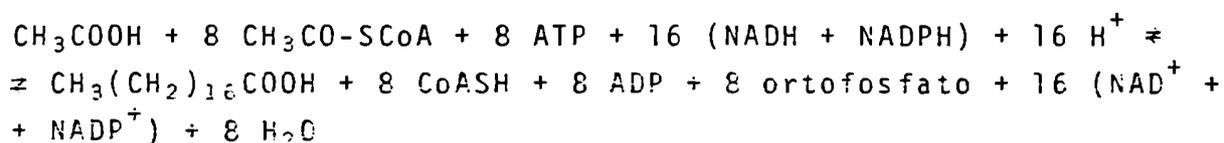
- X.1. Enzimas del metabolismo lipídico
 - X.1.1. Síntesis de ácidos grasos de cadena larga
 - X.1.2. Interconversión y síntesis de pigmentos
- X.2. Composición de los lípidos
- X.3. Influencia fisiológica y del medio ambiente en la biosíntesis de lípidos
 - X.3.1. Efecto del crecimiento en luz y oscuridad
 - X.3.2. Efecto de inhibidores metabólicos

X. METABOLISMO DE LIPIDOS

X.1. Enzimas del metabolismo lipídico

X.1.1. Síntesis de ácidos grasos de cadena larga

Cheniae y Kerr (1965) describieron en *Euglena* el sistema enzimático soluble que cataliza la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga, a partir de acetil-CoA. La reacción total estaría representada por:



(reacción 1)

incorporándose el 60-70% del sustrato en ácidos grasos conteniendo de 16 a 20 átomos de carbono.

El mecanismo de síntesis de ácidos grasos en *Euglena* parece diferir de los caminos conocidos, especialmente en la reversión de la vía de la β -oxidación y en los caminos que involucran la formación de malonil-CoA.

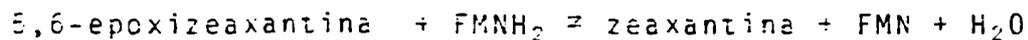
En *Euglena*, también se hallan presentes dos sistemas enzimáticos distintos para la formación de ácidos grasos no saturados; uno predomina en células heterotróficas y el otro en las autotróficas (Nagai y Bloch, 1965).

El primero cataliza la desaturación de tioésteres acil-CoA de cadena larga, lo cual ocurre en células heterótrofas crecidas en oscuridad y el segundo forma ácidos grasos no saturados de cadena larga a partir de los de cadena corta o mediante desaturasas específicas (síntesis de ácido oleico a partir de esteárico). En esta última reacción participan por lo menos, tres proteínas, una desaturasa específica, una NADPH oxidasa y la ferredoxina cloroplástica, en presencia de NADPH y O_2 (Nagai y Bloch, 1966)

X.1.2. Interconversión y Síntesis de Pigmentos

Alrededor del 75% de los carotenoides de *Euglena* se hallan como epóxidos.

Bamji y Krinsky (1965) investigaron la disminución en la cantidad de epóxidos al transferir las células verdes a la oscuridad, en condiciones anaeróbicas. Estos autores demostraron que homogenatos libres de células (verdes) son capaces de llevar a cabo una de-epoxidación de la 5,6-epoxizeaxantina endógena (anteroxantina), la cual constituye el mayor pigmento epóxido de las células verdes. Dicha de-epoxidación ocurre según:



(reacción 2)

anaeróbicamente, en oscuridad y en presencia de FMNH₂ (o de una mezcla de malato, NADP⁺ y FMN) como fuente de poder reductor.

La de-epoxidación puede ocurrir también a la luz, en presencia de FMN, trabajando con preparaciones provistas de cloroplastos activos. Krinsky (1964) demostró la existencia de de-epoxidación fotoquímica en células intactas.

X.2. Composición de los lípidos

La composición lipídica en *Euglena* comprende los siguientes compuestos:

- a) ácidos grasos: i) saturados, especialmente mirístico y palmítico
ii) no saturados, fundamentalmente oleico y hexadecenoico.

En general, predominan los ácidos grasos saturados y no saturados, que contienen 14 a 20 átomos de carbono. Además, los no saturados presentan usualmente configuración cis. La doble ligadura de los ácidos grasos monoenoicos se localiza entre los átomos de carbono 9 y 10, por ejemplo, los ácidos palmitoleico (9-C₁₆) y oleico (9-C₁₈).

En cuanto a los ácidos grasos que contienen dobles uniones múltiples, difieren en la longitud de la cadena carbonada, en el grado de insaturación y en la localización de las dobles uniones. De estos, los más abundantes son los ácidos α -linoleico (9,12,15-C₁₈), γ -linoleico (6,9,12-C₁₈) y araquidónico (5, 8, 11, 14-C₂₀).

Los compuestos del tipo α -linoleico se hallan ampliamente distribuidos en microorganismos fotosintéticos, plantas superiores y protistas con comportamiento de tipo vegetal; en contraste, los ácidos grasos poliénoicos de la serie de los γ -linoleicos se encuentran generalmente en animales superiores y en protistas con comportamiento de tipo animal.

b) ésteres de glicerol de ácidos grasos: i) glicéridos neutros, en los cuales el glicerol se halla esterificado con uno, dos o tres residuos de ácidos grasos (mono, di y triglicéridos). *Euglena* contiene cantidades sustanciales de di o triglicéridos, hecho que depende de las condiciones de cultivo. Los primeros estarían involucrados en la formación de glicolípidos y los segundos en la reserva de carbono (Hulanicka et al, 1964).

ii) diglicéridos unidos a una molécula más polar, generalmente un éster de fosfatos (fosfolípidos) o un azúcar (glicolípidos). De los fosfolípidos hallados en *Euglena*, la lecitina o fosfatidilcolina, la fosfatidil etanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidil inositol son los más importantes (Rosenberg, 1963 ; Hulanicka et al, 1964). En cuanto a los glicolípidos, *Euglena* sintetiza galactolípidos (Carter et al, 1961; Rosenberg, 1963; Hulanicka et al, 1964) y sulfolípidos (Rosenberg, 1963; Davies et al, 1966). La estructura del sulfolípidos hallado en *Euglena* corresponde a un (6-sulfoquinovosil)-1-diglicérido (Davies et al, 1966).

c) esteroides: el ergosterol es el esteroide más importante encontrado en *Euglena*, el cual representa el 0,05-0,1% del peso seco total del organismo (Stern et al, 1960).

d) carotenoides: la anteroxantina (3,3'-dihidroxi-5,6-epoxi- β -caroteno), el β -caroteno y la neoxantina constituyen los carotenoides más importantes (Krinsky y Goldschmidt, 1960). La criptoxantina y el γ -caroteno se encuentran también pero en menor proporción. Schimmer y Krinsky (1966) determinaron la estructura de la neoxantina, concluyendo que era un 3,3',5'-trihidroxi-6-hidro-5,6-epoxi- β -caroteno.

X.3. Influencia fisiológica y del medio ambiente en la biosíntesis de lípidos

X.3.1. Efecto del crecimiento en luz y oscuridad

Euglena posee la capacidad genética de producir las enzimas de los caminos del α -linolenato y del γ -linolenato y de mimetizar los modos de vida de "animales" y "plantas", creciendo fotoautotróficamente a la luz y adaptando su desarrollo en oscuridad a medios orgánicos mediante supresión de las organelas fotosintéticas. Así, *Euglena* ofrece la oportunidad de estudiar la relación existente entre la actividad fisiológica y la estructura lipídica.

Euglena crecida a la luz en medio orgánico, contiene grandes cantidades de ácido α -linoleico (Erwin y Bloch, 1962, 1963) mientras que la desarrollada en oscuridad posee ácidos poliénoicos de C_{20} , C_{22} y C_{24} del tipo γ -linolenato. Este hecho está relacionado con la existencia de cloroplastos funcionales. A pesar de que *Euglena* posee la información genética necesaria para la síntesis de las familias de los ácidos α - y γ -linoleico, el primero depende de la fotosíntesis para su acumulación mientras que el segundo se encuentra en los microorganismos que obtienen su energía a partir de compuestos orgánicos.

Rosenberg et al (1965) encontraron que el α -linolenato era exclusivamente un constituyente cloroplástico en *Euglena* fotosintética. La ausencia de cantidades significativas de α -linolenato en *Euglena* heterotrófica no se debería aparentemente a la cesación de su síntesis. Experiencias realizadas con *Euglena* crecida en la oscuridad, indican que la síntesis de α -linolenato continúa a velocidad significativa pero en lugar de acumularse, penetra en el camino de formación de ácidos poliénoicos (de tipo animal) en el cual existe una elongación de la cadena y una desaturación para producir primariamente ácido eicosapentaénoico, componente fundamental de células heterotróficas (Hulanicka et al, 1964) (Figura 10.1.).

La adaptación de la *Euglena* fotosintética a un medio heterotrófico está acompañada de un reemplazo de los galactolípidos y diglicéridos por fosfolípidos, especialmente lecitina (Hulanicka et al, 1964). Cuando *Euglena* crecida heterotróficamente se ilumina y comienza el desarrollo de los cloroplastos, primero

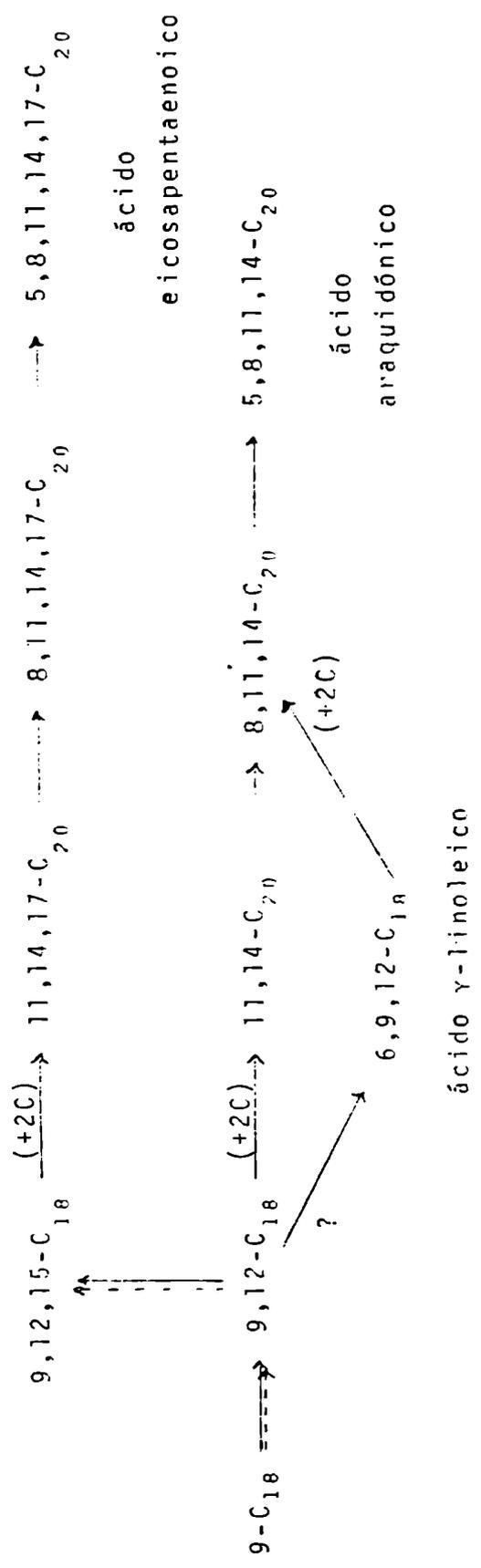


FIGURA 10.1.1.: CAMINOS DE CONVERSION DE ACIDOS POLIINSATURADOS DE C₁₈ Y C₂₀ EN Euglena
 Las flechas llenas indican el camino para las células heterotróficas mientras que las punteadas corresponden al de las células fotoautotróficas.

aparecen los sulfolípidos seguidos de la clorofila y los galactolípidos (Rosenberg y Pecker, 1964).

Prácticamente, todo el ácido α -linoleico y los ácidos grasos poliénoicos de C_{16} en *Euglena* fotoautotrófica se encuentran en los galactolípidos (Hulanicka et al, 1964) y en los sulfolípidos (Davies et al, 1965). En contraste, la mayoría de los ácidos grasos poliénoicos de C_{20} , C_{22} y C_{24} del tipo γ -linolenato se hallan en los fosfolípidos en *Euglena* crecida heterotróficamente (Hulanicka et al, 1964).

X.3.2. Efecto de inhibidores metabólicos

Aaronson y Bensky (1965) estudiaron el efecto de una variedad de agentes hipercolesterémicos, incluyendo el triparanol, en *Euglena* y otros protistas. Estos investigadores informaron que la inhibición del crecimiento producida por estos compuestos, podía revertirse por adición de ácidos grasos no saturados pero no por esteroides. Rosenbaum et al (1965) sugirieron que el triparanol sería un inhibidor de la biosíntesis de los ácidos grasos no saturados pero no actuaría a nivel de la formación del ergosterol.

REFERENCIAS.

- Aaronson, S. & Bensky, B. (1965), J. Protozool. 12, 236.
- Bamji, M.S. & Krinsky, N.I. (1965), J. Biol. Chem. 240, 467.
- Carter, H.E.; Ohno, K.; Nojima, S.; Tipton, C.L. & Stanacev, N.Z. (1961), J. Lipid Res. 2, 215.
- Cheniae, G.M. & Kerr, P.C. (1965), Plant Physiol. 40, 452.
- Davies, W.H.; Mercer, E.I. & Goodwin, T.W. (1965), Phytochemistry 4, 741.
- Davies, W.H.; Mercer, E.I. & Goodwin, T.W. (1966), Biochem. J. 98, 369.
- Erwin, J. & Bloch, K. (1962), Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 103.
- Erwin, J. & Bloch, K. (1963), Biochem. Z. 338, 496.
- Hulanicka, D.; Erwin, J. & Bloch, K. (1964), J. Biol. Chem. 239, 2778.
- Krinsky, N.I. (1964), Biochim. Biophys. Acta 88, 487.
- Krinsky, N.I. & Goldschmidt, T.H. (1960), Arch. Biochem. Biophys. 91, 271.
- Nagai, J. & Bloch, K. (1965), J. Biol. Chem. 240, 3702.
- Nagai, J. & Bloch, K. (1965), J. Biol. Chem. 241, 1925.
- Rosenbaum, N.; Erwin, J. & Holz, G.G. (1965), "Progress in Protozoology" Intern. Conf. Protozool., 2nd, London, pp. 273-274. Excerpta Medica Foundation, New York.
- Rosenberg, A. (1963), Biochemistry 2, 1145.
- Rosenberg, A. & Pecker, M. (1964), Biochemistry 3, 254.
- Rosenberg, A.; Pecker, M. & Moschides, E. (1965), Biochemistry 4, 680.
- Schimmer, B.P. & Krinsky, N.I. (1966), Biochemistry 5, 1814.
- Stern, A.I.; Schiff, J.A. & Klein, H.P. (1960), J. Protozool. 7, 52.

METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS

XI.1. Enzimas involucradas

XI.2. Contenido y variación

XI.3. Ribosomas y síntesis de polipéptidos

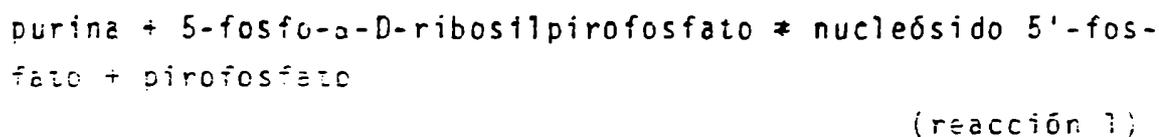
XI.4. Regulación de la síntesis de proteínas cloroplásticas

XI. METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS

XI.1. Enzimas involucradas

Se han encontrado y estudiado en *Euglena* las siguientes enzimas pertenecientes al metabolismo de los ácidos nucleicos;

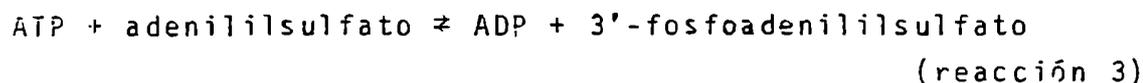
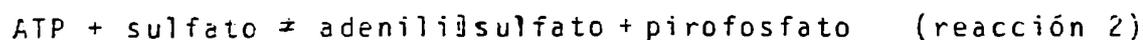
- a) Fellig y Wiley (1960) informaron acerca de las propiedades de la ribonucleasa de *Euglena*, la cual es menos específica que la pancreática ya que degrada tanto a los ácidos poliurídico y poliadenílico como al RNA.
- b) Existen por lo menos dos enzimas involucradas en la síntesis de nucleótidos a partir de nucleósidos (Kahn y Blum, 1965), en presencia de 5-fosfo- α -D-ribosilpirofosfato, según:



Una de ellas reacciona con adenina e hipoxantina y la otra, con guanina y 8-azaguanina.

- c) Extractos de *Euglena* contienen un sistema enzimático soluble que cataliza la síntesis de 3'-fosfoadenililsulfato, intermediario de la formación de otros compuestos sulfonados. Estas enzimas se hallan presentes en extractos de células verdes, etioladas y blanqueadas con estreptomycin (Abraham y Bachhawat, 1964), así como también en extractos de cloroplastos aislados de *Euglena* (Davies et al, 1966).

A pesar de que aún no se han separado las enzimas de este sistema, en esta síntesis están involucradas por lo menos, dos: la sulfato adenilil transferasa y la adenililsulfato quinasa las cuales catalizan las siguientes reacciones respectivamente:



También se ha demostrado la presencia en células verdes y etioladas de *Euglena* de una enzima que hidroliza el 3'-fosfoadenililsulfato (Abraham y Bachhawat, 1964) según:

3'-fosfoadenilsulfato = 3',5'-difosfoadenosina + sulfato

(reacción 4)

d) Evans y San Pietro (1966) y Stern y Avron (1966) estudiaron una enzima de *Euglena* que cataliza irreversiblemente la siguiente reacción:

ADP-ribosa + ortofosfato → ADP + ribosa 5'-fosfato

(reacción 5)

Esta enzima se encuentra presente en células verdes y etioladas de *Euglena*, y parece no estar asociada a los cloroplastos.

XI.2. Contenido y variación

Según la mayoría de los valores informados, el contenido de RNA en *Euglena* varía entre 20 y 40 $\mu\text{g}/10^6$ células. Existen valores mayores o menores, no incluidos dentro de este rango, debido a que la cantidad de RNA presente en *Euglena* puede modificarse según el estado fisiológico de las células, el procedimiento utilizado para la medición de los ácidos nucleicos y las condiciones de crecimiento.

Las células desarrolladas en ausencia de luz tienen menor cantidad de RNA y proteínas que las células verdes; el exceso de proteínas en estas últimas estaría asociado a los cloroplastos (Brawerman et al, 1962).

Sin embargo, el RNA cloroplástico representaría sólo una parte del exceso de RNA presente en células verdes, existiendo evidencias de que en la fracción microsomal se encontraría una mayor cantidad de RNA.

En contraste con las amplias variaciones en el contenido del RNA, los valores correspondientes al DNA en *Euglena* muestran una mayor uniformidad, encontrándose en el rango de 3,0-3,3 $\mu\text{g}/10^6$ células.

No existen diferencias significativas en dicho contenido, entre células crecidas en luz u oscuridad.

E. gracilis es un organismo susceptible a alteraciones permanentes de su contenido de DNA. Las cepas blanqueadas obtenidas por crecimiento a 34 °C contienen niveles de DNA más elevados que los normales de las células de las cuales derivan. Los datos para dos cepas blanqueadas de *E. gracilis* (Z y T) revelan un incremento aproximado del 50% con respecto a las células verdes (Neff, 1960).

Brawerman et al (1960) sugirieron que el aumento en el contenido de DNA no era una consecuencia obligatoria del blanqueamiento, ya que existen numerosas líneas celulares blanqueadas, obtenidas por crecimiento a 34 °C o por tratamiento con estreptomycin, que muestran un contenido normal de DNA. Según Brawerman et al (1960), es posible que este incremento no ocurriera durante el proceso de blanqueamiento en sí, sino que tuviera lugar durante los cultivos subsiguientes.

X1.3. Ribosomas y síntesis de polipéptidos

Existen dos tipos de ribosomas en *Euglena*: citoplasmático y cloroplástico, que pueden distinguirse fácilmente por micrografía electrónica de células verdes. En las mismas se pueden observar partículas ribosomales dentro de los cloroplastos, cuyo tamaño es menor que el de las partículas que se encuentran en el citoplasma (70S y 80S respectivamente).

Ambos sistemas son capaces de promover la síntesis de polipéptidos (Eisenstadt y Brawerman, 1964 a, b).

Es interesante hacer notar que tanto los cloroplastos como los ribosomas cloroplásticos son inhibidos por el cloramfenicol mientras que los ribosomas citoplasmáticos permanecen inalterados. Pogo y Pogo (1965) habían demostrado que este antibiótico inhibía preferencialmente la síntesis de proteínas cloroplásticas en *Euglena*.

La capacidad que presentan los ribosomas cloroplásticos para responder frente a RNA mensajeros exógenos es una característica poco común entre los sistemas libres de células no bacterianas. Se ha demostrado también que carecen de especificidad propia con respecto a la determinación de la secuencia de los aminoácidos en las proteínas.

XI.4. Regulación de la síntesis de proteínas cloroplásticas

La síntesis de las proteínas cloroplásticas se ve afectada por una variedad de factores ambientales que, sin embargo, no tienen efecto sobre el crecimiento celular.

La formación de cloroplastos requiere la presencia continua de luz, ya que en su ausencia se detiene la síntesis de las proteínas asociadas a dichas organelas. Estas incluyen tanto las proteínas estructurales como las enzimas fotosintéticas solubles.

La síntesis de los cloroplastos también está sujeta a una represión selectiva por una variedad de metabolitos (Aoy y Jadenorf, 1963). Esto explicaría el número reducido de cloroplastos presentes en la fase logarítmica de un cultivo que crece en un medio orgánico rico; además, a medida que las células se acercan a la fase estacionaria, comienza una síntesis rápida de cloroplastos, debido posiblemente a la disminución o agotamiento de los metabolitos represores.

El comportamiento de las proteínas cloroplásticas durante el blanqueamiento de las células por crecimiento a 34 °C es un buen ejemplo del estricto control al cual está sujeta. Durante las etapas tempranas del proceso de blanqueamiento, el número de cloroplastos aumenta en forma lineal mientras las células exhiben un crecimiento exponencial normal.

La formación, por ejemplo, de la enzima fotosintética TPN-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa aumenta en forma paralela al contenido de clorofila.

Cuando el proceso de blanqueamiento se interrumpe, por exposición del cultivo a una temperatura menor, comienza una rápida síntesis de clorofila luego de un prolongado lag; nuevamente, la formación de la enzima antes nombrada ocurre con un perfil análogo al de la clorofila.

La existencia de ribosomas dentro de los cloroplastos indica que las proteínas plásticas pueden ser sintetizadas dentro de estas organelas. Se ha considerado la posibilidad de que estos ribosomas contribuyan a la determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas cloroplásticas y por lo tanto, de la naturaleza de las mismas (Brawerman, 1963).

Sin embargo, Schwartz et al (1965) demostraron que los ri bosomas cloroplásticos no parecen poseer especificidad de códi go. Así, el mecanismo selectivo que determinaría la localización subcelular de la síntesis de proteínas cloroplásticas permanece aún sin aclarar.

En 1973, Harris et al estudiaron la incorporación de amino ácidos marcados y analizaron los productos de la síntesis protei ca de cloroplastos aislados de *E. gracilis*. Estos autores encontraron que dicha incorporación dependía del ATP exógeno o de la fosforilación fotosintética; además, era sensible a antibió ticos que inhiben la síntesis proteica en bacterias (cloramfeni col), insensible a la cicloheximida y ligeramente sensible a ac tinomicina D y rifampicina. Los productos obtenidos incluían tan to proteínas solubles como estructurales. Este mismo grupo efec tuó un estudio comparativo con las proteínas sintetizadas in ví vo, en el caso en el cual los ribosomas citoplasmáticos se halla ban inhibidos con cicloheximida y se observó que los datos de síntesis proteica in vítro coincidían con los de la producida

REFERENCIAS

- Abraham, A. & Bachhawat, B.K. (1964), *Indian J. Biochem.* 1, 192.
- App, A.A. & Jagendorf, A.T. (1963), *J. Protozool.* 10, 340.
- Brawerman, G. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* 72, 317.
- Brawerman, G.; Rebman, C.A. & Chargaff, E. (1960), *Nature* 187, 1037.
- Brawerman, G.; Pogo, A.O. & Chargaff, E. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 55, 326.
- Davies, W.H.; Mercer, E.I. & Goodwin, T.W. (1966), *Biochem. J.* 98, 369.
- Eisenstadt, J.M. & Brawerman, G. (1964 a), *J. Mol. Biol.* 10, 392.
- Eisenstadt, J.M. & Brawerman, G. (1964 b), *Biochim. Biophys. Acta* 80, 463.
- Evans, W.R. & San Pietro, A. *Biochem. Biophys.* 113, 236.
- Fellig, J. & Wiley, C.E. (1960), *Science* 132, 1835.
- Harris, E.H.; Preston, J.F. & Eisenstadt, J.M. (1973) *Biochemistry* 12, 1227.
- Kahn, V. & Blum, J.J. (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 4435.
- Neff, R.H. (1960), *J. Protozool.* 7, 69.
- Pogo, B.G.T. & Pogo, A.O. (1965), *J. Protozool.* 12, 96.
- Schwartz, J.H.; Eisenstadt, J.M.; Brawerman, G. & Zinder, N.D. (1965), *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.* 53, 195.
- Stern, A.I. & Avron, M. (1966), *Biochim. Biophys. Acta* 118, 577.

COLOROFLA Y COLOROPLASTOS

CAPITULO XII

ESTUDIOS SOBRE CLOROFILA

XII.1. Introducción

XII.2. Efecto de la luz en la formación de clorofila

XII.2.1. Transformación de precursores en clorofila
(Segmento AB)

XII.2.2. Fase lag (Segmento BC)

XII.2.3. Síntesis rápida de clorofila (Segmento CD)

XII.2.4. Estado estacionario (Segmento DE)

XII.3. Influencia de la intensidad luminosa sobre el contenido total de clorofila durante el desarrollo

XII.4. Influencia de la intensidad luminosa sobre el contenido de clorofila a y clorofila b

Adaptación a la oscuridad. Degradación de la clorofila

PARTE 5: CLOROFILA Y CLOROPLASTOS

XII. ESTUDIOS SOBRE CLOROFILA

XII.1. Introducción

La clorofila *a* se considera el pigmento fotoquímico reactivo por excelencia ya que en su ausencia la fotosíntesis no tiene lugar.

Los carotenoides funcionan como pigmentos accesorios involucrados en la transferencia de la energía absorbida a las clorofilas y como protectores de la fotooxidación de las mismas.

Evidencias recientes indican que sólo una pequeña cantidad de la clorofila *a* funciona en forma fotocatalítica; el resto es el llamado pigmento "antena", el cual actúa en la absorción y transferencia de la energía a la clorofila *a* foto-reactiva de manera similar a los otros pigmentos accesorios: carotenoides, ficobilinas y otras clorofilas.

Duysens (1952) efectuó numerosas mediciones espectrales que mostraban que la energía absorbida por los pigmentos accesorios daba origen principalmente a una fluorescencia a 685 nm mientras que la absorbida por la clorofila *a* correspondía principalmente a una fluorescencia a 720 nm. Duysens (1961) y Duysens y Ames (1962) incorporaron estos conocimientos en la elaboración de una teoría; estos investigadores denominaron sistema I al conjunto de pigmentos de longitud de onda larga y sistema II al correspondiente de onda corta.

Así, la energía absorbida en una "unidad fotosintética" formada por cientos de moléculas de clorofila, se transfiere a un centro de reacción especial ubicado dentro de dicha unidad. Tales centros de reacción de clorofila *a* se encuentran en muy poca cantidad; además, es oxidado por la luz absorbida en el sistema I y es reducido por el sistema II. Kok (1959) descubrió este pigmento y encontró una absorción máxima a 705 nm (Kok y Hoch, 1961) denominándolo P₇₀₀ (P por pigmento) sugiriendo que sería el responsable de la captación de la energía del sistema I.

De acuerdo con los datos experimentales acumulados se concluyó que el sistema II absorbía energía (< 670 nm) directa-

mente a través de la clorofila *a* (antena) o transferida a ésta desde los pigmentos accesorios (incluida la clorofila *b*), produciendo la ruptura del agua, con liberación de oxígeno y con reducción de ciertos intermediarios de los cuales el terminal es el P₇₀₀ oxidado. La energía de mayor longitud de onda (>680 nm) es absorbida por el sistema I, directamente por medio de su antena (clorofila *a*) y/o del P₇₀₀, o por transferencia a los mismos desde el sistema II, y produce la oxidación del P₇₀₀ reducido y la reducción del NADP (Myers, 1963; Clayton, 1965).

XII.2. Efecto de la luz en la formación de clorofila

Numerosos investigadores han demostrado que cuando se iluminan células de *Euglena* crecidas en oscuridad, la formación de clorofila en función del tiempo de iluminación, responde a un perfil del tipo ilustrado en la Figura 12.1.

En las secciones posteriores, se discutirá el significado de los segmentos AB, BC, CD y DE de la Figura 12.1.

Rosenberg y Pecker (1964) (Figura 12.2.) obtuvieron una curva ligeramente diferente. Luego de un corto período lag, las células etioladas de *E. gracilis* producían clorofila en tres etapas, al exponerlas a luz de 90 fcs. Durante la fase I (15 horas) la formación de clorofila ocurría a una velocidad muy lenta. En el estadio II, de aproximadamente 25 horas, la síntesis del pigmento era lineal y en la última etapa, continuaba dicho incremento hasta la obtención de un verdeo máximo.

XII.2.1. Transformación de precursores en clorofila (Segmento AB)

Se han realizado numerosas experiencias para identificar al precursor de la clorofila aprovechando que *Euglena* pierde dicho pigmento durante el crecimiento en oscuridad y lo recupera al exponerla a la luz. Determinaciones del espectro de acción de este proceso sugirieron que la protoclorofila sería el precursor (Wolken, 1961). Sin embargo, Schiff y Epstein (1965) señalaron que en *Euglena* aún no se ha determinado si la protoclorofila o la protoclorofilida es el verdadero precursor, introduciendo entonces el término protoclorofil-(ida)-a. En plantas superiores, la fitilación ocurriría inmediatamente después de la fotoconver

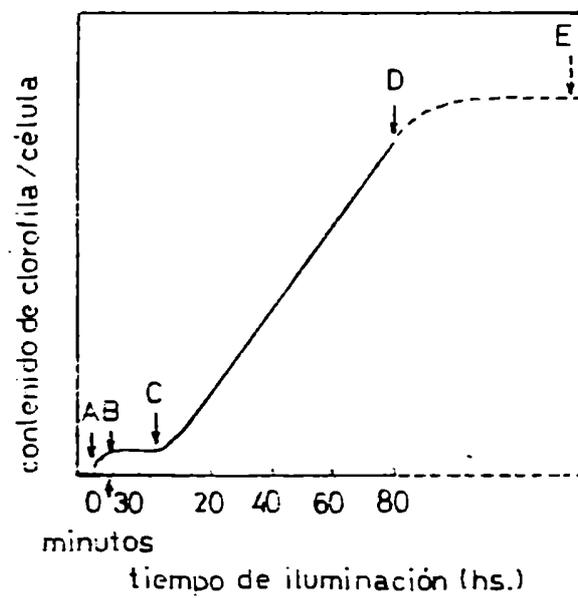


FIGURA 12.1.: Formación de clorofila en función del tiempo de iluminación, para *Euglena* crecida en oscuridad. Los segmentos AB, BC, CD y DE de la curva se discuten en el texto.

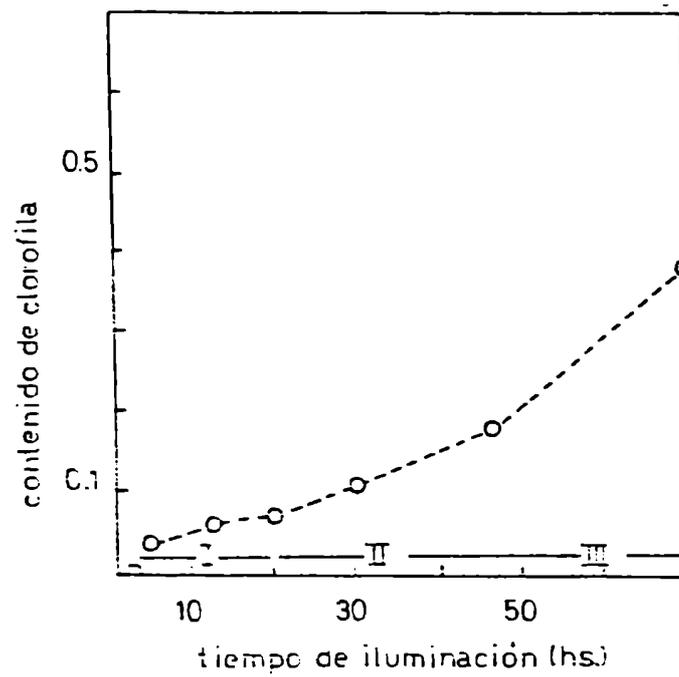


FIGURA 12.2.: Formación de clorofila en función del tiempo de iluminación durante el verdeo de células de *E. gracilis*. El contenido de clorofila se expresa en términos de medición de la D.O. a 668 nm. Los números romanos y se discuten en el texto.

si3n de la protoclorofilida a clorofilida *a* (Smith y French, 1963). Este proceso sucederfa en aproximadamente 10^{-3} segundos (Madsen, 1963).

Stern et al (1964 a) demostraron que c3lulas de *E. gracilis* var. *bacillaris* crecidas en oscuridad contenfan cantidades menores de protoclorofil-(ida)-a (3×10^{-3} pg por c3lula o aproximadamente 18×10^8 mol3culas por c3lula) que las esperadas para un intermediario acumulado en ausencia de luz. Schiff y Epstein (1965) sugirieron que la formaci3n de protoclorofil-(ida)-a en c3lulas desarrolladas en oscuridad se encuentra bajo un control feed-back, en el cual la protoclorofil-(ida)-a actúa inhibiendo la primer enzima de su biosfntesis: la δ -aminolevulico sintetasa. La conversi3n luminosa de la protoclorofil-(ida)-a en clorofil-(ida)-a dejarfa sin efecto dicho bloqueo.

Butler y Briggs (1966) llevaron a cabo una investigaci3n acerca de la influencia de la estructura en los cambios espectrales que ocurrfan durante el verdeo de *E. gracilis* var. *bacillaris*. Para seguir las variaciones espectrales utilizaron la espectroscopfa de absorci3n a bajas temperaturas (77 °K). Estos autores hallaron que el m3ximo de absorci3n de la protoclorofil-(ida)-a se encuentra a 630 nm; inmediatamente despu3s de la fotoconversi3n, la banda de absorci3n de la clorofil-(ida)-a se halla a 667 nm, no existiendo ningun cambio de esta posici3n. Estas observaciones sugirieron que en *Euploea* se forma una clorofila monom3rica a partir de un intermediario tambi3n monom3rico.

XII.2.2. Fase lag (Segmento BC)

Despu3s de la conversi3n inicial de una pequea cantidad de protoclorofil-(ida)-a en clorofila, sigue una fase lag durante la cual continúa formándose el precursor a una velocidad igualmente baja.

Estos perfdodos tienen una duraci3n de 5-15 horas en *E. gracilis* Z (Brawerman y Chargaff, 1959) y *E. gracilis* var. *bacillaris* (Nishimura y Huzisige, 1959).

Stern et al (1964 a) encontraron que la cantidad de clorofila formada despu3s de 2 horas de exposici3n a la luz no era estequiom3trica con respecto al contenido de protoclorofil-(ida)-a de las c3lulas crecidas en oscuridad, sino que representaba un incremento de 10 veces. Por lo tanto, sugirieron que la sntesis

inicial de clorofila ocurría paralelamente a una nueva formación de protoclorofil-(ida)-a y posterior conversión a clorofila.

En cuanto a la duración de esta fase lag, Virgin et al (1963) concluyeron que la misma es función de numerosos factores, entre ellos el estado nutricional.

XII.2.3. Síntesis rápida de clorofila (segmento CD)

Una vez concluida la fase lag, comienza un incremento lineal en la formación de clorofila. De acuerdo con los resultados de Stern et al (1964 a), que estudiaron la cinética de la aparición de la clorofila y los carotenoides y el desarrollo de la fotosíntesis (medida como aparición de O_2 e incorporación de $^{14}CO_2$), este fenómeno ocurre con una velocidad lineal hasta aproximadamente las 80 horas.

M. Brody et al (1965) observaron que *E. gracilis* crecida en oscuridad desarrollaba su aparato fotosintético dentro de las 5-10 horas de iluminación con 100-150 ftc, dado que a las 10 horas ya existían evidencias de la formación de O_2 fotosintético. Estos autores observaron a 77°K que a las 10 horas aproximadamente tenía lugar un incremento agudo de la fluorescencia a 720 nm con respecto a la de 685 nm. Debido a que la fluorescencia a 720 nm se origina en especies agregadas de clorofila (F_A) mientras que la fluorescencia a 685 nm se atribuye a formas monoméricas (F_M), M. Brody et al (1965) concluyeron que en *Euglena* existían pocos agregados en células verdeadas durante las primeras 10 horas y reiteraron sus propias apreciaciones anteriores acerca de que es condición necesaria para la fotosíntesis la presencia de clorofila en forma agregada (S. Brody, 1958; S. Brody y M. Brody, 1961).

XII.2.4. Estado estacionario (Segmento DE)

Stern et al (1964 a) y M. Brody et al (1965) llegaron a similares conclusiones en cuanto a la cinética lineal en la formación de clorofila y en la actividad fotosintética que prosigue a la fase lag.

Stern et al (1964 a) afirmaron que después de 80 horas de

iluminación, *E. gracilis* var. *bacillaris* crecida en oscuridad contenía 12-14 pg de clorofila por célula ($7,2-8,4 \times 10^9$ moléculas por célula) datos coincidentes con los obtenidos para las células desarrolladas a la luz.

M. Brody et al (1965) encontraron que *E. gracilis* 2 contenía $1,06 \times 10^9$ moléculas de clorofila por célula después de 80 horas de exposición a la luz, en contraste con $2,5 \times 10^9$ moléculas de clorofila por célula, halladas en *E. gracilis* 2 crecida directamente a la luz.

XII.3. Influencia de la intensidad luminosa sobre el contenido total de clorofila durante el desarrollo

Stern et al (1964 b) utilizaron células de *E. gracilis* var. *bacillaris* crecidas a la oscuridad y que se encontraban en estado de no división, para estudiar la influencia de la intensidad luminosa y la duración del período de formación del contenido máximo de clorofila (a y b). Estos investigadores hallaron que la fotosíntesis (medida como formación de O_2 y fijación de CO_2) y la síntesis de pigmentos alcanzaban sus valores máximos a intensidades de luz de 100 ft-c, en células iluminadas durante 95 horas. Intensidades superiores o inferiores originan velocidades menores de fotosíntesis y de formación de pigmentos (Figura 12.3.).

Stern et al (1964 b) observaron que la velocidad de formación de O_2 y el contenido total de clorofila alcanzaban sólo un 50% del valor del máximo, aún después de 10 días de exposición de las células a una intensidad de 7 ft-c. Así, la cinética del desarrollo de los pigmentos y de la capacidad fotosintética indicaría que las células adaptadas a bajas intensidades de luz (4 ó 7 ft-c) no alcanzan los niveles máximos.

Las células expuestas a intensidades de 440 ó 700 ft-c durante el verdeo muestran velocidades iniciales comparables a aquellas desarrolladas a 100 ft-c, pero a las 60 horas la velocidad y los niveles disminuyen hasta observarse una inhibición (Figura 12.3.). Stern et al (1964 b) notaron que la relación clorofila/carotenoide (mol/mol) en células desarrolladas a altas intensidades luminosas, no alcanza nunca el valor óptimo de 2,5, posiblemente debido a una mayor inhibición en la formación de

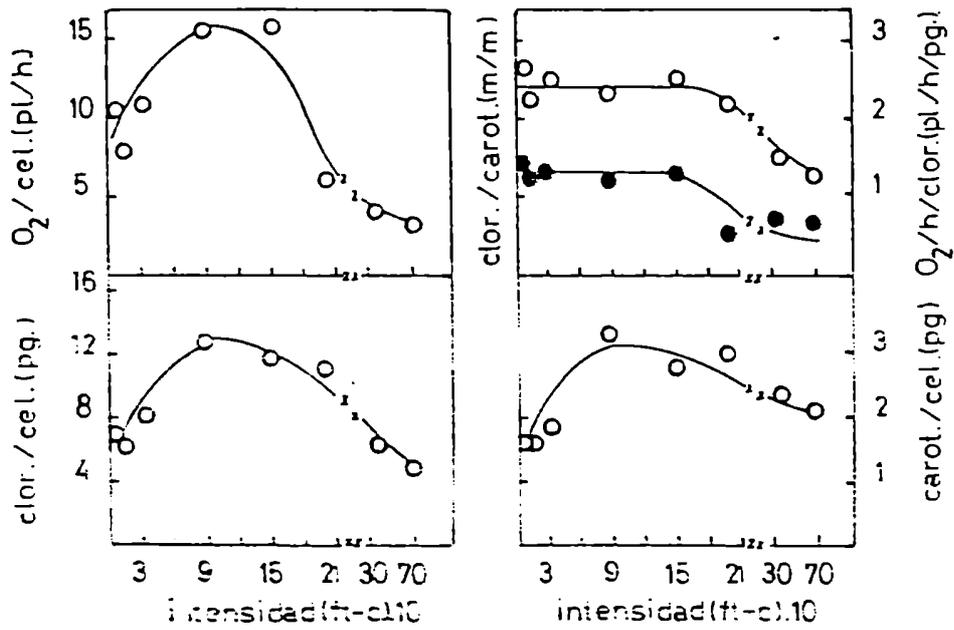


FIGURA 12.3.: Evolución fotosintética de O_2 y contenido de clorofila y carotenoides en células de *Euglena* crecidas en oscuridad y expuestas durante 95-100 horas a distintas intensidades luminosas.
 Evolución de O_2 por hora en base a la clorofila formada (●)
 Relación clorofila a carotenoide (mol/mol) (○) (Stern et al, 1964 b)

clorofila o a una velocidad superior de destrucción de la misma.

Stern et al (1964 b) informaron además que, cuando células crecidas a 7 ft-c durante 87 horas se exponían a 100 ft-c para continuar su desarrollo, las células alcanzaban niveles normales de formación de O_2 y contenido de pigmentos, luego de 40 horas. Una vez transcurrido este tiempo, proseguía el desarrollo de tal forma que a las 80 horas se excedían los niveles normales de estos parámetros y las células se transformaban en hiperdesarrolladas (18 pg de clorofila por célula; $10,8 \times 10^9$ moléculas de clorofila por célula) comparadas con las obtenidas en condiciones normales (13 pg de clorofila por célula; $7,8 \times 10^8$ moléculas de clorofila por célula).

XII.4. Influencia de la intensidad luminosa sobre el contenido de clorofila a y clorofila b

Wolken (1961) estimó que la clorofila b representaba un 15-20% de la cantidad total de clorofila presente en *E. gracilis* var. *pacillans*.

Brown (1960) y Brown y French (1961) informaron acerca de la estabilidad de la clorofila b, cuya cantidad no varía con la intensidad luminosa. La relación clorofila a/clorofila b es aproximadamente 4 a intensidades luminosas elevadas (1200 ft-c) y 7 a bajas intensidades (50 ft-c). Stern et al (1964 b) concluyeron que las altas intensidades luminosas afectan ambas clorofilas, siendo mínimo el efecto sobre la clorofila b.

XII.5. Adaptación a la oscuridad. Degradación de la clorofila

Además de la pérdida de clorofila producida por simple dilución y como resultado de la división celular y del crecimiento, Wolken (1961) observó que cuando *E. gracilis* era transferida a la oscuridad, tenía lugar una degradación de ese pigmento. Las características espectrales de estos extractos sugirieron que dentro de un período de tiempo corto pero variable, en oscuridad, se formaba feofitina. Existen otras condiciones ambientales como una nutrición pobre, vejez, acción de drogas específicas y temperaturas superiores a los 40 °C, que también producen cambios es

pectrales similares e inducen la transformación de la clorofila en feofitina.

De acuerdo con estudios de identificación química, cocromatografía con feofitina *a* cristalina y posición de picos de fluorescencia del pigmento obtenido de *Euglena* (entre 670 y 675 nm), compuesto formado en las células adaptadas a la oscuridad es la feofitina *a*.

La clorofila *b* también disminuye progresivamente durante la adaptación de las células, a la oscuridad, pero su determinación cuantitativa, así como también la de la feofitina *a*, se ve dificultada por la baja concentración y la imprecisión acerca de los coeficientes de extinción correspondientes a ciertas longitudes de onda.

REFERENCIAS

- Brawerman, G. & Chargaff, E. (1959), *Biochim. Biophys. Acta* 31, 178.
- Brody, M.; Brody, S. & Levine, J.H. (1965), *J. Protozool.* 12, 465.
- Brody, S. (1958), *Science*, 128, 838.
- Brody, S. & Brody, M. (1961) , *Nature* 189, 547.
- Brown, J.S. (1960), *Carnegie Inst. Wash. Yrbook* 59, 330.
- Brown, J.S. & French, C.S. (1961), *Biophys. J.* 1, 539.
- Butler, W.L. & Briggs, W.R. (1966), *Biochim. Biophys. Acta* 112, 45.
- Clayton, R.K. (1965), "Molecular Physics in Photosynthesis". Ginn (Blaisdell), Boston, Massachusetts.
- Duysens, L.N.M. (1952), Ph. D. Thesis, Utrecht, The Netherlands.
- Duysens, L.N.M. (1961), "Progress in Photobiology"; Proc. 3rd. Intern. Congr. Photobiol. Copenhagen, 1960, (B.C. Christensen y B. Buchmann, eds.), p. 135.
- Duysens, L.N.M. & Ames, J. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 61, 243.
- Kok, B. (1959), *Plant Physiol.* 34, 125.
- Kok, B. & Hoch, G. (1961), "Light and Life" (W.D. Mc Elroy y B. Glass, eds.), p. 397 Johns Hopkins Press, Baltimore, Md.
- Madsen, A. (1963), *Physiol. Plantarum* 16, 470.
- Myers, J. (1963), "Photosynthetic Mechanisms in Green Plants", Publ. 1145, p. 301. Natl. Acad. Sci. Natl. Res. Council, Washington, D.C.
- Nishimura, M. & Huzisige, H. (1959), *J. Biochem.* 45, 225.
- Rosenberg, A. & Pecker, M. (1964), *Biochemistry* 3, 254.
- Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1965), "Reproduction Molecular, Subcellular and Cellular" (M. Locke, ed.), p. 131. Academic Press, New York.
- Smith, J.H.C. & French, C.S. (1963), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 14, 181.

- Stern, A.I.; Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1964 a), Plant Physiol. 39, 220.
- Stern, A.I.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1964 b), Plant Physiol. 39, 226.
- Virgin, H.I.; Kahn, A. & von Wettstein, D. (1963), Photochem. Photobiol. 2, 83.
- Wolken, J.J. (1961), "Euglena. An Experimental Organism for Biochemical and Biophysical Studies". Rutgers Univ. Press, New Brunswick, New Jersey.

COLOROPLASTOS

XIII.1. Introducción.

XIII.2. Desarrollo morfológico

XIII.3. Desarrollo fisiológico

XIII.3.1. Pigmentos

XIII.3.2. Fotosíntesis

XIII.3.3. Síntesis de proteínas

XIII. CLOROPLASTOS

XIII.1. Introducción

La función especializada de los cloroplastos de proveer y organizar la maquinaria para la conversión primaria de la energía luminosa en energía química se halla asociada a las membranas de los tilacoides (Haan et al, 1973; Heber y Krause, 1971). Mediante reacciones fotoquímicas en los fotosistemas I y II, los cuantos de luz absorbidos por las clorofilas permiten la separación de cargas en los centros de reacción. Los electrones del agua son transportados al NADP^+ y este flujo electrónico inducido por la luz está acoplado a la síntesis de ATP. La energía (ATP) y el poder reductor ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) generado por estas foto-reacciones asociadas a membrana, permiten la fijación del CO_2 en oscuridad y su reducción a carbohidratos.

Desarrollo morfológico

El cloroplasto totalmente desarrollado, característico de células de *Euglena* crecidas a la luz posee aproximadamente 12 lamelas, cada una compuesta de 2 a 4 pares de membranas íntimamente ligadas llamadas discos (Ben-Shaul et al, 1964).

En general, es característica de los cloroplastos de las algas la existencia de pirenoides localizados centralmente, los cuales aparecen en forma más densa en micrografías electrónicas. El carbohidrato de reserva (paramilon) se ubica rodeando al pirenoide y la clorofila se halla distribuída en la región lamelar.

Si bien *Euglena* necesita luz para los procesos de formación de cloroplastos y de síntesis de clorofila, al igual que las plantas superiores, existen otros organismos, como numerosas algas (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, etc.) que no poseen dicho requerimiento.

Aquellos organismos que necesitan luz para el desarrollo de los cloroplastos y la formación de clorofila parecen utilizar la energía luminosa en la conversión de la protoclorofil-(ida)-a a clorofil-(ida)-a. En *Euglena*, como se ha mencionado, no se ha determinado aún cuál es el precursor fotoquímico reducido: la protoclorofila o la protoclorofilida.

Se han aislado mutantes que requieren luz para la formación de los cloroplastos y para la síntesis de clorofila, a partir de organismos que no la necesitan para dichos procesos. Las mutantes de *Chlamydomonas* y *Chlorella* (Sager, 1958) son el resultado de una única mutación en cada caso. Aparentemente, la cepa salvaje contendría tanto el sistema enzimático inducido por luz para la transformación de la protoclorofil-(ida)-a a clorofil-(ida)-a, como el involucrado en dicha etapa en oscuridad. La mutación habría eliminado este último sistema, permaneciendo sólo la alternativa dependiente de la luz.

Después de numerosas generaciones de crecimiento en la oscuridad, las células de *Euglena* pierden toda su clorofila y contienen sólo protoclorofil-(ida)-a, como pigmento verde detectable (Schiff et al, 1961). La micrografía electrónica reveló que las células contenían proplástidos de aproximadamente 1 μ de diámetro (Ben-Shaul et al, 1964). En estos proplástidos se han detectado una o dos membranas internas y partículas del tamaño de los ribosomas (Liss et al, 1965); se han encontrado alrededor de 30 proplástidos por célula (Epstein y Schiff, 1961).

Cuando las células de *Euglena* crecidas en oscuridad se exponen a la luz, los cloroplastos comienzan su desarrollo, estén las células dividiéndose o no. Manteniendo las células en condiciones de no división, mediante un medio en reposo ("resting medium") es posible estudiar el desarrollo cloroplástico, independientemente de la división celular (Stern et al, 1964 a).

Los eventos morfológicos de este proceso (Epstein y Schiff, 1961; Ben-Shaul et al, 1964) se pueden resumir de la siguiente manera:

- a) Las membranas, que luego originarán los discos, se invaginan a partir de la membrana proplástica interna;
- b) estos discos se fusionan unos con otros longitudinalmente, para formar las lamelas que contienen aproximadamente de 2 a 4 discos;
- c) la región pirenoidea se diferencia luego de 18-24 horas de comenzado el proceso de desarrollo;
- d) el número máximo de lamelas se alcanza a las 72 horas de desarrollo del cloroplasto; se considera que al cabo de este período finaliza este proceso.

Los dinoflagelados y los euglenoides poseen cloroplastos que están rodeados por tres membranas las cuales constituyen la envoltura cloroplástica. La función pasiva de esta envoltura consiste en separar del citoplasma las enzimas solubles del ciclo de Calvin-Benson; en cambio sus funciones activas son:

- a) Transporte activo de metabolitos de bajo peso molecular;
- b) permeabilidad selectiva para aniones (unas pocas especies) en relación con transportadores específicos (Heldt, 1969; Strotmann y Berger, 1969), posiblemente asociados con la membrana interna de esta envoltura (Heldt y Sauer, 1971);
- c) síntesis de galactolípidos cloroplásticos (Joyard y Douce, 1976);
- d) identificación y transferencia de proteínas cloroplásticas sintetizadas en el citoplasma (Ellis, 1977; Chua y Schmidt, 1978, 1979), en áreas especializadas de las membranas externa e interna.

La estructura de triple membrana de la envoltura cloroplástica de *Euglena* fue observada por numerosos autores mediante el empleo de la micrografía electrónica (Gibbs, 1962, 1970; Lee-gale, 1968; Dodge, 1974; Taylor, 1976), recibiendo éstas los nombres de: membrana interna, membrana externa o intermedia y membrana pericloroplástica (Dubertret y Lefor-Tran, 1982).

XIII.3. Desarrollo fisiológico

XIII.3.1. Pigmentos

Cuando se iluminan células de *Euglena* crecidas en oscuridad, se forma inicialmente una cierta cantidad de clorofila a (Schiff et al, 1961); dicha síntesis continúa aumentando lentamente durante aproximadamente 10 horas (Stern et al, 1964 a). Pasado este período la formación de clorofila a se incrementa rápidamente en forma casi paralela a la velocidad a la cual se están formando las lamelas.

La clorofila b es muy difícil de medir ya que aún en células completamente desarrolladas constituye sólo una pequeña proporción de la clorofila total.

Las células crecidas en oscuridad contienen una cantidad apreciable de carotenoides (Stern et al, 1964 a). Cuando se induce el desarrollo del coroplasto por iluminación, el aumento de los carotenoides es paralelo al de la clorofila a (Stern et al, 1964 a).

El carotenoide ausente en células etioladas es la neoxantina, que aparece por primera vez a las cuatro horas de comenzado el desarrollo del cloroplasto a la luz y luego continúa aumentando, como así lo hacen los ya presentes en ausencia de luz (Krinsky et al, 1964).

XIII.3.2. Fotosíntesis

Cuando células crecidas en oscuridad se exponen a la luz, el primer proceso que puede medirse es un incremento significativo e irreversible de la velocidad de incorporación de O_2 (Schiff, 1963).

Este hecho representaría un aumento en la respiración, con el fin de movilizar energía para la síntesis de los constituyentes cloroplásticos.

Superpuesto con este proceso irreversible, se puede detectar una incorporación fotoinducida pequeña y reversible de O_2 . A medida que procede el desarrollo del cloroplasto, esta incorporación reversible se ve gradualmente compensada hasta que, transcurridas aproximadamente 4 horas del mismo, se encuentra balanceada por la evolución fotoinducida de O_2 . De aquí en adelante, existe un incremento neto en la evolución fotosintética de O_2 .

De acuerdo con estos hechos, se puede considerar que el momento en que comienza la fotosíntesis es cercano a las 4 horas de iniciado el proceso de desarrollo del cloroplasto.

La fijación fotosintética de CO_2 comienza aproximadamente a las 6 horas (Stern et al, 1964 a; Brody et al, 1965; Wolfowitch y Perl, 1972) y en general, la velocidad de fotosíntesis durante el desarrollo, es paralela a la velocidad de formación de pigmentos y lamelas.

La intensidad de luz óptima para el crecimiento en *Euglena* es aproximadamente 100 ft-c. Las intensidades mayores o menores rinden menor cantidad de clorofila; además bajas intensidades

originan también un desarrollo anormal del cloroplasto (Stern et al, 1964 b; Ben Shaul et al, 1964).

XIII.3.3. Síntesis de proteínas

Dado que el desarrollo del cloroplasto tiene lugar normalmente, en un medio desprovisto de fuentes de carbono y nitrógeno, es interesante conocer si la formación de esta organela involucra la síntesis "de novo" de las proteínas o alternatively, si éstas ya existían en las células crecidas en la oscuridad y son simplemente "empaquetadas" en los cloroplastos cuando las células se iluminan.

Una forma de estudiar este problema es medir las actividades enzimáticas durante el proceso. Se ha observado que algunas enzimas plásticas aparecen precisamente durante este período: NADP-triosa fosfato dehidrogenasa (Brewerman y Konigsberg, 1960), NADP-transhidrogenasa (Lazzarini y Woodruff, 1964) ribulosa di fosfato carboxilasa (Fuller y Gibbs, 1959).

Mediante determinaciones espectrofotométricas, ha sido posible demostrar que el cit 552, localizado en los cloroplastos, se forma también durante su desarrollo (Perini et al, 1964 a, b), a una velocidad que mantiene la relación citoclorofila en 1:400, valor correspondiente al cloroplasto maduro. Esto sugeriría que las unidades fotosintéticas son construídas y completadas como unidades individuales durante el desarrollo.

Todos los estudios que trataron de dilucidar si las proteínas cloroplásticas estaban codificadas por el DNA nuclear o citoplasmático, confirmaron la existencia de síntesis "de novo" de proteínas cloroplásticas. Esta síntesis comienza luego de una fase lag (10-12 horas) durante la cual se utilizan las enzimas presentes en las células crecidas en ausencia de luz (Bovarnick et al, 1974 a, b).

Considerando todas estas evidencias se dedujo que la inducción por luz del desarrollo cloroplástico se asemejaba a una inducción masiva de enzimas adaptativas. Durante este proceso aparecen varias proteínas y actividades enzimáticas nuevas y teniendo en cuenta que esto sucede en ausencia de fuentes de carbono y nitrógeno, estas moléculas se sintetizarían a partir de pools internos de intermediarios o de la ruptura de macromoléculas

las existentes.

Bovarnick et al (1974 a, b) consideraron que durante el proceso del desarrollo cloroplástico ocurría posiblemente un re cambio proteico ya que el contenido de proteínas celulares totales no se modificaba significativamente.

XIII.3.4. RNA y ribosomas

En numerosos estudios empleando *E. gracilis* ¹ se ha demostrado que la exposición a la luz de organismos crecidos en oscuridad induce no sólo la síntesis de proteínas cloroplásticas sino también un incremento y un cambio en el RNA celular (Brown Haselkorn, 1971). Brawerman (1963) comprobó que los cloroplas¹tos tenían ribosomas diferentes y que se distinguían de los cito¹plasmáticos por la composición de sus bases y la característica de su ¹sedimentación.

Eisenstadt y Brawerman (1963) demostraron que cloroplastos intactos de *Euglena* podían incorporar aminoácidos en proteínas; este proceso de incorporación también fue observado en riboso¹mas aislados de cloroplastos y del citoplasma, en presencia de los cofactores e intermediarios necesarios (Eisenstadt y Brawe¹man, 1964 a, b).

Todas estas evidencias sugieren que *Euglena* posee siste¹mas sintetizantes de proteínas tanto en citoplasma como en cloro¹plastos, de tipo similar al hallado en otros organismos.

XIII.3.5. DNA

Numerosos trabajos han establecido la presencia de DNA en cloroplastos de *E. gracilis* (Edelman et al, 1964; Schiff y Epstein, 1965; Kirk, 1966).

En cambio, en mutantes de *Euglena* incapaces de formar cloroplastos no se ha observado dicha presencia (Edelman et al, 1964, 1965).

Scott y Smillie (1977) demostraron mediante la formación de diferentes especies híbridas DNA-RNA, que el DNA cloroplá¹stico codifica para el RNA de los ribosomas de los cloroplastos.

XIII.3.6. Lípidos

Rosenberg (1963) encontró diferencias en el contenido y clase de lípidos en células crecidas en presencia o ausencia de luz.

El ácido α -linolénico es un componente característico de los cloroplastos de *Euglena* pero se encuentra ausente o presente en muy pequeñas cantidades en células crecidas en oscuridad o que no pueden formar estructuras plástidas (Erwin y Bloch, 1962).

En cuanto al ergosterol, no parece estar asociado a los cloroplastos ya que se encuentra en cantidades comparables en mutantes y en células crecidas a la luz o en oscuridad (Sterniet al, 1960).

XIII.4. Retorno de los cloroplastos a la condición de proplástidos

Los cloroplastos de *Euglena* son capaces de retornar a la condición de proplástidos por adaptación a la oscuridad (Ben-Shaul et al, 1965).

En células en división, las lamelas se disocian en discos, que se pierden progresivamente del plástido a una velocidad aproximada de 0,3 por generación (velocidad algo menor que la deducida para una simple dilución de los constituyentes cloroplásticos entre las células hijas: 0,5 por generación). La clorofila sin embargo, desaparece inicialmente a una velocidad de 0,5 por generación. Estas observaciones sugirieron que cuando se retiraba la fuente luminosa, la síntesis de clorofila cesaba inmediatamente, continuando la formación de discos y lamelas a velocidades muy bajas.

Estas evidencias llevaron a la conclusión de que la síntesis del RNA mensajero involucrado en la formación de los constituyentes cloroplásticos puede estar reprimida en la oscuridad; el mensajero presente tendría un tiempo de vida suficientemente largo como para subsistir por una o dos generaciones, permitiendo así la síntesis de dichos componentes a una velocidad menor, a medida que el RNA mensajero disponible se diluye entre las células hijas.

Después de 144 horas de oscuridad (8 generaciones) los

cloroplastos regresaron totalmente a su condición de proplástidos (Ben-Shaul et al, 1965).

Bajo condiciones de no división, la situación que se presenta es diferente (Ben-Shaul et al, 1965). No existe prácticamente pérdida de la estructura cloroplástica, durante las primeras 144 horas, a pesar de que un 50% de la clorofila se ha convertido en feofitina y un 38% ha desaparecido (Brown, 1963).

Esto sugeriría que la clorofila por sí misma no es un determinante de la estructura lamelar, conclusión a la cual llegaron numerosos investigadores trabajando con materiales diferentes (von Wettstein, 1961). Por lo tanto, el desarrollo cloroplástico inducido por la luz, a partir del proplástido puede ocurrir tanto en células en división como en reposo en forma similar; el proceso inverso o sea la transformación del cloroplasto en plástido en ausencia de luz, sólo se produce en células en división.*

Una explicación para estas diferencias se puede hallar en los mecanismos de control que posibilitan que *Euglena* se adapte a su situación ecológica. Este organismo es un fotótrofo u organismo facultativo que puede crecer igualmente fijando CO₂ fotosintéticamente o a expensas de compuestos orgánicos reducidos del medio.

Los organismos crecidos en oscuridad que contienen sólo proplástidos pueden vivir y multiplicarse, si tienen suficiente cantidad de carbono disponible. Si ésta no es la situación, dichos organismos no se dividen más pero pueden seguir viviendo mientras los nutrientes del medio lo permiten. Por lo tanto, es una gran ventaja adaptativa, en estas condiciones, que sea capaz de formar cloroplastos inmediatamente después de la exposición a la luz, adoptando así un modo fotótrofo de existencia.

En presencia de compuestos orgánicos, cuando el organismo puede dividirse, la fotosíntesis constituye un método más eficiente para la utilización de la energía. Así, el organismo puede formar cloroplastos en ambas condiciones de división y de reposo.

Considerando que los cloroplastos se encuentran totalmente desarrollados y que se retira la fuente de energía luminosa, se pueden presentar dos alternativas:

- a) Si el medio no contiene una fuente reducida de carbono, cesa el crecimiento en la oscuridad pero las células conservan sus plástidos; esto representaría una ventaja durante una nueva exposición a la luz;
- b) Si por el contrario, se encuentran presentes compuestos orgánicos reducidos, las células se dividen y pierden rápidamente los cloroplastos, los cuales retornan a su condición de proplástidos, pero siguen viviendo como un organismo organótrofo.

Evidentemente, durante la evolución, los mecanismos de control han sido bien seleccionados para *Euglena*, ya que le permiten adaptarse eficientemente a las distintas condiciones ambientales a las que pueda ser sometida (Schiff y Schwartzbach, 1982).

Posibles mecanismos de control para el desarrollo y la replicación de los cloroplastos

Schiff y Epstein (1968) idearon un modelo para relacionar los diferentes y numerosos conocimientos acerca del desarrollo y de la replicación de los cloroplastos en *Euglena* (Figura 13.1.).

A la izquierda del diagrama se encuentra ubicada la célula crecida en oscuridad. Esta posee aproximadamente 30 proplástidos conteniendo protoclorofil-(ida)-a y DNA. Si estas células se mantienen en esas condiciones, se dividen y los proplástidos se replican para mantener su número constante de generación en generación. Esto implica que el DNA contenido en cada proplástido se replicaría en cada generación de células, posiblemente mediante una DNA polimerasa presente en el mismo plástido. Estos autores consideran que deben existir pequeñas cantidades de esta enzima durante el crecimiento en la oscuridad para permitir la continuidad del proplástido en cultivos desarrollados en dichas condiciones.

A la derecha de la figura se encuentra representada una célula verde, que contiene 10 cloroplastos. De acuerdo con sus resultados experimentales, cada una de estas células contiene tres unidades de DNA, inicialmente presentes en cada proplástido. Cuando el cloroplasto se divide, durante el crecimiento de

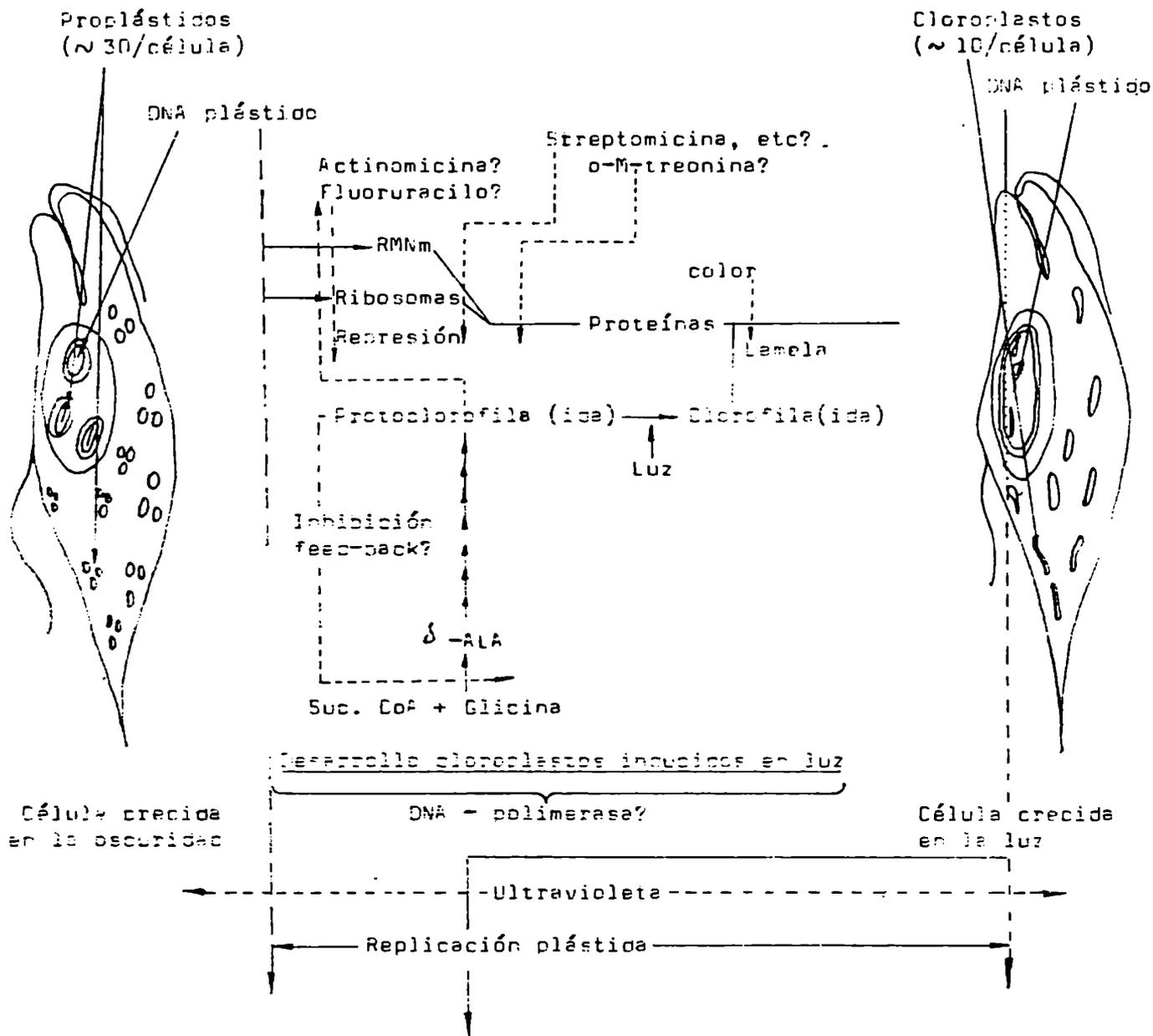


FIGURA 13.1.: Modelo hipotético para el control del desarrollo y replicación del cloroplasto en *Euglena*

la célula a la luz, estos DNA's se replican como en las células crecidas en oscuridad.

Se ha demostrado que la luz U.V. bloquea específicamente la transmisión de la capacidad de formación de plástidos a las células hijas en el momento de la división celular; Schiff y Epstein (1968) propusieron que el sitio de acción de la luz U.V. sería sobre la replicación del DNA. Si se considera el proceso de desarrollo desde el proplástido al cloroplasto, inducido por la luz, se sabe perfectamente que la conversión de la protoclorofil-(ida)-a a clorofil-(ida)-a en presencia de luz es un paso necesario en la biosíntesis de clorofila. La pequeña cantidad de protoclorofil-(ida)-a presente (mucho menor de la que se esperaría de un intermediario que se acumula debido a un bloqueo por ausencia de luz) sugiere que la formación de la clorofila en oscuridad, se halla bajo control feed-back. Por analogía con otras inhibiciones de este tipo, la protoclorofil-(ida)-a podría actuar como inhibidor de la ALA-sintetasa, primera enzima de su camino biosintético. Pero en la conversión de protoclorofil-(ida)-a a clorofil-(ida)-a a la luz, la concentración en el estado estacionario del primer pigmento sería lo suficientemente baja como para no ejercer inhibición feed-back. Los autores sugirieron que todas las enzimas involucradas con la síntesis de protoclorofil-(ida)-a se hallan presentes en el proplástido; efectivamente, células de *Euglena* mantenidas en oscuridad, retienen su contenido de protoclorofil-(ida)-a de generación en generación.

Numerosos trabajos indican que el comportamiento de este pigmento está de acuerdo con el modelo de inhibición feed-back, sugiriendo que la luz desbloquea la síntesis de protoclorofil-(ida)-a convirtiendo este pigmento inhibitorio en clorofila.

Es importante destacar que el efecto de la luz involucra otros hechos de suma importancia, además de la formación de clorofila. La luz induce la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto y por lo tanto, la de-represión del DNA plástido permitiendo así la síntesis de los RNA-mensajeros. Brawerman y Eisenstadt (1964) presentaron evidencias de la presencia de RNA-mensajeros en cloroplastos de *E. gracilis*. Smillie (1963) encontró que el fluoruracilo inhibía el desarrollo de los cloroplastos si se lo incorporaba inmediatamente después de que las

células habían sido expuestas a la luz. Sin embargo, el sistema era insensible a esta droga, si se la agregaba 24 horas después de comenzado el desarrollo, indicando que todo el RNA necesario ya había sido sintetizado durante dicho período de tiempo.

La actinomicina D es una droga también parcialmente inhibitoria (Pogo y Pogo, 1964; Mc Calla y Allan, 1964).

Brawerman (1963) postuló la existencia de ún sólo tipo de ribosomas en cloroplastos de *E. gracilis*. Así si el mensajero se sintetiza a partir del DNA plástido, se puede asociar a los ribosomas plástidos para formar un sistema sintetizante de proteínas

La O-metil treonina bloquea el desarrollo cloroplástico quizás por reemplazo de la isoleucina y formando así proteínas no útiles o quizás por inhibición de la síntesis de aminoácidos. Su efecto es revertido por la isoleucina (Aaronson y Bensky, 1962; Gray y Hendlin, 1962).

La estreptomycinina origina un blanqueamiento de las células, bloqueando asimismo el desarrollo cloroplástico, a partir del proplástido (Schiff y Epstein, 1968). Las evidencias obtenidas con sistemas bacterianos sugieren que este antibiótico interfiere en la unión del mensajero a los ribosomas, resultando en una codificación de ambigüedades (Cox et al., 1964; Davies et al., 1964). Según Schiff y Epstein (1968) la primera acción de la estreptomycinina sobre los cloroplastos de *Euglena* sería bloquear la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto. Si una de las proteínas producidas por este sistema fuese la DNA-polimerasa para el DNA plástido, la interferencia de la estreptomycinina se encontraría a nivel de la replicación; de esta forma se podría llegar a una eliminación total de las estructuras plástidas y del DNA de las células expuestas a su acción.

Las temperaturas superiores a 34 °C tienen un efecto análogo (Brawerman y Chargaff, 1960). Es posible que algunas enzimas involucradas en la replicación del DNA de los plástidos sean sensibles a la desnaturalización a estas temperaturas relativamente bajas.

Así, se debe considerar que la inducción cloroplástica, por la luz es una coordinación compleja de inducción enzimática que emplea los mecanismos de traslación y transcripción, también descriptos para otros sistemas.

REFERENCIAS

- Aaronson, S. & Bensky, B. (1962), J. Gen. Microbiol. 27, 75.
- Ben-Shaul, Y.; Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1964), Plant Physiol. 39, 231.
- Ben-Shaul, Y.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1965), Can. J. Botany 43, 129.
- Bovarnick, J.G.; Chang, S.W.; Schiff, J.A. & Schwartzbach, S.D. (1974 a), J. Gen. Microbiol. 83, 51.
- Bovarnick, J.G.; Schiff, J.A.; Freedman, Z. & Egan, J.M. (Jr.) (1974 b), J. Gen. Microbiol. 83, 63.
- Brawerman, G. (1963), Biochim. Biophys. Acta 72, 317.
- Brawerman, G. & Chargaff, E. (1960), Biochim. Biophys. Acta 37, 221.
- Brawerman, G. & Eisenstadt, J.M. (1964), J. Mol. Biol. 10, 403.
- Brawerman, G. & Konigsberg, N. (1960), Biochim. Biophys. Acta 43, 374.
- Brody, S.; Brody, M. & Levine, J.H. (1965), Biochim. Biophys. Acta 94, 310.
- Brown, J.S. (1963), Biochim. Biophys. Acta 75, 299.
- Brown, R.O. & Haselkorn, R. (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 68 (10), 2536.
- Cox, E.; White, J.R. & Flaks, J.G. (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 51, 703.
- Chua, N.H. & Schmidt, G.W. (1978), "Photosynthetic Carbon Assimilation" (H.W. Siegelman y G. Hind, eds.), pp. 325-347. Plenum,
- Chua, N.H. & Schmidt, G.W. (1979), J. Cell Biol. 81, 461.
- Davies, J.; Gilbert, W. & Gorini, L. (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 51, 883.
- Dodge, J.D. (1974), "The Fine Structure of Algal Cells" (J.D. Dodge, ed.), pp 81-103. Academic Press, New York.
- Dubertret, G. & Lefort-Tran, M. (1982), "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol III pp. 253-312. Academic Press, New York.

- Edelman, M.; Cowan, C.A.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 52, 1214.
- Edelman, M.; Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1965), J. Mol. Biol. 11, 769.
- Eisenstadt, J.M. & Brawerman, G. (1963), Biochim. Biophys. Acta 76, 319.
- Eisenstadt, J.M. & Brawerman, G. (1964 a), Biochim. Biophys. Acta 80, 463.
- Eisenstadt, J.M. & Brawerman, G. (1964 b), J. Mol. Biol. 10, 392.
- Ellis, R. (1977), Biochim. Biophys. Acta 463, 185.
- Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1961), J. Protozool. 9, 427.
- Erwin, J. & Bloch, K. (1962), Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 103.
- Fuller, R.C. & Gibbs, M. (1959), Plant Physiol. 34, 324.
- Gibbs, S.P. (1962), J. Cell Biol. 14, 433
- Gibbs, S.P. (1970), Ann. N.Y. Acad. Sci. 175, 454.
- Gray, R.A. & Hendlin, D. (1962), Plant Physiol. 37, 223.
- Haan, S.A.; Warden, J.T. & Duysen, L.N.M. (1973), Biochim. Biophys. Acta 325, 120.
- Heber, U. & Krause, G.H. (1971), "Photosynthesis and Photorespiration" (M.D. Hatch et al, eds), pp 218-225. Wiley (Interscience), New York.
- Heldt, H.W. (1969), FEBS Lett. 5, 11.
- Heldt, H.W. & Sauer, F. (1971), Biochim. Biophys. Acta 234, 83.
- Joyard, J. & Douce, R. (1976), Physiol. Veg. 14, 31.
- Kirk, J.T.O. (1966), "Biochemistry of Chloroplasts" (T.W. Goodwin, Ed.), Vol I, p. 319. Academic Press.
- Krinsky, N.I.; Gordon, A. & Stern, A.I. (1964), Plant Physiol. 39, 441.
- Lazzarini, R.A. & Woodruff, M. (1964), Biochim. Biophys. Acta 79, 412.
- Leedale, G.F. (1968), "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol I, pp 185-242, Academic Press, New York.

- Liss, R.; Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1965), Resultados no publicados.
- Mc Calla, D.R. & Allan, R.K. (1964), Nature 201, 504.
- Perini, F.; Kamen, M.D. & Schiff, J.A. (1964 a), Biochim. Biophys. Acta 88, 74.
- Perini, F.; Schiff, J.A. & Kamen, M.D. (1964 b), Biochim. Biophys. Acta 88, 91.
- Pogo, B.G.T. & Pogo, A.O. (1964), J. Cell Biol. 22 296.
- Rosenberg, A. (1963), Biochemistry 2, 1148.
- Sager, A. (1958), Brookhaven Symp. Biol. 11, 101.
- Scott, N.S. & Smillie, R.M. (1977), Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (4), 598.
- Schiff, J.A. (1963), Carnegie Inst. Wash. Year Book 62, 375.
- Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1965) "Reproduction: Molecular, Subcellular and Cellular" p. 131, Academic Press Inc., N. York and London (ed. M. Locke).
- Schiff, J.A. & Epstein, H. T. (1968), "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol II, pp 285-333. Academic Press, New York.
- Schiff, J.A. & Schwartzbach, S.D. (1982), "The Biology of *Euglena*" (D.E. Buetow, ed.), Vol III, pp. 313-352. Academic Press, New York.
- Schiff, J.A.; Lyman, H. & Epstein, H. T. (1967), Biochim. Biophys. Acta 51, 340.
- Smillie, R.M. (1963), Can. J. Botany 41, 123.
- Stern, A.I.; Schiff, J.A. & Klein, H.P. (1960), J. Protozool. 7, 52.
- Stern, A.I.; Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1964 a), Plant Physiol. 39, 220.
- Stern, A.I.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1964 b), Plant Physiol. 39, 226.
- Strotmann, H. & Berger, S. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 20.
- Taylor, F. J.R. (1976), J. Protozool. 23 (1), 28.
- von Wettstein, D. (1961), Can. J. Botany 39, 1537.
- Wolfovitch, R. & Perl, M. (1972), Biochem. J. 130, 819.

CAPITULO XIV

INHIBIDORES DEL SISTEMA CLOROPLASTICO

- XIV.1. Introducción
- XIV.2. Inhibidores de la formación de cloroplastos
 - XIV.2.1. Crecimiento en ausencia de luz
 - XIV.2.2. Efecto de las condiciones de crecimiento sobre el desarrollo del cloroplasto
 - XIV.2.3. 5-Fluoruracilo y otros antimetabolitos
- XIV.3. Agentes blanqueantes
 - XIV.3.1. Luz ultravioleta
 - XIV.3.2. Estreptomicina
 - XIV.3.3. Otros antibióticos
 - XIV.3.4. Deficiencia de Mg
 - XIV.3.5. Presión
 - XIV.3.6. Temperatura

XIV. INHIBIDORES DEL SISTEMA CLOROPLASTICO

XIV.1. Introducción

Existe un número creciente de agentes físicos y químicos que producen una pérdida temporaria o permanente de los cloroplastos de *Euglena*. Esta sensibilidad a determinados factores ambientales, los cuales tienen poco o ningún efecto sobre el resto de la célula, enfatiza la naturaleza semiautónoma de estas organelas.

La presencia de DNA (Sagan et al, 1966) y del sistema sintetizante de proteínas (Eisenstadt y Brawerman, 1964) sugieren que los cloroplastos constituyen entidades semiindependientes, los cuales proveen a la célula de un mecanismo para convertir la luz en energía química.

Los cloroplastos de *Euglena* parecen ser más sensibles a influencias externas que aquellos pertenecientes a otros organismos.

Los agentes que afectan los cloroplastos de *Euglena* pueden dividirse en dos categorías: los que interfieren temporariamente con la formación del cloroplasto a la luz y aquellos que producen una pérdida permanente de la capacidad de formación de los plástidos por un proceso de dilución durante la división celular. Los agentes blanqueantes son sumamente efectivos durante la división celular y provocan la pérdida permanente de los cloroplastos celulares.

La inhibición en la formación de cloroplastos es generalmente un proceso reversible; los inhibidores interfieren temporariamente en la conversión de los proplástidos a cloroplastos verdes o producen células blanqueadas reversiblemente en un cultivo en crecimiento. Así, cuando se elimina la sustancia inhibitoria se restaura la capacidad para formar cloroplastos.

XIV.2. Inhibidores de la formación de cloroplastos

XIV.2.1. Crecimiento en ausencia de luz

Este tema ya fue tratado en el capítulo anterior; sin embargo, se enfatizarán brevemente algunos puntos.

La luz es indispensable para el desarrollo de los plástidos. Durante el crecimiento en oscuridad, dicho desarrollo se bloquea en el estadio correspondiente a los proplástidos (Klein et al, 1972; Osafune et al, 1980). Por exposición a la luz, los proplástidos correspondientes a células en estados de división y de no división, se transforman en cloroplastos (Stern et al, 1964 a, b).

Las células crecidas a la luz y mantenidas posteriormente en oscuridad en un medio completo, se dividen y los cloroplastos se reducen a proplástidos (Pellegrini, 1980).

Tanto para las células en estado de división como para las que se encuentran en un período de no división, uno de los primeros pasos en la pérdida de la clorofila lo constituye la eliminación del Mg de la clorofila a para formar feofitina a . Posteriormente se pierde el grupo carboximetilo del anillo isocíclico para formar pirofeofitina a (Greenblatt y Schiff, 1959; Schoch et al, 1980; 1981).

De acuerdo con los espectros de absorción de células intactas, existe una pérdida selectiva de un tipo de pigmento correspondiente a la antena. Esto también se observó cuando las células se trataban con DCMU, inhibidor de la fotosíntesis (Calvayrac et al, 1979). Posiblemente la oscuridad y el DCMU produzcan los mismos resultados finales: carencia de una bomba de protones con una acumulación posterior de iones hidrógeno en la cercanía de la clorofila de tal forma de que se origina la feofitina.

Dubash y Rege (1967) mantuvieron a *E. gracilis* en ausencia de luz durante 6 años (más de 300 transferencias) sin evidencias de una pérdida permanente de la capacidad de formar cloroplastos.

Wolken (1961) postuló que la pérdida de los cloroplastos en ausencia de luz no es siempre un proceso completamente reversible.

XIV.2.2. Efecto de las condiciones de crecimiento sobre el desarrollo del cloroplasto

El desarrollo de los cloroplastos, inducido por luz, se halla inhibido por la presencia de ciertas fuentes de carbono (App y Jagendorf, 1963; Buetow, 1967; Harris y Kirk, 1969; Horrum y Schwartzbach, 1980 a). Así, el etanol inhibe específicamente la síntesis de ciertas enzimas inducidas por la luz y localizadas en los cloroplastos, en células en no división (Horrum y Schwartzbach, 1980 a, c).

Cuando las células de *Euglena* crecen bajo condiciones fotoorganotróficas, la síntesis inducida por luz de los constituyentes cloroplásticos es baja comparada con los niveles encontrados en células fototróficas (Nicolas et al, 1980). La síntesis de macromoléculas localizadas en los cloroplastos aumenta cuando las células entran en fase estacionaria debido a un agotamiento del carbono exógeno. Así, cuando hay disponibles fuentes alternativas de carbono y energía que requieren inducción, el desarrollo de los cloroplastos se halla inhibido (Horrum y Schwartzbach, 1980 a). Dado que la formación de estas organelas, necesarias para la utilización de la luz y del CO₂, requiere de un gasto energético significativamente mayor que el correspondiente para la síntesis de algunas enzimas indispensables para el consumo de otro sustrato carbonado, no es sorprendente que exista un mecanismo de control en *Euglena* que reprima el desarrollo de los cloroplastos cuando se encuentren disponibles otras fuentes de carbono y energía, cuya utilización requeriría de una inducción menos compleja. Este mecanismo de control aseguraría que sustratos constitutivos (se hallan siempre presentes durante el crecimiento celular) tales como glutamato, malato y succinato, que no requieren de la inducción de enzimas para su consumo, son utilizados en primer término y que los mismos no inhiben el desarrollo inducido por la luz, de los cloroplastos (Schiff y Schwartzbach, 1982).

Sustratos tales como el acetato y el etanol, que requieren inducción enzimática deben competir por la luz, observándose la incorporación de estas dos fuentes de carbono a expensas del desarrollo de los cloroplastos (Schiff y Schwartzbach, 1982).

Dado que la formación de los cloroplastos inducida por la

luz es frecuentemente estudiada en células de *Euglena* que no se encuentran en división por carencia de fuentes de carbono y/o nitrógeno (Stern et al, 1964 a), es importante entender el efecto de la limitación de los nutrientes sobre el proceso de control antes mencionado. Las células responden a esta limitación con una disminución en la velocidad de síntesis de las proteínas y del RNA. La provisión de una fuente de carbono utilizable produce un incremento en dichas velocidades y la célula eventualmente comienza su división. La exposición a la luz de células de *Euglena* crecidas en oscuridad y que se encuentran en la etapa de no división, provoca un efecto análogo a la provisión de una fuente carbonada, dado que la luz produce la degradación del paramilon dando origen a una fuente interna de carbono rápidamente utilizable.

La formación de clorofila en células etioladas de *Euglena* expuestas a la luz en un medio carente de fuente de carbono, es una tercera parte en relación con la síntesis de este pigmento en células bajo idénticas condiciones pero en un medio complejo de nutrientes (Mego y Buetow, 1966).

La deficiencia de Fe produce una disminución en el contenido de clorofila (Carell y Price, 1965). Este elemento está implicado particularmente en la conversión del coproporfirinógeno a protoporfirinógeno (Lascelles, 1961).

Dado que el Mg es un constituyente de la molécula de clorofila, el crecimiento en un medio deficiente en dicho metal produciría células con menor contenido de pigmento. Wolken (1956) observó que los cloroplastos de *E. gracilis* var. *bacillaris* se colapsan cuando las células crecen en un medio deficiente en Mg. Este autor concluyó que cualquier agente que provoque una desorganización de la molécula de clorofila producirá interferencia en la formación de los cloroplastos con aparición de feofitina.

XIV.2.3. 5-Fluoruracilo y otros antimetabolitos

Uno de los primeros eventos que ocurren durante el verdeo de *Euglena* crecida en oscuridad, es la formación de nuevos ribosomas (Brawerman, 1963). Estos ribosomas se encuentran localizados en los plástidos y funcionan en la síntesis de las proteínas

cloroplásticas. Cualquier agente que inhiba la formación de los ribosomas o la síntesis de los ácidos nucleicos ejercerá un efecto inhibitorio en la formación de los cloroplastos en células de *Euglena* crecida en oscuridad y expuestas a la luz.

El primer compuesto de este tipo es el 5-fluoruracilo (Evans y Smillie, 1962), que constituye un inhibidor efectivo si se añade antes de las primeras 20 horas de iluminación (Smillie, 1963). Pasado este tiempo, no tiene efecto, a pesar de que se sintetiza sólo una parte del contenido total normal de clorofila en la célula.

El 5-fluoruracilo interfiere con la formación de los ribosomas (Aronson, 1961a, b). pero una vez sintetizados estos ribosomas en los plástidos, el 5-fluoruracilo no tiene efecto en la síntesis de proteínas ni en el desarrollo de los cloroplastos (Smillie, 1963).

Este inhibidor no afecta la síntesis de las proteínas no cloroplásticas (Smillie et al, 1963); por lo tanto, éstas no están sujetas a los mismos controles que las proteínas plástidas.

5-fluoruracilo inhibe la síntesis del cit 552 en el mismo grado que la formación de clorofila.

Otro inhibidor del enverdecimiento de células de *Euglena* crecidas en oscuridad y expuestas a la luz, es el ácido N-formilhidroxiaminooacético (hadacidina) (Mego, 1964). Este compuesto es un análogo estructural del ácido aspártico y previene la síntesis de la adenina por inhibición competitiva de la enzima IMP:L-aspartato liasa (Shigeura y Gordon, 1962). Su efecto inhibitorio sobre el verdeo de células de *Euglena* en estado de no división se revierte por la presencia de aspartato o adenina en el medio, pero no por uracilo.

A semejanza con el 5-fluoruracilo, la hadacidina no es efectiva si se añade después de 24 horas de iluminación, puesto que el cloroplasto, ya tiene formada la mayor parte de la matriz y sólo resta la síntesis de clorofila.

Los inhibidores de la síntesis proteica, cloramfenicol y actinomicina D también interfieren con el verdeo de células de *Euglena*. En contraste con el 5-fluoruracilo, el cloramfenicol es efectivo si se lo agrega en cualquier momento durante el proceso de verdeo (Smillie et al, 1963) y aparentemente no inter-

fiere con la formación de ribosomas (Pogo y Pogo, 1965). Este antibiótico inhibe particularmente la incorporación de Mn^{2+} en los componentes lamelares del cloroplasto así como también la síntesis de clorofila, de cit b_6 y de cit 552. El efecto del clo_{ramfenicol} sobre la síntesis proteica en cloroplastos ocurriría a nivel de los ribosomas. Anderson y Smillie (1966) demostraron que los ribosomas cloroplásticos de *Euglena* poseen una mayor capacidad de unir el antibiótico que los correspondientes citoplasmáticos.

La actinomicina D inhibe la síntesis de proteínas y de RNA así como también el enverdecimiento (Mc Calla y Allan, 1964); sin embargo, la inhibición de las síntesis de proteínas y de clo_{rofila} tiene lugar después de las 12 horas de iluminación de las células etioladas.

Dado que este antibiótico interfiere con la síntesis del RNA dependiente de DNA (Hurwitz et al, 1962), estos resultados sugieren que la síntesis proteica cloroplástica estaría bajo el control del DNA. Sin embargo, considerando que la síntesis del RNA cloroplástico comienza inmediatamente después que las células etioladas se han expuesto a la luz (Mego, 1964) uno esperaría que esta droga inhiba completamente el enverdecimiento y las síntesis proteica salvo que la síntesis de RNA dependiente del DNA comience después de las primeras 12 horas de exposición a luz, cuando la mayoría de los ribosomas ya han sido formados.

La actidiona, inhibidor de la síntesis proteica a nivel ribosomal (Bennett et al, 1965) suprime la incorporación de (^{14}C)leucina en proteínas de *Euglena* tanto en luz como en oscuridad (Kirk y Allen, 1966). Este compuesto inhibe la síntesis de carotenoides aunque no tan efectivamente como la síntesis de clorofila. Esta última inhibición sucede ya sea que se agregue el antibiótico inmediatamente de exponer las células etioladas a la luz o después de 4-8 horas de iluminación.

Kirk et Allen (1966) concluyeron que la formación de clorofila en *Euglena* estaría acompañada de síntesis proteica, posiblemente de proteína asociada al holocromo de la clorofila. Los carotenoides están menos relacionados con este proceso durante el enverdecimiento, puesto que son sintetizados en ausencia de luz y por lo tanto, sus enzimas ya están presentes en la célula.

XIV.3. Agentes blanqueantes

XIV.3.1. Luz ultravioleta

Si células de *E. gracilis* var. *bacillaris* crecidas en presencia o ausencia de luz, se exponen a la luz U.V. y luego son plaqueadas en condiciones no reactivantes pero con una intensidad luminosa como para inducir la formación de cloroplastos, el número de colonias verdes formadas disminuye a medida que la dosis de luz U.V. aumenta (Lyman et al, 1961). Se puede observar que un número creciente de colonias blancas reemplaza a las verdes existentes; la luz U.V. ha ocasionado así la pérdida de la capacidad de enverdecimiento en la progenie de células que ha recibido la radiación.

La Pérdida de la viabilidad celular comienza a dosis 10 veces mayor que la máxima requerida para la inactivación de la capacidad de formación de colonias verdes (Hill et al, 1966).

Debemos tener presente que este fenómeno ocurre tanto en células crecidas a la luz (contienen cloroplastos) como en las desarrolladas en oscuridad (carecen de dichas organelas). Esto nos demuestra que no es necesaria la presencia de cloroplastos, en el momento de la irradiación, para que se produzca la inactivación.

Lyman et al (1961) se plantearon el interrogante acerca de la naturaleza química del cromóforo sensible a la luz U.V. El espectro de acción para la inactivación por U.V. reveló que el cromóforo tenía picos en las regiones de 260 y 280 nm, sugiriendo la participación de una nucleoproteína.

Schiff et al (1961 a) demostraron que la pérdida de la habilidad para formar colonias verdes en *Euglena* puede revertirse por tratamiento con luz U.V. de longitud de onda larga y luz azul, aplicada inmediatamente después de la irradiación inactivante. La fotorreactivación de este proceso puede originar un 100% de reversión en *Euglena*, siendo ésta una eficiencia elevada en comparación con otros sistemas (Jagger, 1958) y con la fotorreactivación de la viabilidad de la *Euglena* misma (Hill et al, 1966).

El espectro de acción para la fotorreactivación de *Euglena*

es muy similar a los descritos para la fotorreactivación de la viabilidad de *E. coli* y para la fotorreactivación del bacteriófago T2, inactivado por U.V. Dado que este proceso involucra la inactivación y reparación del DNA, se puede pensar que nucleoproteínas localizadas en el DNA plástido controlarían la capacidad de las células de producir colonias verdes.

Otro de los interrogantes que surgió fue si la luz U.V. actuaba previniendo la replicación de las entidades plásticas o si interfería en el desarrollo de los proplástidos a cloroplastos. Schiff et al (1961 b) irradiaron células crecidas en la oscuridad con una dosis de luz U.V. que inhibía en un 100% la capacidad de formación de colonias verdes, cuando dichas células eran plaqueadas bajo condiciones no fotorreactivantes. Una alícuota de estas células fue colocada en un medio de mantenimiento, en el cual éstas no se dividen y se expusieron a la luz roja, que induce la formación de cloroplastos y clorofila sin provocar fotorreactivación.

La microscopía de fluorescencia reveló que todas las células irradiadas producían cloroplastos y sintetizaban clorofila, indicando que el desarrollo de las organelas no se encontraba bloqueado por la luz U.V. Sin embargo, cuando estas células fueron plaqueadas en un nuevo medio de crecimiento, se observó un 100% de colonias blancas, lo cual indicaría que la luz U.V. bloqueaba la replicación de las entidades responsables de la formación de los cloroplastos, en el momento de la división celular. Las experiencias de inactivación con luz U.V. y de fotorreactivación realizadas hasta el momento llevaron a la conclusión de que las células crecidas en oscuridad contenían aproximadamente 30 entidades DNA-proteína localizadas en 30 proplástidos. La luz induciría la formación de 10 cloroplastos, cada uno constituido por la fusión de 3 proplástidos; las 30 entidades DNA-proteína se conservan en cada célula pero están localizadas a razón de 3 por cloroplasto.

La irradiación con luz U.V. se ambos tipos de células, crecidas a la luz o en oscuridad, daría como resultado un bloqueo en la división del cloroplasto o proplástido respectivamente, durante la división celular.

Esto predice entonces, que la inactivación por luz U.V. y la pérdida de la capacidad de enverdecimiento por una célula serían sinónimos de la pérdida de los plástidos celulares y

de sus entidades DNA.

Las células mutadas con luz U.V., incapaces de formar cloroplastos y de sintetizar clorofila nunca regresan a su estado original. La microscopía de fluorescencia revela que no se encuentran presentes estructuras fluorescentes de ningún tipo, indicando la ausencia de protoclorofil-(ida)-a.

Por medio de la microscopía electrónica se puede confirmar la ausencia de estructuras plástidas: cloroplastos o proplástidos según sean mutantes que provengan de células crecidas en presencia o en ausencia de luz respectivamente, obtenidas por tratamiento con luz U.V. (Liss et al, 1965).

También se pueden aislar mutantes que no han perdido totalmente la capacidad de formar cloroplastos, sino que presentan un bloqueo en un determinado paso del desarrollo. Estas forman proplástidos cuando crecen en la oscuridad pero muestran ciertas anomalías interesantes que pueden llegar a ser de suma utilidad en el estudio de las fases fisiológicas del desarrollo (Liss et al, 1965).

En las células mutadas se observa una gran hipertrofia de las estructuras mitocondriales de una amplia y extraña diversidad (Lefort, 1964). Es muy probable que la presencia o ausencia de cloroplastos activos controle el desarrollo de las estructuras mitocondriales, con el fin de mantener una actividad respiratoria compensada. Luego de la irradiación, con la proliferación de las mitocondrias y la degeneración de los cloroplastos, las posiciones relativas de estas organelas se modifican.

XIV.3.2. Estreptomicina

En *Euglena*, el efecto blanqueante de la estreptomicina es más efectivo durante la división celular, particularmente en ausencia de luz (Mego y Buetow, 1966), pero se requieren relativamente altas concentraciones para producir el mismo efecto cuando la célula está en proceso de verdeo, en ausencia de división celular.

Células de *E. gracilis* Z crecidas en oscuridad, sintetizan clorofila cuando se las ilumina en un medio conteniendo 5 mg estreptomicina/ml. Si las células se hacen crecer previamente

te en la oscuridad, en presencia del antibiótico, concentraciones tan pequeñas como 0,01 mg/ml inhiben completamente la síntesis de clorofila.

Hay que hacer notar que la inhibición producida por esta droga sobre el desarrollo de los cloroplastos, en células etioladas expuestas a la luz, está influenciada por el pH del medio.

Las células blanqueadas con estreptomycinina presentaban cloroplastos más pequeños que los normales, junto con pérdida de los pirenoídes y fragmentación de los mismos (Provasoli et al, 1951). Vavra (1957) encontró una pérdida de la capacidad por parte de los cloroplastos para crecer; la división celular reducía su tamaño hasta que los mismos se desintegraban y desaparecían. Sin embargo, Siegesmund et al (1962) no lograron encontrar estructuras tipo proplásticos, en *Euglena* blanqueada con estreptomycinina, la que había pasado por varias generaciones y había sido subcultivada numerosas veces en ausencia de luz. Quizás, la presencia o ausencia de proplásticos en células blanqueadas estaría relacionada con el tiempo o el número de generaciones durante las cuales las células se han mantenido en ausencia de luz (estado aclorofílico). Los plástidos remanentes incapaces de formar cloroplastos pueden persistir por varias generaciones en *Euglena* blanqueada.

El blanqueamiento por estreptomycinina puede ser parcialmente inhibido, si están presentes en el medio cationes divalentes incluyendo el Mg (Kirk, 1962 a,b). Los más efectivos resultan ser el Mn y el Ca. El hecho de que el Mn sea más efectivo que el Mg en inhibir el blanqueamiento producido por la estreptomycinina en *Euglena* sugiere que este último efecto no es debido a la quelación del Mg. El Mn puede revertir también la acción inhibitoria de este antibiótico sobre la incorporación de ^{14}C -leucina en proteínas de *Euglena*.

Este efecto de los cationes divalentes es difícil de explicar. La estreptomycinina forma quelatos con dichos cationes; sin embargo es más probable que fuese el resultado de un efecto sobre el transporte del antibiótico dentro de la célula (Litwark y Pramer, 1957).

Ebringer y Kupkova (1967) y Ebringer et al (1967) estudiaron el efecto de la hidroxilamina, observando que la misma revier

te la acción blanqueante de la estreptomina. Los autores sugirieron que la hidroxilamina inactivaría o eliminaría la estreptomina unida, quizás, al DNA plástico.

Siegesmund et al (1962) observaron que *E. gracilis* Z crecida en ausencia de luz con 10 mg/ml de estreptomina, recuperaba su capacidad para formar cloroplastos si las células eran subcultivadas en medios libres del antibiótico, varias veces antes de transferirlas a la luz. Sin embargo, hay que aclarar que estos autores emplearon dihidroestreptomina, el cual no es tan efectivo como agente blanqueante en *Euglena*.

Utilizando sulfato de estreptomina en concentraciones de 10-1000 μ gr/ml, significativamente menores que las empleadas por Siegesmund et al (1962), Mego y Buetow (1965) no lograron obtener organismos verdes luego del crecimiento y subcultivo en medios libres de estreptomina. Las diferencias estructurales entre ambos antibióticos les confieren propiedades diferentes tanto a su capacidad de unión a aniones, en sus sitios catiónicos

Partes de la molécula de estreptomina tales como la N-acetilglucosamina, guanidina, estreptamina o estreptobiosamina son inactivas como agentes blanqueantes (Hutner y Provasoli, 1957) lo cual sugeriría que se requieren otras propiedades además de la presencia de grupos catiónicos, para inhibir la replicación del DNA plástico. Además, se debe recordar que la capacidad blanqueante de la estreptomina se encuentra afectada por el pH, localizándose este efecto muy probablemente a nivel de la membrana celular, durante el transporte del antibiótico al medio intracelular.

Zimmer, Triebel y Thrum (1967) demostraron que ciertos antibióticos incluyendo la estreptomina y la dihidroestreptomina interactúan con el DNA, *in vitro*; sus evidencias sugirieron que interaccionarían (cross-linking) con el DNA mediante fuerzas electrostáticas. Es razonable entonces, postular que los antibióticos pueden evitar o inhibir la separación de las cadenas del DNA, luego de la replicación en el cloroplasto (E-bringer et al, 1969). Estos mismos autores estudiaron el efecto de la hidroxilamina como un agente que revierte la acción de estos antibióticos. Aparentemente, la hidroxilamina actuaría liberando los antibióticos de su interacción electrostática con el DNA cloroplástico, separándolos de su sitio de acción y reacción

nando con el grupo aldehído. Si esta última reacción ocurre en primer término, la hidroxilamina convertiría los antibióticos en compuestos no efectivos. Evidentemente, esta hipótesis requeriría de un mecanismo de acción distinto para aquellos antibióticos que no contienen un grupo aldehído.

XIV.3.3. Otros antibióticos

Existen otros antibióticos que actúan también como agentes blanqueantes en *Euglena*: kanamicina, paramomicina, neomicina (Ebringer, 1962 b,c), eritromicina, carbomicina, picromicina y metimicina (Ebringer, 1962 a). Todos estos antibióticos están relacionados estructuralmente, ya que contienen aminoazúcares. Según Ebringer (1962 b), las propiedades básicas débiles de estos compuestos serían las responsables de sus efectos sobre los cloroplastos.

Sin embargo, la viomicina que no contiene un grupo aminoazúcar, tiene igualmente propiedades blanqueantes, pero la oleandomicina que sí lo tiene, no presenta efectos sobre los cloroplastos de *Euglena* (Ebringer, 1962 b).

La kanamicina es el agente blanqueante más potente, pero no es tan tóxica como la estreptomycinina. Ambos efectos, tóxico y blanqueante se revierten en presencia de iones Mg, histidina o una combinación de pantotenato, ácido nicotínico y treonina. La histidina revierte los efectos tóxicos y blanqueantes de la neomicina y de la paramomicina, prácticamente en forma total, pero sólo parcialmente los correspondientes a la estreptomycinina y a la kanamicina. Zahalsky et al (1962) postularon que el Mg y la histidina podían revertir estos efectos inhibiendo el transporte a través de la membrana, al competir por el mismo sitio de unión en el sistema que transporta el antibiótico hacia el interior de la célula.

El agente antitumoral, antramycinina también provoca el blanqueamiento de *Euglena* (Guttman y Tendler, 1966), inhibiendo la síntesis de RNA, DNA-dependiente de un modo similar a la actinomicina (Pantelakis et al, 1966) a pesar de que su efecto como agente blanqueante antes que como un inhibidor temporario del enverdeamiento sugieren un modo diferente de acción que la actinomicina.

Ebringer (1972) estudió el efecto de 144 compuestos sobre los cloroplastos de *E. gracilis* Z, clasificando a los mismos en dos tipos generales, de acuerdo con sus mecanismos de acción:

- a) Inhibidores de la síntesis de DNA; antramicina, porfiramicina, algunas mitomicinas, mixina, ácido nalidíxico y sus derivados, novobiocina, sarcomicina, y otros.
- b) Inhibidores de la síntesis proteica: 29 antibióticos conteniendo una amino-hexosa en su estructura y 3 que no lo poseen: viomicina, estreptogramina y pactamicina.

Sólo estos dos tipos de antibióticos se comportan como agentes blanqueadores; otros compuestos que inhibían la síntesis de la pared bacteriana o la síntesis de RNA, pirimidina y purina o producían cambios en la permeabilidad de la membrana o inhibían el transporte de electrones, no eran efectivos como agentes blanqueadores.

Si bien aún no está totalmente aclarado el modo de acción de los antibióticos, el efecto del cloramfenicol, inhibidor específico de la síntesis proteica en los cloroplastos, sugiere que otros procesos o mecanismos están involucrados en el blanqueamiento. Aparentemente, los compuestos que atacan o dañan el DNA cloroplástico tienen mayor capacidad para inducir otros cambios que lleven a la pérdida irreversible de los cloroplastos, que sustancias que actúen en otros sitios (Ebringer et al. 1972).

XIV.3.4. Deficiencia de Mg

El crecimiento de *E. gracilis* en ausencia de luz y en un medio deficiente de Mg, provoca un blanqueamiento permanente (Dubash y Rege, 1967). Aparentemente el Mg parece ser un elemento indispensable para mantener la continuidad plástica.

Defelinski y Price (1978) observaron que a medida que disminuye la cantidad de Mg en el medio, la velocidad de síntesis de clorofila y de proteínas es menor, siendo la disminución de éstas previa y la causa del decrecimiento en la formación de clorofila.

XIV.3.5. Presión

Las altas presiones provocan daños permanentes en el sistema cloroplástico de *Euglena* (Gross, 1965); así si se aplica una presión de 100 atm durante media hora sólo permanece el 1% de los organismos en forma viable y durante 20 minutos o 2 horas se produce un 20% de colonias blanqueadas.

Sin embargo, la presión no es un agente blanqueante efectivo si se lo compara con los agentes químicos o las temperaturas elevadas.

XIV.3.6. Temperatura

La mayoría de las cepas de *Euglena* pierden sus cloroplastos y se blanquean irreversiblemente cuando crecen a temperaturas de 34-35 °C.

Cuando *Euglena* crece a 34,5 °C, la velocidad de división celular no se ve afectada, pero la densidad final del cultivo es considerablemente menor. El número de divisiones celulares a temperaturas elevadas determina el grado de blanqueamiento.

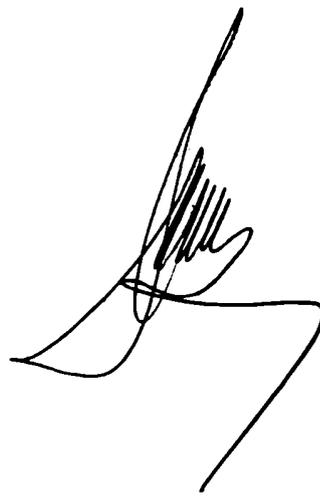
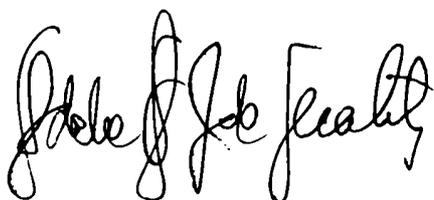
Si las células sometidas a temperaturas blanqueantes se colocan posteriormente a temperaturas normales, antes que los cloroplastos se pierdan por completo, estas células pueden recuperar la capacidad de sintetizar clorofila.

Cook et al (1974) observaron que células de *E. gracilis* Z podían perder irreversiblemente su capacidad para desarrollar cloroplastos, en condiciones fisiológicas. Las condiciones para que ocurriera dicho blanqueamiento eran: transferencia de un medio orgánico a un medio definido, ausencia de luz, temperatura de 30 °C (óptima para la multiplicación); cada uno de estos factores por sí solos, no tiene acción blanqueante. El grado de blanqueamiento obtenido en la población fue de un 100% observándose una fuerte dependencia de las siguientes condiciones: pH del medio definido y su contenido en fosfatos, edad del cultivo madre en el momento de la transferencia y longitud del período de tiempo hasta el comienzo de la división celular en el medio definido.

Los autores sugirieron que la transferencia de un medio

a otro inducía el blanqueamiento por inactivación de los propláستidos, los cuales se diluían a través de las generaciones siguientes. La temperatura y la ausencia de luz juegan un rol sinérgico en este proceso.

La pérdida de la herencia plástida como resultado de la transferencia de un medio complejo a un medio definido podría ser la expresión de una tercera clase de agentes blanqueantes para *Euglena*. Además, esta forma de blanqueamiento es un proceso que puede ocurrir fácilmente en la naturaleza y provee una explicación del origen natural y reciente de protozoarios flagelados incoloros.



REFERENCIAS

- Anderson, L.A. & Smillie, R.M. (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 535.
- App, A.A. & Jagendorf, A.T. (1963), *J. Protozool.* 10, 340.
- Aronson, A.I. (1961 a), *Biochim. Biophys. Acta* 49, 89.
- Aronson, A.I. (1961 b), *Biochim. Biophys. Acta* 49, 98.
- Bennett, L.L.; Ward, V.L. & Brockman, R.W. (1965), *Biochim. Biophys. Acta* 103, 478.
- Brawerman, G. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* 72, 317.
- Buetow, D.E. (1967), *Nature (London)* 213, 1127.
- Calvayrac, R.; Laval-Martin, D.; Dubertret, G. & Bomsel, G. (1979), *Plant Physiol.* 63, 866.
- Carell, E.F. & Price, C.A. (1955), *Plant Physiol.* 40, 1.
- Cook, J.R.; Harris, P. & Nachtwey, D.S. (1974), *Plant Physiol.* 53, 284.
- Dubash, P.J. & Rege, D.V. (1967), *Biochim. Biophys. Acta* 136, 185.
- Ebringer, L. (1962 a), *J. Protozool.* 9, 373.
- Ebringer, L. (1962 b), *Naturwissenschaften* 49, 334.
- Ebringer, L. (1962 c), *J. Antibiotics (Tokyo) Ser. A* 15,
- Ebringer, L. (1972), *J. General Microbiol.* 71, 35.
- Ebringer, L. & Kupkova, H. (1967), *Folia Microbiol.* 12, 36.
- Ebringer, L.; Mego, J.L. & Podova, G. (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 571.
- Ebringer, L.; Mego, J.L. & Jurasek, A. (1969), *Archiv für Mikrobiologie* 64, 229.
- Eisenstadt, J. & Brawerman, G. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 80, 463.
- Evans, W.R. & Smillie, R.M. (1962), *Plant Physiol.* 37 (Suppl.), XXXVIII.
- Greenblatt, C. & Schiff, J.A. (1959), *J. Protozool.* 6, 23.
- Gross, J.A. (1965), *Science* 147, 741.

- Guttman, H.N. & Tendler, M.D. (1966), *Federation Proc.* 25, 562.
- Harris, R.C. & Kirk, J.T.O. (1969), *Biochem. J.* 113, 195.
- Hill, H.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1966), *Biophys. J.* 6, 135.
- Horrum, M.A. & Schwartzbach, S.D. (1980 a), *Plant Physiol.* 65, 382.
- Horrum, M.A. & Schwartzbach, S.D. (1980 b), *Planta* 149, 376.
- Horrum, M.A. & Schwartzbach, S.D. (1980 c), *Plant Physiol.* 65, 5-19.
- Hurwitz, J.; Furth, J.J.; Malamy, M. & Alexander, M. (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1222.
- Hutner, S.H. & Provasoli, L. (1951), "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (A.Lwoff, ed.), Vol 1, pp. 79-128. Academic Press, New York.
- Jagger, J. (1958), *Bacteriol. Rev.* 22, 99.
- Kirk, J.T.O. (1962 a), *Biochim. Biophys. Acta* 56, 139.
- Kirk, J.T.O. (1962 b), *Biochim. Biophys. Acta* 59, 476.
- Kirk, J.T.O. & Allen, R.L. (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 523.
- Klein, S.; Schiff, J.A. & Holowinsky, A.W. 28, 253.
- Lascelles, J. (1961), *Physiol. Rev.* 41, 417.
- Lefort, M. (1964), *Compt. Rend.* 258, 4318.
- Liss, R.; Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1965), Resultados no publicados.
- Litwak, G. & Pramer, D. (1957), *Arch. Biochem. Biophys.* 68, 396.
- Lyman, H.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1961), *Biochim. Biophys. Acta* 50, 301.
- Mc Calla, D.R. & Allan, R.K. (1964), *Nature* 201, 504.
- Mego, J.L. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 79, 221.
- Mego, J.L. & Buetow, D.E. (1966), *J. Protozool.* 13, 20.

- Nicolas, P.; Freyssinet, G. & Nigon, V. (1980), *Plant Physiol.* 65, 631.
- Osafune, T. & Schiff, J.A. (1980), *J. Ultrastruct. Res.* 73, 64.
- Pantelakis, P.N.; Tendler, M.D.; Cole, D.R.; Rousselot, L.M. & Korman, S. (1966), *Federation Proc.* 25, 297.
- Pellegrini, M. (1980), *J. Cell Sci.* 46, 313.
- Pogo, B.G.T. & Pogo, A.G. (1965), *J. Protozool.* 12, 96.
- Provasoli, L.; Hutner, S.H. & Pinter, I.J. (1951), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 16, 113.
- Sagan, L.; Ben-Shaul, Y.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1966), *Plant Physiol.* 40, 1257.
- Schiff, J.A. & Schwartzbach, S.D. (1982), "The Biology of *Euglena*", (D.E. Buetow, ed.), Vol III, Chapter 8, pp 313-352. Academic Press, New York.
- Schiff, J.A.; Lyman, H. & Epstein, H.T. (1961 a), *Biochim. Biophys. Acta* 50, 310.
- Schiff, J.A.; Lyman, H. & Epstein, H.T. (1961 b), *Biochim. Biophys. Acta* 51, 340.
- Schoch, S.; Sheer, H.; Rüdiger, W.; Schiff, J.A. & Siegelman, H.W. (1980), *Plant Physiol.* 65-s, 19.
- Schoch, S.; Sheer, H.; Rüdiger, W.; Schiff, J.A. & Siegelman, H.W. (1981), *Z. Naturforsch.* 36C, 827.
- Shigeura, H.T. & Gordon, C.N. (1962), *J. Biol. Chem.* 237, 1937.
- Siegesmund, K.A.; Rosen, W.G. & Gawlik, S.R. (1962), *Am. J. Botany* 49, 137.
- Smillie, R.M. (1963), *Can. J. Botany* 41, 123.
- Smillie, R.M.; Evans, W.R. & Lyman, H. (1963), *Brookhaven Symp. Biol.* 16, 89.
- Stern, A.I.; Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1964 a), *Plant Physiol.* 39, 220.
- Stern, A.I.; Epstein, H.T. & Schiff, J.A. (1964 b), *Plant Physiol.* 39, 226.
- Vávra, J. (1957), *Folia Biol.* 3, 108.

- Wolken, J.J. (1956), J. Protozool. 3, 211.
- Wolken, J.J. (1961), "Euglena. An Experimental Organism for Biochemical and Biophysical Studies". Rutgers Univ. Press, New Brunswick, New Jersey.
- Zahalsky, A.C.; Hutner, S.H.; Keane, M. & Burger, R.M. (1962), Arch. Mikrobiol. 42, 46.
- Zielinski, R.E. & Price, C.A. (1978), Plant Physiol. 61, 624.
- Zimmer, C.; Triebel, H. & Thrum, H. (1967), Biochim. Biophys. Acta 145, 742.

BIOSINTESIS ENZIMATICA DE PORFIRINOGENOS

por

ADELA ANA JUKNAT

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS de la
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

DIRECTOR: Dra. Alcira M. del C. Batlle de Albertoni

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas
y Porfirias (CIPYP)

Departamento de Química Biológica. Facultad
de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad
de Buenos Aires.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas
y Técnicas (CONICET)

TOMO II

BUENOS AIRES, JULIO DE 1983

1781
V.2
Ej. 1

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Succ.CoA	Succinil Coenzima A
Gli	Glicina
ALA	Acido delta aminolevúlico
PBG	Porfobilinógeno
Uro, Urogen	Uroporfirina, Uroporfirinógeno
Firia, Firiagen	Firiaporfirina, Firiaporfirinógeno
Copro, Coprogen	Coproporfirina, Coproporfirinógeno
Proto, Protogen	Protoporfirina, Protoporfirinógeno
PAI	Porfiria Aguda Intermitente
PCE	Porfiria Congénita Eritropoyética
PCT	Porfiria Cutánea Tardía
PV	Porfiria Variegata
SDJ	Síndrome de Dubin-Johnson
Succinil-CoA-S	Succinil CoA sintetasa
ALA-S	ALA Sintetasa
ALA-D	ALA Dehidrasa
PBG-asa	Porfobilinogenasa
CPG-asa	Coprogenasa
PTG-asa	Protogen-oxidasa
CiSH	Cisteína
PDMAB	p-dimetilaminobenzaldehído
PPy	Fosfato de piridoxal
GSH	Glutati6n
PM	Peso Molecular
TCA	Acido tricloroacético
TRIS	TRI(hidroxi metil) aminometano



TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS

4

PARTE 1

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

NOMENCLATURA Y ESTRUCTURA

- I.1. Introducción
- I.2. Porfirinas
- I.3. Porfirinógenos
- I.4. Metaloporfirinas
 - I.4.1. Hierro-porfirinas
 - I.4.2. Clorofilas y Bacterioclorofilas
- I.5. Hemoproteínas
 - I.5.1. Citocromos
- I.6. Corrinas
- I.7. Tetrapirroles de cadena abierta

PARTE 1: ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

I. NOMENCLATURA Y ESTRUCTURA

I.1. Introducción

Las porfirinas son compuestos tetrapirrólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Existen en mínimas cantidades al estado libre, encontrándose normalmente unidos a metales.

Las porfirinas son las responsables del color rojo de la hemoglobina y del verde de la clorofila, pigmentos sumamente importantes en los procesos fundamentales de respiración y fotosíntesis.

Participan en un número de reacciones metabólicas de gran significado fisiológico, como transportadores de electrones, energía y gases, oxidaciones biológicas, fijación de nitrógeno, etc.

Los estudios acerca de estos compuestos tetrapirrólicos comenzaron con los trabajos realizados por Hoppe-Seyler (1880); Willstätter y Stoll (1928) y Fischer (1937).

Varios años después, las escuelas de Lemberg (1949) y Mc Donald (1955) establecieron la estructura química de varias porfirinas, sintetizando la mayoría de las que se encuentran en la naturaleza.

Así, el conocimiento creciente acerca de la química de las porfirinas, adquirido durante los primeros cincuenta años de este siglo, culminó con la elucidación de las estructuras del hemo y de la clorofila, que ha constituido la piedra fundamental sobre la cual se ha edificado el estudio de la biosíntesis de estos pigmentos.

Los tetrapirroles naturales o sintéticos derivan de dos núcleos básicos: PORFINA Y CLORINA (Figura 1.1.), que contienen cuatro anillos pirrólicos (A, B, C y D), unidos entre sí por medio de cuatro puentes metenos (α , β , γ y δ). Los carbonos externos β y β' de los anillos pirrólicos se identifican con los números 1 al 8, comenzando por el núcleo A. La diferencia estructural entre los núcleos de la porfina y la clorina consiste sim

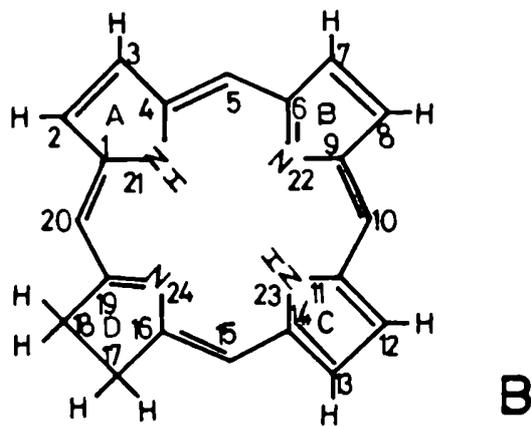
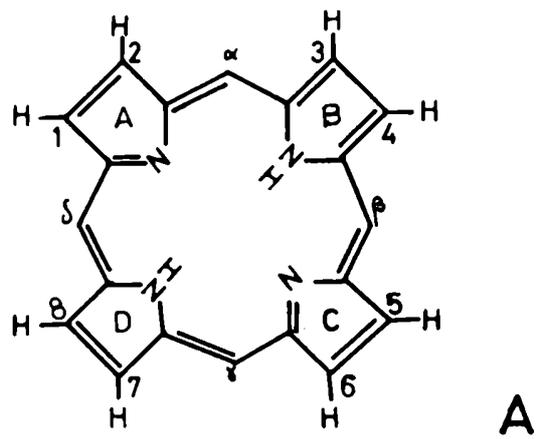


FIGURA 1.1.: Representación de las estructuras de la porfina (A) y de la clorina (B). Nomenclatura del núcleo según Fischer (A) e IUPAC (B)

plemente en que, en la última, el anillo D se encuentra reducido.

La presencia de un sistema de dobles ligaduras alternadas en estos compuestos cíclicos de 16 átomos internos, da como consecuencia una estructura resonante, muy estable y planar.

Las distintas estructuras de los tetrapirroles naturales derivan, como ya se mencionó, de estos dos esqueletos básicos, modificados:

- a) por sustitución parcial o total de los átomos de carbono externos (1 al 8) por restos alquilo;
- b) por sustitución o reemplazo sobre los puentes meténicos; en este caso, los sustituyentes pueden ser átomos de hidrógeno, como aparecen en los porfirinógenos o un anillo de ciclopentanona como en las clorofilas; o un reemplazo como ocurre en el anillo porfirínico de la corrina, característico de los derivados de la vitamina B₁₂, en el cual se ha perdido el puente meténico δ ;
- c) por inserción de un metal, conduciendo a la formación de metaloporfirinas.

1.2. Porfirinas

Las porfirinas son derivados de los tetrapirroles, libres de metales, que se diferencian estructuralmente según la naturaleza y el ordenamiento de las cadenas laterales que han sustituido las posiciones 1 a 8 de los anillos pirrólicos.

Empleando la nomenclatura propuesta por Fischer para identificar a los distintos átomos de carbono del núcleo de la porfina, ilustrada en la Figura 1.1. se observa fácilmente que todas aquellas porfirinas, tales como Uroporfirinas, Coproporfirinas y Etioporfirinas, son derivados de las porfinas en las cuales cada uno de los cuatro anillos pirrólicos, lleva dos restos sustituyentes diferentes, que podemos llamar A y B. Por ejemplo, la Uroporfirina (Figura 1.2.) tiene cuatro restos acético y cuatro restos propiónico, es decir, sólo dos tipos de sustituyentes diferentes: acético y propiónico. En estos casos existen cuatro ordenamientos distintos de los dos grupos, los cuales dan lugar a cuatro isómeros de posición: tipos I, II, III y IV (Figura 1.3.).

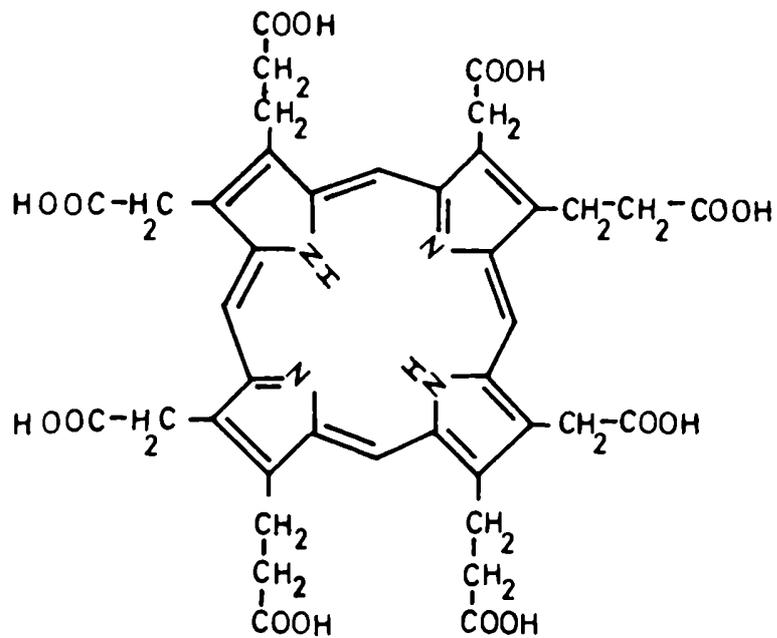


FIGURA 1.2.: Uroporfirina
III

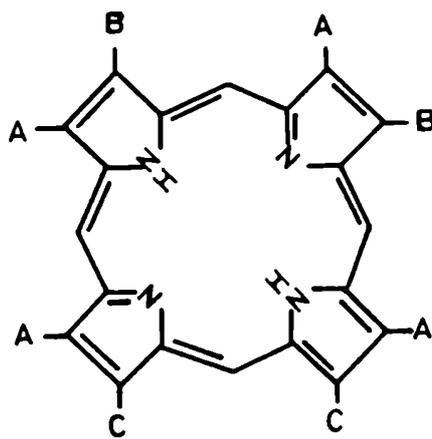


FIGURA 1.4.: Representación esquemática de la estructura de
la Proto y Mesoporfirina
Protoporfirina: A: $-\text{CH}_3$; B: $-\text{CH}=\text{CH}_2$ C: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Mesoporfirina: A: $-\text{CH}$; B: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$; C: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$

En las PROTO y Mesoporfirinas se encuentran tres sustituyentes distintos, dos grupos A y B en los anillos A y B y dos grupos A y C en los anillos C y D (Figura 1.4.). La existencia de tres sustituyentes da lugar a 15 isómeros de posición. Fischer (1937) sintetizó químicamente los 15 isómeros de la protoporfirina. Sin embargo, hasta ahora sólo se ha encontrado en la naturaleza, a la Protoporfirina IX o ácido 1,3,5,8-tetrametil-2,4-vinilporfin-6,7-dipropiónico, el cual proviene únicamente de porfirinas pertenecientes a la serie isomérica III. Este hecho es muy significativo ya que todos los tetrapirroles naturales fisiológicamente activos son tipo III. No obstante, cabe mencionar que se han detectado también derivados naturales de la serie I que no cumplen rol fisiológico alguno y son el resultado de alteraciones en el camino metabólico normal de los tetrapirroles, las cuales se discutirán más adelante.

Los compuestos correspondientes a las series II y IV no han sido aislados hasta el momento, a partir de fuentes naturales.

I.3. Porfirinógenos

El tratamiento de las porfirinas con agentes reductores, tales como amalgama de sodio o borhidruro de sodio, da lugar a la adición de 6 átomos de hidrógeno en el anillo de la porfirina, cuatro de ellos a los puentes meténicos y dos a los nitrógenos de los pirroles. Estos derivados reducidos, denominados Porfirinógenos (Figura 1.5.), son compuestos incoloros, no fluorescentes, que cuando se liberan o excretan, se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas. Esta reoxidación puede acelerarse por medio del agregado de oxidantes suaves, como por ejemplo, soluciones diluídas de iodo.

Los porfirinógenos son los verdaderos intermediarios en el camino biosintético normal del hemo y de las clorofilas y en ello radica su gran importancia biológica.

I.4. Metaloporfirinas

Normalmente, las porfirinas se encuentran como complejos

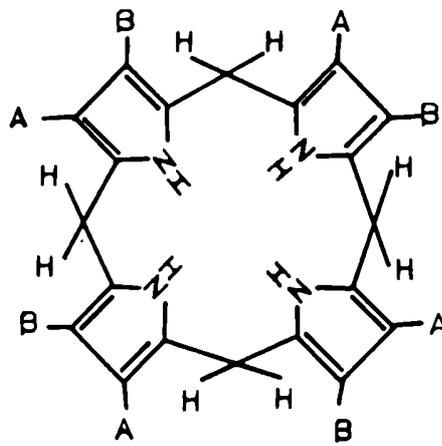


FIGURA 1.5.: Representación esquemática de la estructura de un porfirinógeno

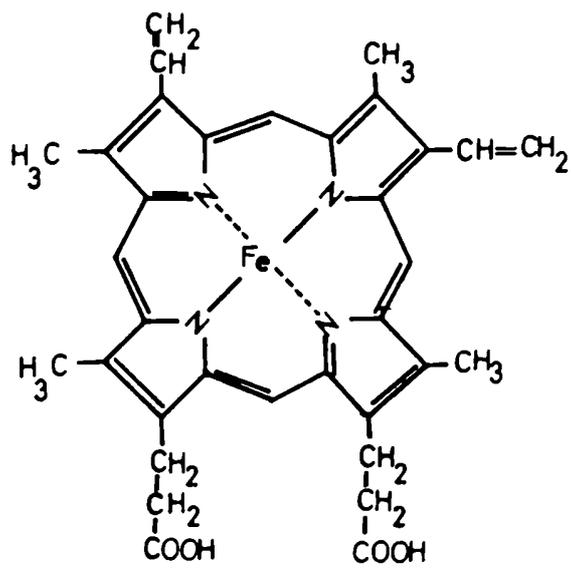


FIGURA 1.6.: Hemo

metálicos, que forman parte de la estructura de compuestos de gran importancia biológica como por ejemplo:

- La hemoglobina (en tejidos animales) que contiene hierro en estado ferroso, interviene en el transporte de gases (O_2 , CO_2 , etc.) en la sangre.
- La clorofila y la bacterioclorofila (en tejidos vegetales y bacterianos respectivamente) que contienen magnesio, cumplen un papel fundamental en la fotosíntesis.
- Los citocromos, que poseen en su estructura hierro capaz de oxidarse y reducirse alternativamente, son compuestos claves en la cadena respiratoria.
- Las corrinas, por ejemplo la vitamina B_{12} , son derivados de las porfirinas complejadas con cobalto.
- Las mioglobinas, que contienen hierro (II), intervienen en el transporte de gases en los músculos.
- Diversas enzimas, tales como catalasa, peroxidasa y triptofano-pirrolasa.

Las porfirinas libres o esterificadas se combinan fácilmente con numerosos metales para formar quelatos, pero solamente los complejos metálicos con el hierro, cobalto y magnesio, cumplen funciones biológicas de importancia.

I.4.1. Hierro-porfirinas

Los complejos de los tetrapirroles con el hierro se denominan hemos o hierroporfirinas. El metal puede encontrarse en forma reducida como en el caso del protohemo o hierroprotoporfirina (Figura 1.6.), o en estado oxidado como ocurre en la hemi-na, hematina o ferriprotoporfirina (Figura 1.7.).

El hemo, que es el grupo prostético de la hemoglobina, se oxida fácilmente en contacto con el aire a hematina o hemina, si el medio contiene iones cloruro. Este cloro-derivado, es muy estable y es la forma bajo la cual se aísla normalmente el grupo prostético de la hemoglobina.

El hemo posee una estructura en la cual los cuatro anillos pirrólicos y el hierro, están ubicados en un mismo plano. El metal posee aún la capacidad de unirse por medio de enlaces

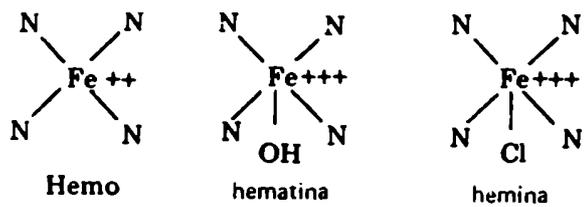


FIGURA 1.7.: Representación esquemática de hemo, hematina y hemina

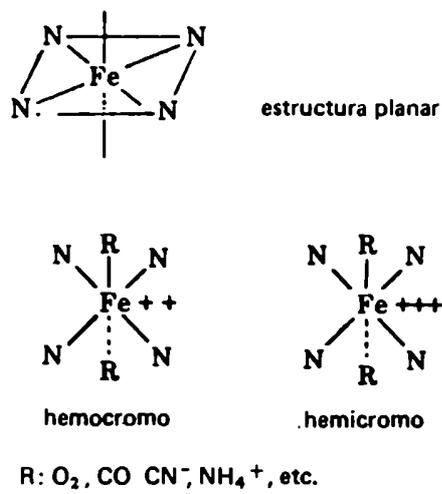


FIGURA 1.8.: Representación esquemática de los complejos hemo y hemicromos

coordinados con otras dos moléculas, que se ubicarán por debajo y por encima del plano antes mencionado; estos derivados se conocen como hemocromos o hemocromógenos. Entre los compuestos que pueden formarlos, encontramos los siguientes: peróxido de hidrógeno, oxígeno, monóxido de carbono, iones cianuro y una gran variedad de bases nitrogenadas como la piridina y el amonio.

La hematina también da origen a complejos similares conocidos como hemicromos o hemicromógenos (Figura 1.8.)

I.4.2. Clorofilas y Bacterioclorofilas

Las clorofilas son tetrapirroles derivados de la clorina que difieren estructuralmente del hemo en cuatro aspectos importantes:

- a) son complejos de magnesio;
- b) el anillo D, en las clorofilas de las plantas, y los anillos B y D en la clorofila de las bacterias, se encuentran al estado reducido;
- c) tienen un anillo adicional (E) de ciclopentanona, formado por ciclización de la cadena lateral de ácido propiónico sobre el carbono 6, con el carbono del puente meténico γ ;
- d) la cadena lateral propiónica sobre el carbono 7 del anillo D, está esterificada con un alcohol isoprenoide de cadena larga, que generalmente es el fitol.

Las plantas superiores contienen dos formas de clorofila, designadas como clorofila a y clorofila b (Figura 1.9.).

La clorofila *a* pura disuelta en acetona posee máximos de absorción a 663 y 420 nm (Figura 1.10.). En las células intactas, sin embargo, la clorofila *a* muestra máximos de absorción diferentes, a mayores longitudes de onda (660, 670, 678 y 685 nm). Tales máximos representan desplazamientos espectrales provocados por diferentes estados de agregación o de unión de las moléculas de clorofila *a*, con proteínas específicas de la célula vegetal.

Las células fotosintéticas productoras de oxígeno contienen dos clases de clorofila, una de las cuales es siempre la clorofila *a*. Mientras que en las plantas verdes, la segunda clo

	R ₁	R ₂	3,4	R ₃	R ₄	R ₅
Clorofila a	-CH=CH ₂	-CH ₃		-COOCH ₃	Fitilo	-H
Clorofila b	-CH=CH ₂	-CHO		-COOCH ₃	Fitilo	-H
Bacterioclorofila a	-CO-CH ₃	-CH dihidro		-COOCH ₃	Fitilo	-H
Bacterioclorofila b		Estructura desconocida				
Bacterioclorofila c	-CHOH-CH ₃	-CH ₃		-H	Farnesilo	-CH ₃
Bacterioclorofila d	-CHOH-CH ₃	-CH ₃		-H	Farnesilo	-CH ₃
Bacterioclorofila e	-CHOH-CH ₃	-CHO		-H	Farnesilo	-CH ₃

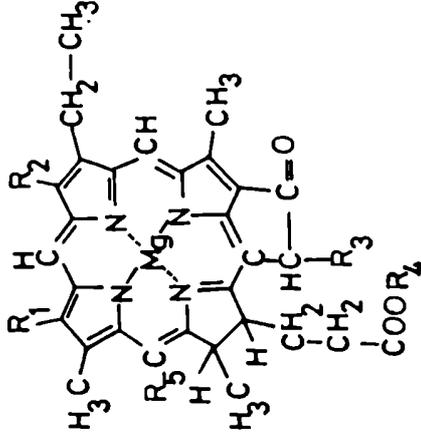


FIGURA 1.9.: (adaptado de Pfennig, 1967). Hay otros sustituyentes posibles para las posiciones 4 y 5 y δ -meso de la Bcl c (Holt et al, 1966; Purdie y Holt, 1965), 4 y 5 de la Bcl d (Holt, 1965; Purdie y Holt, 1965) y 4 de la Bcl e (Brockman, 1976).

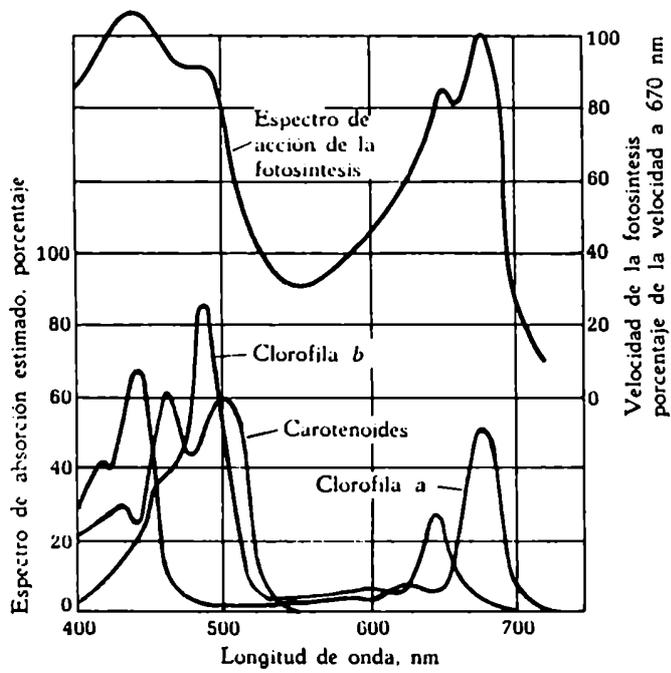


FIGURA 1.10.: Espectro de acción de la fo
tosíntesis en una célula de
una planta verde comparado
con el espectro de absorción
de las clorofilas y de los
carotenoides presentes

rofila es la clorofila *b*, en las algas pardas, diatomeas y dinoflagelados, es la clorofila *c*.

Las células fotosintéticas procarióticas no productoras de oxígeno, no poseen clorofila *a*; contienen bacterioclorofila *a* o bacterioclorofila *b*. La bacterioclorofila *a* (*Bcl a*) difiere de la clorofila *a* de las plantas superiores en la presencia de un grupo acetilo en el anillo A, mientras que el anillo B se ha lla reducido (Figura 1.9.).

La clorofila es el principal pigmento absorbente de luz en la mayor parte de las plantas verdes; este hecho ha quedado establecido por mediciones del espectro de acción fotoquímica de la fotosíntesis, que es una representación de la eficacia de las diferentes longitudes de onda de la luz visible para inducir el desprendimiento de oxígeno. La Figura 1.10. muestra el espectro de acción de la fotosíntesis en una planta verde así como también el correspondiente a la absorción de la luz de sus pigmentos fotosintéticos. El espectro de acción concuerda perfectamente con la suma de los espectros de absorción de las clorofilas y los carotenoides; sin embargo, la mayor parte del espectro visible, refleja los espectros de absorción de las clorofilas *a* y *b*. En base a esta evidencias, se ha llegado a la conclusión de que la clorofila es la molécula absorbente de luz por excelencia, en las células de las plantas verdes.

Además de los distintos tipos de clorofilas y bacterioclorofilas que se encuentran en la naturaleza existen también derivados de las mismas. La nomenclatura empleada para designar a los derivados de las clorofilas, tiene en cuenta la presencia o ausencia del magnesio y del grupo fitol (Tabla 1.1.).

Los derivados correspondientes a la bacterioclorofila, simplemente llevan el prefijo "bacterio", por ejemplo, "bacterioclorofilida".

La *Bcl a*, pigmento característico de las bacterias purpúreas, se encuentra también presente, aunque en pequeñas cantidades, en las bacterias verdes sulfúreas (Jensen et al, 1964).

La *Bcl b* en cambio, reemplaza a la *Bcl a* en sólo dos especies de *Rhodospseudomonas* (*Rp. viridis* y *Rp. sulfoviridis*) y en una correspondiente a la familia Chromatiaceae (*Thiocapsa pfennigii*).

TABLA 1.1.: DERIVADOS DE LA CLOROFILA a

NOMBRE	MAGNESIO	FITOL
clorofila a	+	+
clorofilida a	+	-
feofitina a		+
feoforbida a		

Las especies verdes de la familia Chlorobiaceae contienen Bcl c y d mientras que las marrones poseen Bcl e (Figura 1.9.).

I.5. Hemoproteínas

Las hemoproteínas constituyen una familia de proteínas complejas, cuyo grupo prostético es una hierro-porfirina. Esta denominación es general, ya que no implica que el Fe se encuentre en estado reducido ni que la hierro-porfirina sea el proto-hemo.

Las proteínas específicas para cada hemoproteína están unidas al Fe, a través de determinados grupos funcionales correspondientes a residuos de aminoácidos. También existen uniones covalentes adicionales entre las cadenas laterales del anillo porfirínico y los restos de los aminoácidos.

I.5.1. Citocromos

Los citocromos (cit's) son hemoproteínas transportadoras de electrones.

Algunos cit's se hallan localizados en la membrana mitocondrial interna, donde actúan secuencialmente para transportar los electrones originados en varios sistemas de deshidrogenasas, hasta el oxígeno molecular. Otros, se encuentran en el retículo endoplasmático, en el que desempeñan un papel en las reacciones de hidroxilación especializadas. Todos ellos experimentan cambios reversibles de su estado redox ($\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$) durante los

ciclos catalíticos. Sus formas reducidas no pueden ser oxidadas por el oxígeno molecular, con excepción del cit terminal de la cadena respiratoria mitocondrial: la citocromo c oxidasa, que también contiene Cu íntimamente unido a él.

En la membrana interna de las mitocondrias de los animales superiores, cuya cadena respiratoria se ha estudiado de modo más completo, se han identificado cinco citocromos: b, c₁, c, a y a₃. Uno de ellos, el citocromo b se encuentra por lo menos en dos formas: citocromo b_k y citocromo b_T, las cuales difieren en sus potenciales de óxido-reducción standard; la función de estas dos formas no está aún totalmente esclarecida.

Además de los cit's presentes en la membrana interna mitocondrial, otro tipo, el b₅ se encuentra en el retículo endoplasmático.

En casi todos los cit's, las posiciones de coordinación del hierro que son perpendiculares al anillo de la porfirina, se hallan ocupadas por grupos R de restos aminoácidos específicos de las proteínas. Estos cit's no pueden por ello, unirse a ligandos como el oxígeno, el monóxido de carbono o el cianuro, como ocurre con los hemocromos. El citocromo a₃ constituye una importante excepción ya que, en su función biológica, se une normalmente al oxígeno.

A diferencia de la hemoglobina y la mioglobina, en los cit's el átomo de hierro experimenta cambios reversibles entre las formas Fe (II) y Fe (III); estos últimos actúan como transportadores electrónicos, mientras que la hemoglobina y la mioglobina son transportadores de ligando (oxígeno).

Con una sola excepción, los cit's se hallan unidos muy estrechamente a la membrana mitocondrial, y son difíciles de obtener en forma soluble y homogénea. La excepción es el citocromo c (Figura 1.11.), que puede extraerse fácilmente de las mitocondrias mediante soluciones salinas concentradas. El cit c se ha obtenido en forma cristalina de varias especies y se han determinado sus secuencias aminoacídicas.

El grupo hierro-protoporfirina del cit c se halla unido covalentemente a la proteína mediante puentes tioéter entre los grupos vinilos del anillo de la porfirina y dos restos cisteína de la cadena peptídica. Esta es la única hemoproteína en la que

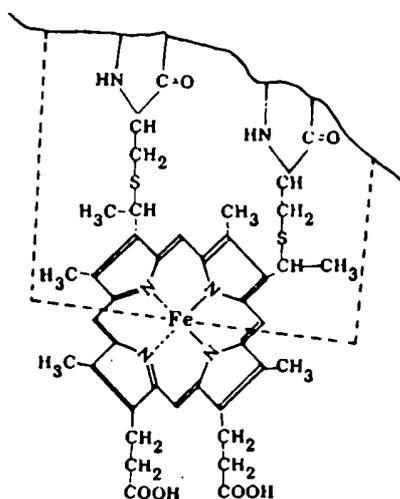


FIGURA 1.11.: Representación esquemática de la estructura del citocromo c, hemoproteína fundamental en la cadena respiratoria

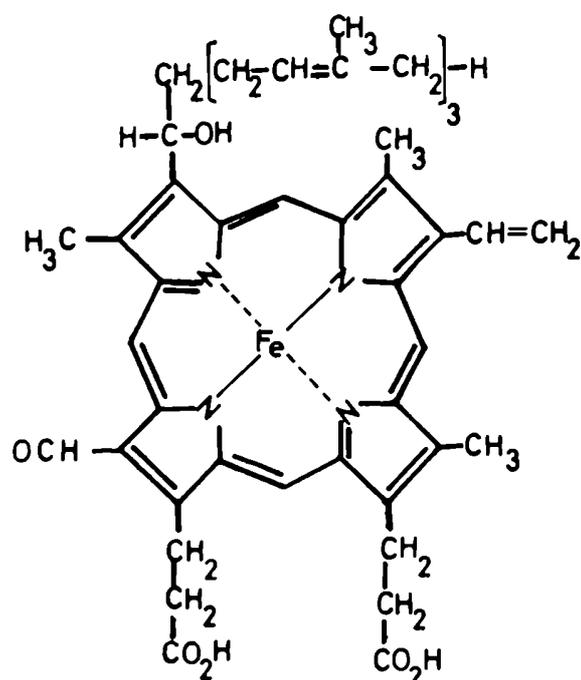


FIGURA 1.12.: Hemo a

el grupo hemo se encuentra unido a la proteína mediante un enlace covalente. Tanto en la hemoglobina como en la mioglobina y al igual que en los cit's b y a, el anillo de la porfirina está unido no-covalentemente, pudiendo separarse de la proteína acidificada por extracción con piridina y otros disolventes. En la Tabla 1.2. se resumen algunas propiedades de los citocromos mitocondriales.

TABLA 1.2.: PROPIEDADES DE LOS CITOCROMOS MITOCONDRIALES

CITOCROMO	PESO MOLECULAR	E' (Voltios)	MAXIMOS DE ABSORCION DE LA FORMA REDUCIDA		
			nm		
			α	β	γ
b	30.000	+ 0,050	563	532	429
c ₁	370.000	+ 0,220	554	524	418
c	13.000	+ 0,254	550	521	415
a	240.000	+ 0,28	600		439
a ₃			603,5		443

Los citocromos a y a₃, que reciben el nombre conjunto de citocromo-c-oxidasa, enzima respiratoria o ferricitocromo-c-oxígeno reductasa, merecen una atención especial. En lugar de prothemo, contienen hemo a (Figura 1.12.) que difiere del anterior en que posee un grupo formilo en lugar de un metilo en la posición 8, no tiene grupo metilo en la posición 5 y en la posición 2 existe una cadena lateral isoprenoide de 17 carbonos, hidrofóbica, en vez de un grupo vinilo. Desde este punto de vista la porfirina a se hallaría relacionada estructuralmente con la porfirina de la clorofila, que también posee una larga cadena lateral isoprenoide.

Todavía no hay total acuerdo acerca de la estructura y mecanismo de acción de los cit's a y a₃. Durante muchos años se creyó que constituían dos entidades separadas ya que sus hemos reaccionan de modo diferente con el cianuro y con el monóxido de carbono y poseen distintos espectros. Sin embargo, ahora está demostrado que se encuentran combinados en una gran molé-

cula proteica oligómera, cuyos hemo son químicamente idénticos, pero difieren en su reactividad hacia ciertos ligandos. Este complejo se conoce como citocromo aa₃. La enzima posee dos moléculas de hemo a y dos átomos de cobre. Los electrones procedentes del cit c son recibidos por el hemo a y transferidos luego al hemo a₃.

Los dos átomos de cobre de la citocromo-c-oxidasa catalizarían la transferencia de electrones desde el hemo a₃ hasta el oxígeno.

I.6. Corrinas

El sistema de anillos de la corrina, se parece al de la hemoglobina ya que contiene cuatro pirroles, pero dos de ellos (A y D) se hallan unidos en forma directa a través de sus posiciones α , estando ausente entonces el puente meténico γ . Coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno internos del sistema anular de la corrina, hay un átomo de cobalto, metal de suma importancia en el crecimiento.

La corrina es parte constitutiva de la estructura de la vitamina B₁₂ (Figura 1.13) conocida como cobalamina, la cual es significativamente importante desde el punto de vista biológico ya que, por ejemplo, resulta esencial para la maduración y desarrollo normal de los eritrocitos y su carencia en la dieta, así como la incapacidad para absorberla de los alimentos ingeridos, producen trastornos tales como la anemia perniciosa.

I.7. Tetrapirroles de cadena abierta

Son compuestos altamente coloreados que se producen en la naturaleza por degradación de la hemoglobina, en cuyo caso se conocen como pigmentos biliares, o bien constituyen los grupos prostéticos de las ficobilinas en las algas rojas y azul-verdosas.

El hígado es el órgano principal encargado de la degradación de la protoporfirina IX. El primer paso en este proceso degradativo, es la oxidación del carbono del puente meténico α , por acción de una α -metenil-oxidasa, con liberación de monóxido de carbono. El producto de esta oxidación se convierte rápida-

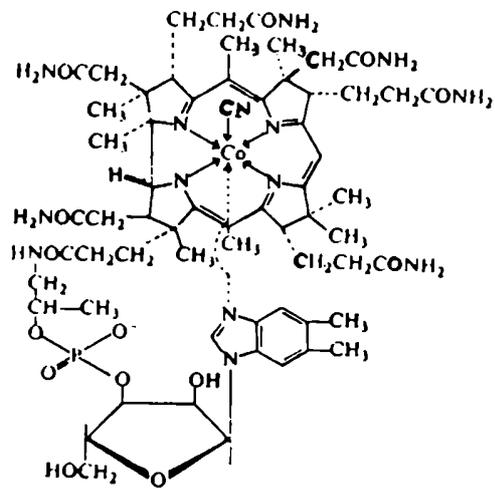


FIGURA 1.13.: Vitamina B₁₂

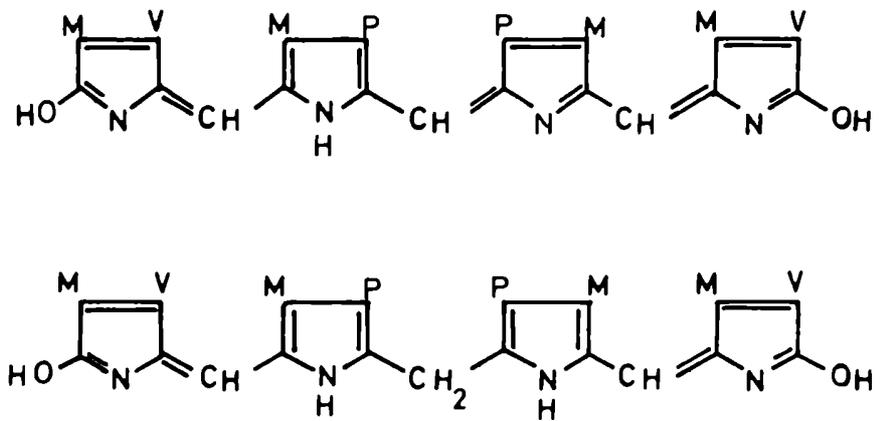


FIGURA 1.14: Estructuras de la Biliverdina IX α y de la Bilirrubina IX α
 M: -CH₃; V: -CH₂=CH₂; P: -CH₂-CH₂-COOH

mente en el tetrapirrol de cadena abierta, conocido como biliverdina IX α (Figura 1.14.), que luego sufre una reducción enzimática a bilirrubina IX α (Figura 1.14.). La bilirrubina se convierte en el hígado en un diglucurónido soluble en agua, que luego se excreta en el duodeno, por la bilis.

Las ficobilinas de las algas rojas o azul-verdosas, son en realidad cromoproteínas solubles en agua, que poseen pigmentos biliares como grupos prostéticos. Hay dos tipos de ficobilinas, la ficocianina (azul) y la ficoeritrina (roja), para las cuales se han sugerido las estructuras que se ilustran en la Figura 1.15.

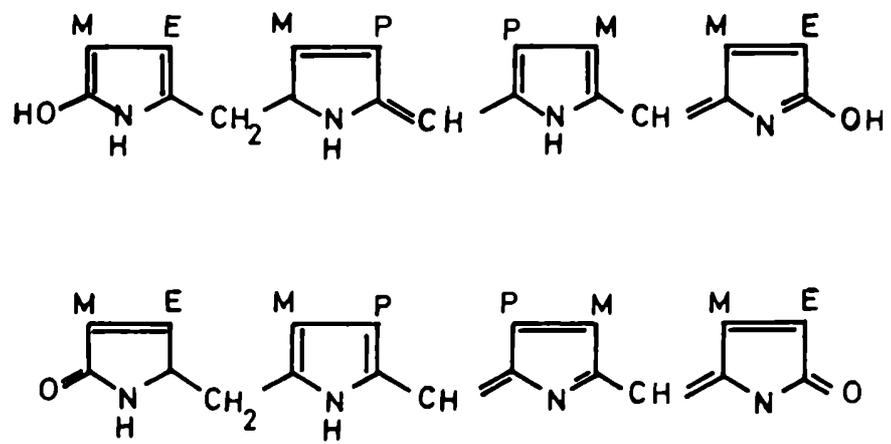


FIGURA 1.15.: Estructuras probables
de la Ficocianobilina
y Ficoeritrobilina
M: -CH₃; E: -CH₂-CH₃;
V: -CH₂=CH₂; P: -CH₂-CH₂-COOH

REFERENCIAS

- Brockman, H., Jr. (1976), Phil. Trans. R. Soc. London B. 273, 277.
- Fischer, H. (1937), "Die Chemie des Pyrrols", Band II, p. 480, Leipzig.
- Holt, A.S. (1965), "The Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T.W. Goodwin, ed.), p.3, Academic Press, New York.
- Holt, A.S.; Purdie, J.W. & Wasley, J.W.F. (1966), Can. J. Chem. 40, 171.
- Hoppe-Seyler, F. (1880), Z. Physiol. Chem. 4, 193.
- Jensen, A.; Aasmundrud, O. & Eimhjellen, K.E. (1964), Biochim. Biophys. Acta 88, 466.
- Lemberg, R. & Legge, J.W. (1949), "Haematin Compounds and Bile Pigments", Interscience Publishers Inc., New York.
- Mac Donald, D.M. & Mac Donald, S.F. (1955), Can. J. Chem. 33, 573.
- Pfennig, N. (1967), Ann. Rev. Microbiol. 21, 285.
- Purdie, J.W. & Holt, A.S. (1965), Can. J. Chem. 43, 3347.
- Willstätter, R. & Stoll, A. (1928), "Investigations on Chlorophyll", Science Press, Lancaster.

PROPIEDADES

II.1. Propiedades físicas de los tetrapirroles

II.1.1. Color

II.1.2.1. Solubilidad

II.1.3 Espectros de absorción

II.1.4. Fluorescencia

II.1.5. Fotosensibilidad

II.2. Propiedades químicas

II. PROPIEDADES

II.1. Propiedades físicas de los tetrapirroles

II.1.1. Color

Las soluciones ácidas de las porfirinas presentan color rojo púrpura, mientras que en soluciones neutras o alcalinas y en solventes orgánicos son pardo rojizas.

II.1.2. Solubilidad

La presencia de los átomos de nitrógeno en los núcleos pirrólicos y de los grupos carboxilos en las cadenas laterales le confiere a las porfirinas propiedades anfóteras. Debido a dicha característica, son solubles en medios acuosos ácidos y básicos.

Los solventes orgánicos más comúnmente empleados en la extracción de los tetrapirroles son el éter y el dioxano. Las clorofilas, debido a la presencia del resto fitol, también son solubles en éter de petróleo.

Tanto las porfirinas como sus complejos metálicos son solubles en solventes orgánicos acidificados, como por ejemplo: acetona-HCl, éter-HCl, acetato de etilo-HCl, etc.

La solubilidad de los tetrapirroles en ácidos o álcalis diluídos depende del número de grupos de ácidos carboxílicos libres de sustituyentes; por eso, la uroporfirina (8 restos carboxilos) es la más soluble mientras que la protoporfirina (2 restos carboxilos) es la menos soluble.

En la práctica, las porfirinas libres son extraídas utilizando el método de partición entre éter y HCl, procedimiento empleado para la separación, identificación y determinación cuantitativa de los distintos tetrapirroles y sus derivados. El método consiste en ir extrayendo selectivamente, las distintas porfirinas presentes en la fase etérea, con soluciones de ácido clorhídrico de concentraciones crecientes.

Las porfirinas libres pueden ser separadas de sus soluciones llevándolas al punto isoeléctrico, en el cual la solubilidad

es mínima, provocando su precipitación. Sus puntos isoeléctricos están situados entre pH 3,0 y 4,5 (Vannotti, 1954).

Además de los procedimientos de extracción por solventes o por precipitación en el pI, existen métodos que emplean adsorbentes para concentrar y aislar las porfirinas de una solución, por ejemplo: talco (With, 1958), alúmina (Fernández et al, 1966), óxido de magnesio (Nicholas, 1951), resinas de intercambio iónico (Heikel, 1958), kieselgur (Gibson y Cooke, 1959), Florisil (Schlenker et al, 1961), etc.

II.1.2.1. Número de HCl

Se define como número de HCl a la constante física característica para cada porfirina, que representa el por ciento de HCl capaz de extraer las 2/3 partes de una dada porfirina de una capa de éter saturada de agua, a un volumen igual de fase ácidoacuosa.

II.1.3. Espectros de absorción

El espectro de absorción de cada porfirina es de fundamental importancia para su identificación y estimación cuantitativa. El sistema conjugado de dobles ligaduras ubicado en el núcleo de las porfirinas es el cromóforo responsable de las bandas de absorción características, en las regiones visible y ultravioleta cercano.

Todos los tetrapirroles presentan una intensa banda de absorción en la región entre los 400-410 nm, desplazándose en algunos complejos hasta los 450 nm. Esta zona de máxima absorción se llama banda de Soret; es característica de estos compuestos conjugados y se la emplea generalmente para su cuantificación (Falk, 1964; Schwartz et al, 1960).

Las porfirinas en solventes orgánicos o en soluciones alcalinas débiles presentan un espectro típico de 4 bandas en la región del visible, además de la banda de Soret (Figura 2.1.). Las cadenas laterales sustituyentes de los anillos pirrólicos no influyen ni en el patrón ni en la intensidad relativa de las bandas, pero modifican la posición y la intensidad absoluta, cons

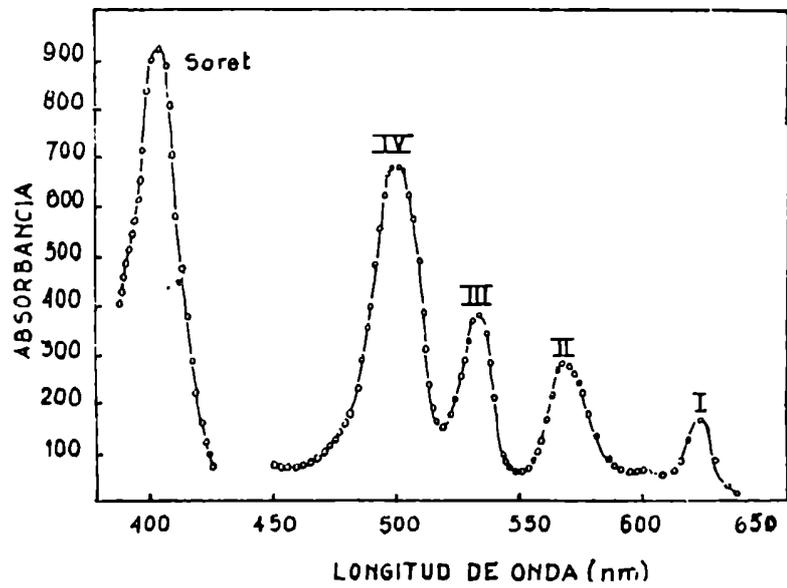


FIGURA 2.1.: Espectro de absorción en cloroformo del éster metílico de una porfirina

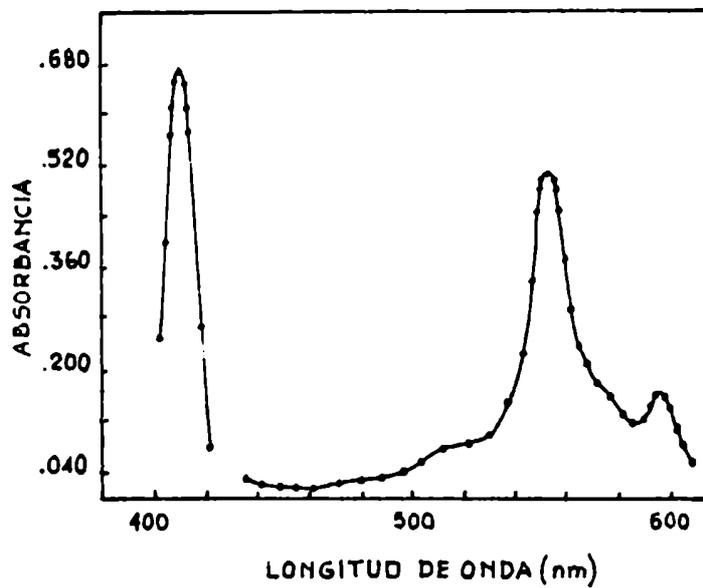


FIGURA 2.2.: Espectro de absorción de una porfirina libre en medio ácido.

tituyendo así un buen criterio para la identificación de las porfirinas (Tabla 2.1.).

En soluciones ácidas, los tetrapirroles presentan solamente dos bandas intensas y bien definidas (Figura 2.2.); la banda de Soret es también mucho más intensa.

Los máximos de absorción de las soluciones de porfirinas en ácido clorhídrico se desplazan hacia longitudes de onda más largas a medida que se incrementa la concentración de dicho ácido.

Se puede observar entonces, que el número y el tipo de bandas que aparecen en la zona del visible, varían con la porfirina, el solvente y el pH; pero son absolutamente característicos para cada una de ellas, en un solvente y a un pH dado.

La formación de complejos metálicos que implican la unión con los átomos de nitrógeno, produce modificaciones en la estructura resonante dando origen al llamado "espectro metálico". Así, los complejos de las porfirinas con metales divalentes muestran un espectro clásico que consta de dos bandas α y β (entre 500 y 600 nm), además de la de Soret. La banda α es la de mayor longitud de onda (550-560 nm) (Figura 2.3.) siendo más intensa que la banda β en complejos metálicos muy estables como los de Cu (II), Co (II) y Ni (II). En el caso de los menos estables, como los de Mg (II), Ba (II) y Cd (II) la banda β es la más fuerte (Falk, 1964).

Las porfirinas constituyentes de las clorofilas se caracterizan por poseer un espectro de absorción típico a mayores longitudes de onda, correspondiendo una banda más intensa alrededor de los 660 nm, a los dihidro-sistemas. Para el caso de la estructura tetrahidro de la bacterioclorofila, la banda α se encuentra desplazada hacia los 770 nm, en solventes orgánicos.

En cuanto a los tetrapirroles de cadena abierta, sus espectros son variables y característicos en la región del visible, con una absorción máxima e intensa entre 400 y 650 nm, según el compuesto; pero a diferencia de los tetrapirroles cíclicos no poseen la banda de Soret.

El espectro de absorción permite, entonces, caracterizar y dosar las distintas porfirinas pero no diferencia los isómeros. Tanto en el visible como en el ultravioleta cercano, los espec-

TABLA 2.1.1.: Máximos de absorción de URO, COPRO y Protoporfirina en KOH
0,1 M

PORFIRINAS	POSICIONES DE LAS BANDAS (nm)				
	α (I)	β (II)	γ (III)	δ (IV)	Soret
Uroporfirina	612	560,5	539	504	405
Coproporfirina	617,5	565,5	538,5	503	401
Protoporfirina	642	591	540	510	408

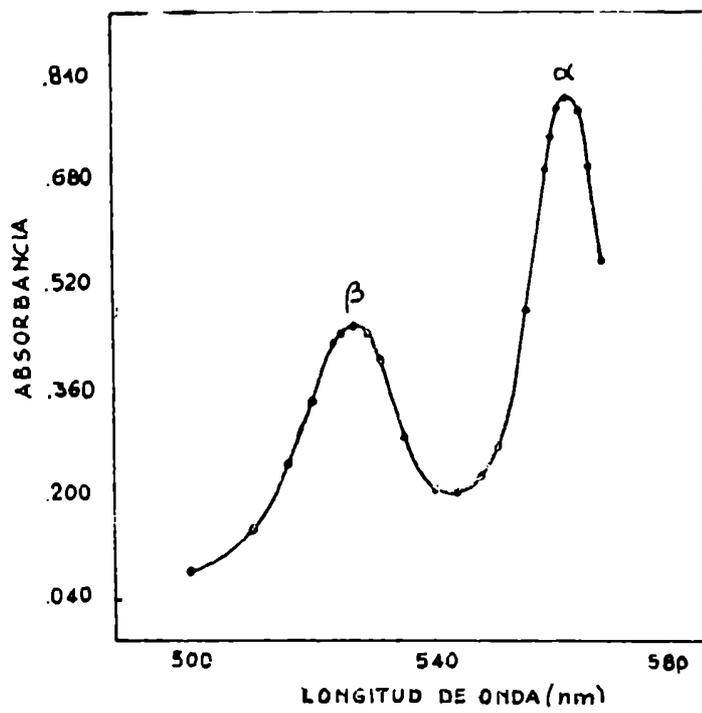


FIGURA 2.3.: Espectro de absorción del complejo metálico (Cu⁺⁺) de una porfirina

tros de absorción de los isómeros son similares en un determinado solvente (Schwartz et al, 1960).

II.1.4. Fluorescencia

Las porfirinas libres y sus ésteres emiten una intensa fluorescencia roja cuando se exponen a la radiación ultravioleta de longitud de onda de aproximadamente 400 nm.

La intensidad de esta fluorescencia varía con el solvente y el pH del medio, es mínima en el punto isoeléctrico y máxima en ácidos minerales (HCl a pH 1,0) (Vannotti, 1954). Esta propiedad permite detectar porfirinas en concentraciones del orden de 10^{-10} M; así, los métodos fluorimétricos constituyen los más sensibles para la cuantificación de las mismas.

Al complejarse las porfirinas con metales pierden en gran parte su fluorescencia. Así, las Fe y Cu-porfirinas no presentan fluorescencia mientras que las Zn-porfirinas fluorescen amarillo-anaranjado (Schwartz et al, 1960).

Los derivados reducidos de las porfirinas (porfirinógenos) son incoloros y no fluorescen.

II.1.5. Fotosensibilidad

Las porfirinas son extremadamente sensibles a la luz, especialmente a las radiaciones ultravioletas que son las que más absorben.

Esta fotosensibilidad se ve incrementada con la disminución del número de grupos carboxilos presentes en el tetrapirrol y con el aumento del pH.

II.2. Propiedades químicas

La presencia de un número variable de grupos carboxilos en las porfirinas es la responsable de las diferencias existentes en la solubilidad y en el comportamiento cromatográfico.

Dichos grupos carboxilos pueden ser esterificados, siendo los ésteres metílicos los más empleados (Schwartz et al, 1960).

Mediante el empleo de columnas de CO_3Ca y OMg (Nicholas, 1951) se pueden separar y purificar las porfirinas esterificadas, las que cristalizan de metanol-cloroformo. Los ésteres metílicos obtenidos presentan puntos de fusión característicos que permiten su identificación.

En los tejidos y en los líquidos biológicos, las porfirinas se encuentran en su mayor parte, como porfirinógenos (Watson, 1951).

REFERENCIAS

- Falk, J.E. (1964), "Porphyrins and Metalloporphyrins", Elsevier, Amsterdam.
- Fernández, A.A.; Henry, R.J. & Goldenberg, H. (1966), Clin. Chem. 12, 463.
- Gibson, L.E. & Cooke, R.E. (1959), Pediatrics 23, 545.
- Heikel, T. (1958), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10, 193.
- Nicholas, R.E.H. (1951), Biochem. J. 48, 309.
- Schwartz, S.; Berg, M.H.; Bossenmaier, I. & Dinsmore, H. (1960), "Methods of Biochemical Analysis" Vol 8 (D. Glick, ed.), p 221, Interscience, New York.
- Schlenker, F.S.; Davis, C.L. & Kitchell, C. (1961), Am. J. Clin. Pathol. 36, 31.
- Vannotti, A. (1954), "Porphyrins", Hilger y Watts, London.
- Watson, C.J. (1951), The Lancet 1, 539.
- With, T. K. (1958), Biochem. J. 68, 717.

PARTE 2

BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

CAPITULO III

PRECURSORES E INTERMEDIARIOS DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS. ACUMULACION DE LOS MISMOS

III.1. Introducción

III.2. Origen de los átomos de carbono y nitrógeno de los tetrapirroles naturales

III.3. PBG: intermediario de la biosíntesis

III.4. ALA: precursor del PBG

III.5. Porfirias

PARTE 2: BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

III. PRECURSORES E INTERMEDIARIOS EN LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS. ACUMULACION DE LOS MISMOS

III.1. Introducción

La elucidación del camino biosintético de las porfirinas fue el resultado de una serie de extensos e importantes trabajos realizados con marcadores isotópicos, en los laboratorios de Rimington, Shemin, Neuberger, Granick y Lascelles.

Estos estudios establecieron las bases para los posteriores avances en este campo y demostraron que en todos los tejidos estudiados, ya sean vegetales, animales o bacterianos, la formación de la protoporfirina IX seguía una secuencia metabólica común.

En la Figura 3.1. se ilustra esquemáticamente el camino biosintético de los tetrapirroles. Así, a partir de glicina y succinato, activado como succinil-CoA, se forma el ácido δ -aminolevúlico (ALA); por acción de la enzima ALA-sintetasa. Dos moléculas de ALA se unen, para originar el monopirrol porfobilinógeno (PBG), reacción catalizada por el ALA-dehidrasa. La porfobilinogenasa produce la condensación de cuatro moléculas de PBG para formar el urogen III, el cual es decarboxilado hasta obtenerse el coprogen III por acción de la decarboxilasa. Se ha comprobado que los verdaderos intermediarios en la biosíntesis de tetrapirroles son los porfirinógenos, que se oxidan fácilmente a porfirinas. A partir del urogen III se biosintetizan las corrininas, que contienen Co y participan en la formación de la vitamina B₁₂. Por decarboxilación oxidativa del coprogen III se obtiene el protoporfirinógeno IX, que se oxida a protoporfirina IX, estando las enzimas coprogenasa y protogen-oxidasa involucradas respectivamente en estas dos últimas etapas. A partir de la protoporfirina se forman dos tipos de compuestos: las hierroporfirinas o hemos y las magnesio-porfirinas que dan lugar a las clorofilas y bacterioclorofilas.

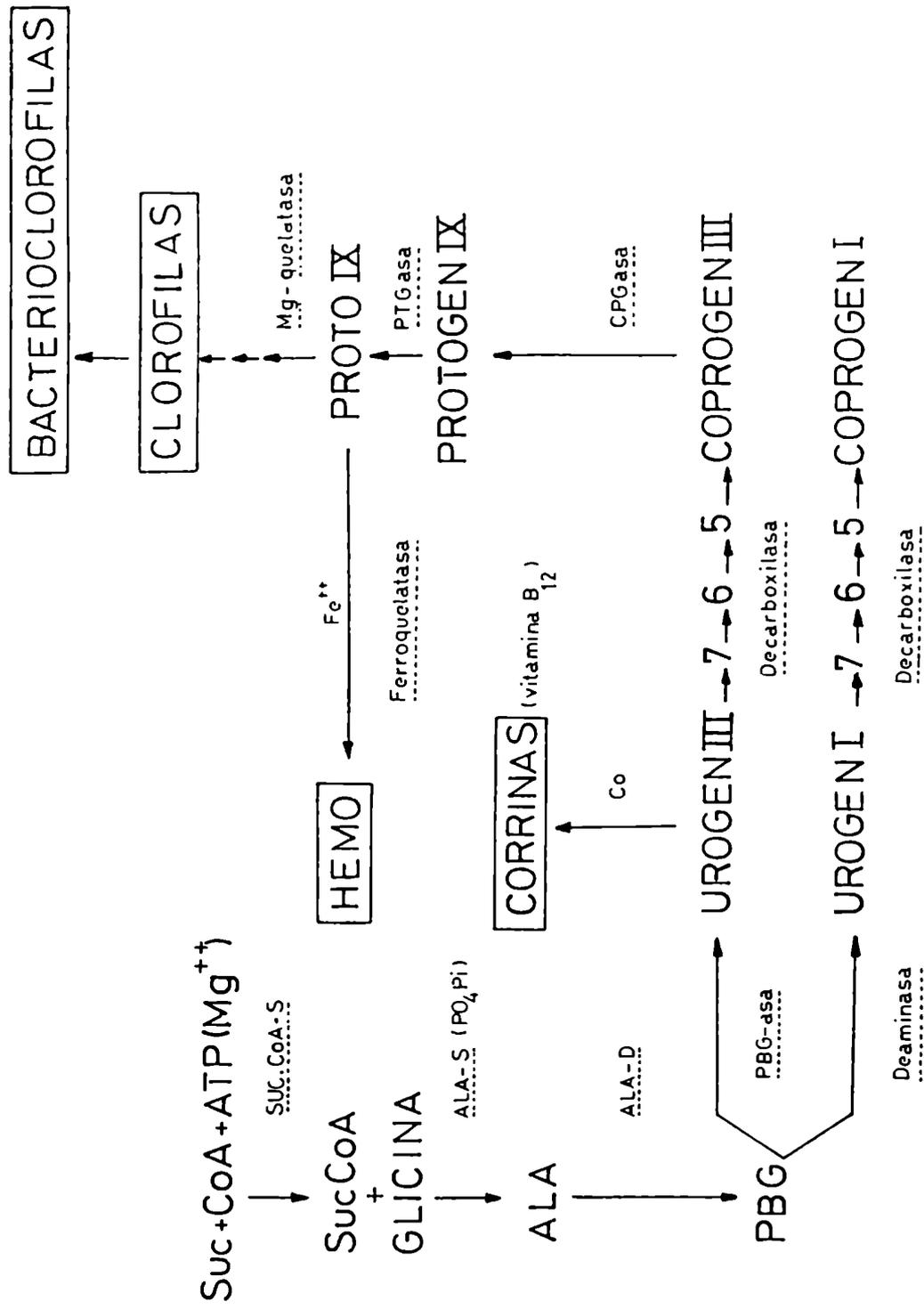


FIGURA 3.1.: Camino biosintético de los tetrapirroles

III.2. Origen de los átomos de carbono y nitrógeno de los tetrapirroles naturales

La mayoría de las células sintetiza la estructura compleja de los tetrapirroles, a partir de constituyentes simples de la dieta. Esta hipótesis fue comprobada mediante el empleo de técnicas isotópicas. Así, utilizando glicina marcada con ^{15}N y midiendo la incorporación en el hemo formado, se demostró que la glicocola era el precursor de los cuatro átomos de nitrógeno del hemo (Figura 3.2.) (Shemin y Rittenberg, 1945).

Radin et al (1950) encontraron que los 4 carbonos de los puentes meténicos provenían también de la glicocola (de su carbono α), además de otros 4 de los carbonos α , en los anillos pirrólicos.

Bloch y Rittenberg (1945) observaron que por administración de acetato, a ratas, éste se incorporaba en el hemo. Así, Shemin y Rittenberg (1951) demostraron que ambos átomos de ^{14}C del acetato aparecían en la protoporfirina IX (Figura 3.2.).

Estos hechos constituyeron los puntos claves para el comienzo del estudio del mecanismo de formación de las porfirinas. Shemin y Kumin (1952) demostraron que el succinato o su forma activa el succinil-CoA era el precursor directo de los 26 átomos de carbono restantes de la protoporfirina IX.

III.3. PBG: intermediario de la biosíntesis

Sachs (1931) observó que la orina de pacientes con porfiria aguda daba color rojo con el reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído en medio ácido). Waldenström y Wahlquist (1939) denominaron a esta sustancia porfobilinógeno (PBG).

Recién en 1953, Cookson y Rimington lograron aislarlo y determinar su estructura, que fue confirmada por síntesis (Rimington y Krol, 1955), por rayos X (Kennard, 1953), y por preparación de distintos derivados (Cookson, 1953; Granick y Bogorad, 1953).

En base a las propiedades y a la estructura del PBG se postuló que constituía un precursor de las porfirinas, lo cual se demostró empleándolo como sustrato con extractos enzimáticos crudos y parcialmente purificados, obtenidos de animales, vege-

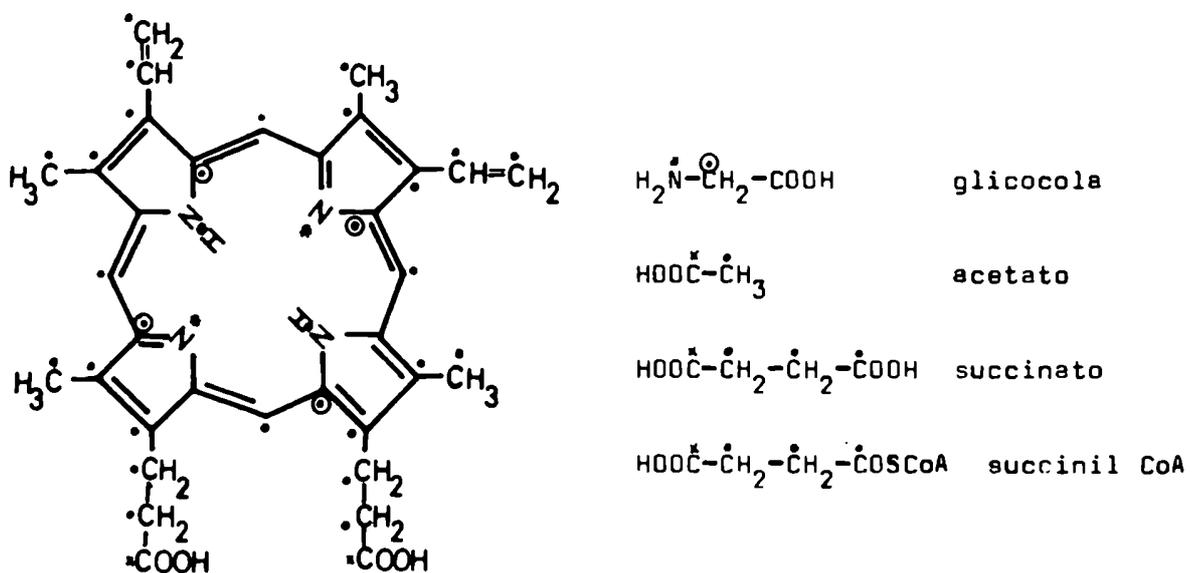


FIGURA 3.2.: Origen de los átomos de carbono y de nitrógeno de la molécula de la Protoporfirina IX

tales y bacterias.

Hay que resaltar que todos estos hallazgos con respecto a la utilización del PBG en la biosíntesis de porfirinas se demostraron antes que Shemin y Russell (1953) descubrieran el rol del ácido δ -aminolevúlico en dicho camino metabólico.

III.4. ALA: precursor del PBG

Shemin y Russell (1953) postularon que por condensación de glicina con succinil-CoA se formaría un intermediario: el ácido α -amino β -cetoadípico, el cual perdería rápidamente CO_2 para formar el ácido δ -aminolevúlico (ALA). Esta hipótesis se confirmó mediante los trabajos de Dresel y Falk (1953) y Neuberger y Scott (1953), entre otros.

Quedó así aceptado que el ALA es un intermediario en la síntesis de hemo.

El grupo de Shemin determinó que el ALA podía metabolizarse por otras vías, además del camino del hemo, puesto que encontraron que el ($5\text{-}^{14}\text{C}$) ALA se incorporaba al grupo ureído de las purinas, se eliminaba como formaldehído en la orina y aparecía como CO_2 en la respiración. Se postuló que el ALA podía transformarse en succínico (ciclo succínico-glicina), constituyendo otro camino posible de oxidación de la glicina, la cual además de utilizarse para la síntesis de porfirinas, provee de unidades de "carbono uno" que luego aparecen en compuestos tales como las purinas, serina, metionina y formiato (Figura 3.3.):

III.5. Porfirias

Las porfirias son una consecuencia de desórdenes en el camino metabólico del hemo. Pueden ser hereditarias o adquiridas y se caracterizan por una excreción aumentada o una acumulación de ALA o PBG y/o porfirinas.

Las manifestaciones clínicas y bioquímicas específicas para cada tipo de porfiria están relacionadas con el tejido en el cual ocurre o se expresa la falla metabólica, así como con la o las etapas del camino biosintético de las porfirinas en las cuales ha ocurrido dicha falla.

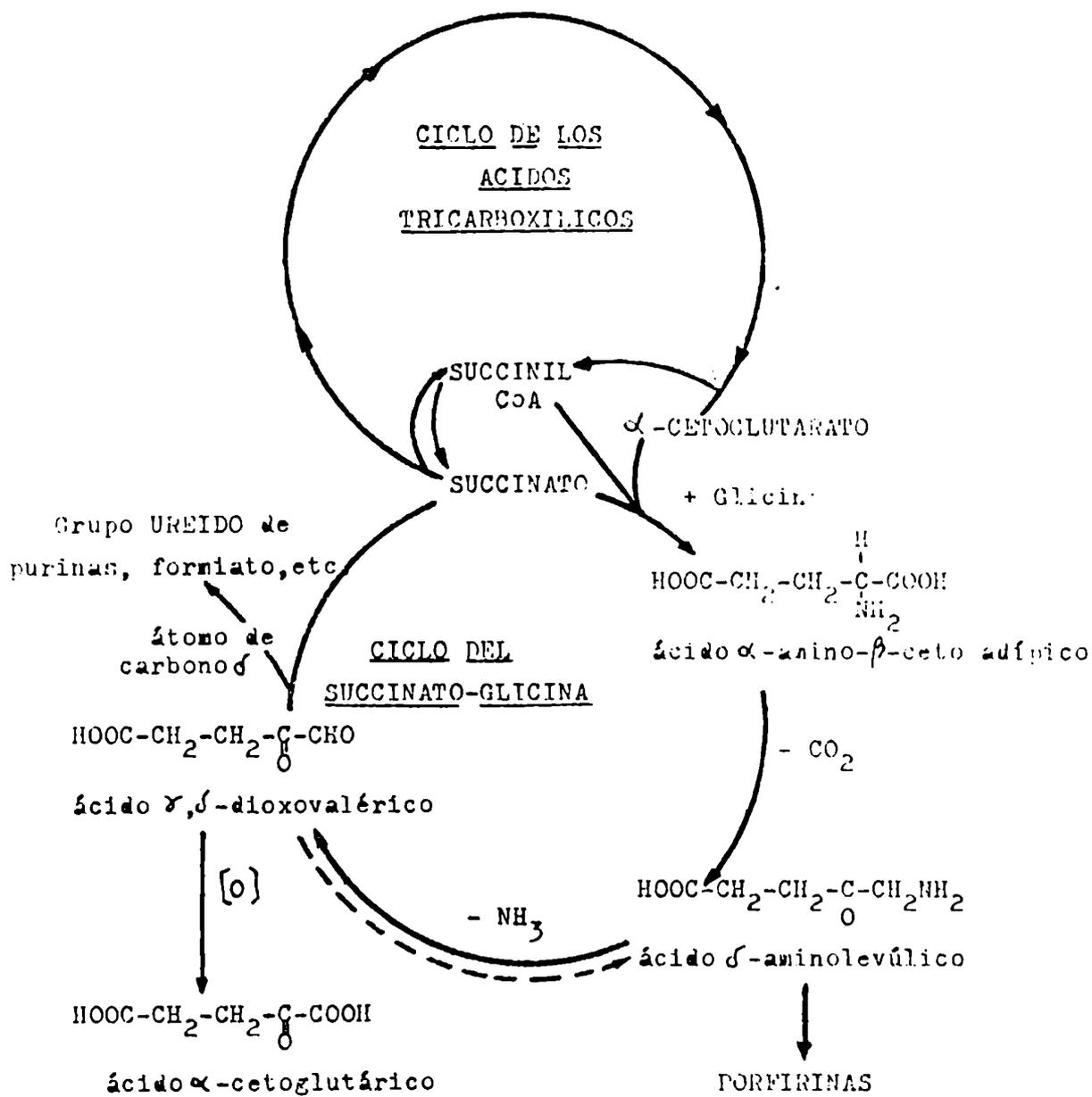


FIGURA 3.3.: Ciclo succínico-glicina

Las porfirias pertenecen así a la familia de las enfermedades metabólicas y en el caso de las hereditarias constituyen un ejemplo característico de errores congénitos del metabolismo.

Con la introducción de los barbitúricos en la terapéutica en 1903, se observó que pequeñas cantidades de estas drogas podían producir ataques agudos y en ciertos casos fatales, en individuos con porfiria hereditaria, clínicamente latente y asintomática. Posteriormente, se advirtió que existían una gran variedad de drogas que actuaban en forma similar a los barbitúricos. Además, se observó que dosis mucho mayores de las mismas drogas producían desórdenes en el metabolismo del hemo, en individuos y animales normales. Este tipo de disturbios se conoce con el nombre de porfirias adquiridas, en el caso de humanos o porfirias experimentales cuando se refieren a organismos no humanos.

Las porfirias se pueden clasificar en:

- Eritropoyéticas

Porfiria eritropoyética congénita
Protoporfiria eritropoyética (PPE)
Coproporfiria eritropoyética

- Hepáticas

Porfiria cutánea tardía (PCT)
Porfiria aguda intermitente (PAI)
Porfiria variegata o mixta (PV)
Coproporfiria hereditaria (CPH).

- Porfirinurias

Sin embargo, se debe resaltar que estos trastornos en algunos casos, no son exclusivos de un determinado órgano o sistema (hepático o eritropoyético), sino que puede existir un compromiso de ambos. Así, Piñol Aguadé et al (1975) presentaron una nueva forma de porfiria: la hepatoeritrocitaria. En ésta se encuentran características pertenecientes a la PCT y a la protoporfiria eritropoyética, además de un patrón de excreción de porfirinas urinarias que no corresponde a ninguno de los dos.

Las porfirinurias son consecuencias secundarias de otras disfunciones (trastornos hepáticos varios, enfermedades hematológicas, intoxicaciones con metales pesados, etc) en las cuales

existe una excreción urinaria aumentada de coproporfirina y menos frecuentemente uroporfirina y precursores.

REFERENCIAS

- Bloch, K. & Rittenberg, D. (1945), J. Biol. Chem. 159, 45.
- Cookson, G.H. (1953), Nature (London), 172, 457.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1953), Chemical Constitution Nature 171, 875.
- Dresel, E.I.B. & Falk, J.E. (1953), Nature 172, 1185.
- Granick, S. & Bogorad, L. (1953), J. Am. Chem. Soc. 75, 3610.
- Kennard, O. (1953), Nature (London) 171, 876.
- Neuberger, A. & Scott, J.J. (1953), Nature 172, 1093.
- Piñol Aguadé, J.; Herrero, C.; Almeida, J.; Castells Mas, A.; Ferrando, J.; Asprer, J. de; Palov, A. & Giménez, A. (1975) Ann. Derm. Syph. 102, 129.
- Radin, N.S.; Rittenberg, D. & Shemin, D. (1950), J. Biol. Chem. 184, 745.
- Rimington, C. & Krol, C. (1955), Nature 175, 629.
- Sachs, D. (1931), Klin. Wochenschr. 10, 1123.
- Shemin, D. & Kumin, S. (1952), J. Biol. Chem. 198, 827.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945), J. Biol. Chem. 159, 567.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1951), J. Biol. Chem. 192, 315.
- Shemin, D. & Russell, C.S. (1953), J. Am. Chem. Soc. 75, 4873.
- Waldenström, J. & Wahlquist, B.C. (1939), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 260, 189.

CAPITULO IV

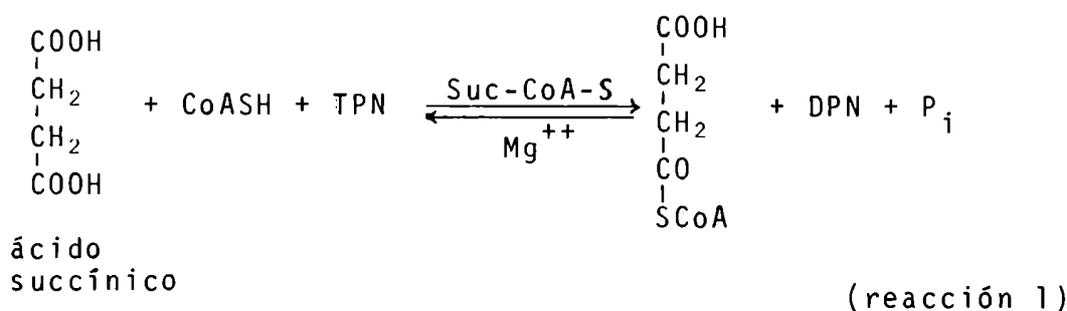
SUCCINIL-COA SINTETASA

IV.1. Propiedades y mecanismo

IV. SUCCINIL-CoA SINTETASA

IV.1. Propiedades y mecanismo

La succinil-CoA sintetasa (Suc-CoA-S) también conocida como succinil-CoA tioquinasa, cataliza la formación de succinil-CoA mediante la activación reversible de un grupo carboxilo del ácido succínico por la CoA, en presencia de un compuesto rico en energía (TPN), de acuerdo con la siguiente reacción:



Esta enzima fue descubierta por Kaufman en 1951; desde entonces y hasta el presente ha sido detectada, aislada y purificada a partir de numerosas fuentes animales, vegetales y bacterianas (Nishimura y Grinnel, 1972; Wider de Xifra y Batlle, 1973).

Las mitocondrias y los cloroplastos constituyen las organelas donde se ubica esta enzima, en la mayoría de los tejidos estudiados.

La Suc-CoA-S requiere la presencia de un catión divalente (Mg^{++} o Mn^{++}) para expresar su actividad en forma máxima (Wider de Xifra y Batlle, 1980).

Respecto a la especificidad por el TPN, ésta varía según la fuente estudiada. En general, la enzima proveniente de mamíferos puede utilizar GTP o ITP (Cha y Parks, 1964) mientras que la de plantas y bacterias emplea el ATP.

En todos los casos, existe una alta especificidad por el sustrato succinato y por la CoASH.

La Suc-CoA-S presenta las características de una enzima sulfhidrónica, siendo inhibida por p-cloromercuribenzoato (PCMB), iodoacetamida y otros reactivos típicos de grupos tioles. En algunos tejidos es necesaria la presencia de un protector de grupos -SH, como el glutatión reducido (GSH) para permitir su

acción (Wider de Xifra y Batlle, 1974).

El peso molecular de la Suc-CoA-S varía según las distintas fuentes de obtención, entre 70.000 y 140.000, habiéndose demostrado que está formada por dos tipos de subunidades (α y β) de pesos moleculares 29.000 y 41.000 respectivamente.

El mecanismo de acción de la Suc-CoA-S ha sido objeto de numerosos estudios y a pesar de que aún no existe acuerdo en cuanto a las distintas y posibles secuencias, todos coinciden en que la primera etapa involucra la formación de la fosfoenzima:



De todos los esquemas propuestos, el más reciente es el que considera las evidencias experimentales halladas hasta este momento y plantea la existencia de caminos alternativos (Figura 4.1.) (Wider de Xifra y Batlle, 1976) incluyendo además todos los otros mecanismos postulados.

En este diagrama figuran otros complejos, de existencia discutida pero que no se deben descartar, dada la posibilidad de que representen alteraciones de los equilibrios del camino normal y por lo tanto, se produzca una desviación por dichas vías laterales (Wider de Xifra y Batlle, 1976).

Existen numerosas evidencias experimentales que indican que la Succinil-CoA-S desempeña un importante papel en la biosíntesis de los tetrapirroles y su control (Batlle et al, 1975; Wider de Xifra y Tigier, 1970, 1971).

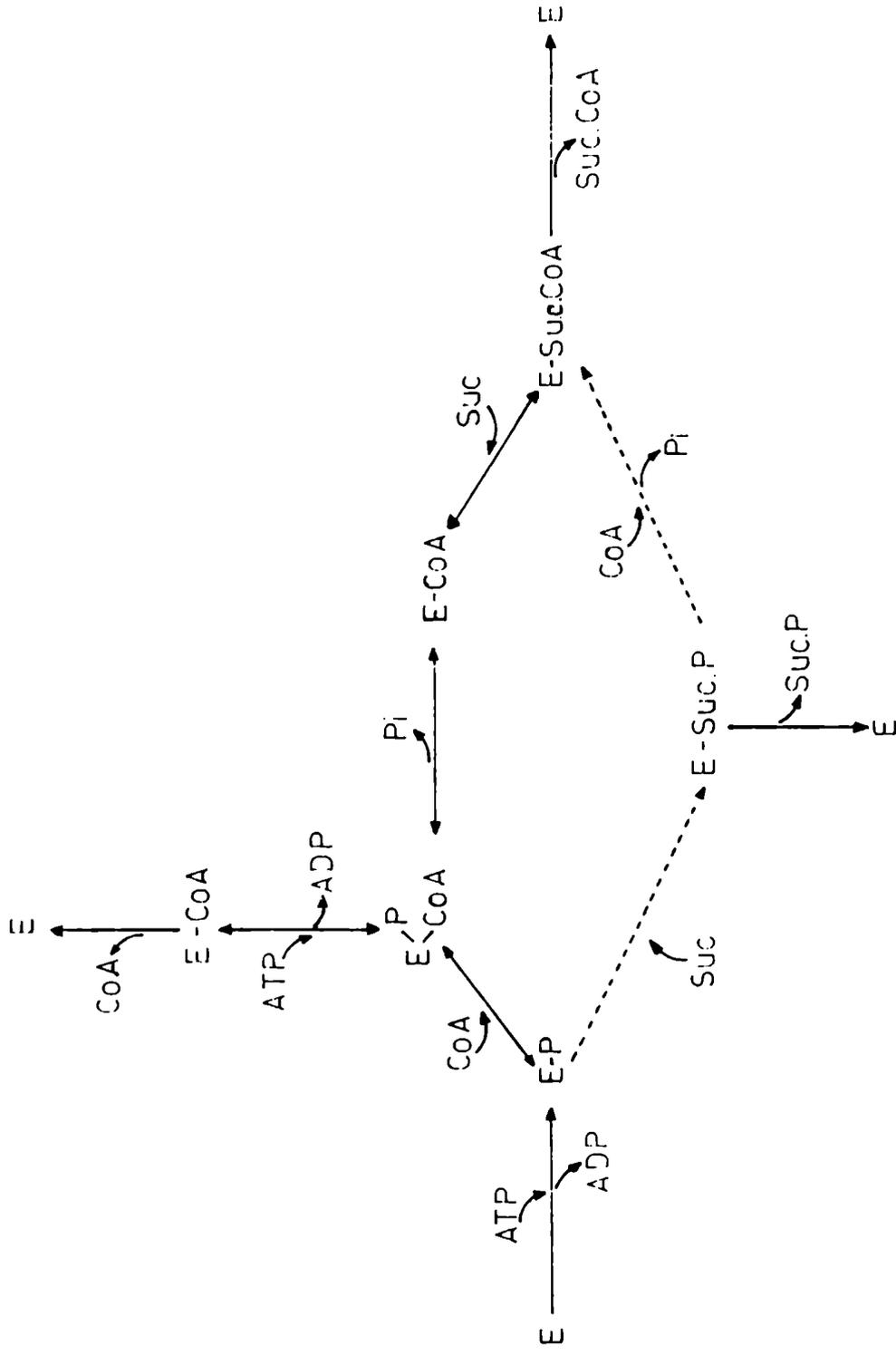


FIGURA 4.1.: MECANISMO DE ACCION DE LA SUCCINIL-CoA-SINTETASA

REFERENCIAS

- Batlle, A.M. del C.; Llambías, E.B.C.; Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H.A. (1975), Int. J. Biochem. 6, 591.
- Cha, S. & Parks, R.E, Jr. (1964), J. Biol. Chem. 239, 1968.
- Kaufman, S. (1951), "Phosphorus Metabolism", (W.D. Mc Elvery y B. Glass, eds.), Vol. 1, p. 370 Baltimore, U.S.A..
- Nishimura, J.S. & Grinnel, F. (1972), "Advances in Enzymology" (Meister, ed.), Vol 36, p. 183, Wiley & Son Chicester.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1973), Enzyme 16, 128.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1974), Int. J. Biochem. 5, 129.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1976), "Porphyrin in Human Diseases" (M. Doss, ed.) p.25, S. Karger, Basel.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), Int. J. Biochem. 12, 717.
- Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H.A. (1970), FEBS Letters 9, 30.
- Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H.A. (1971), Enzymologia 41, 217.

CAPITULO V

ACIDO δ -AMINOLEVULICO SINTETASA

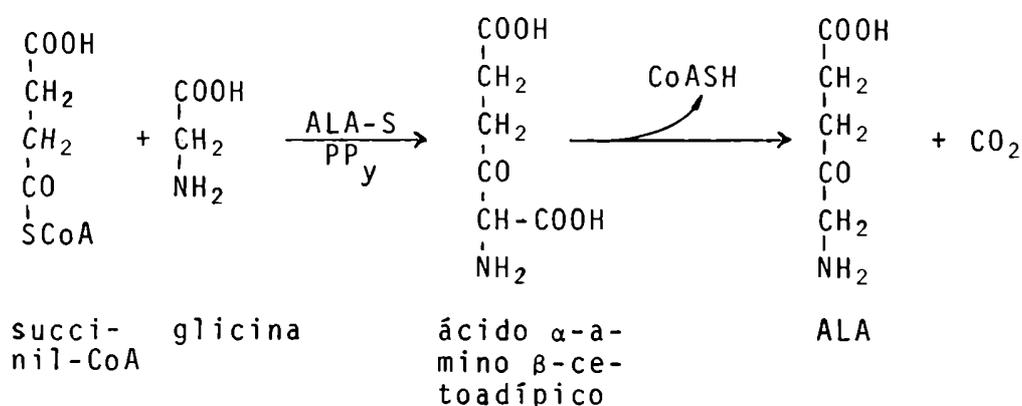
V.1. Propiedades y mecanismo

V.2. Función del ALA-S en el camino metabólico de las porfirinas

V. ACIDO δ-AMINOLEVULICO SINTETASA

V.1. Propiedades y mecanismo

La enzima δ-aminolevúlico sintetasa (ALA-S) cataliza la formación del ácido δ-aminolevúlico (ALA) a partir de glicina y succinil-CoA, requiriendo como cofactor al fosfato de piridoxal.



(reacción 1)

El ALA-S se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza; sin embargo por tratarse de una enzima poco estable es bastante difícil su medición, aún en aquellos tejidos en los cuales no existen dudas acerca de su existencia (Tait, 1968).

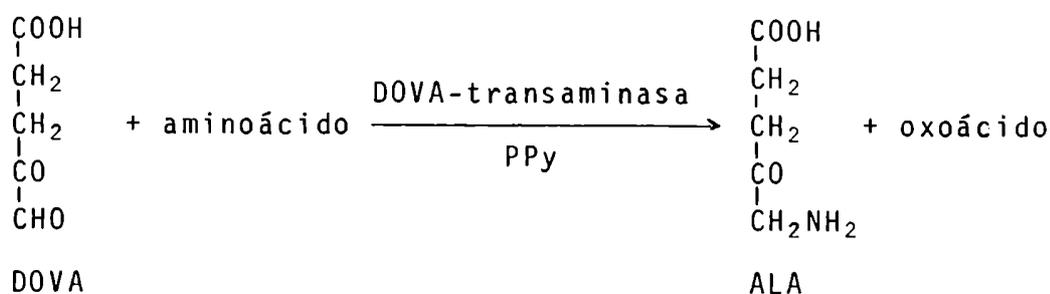
Recién en el año 1958, se demostró la presencia de esta enzima en bacterias fotosintéticas (Kikuchi et al, 1958) y en eritrocitos de pollo (Gibson et al, 1958), siendo éstas las primeras evidencias de su actividad.

Estudiando la enzima proveniente de diversos sistemas se comprobó que se encuentra en la fracción particulada. Glick (1962) demostró que el ALA-S era mitocondrial, aunque recientemente se ha aislado en hígado de rata una forma soluble de esta enzima (Hayashi et al, 1969, 1970). Aparentemente, el ALA-S se sintetizaría en el citoplasma como parte de un complejo con otras dos proteínas, cuya función aún se desconoce, que se separarían del ALA-S cuando ésta se transporta a la mitocondria, donde muestra realmente su actividad catalítica (Ohashi y Kikuchi, 1977).

En cuanto a los requerimientos del ALA-S, el fosfato de

piridoxal es indispensable para el funcionamiento de la enzima. Es específica para su sustrato, el succinil-CoA y presenta las características de una enzima sulfhidrónica.

En la actualidad existen numerosas evidencias que demuestran que el ALA-S no es la única enzima capaz de catalizar la formación de ALA. En diversos tejidos se observó la presencia de una transaminasa, la cual utilizando el ácido γ,δ -dioxovalérico (DOVA) y un aminoácido como sustratos producía ALA.



(reacción 2)

En un principio, se pensó que la vía del ALA-S existía únicamente en tejidos animales y bacterianos (Gibson et al, 1958; Kikuchi et al, 1958) mientras que la ruta correspondiente a la DOVA-transaminasa (DOVA-T) se encontraba solamente en plantas superiores (Beale y Castelfranco, 1974; Beale et al, 1975; Lohr y Friedmann, 1976) y en algas (Gassman et al, 1968; Kipe-Nolt y Stevens Jr, 1980).

Sin embargo, existen evidencias de actividad de ALA-S en tejidos de origen vegetal (Ramaswamy y Nair, 1973; Wider de Xifra et al, 1971) y de DOVA-T en tejidos animales (Kowalski et al, 1959; Varticovski et al, 1980 a) y en bacterias (Bajkowski y Friedmann, 1982; Gibson et al, 1961). Incluso, se ha demostrado la presencia de ambas enzimas en un mismo organismo, como por ejemplo, una mutante del alga verde *Scenedesmus obliquus* (Klein y Senger, 1978 a) predominando la vía del ALA-S. En *Rhodospseudomonas sphaeroides* también coexisten ambas vías de formación de ALA (Gibson et al, 1961; Kikuchi et al, 1958). La mayoría de los trabajos realizados en plantas superiores para postular la vía de síntesis a través de la DOVA-T, no utilizan DOVA como sustrato sino que estudian la incorporación de precursores radioactivos (glutamato, glutamina, α -cetoglutarato) en ALA (Figura 5.1.).

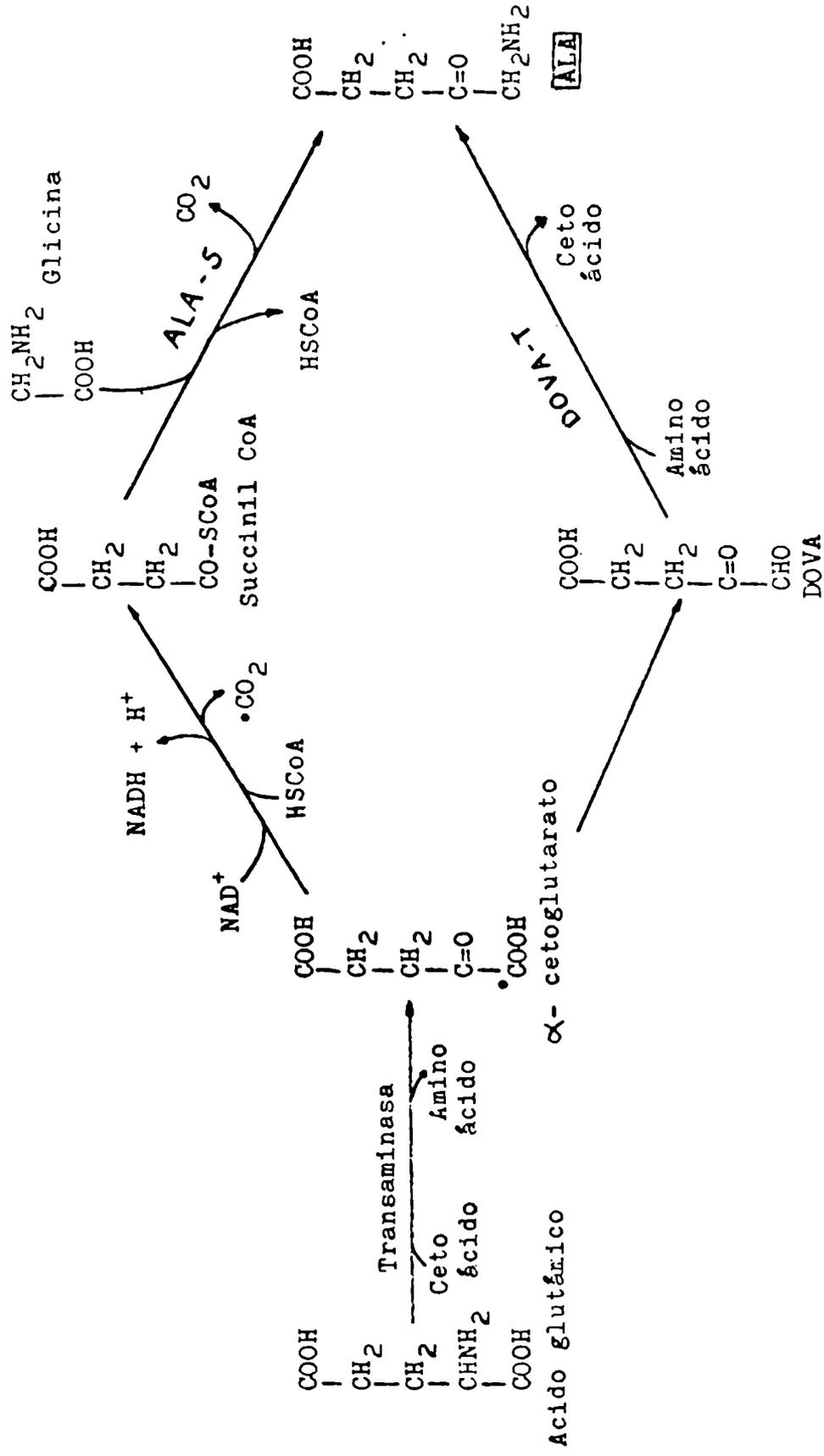


FIGURA 5.1.: Caminos biosintéticos para la formación de ALA partiendo de un mismo sustrato, el ácido glutámico.

Analizando ambos caminos de formación de ALA y teniendo en cuenta los resultados publicados, nuestro laboratorio (Lombardo y Batlle, 1983) postula que en células etioladas funcionaría principalmente el ALA-S mientras que en células pigmentadas lo haría la DOVA-T.

Según los trabajos de Beale (1978), Klein y Senger (1978 a,b) y Klein et al (1980) se sugirió que en vegetales predominaría la vía de la glicina-succinil-CoA sobre la del glutamato, conduciendo ambas a la síntesis de clorofila.

El ALA-S se caracteriza por su gran inestabilidad y su corta vida media, lo cual dificulta su estudio y purificación, como asimismo su detección en numerosos sistemas. Dentro de las células, el ALA-S se encuentra asociada a las mitocondrias tal que posee una infraestructura óptima para su actividad. Cuando la enzima se separa de dicha arquitectura, pierde estabilidad y se inactiva fácilmente. Esta hipótesis ha sido confirmada mediante los trabajos de Wider de Xifra et al (1978), en los cuales se proporciona a la enzima de un soporte sólido reconstituyendo así artificialmente la unión enzima-membrana. De esta forma se observó que el ALA-S insolubilizada retenía su actividad por más tiempo en comparación con la enzima solubilizada.

En la Figura 5.2. se puede observar el mecanismo propuesto para el ALA-S. La glicina se condensa con el complejo enzima-fosfato de piridoxal formando un carbanión estable. Este reacciona con el carbonilo electrofílico del succinil-CoA para producir un intermediario sumamente inestable (ácido α -amino β -cetoadípico) el cual unido a la enzima se decarboxila espontáneamente originando el ácido δ -aminolevúlico.

V.2. Función del ALA-S en el camino metabólico de las porfirinas

El ALA-S es una de las enzimas claves del camino biosintético del hemo y se la considera la enzima limitante, en la mayoría de los tejidos estudiados. El ALA-S está sujeta a una serie de mecanismos de control: inducción (Sassa y Granick, 1970), represión (Marver, 1969; Sassa y Granick, 1970), inhibición feed back por hemo (Burnham y Lascelles, 1963) e inhibición por producto ALA (Bottomley y Smithee, 1968). Además, el ALA-S juega un rol regulatorio en la síntesis de clorofila durante el enverde-

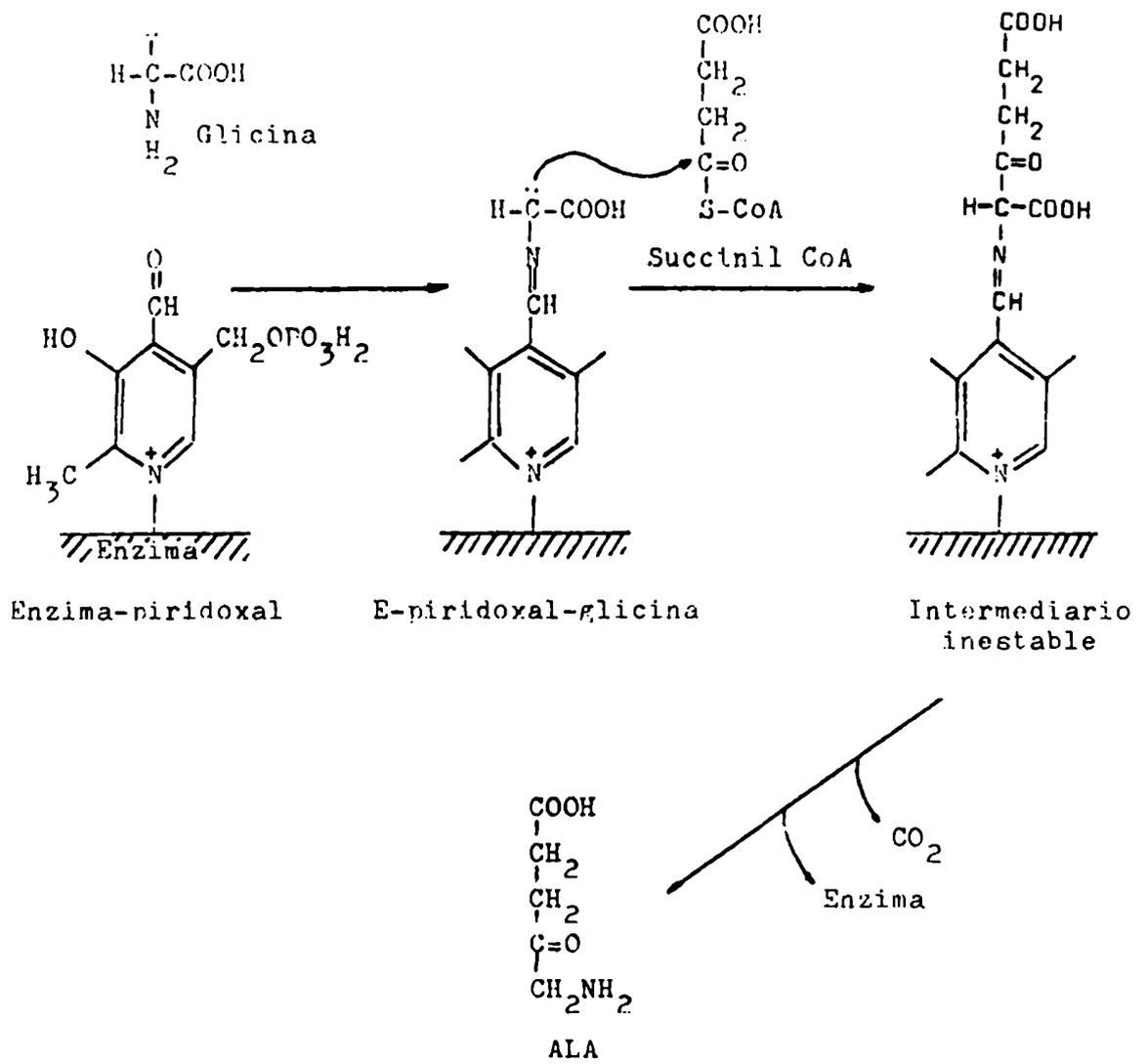


FIGURA 5.2.: Mecanismo propuesto para la formación enzimática de ALA

cimiento de *Chlorella fusca* (Porra y Grimme, 1974). La síntesis exacerbada de precursores y/o porfirinas, mediante la administración de compuestos porfirogénicos, ya sea en animales o cultivos de células, se produjo por un incremento significativo en la actividad de la enzima ALA-S. Así, los cambios en su actividad son una de las principales causas que provocan los disturbios bioquímicos observados en las porfirias.

Es interesante hacer notar que así como existen compuestos capaces de aumentar la actividad del ALA-S, se encuentran otros que actúan inhibiendo la enzima, por ejemplo la hemina.

Durante los intentos de purificar el ALA-S de *Rp. sphaeroides*, Kikuchi et al (1958 a) encontró variaciones en su actividad, postulándose la existencia de dos enzimas isofuncionales diferentes: una forma de baja y otra de alta actividad (Tuboi y Hayasaka, 1972). La interconversión de estas formas depende de la presencia de ciertos compuestos tioles, lo cual sugeriría que la actividad del ALA-S en *Rp. sphaeroides* estaría controlada a nivel molecular (Neuberger et al, 1973; Wider de Xifra et al, 1976).

REFERENCIAS

- Bajkowski, A.S. & Friedmann, H.C. (1982), *J. Biol. Chem.* 257, 2207.
- Beale, S.I. (1978), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 95.
- Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1974), *Plant Physiol.* 53, 297.
- Beale, S.I.; Gough, S.P. & Granick, S. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 72, 2719.
- Bottomley, S.S. & Smithee, G.A. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* 159, 27.
- Burnham, B.F. & Lascelles, J. (1963), *Biochem. J.* 87, 462.
- Gassman, M.; Pluscec, J. & Bogorad, L. (1968), *Plant Physiol.* 43, 1411.
- Gibson, K.D.; Laver, W.G. & Neuberger, A. (1958), *Biochem. J.* 70, 71.
- Gibson, K.D.; Mattew, M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1961), *Nature* 192, 204.
- Granick, S. (1962), *Trans. N.Y. Acad. Sciences Ser. II* 25, 53.
- Hayashi, N; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 83.
- Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1970), *J. Biochem. (Tokyo)* 67, 859.
- Kikuchi, G.; Shemin, D. & Bachman, B.J. (1958 a), *Biochim. Biophys. Acta* 28, 219.
- Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. & Shemin, D. (1958 b), *J. Biol. Chem.* 233, 1214.
- Kipe-Nolt, J.A. & Stevens, S.E., Jr. (1980), *Plant Physiol.* 65, 126.
- Klein, O. & Senger, H. (1978 a), *Photochem. Photobiol.* 27, 203.
- Klein, O. & Senger, H. (1978 b), *Plant Physiol.* 62, 10.
- Klein, O.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 725.
- Kowalski, E.; Danciewicz, A.M.; Szot, Z.; Lipinski, B. & Rosiek, O. (1959), *Acta Biochim. Pol.* 6, 257.

- Lohr, J.B. & Friedmann, H.C. (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, 908.
- Lombardo, E. & Batlle, A.M. del C. (1983) en preparación.
- Marver, H.S. (1969), "Microsomes and Drug Oxidations", pp. 495-511. Academic Press, New York.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G. (1973), *Biochem. J.* 136, 477.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1977), *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 607.
- Porra, R.J. & Grimme, L.H. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 312.
- Ramaswamy, N.K. & Nair, P.M. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 293, 269.
- Sassa, S. & Granick, S. (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 67, 517.
- Tait, G.H. (1968), "Porphyrins and Related Compounds", *Biochemical Society Symposia N° 28*, pp. 19-34. Academic Press, New York.
- Tuboi, S. & Hayasaka, S. (1972), *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 690.
- Varticovski, L.; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 3742.
- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H.A. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 235, 511.
- Wider de Xifra, E.A.; Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1978), *Plant Science Letters* 11, 93.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976), *Phil. Trans. R.Soc. London B.* 273, 79.

CAPITULO VI

ACIDO δ -AMINOLEVULICO DEHIDRASA

VI.1. Propiedades y mecanismo

VI.1. Porfirias adquiridas

VI.2.1. Intoxicación con plomo

VI. ACIDO δ-AMINOLEVULICO DEHIDRASA

VI.1. Propiedades y mecanismo

La enzima δ-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D) cataliza la síntesis del monopirrol porfobilinógeno (PBG) por condensación de dos moléculas de ALA (Figura 3.1.).

El ALA-D constituye una de las enzimas acerca de la cual existe mayor información. Se la ha detectado en una gran cantidad de sistemas biológicos, habiendo sido aislada, purificada y caracterizada a partir de fuentes animales, vegetales y bacterianas. En animales, el ALA-D se encuentra en mayor proporción en los tejidos hematopoyético y hepático y también en médula ósea y riñón.

El ALA-D es una enzima soluble, lo cual significa que una vez que el ALA se ha sintetizado dentro de las mitocondrias debe difundir al citoplasma para convertirse en PBG.

Es una enzima termoestable y típicamente sulfhidrúlica. En la mayoría de los tejidos estudiados requiere de la presencia de compuestos reductores tiólicos (glutatión, β-mercaptoetanol, cisteína, tioglicolato, ditiotreitól, etc.) para expresar su máxima actividad. Existe una concentración óptima para que el efecto activante de estos compuestos se manifieste, ya que en algunos casos, concentraciones mayores pueden llegar a producir una completa inhibición de la enzima (Batlle et al, 1967). El ALA-D es sumamente sensible a agentes bloqueantes de grupos -SH, como los metales pesados (plomo, mercurio, cadmio) u otros reactivos como los compuestos orgánicos mercuriales (p-mercuribenzoato: PCMB) que forman mercaptidas o como el iodobenzoato y el glutatión oxidado que oxidan los -SH vecinales (Batlle et al, 1967; Tigier et al, 1970).

Es interesante hacer notar que la enzima de algunas fuentes se activa por la presencia de ciertos cationes, como por ejemplo, Zn^{++} , Cu^{++} , Al^{+++} , Mg^{++} y Mn^{++} . Se ha postulado que por ejemplo, el Zn y el Cu formarían parte de la estructura misma de la proteína enzimática, tratándose entonces de una metaloenzima.

Existen evidencias de que en el centro activo de la enzima se encuentran, además de los grupos -SH necesarios para la

actividad, un átomo de Zn por subunidad, 1 ó 2 residuos lisina, 1 residuo histidina y restos de aminoácidos hidrofóbicos, que en conjunto contribuyen a definir la estructura activa de la enzima (Tsukamoto et al, 1975 , 1980).

El ALA-D es una proteína oligomérica, de peso molecular 280.000, constituida por 8 subunidades similares de peso molecular 35.000 (Shemin, 1976).

Sin embargo, mediante el empleo de técnicas de insolubilización, se han obtenido resultados que permitirían postular que la estructura mínima funcional correspondería a la de un dímero de peso molecular 70.000, formada por dos subunidades similares que cumplirían roles distintos en la síntesis del PBG (Batlle & Stella, 1978; Batlle et al, 1978). El ALA-D es una proteína que según las condiciones experimentales, puede formar fácilmente agregados moleculares, originando así especies de pesos moleculares diferentes las cuales se encuentran en equilibrio (Stafforini et al, 1980).

Nandi y Shemin (1968) y Batlle y Stella (1978) han propuesto esquemas para explicar el mecanismo de acción de esta enzima, los cuales se ajustan a las evidencias experimentales obtenidas hasta el momento. En la Figura 6.1. se ilustra el modelo postulado por Batlle y Stella (1978).

VI.2. Porfirias adquiridas

VI.2.1. Intoxicación con plomo

Como consecuencia de la contaminación ambiental, las enfermedades adquiridas, entre ellas la porfiria, ocupan un lugar cada vez más importante. De todos los contaminantes ambientales tóxicos ciertos metales, como por ejemplo plomo, mercurio y cadmio juegan un rol significativo.

Los casos de intoxicación con plomo son los más habituales, debido al gran uso de este metal. A nivel del metabolismo celular, el efecto más conocido del plomo es su acción inhibitoria sobre las enzimas cuyas actividades dependen de la presencia de grupos -SH libres. La manifestación más clara de dicho efecto sobre las enzimas sulfhidrúlicas es el disturbio que provoca en la biosíntesis del hemo. Una de las enzimas más sensiblemen

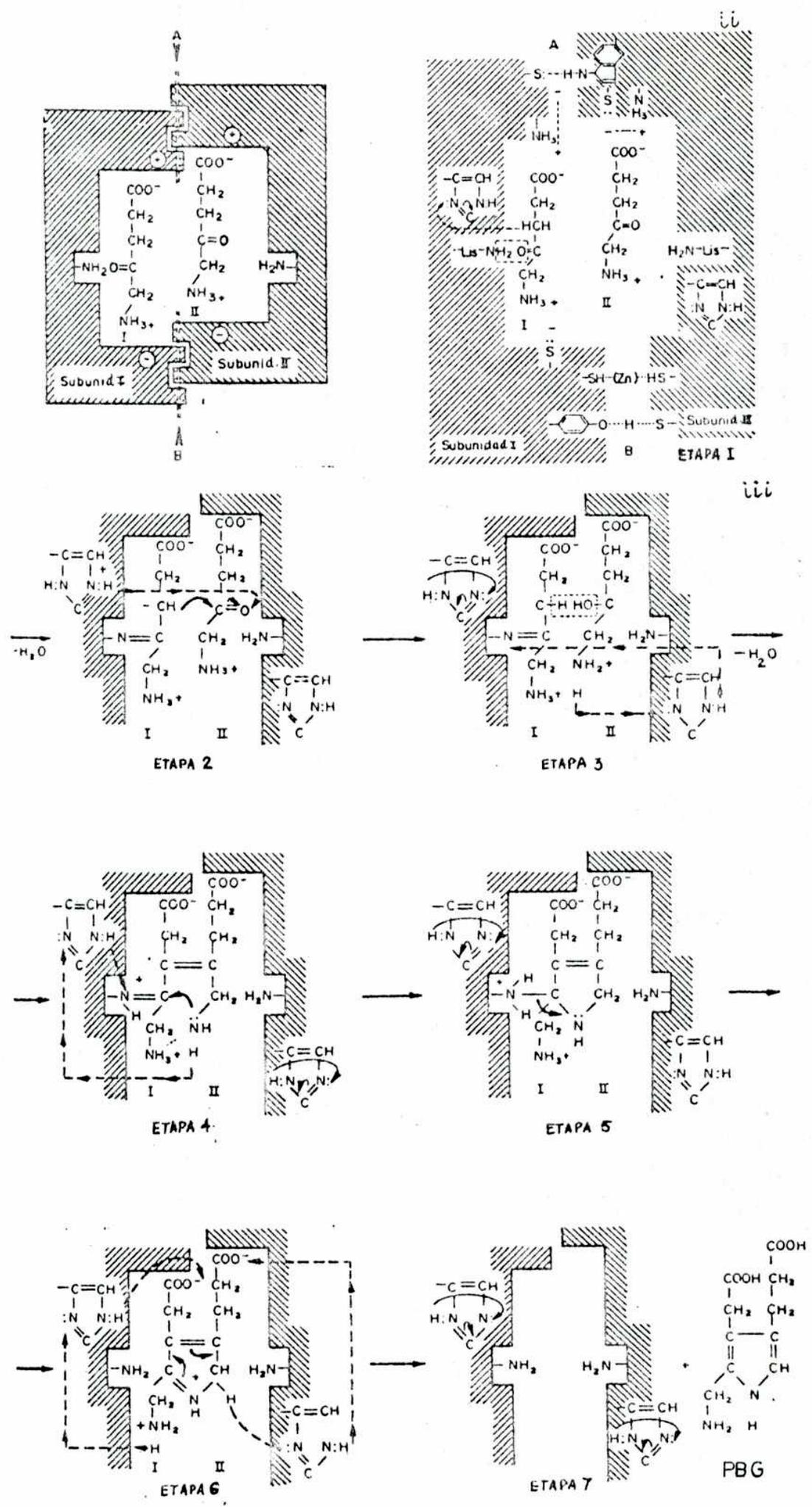


FIGURA 6.1.: Esquema propuesto para la formación enzimática del PBG.

te afectadas es el ALA-D, encontrándose que el plomo inhibe la actividad de esta proteína en médula ósea, sangre, hígado, riñón y cerebro (Gibson y Goldberg, 1970).

Esta enzima puede medirse en glóbulos rojos, constituyendo un elemento fácilmente accesible para el diagnóstico temprano de una intoxicación por plomo en humanos (Sassa, Granick y Kappas, 1975).

El aumento de los niveles de plomo en glóbulos rojos, produce una inhibición del ALA-D *in vitro*, efectuándose su unión a través de los grupos -SH de la proteína. Este bloqueo del ALA-D por el Pb puede ser revertido, al menos parcialmente, mediante el agregado de glutatión (Hapke y Pryge, 1973).

Por calentamiento de preparaciones enzimáticas contaminadas por Pb, éstas recuperaban su actividad normal. La cinética de inhibición por este metal respondería a un comportamiento sigmoideo; mediante el tratamiento térmico se desensibilizaría la proteína, presentando entonces una cinética michaeliana. Por lo tanto, se postuló que el calentamiento podría provocar cambios sustanciales en la conformación enzimática (Chiba, 1976) o que existiría un factor de naturaleza proteica el cual alteraría los niveles de ALA-D (Cartasegna et al, 1968).

Es evidente que la medida de la actividad del ALA-D, es el indicador de una intoxicación con Pb más sensible que la excreción de ALA e incluso aún más que los niveles de Pb en sangre.

Si bien la medición de la enzima ALA-D en eritrocitos constituye un valioso elemento para el diagnóstico, existen, como veremos, otras etapas sobre las cuales el plomo ejerce su acción inhibitoria, dando origen así a un cuadro bioquímico anormal característico de la intoxicación con este metal (Figura 6.2.).

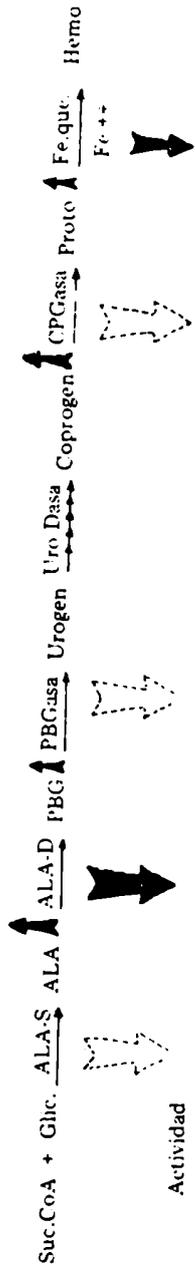


FIGURA 6.2.: Efecto del plomo sobre la actividad de distintas enzimas del camino del hemo: inhibición demostrada (flechas sólidas) y postulada (flechas punteadas)

REFERENCIAS

- Batlle, A.M. del C. & Stella, A.M. (1978), *Int. J. Biochem.* 9, 861.
- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967), *Biochem. J.* 104, 244.
- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y. ; Wider de Xifra, E.A. & Sancovich, H. (1978), *Int. J. Biochem.* 9, 401.
- Cartasegna, C.; Vergnano, C. & Arboino, V. (1968), *Med. dell Lavoro* 59, 419.
- Chiba, M. (1976), *Brit. J. Ind. Med.* 33, 36.
- Gibson, S.L.M. & Goldberg, A. (1970), *Clin. Sci.* 38, 63.
- Hapke, H.J. & Pryge, E. (1973), *Arch. Toxicol.* 31 (2), 153.
- Nandi, D. & Shemin, D. (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 1236.
- Sassa, S.; Granick, S. & Kappas, A. (1975), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 419.
- Shemin, D. (1976), *Phil. Trans. R. Soc. London B* 273, 109.
- Stafforini, D.M.; Polo, C.F.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 757.
- Stella, A.M. (1977), *Tesis Doctoral F.C.E.N. (UBA)*.
- Tigier, H.; Batlle, A.M. del C. & Locascio, G. (1970), *Enzimo logía* 38, 43.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 294.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 751.

CAPITULO VII

PORFIBILINOGENASA

VII.1. Generalidades

VII.2. Propiedades de las enzimas

VII.3. Estudios cinéticos

VII.4. Intermediarios polipirrólicos

VII.5. Mecanismo de acción

VII.6. PBG-asa y porfirias

VII.6.1. Porfirias hepáticas

VII.6.1.1. Porfiria Aguda Intermitente (PAI)

VII.6.2. Porfirias eritropoyéticas

VII.6.2.1. Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE)

VII.6.3. Porfirias adquiridas

VII.6.3.1. Intoxicación con plomo

VII.6.4. Síndrome de Dubin-Johnson (SDJ)

VII. PORFOBILINOGENASA

VII.1. Generalidades

De todas las enzimas involucradas en el camino biosintético del hemo, la porfobilinogenasa designada por Lockwood y Rimington (1957) como PBG-asa, es la más atractiva, ya que constituye un sistema enzimático altamente específico que cataliza una reacción única de reordenamiento, originando el uroporfirinógeno III o urogen III (Figura 7.1.).

Uno de los tantos objetivos de nuestro laboratorio consiste en la elucidación del mecanismo de acción de esta enzima. La PBG-asa cataliza la condensación de cuatro moléculas del monopirrol porfobilinógeno (PBG), dando lugar al urogen III, intermediario fisiológico en la biosíntesis del hemo, las clorofilas y las corrinas (Figura 3.1.).

La PBG-asa es un complejo enzimático formado por dos proteínas distintas: la deaminasa o uroporfirinógeno I sintetasa (URO-S) y la isomerasa o uroporfirinógeno III cosintetasa (Uro-CoS).

La Uro-S cataliza la unión de cuatro moléculas de PBG para formar el uroporfirinógeno I o urogen I (Figura 7.1.), mediante una condensación repetida cabeza-cola, con eliminación de amoníaco y cierre final del anillo. Aún no está totalmente confirmado si esta ciclación es un proceso enzimático o si ocurre espontáneamente.

La Uro-CoS no puede actuar sobre el PBG ni tampoco sobre el Urogen I; sin embargo, cuando reacciona en forma conjunta con la Deaminasa constituyendo el complejo PBG-asa, produce una modificación en la orientación de uno de los anillos pirrólicos sintetizándose el uroporfirinógeno II.

Aún no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo de acción de la isomerasa; lo que sí se ha demostrado es que esta enzima se encuentra en exceso normalmente en todos los organismos y tejidos, asegurando la formación exclusiva del urogen III.

Existen numerosos esquemas propuestos para explicar el mecanismo de acción de la PBG-asa. La gran mayoría de estas hipótesis se basa en la suposición de que durante la reacción se

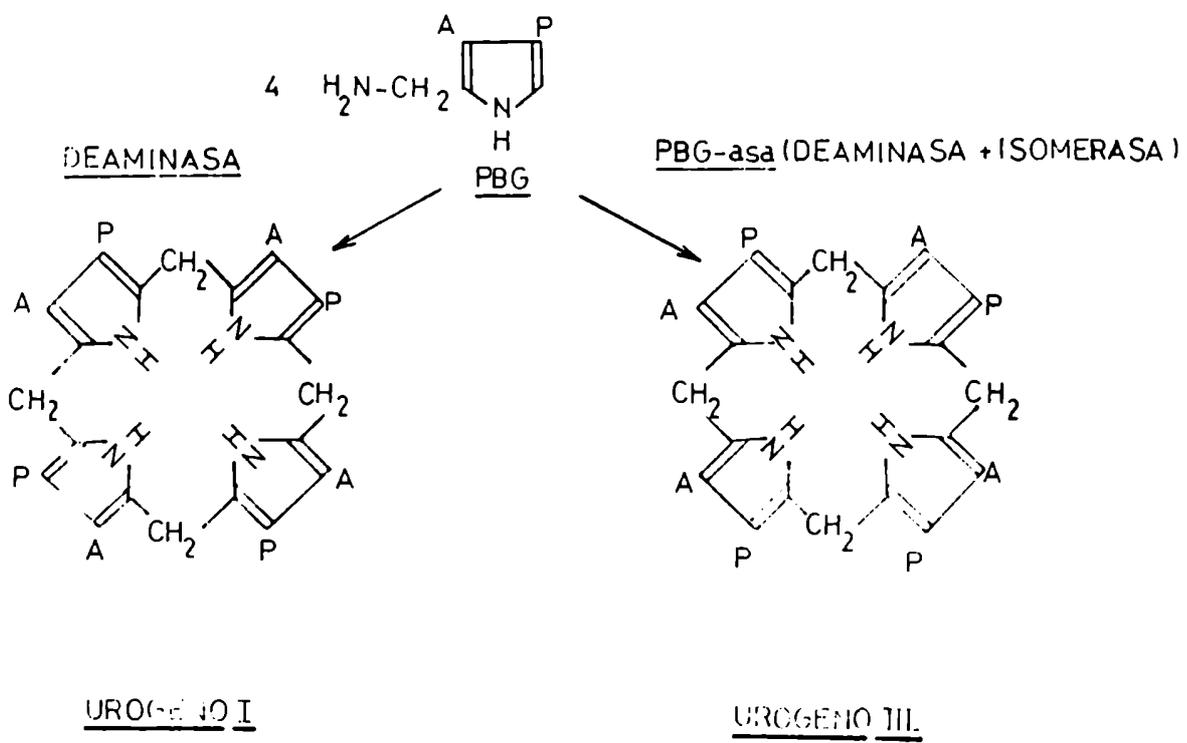


FIGURA 7.1.:

formarían intermediarios polipirrólicos: di, tri y tetrapirrilmetanos de cadena abierta. La búsqueda y el estudio de estos intermediarios polipirrólicos permitirá un mayor conocimiento del mecanismo de acción de estas enzimas y cuánto más se sepa acerca del funcionamiento normal de la PBG-asa y sus componentes, mejor podremos explicar la naturaleza de los defectos enzimáticos primarios causantes de ciertas porfirias.

VII.2. Propiedades de las enzimas

Tanto la PBG-asa como sus componentes han sido extensamente estudiados en tejidos animales, vegetales y bacterianos.

Según lo observado en la mayoría de los tejidos, la PBG es una enzima citoplasmática. Sin embargo, existen evidencias de que esta enzima podría hallarse también asociada a membranas (Falk y Dresel, 1960; Carell y Kahn, 1964).

En nuestro laboratorio, se detectó actividad de PBG-asa, tanto en las fracciones particuladas como en las solubles de *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978). Ambos componentes de la PBG-asa se han logrado separar sin destrucción o inactivación de los mismos, empleándose técnicas como diálisis contra agua destilada, fraccionamiento con resinas de intercambio iónico y tratamiento con fuerza iónica elevada (Levin y Coleman, 1967; Stevens et al, 1968; Sancovich et al, 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a,b; Rossetti, 1978). Como la isomerasa es una proteína termolábil, la deaminasa se ha purificado por calentamiento del complejo enzimático utilizándose temperaturas superiores a 60 °C y tiempos variables según el tejido utilizado (Llambías y Batlle, 1971 b; Rossetti, 1978).

Mediante el empleo de procedimientos convencionales (filtración por geles, electroforesis en gel de poliacrilamida y centrifugación en gradiente de sacarosa) se determinaron los pesos moleculares (PM's) del complejo y sus componentes. Se han informado datos de $PM\ 40.000 \pm 4.000$ para la deaminasa de numerosas fuentes (Llambías y Batlle, 1971 a, b; Jordan y Shemin, 1973; Higuchi y Bogorad, 1975; Sancovich et al, 1976; Miyagi et al, 1979; Rossetti et al, 1980; Williams et al, 1981; Fumagalli et al, 1983), existiendo una publicación que establece un $PM\ 25.000 \pm 5.000$ (Frydman y Feinstein, 1974).

Por el contrario no existe acuerdo en cuanto al PM de la isomerasa. El comportamiento de esta proteína frente a geles de dextrano y agarosa (Sancovich et al, 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a,b; Rossetti et al, 1980) varía de acuerdo con la fuerza iónica; se sugirió entonces que según las condiciones experimentales empleadas se produciría una asociación de unidades de la enzima formando diferentes agregados moleculares. Esto explicaría la presencia en la literatura de PM's diferentes (5.000-6.000 a 280.000).

Debido a lo anteriormente expuesto, es lógico que la PBG-asa presente PM's promedios distintos, sugiriéndose la existencia de fenómenos de asociación-disociación entre un número variable de unidades de los componentes individuales del complejo enzimático (Llambías y Batlle, 1971 a; Rossetti et al, 1980; Fumagalli et al, 1982). En base a evidencias experimentales, nuestro laboratorio postuló que la estructura funcional mínima de la PBG-asa en *Euglena gracilis* y en hígado de cerdo sería un dímero de PM 50.000 (Rossetti et al, 1980; Fumagalli et al, 1982) cuyos protómeros de PM 25.000 estarían formados por dos unidades proteicas diferentes, en la relación de 1 mol de deaminasa (PM 20.000) a 1 mol de isomerasa (PM 5.000).

En cuanto al pH se han observado actividades máximas de PBG-asa y de deaminasa a pH's entre 7,2 y 8,2, según la fuente enzimática empleada. Para ambas enzimas se obtuvieron curvas de forma semejante, para la actividad expresada tanto en función de las porfirinas formadas como del PBG consumido. En callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 a) y en *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978) dicho comportamiento fue diferente; se observó un único pico de pH óptimo para la PBG-asa y la deaminasa, midiendo la actividad en función de la cantidad de uroporfirinógeno formado, pero cuando se consideró la misma respecto al PBG consumido aparecieron dos picos bien definidos a distintos pH's. Esto sugeriría que el consumo de sustrato ocurre probablemente en dos etapas las cuales poseerían dos pH's óptimos diferentes.

Tanto la PBG-asa como la deaminasa se han comportado como enzimas sulfhidrúlicas, en todos los sistemas estudiados hasta el momento (Sancovich et al, 1969 a, 1976; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Frydman y Feinstein, 1974; Russell y Rockwell, 1980) no conociéndose aún cómo actuarían dichos grupos -SH durante la

reacción. Se ha sugerido que los mismos estabilizarían el complejo enzima-sustrato o que podrían ser necesarios en la formación de un complejo enzimático activo, ordenando o disponiendo estructuralmente a la proteína para la expresión de su actividad (Llambías y Batlle, 1971 a,b). Dado que los inhibidores típicos de los grupos tioles afectan más la formación de porfirinas que el consumo de sustrato, se ha propuesto que dichos restos -SH estarían involucrados en la etapa de ciclación.

En cuanto al efecto de las sales de sodio y magnesio, sobre la actividad de la PBG-asa de ciertas fuentes (Llambías y Batlle, 1971 a; Sancovich et al, 1976; Clement et al, 1982) se observó una acción estimulante, hecho que podría deberse a que estos iones participarían en algún fenómeno de asociación-disociación de la proteína, la cual alcanzaría así un ordenamiento estructural adecuado para una actividad óptima.

Bogorad (1962, 1963) estudió el efecto del ion amonio y de la hidroxilamina sobre la deaminasa. Este autor halló que ambos reactivos inhibían tanto la formación de porfirinas como el consumo de PBG. Sancovich et al (1969 a, b), Frydman y Frydman (1970), Llambías y Batlle (1971 a, b) y Frydman y Feinstein (1974) observaron el mismo efecto inhibitorio sobre la PBG-asa y la deaminasa de otras fuentes. Sancovich et al (1969 a) y Stella et al (1971) propusieron que los iones amonio inhibirían la actividad de la isomerasa uniéndose a la enzima en el sitio activo correspondiente al PBG o a un intermediario polipirrólico. Otra hipótesis planteada por estos autores considera que los iones amonio podrían disociar el complejo PBG-asa o interferir en la interacción de sus componentes, que sería necesaria para su actividad.

Debido a la estabilidad de la deaminasa al calentamiento, en la mayoría de los casos se la ha purificado mediante este tratamiento. Esta enzima puede incubarse durante 15 a 30 minutos a 65 °C sin pérdida de actividad, aunque temperaturas superiores a ésta la inactivan rápidamente. Además, cuando se somete a un precalentamiento a 60 °C durante 30 minutos a fracciones de PBG-asa parcialmente purificadas, no sólo se inactiva la isomerasa sino que paralelamente se observa un aumento de la biosíntesis de porfirinas por incubación con PBG (Conford, 1964; Sancovich et al, 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Rossetti, 1978).

En nuestro laboratorio se han logrado unir covalentemente a Sepharosa, deaminasas de *Rp. palustris* y de hígado bovino (Kotler et al, 1983) así como también la PBG-asa de esta última fuente, (Rossetti et al, 1976). La PBG-asa insolubilizada sintetizaba uroporfirinógeno III pero la relación de urogen III a urogen I presentes dependía del tratamiento previo de la enzima, de las condiciones de incubación y de las cantidades relativas de Isomerasa y deaminasa activas (Rossetti et al, 1976).

También se ha encontrado que deaminasas de distintas fuentes eran fotosensibles (Frydman y Frydman, 1970; Frydman y Feinstein, 1974) e inhibidas por una pirroloxigenasa, oxidasa de función mixta que inactiva enzimas conteniendo residuos triptofano, en presencia de ditionito. Esto sugeriría que este aminoácido podría estar involucrado en el sitio activo de la deaminasa (Frydman y Frydman, 1973).

Llambías y Batlle (1971 a, b) y Sancovich et al (1976) observaron que la deaminasa se encontraba inhibida en presencia de algunos ácidos dicarboxílicos y de 2-metoxi-5-nitrotrona, reactivo que modifica química y específicamente a los grupos amino libres de las proteínas. Estos autores propusieron que los ácidos dicarboxílicos inhibirían la deaminasa compitiendo con el PBG por algunos grupos de la enzima cargados positivamente (restos ϵ -amino de la lisina o restos guanidino de la arginina). Esta hipótesis estaría de acuerdo con los trabajos de Bogorad (1958 a) quien demostró que el formaldehído inhibía la deaminasa uniéndose a los residuos lisina de la proteína. La deaminasa de germen de trigo y de eritrocitos humanos es inhibida por monopirroles sintéticos análogos al PBG, que poseen una posición α libre, una cadena de ácido propiónico en posición β y un grupo metilo o aminometilo en la otra posición α (Frydman y Frydman, 1970; Frydman y Feinstein, 1974).

Sin embargo, Russell y Rockwell (1980) hallaron que el ácido opsopirrol dicarboxílico (OPD) era un inhibidor de la deaminasa de germen de trigo. Estos autores estudiaron el efecto de reactivos mercuriales y de N-etilmaleimida (NEM) en presencia y ausencia de PBG y OPD y observaron que el OPD protegía a la deaminasa de la inhibición ejercida por el NEM y por un derivado mercurial del PBG (PBG-Hg). Esto sugeriría la existencia de uno o más grupos -SH en el sitio activo de la enzima. La presencia de PBG produjo un incremento del efecto inhibitorio de los

compuestos mercuriales sobre la deaminasa. Russel y Rockwell (1980) postularon que el PBG podría provocar un cambio conformacional, el cual expondría los grupos tioles o podría activar los reactivos mercuriales originando un compuesto más reactivo.

Pollack y Russell (1978) estudiaron el efecto de la butadiona sobre la actividad de la deaminasa de germen de trigo y encontraron que este reactivo inhibía significativamente a la enzima mientras que el PBG revertía dicha inhibición. La butadiona es un inhibidor que actúa bloqueando los grupos guanidino de los residuos arginina del sitio activo de las enzimas cuyos sustratos contienen en su estructura grupos carboxilatos o fosfatos. Estos autores sugirieron que la deaminasa poseería uno o más residuos arginina en su sitio activo.

La deaminasa proveniente de una variedad de fuentes enzimáticas se ha comportado electroforéticamente como una proteína homogénea (Levin y Coleman, 1967; Stevens et al, 1968; Llambías y Batlle, 1971 a,b; Jordan y Shemin, 1973; Frydman y Feinstein, 1974; Higuchi y Bogorad, 1975; Russell y Pollack, 1978). Sin embargo, Miyagi et al (1979) informaron acerca de la presencia de tres isoenzimas en eritrocitos humanos. En un trabajo posterior, Miyagi et al (1980) demostraron la separación de preparaciones de deaminasa purificada de eritrocitos humanos y bovinos, en seis bandas activas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Estos autores dividieron las isoenzimas en grupos de baja estabilidad-alta actividad y alta estabilidad-baja actividad, siendo aún un misterio su significado. Miyagi et al (1979, 1980) apoyan la hipótesis de que estas isoenzimas tomarían parte en un proceso de síntesis enzimática, postulando además una especificidad de las mismas por algún órgano en particular (hígado, riñón, médula ósea), predominando en uno de ellos.

En cuanto a la isomerasa, su existencia y propiedades han sido estudiadas en forma indirecta. Así, para poder medir su actividad se la ha incubado en forma conjunta con la deaminasa. En nuestro laboratorio se incubó isomerasa purificada de numerosas fuentes con PBG y ciertos intermediarios polipirrólicos de callos de soya (Llambías y Batlle, 1970) y *Euglena gracilis* (Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti et al, 1977) obteniéndose uroporfirinógenos. Esto sugirió en ese momento, que los posibles sustratos para la isomerasa serían el PBG y algún polipirrilmetano unido a la proteína y formado durante la reacción.

Sin embargo, en 1979, el grupo de Jordan y Scott presentaron evidencias mediante estudios espectroscópicos de RMN, que la transformación enzimática del PBG en urogen I y III ocurría a través de un intermediario libre denominado preuroporfirinógeno (Figura 7.2.) (Burton et al, 1979). Este compuesto formado a partir del PBG y por acción de la deaminasa, actúa como sustrato para la isomerasa originando un alto porcentaje de uroporfirinógeno III (Jordan et al, 1979; Jordan y Berry, 1980). El grupo de Battersby informó que la síntesis del urogen III ocurría vía otro intermediario: el hidroximetilbilano (Figura 7.3.) producto de la acción de la deaminasa sobre el PBG; dicho intermediario sería sustrato de la isomerasa. Esta produciría un reordenamiento intramolecular originando el urogen III (Battersby et al, 1979 c).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la isomerasa es una proteína termolábil que pierde un 80% de su actividad cuando se la pre-incuba a 65-70 °C durante 20-30 minutos, en presencia de deaminasa. Cuando la isomerasa se calienta en ausencia de deaminasa, la inactivación es mayor y ocurre a menores intervalos de tiempo. Esto sugeriría que en el complejo PBG-asa, la isomerasa estaría asociada a la deaminasa en tal forma que esta última protegería al componente termolábil.

En muchos casos se ha demostrado que tanto la PBG-asa como la deaminasa son igualmente activas en ausencia o en presencia de oxígeno (Bogorad, 1958 a, b; Lockwood y Benson, 1960; Sancovich et al, 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 b; Fumagalli et al, 1982). Sin embargo, se ha encontrado que en callos de soya (Llambías y Batlle, 1970; Stella et al, 1971) y en *Euglena gracilis* (Rossetti, 1979; Rossetti y Batlle, 1977) la actividad de estas enzimas se ve significativamente afectada por la presencia de oxígeno. En estos tejidos, la formación de uroporfirinógenos es máxima bajo condiciones anaeróbicas, no modificándose sin embargo, el consumo de sustrato. Los autores postularon que la presencia de oxígeno no afectaría la síntesis de intermediarios pero podría oxidarlos; de tal forma que ya no serían utilizados por las enzimas.

También es posible que el PBG fuera empleado bajo condiciones aeróbicas, en algún otro camino biosintético, por ejemplo a través de una pirrol oxigenasa (Frydman et al, 1972 a).

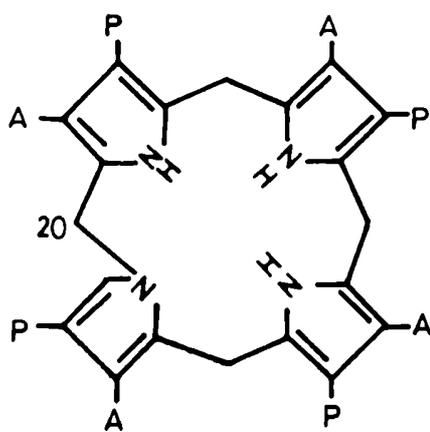


FIGURA 7.2.: Preuroporfirinógeno

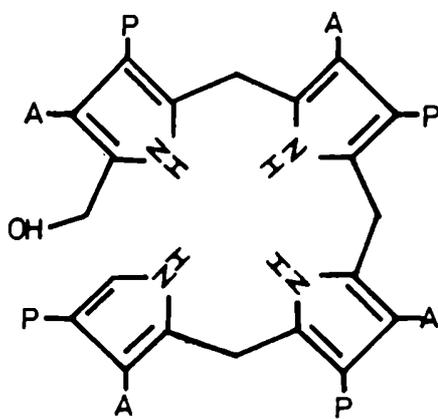


FIGURA 7.3.: Hidroximetilbilano

Clement et al (1982) aislaron y purificaron la isomerasa de hígado de rata, estudiando algunas de sus propiedades, incluyendo la inhibición ejercida por varios iones metálicos. Estos autores aseguraron la formación de más de un 80% de urogen III manteniendo una relación de unidades de isomerasa:deaminasa de 14:1. Stevens et al (1968) habían propuesto una relación aproximada de 10:1 para extractos crudos de eritrocitos humanos. Este exceso de Isomerasa también fue descrito por Batlle y Rossetti (1977), concluyéndose que en condiciones fisiológicas aseguraría la exclusiva síntesis de urogen III.

Clement et al (1982) efectuaron estudios de la actividad de PBG-asa, deaminasa e isomerasa, de hígado de rata en presencia de iones metálicos, sugiriendo que la isomerasa sería más sensible a la inhibición ejercida por estos metales que la deaminasa. Así, observaron una inhibición selectiva de esta enzima al incubarla con CdCl_2 , ZnCl_2 y CuCl_2 , en concentraciones de $10 \mu\text{M}$. Es muy probable que estos iones interfieran con la formación del complejo activo deaminasa-isomerasa. Alternativamente, la isomerasa poseería grupos monotioles que estarían más expuestos que en la deaminasa. Debido a que la inhibición por los metales es no competitiva y se revierte en presencia de compuestos tiólicos, es probable que dichos grupos no se encuentren en el sitio activo sino que estén involucrados en el mantenimiento de una conformación adecuada.

VII.3. Estudios cinéticos

Los estudios cinéticos más detallados acerca de la PBG-asa y de la deaminasa han sido realizados en enzimas purificadas de hígado bovino (Sancovich et al, 1969 a,b), eritrocitos de ave (Llambías et al, 1971) y callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 b,c).

La PBG-asa de hígado bovino exhibe efectos cooperativos observándose una curva sigmoidea al graficar v vs (PBG), gráficos de las inversas no lineales y un coeficiente de Hill (n) tendiendo a 2 (Sancovich et al, 1969 a,b).

La deaminasa, en cambio, muestra una cinética michaeliana, con un n igual a 1. Este comportamiento no se ve afectado

por la presencia de iones amonio. En consecuencia, como la deaminasa no presenta cinética cooperativa, mientras que la PBG-asa manifiesta un comportamiento no michaeliano, se postuló que dichos efectos facilitarían la unión del PBG al componente isomerasa del complejo (Sancovich et al, 1969 b).

Cuando la PBG-asa de esta fuente se calienta, se dializa contra agua destilada o se mezcla con el inhibidor amonio, la cinética alostérica se transforma en michaeliana apareciendo un incremento en la afinidad por el PBG y formándose urogen I en lugar de urogen III. De acuerdo con estos resultados, Sancovich et al (1969 a,b) propusieron que la PBG-asa de hígado bovino sería una enzima alostérica.

Llambías et al (1971) estudiaron la cinética de estas dos enzimas purificadas de eritrocitos de ave. Tanto en presencia como en ausencia del inhibidor amonio, la PBG-asa y la deaminasa exhibían un comportamiento semejante al de las enzimas de hígado bovino.

Los extensos estudios cinéticos realizados por Llambías y Batlle (1970 b,c) con las enzimas purificadas de callos de soya indicaron que tanto la PBG-asa como la deaminasa presentaban un comportamiento cinético totalmente diferente al de las mismas enzimas provenientes de otras fuentes. Así, las curvas de saturación para la PBG-asa y la deaminasa, en presencia o ausencia del ion amonio, eran muy similares, respondiendo a una cinética no michaeliana y los gráficos de las inversas eran bífásicos dando origen a dos valores de K_m .

Este tipo de perfil cinético se obtuvo también al expresar la velocidad de la reacción como función del consumo de sustrato.

Esta desviación del comportamiento michaeliano se apreció también al calcular los valores de R_s y de n para ambas enzimas. La PBG-asa reveló un R_s mayor que 81 y un n menor o tendiendo a 1 a bajas o altas concentraciones de sustrato respectivamente respondiendo así a una cinética homotrópica negativa (Llambías y Batlle, 1970 b).

Recientemente, el grupo de Battersby (Williams et al, 1981) efectuó estudios de velocidades iniciales empleando la deaminasa de *Euglena gracilis*. Estos autores midieron la veloci

dad de formación de urogen en un amplio rango de concentraciones de sustrato y a tres valores de pH. En todos los casos, el gráfico de (PBG)/v vs (PBG) fue lineal. La presencia de una cinética michaeliana para la deaminasa ha sido observada también en otras fuentes: germen de trigo (Frydman y Frydman, 1970) y eritrocitos humanos (Frydman y Feinstein, 1974).

En cuanto a la PBG-asa de pellet de *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978), la cinética es michaeliana considerando la velocidad como formación de porfirinas; sin embargo, teniendo en cuenta los valores obtenidos midiendo la velocidad en función del consumo de sustrato, se observan gráficos sigmoideos. Este comportamiento diferencial se confirma al efectuarse los gráficos de las dobles recíprocas y al calcularse los n de Hill. El n para la reacción, considerando el consumo de PBG tiende a 2, hecho que apoyaría la teoría de la existencia de una cooperatividad positiva entre, por lo menos 2 sitios de unión distintos para el sustrato.

VII.4. Intermediarios polipirrólicos

Uno de los puntos más importantes para elucidar el mecanismo de acción de la PBG-asa consiste en la identificación del sustrato de la isomerasa.

En 1963, Bogorad postuló que esta enzima actuaba sobre un intermediario de estructura desconocida, producto de la acción de la deaminasa sobre el PBG (Figura 7.4.). Sin embargo, hasta 1970 no se lograron detectar estos intermediarios. La primera evidencia experimental de la existencia de los mismos provino de los estudios con callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 a; Stella et al, 1971), en los cuales se encontró que en condiciones normales de incubación por acción de la PBG-asa y de la deaminasa sobre el PBG, se originaban intermediarios polipirrólicos distintos: "P" y "D" respectivamente. La incubación de P con PBG y PBG-asa producía sólo urogen III mientras que D junto con PBG y deaminasa formaba 100% de urogen I. A partir de este fundamental hallazgo, aparecieron otros estudios de acumulación y aislamiento de di y tetrapirroles, obtenidos incubando PBG y deaminasa en presencia de inhibidores (amonio e hidroxilamina) (Pluscec y Bogorad, 1970; Radmer y Bogorad,

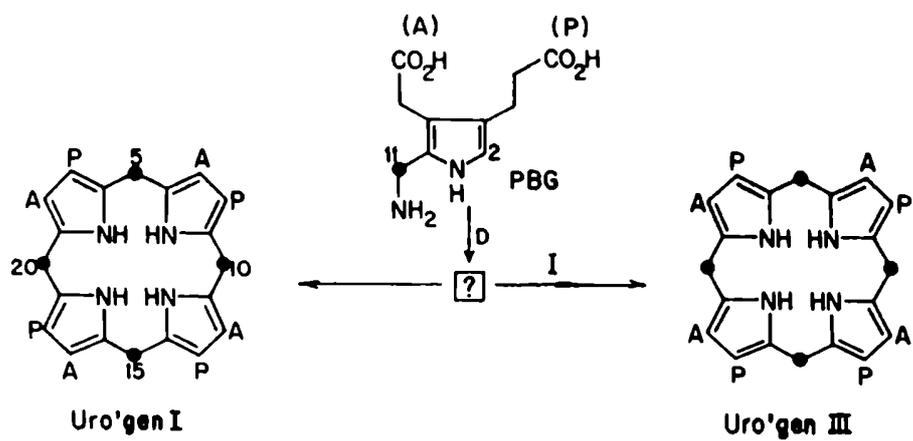


FIGURA 7.4.: Intermediario polipirrónico (?)
 producto de la acción de la Deaminasa
 sobre el PBG, propuesto por Bogorad
 (1963) como sustrato de la Isomerasa
 (I)

1972; Davies y Neuberger, 1973). No obstante, nuestro laboratorio considera que este procedimiento no es el más conveniente, ya que es probable que las estructuras de los intermediarios aislados, obtenidos por inhibición de una reacción, no sean las que correspondan a las verdaderas. Así, Davies y Neuberger (1973) identificaron un intermediario que según sus conclusiones era distinto al hallado por el grupo de Bogorad (Pluscec y Bogorad, 1970; Radmer y Bogorad, 1972), habiendo usado ambos el mismo inhibidor junto con deaminasa.

De los resultados obtenidos estudiando la cinética de las enzimas de callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a) y *E. gracilis* (Rossetti y Batlle, 1977) se propuso que la conversión del PBG en urogen I ó III ocurriría en dos etapas: durante la primera se sintetizaría un intermediario polipirrólico y en la segunda se formaría el producto final.

Tanto, en callos de soya como en *E. gracilis* existía un lag pronunciado considerando la formación de uroporfirinógeno, luego del cual la síntesis aumentaba en forma lineal con el tiempo (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 a; Stella et al, 1971; Rossetti y Batlle, 1977). Es importante hacer notar que no se encontró evidencia alguna de una fase lag durante la medición del consumo de sustrato. De la curva de actividad en función del tiempo se observó que la cantidad de porfirinas formadas se hallaba muy por debajo de la relación estequiométrica; los gráficos de saturación por sustrato revelaron un comportamiento diferente de la enzima según se midiera la formación de producto o el consumo de sustrato, corroborando la falta de estequiometría (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 a; Stella et al, 1971; Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti, 1978). Indudablemente, existe más consumo de sustrato que el necesario para la cantidad de porfirinas sintetizadas. Estos resultados indicarían que en tales condiciones debería estar formándose algún intermediario de naturaleza polipirrólica.

Llambías y Batlle (1971 a) observaron que la fase lag era menos pronunciada o podía desaparecer cuando dicho intermediario se encontraba presente en la mezcla de reacción desde el comienzo de la incubación. Esto sugeriría que su ausencia o su lenta formación serían la causa de la demora en la aparición de los uroporfirinógenos.

Como hemos mencionado anteriormente, concentraciones elevadas de hidroxilamina y de amonio inhiben la síntesis de urogen en un grado mayor que el consumo de sustrato. Así, Pluscec y Bogorad (1970) aislaron e identificaron un dipirrimetano no isomerizado (DPM I) (Figura 7.5.a.) de una mezcla de incubación de deaminasa de espinaca con PBG en presencia de hidroxilamina. Pluscec y Bogorad (1970) y Frydman et al (1971) emplearon el DPM I sintetizado químicamente y demostraron que no actuaba ni como sustrato ni como intermediario de la síntesis de urogen III; sin embargo, constituía un intermediario en la formación enzimática del urogen I.

Estos resultados no están de acuerdo con trabajos del grupo de Battersby (Battersby et al, 1977 a, b, c); estos autores demostraron que el DPM I se convertía en urogen III. La etapa inicial sería la síntesis de un dipirrimetano mediante una condensación cabeza-cola de dos moléculas de PBG. Seguidamente se combinarían secuencialmente otras dos moléculas de sustrato para dar origen a un bilano lineal tetrapirrólico no isomerizado (Figura 7.6.). Recién luego de esta etapa tendría lugar la inversión de uno de los anillos de PBG.

Radmer y Bogorad (1972) aislaron e identificaron también un intermediario de una mezcla de incubación de deaminasa de espinaca con PBG en presencia de amonio. Este intermediario era un tetrapirrimetano (TPM I) (Figura 7.6.) que formaba urogen I no enzimáticamente. En el año 1963, Bogorad había propuesto que el intermediario polipirrólico en la biosíntesis del urogen III sería un compuesto del tipo del TPM I. Sin embargo, Radmer y Bogorad (1972) observaron que el TPM I no era utilizado enzimáticamente en la formación del isómero III.

Valasinas et al (1978) encontraron un nuevo método de síntesis para el 2-aminometilbilano (TPM I) observando que el TPM I no era sustrato de la deaminasa, ni de la isomerasa, como tampoco de la PBG-asa. Este grupo apoya la hipótesis de que la inversión de un anillo del PBG debe ocurrir en una etapa temprana de la formación del urogen III.

El dipirrimetano III (DPM III) (Figura 7.5.b) se incorpora específicamente en el urogen III en presencia de PBG y por acción de la PBG-asa (Frydman et al, 1972 b). Dado que en ausencia de PBG no existe incorporación, los autores eliminaron la

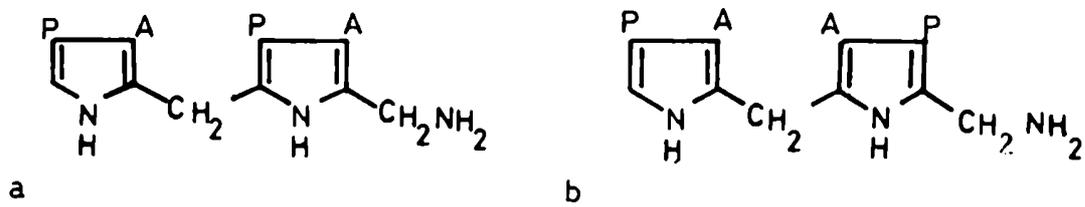


FIGURA 7.5.: a: Dipirrilmetano I (DPM I)
 b: Dipirrilmetano III (DPM III)
 A: -CH₂-COOH; P: -CH₂-CH₂-COOH

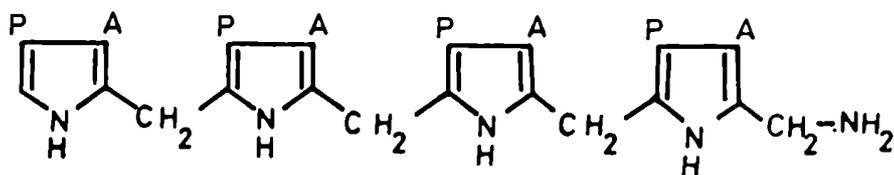


FIGURA 7.6.: Tetrapirrilmetano I
 (TPMI)
 A: -CH₂-COOH;
 P: -CH₂-CH₂-COOH

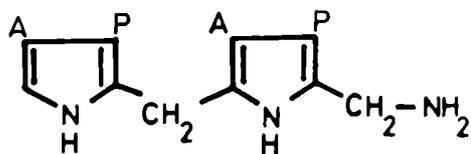


FIGURA 7.7.: Dipirrilmetano II (DPM II)

posibilidad de una condensación de pares de moléculas de DPM III. Sin embargo, esta incorporación del DPM III es baja y del mismo orden que la hallada para el DPM I con la deaminasa, en contraste con la significativa incorporación del DPM I en urogen III, obtenida por Battersby (1977 c).

Estos resultados indicarían que estos compuestos no se comportarían como sustratos libres de la reacción sino que actuarían como intermediarios de la misma. Battersby et al (1973) hallaron que hemolizados de eritrocitos de pato y extractos crudos de *E. gracilis* incorporaban el DPM I en protoporfirina IX. Utilizando estas mismas fuentes enzimáticas, estudiaron la incorporación del (2,11-¹³C)PBG en protoporfirina IX, demostrando que era el anillo D el que sufría el reordenamiento intramolecular, mientras que los otros tres permanecían intactos (Battersby et al, 1973 b).

Frydman et al (1978 a) sintetizaron los compuestos DPM I, DPM III y DPM II (Figura 7.7.) con la finalidad de estudiar la especificidad del sistema enzimático PBG-asa. Así, confirmaron la incorporación del DPM I en urogen I y del DPM III en urogen II. En cuanto al DPM II no se incorporaba en ninguno de los isómeros, sino que por el contrario ejercía un marcado efecto inhibitorio sobre la formación enzimática del isómero III.

A esta altura de las investigaciones existía un acuerdo en cuanto a que un aminometildipirrimetano estaría involucrado en la conversión del PBG en urogen III; pero según Battersby et al (1977 a, b, c) la isomerización ocurriría luego de la formación de un bilano lineal no isomerizado mientras que de acuerdo con propuestas de Llambías y Batlle (1970 a, 1971 a), Frydman y Frydman (1975) y Batlle y Rossetti (1977) los hechos experimentales indicarían que la isomerización sucedería en la etapa inicial de la condensación de las dos primeras moléculas de sustrato.

Scott et al (1976) analizaron una serie de hipótesis con la finalidad de aclarar y distinguir entre las dos posibilidades antes mencionadas. La hipótesis de Mathewson y Corwin (1961) (Figura 7.8.) esquematiza la vía del bilano simétrico mientras que la teoría de Rimington-Johnson (Figura 7.9.) estaría de acuerdo con las hipótesis de Cookson y Rimington (1954) y Bullock et al (1958). En este último esquema el camino A indica una

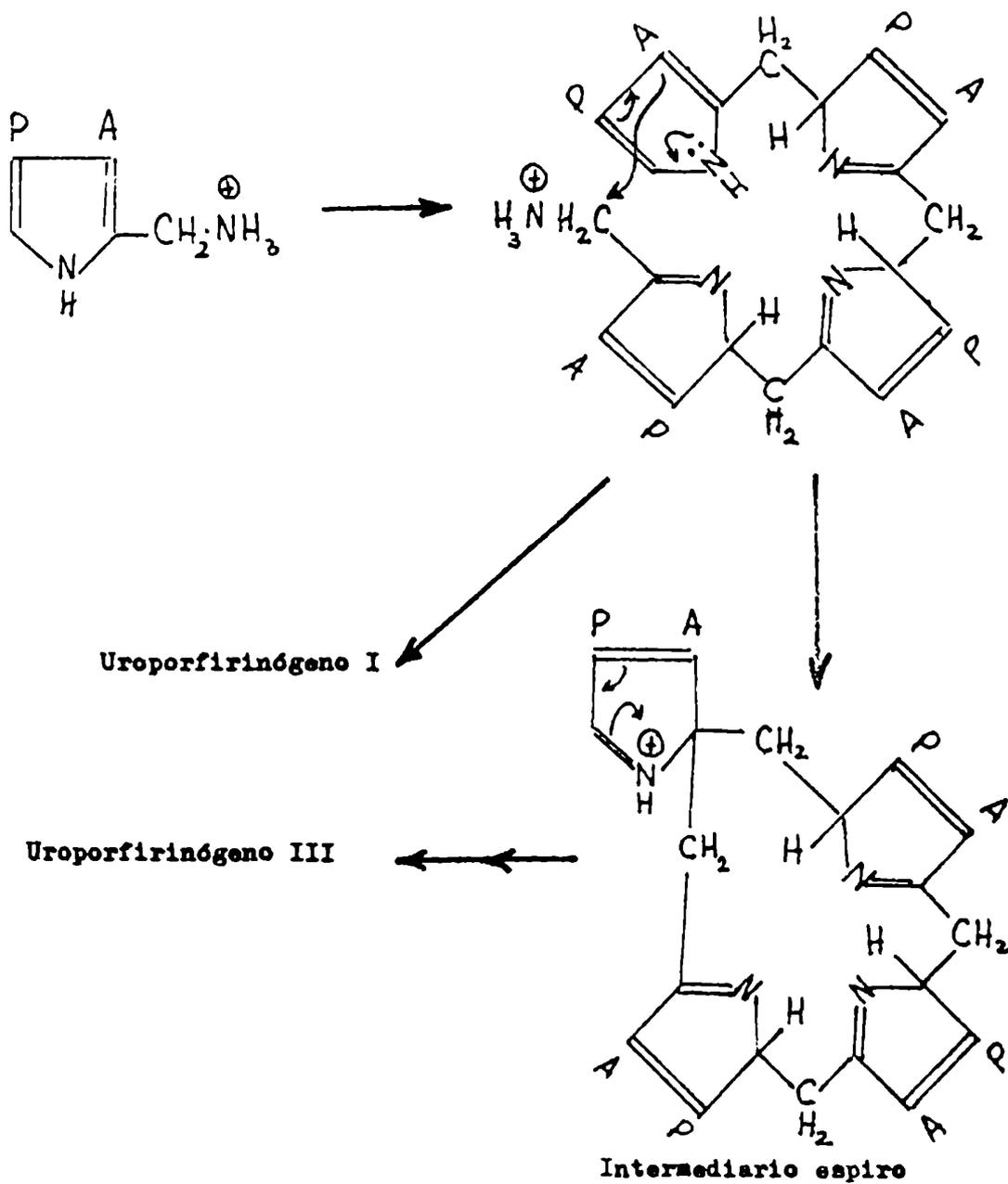


FIGURA 7.8.: Hipótesis de Mathewson y Corwin (1961) para la formación del Uroporphirinógeno III ó I

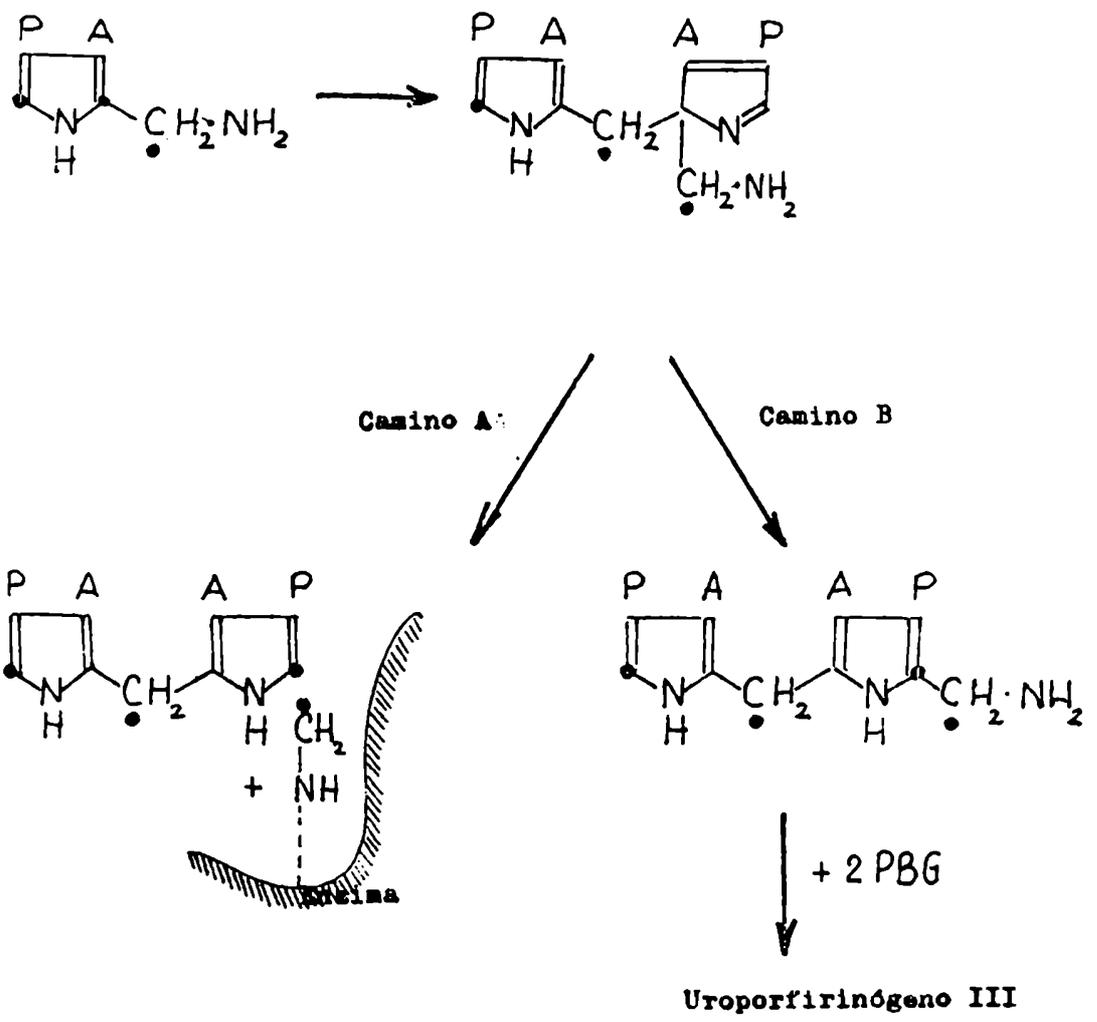


FIGURA 7.9.: Mecanismo de Rimington-Johnson

reacción intramolecular de tipo estrictamente químico, a través de un reordenamiento concertado $7 \rightarrow 6$, no excluyéndose la posibilidad de un reordenamiento intramolecular enzimático $7 \rightarrow 8 \rightarrow 6$ (camino B). Scott et al (1976) emplearon un dipirrometano simétrico, el cual carecía del grupo aminometilo (DPM 8) (Figura 7.10.) e incubaron este compuesto marcado con ^{14}C , con PBG-asa purificada de espinaca, extractos libres de células de *Clostridium tetanomorphum* y células enteras de *P. shermanii*. En todos los casos observaron que el DPM 8 se incorporaba en el urogen III y no en el I. Scott et al (1976) propusieron que este compuesto se debería intercambiar necesariamente con una molécula igual lo cual revelaría que durante la reacción el resto aminometilo se separaría totalmente del DPM formado en el primer paso de la reacción. Esto estaría aportando una prueba de que la síntesis del isómero III está controlada por la formación del DPM III y apoyaría la hipótesis de que la inversión del anillo D se produciría al comienzo del proceso o sea durante la condensación cabeza-cola de dos moléculas de PBG mediante un mecanismo de transferencia del grupo aminometilo (Figura 7.11.).

Frydman et al (1974) sintetizaron un 2-aminometiltripirrano (tripirrano I) (Figura 7.12 a) observándose que este compuesto no era sustrato de la isomerasa ya sea en presencia o ausencia de PBG. Estos autores demostraron que el tripirrano I inhibía la síntesis enzimática de urogen III; además se incorporaba en forma muy reducida en el urogen I por lo cual no podía ser considerado sustrato de la deaminasa pero sí un posible intermedio en la síntesis de dicho producto.

Frydman et al (1978 b) investigaron la interacción del tripirrano III (Figura 7.12 b) con estas enzimas, encontrando que no actuaba como sustrato de ninguna de ellas, ya sea en presencia o ausencia de PBG. La presencia de este tripirrano III no incrementaba la formación de uroporfirinógeno, sino por el contrario, ejercía un efecto inhibitorio sobre la síntesis total de uroporfirinógenos en particular del isómero III, no observándose tampoco incorporación en el tipo I.

Frydman et al (1978 b) sintetizaron otros dos tripirranos: II y IV (Figura 7.13.a,b). El tripirrano II no constituye un sustrato para ninguna de las enzimas; más aún, en presencia de PBG y de PBG-asa, deaminasa o isomerasa ejercía un efecto inhi-

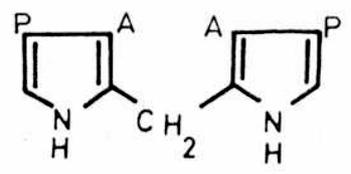


FIGURA 7.10.: Dipirrometano

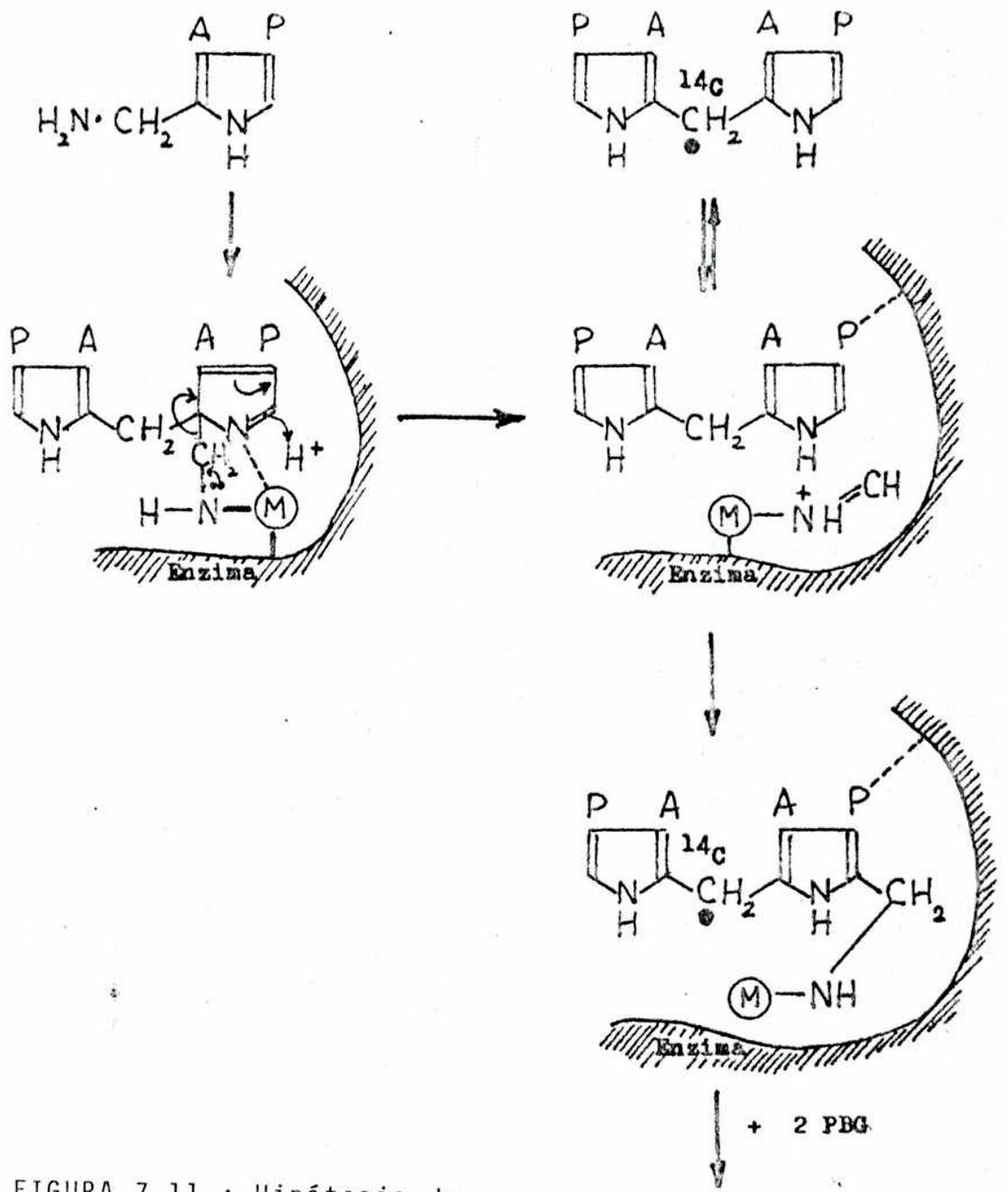


FIGURA 7.11.: Hipótesis de Scott

¹⁴C-Uroporfirinógeno III

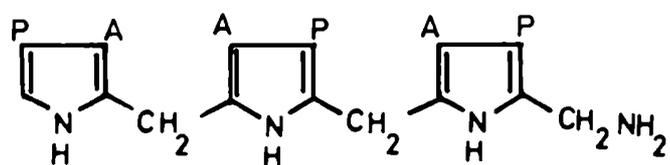
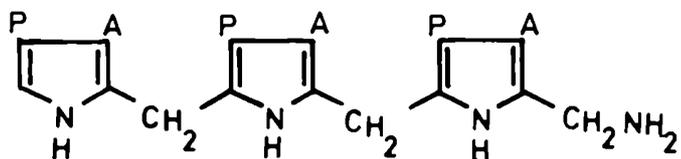


FIGURA 7.12.: a: Tripirrano I; b: Tripirrano III

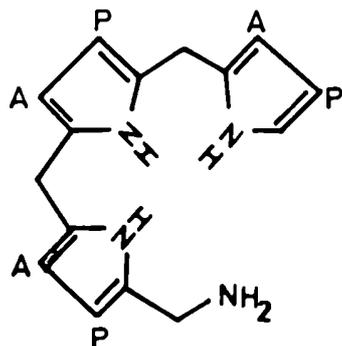
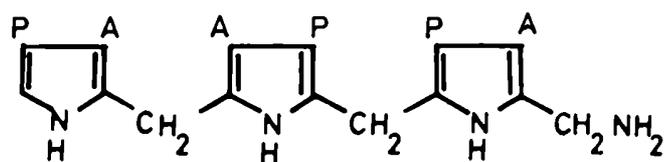


FIGURA 7.13.: a: Tripirrano II; b: Tripirrano IV

bitorio, mayor sobre la formación de urogen III que sobre la de urogen I. En cuanto al tripirrano IV no se comportó ni como sustrato ni como intermediario de la biosíntesis de urogen III y urogen I, produciendo una inhibición de la cantidad total de uroporfirinógenos formados, especialmente urogen III.

Estos resultados no coinciden con los hallados por Franck et al (1977 a,b), quienes sintetizaron químicamente, mediante una metodología distinta, los tripirranos IV (Figura 7.13.b) y V (Figura 7.14.). Incubando estos tripirranos marcados se observó una incorporación de ambos en el hemo formado.

Mediante experiencias empleando ^{13}C , el grupo de Battersby demostró que los cuatro anillos pirrólicos del urogen III se unían en forma secuencial siendo el último (anillo D) el que sufría un reordenamiento intramolecular (Battersby et al, 1978, 1979 a,c). Battersby et al (1979 b) hallaron que la deaminasa en presencia de PBG formaba como intermediario un bilano lineal no isomerizado, el cual en ausencia de isomerasa se liberaría como hidroximetilbilano (Figura 7.3.); éste se transformaría no enzimáticamente en urogen I, pero en presencia de la isomerasa se convertiría rápidamente en urogen III (Battersby et al, 1979 b). Paralelamente el grupo de Scott encontró también un posible sustrato para la isomerasa. Burton et al (1979) efectuaron estudios de espectroscopía RMN (^{13}C) y presentaron evidencias de que la transformación enzimática del PBG en urogen I y urogen III ocurriría a través de un intermediario libre: preuroporfirinógeno (Figura 7.2.) producto de la acción del PBG sobre la deaminasa. El preuroporfirinógeno actuaría como sustrato de la isomerasa originando un alto porcentaje de urogen III. En ausencia de la isomerasa, el preuroporfirinógeno se cicla químicamente formando exclusivamente urogen I (Jordan et al, 1979). Estos autores presentaron evidencias que indicarían que ambas enzimas funcionan independientemente y en forma secuencial. Además, el orden de unión de las cuatro moléculas de sustrato sería el ya determinado por Battersby et al (1978, 1979 a): abcd (Jordan y Sehra, 1979).

Recientemente, Battersby et al (1980) corroboraron la acción de la isomerasa sobre el hidroximetilbilano, produciendo una isomerización sólo sobre el anillo D y una rápida ciclación para originar el urogen III.

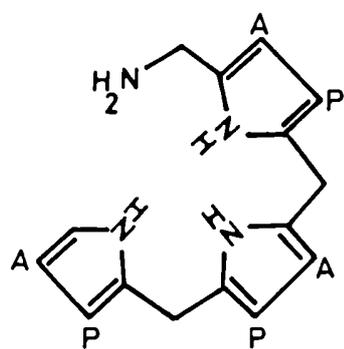


FIGURA 7.14.: Tripirrano V

En 1980, el grupo de Jordan consideró los datos obtenidos por espectroscopía de RMN indicando que la estructura más probable para el preuroporfirinógeno sería la de un hidroximetilbilano (Jordan y Berry, 1980). Estos autores obtuvieron el intermediario incubando PBG con deaminasa de *Rp. sphaeroides*. Una vez sintetizado el preuroporfirinógeno, lo utilizaron como sustrato de isomerasa proveniente de diversas fuentes: *Rp. sphaeroides*, levaduras, germen de trigo, reticulocitos humanos, eritrocitos de ave y bazo de ratón. En todos los casos se obtuvo un excelente rendimiento de urogen III.

El preuroporfirinógeno es un intermediario sumamente inestable a pH fisiológico ($t_{1/2} = 4$ minutos, a 37 °C, pH 8,2-8,5) (Jordan y Berry, 1980; Jordan et al, 1980).

Berry y Jordan (1981) trataron de aislar y caracterizar los complejos enzima-intermediario formados mezclando en una forma rápida (rapid mixing device) deaminasa purificada de *Rp. sphaeroides* y cantidades crecientes y estequiométricas de (^{14}C)PBG. Mediante el empleo de la electroforesis en gel de poliacrilamida, se determinó que la deaminasa presentaba una sola banda mientras que las muestras provenientes de los distintos sistemas de mezclado poseían movilidad electroforética progresivamente superiores y migraban en bandas discretas.

Anderson y Desnick (1980) habían observado también bandas múltiples que corresponderían a los intermediarios enzima-PBG_n al incubar deaminasa de eritrocitos humanos con PBG en exceso.

Berry y Jordan (1981) concluyeron que las distintas bandas separadas electroforéticamente corresponderían a los intermediarios provenientes de la reacción catalítica que involucra uno, dos y tres residuos pirrólicos unidos a la enzima. Bajo las condiciones de esta experiencia se observaron sólo tres complejos enzima-intermediario, debido posiblemente a que el complejo enzima-tetrapirrol es inestable liberándose rápidamente para formar el preuroporfirinógeno.

VII.5. Mecanismo de acción

Hasta el momento se han detectado, aislado, identificado y sintetizado química y bioquímicamente, intermediarios polipirrólicos de longitud variable, algunos de los cuales llevan a la formación del isómero III.

Llambías y Batlle (1971 a) postularon un esquema para tratar de explicar el mecanismo de acción de la PBG-asa (Figura 7.15.), teniendo en cuenta el hecho de que el proceso de isomerización constituye una etapa temprana en la secuencia de polimerización del PBG. En este esquema se propuso que la primer molécula de sustrato se unía a la deaminasa a través de sus dos sustituyentes carboxílicos y su posición α libre. La deaminasa catalizaría luego la formación de un dipirrol con una segunda molécula de PBG. A partir de éste se originaría un tripirrol lineal, que ya poseería la estructura de la serie III, por acción combinada de la isomerasa. Sobre la base de experiencias preliminares que sugerían que los intermediarios polipirrólicos naturales aislados eran tripirranos, la isomerasa funcionaría luego de la formación del dipirrol, si bien no se excluía la posibilidad de que esta enzima actuara durante la formación del dipirrol (Llambías y Batlle, 1971 a, b).

Sin embargo, este mecanismo se modificó debido a resultados obtenidos posteriormente. Si no existen intermediarios pirrilmétanos comunes a los urógenos III y I, la unión y reacción inicial de las dos primeras moléculas de PBG deberían ser diferentes según se tratara de PBG-asa o deaminasa. De acuerdo con estas consideraciones se modificó el esquema propuesto en 1971 (Batlle y Rossetti, 1977) (Figura 7.16.). Así, la primer molécula de PBG correspondiente al anillo D se uniría al complejo enzimático posiblemente a la deaminasa a través de sus sustituyentes β -carboxílicos y su posición α libre y a la isomerasa mediante su grupo α aminometilo. En presencia de una segunda molécula de PBG, la isomerasa actuaría modificando el sitio de condensación. De esta forma, como resultado de dicha condensación y del reordenamiento de las dos primeras moléculas de PBG se produciría un dipirrol del tipo PAAP o DPM III. En ausencia de isomerasa, la condensación sería normal (cabeza-cola) lo que originaría el dipirrilmetano I (DPMI) o PAPA. Una vez formado el dipirrol, ocurriría la inserción de dos moléculas más de PBG. Cuando la

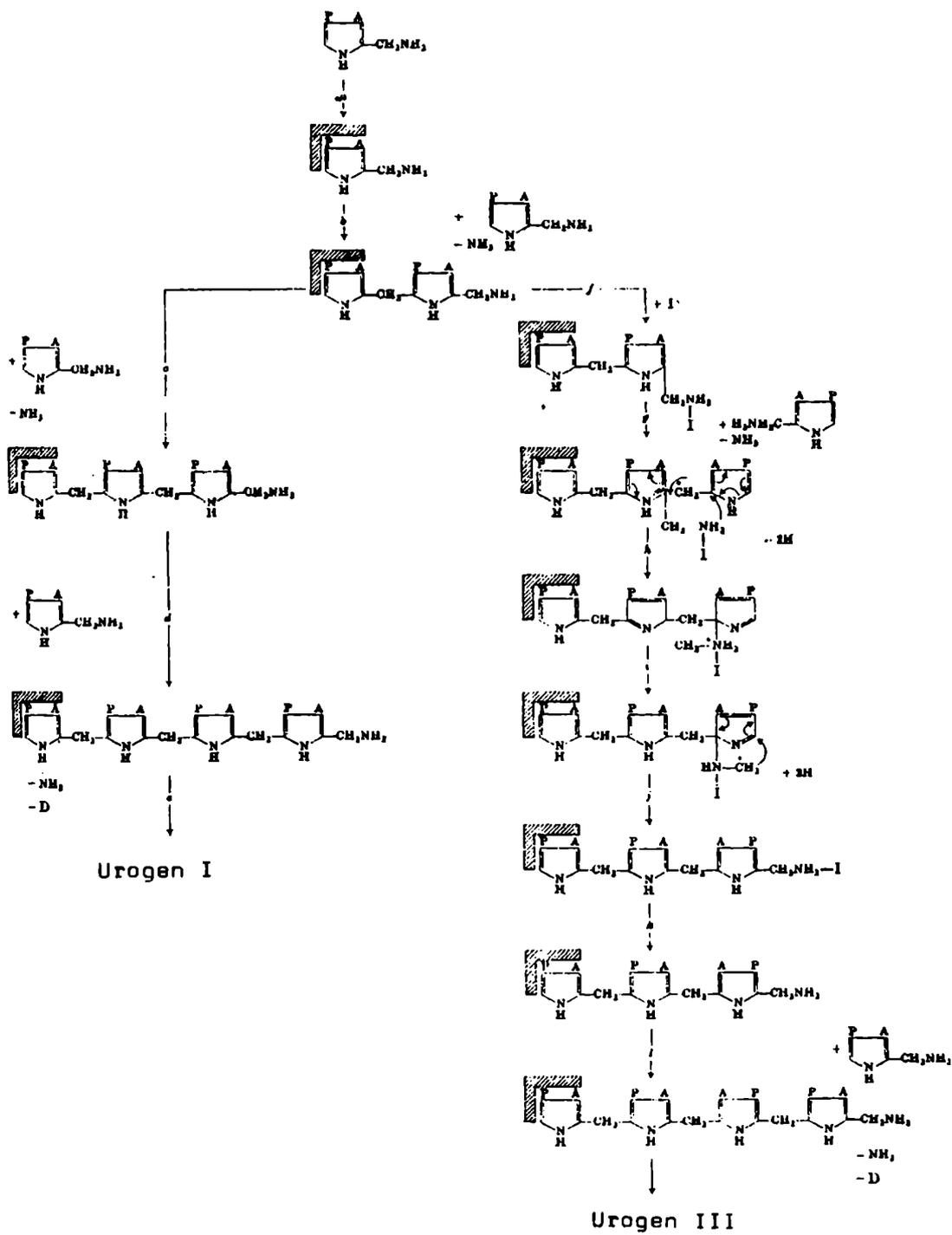


FIGURA 7.15.: Esquema propuesto para la formación de Uroporfirinógenos I y III a partir de PBG (Llambías y Battlle, 1971 a)

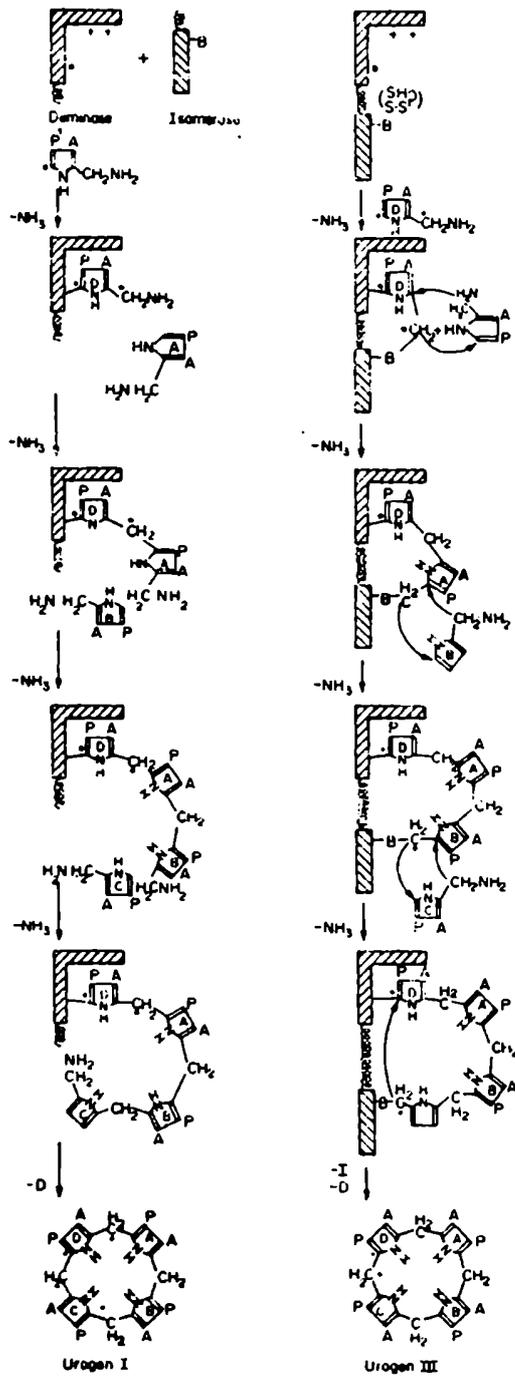


FIGURA 7.16.: Mecanismo de acción de la PBG-asa (Batlle y Rossetti, 1977)

cadena alcanza la longitud crítica correspondiente a un tetrapirrol, se produciría la ciclación. Una vez finalizado este proceso se separarían las enzimas las cuales volverían a asociarse para iniciar un ciclo nuevo (Batlle y Rossetti, 1977).

En cuanto al mecanismo de acción de la deaminasa, éste ha sido investigado por numerosos grupos, siendo los trabajos más recientes los correspondientes a Jordan y Seehra (1979); Battersby et al (1979 a); Seehra y Jordan (1980) y Jordan y Berry (1981).

Seehra y Jordan (1980) corroboraron el orden de adición de las cuatro moléculas de PBG para formar el preuroporfirinógeno. Bajo condiciones normales no hay liberación de intermediarios durante la síntesis del preuroporfirinógeno, encontrándose los mismos unidos a la enzima (Frydman et al, 1976). Jordan y Berry (1981) propusieron un mecanismo de acción para la deaminasa, en el cual la primera molécula de sustrato que da origen al anillo a del producto (Jordan y Seehra, 1979), se encuentra covalentemente unido a la enzima habiéndose desplazado el residuo amino. Sucesivamente se van uniendo las siguientes moléculas de PBG, liberándose el tetrapirrol formado a nivel de la unión covalente. Este mecanismo difiere del de Anderson y Desnick (1980) en que el grupo amino del PBG es desplazado durante la unión inicial a la enzima debido a la formación de dicha unión covalente.

VII.6. PBG-asa y porfirias

VII.6.1. Porfirias hepáticas

VII.6.1.1. Porfiria aguda intermitente (PAI)

En la PAI la excreción urinaria de ALA y PBG se encuentra marcadamente incrementada tanto durante la fase aguda como durante la remisión, no existiendo un aumento proporcional en las porfirinas que se sintetizan a partir del PBG. Esto implica que el bloqueo de la formación de tetrapirroles debería hallarse a nivel de la PBG-asa (Figura 7.17.).

Strand et al (1970) demostraron que en pacientes con PAI, la actividad de la deaminasa en hígado estaba disminuída en

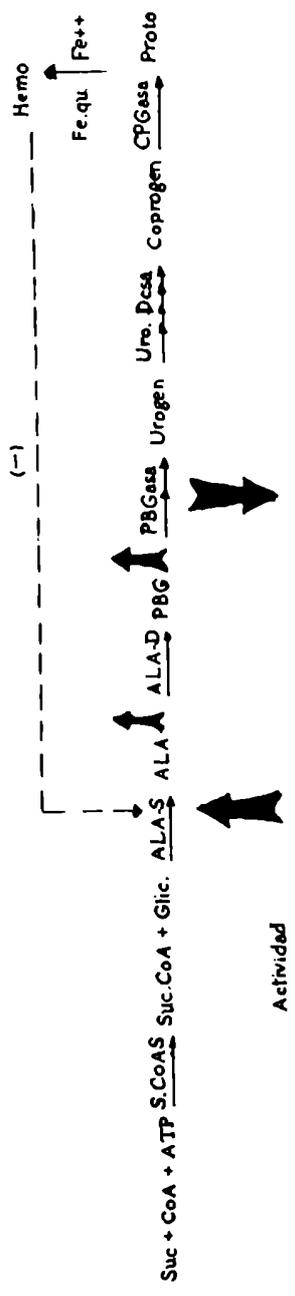


FIGURA 7.17.: Relación entre la deficiencia de Porfobilinogenasa y el incremento de ALA-S en la Porfiria Aguda Intermitente

un 50%. Estos autores postularon entonces que el defecto enzimático primario en esta porfiria sería una deficiencia de la urogen I sintetasa o deaminasa, la cual limitaría la velocidad de síntesis de hemo e interferiría en la regulación del ALA-S, deprimiendo su síntesis. Posteriormente, se estableció que esta deficiencia enzimática se hallaba determinada genéticamente, encontrándose que la actividad de la deaminasa también estaba reducida en un 50% en glóbulos rojos (Kreimer-Birnbaum, 1975; Nordmann y Grandchamp, 1976; Astrup, 1978; Batlle et al, 1978) y en fibroblastos (Meyer, 1973; Bonkowsky et al, 1973).

Es importante hacer notar que esta reducción en la deaminasa de eritrocitos se emplea como dato positivo para el diagnóstico de una PAI, no sólo en casos clínicamente manifiestos sino también en portadores asintomáticos de esta anomalía genética.

Existe un alto porcentaje de ataques agudos, potencialmente fatales, producidos por la administración imprudente de ciertas drogas (barbitúricos, sedantes, etc) o por factores de origen nutricional y hormonal. Por lo tanto, es evidente que debe evitarse que los carriers asintomáticos utilicen dichos agentes precipitantes. Así, es aconsejable llevar a cabo un estudio de la PBG-asa eritrocitaria en todos los miembros de la familia de un paciente con PAI (Batlle et al, 1978).

VII.6.2. Porfirias eritropoyéticas

VII.6.2.1. Porfiria congénita eritropoyética (PCE)

La PCE fue una de las primeras porfirias reconocidas (Schultz, 1874), pero al mismo tiempo es una de las más raras. Se la ha encontrado en humanos y en animales y se hereda según un carácter autosómico recesivo.

La principal manifestación de esta porfiria es la fotosensibilidad, acompañada de eritrodoncia, anemia hemolítica y porfirinuria. La aparición de estos signos clínicos se explica por la excesiva producción en médula ósea de uro y coproporfirina I, los cuales no son intermediarios en la biosíntesis de la protoporfirina IX.

En la Figura 7.18. se hallan descritos los distintos modelos para explicar los defectos enzimáticos responsables de esta porfiria.

Levin (1968) afirmó que la deficiencia enzimática específica en la PCE se encontraba localizada a nivel de la isomerasa. Así, se podía detectar a los portadores asintomáticos de la falla genética (Romeo et al, 1970 a, b).

La otra hipótesis postula que el defecto enzimático básico de la PCE constituye una actividad incrementada de deaminasa (Helmeyer et al, 1963; Watson et al, 1964). Miyagi et al (1976) demostraron que la actividad de la deaminasa era superior en sangre de pacientes con PCE comparada con la de sujetos normales.

Una tercera posibilidad podría ser una actividad aumentada de deaminasa asociada a una deficiencia en la isomerasa. Estudios recientes efectuados con distintos órganos provenientes de un toro con PCE indicaron la presencia de estas anomalías en médula ósea, además de una elevada actividad de ALA-S (Batlle, et al, 1979).

El primer caso humano de PCE en Escandinavia fue descrito por Rimington y With (1971) y Hofstad et al (1971). El patrón de excreción para este paciente difería en varios aspectos con la PCE clásica; más del 50% de las porfirinas urinarias eran de tipo III, lo cual excluiría la posibilidad de una deficiencia en la isomerasa, tratándose entonces de un nuevo tipo de PCE. Las evidencias experimentales indicarían que la PCE es fenotípicamente homogénea en la mayoría de las especies pero genéticamente heterogénea.

VII.6.3. Porfirias adquiridas

VII.6.3.1. Intoxicación con plomo

Uno de los efectos más conocidos del plomo sobre el camino biosintético del hemo es la marcada inhibición del ALA-D, existiendo otras etapas que sufren un bloqueo parcial por acción de este metal (ALA-S, CPG-asa y ferroquelatasa). Sin embargo, hay que hacer notar que durante una intoxicación con plomo se

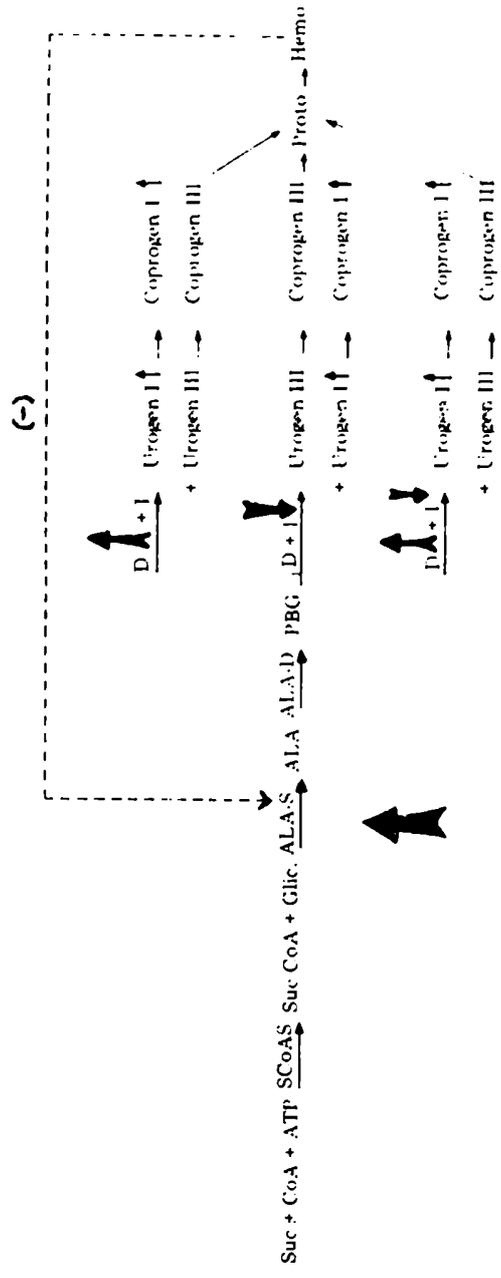


FIGURA 7.18.: Posibles modelos para explicar el patrón de excreción anormal de isómeros tipo I en la Porfiria Congénita Eritropoyética

observa también un incremento en la excreción del PBG en orina. Esto podría deberse a una inhibición de la conversión del monopirrol en urogen.

Piper y Tephly (1974) y Tephly (1975) demostraron que el plomo inhibe la actividad de la deaminasa de hemolizados de eritrocitos de rata y humanos, mientras que no tiene efecto sobre la deaminasa de citosol de hígados del mismo origen. Este comportamiento distinto entre ambas deaminasas se debería a la presencia de un factor dializable de bajo peso molecular, el cual protegería a la enzima de la inhibición por el plomo, siendo capaz de revertir también dicha inhibición de la deaminasa por el metal. Piper y van Lier (1977) demostraron que este factor además de proteger a la enzima de los efectos del plomo, estimularía la actividad enzimática, proponiéndose que funcionaría como una coenzima.

VII.6.4. Síndrome de Dubin-Johnson (SDJ)

Los pacientes con SDJ excretan un 30-40% más de COPRO que controles normales, aunque este incremento es mucho menor que el hallado en sujetos con PCE.

En cuanto a la distribución de los isómeros, se observa un marcado aumento del tipo I con una disminución simultánea del tipo III (Koskelo et al, 1967; Wolkoff et al, 1973; Kondo et al, 1976 a, b).

Ben-Ezzer et al (1971) postularon que la causa que producía la inversión de los isómeros I y III de la coproporfirina en orina podría deberse a una deficiencia o inhibición de la isomerasa hepática, por analogía con la teoría de Levin (1968) para la PCE.

Wolkoff et al (1973) propusieron que una deficiencia a nivel de la isomerasa en pacientes con SDJ, podría producir una disminución en la formación del hemo hepático. Esto implicaría un aumento del ALA-S, a través de una falla en su control. Sin embargo en pacientes con SDJ no se han observado síntomas característicos de porfiria.

Shimizu et al (1977) determinaron la actividad de isomerasa en hemolizados de eritrocitos de pacientes con SDJ, midien

dola también en homogenatos de biopsias de hígado. Estos autores no encontraron diferencias significativas en la actividad de la isomerasa de ambas fuentes sugiriéndose que el bajo contenido de coprogen III y la elevada cantidad del isómero I no se deberían a una falla en esta enzima. Aparentemente, el defecto metabólico en los casos de SDJ estaría en el transporte del urogen III y no en su formación.

Los resultados obtenidos por Shimizu et al (1977) eliminarían la participación de la isomerasa como factor responsable de la anormal excreción urinaria de coproporfirina I.

Sin embargo, son necesarias más evidencias experimentales para aclarar esta situación.

REFERENCIAS

- Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1980), J. Biol. Chem. 255 (5), 1993.
- Astrup, E.G. (1978), Clin. Sci. Mol. Med. 54, 251.
- Batlle, A.M. del C.; Wider de Xifra, E.A. & Stella, A.M. (1978), Int. J. Biochem. 9, 871.
- Batlle, A.M. del C.; Wider de Xifra, E.A.; Stella, A.M.; Bustos, N. & With, T.K. (1979), Clin. Sci. 57, 63.
- Battersby, A.R.; Hunt, E. & Mc Donald, E. (1973 a), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 442.
- Battersby, A.R.; Gibson, K.H.; Mc Donald, E.; Mander, L.N.; Moron, J. & Nixon, L.N. (1973 b), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 768.
- Battersby, A.R.; Mc Donald, E.; Williams, D.C. & Wurziger, H. K.W. (1977 a), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 113.
- Battersby, A.R.; Buckley, D.G.; Mc Donald, E.; & Williams, D.C. (1977 b), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 115.
- Battersby, A.R.; Johnson, D.W.; Mc Donald, E. & Williams, D. C. (1977 c), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 117.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Mc. Donald, E. & Meegan, M.J. (1978), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 185.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1979 a), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 539.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1979 b), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1155.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J.; Mc Donald, E. & Gustafson-Potter, K.E. (1979 c), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 316.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1980), Nature 285 (5759), 17.
- Ben-Ezzer, J.; Rimington, C.; Shani, M.; Seligsohn, U.; Sheba, C. & Szeinberg, A. (1971), Clin. Sci. 40, 17.
- Berry, A. & Jordan, P.M. (1981), Biochemical Society Transactions 9 (3), 231.

- Bogorad, L. (1958 a), J. Biol. Chem. 233, 501.
- Bogorad, L. (1958 b), J. Biol. Chem. 233, 510.
- Bogorad, L. (1962), *Methods in Enzymology* (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.), 5 p.885, Academic Press, N.Y.
- Bogorad, L. (1963), Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 676.
- Bonkowsky, H.L.; Tschudy, D.P.; Weinbach, E. & Ebert, P.S. (1973), Clin. Res. 21, 961.
- Bullock, E.; Johnson, A.W.; Makman, E. & Shaw, K.B. (1958), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1430.
- Burton, G.; Fagerness, P.E.; Hosozawa, S.; Jordan, P. & Scott, I. (1979), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 202.
- Carell, E.F. & Kahn, J.S. (1964), Arch. Biochem. Biophys. 108, 1.
- Carpenter, A.T. & Scott, J.J. (1959), Biochem. J. 71, 325.
- Clement, R.P.; Kohashi, M. & Piper, W. (1982), Arch. Biochem. Biophys. 214 (2), 657.
- Conford, P. (1964), Biochem. J. 91, 64.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1954), Biochem. J. 57, 476.
- Davies, R.C. & Neuberger, A. (1973), Biochem. J. 133, 471.
- Falk, J.E. & Dresel, E.I.B. (1960), Biochim. Biophys. Acta, 39, 458.
- Franck, B.; Rowold, A.; Wegner, Ch. & Eckert, H.G. (1976), Phi. Trans. R. Soc. Lond. B273, 181.
- Franck, B.; Fels, G. & Ufer, G. (1977 a), Angew. Chem. int. Edn. 16, 652.
- Franck, B.; Fels, G.; Ufer, G. & Rowold, A. (1977 b), Angew. Chem. int. Edn. 16, 651.
- Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974), Biochim. Biophys. Acta 350, 358.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1970), Arch. Biochem. Biophys. 136, 193.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1973), Biochim. Biophys. Acta. 293, 506.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1975), FEBS lett. 52, 317.

- Frydman, B.; Reil, S.; Valasinas, A.; Frydman, R.B. & Rapoport, H. (1971), J. Am. Chem. Soc. 93, 2738.
- Frydman, R.B.; Tomaro, M.L.; Wanschelbaum, A. & Frydman, B. (1972 a) FEBS lett. 26, 203.
- Frydman, R.B.; Valasinas, A.; Rapoport, H. & Frydman, B. (1972 b), FEBS lett. 25, 309.
- Frydman, R.B.; Valasinas, A.; Levy, S. & Frydman, B. (1974), FEBS lett. 38, 134.
- Frydman, B.; Frydman, R.B.; Valasinas, A.; Levy, S. & Feinstein, G. (1976), Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B 273, 137.
- Frydman, R.B.; Levy, E.S.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1978 a), Biochemistry 17 (1), 110.
- Frydman, R.B.; Levy, E.S.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1978 b), Biochemistry 17 (1), 115 .
- Fumagalli, S.A.; Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L. & Batlle, A.M. del C. (1982), Anales Asoc. Quím. Argentina 70, 375.
- Fumagalli, S.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1983), en preparación.
- Heilmeyer, L.; Clotten, R.; Kerp, L.; Merker, H.; Porra, A. & Wetzel, H.P. (1963), Dtsch. med. Wschr. 88, 2449.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975), Ann. N.Y. Acad. Sci. 244, 401.
- Hofstad, F.; Seip, M. & Eriksen, L. (1973), Acta Ped. Scand. 26, 380.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1980), FEBS lett. 112 (1), 86.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1981), Biochem. J. 195, 177.
- Jordan, P.M. & Seehra, J.S. (1979), FEBS lett. 104, 364.
- Jordan, P.M. & Seehra, J.S. (1980), FEBS lett. 114, 283.
- Jordan, P.M. & Shemin, D. (1973), J. Biol. Chem. 248, 1019.
- Jordan, P.M.; Burton, G.; Nordlov, H.; Schneider, M.M.; Pryde, L.M. & Scott, A.L. (1979), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 204.
- Jordan, P.M.; Nordlov, H.; Burton, G. & Scott, I. (1980), FEBS lett. 115 (2), 269.

- Kondo, T.; Kuchiba, K. & Shimizu, Y. (1976 a) 10° Int. Congress Gastr. (Budapest) Abst. p. 481.
- Kondo, T.; Kuchiba, K. & Shimizu, Y. (1976 b), Gastroenterology 70 (6), 1117.
- Koskelo, P.; Toivonen, L. & Adlercreuts, H. (1967), Clin. Chem. 13, 1006.
- Kotler, M.L; Juknat de Geralnik, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1983), en preparación.
- Kreimer- Birnbaum, M. (1975), Anales Asoc. Quím. Argentina 63, 287.
- Levin, E.Y. (1968), Science 161, 907.
- Levin, E.Y. & Coleman, D.L. (1967), J. Biol. Chem. 242, 4248.
- Lockwood, W. & Benson, A. (1960), Biochem. J. 75, 372.
- Lockwood, W. & Rimington, C. (1957), Biochem. J. 67, p. 8.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 a), FEBS lett. 6, 285.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 b), FEBS lett. 9, 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 c), Biochim. Biophys. Acta 220, 552.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 a), Biochem. J. 121, 327.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 b), Biochim. Biophys. Acta 227, 180.
- Llambías, E.B.C.; Locascio, G.A. & Batlle, A.M. del C. (1971), Anales Asoc. Quím. Argentina 59, 271.
- Mathewson, J.H. & Corwin, A.H. (1961), J. Am. Chem. Soc. 83, 135.
- Mayer, U.A. (1973), Enzyme 16, 334.
- Miyagi, K.; Petryka, Z.J.; Bossenmaier, I.; Cardinal, R. & Watson, C.J. (1976), Am. J. Hematol. 1, 3.
- Miyagi, K.; Kaneshima, M.; Kawakami, J.; Nakada, F.; Petryka, Z.J. & Watson, C.J. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (12), 6172.

- Miyagi, K.; Petryka, Z.J.; Kaneshima, M.; Kawakami, J. & Pierach, C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 769.
- Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1976), *Biochem. Med.* 15, 119.
- Piper, W.N. & Tephly, T.R. (1974), *Life Science* 14, 873.
- Piper, W.N. & van Lier, R.B.L. (1977), *Mol. Pharmacol.* 13, 1126.
- Pluscec, J. & Bogorad, L. (1970), *Biochemistry* 9, 4736.
- Pollack, S.E. & Russell, C.S. (1978), *FEBS lett.* 90 (1), 47.
- Radmer, R. & Bogorad, L. (1972), *Biochemistry* 11, 904.
- Rimington, C. & With, T.K. (1973), *Dan. med. Bull.* 20, 5.
- Romeo, G.; Glenn, B.L. & Levin, E.Y. (1970 a), *Biochem. Genet.* 4, 719.
- Romeo, G.; Kaback, M.M. & Levin, E.Y. (1970 b), *Biochem. Genet.* 4, 659.
- Rossetti, M.V. (1978), Tesis de Doctorado en Química (U.B.A.).
- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 277.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 781.
- Rossetti, M.V.; Parera, V.E. & Batlle, A.M. del C. (1976), *Acta Physiol. Latinoam.* 26 (5), 371.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Russell, C.S. & Pollack, S.E. (1978), *J. of Chromat.* 166, 632.
- Russell, C.S. & Rockwell, P. (1980), *FEBS lett.* 116 (2), 99.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969 a), *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969 b), *FEBS lett.* 3, 223.
- Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976), *Acta Physiol. Latinoam.* 26 (5), 379.

- Scott, A.I.; Ho, K.S.; Kajiwara, M. & Takahashi, T. (1976), J. Am. Chem. Soc. 98 (6), 1589.
- Schultz, J.H. (1874), Inaugural Dissertation, Greifswald.
- Seehra, J.S. & Jordan, P.M. (1980), J. Am. Chem. Soc. 102, 6841.
- Shimizu, Y.; Kondo, T.; Kuchiba, K. & Urata, G. (1977), J. Lab. Clin. Med. 89, 517.
- Stella, A.M.; Parera, V.E.; Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971), Biochim. Biophys. Acta 252, 481.
- Stevens, E.; Frydman, R.B. & Frydman, B. (1968), Biochim. Biophys. Acta 158, 496.
- Strand, L.J.; Felsher, B.F.; Redecker, A.G. & Marver, H.S. (1970), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1315.
- Tephly, T.R. (1975), Porphyrins in Human Diseases. Report of the discussiones, p. 128.
- Valasinas, A.; Frydman, R.B.; Díaz, L. & Frydman, B. (1978), XIV Reunión Nacional de la SAIB. Abstract D-26
- Watson, C.J.; Runge, W.; Raddeimi, L.; Bossenmaier, I. & Cardinal, R. (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 52, 478.
- Williams, D.C.; Morgan, G.S.; Mc Donald, E. & Battersby, A. R. (1981), Biochem. J. 193, 301.
- Wolkoff, A.W.; Cohen, L. & Arias, I. (1973), N. Engl. J. Med. 288, 1.

CAPITULO VIII

DECARBOXILASA

VIII.1. Propiedades y mecanismo

VIII.2. Porfirias hepáticas

VIII.2.1. Porfiria Cutánea Tardía (PCT)

VIII. DECARBOXILASA

VIII. 1. Propiedades y mecanismo

La Decarboxilasa o Uroporfirinógeno-carboxilasa cataliza la conversión del Uroporfirinógeno III en Coproporfirinógeno III (Figura 3.1.). Esta reacción implica la decarboxilación de las cuatro cadenas laterales del ácido acético del sustrato dando origen a los cuatro restos metilo del producto.

Se ha sugerido que este proceso ocurriría en etapas (Batlle y Grinstein, 1962, 1964 b) debido a la detección de intermediarios de 7, 6 y 5 carboxilos. Sin embargo, hasta el presente sólo se ha logrado aislar una única proteína responsable de esta reacción (Batlle, 1973). Elder (1982) purificó la decarboxilasa de eritrocitos humanos; ésta estaría constituida por una única proteína formada por dos subunidades, sugiriéndose que existirían dos clases de sitios catalíticos por molécula de enzima.

Numerosos hechos experimentales apoyan la teoría de que la decarboxilación constituye un proceso secuencial. Durante la formación enzimática del coproporfirinógeno *in vitro* se ha detectado la presencia de intermediarios normales de 7,6 y 5 carboxilos a partir de precursores simples (Batlle y Grinstein, 1964 a, b; Falk et al, 1956; Hoare y Heath, 1959; Lascelles, 1956; Mauzerall y Granick, 1958). Asimismo, en ciertos estados patológicos se ha observado acumulación de estos intermediarios principalmente en pacientes con porfiria cutánea tardía (PCT) (Canivet y Rimington, 1953).

Todas estas evidencias llevaron a postular que los porfirinógenos de 7, 6 y 5 carboxilos serían los intermediarios normales en el camino biosintético del hemo (Batlle y Grinstein, 1962; San Martín de Viale y Grinstein, 1968).

La decarboxilasa actúa también, aunque con menor velocidad, sobre el uroporfirinógeno I para dar origen al coproporfirinógeno I. Esto implica, que es una enzima específica para los restos acético pero no para el tipo isomérico. De todos modos, existe un grado de selectividad ya que la velocidad de decarboxilación varía de acuerdo con el tipo isomérico, habiéndose observado el siguiente orden en forma decreciente III > IV > II > I (Mauzerall y Granick, 1958). Así, en glóbulos rojos humanos

la velocidad de decarboxilación del isómero III es siete veces mayor que la del isómero I (Conford, 1964). Además, hay que destacar que esta enzima puede actuar también sobre los distintos isómeros de los demás porfirinógenos con 7, 6 y 5 carboxilos.

La uroporfirinógeno decarboxilasa es una enzima citoplasmática, preferentemente anaeróbica. El oxígeno inhibe la reacción, probablemente por oxidación de los sustratos porfirinógenos (Mauzerall y Granick, 1958), aunque no puede descartarse la posibilidad de una acción directa del oxígeno sobre la enzima. De todos modos, se ha ensayado su actividad en anaerobiosis (Bogorad, 1958; Hoare y Heath, 1958 b; Mauzerall y Granick, 1958; Tomio et al, 1970) y en aerobiosis (Batlle y Grinstein, 1964 b; San Martín de Viale y Grinstein, 1968; Tomio et al, 1970).

La decarboxilasa es una enzima termosensible (Romeo y Levin, 1971; Tomio et al, 1970) y presenta características sulfhidrúlicas. El glutatión GSH y el β -mercaptoetanol la activan aunque la cisteína (CISH) en iguales condiciones la inhibe (Tomio et al, 1970). Lógicamente, los metales pesados, la iodoacetamida, el PCMB y el DTNB producen inhibición de su actividad (Hoare y Heath, 1958 a; Romeo y Levin, 1971). Los cationes univalentes también originan el mismo efecto sobre la enzima proveniente de eritrocitos humanos y de aves (Batlle, 1973; Conford, 1964).

En cuanto al mecanismo de la decarboxilación del resto acetato a metilo, aún se desconoce, aunque existen ciertos avances en este sentido (Smith y Francis, 1981). Sin embargo, se ha logrado establecer cuál es la ruta fisiológica de decarboxilación del urogen III a coprogen III (Jackson et al, 1976). Por sucesivas decarboxilaciones de las cuatro cadenas acetato existen teóricamente 24 posibles secuencias a través de 14 intermedios (4 porfirinas heptacarboxílicas, 6 hexacarboxílicas y 4 pentacarboxílicas). Mediante la síntesis química de estos 14 derivados, su decarboxilación enzimática *in vitro* y el análisis de los productos formados, Jackson et al (1976) confirmaron que la decarboxilación era un proceso secuencial en el cual el sustrato ubicado en el sitio activo de la enzima se desplazaría sobre la superficie de la misma, siguiendo el sentido de las agujas del reloj, iniciándose la reacción en el anillo D y

continuando luego con los anillos A, B y C, (Figura 8.1.).

En contraste con esta ruta ordenada para la serie isomé-rica III, la decarboxilasa actúa sobre el urogen I transformán-dolo en coprogen I por cualquiera de las dos rutas posibles, ocurriendo el proceso por un camino no específico (Figura 8.2.) (Jackson et al, 1977).

VIII.2. Porfirias hepáticas

VIII.2.1. Porfiria cutánea tardía (PCT)

Se ha observado que en orina de pacientes con PCT se encuentran cantidades elevadas de porfirinas, especialmente uro y firiaporfirina.

En base a observaciones de la acumulación en hígado y de la excreción aumentada de las porfirinas hepta y octacarboxí-licas y en menor grado, las de 6 y 5 carboxilos, Doss et al (1971) postularon una deficiencia a nivel de la urogen decarbo-xilasa (Figura 8.3.).

Esta hipótesis fue confirmada por Kushner et al (1976) quienes hallaron una actividad reducida de la enzima en un 50% en hígado y eritrocitos de pacientes con PCT.

Otros autores no pudieron corroborar los resultados de Kushner en eritrocitos (Blekkenhorst et al, 1976). Sin embargo, el grupo de Verneuil (1978) encontró actividades reducidas un 50% o normales, al estudiar 3 generaciones de varias familias. Aparentemente esto sugeriría que pueden existir dos formas de PCT, una con una deficiencia enzimática determinada genéticamen-te y otra adquirida, que presenta una actividad de urogendecarboxilasa normal en eritrocitos.

Llevando a cabo estudios comparativos de la biosíntesis de porfirinas *in vitro* a partir de ALA y PBG, en distintos individuos normales, pacientes con PCT y otros tipos de porfiri se han obtenido datos adicionales acerca de la naturaleza here-ditaria o no de esta porfiria (Batlle et al, 1979; Magnin et al 1982). Los resultados observados han sugerido que estudios de esta naturaleza permiten obtener datos adicionales para confir-mar el diagnóstico (Parera et al, 1980).

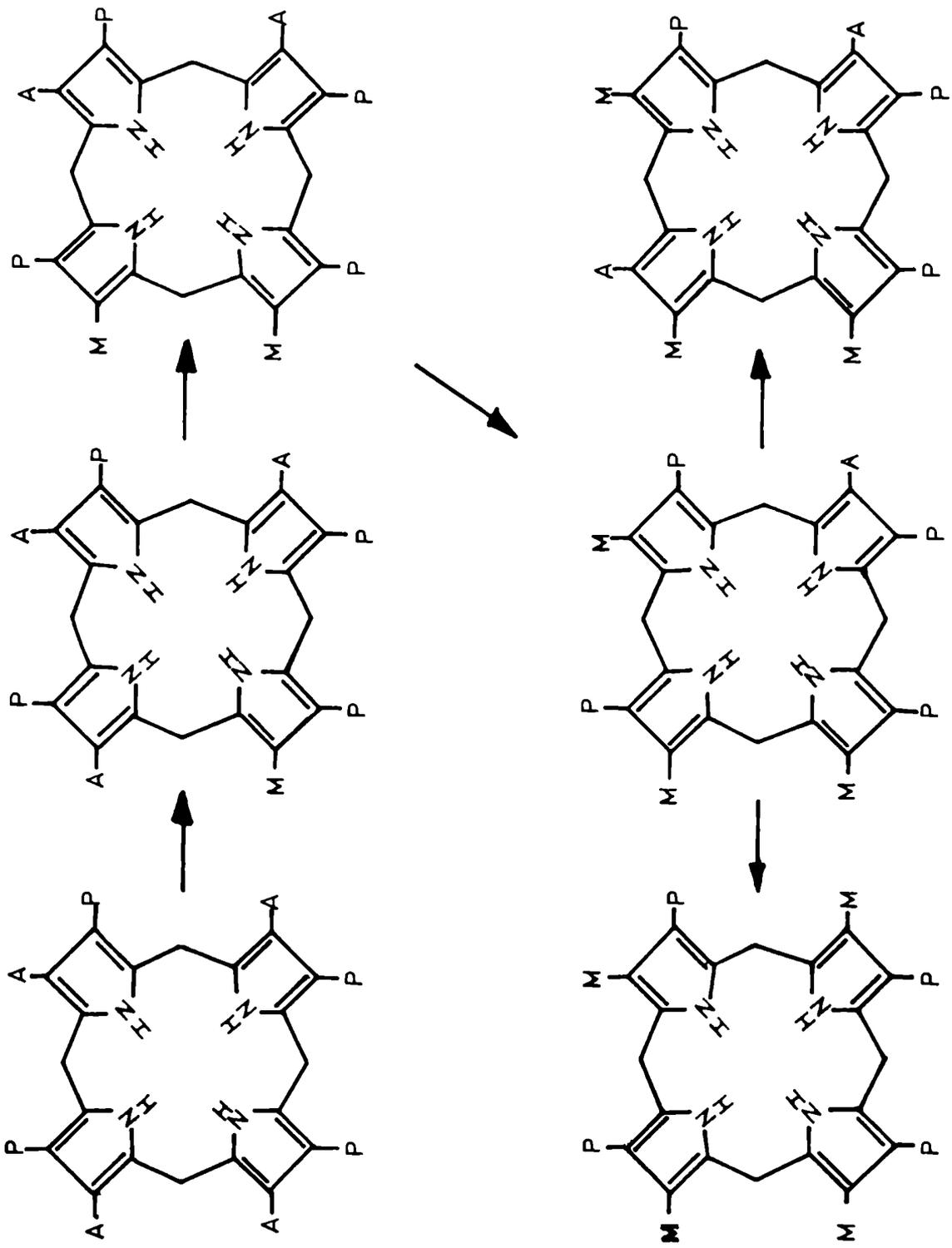


FIGURA 8.1.: Decarboxilación enzimática del Uroporfirinógeno III

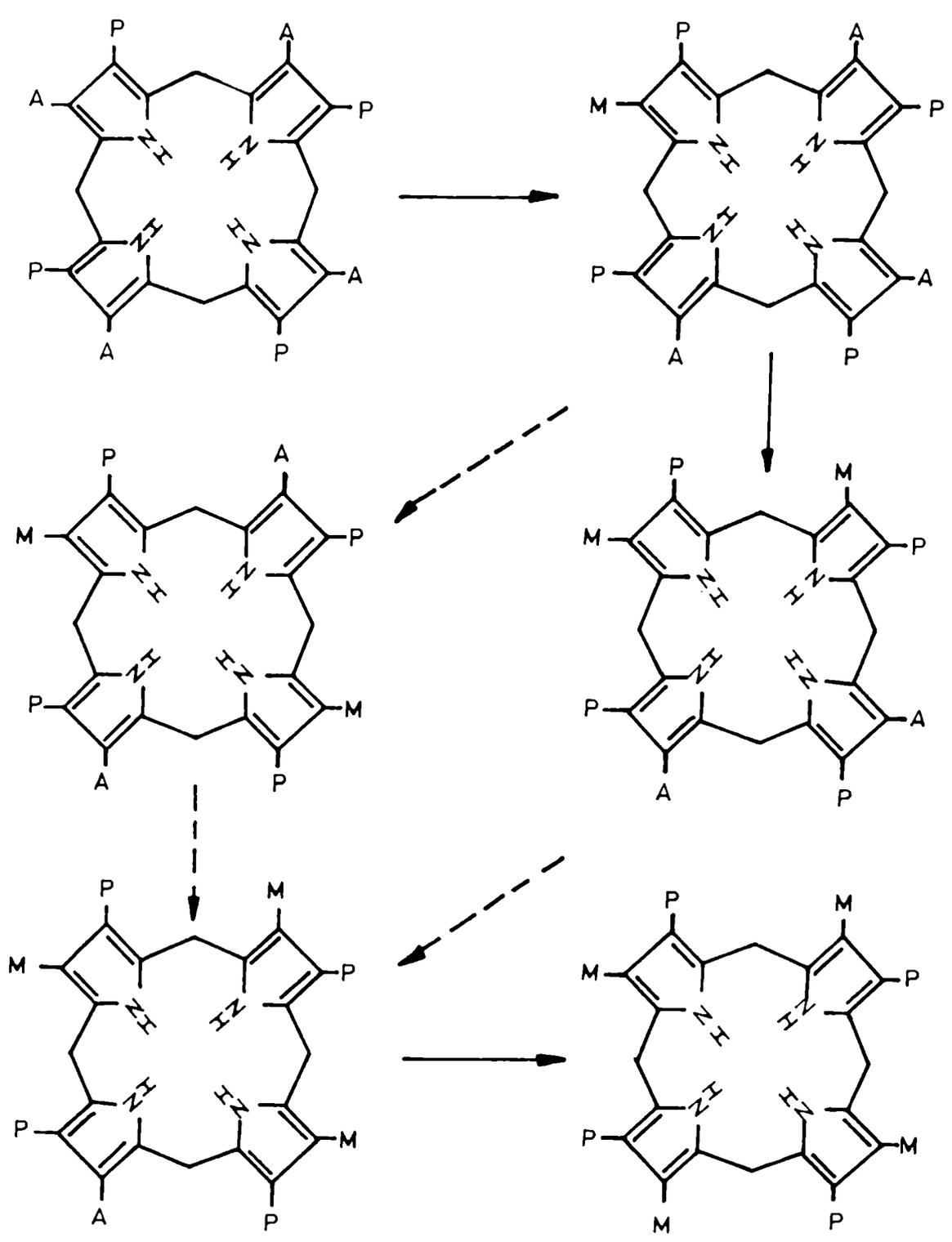


FIGURA 8.2.: Decarboxilación enzimática del Uroporfirinógeno I en Coproporfirinógeno I

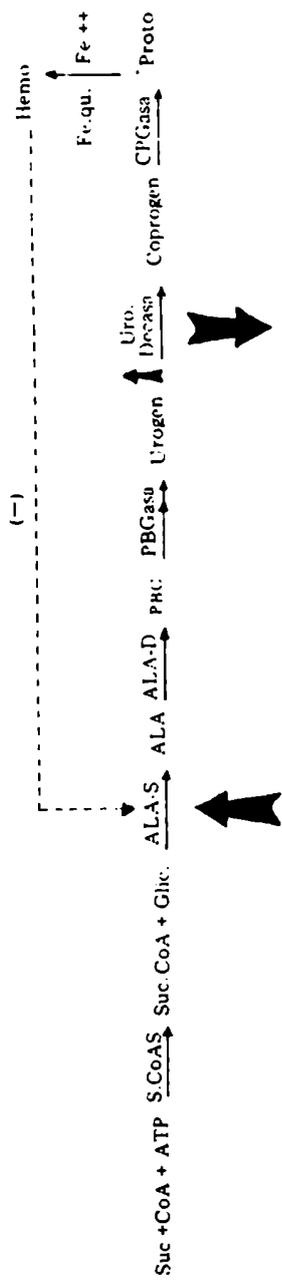


FIGURA 8.3.: Esquema propuesto para explicar el cuadro bioquímico característico de una Porfiria Cutánea Tarda sintomática

La deficiencia enzimática primaria a nivel de la decarboxilasa en PCT lleva a un aumento secundario de la actividad de la enzima limitante (ALA-S) por de-represión, con lo cual se produce un patrón anormal de porfirinas durante la biosíntesis del hemo.

Por otro lado, la intoxicación crónica con policlorados como por ejemplo el hexaclorobenceno, provoca en humanos y en animales (modelo experimental) un tipo de porfiria con sintomatología clínica y bioquímica similar a la observada en la PCT.

Existe actualmente abundante información acerca de la PCT así como también de su modelo experimental, en relación con la actividad y las propiedades de la decarboxilasa, siendo los trabajos de Elder (1976) y Strik y Koeman (1970) los más completos.

REFERENCIAS

- Batlle, A.M. del C. (1973), *Bioquímica Clínica* 7, 309.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 62, 197.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964 a), *Biochim. Biophys. Acta* 82, 1.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964 b), *Biochim. Biophys. Acta* 82, 13.
- Batlle, A.M. del C.; Wider de Xifra, E.A.; Stella, A.M.; Bustos, N.; Vázquez, E. & Magnin, P.H. (1979), *Rev. Arg. Dermat.* 60, 101.
- Blekkenhorst, G.H.; Pimpstone, N.; Webber, B.L. & Eales, L. (1976), *Ann. Clin. Res.* 8, 108.
- Bogorad, L. (1958), *J. Biol. Chem.* 233, 516.
- Canivet, C. & Rimington, C. (1953), *Biochem. J.* 55, 867.
- Conford, P. (1964), *Biochem. J.* 91, 64.
- Doss, M.; Meinhof, N.; Look, D.; Henning, H.; Nawrocki, P.; Dolle, W.; Strohmeyer, G. & Fillipini, L. (1971), *South Afr. J. Lab. Clin. Med.* 17, 50.
- Elder, G. (1976), *Essays Med. Biochem.* 2, 75.
- Elder, G. (1982), Abstracts VIIIth Tetrapyrrole Meeting, Southampton.
- Falk, J.E.; Dresel, E.I.B.; Benson, A. & Knight, B. (1956), *Biochem. J.* 63, 87.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1958 a), *Biochem. J.* 69, 51 P.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1958 b), *Nature* 181, 1592.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1959), *Biochem. J.* 73, 679.
- Jackson, A.H.; Nagaraja Rao, K.R.; Supphayen, D.M. & Smith, S.G. (1977), *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 696.
- Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Elder, G.H. & Smith, S.G. (1976), *Phil. Trans. R. Soc. London* 273, 191.

- Kushner, J.P.; Barbuto, A.J. & Lee, G.R. (1976), J. Clin. Invest. 58, 1089.
- Lascelles, J. (1956), Biochem. J. 62, 78.
- Magnin, P.H.; Wider de Xifra, E.A.; Lenczner, M.; Stella, A.M & Batlle, A.M. del C. (1982), Int. J. Dermatolog. 21 (3), 142
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958), J. Biol. Chem. 232, 1141.
- Parera, V.E.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A.; Fukuda, H. & Batlle, A.M. del C. (1980), Int. J. Biochem. 12, 947.
- Romeo, G. & Levin, E. (1971), Biochim. Biophys. Acta 230, 330
- San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1968), Biochim. Biophys. Acta 158, 79.
- Smith, A.G. & Francis, J.E. (1981), Biochem. J. 195, 241.
- Strik, J. & Koeman, J.H. (1979), "Chemical Porphyria in Man", Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Tomio, J.M.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1970), Biochim. Biophys. Acta 198, 353.
- Verneuil, H. de; Nordmann, Y.; Phung, N.; Grandchamp, B.; Aitken, G.; Grellet, M. & Noire, J. (1978), Int. J. Biochem. 9, 927.

COPROPORFIRINOGENASA

IX.1. Propiedades y mecanismo

IX.2. Porfirias adquiridas

IX.2.1. Intoxicación con plomo

IX.3. Porfirias hepáticas

IX.3.1. Coproporfiria hereditaria (CPH)

IX.4. Porfirias eritropoyéticas

IX.4.1. Coproporfiria eritropoyética congénita

IX. COPROPORFIRINOGENASA

IX.1. Propiedades y Mecanismo

La coproporfirinogenasa (CPG-asa) (Batlle et al, 1965) o coprogenasa o coproporfirinógeno-oxidasa cataliza la conversión del coproporfirinógeno III en protoporfirinógeno IX (Figura 3.1.). Esta reacción involucra la decarboxilación oxidativa de los dos restos propionato ubicados en los anillos A y B del coprogen III, a dos restos vinilo, con eliminación de dos moléculas de CO₂ y dos de hidrógeno.

La coprogenasa es una enzima altamente específica para el coprogen III, por lo cual sólo se encuentra la protoporfirina IX en la naturaleza. No utiliza el coprogen I ni el coprogen II como sustratos, aunque *in vitro* puede emplear el isómero IV, producto de síntesis no encontrado en sistemas biológicos, dando origen así a la protoporfirina XIII (Al-Hazimi et al, 1976).

En todos los tejidos estudiados la CPG-asa es una enzima mitocondrial (Batlle et al, 1965; Granick y Mauzerall, 1958; Porra y Falk, 1964; Rimington y Tooth, 1961; Sano y Granick, 1961) y en eucariotas, tiene un requerimiento absoluto por el oxígeno molecular (Falk et al, 1953), el cual actuaría como aceptor de hidrógenos no pudiendo ser reemplazado por otros oxidantes. En ciertos organismos estrictamente anaeróbicos existe necesariamente algún otro mecanismo que conduzca a la formación del protogen IX (Mori y Sano, 1968). Tait (1969, 1972) propuso que en *Rp. sphaeroides* el aceptor de hidrógenos estaría constituido por ATP, L-metionina y Mg⁺⁺.

En base a la determinación de las estructuras de las porfirinas halladas en materiales biológicos y a la síntesis química de posibles intermediarios de esta reacción, se han postulado varios mecanismos para explicar la acción de esta enzima.

Tomio y Grinstein (1968) detectaron por primera vez una porfirina tricarbóxilica en glándula de Harder, por lo cual se la denominó harderoporfirina, siendo confirmada su estructura por síntesis química por Kennedy et al (1970 a,b). Este intermediario constituye un derivado de la coproporfirina III, en el cual el resto propiónico de la posición 2 del anillo A se encuentra sustituido por un vinilo (Kennedy et al, 1970 a, b).

La decarboxilación oxidativa de los restos propionato sería también un proceso en etapas y comenzaría por el anillo A. Games et al (1976), confirmaron esta hipótesis empleando análogos sintéticos. De esta manera, la CPG-asa actuaría siguiendo el sentido de las agujas del reloj (Figura 9.1.).

Rimington y Tooth (1961) postularon que una acrílico porfirina podría ser el intermediario de esta reacción. Sin embargo, se observó que el trans 2-4-diacrílico porfirinógeno no actuaba como sustrato (Batlle y Rimington, 1966; Sano y Granick, 1961), aunque existía la posibilidad de que el verdadero intermediario fuera el isómero CIS (Batlle et al, 1965).

French et al (1970) aislaron de materiales biológicos, la porfirina S-411, cuya estructura correspondía a una porfirina tricarboxílica derivada de la coproporfirina III, con un sustituyente cis-acrilato en la posición 2 del anillo A, lo cual estaría apoyando la teoría anterior.

Batlle y Rimington (1966) propusieron que la primera etapa de esta reacción sería la oxidación del resto propionato a un α -hidroxipropionato (Figura 9.2.).

Sano (1966) sintetizó una mezcla de isómeros de este compuesto, comprobando su incorporación en el protogen por acción de la CPG-asa proveniente de extractos mitocondriales de hígado bovino.

Estudios efectuados por Zaman et al (1972) empleando precursores marcados indicaron que la porfirina S-411 no sería un intermediario normal en esta etapa. Sin embargo, Jackson et al (1976) interpretaron estos resultados sugiriendo que dicha porfirina provendría de un camino anormal y que el α -hidroxipropionil derivado podría eliminar agua y decarboxilarse paralelamente a vinilo.

Sin embargo, no puede descartarse aún la posibilidad de que bajo control enzimático, ocurra *in vivo* la ruta planteada en la Figura 9.2.

Existen también otros trabajos sobre este tema, que tratan de aclarar algunos aspectos del mecanismo estudiando la estereoquímica de la reacción (Battersby et al, 1975; Zaman y Akhtar, 1976).

En recientes estudios (Jackson et al, 1980) utilizando

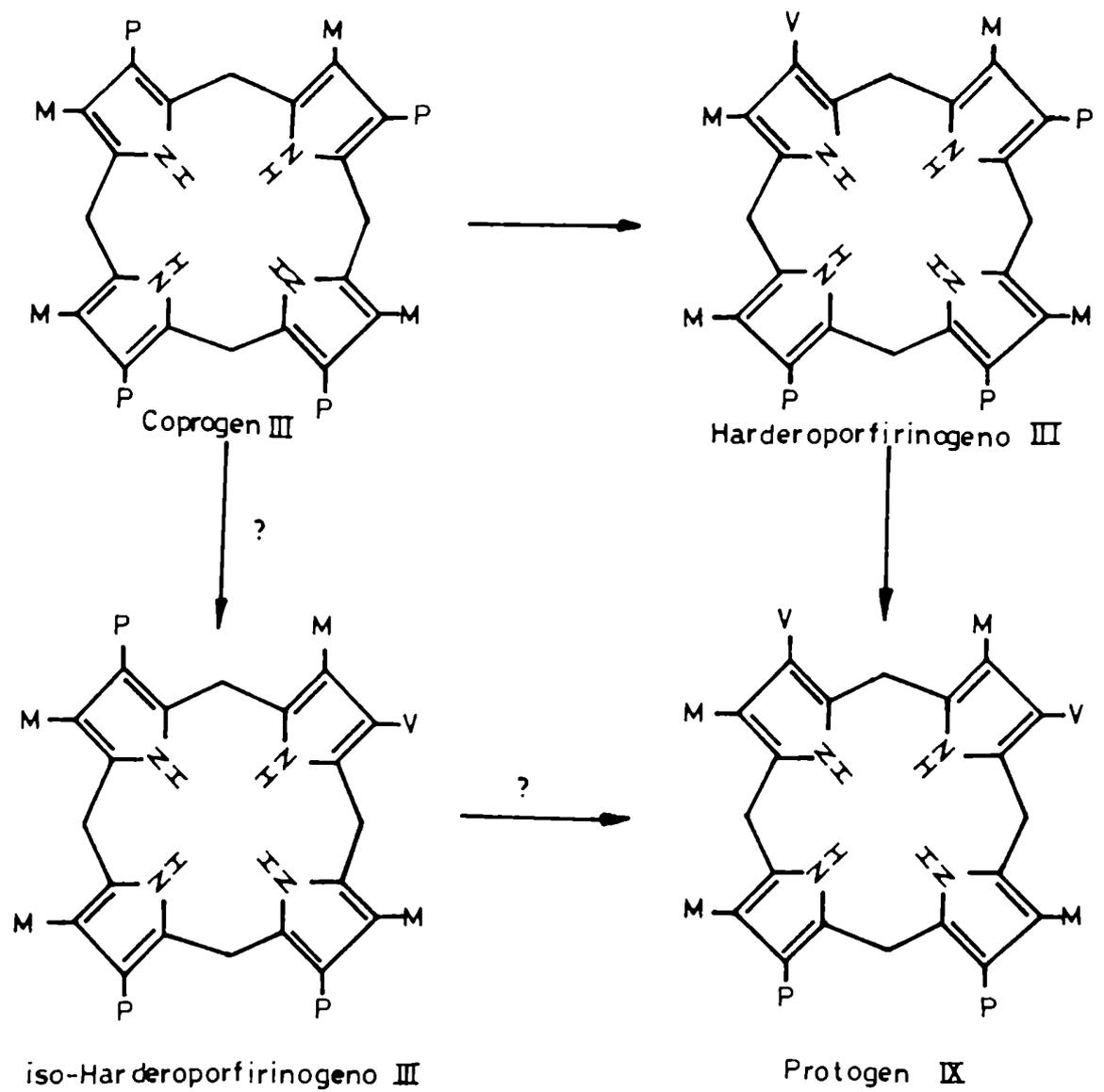


FIGURA 9.1.: Decarboxilación oxidativa del Coproporfirinógeno

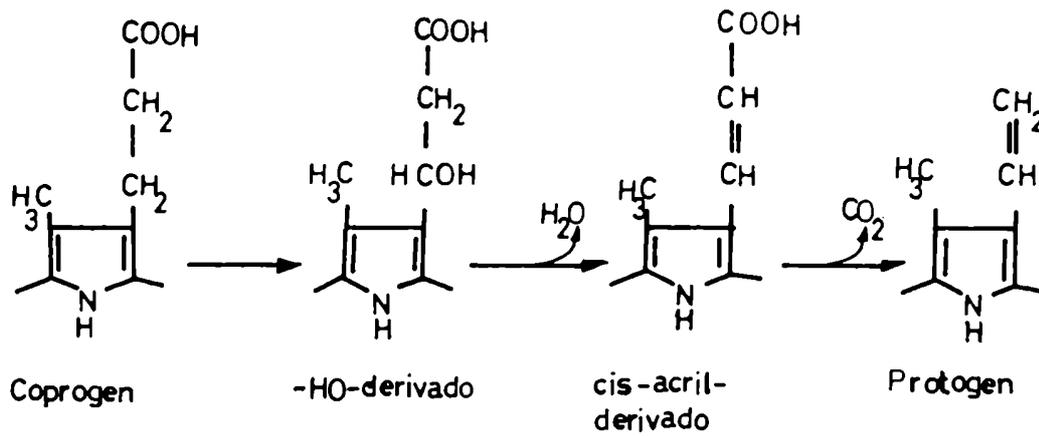


FIGURA 9.2.: Mecanismo de decarboxilación del Coproporfirínógeno III en Protoporfirínógeno IX

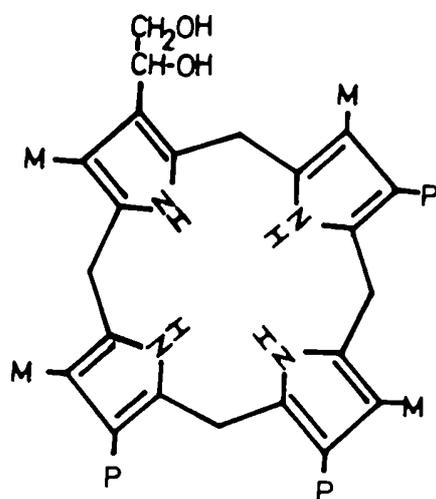


FIGURA 9.3.: Porfirinógeno hidroxipropiónico

hemolizados de eritrocitos de pollo y mitocondrias de hígado de rata como fuentes de CPG-asa se sugirió que el intermediario anterior al harderoporfirinógeno sería un porfirinógeno hidroxipropiónico (Figura 9.3.).

IX.2. Porfirias adquiridas

IX.2.1. Intoxicación con plomo

La elevada excreción urinaria de ALA y coproporfirina III constituye una de las características bioquímicas más importantes en los pacientes intoxicados con plomo. Esto estaría sugiriendo una inhibición de las enzimas ALA-D (ítem VII.2.1.) y CPG-asa (Figura 6.2.), hallándose también afectadas el ALA-S y la ferroquelatasa (Batlle et al, 1981).

IX.3. Porfirias hepáticas

IX.3.1. Coproporfirina hereditaria (CPH)

Elder et al (1976) y Grandchamp et al (1977) confirmaron que la deficiencia enzimática primaria de esta porfiria se halla ba a nivel de la enzima CPG-asa (Figura 9.4.).

Ambos grupos de trabajo demostraron que la actividad de esta proteína se encontraba reducida en un 50% en pacientes con CPH clínicamente manifiesta y en portadores del defecto genético, con respecto a controles normales.

La presencia de esta deficiencia enzimática explica claramente la acumulación y excreción aumentada de coproporfirina III, la limitación en la concentración de hemo y la activación secundaria del ALA-S por de-represión.

IX.4. Porfirias eritropoyéticas

IX.4.1. Coproporfirina eritropoyética congénita

Esta porfiria se caracteriza por trastornos de fotosensibilización con un aumento de la coproporfirina III en glóbulos

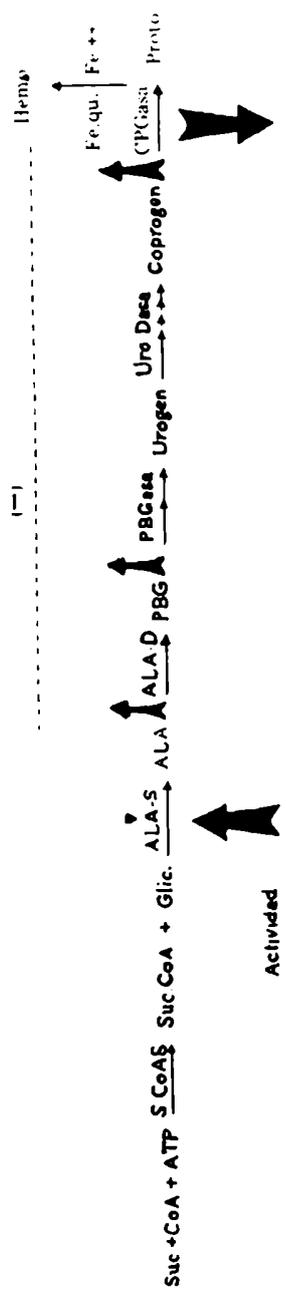


FIGURA 9.4.: Relación entre la deficiencia de Coproporfirinogenasa y el incremento de ALA-S en Coproporfiria hereditaria

rojos.

En pacientes con este trastorno se ha observado un incremento de hasta 100 veces sobre los niveles normales de coproporfirina III, debido a una deficiencia en la CPG-asa.

REFERENCIAS

- Al-Hazimi, H.; Jackson, A.H. & Ryder, D. (1976), J. Chem. Soc. Chem. Comm. 188.
- Batlle, A.M. del C. & Rimington, C. (1966), Ciencia e Investigación 22, 369.
- Batlle, A.M. del C.; Benson, A. & Rimington, C. (1965), Biochem. J. 97, 731.
- Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981), Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento. Editorial Eudeba.
- Battersby, A.R.; Mc Donald, E.; Wurziger, H.K. W. & James, K. J. (1975), J. Chem. Soc. Chem. Comm., 493.
- Elder, G.H.; Evans, J.D.; Thomas, N.; Cox, R.; Brodie, M.J.; Moore, M.D.; Goldberg, A. & Nicholson, D.C. (1976), Lancet 2, 1217.
- Falk, J.; Dresel, E. & Rimington, C. (1953), Nature 172, 292.
- French, J.; Nicholson, D. & Rimington, C. (1970), Biochem. J. 120, 393.
- Games, G.; Jackson, A.H. & Jackson, J. (1976), J. Chem. Soc. Chem. Comm., 187.
- Grandchamp, B.; Phung, N.; Greller, M.; de Verneuil, H.; Noire, J.; Ohnet, J.P. & Nordmann, Y. (1977), Nouv. Presse Med. 6, 1537.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958), Fed. Proc. 17, 233.
- Jackson, A.H.; Jones, D.M.; Philip, G.; Lash, T.D.; Batlle, A.M. del C. & Smith, S.G. (1980), Int. J. Biochem. 12, 681.
- Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Elder, G.H. & Smith, S.G. (1976), Phil. Trans. R. Soc. London B. 273, 191.
- Kennedy, G.; Jackson, A.H.; Kenner, G. & Suckling, G. (1970 a) FEBS Letters 6, 9.
- Kennedy, G.; Jackson, A.H.; Kenner, G. & Suckling, G. (1970 b), FEBS Letters 7, 205.
- Mori, M. & Sano, S. (1968), Biochim. Biophys. Res. Commun. 32, 610.

- Porra, R. & Falk, J. (1964), *Biochem. J.* 90, 69.
- Rimington, C. & Tooth, B. (1961), *J. Biochem. (Tokyo)* 49, 456.
- Sano, S. (1966), *J. Biol. Chem.* 241, 5276.
- Sano, S. & Granick, S. (1961), *J. Biol. Chem.* 236, 1173.
- Tait, G. (1969), *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 37, 116.
- Tait, G. (1972), *Biochem. J.* 128, 1159.
- Tomio, J. & Grinstein, M. (1968), *Eur. J. Biochem.* 6, 80.
- Zaman, Z. & Akhtar, M. (1976), *Eur. J. Biochem.* 61, 215.
- Zaman, Z.; Abboud, M. & Akhtar, M. (1972), *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1263.

CAPITULO X

PROTOPORFIRINOGENO-OXIDASA. FERROQUELATASA

X.1. Protogen-oxidasa

X.1.1. Propiedades y mecanismo

X.1.2. Porfirias hepáticas

X.1.2.1. Porfiria variegata (PV)

X.2. Ferroquelatasa

X.2.1. Propiedades

X.2.2. Porfirias eritropoyéticas

X.2.2.1. Protoporfiria eritropoyética (PPE)

X.2.3. Porfirias adquiridas

X.2.3.1. Intoxicación con plomo

X. PROTOPORFIRINOGENO-OXIDASA. FERROQUELATASA

X.1. Protogen-oxidasa

X.1.1. Propiedades y mecanismo

La protoporfirinógeno-oxidasa o protogen-oxidasa cataliza la deshidrogenación del protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX con pérdida de 6 átomos de hidrógeno.

Labbe et al (1967) informaron acerca de la presencia de un pigmento en *S. cerevisiae*, cuyo espectro de absorción y reacciones químicas correspondían a una tetrahidroporfirina. Se propuso entonces que ésta podía provenir de la reducción de la protoporfirina IX o de la autooxidación del protogen IX.

Poulson y Polglase (1973) postularon que dicho pigmento denominado P-503, por presentar una banda típica de absorción en el espectro visible a 503 nm, constituía un posible intermediario en la biosíntesis de la protoporfirina IX. El pigmento P-503 ha sido encontrado también en *Escherichia coli* (Olden y Hempfling, 1973).

Kamitakahara et al (1973) identificaron al P-503 como una prototetrahidroporfirina IX, mientras que Poulson y Polglase (1975) extrajeron y purificaron la enzima de *S. cerevisiae*. El agregado de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo de esta levadura produce la acumulación de P-503 y de Protogen IX, lo cual indicaría una inhibición o una deficiencia a nivel de la protogen-oxidasa (Poulson, 1976; Poulson y Polglase, 1974).

La protogen-oxidasa es una enzima mitocondrial, de naturaleza sulfhidrónica que no utiliza al coprogen I ni al III, como tampoco al urogen I ó III como sustratos. Con respecto al mecanismo de acción de esta enzima, éste aún no está totalmente dilucidado. Sin embargo, Jackson et al (1974) y Smith et al (1976) demostraron que el proceso de oxidación llevado a cabo por la protogen-oxidasa es estereoespecífico.

X.1.2. Porfirias hepáticas

X.1.2.1. Porfiria variegata (PV)

La porfiria variegata presenta numerosas semejanzas con la PAI en su fase aguda, considerando los síntomas neurológicos y psíquicos, relacionados con una elevada excreción de ALA y PBG en orina (Becker y Kramer, 1977) y con la PCT.

En la PV, la coproporfirina y un complejo protoporfirina-dipéptido (porfirina X) (Rimington et al, 1968), así como también la protoporfirina se excretan en cantidades significativas en materia fecal.

Se ha demostrado que el ALA-S se encuentra aumentada (Moore et al, 1980) en pacientes con PV, y en cuanto a la deficiencia enzimática primaria causante de esta porfiria, algunos autores habían postulado un bloqueo a nivel de la ferroquelatasa (Becker et al, 1977; Viljoen et al, 1979).

Becker et al (1977) atribuyeron la actividad reducida de la ferroquelatasa en pacientes con PV a una mutación en el gen estructural dominante lo cual daría origen a una ferroquelatasa inactiva.

En 1976, Smith et al propusieron que la falla podría ubicarse en la etapa de la oxidación a protoporfirina IX, teoría que ha sido finalmente apoyada por evidencias experimentales del grupo de trabajo de Nordmann (Deybach et al, 1981).

X.2. Ferroquelatasa

X.2.1. Propiedades

La ferroquelatasa (Rimington, 1958) o hemo sintetasa o proto-hemo-ferroliasa es la enzima que cataliza la inserción del hierro ferroso en el anillo de la protoporfirina IX.

Es una enzima particulada que se encuentra en las mitocondrias de células animales, en los cloroplastos de vegetales y en los cromatóforos de las bacterias fotosintéticas. Mc Kay et al (1969) la hallaron fuertemente asociada a la membrana interna de la mitocondria de hígado de rata.

Si bien todavía no se ha demostrado la participación de cofactores en esta reacción, Labbe (1976) propuso que la ferroquelatasa requeriría fosfato de piridoxal para su actividad, aunque se desconoce aún su mecanismo.

La ferroquelatasa es una enzima absolutamente específica para el hierro (Labbe y Hubbard, 1961; Yoneyama et al, 1962), pudiendo utilizar como sustratos la protoporfirina IX, así como otras porfirinas (meso y deuteroporfirina) (Porra y Jones, 1963 b) pero no sus porfirinógenos o las porfirinas parcialmente reducidas (Labbe et al, 1968; Porra y Jones, 1963 a).

Se ha propuesto entonces que la enzima poseería dos sitios activos: uno para el metal y el otro para la porfirina (Nishida y Labbe, 1959).

La ferroquelatasa es una lipoproteína (Mazanowska et al, 1969) ya que se ha encontrado que el agregado de los solventes orgánicos aumenta su actividad (Mazanowska et al, 1966), posiblemente facilitando el acceso del sustrato al sitio activo. Takeshita et al (1970) postularon que un fosfolípido cargado participaría en la activación de la enzima. Es una enzima sulfhidrática; el glutatión reducido estimula su actividad mientras que ciertos cationes divalentes como el manganeso y el plomo la inhiben significativamente. Este último efecto se observó también por acción del oxígeno (Porra y Jones, 1963 a).

X.2.2. Porfirias eritropoyéticas

X.2.2.1. Protoporfiria eritropoyética (PPE)

En la PPE, la deficiencia enzimática se halla localizada a nivel de la hemo sintetasa (Figura 10.1.) (Bonkowsky et al, 1975; Bottomley et al, 1975). Es una porfiria hereditaria que se transmite con carácter autosómico dominante. A pesar de dicho defecto enzimático, se forman cantidades menores pero suficientes de hemo como para una síntesis adecuada de hemoglobina, existiendo un aumento secundario de la actividad del ALA-S (Schwartz et al, 1971). Sin embargo a partir del estudio de pacientes con PPE se ha demostrado dicha deficiencia de ferroquelatasa, pero se han encontrado valores normales de ALA-S (Stella et al, 1981).

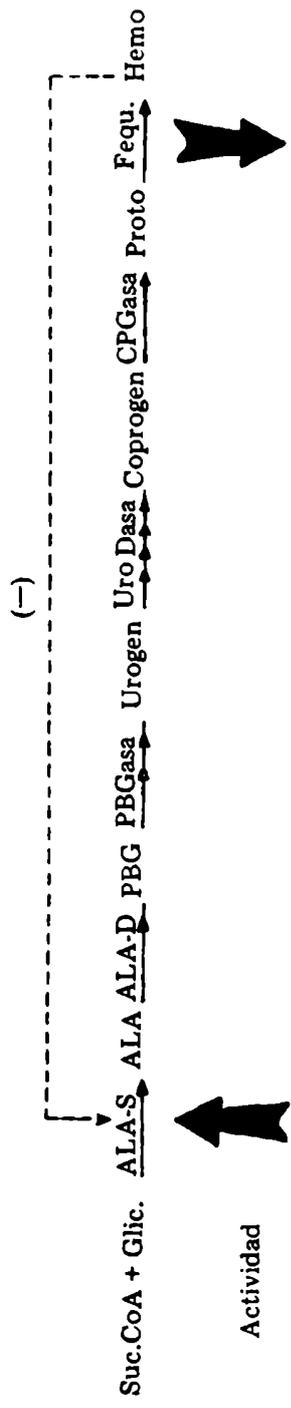


FIGURA 10.1.: Relación entre la deficiencia enzimática primaria de Ferroquelatasa y el aumento de ALA-S en Protoporfiria Eritropoyética

Becker et al (1977) atribuyeron una actividad reducida de ferroquelatasa en pacientes con PPE, a una mutación genética la cual originaba una enzima funcionalmente diferente.

En sujetos normales y en pacientes deficientes en hierro o intoxicados con plomo, el exceso de protoporfirina en glóbulos rojos se une al Zn enzimáticamente (Piomelli et al, 1975). Aparentemente, en pacientes con PPE la presencia de una ferroquelatasa modificada con una actividad disminuída produciría una acumulación de protoporfirina (Kramer y Viljoen, 1980). Esta difunde de los glóbulos rojos y da origen a los problemas dermatológicos típicos de una PPE.

X.2.3. Porfirias adquiridas

X.2.3.1. Intoxicación con plomo

Una de las manifestaciones bioquímicas típicas de una intoxicación con plomo es la aumentada excreción de ALA y coproporfirina III en orina (ítem IX.2.1.). Se ha apreciado también una estrecha relación entre las concentraciones de plomo y de protoporfirina en sangre, de manera tal que se ha enfatizado acerca de la eficiencia de la medición de la protoporfirina en eritrocitos como otro parámetro útil para detectar la intoxicación por plomo (Sassa et al, 1975). En este caso, la protoporfirina se acumula dentro de los glóbulos rojos, a diferencia de lo que sucede en la PPE. Debido a dicha retención dentro del eritrocito, los pacientes intoxicados con plomo no son fotosensibles (Piomelli et al, 1975).

Goldberg (1968) sugirió que esta acumulación de protoporfirina en eritrocitos se debería a una inhibición de la ferroquelatasa (Figura 6.2.).

Moore et al (1975) encontraron disminuída la actividad de esta enzima en hígado y músculo cardíaco de ratas intoxicadas con plomo.

Como se puede observar, existen otras enzimas además del ALA-D, afectadas por la presencia del plomo.

REFERENCIAS

- Becker, D.M. & Kramer, S. (1977), *Medicine* 56, 411.
- Becker, D.M.; Viljoen, J.D.; Katz, J. & Kramer, S. (1977), *Am. J. Hemat.* 6, 185.
- Bonkowsky, H.L; Bloomer, J.R.; Ebert, P.S. & Mahoney, M.J. (1975), *J. Clin. Invest.* 56, 1139.
- Bottomley, S.A.; Tanaka, M. & Everett, M.A. (1975), *J. Lab. Clin. Med.* 86, 126.
- Deybach, J.Ch.; de Verneuil, H. & Nordmann, Y. (1981), *Hum Genet.* 58, 425.
- Goldberg, A. (1968), *Semin. Hematol.* 5, 424.
- Jackson, A.H.; Games, D.E.; Couch, P.; Jackson, J.R.; Belcher, R.V. & Smith, S.G. (1974), *Enzyme* 17, 81.
- Kamitakahara, R.; Pearlstone, J.; Poulson, R. & Polglase, W. (1973), *Can. J. Microbiol.* 19, 1239.
- Kramer, S. & Viljoen, J.D. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 925.
- Labbe, P.; Volland, C. & Chaix, P. (1967), *Biochim. Biophys. Acta* 143, 70.
- Labbe, P.; Volland, C. & Chaix, P. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* 159, 527.
- Labbe, R.F. (1976), "Porphyrins in Human Diseases" (M. Doss, ed) Karger, Basel.
- Labbe, R.F. & Hubbard, N. (1961), *Biochim. Biophys. Acta* 52, 130.
- Mazanowska, A.M; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1966), *Biochem. J.* 98, 117.
- Mazanowska, A.M; Danciewicz, A.M.; Malinowska, T. & Kowalski, E. (1969), *Eur. J. Biochem.* 7, 583.
- Mc Kay, R.; Druyan, R.; Getz, G.S. & Rabinowitz, M. (1969), *Biochem. J.* 114, 455.
- Moore, M.R.; Mc Coll, K.E.L. & Goldberg, A. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 941.
- Moore, M.R.; Meredith, P.A.; Goldberg, A.; Carr, K.; Toner, P. & Lawrie, T.D.U. (1975), *Clin. Sci. Mol. Med.* 49, 337.

- Nishida, G. & Labbe, R.F. (1959), *Biochem. Biophys. Acta* 31, 519.
- Oelden & Hempfling (1973), *J. Bacteriol.* 113, 914.
- Piomelli, S.; Lamola, A.A.; Poth Fitzpatrick, M.B; Seaman, C. & Harber, L.C. (1975), *J. Clin. Inv.* 56, 1519.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 a), *Biochem. J.* 87, 181.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 b), *Biochem. J.* 87, 186.
- Poulson, R. (1976), *Ann. Clin. Res.* 8, Suppl. 17, 56.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1973), *Biochem. Biophys. Acta* 329, 256.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1974), *FEBS Lett.* 40, 258.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 1269.
- Rimington, C. (1958), *Royal Australian Chem. Inv.* 8, 129.
- Rimington, C.; Lockwood, W.H. & Belcher, R.V. (1968), *Clin. Sci.* 35, 211.
- Sassa, S.; Granick, S. & Kappas, A. (1975), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 419.
- Schwartz, S.; Johnson, J.A.; Stephenson, B.D.; Anderson, A.S.; Edmonson, P.R. & Fussaro, R.M. (1971), *J. Lab. Clin. Med.* 78, 411.
- Smith, S.G.; Jackson, A.H. & Jackson, J.R. (1976), *Ann. Clin. Res.* 8, Suppl 7, 53.
- Stella, A.M; Wider, E.A.; Lenczner, J.M.; Magnin, P.H. & Batlle, A.M. del C. (1981), *Rev. Arg. Dermatol.* 62, 7.
- Takeshita, M.; Sugita, Y. & Yoneyama, Y. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 202, 544.
- Viljoen, J.D.; Cayanis, E.; Becker, D.M.; Dawson, B.; Bernstein, R. & Kramer, S. (1979), *Am. J. Hemat.* 6, 185.
- Yoneyama, Y.; Ohyama, H.; Sugita, Y. & Yoshikawa, H. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 62, 261.

PARTE 3

RAMIFICACIONES DE LA BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

CAPITULO XI

BIOSINTESIS DE CLOROFILA Y BACTERIOCLOROFILA

XI.1. Introducción

XI.2. Intermediarios en la conversión de protoporfirina IX a clorofila y bacterioclorofila

XI.2.1. Mg-protoporfirina

XI.2.2. Mg-protoporfirina monometil éster

XI.2.3. Mg-vinil feoporfirina a_5 (protoclorofilida a)

XI.2.4. Clorofilida

XI.2.5. Clorofila a

XI.2.6. Bacterioclorofila a

PARTE 3: RAMIFICACIONES DE LA BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

XI. BIOSINTESIS DE CLOROFILA Y BACTERIOCLOROFILA

XI.1. Introducción

El primer indicio de la existencia de un camino biosintético común en la formación del hemo y de las clorofilas surgió al aislarse una mutante del alga *Chlorella vulgaris* incapaz de sintetizar clorofila, que acumulaba cantidades significativas de protoporfirina IX (Granick, 1948 a).

Granick (1951) observó que cloroplastos y mitocondrias de vegetales contenían hierro-porfirinas y derivados de las mismas, como por ejemplo citocromos, mientras que las magnesio-porfirinas se localizaban únicamente en los plástidos; se sugirió entonces que en estas organelas se hallarían la mayor parte de las enzimas involucradas en la biosíntesis de clorofilas.

Dubash y Rege (1967) comprobaron la existencia de un bloqueo en la síntesis de estos pigmentos, en *Euglena* crecida en oscuridad. En estas condiciones aislaron un intermediario: protoporfirina IX dimetil éster, postulando entonces que la protoporfirina IX en *Euglena* se encontraría en el camino biosintético de las clorofilas, siendo posiblemente su dimetil éster un derivado más estable.

Tanto en mutantes de *Chlorella* como en hojas de mutantes de cebada, ambas carentes de clorofila, se hallaron también, además de protoporfirina IX, Mg-protoporfirina IX y Mg-protoporfirina IX monometil éster (Gough, 1972; Granick, 1948 b, 1961).

El hallazgo de la Mg-protoporfirina IX confirmaba la suposición de que la protoporfirina IX era un precursor de la clorofila, sugiriéndose además que constituía el paso posterior a la formación de dicho compuesto.

Jones (1968 a) resumió las evidencias que aseguraban que la protoporfirina IX era un intermediario en la biosíntesis de clorofila:

- a) Los precursores marcados de la protoporfirina IX (succinato, acetato, glicina y ALA) se incorporaban en la molécula de clorofila (Roberts y Perkins, 1962).

Manetas y Akoyunoglu (1975) demostraron que ocho moléculas de ALA producían una de protoclorofilida. Rebeiz y Castel Franco (1973) observaron que el ALA exógeno estimulaba la formación de coprogen, proto IX y Mg-protoporfirina IX en brotes etiolados. Además, al incubar ALA y cofactores en presencia de etioplastos y cloroplastos en desarrollo de pepino, se demostró la síntesis de uroporfirina, coproporfirina, protoporfirina IX y protoclorofilida, acumulándose esta última (Rebeiz et al, 1975).

b) En cloroplastos purificados se encuentran todas las enzimas involucradas en la conversión de ALA en protoporfirina (Carell y Kahn, 1964). Dado que la actividad de la ferroquelatasa en cloroplastos es elevada (Jones, 1968 b) no se descarta la posibilidad de que estas enzimas sean utilizadas en la síntesis del hemo. Porra e Irving (1970) no pudieron detectar actividad de ALA-S en proplástidos y cloroplastos vegetales. Estos autores tampoco pudieron medirla en mitocondrias de plantas pero en ambos casos se observó síntesis de hemo y clorofilas a partir de ALA. Sin embargo, en 1971 Wider de Xifra et al pudieron medir actividad de ALA-S en extractos de callos de soya.

IX.2. Intermediarios en la conversión de protoporfirina IX a clorofila y bacterioclorofila

La secuencia metabólica diagramada en la Figura 11.1. corresponde a los pasos que involucran la biosíntesis de *Bcl* a partir de protoporfirina IX.

IX.2.1. Mg-protoporfirina

Jones (1968 a) y Neuberger y Tait (1964) no lograron detectar la enzima que incorpora Mg^{++} en protoporfirina; actualmente existe sólo una demostración experimental de la síntesis *in vitro* de Mg-protoporfirina, según la reacción:



Gorchein (1972, 1973) ha hallado las condiciones para medir la actividad de la Mg-quelatasa en *Rp. sphaeroides*, estudiando algunas propiedades de la misma.

En vegetales superiores se encontró una quelatasa localizada en los plástidos que era incapaz de incorporar Mg^{++} en porfirinas, debido a lo cual se la asoció con la síntesis de hemo (Porra y Lascelles, 1968). Jones (1976) detectó también una me-

(Jones, 1966; Houssier y Sauer, 1969).

Granick (1948 a) sugirió que la formación del anillo ciclopentanona ocurriría mediante una β -oxidación del propionato de metilo de la posición 6. Esta hipótesis fue apoyada por las investigaciones de Ellsworth y Aronoff (1968), quienes empleando mutantes de *Chlorella vulgaris* encontraron los intermediarios normales de la β -oxidación: tetrapirroles con residuos acrilato de metilo; hidroxipropionato y ceto-propionato en posición 6 (Figura 11.2.).

Jones (1976) propuso la siguiente secuencia para la síntesis de protoclorofilida:

Mg-protoporfirina monometiléster $\xrightarrow{\text{ciclación}}$ Mg-2,4-divinil
feoporfirina a₅ (vinil protoclorofilida) $\xrightarrow{\text{reducción}}$ protoclorofilida

(reacción 4)

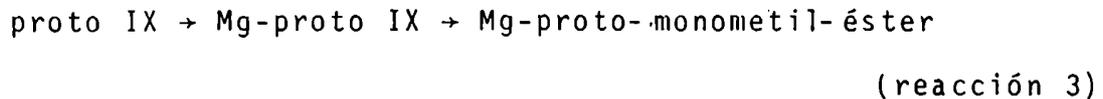
Ellsworth y Aronoff (1968) propusieron una secuencia metabólica con distintas vías alternativas las cuales conducen en forma paralela a la síntesis de protoclorofilida y de vinil protoclorofilida (Figura 11.2.). Estos diferentes caminos planteados se deben al hecho de que, al menos en mutantes de *Chlorella*, la reducción del vinilo parece ser no específica ocurriendo la misma en alguna de las etapas de la β -oxidación, ya que se encontraron intermediarios que tenían el propionato de la posición 6 modificado y presentaban en ciertos casos un grupo etilo en la posición 4.

XI.2.4. Clorofilida

La conversión de protoclorofilida en clorofilida involucra la reducción del anillo D mediante la adición de 2 H en trans en las posiciones 7 y 8, proceso fotodependiente.

La protoclorofilida de hojas etioladas puede presentarse en más de una forma: el mayor porcentaje de la misma posee un máximo de absorción a 650 nm (P 650), existiendo otra con absorción a 636 nm (P 636) y una tercera a 628 nm (P 628) la cual fue hallada en numerosas oportunidades en tejidos envejecidos. De manera semejante a lo que sucede con las clorofilas, la extrac-

secuencia propuesta inicialmente por Granick (1948 a):



Gibson et al (1961) observaron que bajas concentraciones de etionina inhibían la síntesis de bacterioclorofila en *Rp. sphaeroides*, estimulando la acumulación de coproporfirina. Estos autores postularon que este compuesto interferiría en la síntesis o utilización de la metionina, sugiriendo que esta última sería la dadora de los grupos metilos. El empleo de metionina marcada con ^{14}C en el metilo permitió confirmar dicha suposición. La acumulación de coproporfirina en ausencia de este aminoácido se debería a que éste constituye un requerimiento esencial para la acción de la CPG-asa anaeróbica (Tait, 1969).

La metiltransferasa es una enzima firmemente unida a la fracción de los cromatóforos (Gibson et al, 1963) o de los cloroplastos (Rebeiz y Castel Franco, 1973). Esta enzima ha sido detectada también en *Chlorobium thiosulphatophilum* (Jones, 1968 a), en cloroplastos y proplástidos de *Euglena gracilis* (Ebbon y Tait, 1969) y en cloroplastos de maíz (Radmer y Bogorad, 1967).

XI.2.3. Mg-vinil feoporfirina a_5 (protochlorofilida a)

La conversión de Mg-protoporfirina monometil éster en Mg-vinil feoporfirina a_5 involucra los siguientes procesos:

- a) reducción del vinilo ubicado en la posición 4 del núcleo tetrapirrólico;
- b) oxidación de la cadena lateral del carbono 6 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOCH}_3$ a $\text{CO-CH}_2\text{-COOCH}_3$);
- c) ciclación de la cadena lateral nombrada en b) originando el anillo ciclopentanona.

Jones (1963 a,b) observó que la biosíntesis de bacterioclorofila se inhibía al tratar a *Rp. sphaeroides* con 8-hidroxi-quinolina acumulándose el pigmento 2,4 divinil feoporfirina a_5 monometil éster (vinil protochlorofilida) (Figura 11.1.). Este intermediario fue encontrado también en plantas verdes, demostrándose así su participación en la biosíntesis de clorofila

talquelatasa en extractos de cebada, la cual cataliza la inserción del Zn^{++} pero no la del Mg^{++} .

La incorporación del Mg^{++} a la porfirina parece ser una reacción asociada a membranas; es probable que la protoporfirina IX se encuentre complejada con algún carrier proteico o lipoproteico, el cual facilitaría el acceso de dicho sustrato al sitio activo de la enzima. El Mg^{++} también se hallaría asociado a lípidos (Mg^{++} -lípidos), los que actuarían cediendo el metal para su unión con las porfirinas (Rebeiz y Castelfranco, 1973).

Gorchein (1972, 1973) observó que células enteras de *Rp. sphaeroides* incorporaban Mg^{++} en protoporfirina IX exógena pero el producto resultante era la Mg-proto IX monometil éster y no la Mg-proto IX. Por tal causa se postuló que en bacterias esta inserción estaría obligadamente acoplada a la metilación de la Mg-protoporfirina, siendo la reacción total catalizada por un complejo enzimático.

Sin embargo, en vegetales superiores y en algas, las mutantes de cebada y de *Chlorella* acumulaban Mg-protoporfirina.

XI.2.2. Mg-protoporfirina monometil éster

La enzima S-adenosil-L-metionina-Mg-protoporfirina metiltransferasa cataliza la esterificación del ácido propiónico en la posición 6 según:



(reacción 2)

Tait y Gibson (1961) observaron que cromatóforos de *Rp. sphaeroides* incubados con Mg-protoporfirina y S-adenosilmetionina formaban un compuesto identificado como el éster monometílico de la Mg-protoporfirina. Este hallazgo, sumado a los hechos de que la Mg-protoporfirina es un sustrato más activo que la protoporfirina misma frente a la metilación y al aislamiento del intermediario Mg-protoporfirina en plantas superiores, permite descartar la alternativa de una esterificación primera con posterior quelación (Rebeiz y Castelfranco, 1973), avalando así la

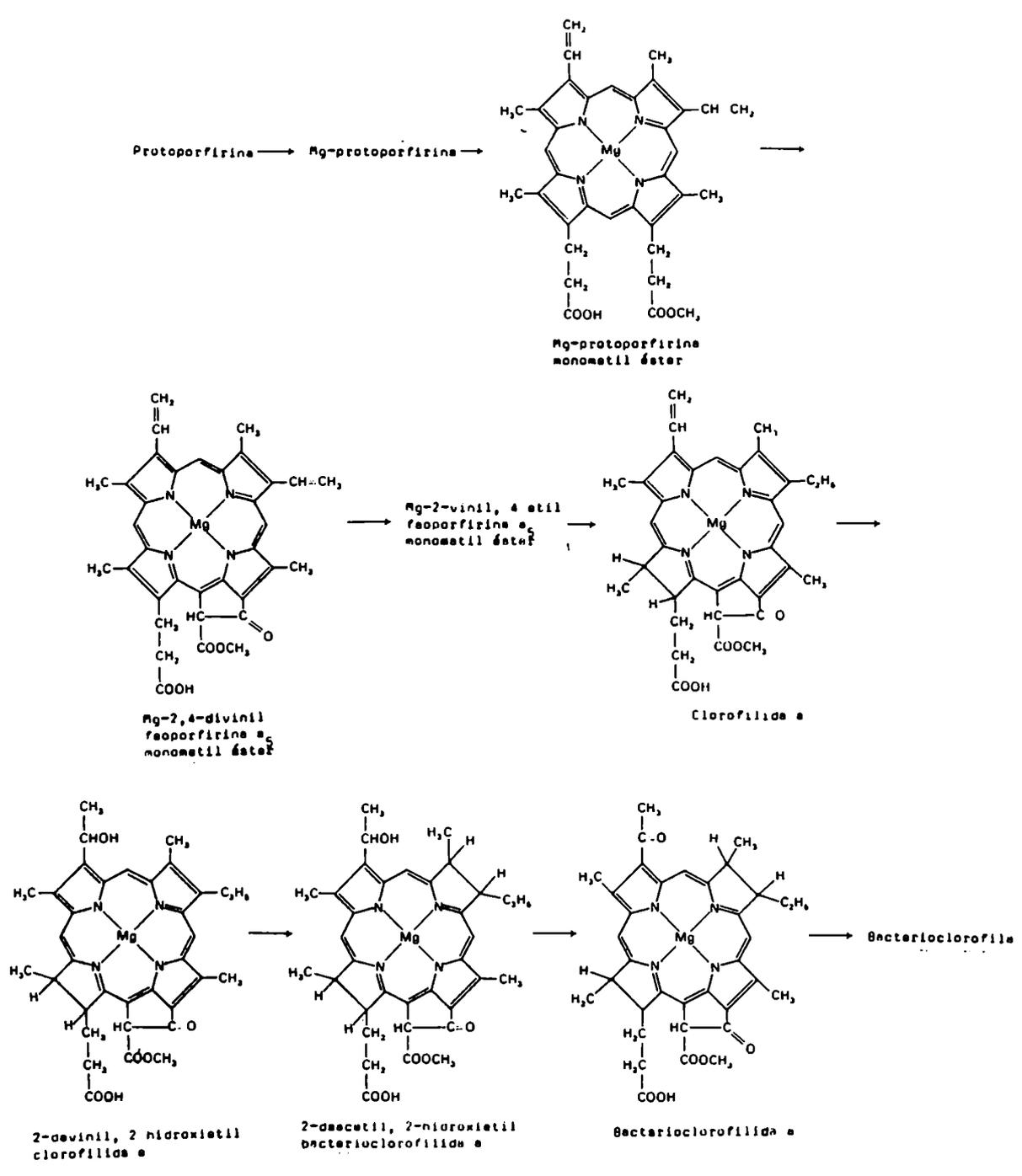


FIGURA 11.1.: Biosfntesis de Bacterioclorofila

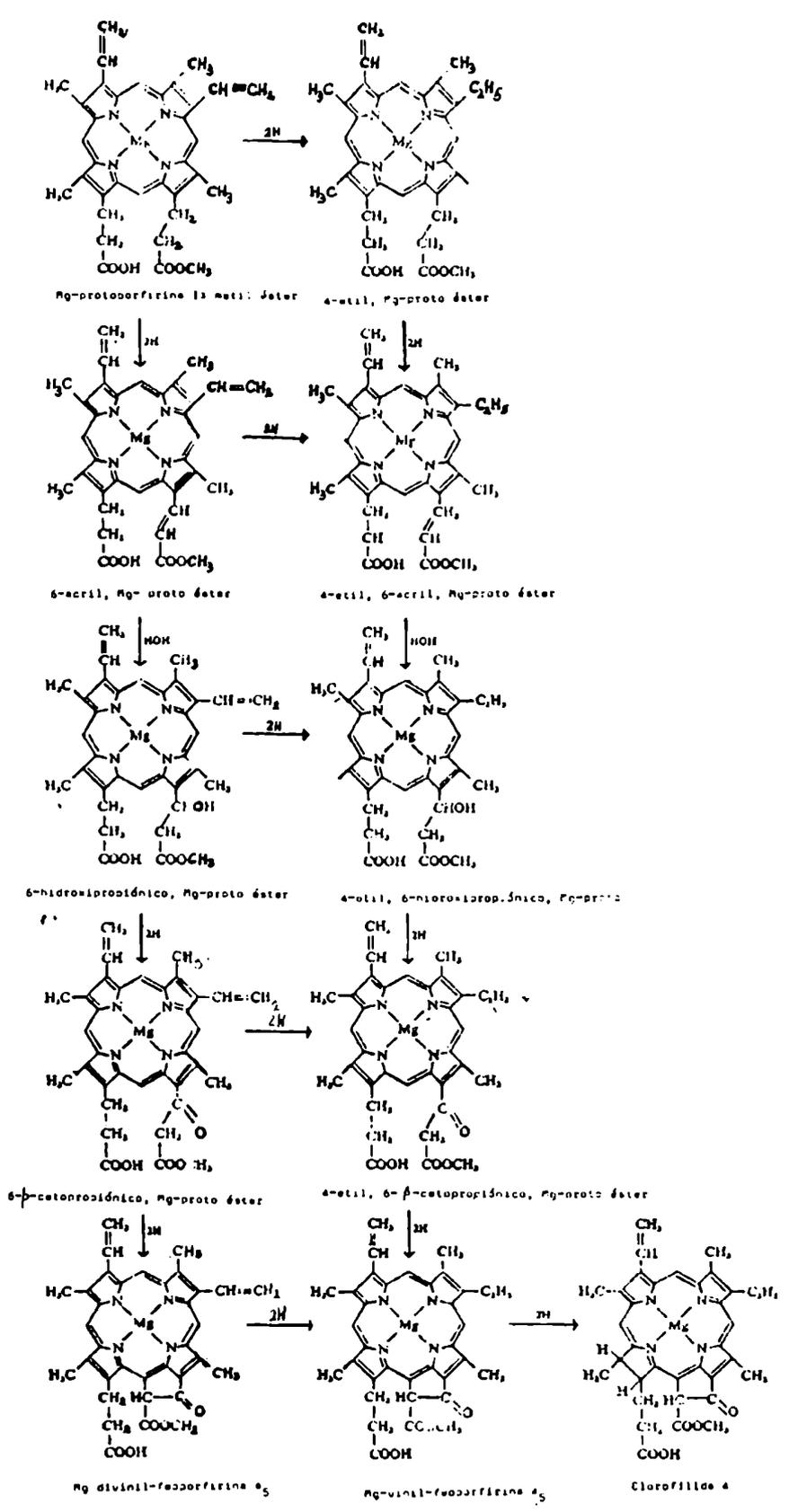


FIGURA 11.2.: Hipótesis de Ellsworth y Aronoff (1968)

ción con solventes orgánicos sólo da origen a una forma, cuyo máximo de absorción se encuentra a 623 nm.

P 650 y P 636 pueden transformarse en P 628 por aplicación de distintos tratamientos: calor, ácidos, congelamiento y descongelamiento, acción de distintos reactivos, etc (Gassman, 1973; Henningsen, 1970).

Mediante estudios de iluminación se observó que las formas P 650 y P 636 son fototransformables mientras que la P 628 no lo es (Kahn et al, 1970).

Kahn y Nielsen (1974) postularon la existencia de un equilibrio dinámico entre las formas P 650 y P 636.

Aparentemente estas diversas formas espectroscópicas halladas *in vivo* para la protoclorofilida se deberían a la existencia de un complejo con proteínas específicas (protoclorofilida holocromo) o a una agregación de las moléculas de protoclorofilida.

El tratamiento de hojas etioladas con ALA en oscuridad produjo una acumulación significativa de protoclorofilida (Granick, 1959, 1961) la cual absorbe a 636 nm pero no es fototransformable al exponer las hojas a iluminación constante (Griffiths, 1975). Se postuló entonces que esta inactividad se debería a la existencia de poca proteína catalítica y por ende se formaría una cantidad escasa del complejo protoclorofilida-holocromo.

El primer producto de la fototransformación de protoclorofilida -holocromo en clorofilida corresponde a una forma con un máximo de absorción a 678 nm. Esta se convierte rápidamente en oscuridad en otra forma cuyo máximo de absorción se encuentra a 683 nm (Gassman et al, 1968; Schopfer y Siegelman, 1968).

Así, la presencia de ALA produce la síntesis de P 636, el cual en presencia de una proteína específica y de un reductor (posiblemente NADPH) (Griffiths, 1974) se transforma en P 650. La clorofilida 678 también está unida a una proteína específica y su separación de la misma provoca el desplazamiento espectroscópico a 683 nm (Granick y Gassman, 1970).

Mathis y Sauer (1972) y Schultz y Sauer (1972) efectuaron estudios de dicroísmo circular observando la existencia de una interacción pigmento-pigmento y postulando que algunas de las formas antes mencionadas serían producidas por dímeros de proto

clorofilida.

Griffiths (1974) demostró que para que el P 636 sea fototransformado es necesaria la presencia de un medio reductor siendo el NADPH el más efectivo. Este limita la conversión del P 636 en clorofilida e interviene directa o indirectamente, en la reducción del anillo D de la protoclorofilida.

XI.2.5. Clorofila a

La transformación de la clorofilida a en clorofila a implica la esterificación del grupo propiónico del C 7 con fitol.

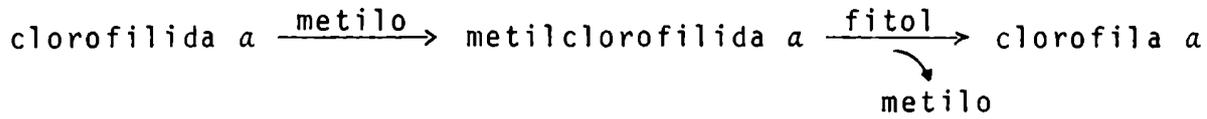
Hasta el momento no ha sido posible aislar la enzima responsable de la fitilación, aunque se supone que estaría posiblemente unida a membrana. Sin embargo, existen varias referencias acerca de una enzima soluble denominada clorofilasa. La clorofilasa cataliza la hidrólisis del grupo propionil éster de la clorofila a . Esta enzima actúa también sobre las otras clorofilas y feofitinas con el anillo D reducido y sobre la $Bcl a$ y las "clorobium" clorofilas.

La actividad de la clorofilasa aumenta en los tejidos durante las etapas de verdeo (Holden, 1961; Sudyina, 1963), lo cual estaría indicando que también cumpliría alguna función durante la síntesis de la clorofila. Wellburn (1970) y Ellsworth (1972 a, b) demostraron que la clorofilasa es más activa en reacciones de transesterificación, catalizando la fitilación de metilclorofilida a .

Katz et al (1972) encontraron en bacterias fotosintéticas una forma de $Bcl a$ esterificada con trans-geranil-geraniol. Por esta causa se supuso que la última etapa en la síntesis de la clorofila ocurriría solamente luego de la formación de un precursor por esterificación de la clorofilida a . De esta forma la fitilación sería una reacción de transesterificación. Así, Chiba et al (1967) obtuvieron una clorofilasa muy activa la cual formaba clorofila a al incubarse con metilclorofilida a y fitol. Se observó que esta enzima no catalizaba la fitilación de la clorofilida a libre.

Hines y Ellsworth (1969) encontraron pequeñas cantidades de metilclorofilida a , en extractos de trigo y hojas de pasiona

ria. Estos resultados sumados a los de Chiba et al (1967) permitieron sugerir que el último paso sería:



XI.2.6. Bacterioclorofila a

La *Bcl a* se sintetiza a partir de la clorofilida *a*, intermediario aislado de cultivos de *Rp. sphaeroides* (Jones, 1963 a). Jones (1964) y Lascelles (1966) aislaron de esta bacteria el compuesto 2-devinil-2-hidroxietil-clorofilida *a* pero sin Mg, sugiriendo entonces que el grupo acetilo de la *Bcl a* puede formarse por hidratación e hidrogenación del grupo vinilo de la clorofilida *a*. En algunas mutantes de *Rp. sphaeroides* se acumula otro pigmento la bacterioclorofilida *a* (Lascelles y Altschuler, 1967).

De acuerdo con estos resultados se postuló la siguiente secuencia para la biosíntesis de *Bcl a*:

Clorofilida *a* + 2-devinil-2-hidroxietil-clorofilida *a* + bacterioclorofilida *a* + *Bcl a*

REFERENCIAS

- Carell, E.F. & Kahn, J.S. (1964), Arch. Biochem. Biophys. 108 1.
- Chiba, Y.; Aiga, Y.; Ydemori, M.; Satoh, J.; Matsushita, K. & Sasa, T. (1967), Plant Cell Physiol. 8, 623.
- Dubash, P.J. & Rege, D.U. (1967), Biochim. Biophys. Acta 141, 209.
- Ebbon, J.G. & Tait, G. (1969), Biochem. J. 111, 573.
- Ellsworth, R.K. (1972 a), Photosynthetica 6, 32.
- Ellsworth, R.K. (1972 b), Photosynthetica 6, 276.
- Ellsworth, R.K. & Aronoff, S. (1968), Arch. Biochem. Biophys. 125, 35.
- Gassman, M.L. (1973), Plant Physiol. 51, 139.
- Gassman, M.L.; Granick, S. & Mauzerall, D. (1968), Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 295.
- Gibson, K.D.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1961), Biochim. Biophys. Acta 52, 614.
- Gibson, K.D.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1963), Biochem. J. 88, 325.
- Gorchein, A. (1972), Biochem. J. 127, 97.
- Gorchein, A. (1973), Biochem. J. 134, 833.
- Gough, S. (1972), Biochim. Biophys. Acta 286, 36.
- Granick, S. (1948 a), J. Biol. Chem. 172, 717.
- Granick, S. (1948 b), J. Biol. Chem. 175, 333.
- Granick, S. (1951), A. Rev. Plant Physiol. 2, 115.
- Granick, S. (1959), Plant Physiol. 34, XVIII.
- Granick, S. (1961), J. Biol. Chem. 236, 1168.
- Granick, S. & Gassman, M. (1970), Plant Physiol. 45, 201.
- Griffiths, W.T. (1974), FEBS Lett. 46, 301.
- Griffiths, W.T. (1975), Biochem. J. 146, 17.
- Henningsen, K.W. (1970), J. Cell Sci. 7, 587.
- Hines, G.D. & Ellsworth, R.K. (1969), Plant Physiol. 44, 1742

- Holden, M. (1961), *Biochem. J.* 78, 359.
- Holt, A.S. (1966), "The Chlorophylls", (L.P. Vernon y G.R. Seely, eds.), p. 111, Academic Press Inc. , London y New York.
- Houssier, C. & Sauer, K. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 172, 476.
- Jones, O.T.G. (1963 a), *Biochem. J.* 88, 335.
- Jones, O.T.G. (1963 b), *Biochem. J.* 89, 182.
- Jones, O.T.G. (1964), *Biochem. J.* 91, 572.
- Jones, O.T.G. (1966), *Biochem. J.* 101, 153.
- Jones, O.T.G. (1968 a), "Porphyrins and Related Compounds" (T.W. Goodwin, ed.) p. 131, Academic Press, New York.
- Jones, O.T.G. (1968 b), *Biochem. J.* 107, 113.
- Jones, O.T.G. (1976), *Phil. Trans. R. Soc. London B.* 273, 207.
- Kahn, A. & Nielsen, O.E. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 333, 409.
- Kahn, A.; Boardman, N.K. & Thorne, S.W. (1970), *J. Mol. Biol.* 48, 85.
- Katz, J.J.; Strain, H.H.; Harkness, A.L. ; Studier, M.H.; Svec, W.A.; Janson, T.R. & Cope, B.T. (1972), *J. Am. Chem. Soc.* 94, 7938.
- Lascelles, J. (1966), *Biochem. J.* 100, 175.
- Lascelles, J. & Altschuler, T. (1967), *Arch. Mikrobiol.* 59, 204.
- Manetas, Y. & Akoyunoglou, G. (1975), *Plant Sci. Lett.* 5, 375.
- Mathis, P. & Sauer, K. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 267, 498.
- Neuberger, A. & Tait, G.H. (1964), *Biochem. J.* 90, 607.
- Porra, R.J. & Irving, E.A. (1970), *Biochem. J.* 116, 42P.
- Porra, R.J. & Lascelles, J. (1968), *Biochem. J.* 108, 343.
- Radmer, R. & Bogorad, L. (1967), *Plant Physiol.* 42, 463.
- Rebeiz, C.A. & Castelfranco, P. (1973), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 129.
- Rebeiz, C.A.; Mattheis, J.R.; Smith, B.B.; Rebeiz, C.C. & Dayton, D.F. (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* 171, 549.

- Roberts, D.W.A. & Perkins, H.J. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 58, 499.
- Schopfer, P. & Siegelman, H.W. (1968), *Plant Physiol.* 43, 990.
- Schultz, A. & Sauer, K. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 267, 320.
- Sudyina, E.G. (1963), *Photochem. Photobiol.* 2, 181.
- Tait, G.H. (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 116.
- Tait, G.H. & Gibson, K.D. (1961), *Biochim. Biophys. Acta* 52, 614.
- Wellburn, A.R. (1970), *Phytochemistry* 9, 2311.
- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H.A. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 235, 511.

CAPITULO XII

BIOSINTESIS DE VITAMINA B₁₂

XII.1. Introducción

XII.2. Origen de los grupos metilos de la vitamina B₁₂

XII.3. Sirohidroclorina

XII. BIOSINTESIS DE VITAMINA B₁₂

XII.1. Introducción

El descubrimiento de que las corrinas (Bray y Shemin, 1958) se forman en la naturaleza a partir de ALA (Figura 12.1. (1)) o de PBG (Figura 12.1., (2)), se realizó hace más de 20 años, mencionándose en el Segundo Simposio sobre Vitamina B₁₂ (1961).

Los estudios más importantes fueron los efectuados por el grupo de Bernhauer (1968) quienes mostraron que la vitamina B₁₂ (Figura 12.1., (3 c)) se sintetizaba *in vivo* a partir del ácido cobirínico (Figura 12.1., (3 a)).

Shemin et al (1956) y Schwartz et al (1959) demostraron que tanto el ALA como el PBG eran precursores en la biosíntesis del ácido cobirínico, mientras que la S-adenosilmetionina (SAM) sería la responsable de los siete grupos metilos presentes en la vitamina B₁₂.

Todos estos hallazgos provienen de la utilización de precursores marcados con (¹³C) y de la determinación de los productos formados mediante resonancia magnética nuclear (¹³C-RMN). Numerosos grupos han contribuido a los mismos, siendo los más importantes los de Arigoni, Battersby, Scott y Shemin (Battersby, 1979; Battersby y Mc Donald, 1975; Battersby et al, 1973, 1974, 1975, 1977 a,b; Brown et al, 1973; Infield et al, 1976; Scott et al, 1972 a, 1974 b, 1975, 1978).

Dado que el ALA y el PBG se incorporaban en el ácido cobirínico, quedaba por dilucidar a qué nivel divergía la síntesis de vitamina B₁₂ de la del hemo.

Existía la posibilidad de que el anillo de la corrina se formara directamente a partir del PBG, suposición que fue corroborada por el hecho de que no se logró incorporar Urogen III marcado en vitamina B₁₂ (Franck et al, 1972; Müller y Dieterle, 1971). Sin embargo, existen microorganismos anaerobios como *Clostridium tetanomorphum* y *Clostridium perfringens*, capaces de sintetizar corrinas pero no hemo, que producen uroporfirina III a partir de ALA y fumarato (Burnham y Plane, 1966; Porra, 1965).

Estos hechos sugieren que el urogen III es el intermedia

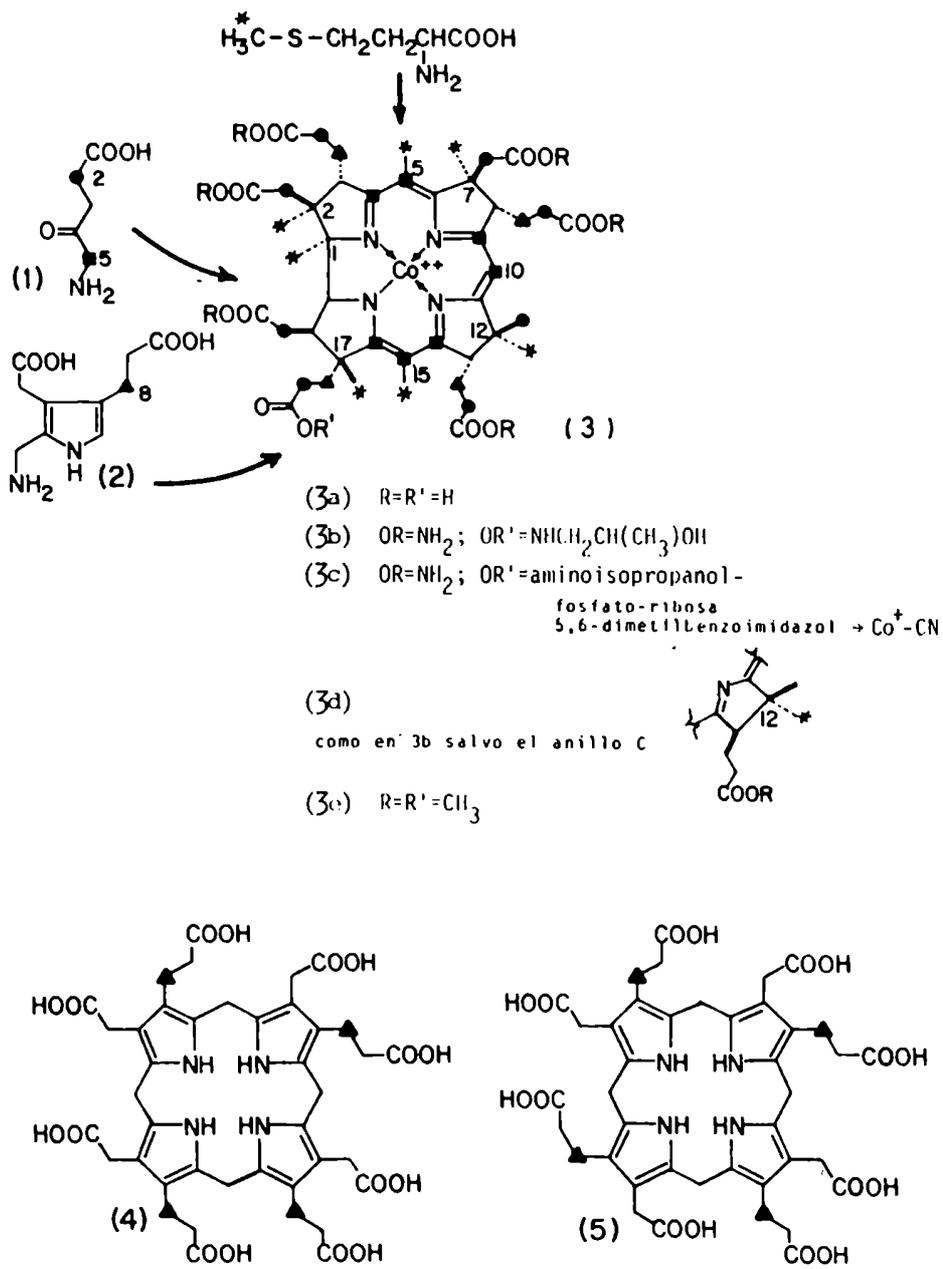


FIGURA 12.1.

rio verdadero entre el PBG y las corrinas, siendo inefectivo el Urogen I (Figura 12.1. , (5)) en esta transformación.

De la simple observación de las estructuras del Urogen III (Figura 12.1. (4)) y del ácido cobirínico (Figura 12.1. (3 a)) surge el hecho de que se necesitan numerosos pasos para la conversión del primero en el segundo:

- a) Introducción de siete grupos metilos provenientes de la S-adenosil metionina en los carbonos 1, 2, 5, 7, 12, 15 y 17;
- b) decarboxilación de la cadena lateral del ácido acético del carbono 12;
- c) pérdida del carbono meso 20 del esqueleto del urogen III;
- d) cambios rédox del macrociclo;
- e) inserción del cobalto.

Battersby y Mc Donald (1978) argumentaron que el primer paso de esta conversión sería la metilación o la decarboxilación del carbono 12. Sin embargo, en experiencias posteriores estos autores descartaron la segunda posibilidad (Battersby et al, 1977 b).

XII.2. Origen de los grupos metilos de la vit B₁₂

De los ocho grupos metilos ubicados en la periferia de la estructura de la vit B₁₂ (Figura 12.1., (3 c)), Bray y Shemin (1963) y Shemin y Bray (1964) sugirieron que los carbonos 1 y 12 provendrían de los C-5 y C-2 del ALA respectivamente. Así, el C-12 se formaría por decarboxilación del acetato correspondiente al Urogen III y el C-1 derivaría de la reducción del puente metileno del Urogen III o sería el resultado de una ciclización directa de un tetrapirrol lineal (Mathewson y Corwin, 1961). Los seis grupos metilos restantes se originarían a partir de la S-adenosil metionina. Estas conclusiones se obtuvieron por oxidación de corrinas marcadas y sintetizadas a partir de (5-¹⁴C)ALA, (2,3-¹⁴C)ALA y (¹⁴CH₃)metionina.

Cuando el problema se reexaminó empleándose sustratos marcados con ¹³C y estudiándose las señales del RMN, se comprobó que ocho moléculas de (2-¹³C)ALA (Figura 12.1., (1)) se incorpo

raban en la estructura de la vit B₁₂ sintetizada por *Propionibacterium shermanii* (Scott et al, 1972 a,b, 1974), correspondiendo las resonancias a siete grupos metilenos CH₂CONH₂ y a uno de los gem-dimetil del C-12 (Figura 12.1.). El empleo de (5-¹³C)ALA (Figura 12.1. (1)) produjo resultados sorprendentes ya que aparecieron sólo siete señales, perdiéndose durante el proceso un grupo aminometilo (Scott et al, 1974) (Figura 12.1.).

Los estudios efectuados utilizando (¹³CH₃)-metionina revelaron siete señales las cuales correspondían a los siete grupos metilos no detectados aún (Figura 12.1., (C*)). Estos resultados fueron confirmados por Battersby et al (1973) quienes emplearon el cobester (Figura 12.1., (3 e)) para simplificar el análisis posterior.

A pesar de haberse demostrado que uno de los grupos metilos del C-12 proviene de la metionina y el otro del C-2 del ALA, hasta 1973 no se había establecido la estereoespecificidad de este proceso. Scott et al (1973) determinaron que la configuración absoluta del C-12 es R.

Estudios realizados por Battersby et al (1974) indicaron que la S-adenosilmetionina transfería los grupos metilos en forma intacta.

XII.3. Sirohidroclorina

Una vez definido el Urogen III como precursor en la biosíntesis de las corrinas (Figura 12.2.), comenzó la búsqueda de los intermediarios parcialmente metilados involucrados en la formación de la vit B₁₂. Murphy et al (1973) y Siegel et al (1973) consideraron que la sirohidroclorina, grupo prostético libre de hierro de la enzima sirohemo, podría constituir un posible intermediario.

Murphy y Siegel (1973) propusieron que la sirohidroclorina sería un derivado dimetilado del Urogen III. El espectro UV de la sirohidroclorina sugirió la presencia de un compuesto del tipo isobacterioclorina con dos anillos reducidos adyacentes. Dado que la sirohidroclorina se incorpora en forma intacta en el ácido cobirínico, las estructuras 6-9 (Figura 12.3.) representarían las posibles alternativas.

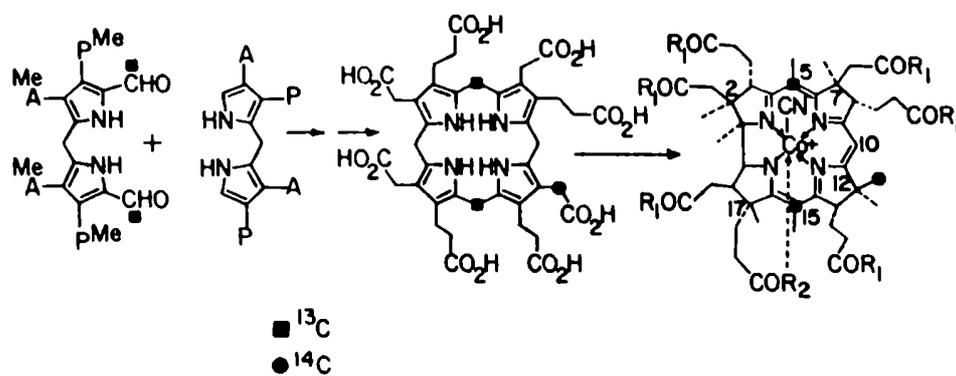


FIGURA 12.2.: Urogen III, precursor de la síntesis de las corrinas
 R_1 : NH_2 ; R_2 : aminoisopropanol-fosfato-ribose-5,6-dimetilbenzimidazol- Co^+ -CN

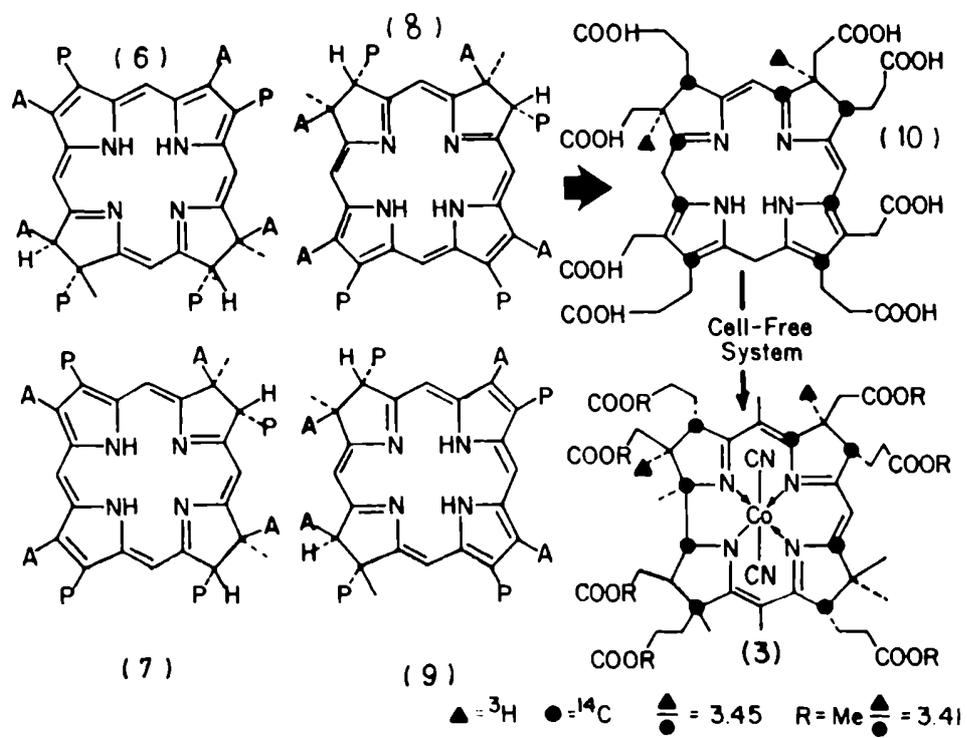


FIGURA 12.3.: Posibles estructuras de la sirohdroclorina (6-9)

En 1977, Deeg et al aislaron un metabolito: Factor II, el cual se convierte en ácido cobirínico en presencia de un sistema de células libres de *P. shermanii*. La comparación de las propiedades físicas del Factor II y de la sirohidroclorina permitieron determinar que constituían el mismo compuesto.

De acuerdo con los datos espectroscópicos y de bioincorporación obtenidos por Scott (1979), las estructuras 7 y 8 son las más probables (Figura 12.3.). Sin embargo, dado que es improbable que la metilación del anillo C ocurra antes que la de carboxilación del grupo acetato durante la biosíntesis de la vit B₁₂, la estructura 8 es la más probable. La dilucidación de este intermediario se confirmó por una serie de experiencias biosintéticas en las cuales la marcación con ¹³C fue de valor diagnóstico para arribar a una única solución. Finalmente, la incubación con (5-¹³C) ALA permitió demostrar que la sirohidroclorina poseía la estructura 8 (Figura 12.4.) (Scott, 1979).

Scott et al (1978) postularon un mecanismo para este proceso, basándose en hechos experimentales (Scott et al, 1974 a). Este esquema considera también los metabolitos aislados por Deeg et al (1977) y Bergmann et al (1977): Factor I y Factor III, estando este último relacionado con una bislactona corrifirina-3 (Battersby y Mc Donald, 1978).

La Figura 12.5. muestra la incorporación de la sirohidroclorina (Factor II) y de los Factores I y II, todos al estado reducido.

Estudios recientes basados en evidencias espectroscópicas y bioquímicas permitieron determinar la estructura del Factor III, el cual sería una 20-metilsirohidroclorina, y no una 5-metilisobacterioclorina como fue postulado por Battersby y Mc Donald (1978).

La transformación del Factor III reducido en el núcleo de la corrina se halla descripta en la Figura 12.6. Este esquema responde solamente a algunas hipótesis de trabajo, según las cuales existe una decarboxilación del anillo C, una metilación por intermedio del SAM y una apertura del anillo con pérdida del C-20, ya sea en forma directa para formar dehidrocorrina (Scott, 1975, 1976) o por metilación del C-1 dando origen a la 1,19 dimetil seco-corrina y posteriormente a la 1,19 trans metil-dehidrocorrina. La última parte de la secuencia se encuentra en la Figura 12.7. donde se muestra la sustitución del metilo del

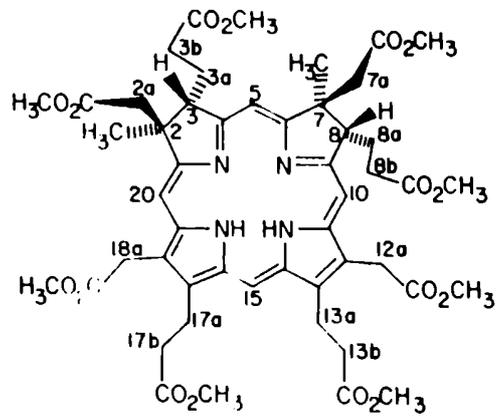


FIGURA 12.4.: Sirohdroclorina metil ester

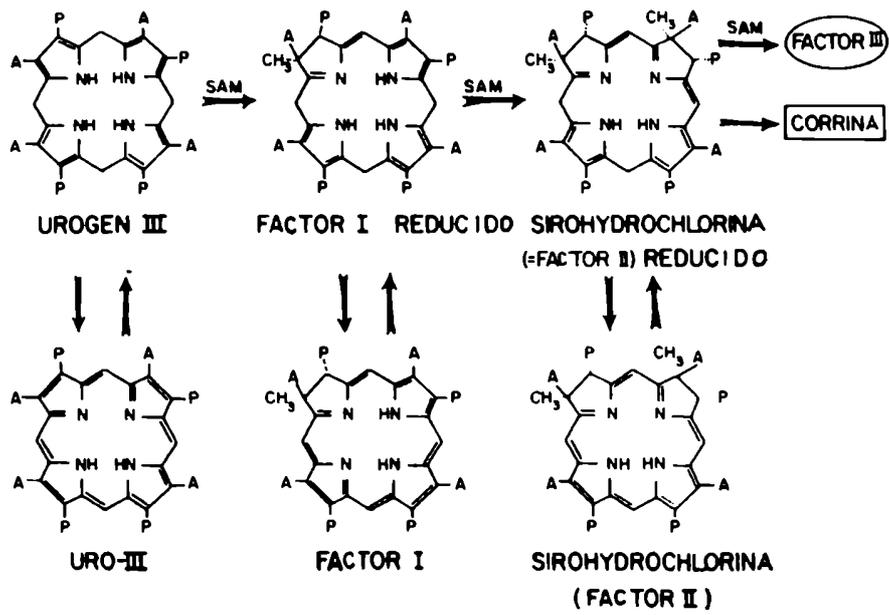


FIGURA 12.5.

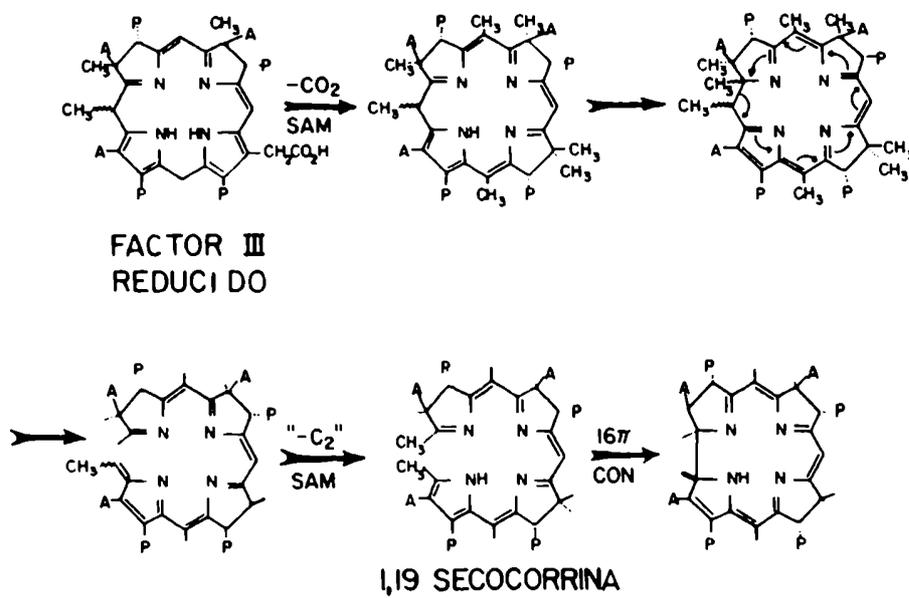


FIGURA 12.6.

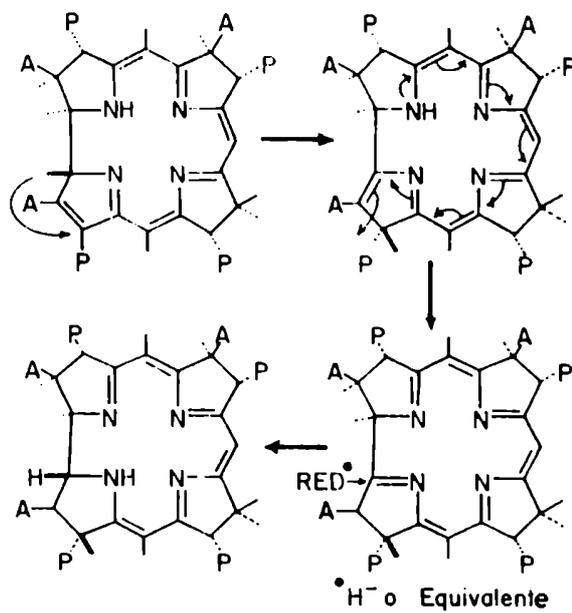


FIGURA 12.7.

C-19 orientado en β en el anillo D, al C-17, originándose así el ácido cobirfínico, el cual por inserción del Co^{3+} forma la vitamina B_{12} .

Sobre la formación de las cobinamidas (incorporación de grupos amino, isopropanolamina y 5'-deoxiadenosil al ácido cobirfínico) (Figura 12.1, (3b), (3d)) y de las cobamidas (incorporación de 5,6-dimetilbenzimidazol y otras bases) existen numerosos trabajos (Friedman y Cagen, 1970; Plaut et al, 1974).

REFERENCIAS

- Battersby, A.R. (1979), Vitamin B₁₂ p.217-246, Walter de Gruyter & Co., Berlin - New York.
- Battersby, A.R. & Mc Donald, E. (1975), "Porphyrins and Metalloporphyrins", 2nd ed. (K.M. Smith ed.) p.61, Elsevier, Amsterdam.
- Battersby, A.R. & Mc Donald, E. (1978), Bioorg. Chem. 7, 161.
- Battersby, A.R.; Ihara, M.; Mc Donald, E. & Stephenson, J.R. (1973), J. Chem. Soc. Chem. Comm. 404.
- Battersby, A.R.; Ihara, M.; Mc Donald, E. & Stephenson, J. R. (1974), J. Chem. Soc. Chem. Comm. 458.
- Battersby, A.R.; Ihara, M.; Mc Donald, E.; Satoh, F. & Williams, D.C. (1975), J. Chem. Soc. Chem. Comm. 436.
- Battersby, A.R.; Ihara, M.; Mc Donald, E.; Stephenson, J.R. & Goldin, B.T. (1977 a), J. Chem. Soc. Perkin I, 158.
- Battersby, A.R.; Mc Donald, E.; Hollenstein, R.; Ihara, M.; Satoh, F. & Williams, D.C. (1977 b), J. Chem. Soc. Perkin I, 166.
- Bergmann, K.H.; Deeg, R. ; Gneuss, K.D.; Kriemler, H.P.; & Müller, G. (1977), Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 358, 1315.
- Bernhauer, K.; Wagner, F.; Michna, H.; Rapp, P. & Vogelmann, H. (1968), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1297.
- Bray, R. & Shemin, D. (1958), Biochim. Biophys. Acta 30, 647.
- Bray, R. & Shemin, D. (1963), J. Biol. Chem. 238, 1501.
- Brown, C.E.; Shemin, D. & Katz, J.J. (1973), J. Biol. Chem. 248, 8015.
- Burnham, B.F. & Plane, R.A. (1966), Biochem. J. 98, 13 c.
- Deeg, R.; Kriemler, H.P.; Bergmann, K.H. & Müller, G. (1977), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 339.
- Franck, B.; Gantz, D.; Montforts, F.P. & Schmitchon, F. (1972), Angewandte Chemie (Eng. Ed.) 11, 421.
- Friedman, H.C. & Cagen, L.M. (1970) Ann. Rev. Microbiol. 24, 159.
- Infield, M.; Townsend, C.A. & Arigoni, D. (1976), J. Chem. Soc. Chem. Comm. 541.

- Mathewson, J.H. & Corwin, A.H. (1961), *J. Am. Chem. Soc.* 83, 135.
- Müller, G. & Dieterle, W. (1971), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 143.
- Murphy, M.J. & Siegel, L.M. (1973), *J. Biol. Chem.* 248, 6911
- Murphy, M.J.; Siegel, L.M.; Kamin, H. & Rosenthal, D. (1973), *J. Biol. Chem.* 248, 2801.
- Plant, G.W.E; Smith, C.M. & Alworth, W.L. (1974), *Ann. Rev. Biochem.* 43, 899.
- Porra, R.J. (1965), *Biochim. Biophys. Acta* 107, 176.
- Scott, A.I. (1975), *Tetrahedron* 31, 2639.
- Scott, A.I. (1976), *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, 273, 303.
- Scott, A.I. (1978), *Accounts Chem. Research* 11, 29.
- Scott, A.I. (1979), *Vitamin B₁₂* p.247-277. Walter de Gruyter & Co., Berlin - New York.
- Scott, A.I.; Lee, E. & Townsend, C.A. (1974 a), *Bioorg. Chem.* 3, 229.
- Scott, A.I.; Townsend, C.A. & Cushley, R.J. (1973), *J. Am. Chem. Soc.* 95, 5759.
- Scott, A.I.; Irwin, A.J.; Siegel, L.M. & Shoolery, J. N. (1978), *J. Am. Chem. Soc.* 100, 316, 7987.
- Scott, A.I.; Townsend, C.A.; Okada, K.; Kajiwara, M; Whitman, P.J. & Cushley; R.J. (1972 a), *J. Am. Chem. Soc.* 94, 8267.
- Scott, A.I.; Townsend, C.A.; Okada, K.; Kajiwara, M. & Cushley, R.J. (1972 b), *J. Am. Chem. Soc.* 94, 8269.
- Scott, A.I.; Townsend, C.A.; Okada, K.; Kajiwara, M.; Cushley, R.J. & Whitman, P.J. (1974 b), *J. Am. Chem. Soc.* 96, 8069.
- Scott, A.I.; Georgopapadakou, N; Ho, K.S.; Klioze, S.; Lee, E.; Temme III, G.H.; Townsend, C.A. & Armitage, I.A. (1975), *J. Am. Chem. Soc.* 97, 2548.
- Schwartz, S.; Ikeda, K.; Miller, I.M. & Watson, C.J. (1959), *Science* 129, 40.
- Segundo Simposio Europeo de Vitamina B₁₂: "Vitamin B₁₂ and Intrinsic Factor" (1961), Hamburg, Ferdinand Erke, Verlag, Stuttgart.

- Shemin, D. & Bray, R.C. (1964), Ann. N.Y. Acad. Sci. 112, 615.
- Shemin, D.; Corcoran, J.W.; Rosenblum, C. & Miller, I.M. (1956), Science 124, 272.
- Siegel, L.M.; Murphy, M.J. & Kamin, H. (1973), J. Biol. Chem. 248, 251.

PARTE 4

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE LOS TETRAPIRROLES

CAPITULO XIII

REGULACION DE LA SINTESIS DEL HEMO

XIII.1. Introducción

XIII.2. Mecanismos de control

- XIII.2.1. Control por localización intracelular y tisular
- XIII.2.2. Control por efecto de constituyentes celulares o del medio ambiente
- XIII.2.3. Control por interconexión con otros caminos metabólicos
- XIII.2.4. Control genético a través de cambios en la actividad y cantidad de la enzima limitante
 - XIII.2.4.1. Cambios en la actividad del ALA-S
 - XIII.2.4.2. Cambios en la cantidad del ALA-S

PARTE 4: REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE LOS TETRAPIRROLES

XIII. REGULACION DE LA SINTESIS DEL HEMO

XIII.1. Introducción

La naturaleza esencialmente dinámica de los seres vivos, así como de sus células constituyentes, determina la existencia de mecanismos que aseguran un perfecto equilibrio entre los niveles de reacciones metabólicas que tienen lugar en los organismos vivientes. Este control que se lleva a cabo a diferentes niveles y de varias formas, es en realidad sumamente complejo y su coordinación depende del eficiente funcionamiento de una extraordinaria maquinaria regulatoria.

La biosíntesis de porfirinas, atributo de todas las células, responde a esta regla general; además constituye un caso notable por el alto grado de eficiencia con el cual se lleva a cabo esta síntesis, a juzgar por las cantidades relativas de porfirinas y sus precursores que se forman y excretan por día. Así, en condiciones normales, de la producción diaria de 460 μ moles de hemoglobina en el hombre, apenas se eliminan 20-24 μ moles entre precursores y porfirinas; de este modo la pérdida total es menor que un 5%. Este singular rendimiento es consecuencia de la existencia de una serie estrechamente ligada de controles; sin embargo, si estos mecanismos de control fallan o son defectuosos, como ocurre en la porfirias, la síntesis o acumulación de intermediarios en la cadena del hemo puede alcanzar niveles mayores que los fisiológicamente funcionales, con serias consecuencias para el organismo todo.

La elevada concentración de precursores y/o intermediarios que puede alcanzarse cuando fallan los mecanismos de regulación, demuestra la capacidad potencial de funcionamiento de las enzimas del camino del hemo cuando actúan libremente, y enfatiza además, la necesidad natural de la existencia de sistemas de control, en favor de la economía y salud celular.

XIII.2. Mecanismos de control

Se han postulado diferentes mecanismos que contribuirían a un fino control de la biosíntesis del hemo.

Entre los múltiples controles de los cuales puede disponer la célula para regular su contenido de tetrapirroles, se en encuentran:

- 1) control por localización intracelular y tisular;
- 2) control por efecto de los constituyentes del medio ambiente o del medio celular (oxígeno, luz, estado de óxido-reducción);
- 3) control por su interconexión con otros caminos metabólicos;
- 4) control genético a través de cambios en la actividad y cantidad de la enzima limitante.

XIII.2.1. Control por localización intracelular y tisular

Muy brevemente diremos que, observando la localización intracelular de las enzimas del camino del hemo, ha llamado la atención el hecho de que determinadas etapas tienen lugar dentro de la mitocondria, mientras que otras suceden en el citoplasma (Figura 14.1.). Así, los compuestos intermedios formados se ven forzados a difundir de un compartimiento a otro, lo cual podría constituir de por sí un mecanismo regulatorio (Granick, 1962; Sano y Granick, 1961); incluso se ha postulado la existencia de permeasas específicas. Sin embargo, esta teoría no cuenta con suficiente apoyo experimental.

Por otro lado sabemos que los niveles de hemo-proteínas varían considerablemente en los distintos tejidos y existen evidencias de que las células de cada tejido son capaces de sintetizar sus propias hemoproteínas de novo, de acuerdo además con sus necesidades específicas; esto sugiere que la concentración de las enzimas del hemo determina o regula la cantidad de porfirinas formadas por un dado tejido u órgano.

XIII.2.2. Control por efecto de constituyentes celulares o del medio ambiente

La tensión de oxígeno y estado de óxido-reducción de la

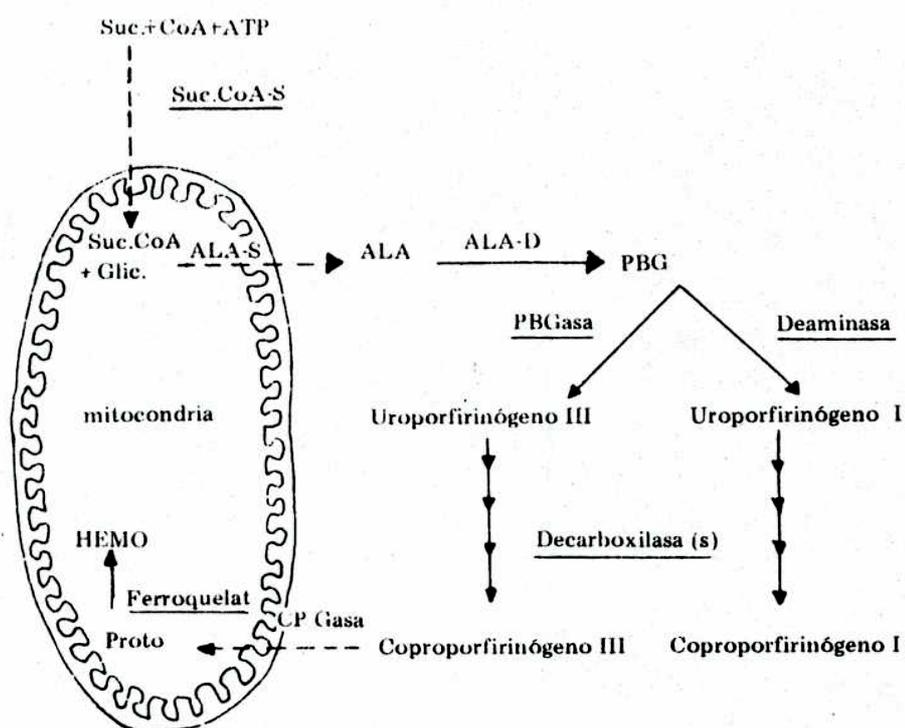


FIGURA 14.1.: Localización intracelular de las enzimas involucradas en el camino biosintético del Hemo

célula también influyen diferencialmente en las distintas etapas de este camino metabólico, jugando entonces un posible rol regulatorio. Así, por ejemplo, la conversión del coproporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX es una reacción que depende del oxígeno, mientras que la inserción de hierro en la protoporfirina IX para dar hemo está favorecida en condiciones anaeróbicas.

En las bacterias fotosintéticas, por otra parte, las condiciones de iluminación desempeñan igualmente un rol importante en la regulación de la biosíntesis de tetrapirroles; así, una muy elevada intensidad luminosa reprime normalmente su síntesis.

XIII.2.3. Control por interconexión con otros caminos metabólicos

Los mecanismos de regulación del hemo se encuentran muy bien coordinados, por ejemplo, con los de formación de las proteínas específicas que constituyen las distintas hemoproteínas. Otro hecho importante, es el estado estacionario de la concentración de ALA mitocondrial, que a su vez está estrechamente vinculado con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que regula el nivel de succinil-CoA, sustrato necesario para la síntesis de ALA.

El estado de óxido-reducción (Cohen-Bazire et al, 1957), los niveles de NADH (Labbe, 1967) y de ATP celular (Gajdos y Gajdos-Török, 1969), son otros factores que participan asimismo en el control de este camino.

Recientemente, se ha demostrado que en *Rp. sphaeroides* la actividad de la enzima ALA-S está controlada por las actividades relativas de dos enzimas, cistationasa y rodenasa, involucradas en el metabolismo de los compuestos sulfurados y en la formación y degradación de un trisulfuro, que actúa como activador del ALA-S en ciertas condiciones (Wider de Xifra et al, 1976) (Figura 14.2.).

Un mecanismo similar parecería funcionar en callos de soya (Vázquez et al, 1980).

Viale et al (1980) propusieron que la actividad del ALA-S en *Rp. palustris* estaría controlada por la presencia de

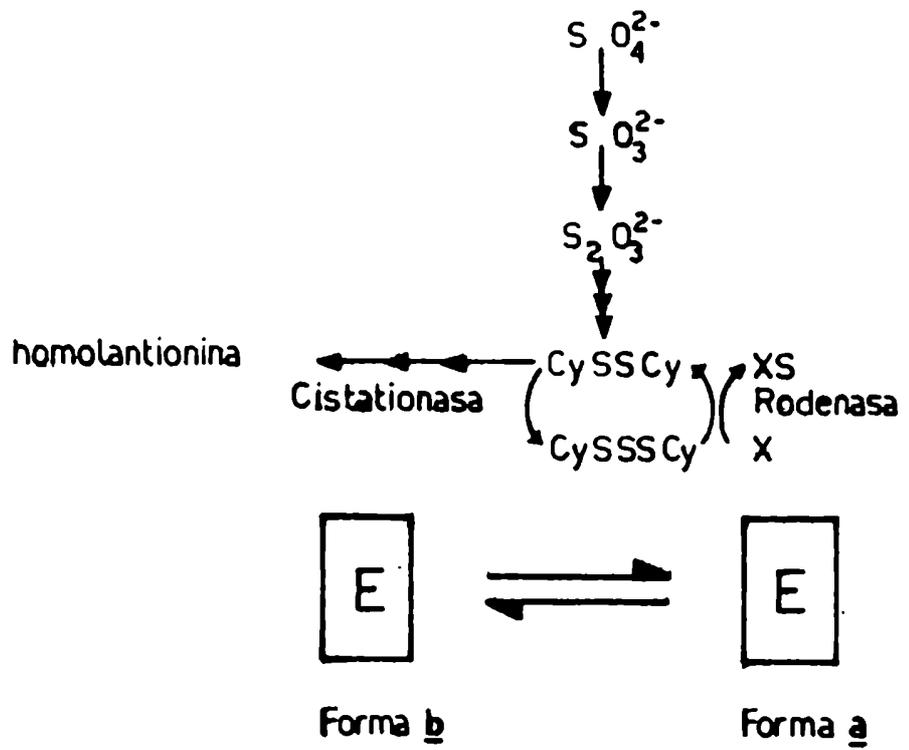


FIGURA 14.2.: Esquema postulado para el control de la actividad del ALA-S en *Rp. spheroides*

un compuesto de bajo peso molecular pero su mecanismo de acción sería distinto al existente en *Rp. sphaeroides*.

Vemos así que la extraordinaria eficiencia de la biosíntesis de las porfirinas depende de un complejo sistema de controles, indudablemente interrelacionado con el de varios otros caminos metabólicos.

XIII.2.4. Control genético a través de cambios en la actividad y cantidad de la enzima limitante

Un paso fundamental hacia nuestro conocimiento de la regulación de la biosíntesis del hemo fue la demostración de que la síntesis de porfirinas está principalmente controlada por cambios en la actividad del ALA-S, primer enzima específica de esta secuencia y además, la enzima limitante. Es importante tener presente entonces que la cantidad sintetizada de hemo depende de la actividad del ALA-S presente. De allí que es el ALA-S la enzima que juega el papel fundamental en la regulación de esta cadena metabólica. En la mayoría de las células estudiadas, las demás enzimas se encuentran en cantidades y con actividades no limitantes.

Hay dos mecanismos generales por medio de los cuales se puede controlar la actividad de una enzima:

- a) uno rápido que implica cambios directos en la actividad catalítica;
- b) otro más lento, por cambios en la cantidad de la proteína.

XIII.2.4.1. Cambios en la actividad del ALA-S

Se ha encontrado que en un número muy grande de procesos enzimáticos el producto final de una dada secuencia metabólica, ejerce un efecto inhibitorio sobre la primera enzima de ese camino. Este tipo de control rápido se conoce como control por "feed-back" o control por retroinhibición. Se ha demostrado (Lascelles, 1964; Marks, 1969) que este tipo de control opera en la biosíntesis del hemo (Figura 14.3.), es decir, cuando la concentración de hemo en la célula supera los niveles normales, éste, su producto final, inhibe directamente la primer enzima

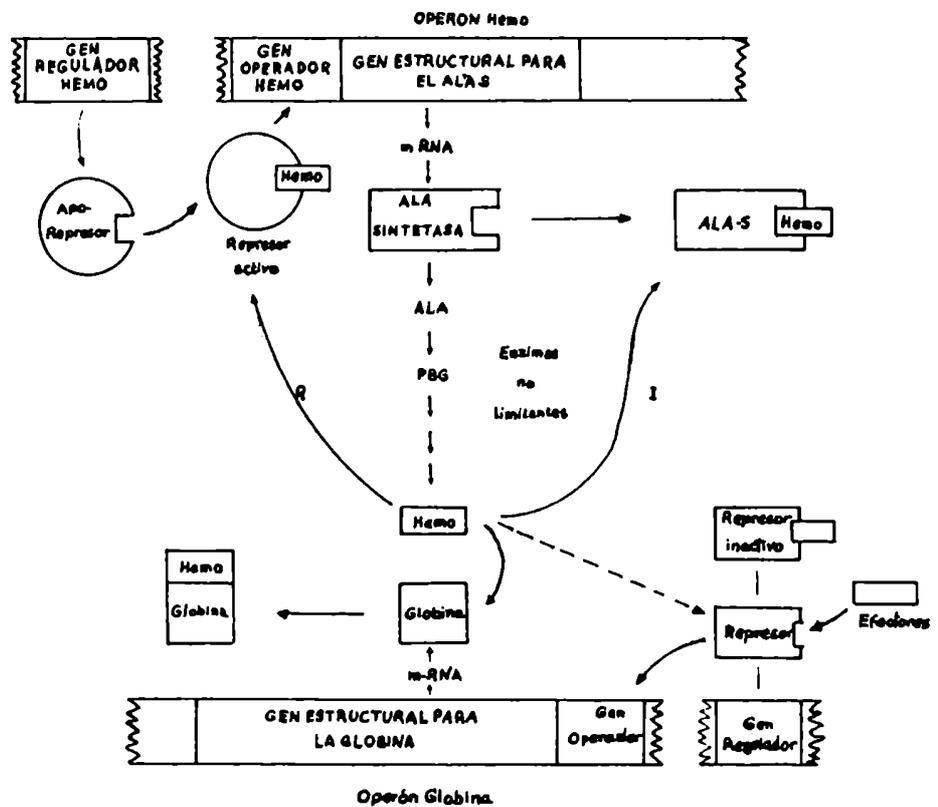


FIGURA 14.3.: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del Hemo; I: Por inhibición de producto final del ALA-S; R: Por represión de síntesis proteica del ALA-S. Su coordinación con un hipotético esquema de control de la síntesis de globina y Hemoglobina.

del camino, el ALA-S.

XIII.2.4.2. Cambios en la cantidad del ALA-S

Además de la inhibición por producto final, se ha encontrado que muchos sistemas son sensibles a un control más lento, por represión. En nuestro caso, un control genético de la síntesis de ALA-S, dependiente de DNA, regula la cantidad de ALA-S formada en la célula.

El mecanismo que se ha postulado (Granick, 1966; Granick y Levere, 1964) para explicar la formación y control del ALA-S se basa en la conocida hipótesis de Jacob y Monod (Figura 14.3).

En este esquema, una premisa importante es el hecho experimental de que en la mayoría de los tejidos, la síntesis del hemo se encuentra normalmente reprimida, por cuanto sus requerimientos generalmente son bajos, y además el mismo hemo actúa como represor de su propia síntesis.

El gen estructural del operón hemo (GS), una porción del DNA cromosómico nuclear que lleva la información para la síntesis del ALA-S, se activa por medio de un gen operador (GO), que a su vez responde a la presencia de un represor activo, el cual normalmente actúa reprimiendo este gen operador, que detiene entonces la producción del RNA mensajero por parte del gen estructural que codifica el ALA-S y en consecuencia se interrumpe su síntesis.

El gen regulador (GR) produce una molécula proteica o apo-represor que cuando se combina con su co-represor, en este caso el hemo, da lugar al represor activo. Cuando el hemo no puede unirse al apo-represor, ya sea porque su concentración es baja o bien porque su sitio de unión está bloqueado, no se forma el represor activo, que por lo tanto no puede actuar sobre el gen operador; como consecuencia se dispara o recomienza la síntesis del ALA-S, que tendrá lugar a su máxima velocidad.

Así, el hemo puede controlar su propia biosíntesis, actuando rápidamente por un mecanismo "feed-back" inhibiendo en forma directa la actividad del ALA-S, y más lentamente por un mecanismo de represión de la síntesis proteica de esta enzima.

Este mecanismo de control genético de la biosíntesis del hemo por represión fue demostrado en numerosos tejidos. Así, en cultivos de *Rp. sphaeroides* el agregado de concentraciones de hemo de alrededor de 10 μ M reprime completamente la síntesis del ALA-S, actuando un mecanismo análogo en organismos superiores (Rimington, 1966).

Asociado al concepto de que el control de la síntesis de porfirinas depende del nivel de ALA-S, existe la idea de que la cantidad formada de esta enzima debe variar como respuesta a ciertos estímulos o necesidades. Se ha demostrado así que, efectivamente, además de reprimible el ALA-S es también una enzima inducible por acción de ciertos compuestos fisiológicos, farmacológicos y químicos. La respuesta de este sistema de controles frente a tales inductores, se explica en términos muy generales, suponiendo que los compuestos inductores interfieren directa o indirectamente en la combinación del hemo con el apo-represor, o bien alteran el destino metabólico del hemo, disminuyendo su concentración celular, haciendo que haya menos co-represor disponible para dicha combinación.

Por lo general las porfirias, hereditarias o adquiridas, son una consecuencia de deficiencias enzimáticas específicas primarias de algunas de las enzimas del camino del hemo que a su vez llevan a fallas secundarias en el control de la cantidad y actividad del ALA-S.

REFERENCIAS

- Cohen-Bazire, G.; Siström, W.R. & Stanier, R. Y. (1957), J. Cell Comp. Physiol. 49, 25.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1969), Biochem. Med. 2, 372.
- Granick, S. (1962), Trans. N.Y. Acad. Sci. Ser II, 25, 53.
- Granick, S. (1966), J. Biol. Chem. 241, 1359.
- Granick, S. & Levere, R.D. (1964), Progress in Haematology 4, 1.
- Labbe, R.F. (1967), Lancet ii, 1361.
- Lascelles, J. (1964), "Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation" (W.A. Benjamin, ed.) Inc. New York - Amsterdam.
- Marks, G.S. (1969), "Heme and Chlorophyll Chemical, Biochemical and Medical Aspects". D. Van Nostrans Co. Ltd., London.
- Rimington, C. (1966), VI Congreso Internazionale di Patologia Clínica - Roma, 341.
- Sano, S. & Granick, S. (1961), J. Biol. Chem. 236, 1173.
- Vázquez, E.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A. M. del C. (1980), Int. J. Biochem. 12, 721.
- Viale, A.A.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A. M. del C. (1980), Int. J. Biochem. 12, 729.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976), Phil. Trans. R. Soc. London B. 273, 79.

MATERIALES

Y

METODOS

MATERIALES

A.- MATERIALES

- Porfobilinógeno: El PBG se obtuvo enzimáticamente de acuerdo con la metodología descrita por Sancovich et al (1970) a partir de ALA-D de hígado bovino y ALA (Sigma Chemical Co, USA).
- Peptona y Extracto de levadura: La peptona y el extracto de levadura agregados al medio de crecimiento se adquirieron de Difco.
- Sulfato de amonio: Proveniente de Merck AG-Darmstadt, Alemania y de grado analítico, se utilizó como droga sólida, calculándose se los gramos a agregar para alcanzar un determinado porcentaje, mediante el nomograma correspondiente.
- Geles de Sephadex: Se emplearon los geles de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia. Las dimensiones de las columnas utilizadas se detallan a continuación:
 - a) Sephadex G-100: Volumen de cama: 172 ml; Vo: 78,5 ml; Flujo: 40 ml/h; ϕ_i : 2,5 cm; largo de columna: 57 cm.
 - b) Sephadex G-25 grueso: Volumen de cama: 120 ml; ϕ_i : 1,8 cm; largo de columna: 50 cm.
- Gel de fosfato de calcio: Se preparó según el método de Keilin y Hartree (1951).
- Acido Tricloroacético: Proveniente de Merck AG-Darmstadt, Alemania; la concentración se expresa como peso de ácido en gramos por 100 ml de solución.
- Buffers: Se emplearon buffers fosfato de sodio 0,05 M y TRIS-HCl 0,05 M a los pH's que se indican en Métodos.

Los solventes empleados en todas las cromatografías fueron de grado analítico o para uso espectrofotométrico.

Los demás reactivos y solventes usados también fueron de grado P.A., provenientes de distintas fuentes comerciales.

Para la preparación de todas las soluciones se utilizó a gua deionizada y bidestilada.

- Equipos utilizados

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas International B₂₀ y Sorvall RC-5B.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros Beckman modelos DB y 35 y Metrolab RC 325 BD.

Las mediciones de pH se efectuaron en un Termo-pHmetro modelo TPX.

Para la sonicación del tejido se empleó un equipo Sonifier Cell Disruptor Modelo W 185D.

Las cromatografías para la caracterización y determinación cuantitativa de las porfirinas esterificadas se realizaron en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Varian modelo 5000, equipado con un inyector con loop (capacidad 10 μ l). La detección de las porfirinas a 404 nm fue efectuada con un detector de longitud de onda variable Varian modelo 50. El registro gráfico se obtuvo mediante un registrador Varian modelo 9176 y la integración de las áreas de cada pico de absorbancia se llevó a cabo mediante un integrador Varian modelo CDS 111L. En este caso los solventes utilizados fueron de grado HPLC.

✎

REFERENCIAS

- Keilin, D. & Hartree, E.F. (1951), Biochem. J. 49, 88.
- Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1970), Methods in Enzymology (H. Tabor y C.W. Tabor, eds.) Vol 17, pag. 220. Academic Press, New York.

B

METODOS

CAPITULO I

EUGLENA GRACILIS

- I.1. Fuente de enzima
- I.2. Cultivo y crecimiento del tejido
- I.3. Extracción de la proteína enzimática
 - I.3.1. Obtención de PrH, PrS, F_H y F_S
 - I.3.2. Obtención de $F_S \emptyset$
 - I.3.3. Obtención de H \emptyset y S \emptyset
 - I.3.4. Obtención de Deaminasa
- I.4. Sistema Standard de Incubación
- I.5. Unidades
 - I.5.1. Unidad enzimática
 - I.5.2. Unidades de factor F_S

B. METODOS

I. Euglena gracilis

I.1. Fuente de enzima

La muestra inicial de *Euglena gracilis* Klebs strain, Z Pringsheim fue cedida gentilmente al Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias en 1973 por los Dres. Belocopitow y Marechal del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

I.2. Cultivo y crecimiento del tejido

Se hizo crecer el tejido de *Euglena gracilis* en el medio de Hutner modificado (Price y Valle, 1962; Price y Carell, 1964). La composición del mismo por cada 100 ml fue la siguiente: peptona (0,5 g), extracto de levadura (0,2 g), etanol (1 ml), vitamina B₁₂ (5 µg) y H₂O hasta completar el volumen.

El medio de cultivo y todos los materiales empleados en los repiques se esterilizaron con vapor a 1,5 atm durante 30 minutos en autoclave.

Para mantener esta cepa se hicieron crecer las células a la luz, en tubos de agar (2%) inclinado, los cuales se guardaron a 4°C hasta el momento de ser empleados.

Para su uso, se repicaron inóculos del medio sólido a tubos con medio líquido de Hutner modificado (10-15 ml) haciéndolos crecer en oscuridad, a 28 °C. Después de 5-6 días de desarrollo en dichas condiciones se repicaron estos inóculos a frascos Roux de 1000 ml de capacidad, conteniendo cada uno 200 ml de dicho medio. El tejido se cosechó al cuarto o sexto día de crecimiento (Rossetti, 1978; Rossetti y Battie, 1977) por centrifugación a 12.000xg durante 10 minutos y se lo lavó una vez con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7.4.

En nuestros estudios se emplearon extractos frescos de *Euglena gracilis*, utilizándose las células recién cosechadas. La intensidad luminosa recibida por los cultivos fue de 900 ftc, a una distancia de 10-15 cm.

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C.

I.3. Extracción de la proteína enzimática

El tejido fresco (T.F.) cosechado y lavado se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 utilizándose la relación 1:2 (g T.F.: ml buffer) (Rossetti, 1978; Rossetti y Batlle, 1977). Se sonicó la suspensión durante 30 segundos en volúmenes de 5-6 ml, obteniéndose así la fracción enzimática denominada Homogenato (H). Por centrifugación del H a 24.000xg durante 30 minutos se separó un Sobrenadante (S) y un Pellet (P), el cual se resuspendió, en caso necesario, en un volumen de buffer igual al del sobrenadante.

I.3.1. Obtención de PrH, PrS, F_H y F_S

Se sembraron 10 ml de H ó S en una columna de Sephadex G-25 (grueso), equilibrada con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4.

Eluyendo con el mismo buffer se recogieron las fracciones PrH ó PrS (eluidos entre 35 y 65 ml) y las F_H ó F_S (eluidos entre 75 y 120 ml).

I.3.2. Obtención de F_S Ø

Para la obtención de la fracción F_SØ se calentó un volumen adecuado de F_S durante 10 minutos a 100 °C en baño de agua. Se centrifugó 10 minutos a 13.000xg utilizándose el sobrenadante como fuente de F_SØ.

I.3.3. Obtención de HØ y SØ

Para la obtención de HØ y SØ se calentaron volúmenes adecuados de H y S a 100 °C en baño de agua, durante 10 minutos. Se centrifugaron 10 minutos a 10.000xg, empleándose los sobrenadantes como fuentes de HØ y SØ.

1.3.4. Obtención de deaminasa

La secuencia de pasos empleada fue la siguiente (Rossetti, 1978):

- Etapa 1: Homogenato (H): Se preparó según la técnica descrita en I.3.
- Etapa 2: Sobrenadante (S): Por centrifugación del H a 24.000xg durante 30 minutos se obtuvo un precipitado (pellet P) y el correspondiente sobrenadante S.
- Etapa 3: Fracción 30-80% de $SO_4(NH_4)_2$: Se llevó el sobrenadante de la etapa anterior a 30% de saturación con $SO_4(NH_4)_2$. Luego de 40 minutos de agitación se centrifugó 10 minutos a 10.000xg. Se descartó el precipitado y el nuevo sobrenadante se llevó a 80% de saturación con $SO_4(NH_4)_2$. Se dejó agitando 1 hora luego de lo cual se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas. La fracción 30-80% recogida se desaló por pasaje a través de Sephadex G-25 (grueso).
- Etapa 4: Sobrenadante de calentamiento: El eluido de la etapa anterior se calentó 15 minutos a 65 °C enfriándose inmediatamente en baño de hielo y eliminándose la proteína precipitada por centrifugación 10 minutos a 13.000xg. El sobrenadante final se empleó como fuente de Deaminasa.

1.4. Sistema standard de incubación

El sistema standard de incubación contenía 2 ml de fracción enzimática, 60 µg de PBG (0,15-0,2 ml) y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 hasta completar un volumen final de 3 ml.

Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C, durante 4 horas, en oscuridad, con agitación continua y en anaerobiosis, en tubos de Thunberg.

Se efectuaron blancos de actividad enzimática, los cuales contenían sólo PBG y buffer. De esta forma, todos los datos de actividad fueron corregidos considerando las porfirinas formadas no enzimáticamente.

Finalizada la incubación se precipitó la proteína por agregado de un volumen adecuado de HCl (c) para alcanzar una concentración final del 5%. Se dejaron oxidar los porfirinógenos

formados a porfirinas utilizando luz blanca de 50 ftc.

Se filtró el precipitado obtenido a través de papel de filtro plegado y se lo lavó 3 veces con 1 ml de HCl 5% cada vez.

Los filtrados se reunieron determinándose en los mismos las porfirinas totales formadas y el sustrato remanente.

1.5. Unidades

1.5.1. Unidad enzimática

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de sintetizar 1 nmol de porfirina/4 h ó de consumir 1 nmol de PBG/4 h, bajo las condiciones experimentales antes descriptas.

La actividad específica se expresa entonces como nmoles de porfirinas formadas/4 h por mg proteína o nmoles PBG consumido/4 h por mg proteína.

En todos los casos, se restaron los valores de las porfirinas formadas y del PBG consumido en los blancos correspondientes.

1.5.2. Unidades de factor F_S

Se define como una unidad de factor (F_S) a la cantidad del mismo que es capaz de actuar efectivamente produciendo un incremento de 2 veces en la actividad del control.

CAPITULO II

Rhodopseudomonas palustris

- II.1. Fuente enzimática: *Rp. palustris*
- II.2. Cultivo y crecimiento
- II.3. Determinación de la relación entre el peso seco y la absorbancia
- II.4. Extracción de la proteína enzimática
- II.5. Obtención de Deaminasa
- II.6. Sistema standard de incubación
- II.7. Unidades
 - II.7.1. Unidad enzimática

II. Rhodopseudomonas palustris

II.1. Fuente enzimática: Rhodopseudomonas palustris

Se utilizó una cepa salvaje perteneciente a la colección de la cátedra de Microbiología e Inmunología (FCEN - UBA)

II.2. Cultivo y crecimiento

Se hicieron crecer las bacterias en el medio de Cohen-Bazire et al (1957), modificado por la adición de peptona y extracto de levadura. Dicho medio se prepara a partir de las siguientes soluciones:

- Solución 1: Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 6,8.
- Solución 2:

Acido D-L-málico	134,0 g
Acido L(+)-glutámico	50,0 g
Acetato de sodio	50,0 g
Cloruro de amonio	50,0 g

Se ajusta el pH a 6,8 con OHNa (lentejas) y se lleva a un volumen final de 1 litro con agua destilada.

- Solución 3:

EDTA disódico.2H ₂ O	12,8 g
MgSO ₄	14,5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,67 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	9,3 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	99,0 mg
Acido nicotínico	50,0 mg
Clorhidrato de tiamina	25,0 mg
Biotina	1,0 mg
Metal "44"	50,0 ml

En primer lugar se disuelve el EDTA-disódico y se ajusta a pH 6,8 con OHNa 10 M. La solución final de toda la mezcla se lleva a un volumen de 1 litro con agua destilada, controlándose el pH.

- Metal "44":

EDTA disódico.2H ₂ O	2,9 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,95 g (2,5 g Zn)
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,00 g (1 g Fe)
MnSO ₄ .H ₂ O	1,54 g (500 mg Mn)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,392 g (100 mg Cu)
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,248 g (50 mg Co)
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,177 g (2 mg B)

Se agregan unas gotas de ácido sulfúrico para retardar la precipitación y se lleva a 1 litro con agua destilada.

Para preparar 1 litro de medio se mezclan las soluciones en la siguiente relación:

- 40 ml solución 1
- 20 ml solución 2
- 20 ml solución 3

agregándose 1 g de peptona y 1 g de extracto de levadura y controlándose el pH final.

Se esteriliza con vapor a 1,5 atm durante 15 minutos. Al autoclavarse se forma un precipitado considerable, el cual se resuelve al enfriarse el medio.

Para el mantenimiento de la cepa se utilizaron células crecidas a la luz sembradas por punción en tubos de agar (1%), conteniendo extracto de levadura (1%).

El crecimiento en medio líquido se efectuó en tubos de 30 ml, a partir de punciones del sólido, los cuales se transfieren luego a erlenmeyers de 125 ml. De esta forma se obtiene una cantidad suficiente de inóculo para repicar a erlenmeyers de 1 litro. El desarrollo se realizó a 30 °C durante aproximadamente 72 horas, en semianaerobiosis y bajo una intensidad luminosa de 900 ftc.

Las células se cosecharon por centrifugación a 12.000xg durante 10 minutos y se lavaron una vez con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4, almacenándose a -20 °C hasta el momento de su uso.

11.3. Determinación de la relación entre el peso seco y la absorbancia

El tejido cosechado y lavado se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4.

De distintas resuspensiones bacterianas las cuales poseía diferentes valores de absorbancias a 680 nm se tomaron alícuotas que se secaron en estufa a 85 °C durante una noche en vidrios de reloj previamente tarados (De Moss y Bard, 1957); en todos los casos, se descontó el peso de las sales del buffer.

La curva de calibración obtenida (Figura 2.1.) es una recta que corresponde a la siguiente ecuación:

$$\text{peso seco (mg/ml)} = 0,66 \times A_{680} \times \text{dilución}$$

11.4. Extracción de la proteína enzimática

Las células se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 hasta obtener una absorbancia de 0,500 a 680 nm (aproximadamente 60 mg/ml).

La suspensión se sonicó durante 1 minuto en volúmenes de 5-6 ml, efectuándose posteriormente una dilución de 3 veces con el mismo buffer. La fracción obtenida se denominó Homocenato (H). Por centrifugación del H a 27.000xg durante 1 hora se separaron las fracciones Sobrenadante (S) y Pellet (P). Este último se resuspendió, en caso necesario, en un volumen de buffer igual al del sobrenadante.

11.5. Obtención de deaminasa (D)

Se empleó la siguiente secuencia de pasos (Kotler et al, 1983):

- Etapa 1: Homocenato (H): Se preparó según la técnica descrita en el ítem anterior; para la resuspensión de las células se utilizó el buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8.
- Etapa 2: Sobrenadante (S): Por centrifugación del H a 27.000xg durante 60 minutos se obtuvo un precipitado (pellet P) y el correspondiente sobrenadante S.
- Etapa 3: Fracción 35-55% con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: Se llevó el sobrenadante S a 35% de saturación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Luego de 40 minutos de agitación, se centrifugó 10 minutos a 10.000xg descartándose el precipitado. El nuevo sobrenadante se llevó a 55% de saturación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, dejándose agitar durante 1 hora. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones anteriores. Esta fracción fue desalada por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 (grueso).

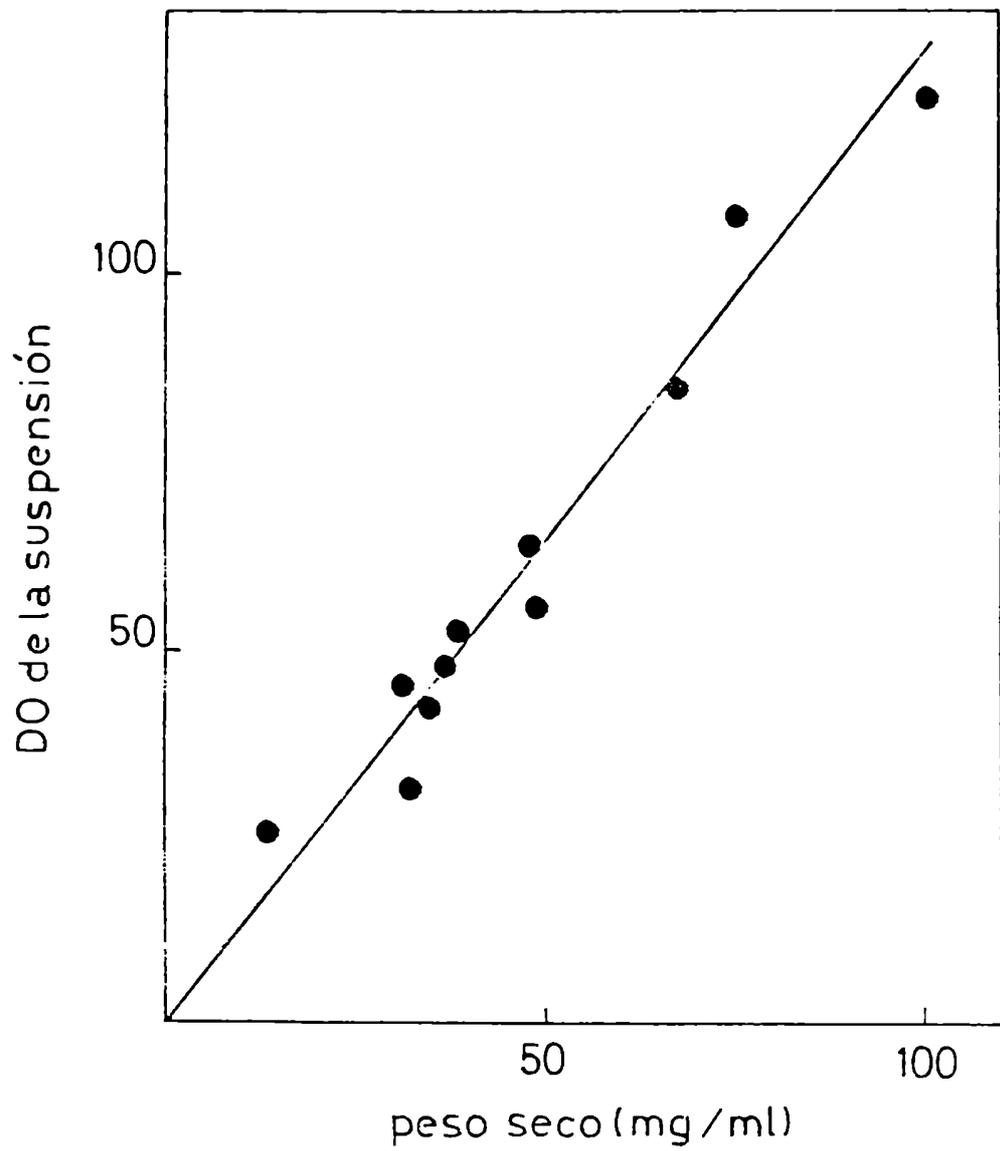


FIGURA 2.1.: Curva de calibración que permite relacionar la absorbancia con el peso seco

- Etapa 4: El eluido de la etapa anterior se calentó 5 minutos a 65 °C, enfriándose inmediatamente en hielo. Por centrifugación a 13.000xg durante 20 minutos se obtuvo la fracción sobrenadante de calentamiento utilizada como fuente de deaminasa.

II.6. Sistema standard de incubación

El sistema standard de incubación contenía 0,2 ml de fracción enzimática, 60 µgr de PBG (0,15-0,2 ml) y buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta completar un volumen final de 1,5 ml.

Se incubó a 37 °C, en oscuridad, con agitación continua, en aerobiosis, durante 1 hora salvo se indique lo contrario.

En todos los casos se efectuaron los blancos de actividad correspondientes, ya detallados en el ítem I.4.

Se detuvo la reacción por agregado de TCA 10%, dejándose oxidar los porfirinógenos formados a porfirinas utilizando luz blanca de 50 ftc. Una vez filtrado el precipitado obtenido a través de papel de filtro plegado, se lo lavó 3 veces con 1 ml de TCA 5% cada vez.

Se reunieron los filtrados determinándose en los mismos las porfirinas totales formadas y el PBG remanente.

II.7. Unidades

II.7.1. Unidad enzimática

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de sintetizar 1 nmol de porfirina/1 h ó de consumir 1 nmol de PBG/1 h, bajo las condiciones experimentales antes descriptas.

La actividad específica se expresa entonces como nmoles porfirinas formadas/1 h por mg proteína o nmoles PBG consumido/1 h por mg proteína.

CAPITULO III

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

- III.1. Determinación espectrofotométrica de las porfirinas formadas
- III.2. Determinación del PBG
- III.3. Determinación del contenido proteico
 - III.3.1. Método de Lowry
 - III.3.2. Método de Lowry modificado
 - III.3.3. Determinación de proteínas por absorción al UV

III. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

III.1. Determinación espectrofotométrica de las porfirinas formadas

La cantidad total de porfirinas formadas durante la incubación se determinó espectrofotométricamente en medio ácido (Rimington, 1960).

Se leyó la absorbancia a tres longitudes de onda: 380 nm, 430 nm y en el máximo de la zona del Soret (400-410 nm) ($A_{m\acute{a}x}$) y se calculó la cantidad de porfirinas formadas empleándose la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (1950):

$$\text{nmoles porfirinas: } (2 A_{m\acute{a}x} - (A_{380} + A_{430})) \times f \times v$$

donde:

v: volumen de la solución

f: factor cuyo valor corresponde a 1,008 para la uroporfirina en HCl 5%.

A: absorbancias leídas a las longitudes de onda indicadas.

III.2. Determinación del PBG

Se utilizó el método de Moore y Labbe (1954) que emplea el llamado reactivo de Ehrlich, constituido por una mezcla de p-dimetilaminobenzaldehído (PDMAB) (2 g) en HCl (c) (25 ml) y ACOH (gl) (75 ml); se trata de un reactivo sumamente estable en frío y oscuridad.

La técnica empleada consiste en mezclar un volumen de muestra diluida apropiadamente, con igual volumen del reactivo a temperatura ambiente. Se desarrolla un color rojizo el cual alcanza su intensidad máxima a los 8 minutos manteniéndose constante hasta los 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la intensidad comienza a decrecer lo cual se debe a la reacción del complejo con una segunda molécula de pirrol.

Cookson y Rimington (1954) determinaron que la relación entre las concentraciones del aldehído y del ácido fuerte influyen en la velocidad de la reacción mientras que la concentración

del ácido acético afecta el desarrollo de la intensidad del color.

III.3. Determinación del contenido proteico

III.3.1. Método de Lowry

Se siguió la metodología de Lowry et al (1951) según la cual a 0,4 ml de una dilución apropiada de la proteína enzimática se le agregan 2 ml de una solución de CO_3Na 2% en NaOH 0,1 N: $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% en tartrato de sodio y potasio 1% (20:0,4 v/v). Se mezcla y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se le añaden 0,2 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido adecuadamente con agua; se agita rápidamente y se deja desarrollar el color azul característico del complejo formado. Después de 30 minutos se lee la absorbancia a 660 nm y se calcula la cantidad de proteína aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg proteína/ml} = A_{660} \times 0,575 \times \text{dilución}$$

III.3.2. Método de Lowry modificado

Durante los estudios realizados con la PBG-asa de *Euglena gracilis* se hallaron dificultades para cuantificar en forma correcta el contenido proteico de extractos crudos. Por esta causa se modificó la técnica original de Lowry et al (1951).

Se coloca 0,1 ml del extracto proteico en un tubo y se lo seca al vacío en un recipiente conteniendo una atmósfera deshidratante constituida por SO_4H_2 (c) (30 ml) y un tubo de Pyrex con lentejas de NaOH . Para acelerar el proceso de secado, se sumerge el recipiente en un baño de agua a 80 °C. Los vapores ácidos se neutralizan colocando un intermediario conteniendo lentejas de NaOH .

Una vez seca la proteína, se la resuspende en NaOH 0,6 M, calentando en baño de agua a 40-50 °C durante 30 minutos.

Se mezclan 0,4 ml de una dilución apropiada de esta solución proteica con 2 ml de una mezcla de composición similar a la descrita en el ítem anterior, pero sin NaOH .

El resto de la metodología es idéntica a la detallada en el punto III.3.1.

III.3.3. Determinación de proteínas por absorción al U.V.

Las proteínas presentan una absorción máxima al U.V. a 280 nm debido principalmente a la presencia de tirosina y triptofano. Este pico de absorción a 280 nm constituye una medida rápida y sensible para calcular la concentración proteica en ausencia de sustancias interferentes. Sin embargo, los ácidos nucleicos que suelen encontrarse en preparaciones enzimáticas, presentan una fuerte banda de absorción al U.V. Warburg y Christian (1941) eliminaron la interferencia de los ácidos nucleicos determinando la absorción a 260 nm y 280 nm de mezclas conocidas de proteínas y ácidos nucleicos y calculando los coeficientes de extinción correspondientes.

En nuestras experiencias se empleó la siguiente ecuación (Kalckar, 1947):

$$\text{mg proteína/ml} = (1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}) \times \text{dilución}$$

Esta expresión da resultados comparables a los de Lowry cuando el contenido en ácidos nucleicos es bajo. En *Euglena gracilis*, el empleo de ambos métodos produjo datos no coincidentes. Por este motivo y salvo indicación contraria, se utilizó el método de Lowry para cuantificar la proteína presente, empleándose la ecuación anterior sólo como una aproximación para obtener en forma rápida los perfiles de elución proteica en una cromatografía en columna.

CAPITULO IV

DETERMINACION DEL TIPO ISOMERICO Y DE LAS PORFIRINAS FORMADAS

IV.1. Esterificación de porfirinas

IV.2. Estimación cuantitativa de porfirinas esterificadas

IV.3. Determinación del tipo isomérico y distintas porfirinas formadas

IV. DETERMINACION DEL TIPO ISOMERICO Y DE LAS PORFIRINAS FORMADAS

IV.1. Esterificación de porfirinas

Se siguió la metodología descrita por Batlle y Grinstein (1964).

La solución ácida desproteinizada proveniente de la incubación se evaporó a sequedad al vacío. El residuo resultante se disolvió en una mezcla esterificante $\text{SO}_4\text{H}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 5% (v:v). Se dejó en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 24-36 horas.

IV.2. Estimación cuantitativa de porfirinas esterificadas

La extracción y estimación de las porfirinas esterificadas se realizó según la técnica de Batlle y Grinstein (1962).

Las porfirinas esterificadas se extrajeron con cloroformo lavándose con exceso de agua hasta acidez negativa. La emulsión formada ocasionalmente se destruyó mediante un lavado con ClNa 7%. La solución clorofórmica se pasó a través de papel de filtro embebido en el mismo solvente determinándose la cantidad total de porfirinas esterificadas presentes en el filtrado mediante la siguiente expresión:

$$\mu\text{g porfirinas} = (2 A_{\text{máx}} - (A_{380} + A_{430})) \times 2,721 \times v$$

donde

v: volumen de la solución

A: absorbancias leídas a 380 nm, 430 nm y en el máximo de la zona del Soret (400-410 nm)

2,721: factor deducido para la uroporfirina esterificada (Cornio y Benson, 1963).

IV.3. Determinación del tipo isomérico y distintas porfirinas formadas

La solución clorofórmica donde se midieron las porfirinas totales esterificadas se llevó a sequedad en baño de agua hirviente. El residuo se disolvió en un pequeño volumen de cloroformo de tal manera de obtener una concentración de 5-10 $\mu\text{g/ml}$.

Durante la primera parte de este trabajo, la determinación del tipo isomérico de las uroporfirinas formadas como así también la presencia de porfirinas de distinto número de carboxilos se llevó a cabo por los métodos semicuantitativos de Cornford y Benson (1963) y Batlle y Benson (1966) basados en el método cualitativo original de Falk y Benson (1953); en ciertas experiencias se empleó también el procedimiento descrito por With (1975). Pero fundamentalmente, la mayor parte de los datos se obtuvieron aplicando la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), desarrollada en nuestro laboratorio. Por cuanto podemos encontrar una descripción detallada de los métodos anteriores (Batlle y Benson, 1966; Cornford y Benson, 1963; With, 1975) en la Tesis de Rossetti (1978), se hará sólo referencia a los métodos de HPLC.

Una vez obtenida la concentración adecuada de porfirinas esterificadas, se filtraron las mismas a través de un filtro Millipore de 0,22 μ .

Según el método de Poic et al (1983 b), las condiciones empleadas para la separación de los ésteres metílicos de las porfirinas formadas fueron las siguientes:

- Solventes: acetato de etilo:n-hexano (55:45, v:v)
- Flujo: 2 ml/minuto
- Presión: 42-50 atm
- Tiempo de retención: 2 a 8 minutos
- Volumen de muestra inyectado: 10 μl

En estas determinaciones se utilizó una columna (l=25 cm; ϕ_i 4,6 mm) rellena con Spherisorb S5^M de Spectra -Physics (Figura 4.1.)

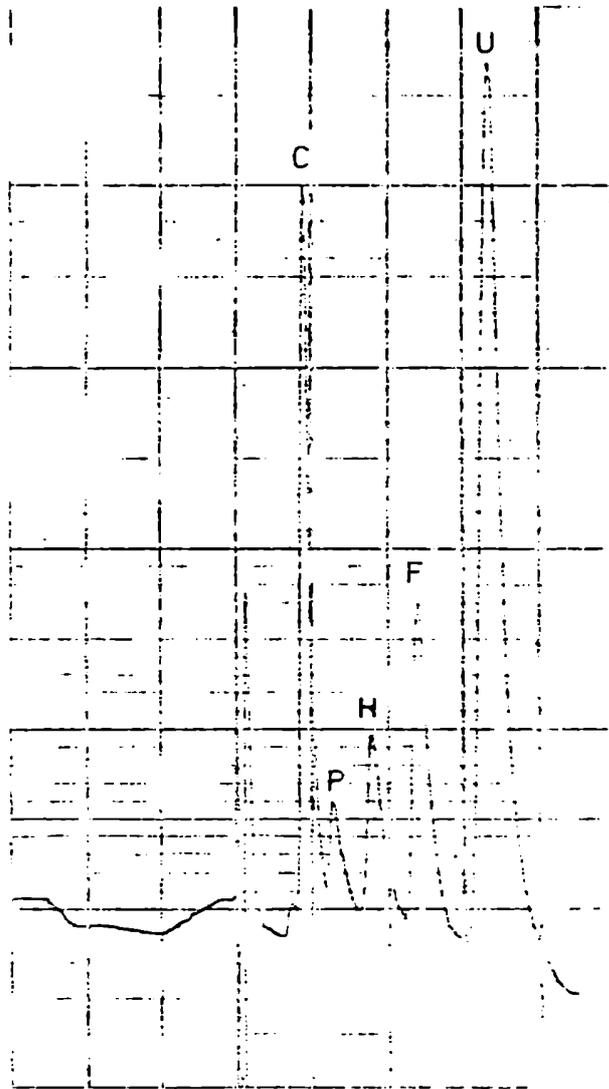


FIGURA 4.1.: Cromatograma de separación de porfirinas esterificadas

La determinación del tipo isomérico de las uroporfirinas sintetizadas se efectuó según el método de Polo et al (1983 a), siendo las condiciones empleadas las siguientes:

- Solventes: acetato de etilo:n-hexano (40:60, v:v)
- Flujo: 1 ml/minuto
- Presión: 25 atm
- Tiempo de retención:
- Volumen de muestra inyectado: 10 μ l

En estas determinaciones se utilizó una columna Spherisorb S5W (Spectra-Physics) con relleno de sílica de 5 μ , provista de pre-columna con relleno de sílica de 10 μ SI 10 de Varian (Figura 4.2.).

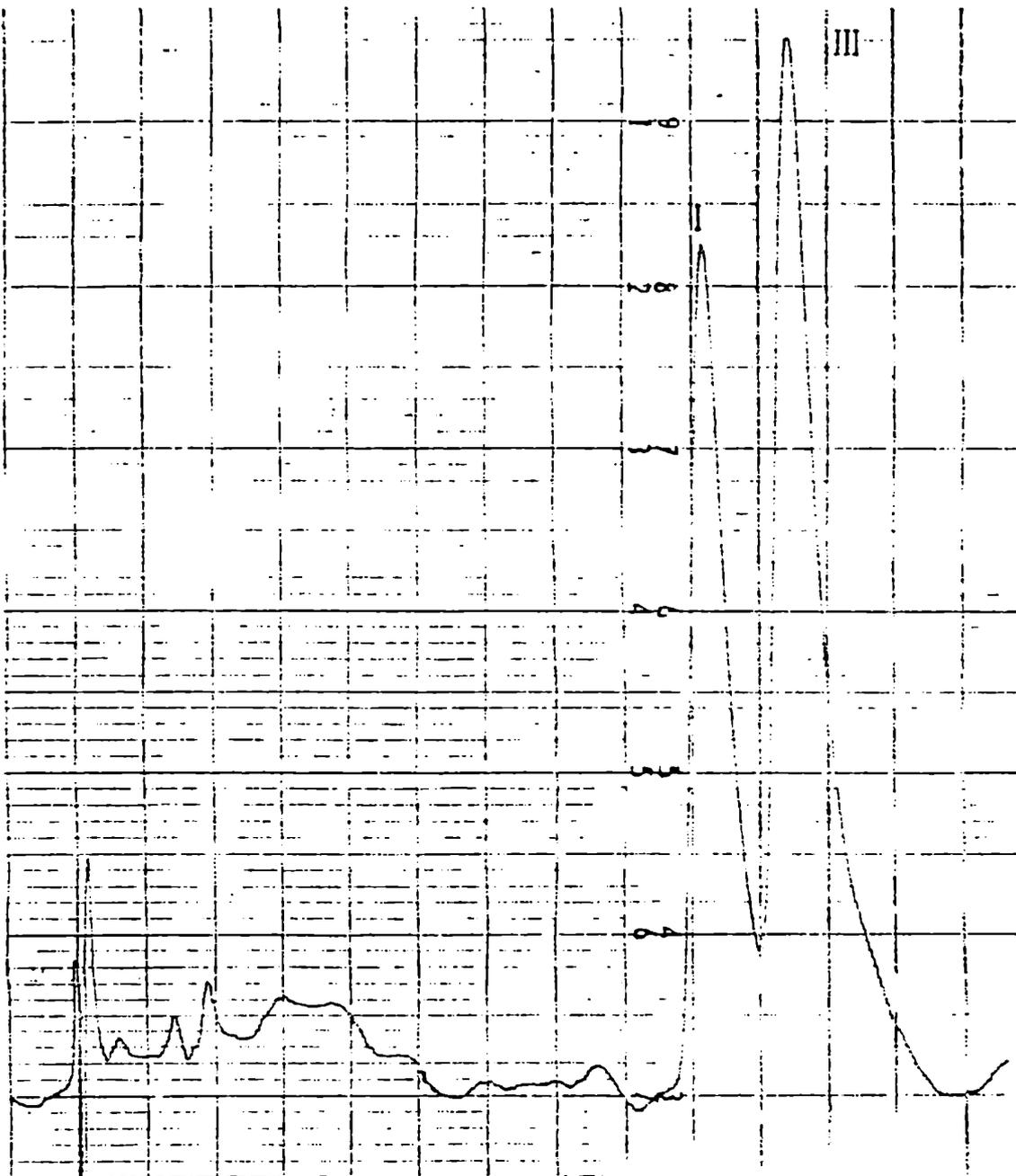


FIGURA 4.2.: Cromatograma de separación de uroporfirinas esterificadas.

CAPITULO V

ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR

V. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR (P.M.)

La filtración por geles constituye el método más simple y rápido para determinar el peso molecular de distintas proteínas.

El armado de las columnas así como el tratamiento previo de los geles fue el descrito por Batlle (1968). En nuestro caso se emplearon geles de dextrano (Sephadex), estimándose el peso molecular según la metodología de Andrews (1964, 1965).

La calibración de las columnas se efectuó utilizando proteínas de peso molecular conocido graficándose V_e/V_o en función del $\log P.M.$ (Figura 5.1.).

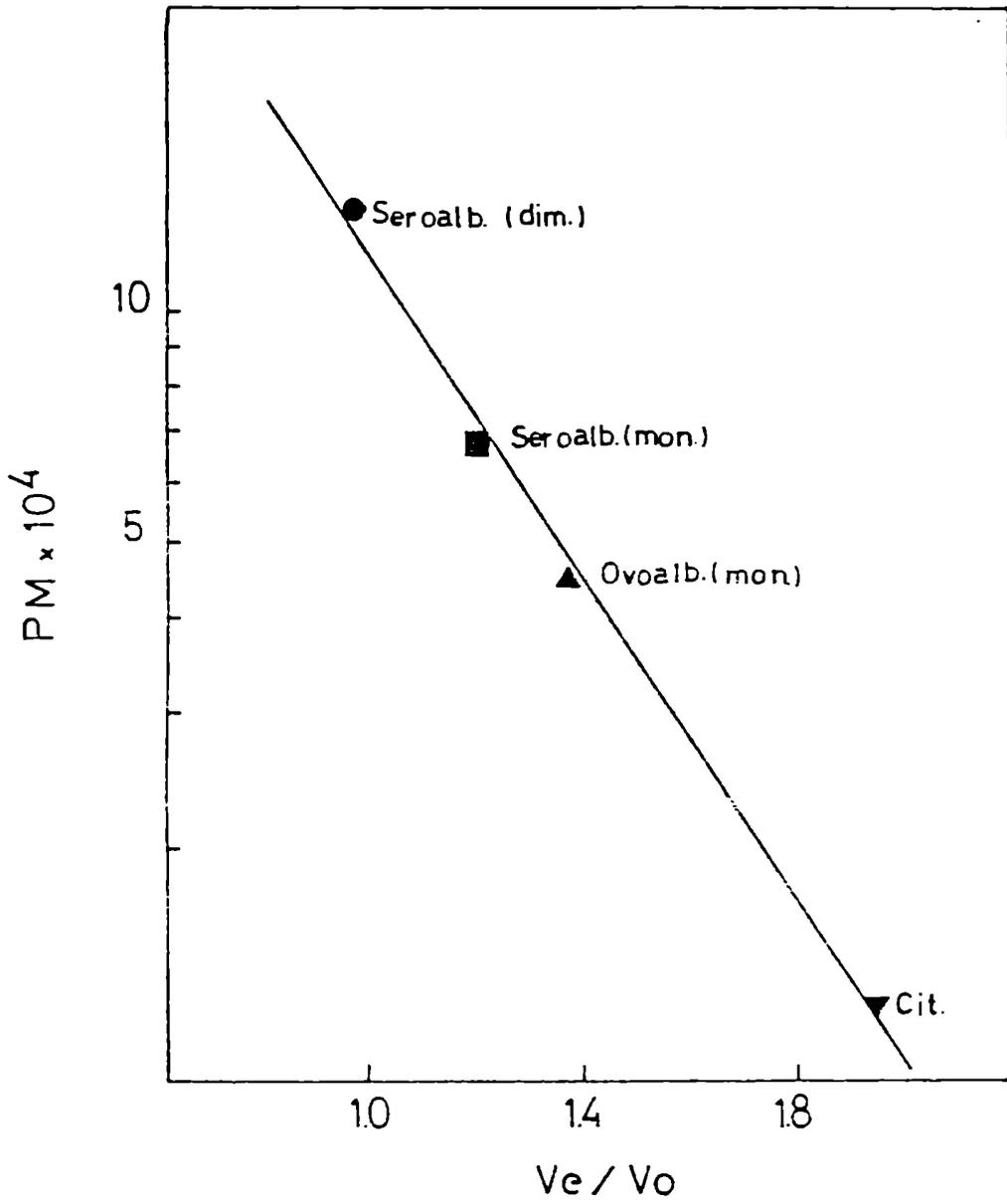


FIGURA 5.1.: Curva de calibración para la determinación de PM, empleando una columna de Sephadex G-100

REFERENCIAS

- Andrews, P. (1964), *Biochem. J.* 91, 222.
- Andrews, P. (1965), *Biochem. J.* 96, 595.
- Batlle, A.M. del C. (1968), *Ciencia e Investigación* 24 (6) 242.
- Batlle, A.M. del C. & Benson, A. (1966), *J. Chromatogr.* 25, 117.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1962), *Latin-Am. Meeting Chem.*, 8th, Buenos Aires, Abstr., p 107.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 82, 1.
- Cohen-Bazire, G.; Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y. (1957), *J. Cell Comp. Physiol.* 49, 25.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1954), *Biochem. J.* 57, 476.
- Cornford, P.A.D. & Benson, A. (1963), *J. Chromatog.* 10, 141.
- De Moss, R.D. & Bard, R.C. (1957), *Manual of Microbiological Methods*, Society of American Bacteriologists (Pelczar, M.J.; Chairman) p.169; Mc Graw-Hill Co. Inc., New York.
- Falk, J.E. & Benson, A. (1953), *Biochem. J.* 55, 101.
- Kalckar, H.M. (1947) *J. Biol. Chem.* 167, 461.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1983) en preparación.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Moore, D. & Labbe, R. (1964), *Clin. Chem.* 10, 1105.
- Polo, C.; Schoua, E. & Batlle, A.M. del C. (1983 a) en preparación.
- Polo, C.F.; Stella, A.M.; Wider, E.A.; Batlle, A.M. del C.; Lenczner, J.M.; Altuna, C. & Magnin, P.H. (1983 b) *Rev. Arg. Dermatol.*, en prensa.
- Price, C.A. & Carell, C.F. (1964), *Plant Physiol.* 39, 862.
- Price, C.A. & Valle, B. (1962), *Plant Physiol.* 37, 428.
- Rimington, C. (1960), *Biochem. J.* 75, 620.

- Rimington, C. y Sveinsson, S.L. (1950) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2, 209.
- Rossetti, M.V.(1978) Tesis de Doctorado en Química (FCEN) (UBA).
- Rossetti, M.V. y Battlle, A.M. del C. (1977) Int. J. Biochem. 8, 277.
- Viale, A. A. (1978) Tesis de Doctorado en Química (FCEN) (UBA).
- Warburg, O. y Christian, W. (1941) Biochem. Z. 310, 384.
- With, T. (1975) Danish Medical Bulletin 22, 77.

RESULTADOS

Y

DISCUSION

P

BIOSINTESIS DE PORFIRINOGENOS EN *Rp. palustris*

CAPITULO P I

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA PBG-ASA DE *Rp. palustris*

P.I.1. Generalidades

P.I.2. Determinación de las condiciones óptimas para el aislamiento y medición de la actividad

- P.I.2.1. Curva de crecimiento y de actividad de PBG-asa en función de los días de desarrollo
- P.I.2.2. Atmósfera de incubación
- P.I.2.3. Selección del buffer de extracción y técnica de homogeneización
- P.I.2.4. Efecto del tiempo de sonicación
- P.I.2.5. Saturación por sustrato
- P.I.2.6. Tiempo de incubación
- P.I.2.7. Efecto de la cantidad de proteína
- P.I.2.8. pH óptimo

P.I.3. Purificación de la enzima y peso molecular

- P.I.3.1. Ensayos preliminares
 - P.I.3.1.1. Tratamiento con ácido acético glacial
 - P.I.3.1.2. Fraccionamiento con sulfato de amonio
 - P.I.3.1.3. Tratamiento con gel de fosfatos
- P.I.3.2. Purificación de la enzima y determinación de su peso molecular

P.I. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA PBG-asa

P.I.1. Generalidades

Dentro de la familia de las bacterias fotosintéticas sólo encontramos datos acerca de la deaminasa en *Rp. spheroides*. Teniendo en cuenta su estrecho parentesco con *Rp. palustris* y el hecho llamativo de que en esta última bacteria la información acerca de las enzimas involucradas en el camino de los tetrapirroles, está reducida únicamente a investigaciones de nuestro laboratorio sobre el ALA-S (Viale, 1978; Viale et al, 1980 a, b), es que resultó de sumo interés, emplear este organismo para nuestros estudios sobre la síntesis enzimática de porfirinógenos a partir de PBG.

Los ensayos iniciales de esta etapa comprendieron una serie de experiencias tendientes a determinar las condiciones óptimas para la detección, extracción y medición de la actividad enzimática en esta bacteria, para luego enfocar los estudios de purificación de la PBG-asa.

Cabe notar que tanto para el caso de *Rp. palustris* como con *Euglena gracilis*, los datos que se presentan corresponden o bien a valores obtenidos en experiencias típicas o bien a promedios de repetidos ensayos, y siempre cada cifra proviene de duplicados.

Como se ha indicado en Materiales y Métodos, las actividades enzimáticas se han determinado en función de la cantidad de porfirinas formadas y también en base a la cantidad de PBG consumido; por lo general se informarán ambos valores, aunque en algunos casos sólo se presentarán los primeros discutiéndose o haciéndose mención en el texto acerca de los segundos.

Finalmente, salvo se indique lo contrario, todas las operaciones posteriores a partir de la etapa de cosecha, se llevaron a cabo entre 4-6 °C.

P.I.2. Determinación de las condiciones óptimas para el aislamiento y medición de la actividad

P.I.2.1. Curva de crecimiento y de actividad de PBG-asa en función de los días de desarrollo

El crecimiento bacteriano puede definirse en función de la masa celular o del número de células. Por lo general, cuando se trata de estudios bioquímicos, la concentración o actividad de una enzima o de un compuesto en particular se refiere a la masa bacteriana, mientras que en estudios genéticos es más conveniente el empleo del número de células.

El parámetro más usualmente utilizado para determinar la masa celular es la turbidez, cuya rápida medición en el espectro fotómetro, permite conocer la densidad del cultivo. Empleando en nuestro caso la D_{0} a 680 nm como medida de la turbidez se obtuvo la curva que se ilustra en la Figura P.I.1, en la cual se observan las tres fases clásicas de crecimiento bacteriano.

Al mismo tiempo se midió la actividad, apreciándose que, en función del producto formado, el aumento es lento y lineal, y recién después de las 60 horas de desarrollo el incremento es mayor, cuando las células ya se encontraban en la fase estacionaria; no alcanzándose el plateau aún luego de 80 horas de crecimiento.

De todas maneras se procedió a cosechar el tejido a las 72 horas, al finalizar la fase exponencial, antes del agotamiento de algún nutriente esencial y para evitar la acumulación de algún producto metabólico tóxico.

P.I.2.2. Atmósfera de incubación

Considerando que en la mayoría de los tejidos, con excepción de callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 a) y *Euglena gracilis* (Rossetti y Batlle, 1977) la PBG-asa funciona igualmente en aerobiosis como en anaerobiosis, se determinó cuál era la atmósfera más conveniente en este caso.

En la Figura P.I.2, podemos observar que en *Rp. palustris* la formación de porfirinas a partir de PBG, es prácticamente la

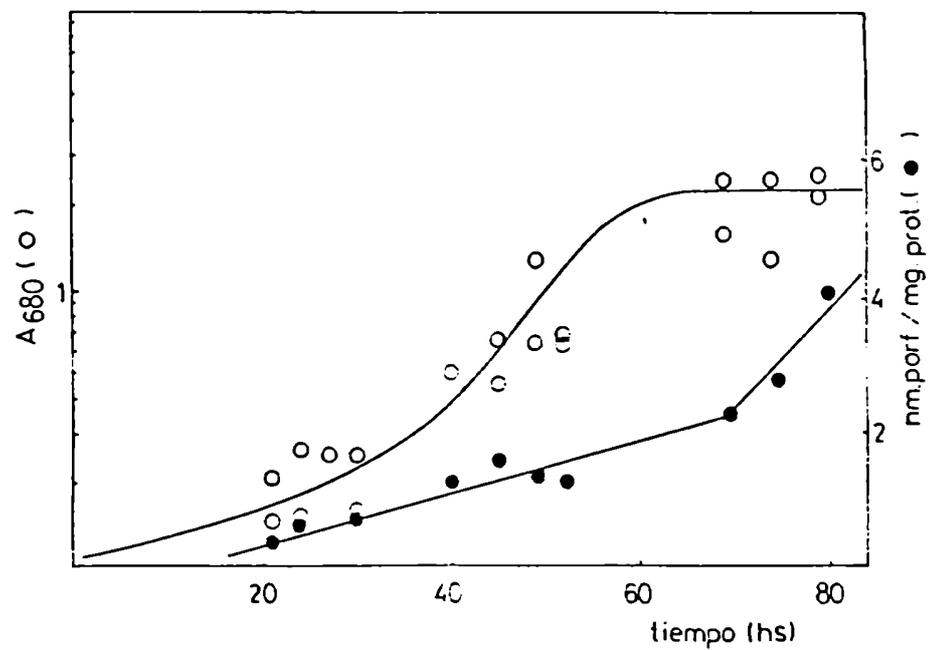


FIGURA P.I.1.: Curva de crecimiento y de actividad en función de los días de desarrollo.
 La obtención de la fracción Sobrenadante y el sistema de incubación empleado son los detallados en Métodos. Se utilizó 1 hora como tiempo de incubación.
 ○ A₆₈₀; ● nmoles porf/mg P

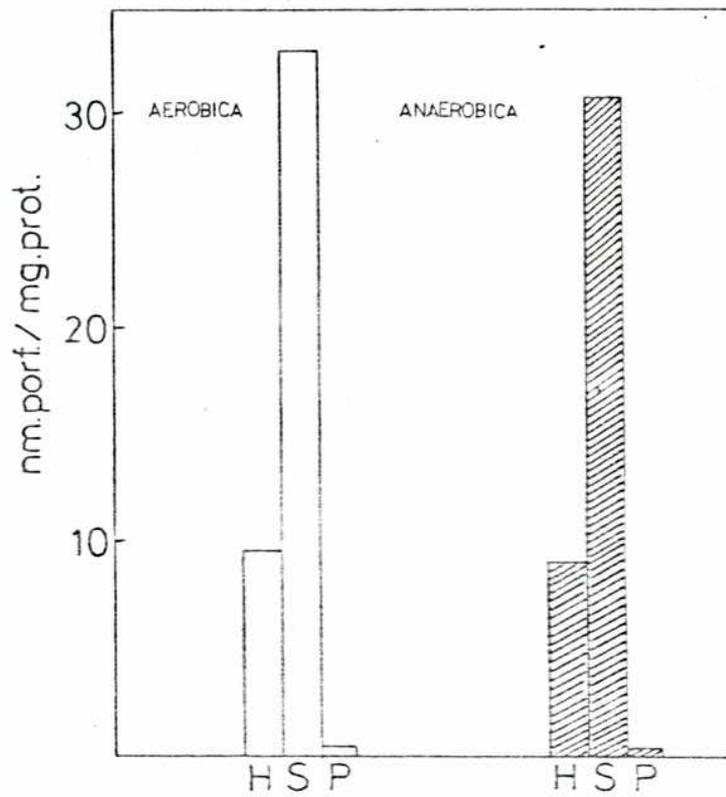


FIGURA P.I.2.: Variación de la actividad enzimática con la atmósfera de incubación. Las condiciones de incubación y la obtención de las fracciones Homogenato (H), sobrenadante (S) y pellet (P) son las detalladas en Métodos, habiéndose empleado 2 horas como tiempo de incubación.
 □ aerobiosis; ▨ anaerobiosis

misma en ambas atmósferas y agreguemos que tampoco el consumo de sustrato está afectado por la presencia de oxígeno.

Apreciamos además ya en estas experiencias que la actividad enzimática se concentra en la fracción soluble del sobrenadante, no obteniéndose producto ni consumo de PBG cuando se midió actividad en el pellet.

Es de notar también que no se detectaron diferencias significativas en cuanto a los tipos isoméricos de las porfirinas formadas según la atmósfera fuera aeróbica o anaeróbica.

En consecuencia se resolvió emplear la fracción sobrenadante e incubar en aerobiosis.

P.I.2.3. Selección del buffer de extracción y técnica de homogenización

Hasta el momento se estuvo extrayendo la enzima empleando buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4, por sonicación durante 60 segundos. Se determinó entonces cuál sería el buffer y el pH más conveniente para la extracción, para lo cual se utilizaron soluciones de buffer fosfato de sodio 0,05 M, TRIS-HCl 0,05 M y glicina-NaOH 0,05 M de distintos pH's para la preparación del homogenato; luego se incubó en buffer TRIS-HCl pH 7,4. En la Tabla P.I.1. se ilustran los datos obtenidos; se encontró máxima actividad empleando buffer TRIS-HCl pH 7,4-7,8 y fosfato de sodio en igual rango de pH, observándose que este último extrae menos proteínas que los otros dos buffers utilizados.

Por otro lado, se compararon la técnica de homogeneización por sonicación y mecánica empleando un Potter-Elvehjeem (émbolo de teflón y pistón de vidrio), usando en ambos casos de 6-8 ml por vez de una suspensión de células en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 y TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4, correspondiente a una lectura de 0,500 a 680 nm luego de una dilución de 200 veces en agua. La sonicación fue de 60 segundos (en dos períodos de 30 segundos).

Sin lugar a dudas solamente por sonicación se logró extraer proteína enzimáticamente activa (Figura P.I.3.).

De manera que de acuerdo con estos resultados, se seleccio

TABLA P.I.1.: Condiciones de extracción

BUFFER Y pH DE EXTRACCION	PROTEINA EXTRAIDA mg/ml	ACTIVIDAD			
		nmoles	nmoles/mg P	nmoles	nmoles/mg P
Fosfato de Na 0,05 M pH's 6,5 7,4 7,8 8,0	2,87	8,60	14,96	89,15	155,04
	2,54	9,95	19,55	180,80	355,19
	2,30	10,04	21,83	177,02	384,82
	3,30	11,46	17,34	106,86	161,67
TRIS HCl 0,05 M pH's 7,4 7,8 8,5 9,0	4,60	19,33	21,04	158,87	172,87
	4,68	18,66	19,91	161,23	172,07
	4,12	9,95	12,06	101,32	122,83
	6,45	15,92	12,34	125,72	97,46
Glicina-NaOH 0,05 M pH's 10,0 10,6	5,78	14,69	12,66	124,15	107,01
	3,65	12,12	16,60	153,72	210,68

Las condiciones de incubación se encuentran detalladas en Métodos. La actividad enzimática se midió en la fracción sobrenadante obtenida según se describe en la misma sección, utilizándose los buffers a los pH's aquí indicados para la extracción de la proteína.

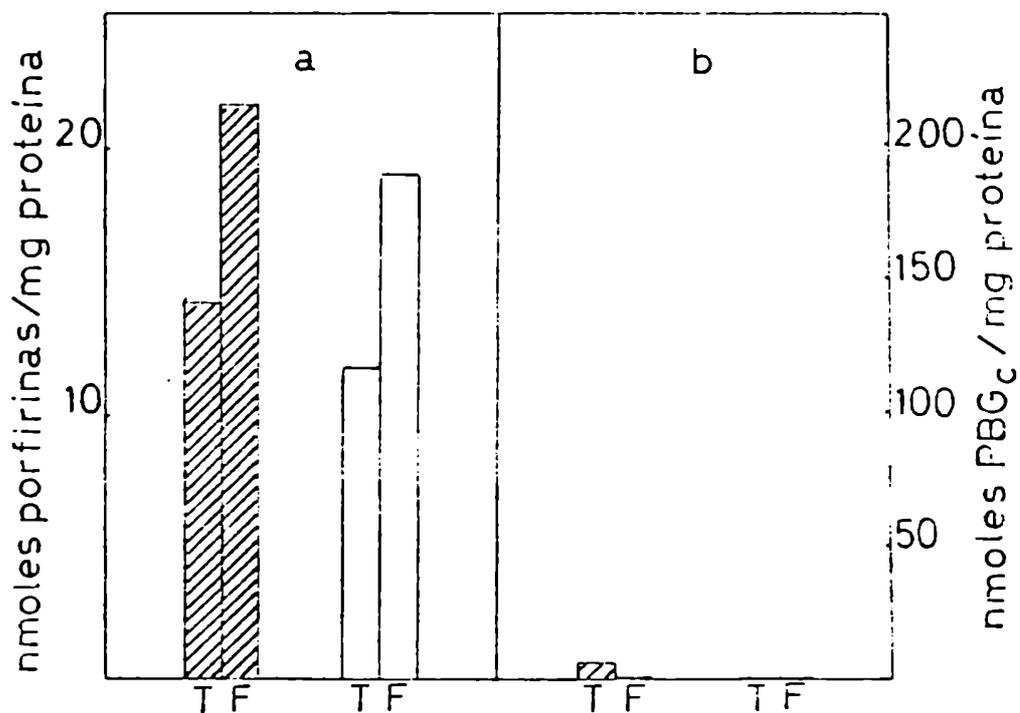


FIGURA P.1.3.: Efecto de la técnica de homogeneización sobre la actividad de la fracción S. La obtención de dicha fracción y el sistema de incubación empleado son los detallados en Métodos. Se utilizó 1 hora como tiempo de incubación.
a: sonicación; b: potter; T: buffer TRIS-HCl; F: buffer fosfato de Na
▨ nmoles de porf/mg prot.
□ nmoles de PBG_c/mg prot.

nó el buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 como buffer de extracción y la sonicación como técnica de homogeneización.

P.I.2.4. Efecto del tiempo de sonicación

Adoptado como más conveniente el método de homogeneización por ultrasonido, era necesario establecer el intervalo óptimo para lo cual se sonicaron volúmenes constantes de suspensión (6 ml) durante períodos variables. En la Figura P.I.4., como era de esperar, al aumentar el tiempo de sonicación se observa un incremento en la proteína liberada. En cuanto a la actividad específica, en función de las porfirinas formadas, aparece un pico a los 60 segundos. Con respecto al tipo de porfirinas formadas en los diferentes tiempos, hubo máxima formación de tipo III a los 60 y 90 segundos de sonicación y una significativa disminución de Uro III acompañada de un incremento en los productos de decarboxilación a 120 segundos, indicando una mayor liberación de las decarboxilasas y probablemente también inactivación de la isomerasa o del complejo. En consecuencia, se adoptó el intervalo de 60 segundos como tiempo de sonicación

P.I.2.5. Saturación por sustrato

Hasta el momento se venía empleando 60 μg de PBG (177 μM) en la mezcla de reacción; para optimizar esta variable se efectuó una curva de saturación por sustrato. Se observa en la Figura P.I.5. que la actividad de la PBG-asa medida en función de las porfirinas formadas siguió un perfil sigmoideo al variar la concentración de PBG. Sin embargo, aún a los mayores valores de sustrato, su consumo mostró un comportamiento lineal sin llegar a la saturación. Las gráficas de actividad específica son similares a las de esta figura y volveremos a ocuparnos en particular del análisis de la cinética de esta reacción más adelante.

Con estos datos se decidió continuar empleando una concentración de PBG de 177 μM .

Como ya fuera observado con la PBG-asa de callos de soya (Llambías, 1971) y *Euglena* (Rossetti, 1978) tampoco en este caso se cumplió la razón estequiométrica de 4 moles de PBG por 1 mol de porfirinógeno (Tabla P.I.2. y Figura P.I.6.) a ninguna

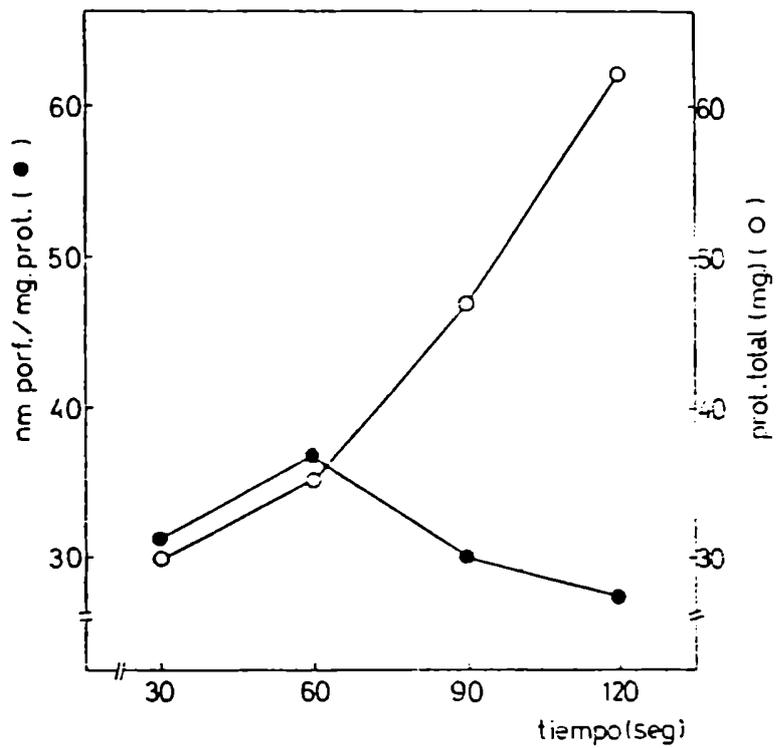


FIGURA P.I. 4.: Efecto del tiempo de sonicación sobre la formación total de porfirinas. La fracción Sobrenadante u tilizada como fuente enzimática y las condiciones de incubación son las descritas en Métodos, empleándose 2 horas como tiempo de incubación.
 ○ mg proteínas totales;
 ● nmoles porf/mg P

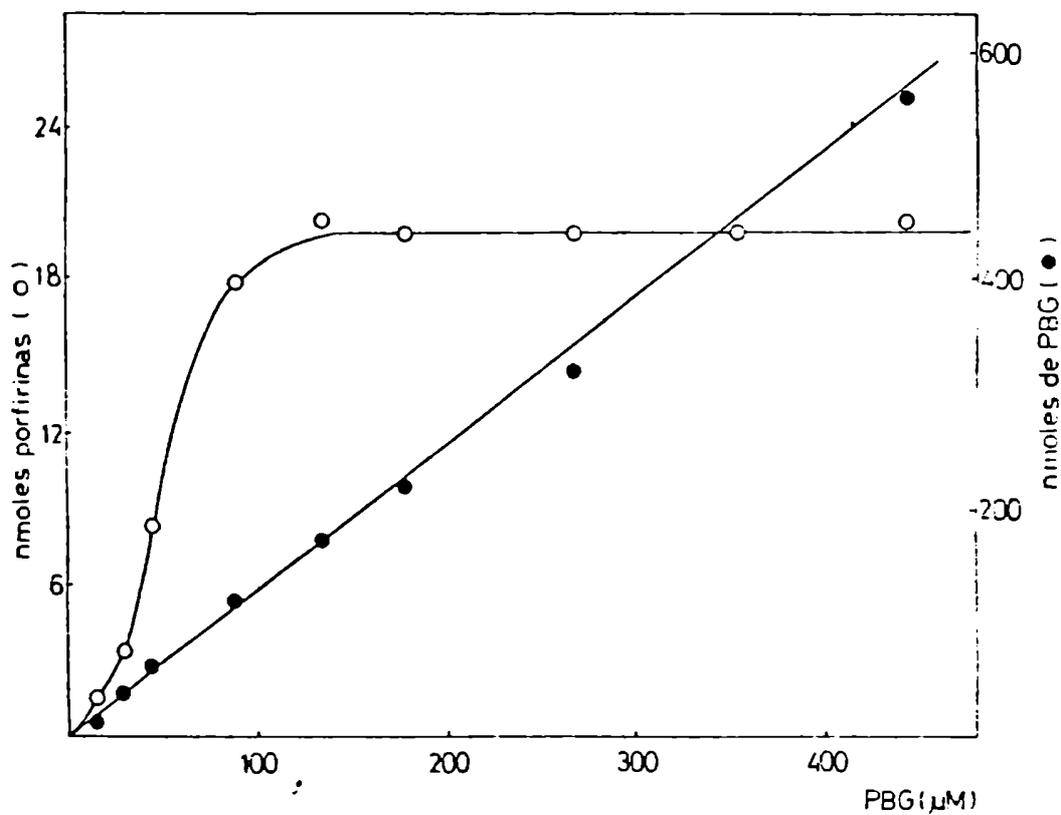


FIGURA P.I.5.: Curva de saturación por sustrato. La obtención de la fracción sobrenadante utilizada como fuente enzimática y las condiciones de incubación empleadas son las detalladas en Métodos, habiéndose incubado durante 2 horas.
 ○ nmoles de porfirinas formadas;
 ● nmoles de PBG consumido

TABLA P.I.2: Estequiometría de la reacción de conversión de PBG en Uroporfirinas
en PBG-asa de *Rp. palustris*

µg	PBG AGREGADO		PBG CONSUMIDO		PORFIRINAS FORMADAS		R
	nmoles	µM	µg	nmoles	Teórico (*)	Reales	
5	22,6	14,75	4,23	18,5	4,6	1,549	3,00
10	43,8	29,50	8,56	37,6	9,4	3,390	3,00
15	66,4	44,25	14,00	61,6	15,4	8,390	2,00
30	133,0	88,70	27,00	118,8	29,5	17,860	2,00
45	199,0	132,70	39,40	171,0	42,7	20,310	2,10
60	265,0	177,00	49,50	218,0	54,5	19,720	2,76
90	398,0	265,00	72,50	319,0	79,7	19,820	4,02
120	531,0	354,00	100,40	442,0	110,0	19,840	5,54
150	664,0	442,00	126,60	557,0	193,3	20,280	6,86

(*) Calculado en base al PBG realmente consumido

(**) Relación entre $\frac{\text{nmoles porfirinas teóricas}}{\text{nmoles porfirinas reales}}$

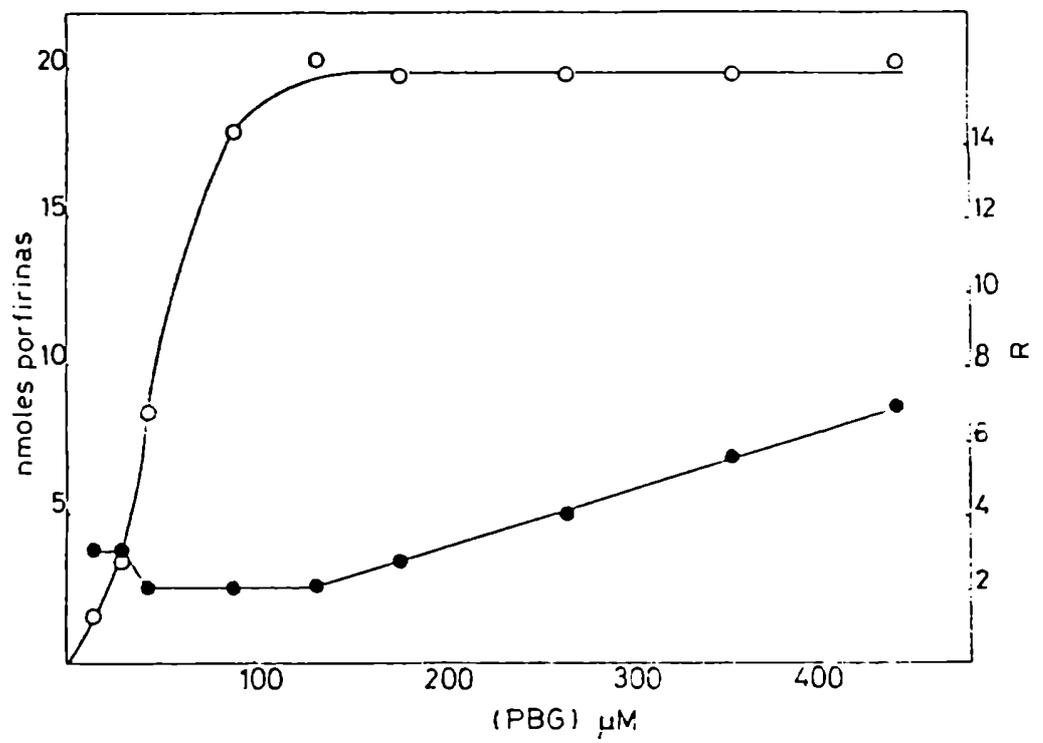


FIGURA P.I.6.: Curva de saturación por sustrato.
 R: relación entre la cantidad de porfirinas obtenidas teórica y experimentalmente.

$$R = \frac{\text{nmoles porfirinas teóricas}}{\text{nmoles porfirinas experimentales}}$$

de las concentraciones de sustrato empleadas. En la parte inicial correspondiente a la zona sigmoidea, se empleó un exceso de 3 veces la cantidad de PBG, luego entre aproximadamente 40 y 130 μM , hasta llegar a la saturación, se consume el doble de PBG por cada mol de porfirinógeno formado, y finalmente, la relación aumenta en forma lineal. Un comportamiento bastante similar habíamos observado, analizando la PBG-asa de pellet de *Euglena* (Rossetti, 1978), excepto que en ese caso el perfil había sido hiperbólico, de manera que hubo sólo diferencias en la relación a las menores concentraciones de PBG.

P.I.2.6. Tiempo de incubación

En estos ensayos iniciales se estuvo empleando como tiempo de incubación 2 horas; con el objeto de confirmarlo o mejorar las condiciones, se estudió más en detalle el efecto de este parámetro sobre la actividad enzimática.

En la Figura P.I.7. se observa que, si consideramos las porfirinas totales producidas, hay un incremento lineal de las mismas al aumentar el período de incubación hasta las 3 horas, luego de lo cual, parece alcanzarse un plateau. En cambio, cuando medimos el consumo de PBG, al parecer, después de la primer hora no hay una utilización adicional de sustrato. Como se señalara para la Figura P.I.5. también en este caso los perfiles de actividad específica en función del tiempo de incubación son similares a los ilustrados en la Figura P.I.7. Con respecto a la clase de porfirinas formadas, se debe señalar que, se observó un incremento en la cantidad de coproporfirina, y hubo además una ligera disminución de las porfirinas de tipo isomérico III.

En consecuencia se adoptó 1 hora como tiempo standard.

P.I.2.7. Efecto de la cantidad de proteína

Ya en las experiencias iniciales de estos estudios fue evidente que la actividad de la enzima de *Rp. palustris* era relativamente alta en comparación con cualquiera de los demás tejidos; de allí que hasta este momento se había venido empleando aproximadamente 1 mg de proteína por ensayo. Para ajustar aún más las condiciones, utilizando siempre el sobrenadante, se estu

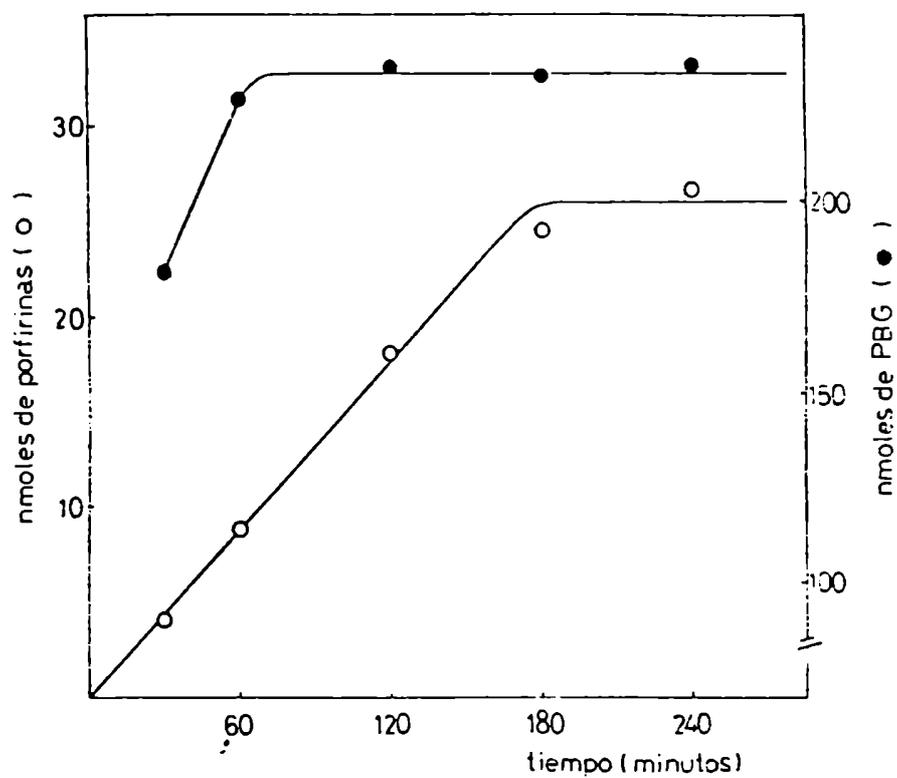


FIGURA P.I.7.: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática. La fracción sobrenadante utilizada como fuente enzimática y las condiciones de incubación son las descritas en Métodos.
 ○ nmoles de porfirinas formadas;
 ● nmoles de PBG consumidos

dió la influencia de la cantidad de proteína sobre la actividad.

En la Figura P.I.8 a. se observa que los nmoles de porfirinas totales ya alcanzan su máximo para 0,8 mg de proteína, disminuyendo luego bastante abruptamente para cantidades mayores de enzima; el consumo de sustrato llega a un máximo también con 0,8 mg, y luego aunque se aumente la proteína no ocurre consumo adicional. Sin embargo es de notar que aún en las mejores condiciones todavía queda un 40-42% de sustrato remanente, como ya se ha observado en otros casos, como por ejemplo utilizando las enzimas de *Euglena* (Rossetti, 1978).

Considerando las actividades específicas (Figura P.I.8.b.) en función del producto formado, tenemos el pico entre 0,2-0,4 mg de proteína, mientras que, como era de esperar con respecto al PBG consumido, éste decrece continua y rápidamente hasta los 0,8-1,2 mg y luego en forma mucho menos pronunciada.

De acuerdo con estos resultados se redujo la cantidad de proteína empleada a aproximadamente 0,4 mg.

P.I.2.8. pH óptimo

Se ha comentado ya que en la mayoría de las fuentes, el pH óptimo de esta reacción se encuentra en la zona neutra. Empleando entonces la fracción sobrenadante en buffers 0,05 M de glicina-NaOH, fosfato de sodio y TRIS-HCl, como para cubrir un rango de pH entre 6 y 10,5, se investigó el efecto del pH sobre la actividad enzimática.

En la Figura P.I.9. se puede observar que cuando la actividad se mide en función de las porfirinas formadas, hay un sólo máximo bien definido a pH 7,4 tanto para buffer TRIS-HCl como para fosfato de sodio, disminuyendo rápidamente a valores de pH mayores o menores. También se aprecia nuevamente que la actividad es siempre relativamente superior en buffer TRIS-HCl que en fosfato de sodio a iguales pH's.

Cuando analizamos el perfil correspondiente al PBG consumido, encontramos un pico coincidente con el ya mencionado en la zona neutra, a pH 7,4; pero además hay un segundo máximo a pH 8,5. Recordemos que este comportamiento ya se había observado estudiando las enzimas de callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 a) y

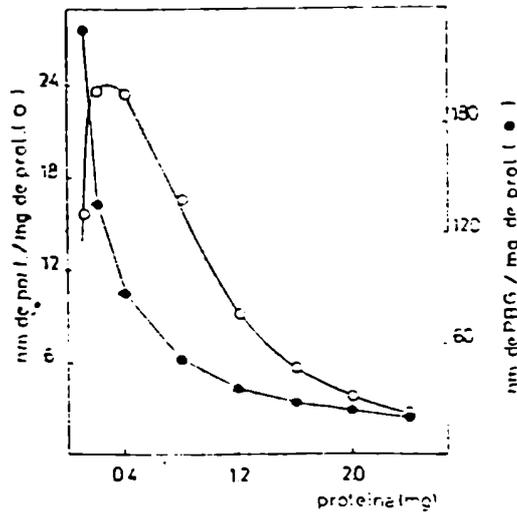
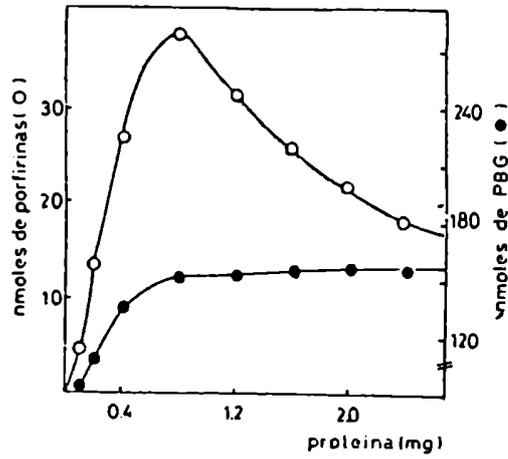


FIGURA P.I.8.: a) Efecto de la cantidad de proteína enzimática sobre la formación total de porfirinas y el consumo de sustrato.
 ○ nmoles de porfirinas;
 ● nmoles de PBG consumido

b) Efecto de la cantidad de proteína enzimática sobre la actividad específica.
 ○ nmoles porf/mg P; ● nmoles PBG/mg P

La obtención de la fracción Sobrenadante y las condiciones de incubación utilizadas son las detalladas en Métodos, habiéndose empleado 2 horas como tiempo de incubación

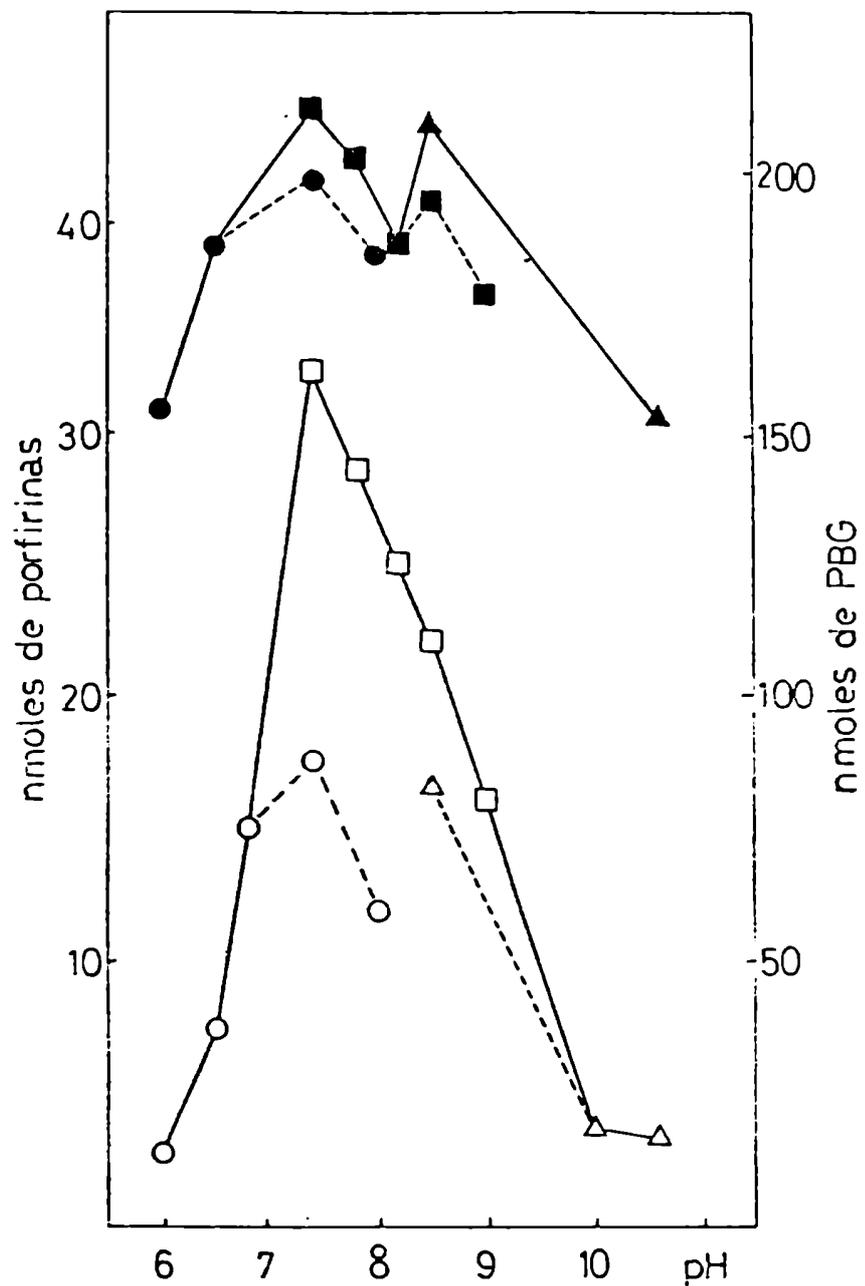


FIGURA P.I.9.: Efecto del pH de incubación en la formación total de porfirinas (○, □, △) y en el consumo de PBG (●, ■, ▲). Los buffers empleados fueron los siguientes: (○, ●) fosfato de sodio; (□, ■) TRIS-HCL; (△, ▲) glicina-NaOH. La fracción sobrenadante se obtuvo según se detalla en Métodos. La preparación enzimática se incubó en las condiciones standards durante 1 hora.

Euglena (Rossetti, 1978). De manera que la reacción que lleva a la formación de las porfirinas tendría un único pH óptimo. En cuanto al consumo de sustrato, existen dos pH's que favorecen la unión del PBG, encontrándose uno solo de ellos involucrado en la actividad de la PBG-asa (pH 7,4).

Recordemos que en condiciones aeróbicas, el PBG puede también consumirse por acción de otra enzima: la PBG-oxigenasa (Frydman et al, 1972; Tomaro et al, 1977), de manera que la actividad observada a pH 8,5 podría no ser específica de PBG-asa.

Es interesante mencionar que cuando nos desplazamos hacia la zona alcalina hay un aumento de las porfirinas de tipo isomérico I (Figura P.I.10.) y correspondientemente en la zona neutra y aún ácida predomina o hallamos únicamente el tipo III.

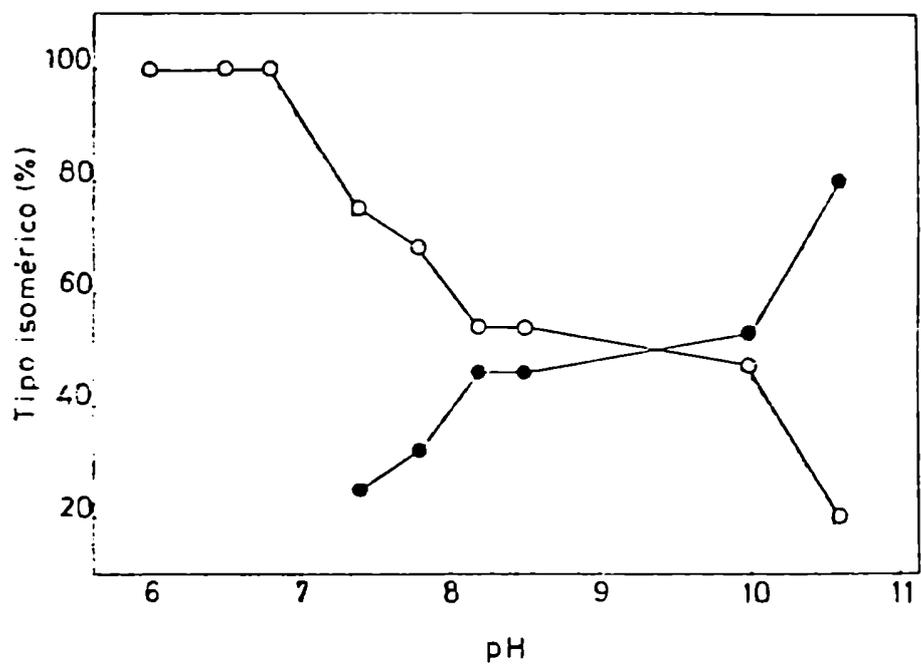


FIGURA P.I.10.: Efecto del pH sobre el tipo isomérico
○ tipo III; ● tipo I

P.I.3. Purificación de la enzima y peso molecular

P.I.3.1. Ensayos preliminares de purificación

Se llevaron a cabo una serie de ensayos para la obtención de una fracción de PBG-asa purificada a partir de *Rp. palustris* entre los cuales mencionaremos:

P.I.3.1.1. Tratamiento con ácido acético glacial

Con frecuencia se ha empleado la precipitación del primer sobrenadante activo con ácido acético glacial a pH 5, para la separación de proteínas contaminantes, con buenos resultados. Sin embargo, este tratamiento produjo una inactivación total de la enzima como podemos observar de los datos ilustrados en la Tabla P.I.3.

P.I.3.1.2. Fraccionamiento con sulfato de amonio

En la Tabla P.I.4. puede verse que prácticamente el total de la proteína enzimática se concentró en la fracción 35-55%, lográndose una significativa purificación con este procedimiento aunque llamó la atención que luego del fraccionamiento salino disminuyó un 50% la Uro III con respecto a la etapa anterior.

P.I.3.1.3. Tratamiento con gel de fosfatos

Se intentó asimismo, adsorber proteína inactiva sobre gel de fosfatos, para lo cual, a una fracción de 35-55% previamente desalada por Sephadex G-25 (grueso), se la trató en una relación de 2 mg gel/mg proteína.

En la Tabla P.I.5. podemos observar que si bien el grado de purificación resultante en función de las porfirinas formadas aumenta poco, es sin embargo significativo si se tiene en cuenta el consumo de sustrato y además es importante el cambio en cuanto al tipo de porfirinas formadas; aparentemente una buena parte de las decarboxilasas quedaría retenida en el gel, encontrándose un 80% de Uro III. Nuevamente se observó que luego del frac

TABLA P.I.3: Efecto del AcOH (g1)

Fracción	Proteínas (mg/ml)	Porfirinas (nmoles)	nmPorf. mgP.
1) Sobrenadante 27.000xg	4,025	23,080	28,672
2) Pellet 27.000xg	8,340	0,034	0,020
3) Sobrenadante AcOH (g1) pH 5	1,380	0,000	0,000
4) Pellet AcOH (g1) pH 5	0,370	0,000	0,000

La obtención de las dos primeras fracciones se realizó en una centrifuga Spinco (Cabezal 50) a 27.000xg durante 70 minutos. Las condiciones de incubación son las detalladas en Métodos, empleándose 2 horas como tiempo de incubación.

TABLA P.I.4.: Tratamiento con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Fracción	Proteínas (mg/ml)	nmporf.	nmporf. mgp.	nmoles PBGc	nmoles PBGc mgp.
Sobrenadante 27.000xg	3,622	24,640	34,015	178,99	247,05
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$					
0-35%	14,730	0,396	0,135	22,40	7,60
35-55%	1,120	27,950	124,800	190,56	850,72
55-70%	0,230	0,000	0,000	6,75	51,05

Las condiciones de incubación son las detalladas en Métodos, empleándose como tiempo de incubación 2 horas. La obtención de la fracción sobrenadante se realizó en una centrifuga Spinco (cabezal 50) centrifugándose durante 70 minutos a 27.000xg.

TABLA P.I.5.: Tratamiento con gel de fosfatos

Fracción	Proteínas (mg/ml)	nmporf.	nmporf. mgP	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P}}$	Grado de purificación		Porfirinas formadas		
						Porfirinas formadas	Sustrato consumido	URO I	URO III	Productos de carbox.
H	12,65	20,238	7,99	175,36	69,31	1,00	1,00	30	34	36
S	6,30	21,54	17,11	183,05	145,39	2,14	2,10	25	40	35
35-55%	3,50	24,31	34,73	199,25	284,65	4,30	4,10	40	20	40
Sob.gel	1,24	9,30	37,49	202,30	815,75	4,70	11,75	-	80	20

Las condiciones de incubación son las detalladas en Métodos, empleándose como tiempo de incubación 2 horas.

cionamiento salino hay una disminución del porcentaje de Uro' III.

Se decidió entonces aplicar el tratamiento con gel de fosfatos como etapa de purificación de la PBG-asa de *Rp. palustris*.

P.I.3.2. Purificación de la enzima y determinación de su Peso Molecular

Finalmente, la secuencia de pasos establecida para la purificación de la PBG-asa de *Rp. palustris* fue la siguiente (Tabla P.I.6.):

- Etapa 1: Homogenato: se preparó según se detalla en Métodos. El tejido se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 y la dilución se efectuó con el mismo buffer.
- Etapa 2: Sobrenadante de 27.000xg: el homogenato se centrifugó 1 hora a 27.000xg. El pellet obtenido se lavó 3 veces con un volumen total de buffer equivalente al del homogenato. Se reunieron todos los sobrenadantes, descartándose el sedimento final inactivo.
- Etapa 3: Fraccionamiento con sulfato de amonio: el sobrenadante de la etapa anterior se trató con sulfato de amonio sólido hasta un 35% de saturación. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se llevó hasta 55%. Durante todo el proceso, el pH se mantuvo neutro por adición de amoníaco (c). Luego de 40 minutos de agitación, se centrifugó 10 minutos a 10.000xg. El precipitado obtenido se disolvió en el menor volumen posible de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4.
- Etapa 4: Tratamiento con gel de fosfato: el precipitado disuelto en buffer proveniente de la etapa 3 se desaló por pasaje a través de Sephadex G-25 grueso (1,8 cm x 50 cm) equilibrada y corrida con el mismo buffer TRIS-HCl. El eluido proteico se trató con gel de fosfato de calcio (en la relación de 2 mg de gel por mg de proteína). Después de 20 minutos de agitación, la suspensión se centrifugó a 1.000xg durante 10 minutos y el pellet resultante se lavó 2 veces con 1/5 de su volumen de buffer TRIS-HCl. Se reunieron los lavados con el primer sobrenadante y la proteína se concentró por precipitación con sulfato de amonio al 55%, en las condiciones usuales.

TABLA P.I.6.: Purificación de la PBG-asa de *Rp. palustris*

Fracción	Proteína total (mg)	nmporf. / mg P	Unidades totales	Purificación	% Porfirinas formadas		
					URO I	URO III	DECAR
1) Homogenato	2.360,0	7,44	17,553	1	30	34	36
2) Sobrenadante de 27.000xg	1.148,0	26,47	30,389	3,6	28	46	26
3) 35-55% de $SO_4(NH_4)_2$	278,0	38,91	10,841	5,2	40	42	18
4) Sobrenadante gel de fosfatos	181,0	52,57	9,548	7,1	-	80	20
5) Sephadex G-100	2,4	159,09	381,800	22		100	

Las condiciones de incubación son las detalladas en Métodos, empleándose 2 horas como tiempo de incubación.

- Etapa 5: Cromatografía en Sephadex G-100: el precipitado proteico salino anterior, se disolvió en el menor volumen de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4 y se sembró en una columna de Sephadex G-100 (2,5 x 57 cm).

En la Figura P.I.11. se ilustra un perfil de elución característico. Análogamente a lo observado con la enzima de *Euglena* (Rossetti, 1978; Rossetti et al, 1980). aparece una banda principal de actividad (I), que eluye después del primer y mayor pico proteico, y luego una banda menor (II).

La banda I, para la cual corresponde un PM de 115.000 ± 11.500 , forma exclusivamente Uro III a partir de PBG, en tanto que la banda II para la cual se calcula un PM de 50.000 ± 5.000 está todavía acompañada de un pequeño porcentaje de decarboxilasas.

Se obtiene finalmente una fracción muy activa de PBG-asa, purificada 22 veces. Es importante enfatizar que se trataría de la preparación de PBG-asa más activa obtenida hasta ahora.

Otro hecho que se debe comentar y que fuera observado desde las primeras experiencias, es que en el sobrenadante de 27.000xg siempre se ha encontrado una actividad casi dos veces superior a la que resultaría de un simple cálculo de las unidades provenientes del homogenato inicial y del contenido proteico en esa fracción. Este comportamiento tenía alguna similitud con el observado con las enzimas de *Euglena* y en un principio se atribuyó también a la liberación de un factor regulador, por lo cual esta posibilidad se investigó más adelante.

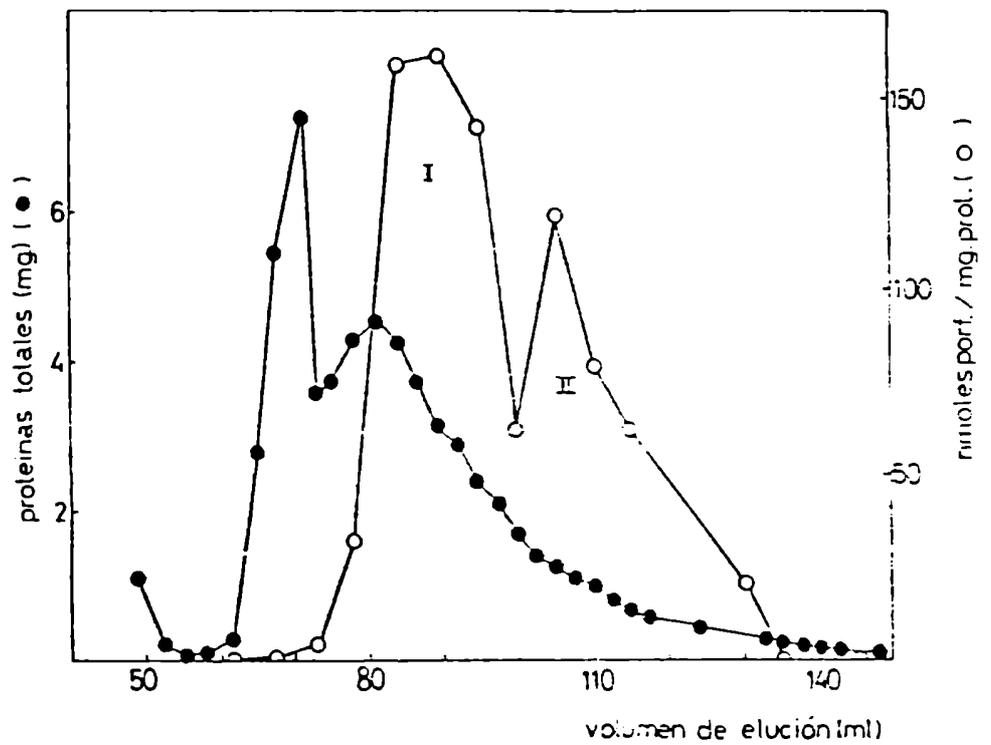


FIGURA P.I.11.: Cromatografía de la fracción Sobrenadante del tratamiento con gel de fosfatos, a través de una columna de Sephadex G-100.
 ● mg proteínas totales; ○ nmoles porf/mg P.
 Las condiciones de incubación son las detalladas en Métodos, empleándose 2 horas como tiempo de incubación.

ALGUNAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA

- P.II.1. Acerca de la existencia de un factor regulador
 - P.II.1.1. Estacionamiento de la fracción S
 - P.II.1.2. Pasaje de la fracción S por una columna de Sephadex G-25
 - P.II.1.3. Efecto de la diálisis
- P.II.2. Cinética de la reacción y efecto de cationes y aniones
 - P.II.2.1. Cinética
 - P.II.2.2. Efecto de iones
 - P.II.2.2.1. Acción de la mezcla $\text{ClNa}-\text{Cl}_2\text{Mg}$
 - P.II.2.2.2. Efecto de iones sodio
 - P.II.2.2.3. Efecto del anión fosfato
 - P.II.2.2.4. Efecto de los iones magnesio

P.II. ALGUNAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA

P.II.1. Acerca de la existencia de un factor regulador

P.II.1.1. Estacionamiento de la fracción S

Ya habíamos observado que la actividad del sobrenadante de 27.000xg era aproximadamente el doble de la esperada, teniendo en cuenta la actividad del homogenato inicial. Esto hizo pensar en la posible liberación de algún compuesto o factor regulador que activara la enzima, por analogía con el comportamiento de la PBG-asa de *Euglena* (Rossetti, 1978) y la deaminasa de hígado de rata (Tephly, 1975). De acuerdo con el esquema propuesto para el mecanismo de acción de este factor (Juknat de Gernalnik et al, 1981), su liberación podría provocar una activación espontánea de la enzima por simple estacionamiento de una suspensión de S o aún de H en buffer. De manera que se investigó esta posibilidad, midiendo la actividad a lo largo del tiempo, de una preparación de S, estacionada, sin agitación a 4 °C. Los resultados se ilustran en la Figura P.II.1.; se observa un decaimiento de la actividad en función de las porfirinas formadas, más rápido durante la primer semana y luego más lento, llegando a un 50% de inactivación alrededor de los 18 días; al cabo de dos meses la actividad remanente era del 10%. En cuanto al sustrato consumido, después de un pequeño incremento de un 15% a las 24 horas hubo poco cambio a lo largo de 20 días; a los 60 días, aún quedaba 60% de la actividad inicial. De todas formas, estos datos no son concluyentes acerca de la existencia de un activador, si bien tampoco la excluyen, por cuanto podría haberse ya liberado en forma total y en corto tiempo, y no ser lo suficientemente estable; sin embargo, esta alternativa es muy poco probable, dadas las conocidas propiedades del factor regulador de *Euglena* y el de citosol de hígado de rata (Tephly, 1975).

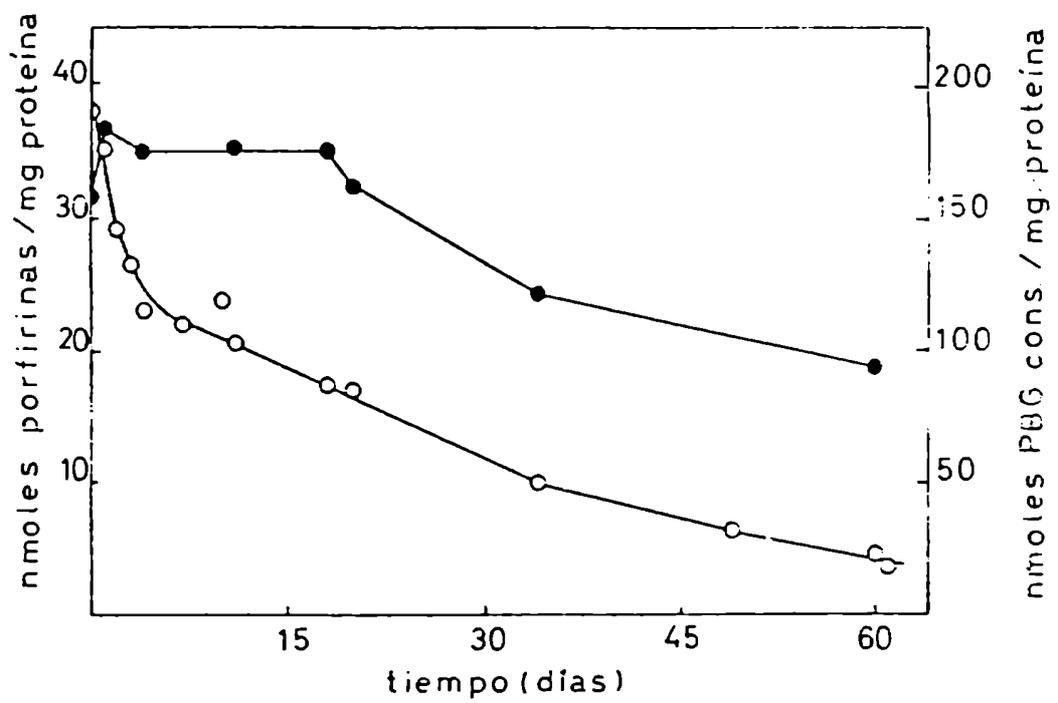


FIGURA P.II.1.: Efecto del estacionamiento sobre la fracción S.
 La obtención de la fracción sobrenadante y el sistema de incubación empleado son los detallados en Métodos. La fracción enzimática se guardó a 4 °C en heladera y a los días indicados se tomaron muestras para determinar actividad.
 (O) nmoles porf/mg P; (●) nmoles PBGc/ mg P

P.II.1.2. Pasaje de la fracción S por una columna de Sephadex G-25

Como ya comentáramos, tanto en *Euglena* como en hígado bovino y de rata, se logró separar un compuesto de bajo peso molecular activador de la PBG-asa. Una técnica simple consistió en la filtración de la preparación enzimática por geles de Sephadex o similares que excluyen totalmente la proteína y retienen moléculas de menor tamaño. Se estudió entonces el comportamiento de la fracción S de *Rp. palustris* pasándola a través de una columna de Sephadex G-25 grueso. Los resultados se muestran en la Tabla P.II.1.

Evidentemente, este tratamiento no afecta la actividad de la fracción S, si tenemos en cuenta la actividad de la proteína filtrada PrS expresada en función del producto formado; hubo sí un aumento notable en cuanto al PBG consumido, pero recordemos que en condiciones aeróbicas, este pirrol puede también consumirse por acción de la pirroloxigenasa, de manera, que el cambio observado no sería específico para la PBG-asa.

Se denominó FSp (supuesto factor regulador en S de *Rp. palustris*) a la fracción de bajo PM, completamente inactiva eluída a los volúmenes mayores; vemos que el agregado de FSp tanto a H como a S no provocó variación significativa, en tanto que aparentemente disminuyó un 30% la de PrS. Nuevamente los datos del consumo de PBG son llamativos, pero inespecíficos. En consecuencia, tampoco estas experiencias arrojaron evidencia alguna acerca de la existencia del factor regulador de la PBG-asa en *Rp. palustris*.

P.II.1.3. Efecto de la diálisis

Se intentó asimismo obtener alguna evidencia acerca de un factor regulador en *Rp. palustris* dializando las fracciones H y S, durante 20 horas contra buffer fosfato de sodio y TRIS-HCl 5 mM pH 7,4. Se mantuvieron como control muestras de H y S en las mismas condiciones durante igual período, las que se denominaron H' y S'. Los resultados se ilustran en las Tablas P.II.2. y P.II.3.

Empleando buffer fosfato diluido (Tabla P.II.2.) se observó que la actividad específica de ambas fracciones, disminuía

TABLA P.II.1.1.: Pasaje de la fracción S por Sephadex G-25

Fracción	Proteínas (mg/ml)	nmporf.	$\frac{nmporf.}{mg P}$	nmoles PBGc	$\frac{nmoles PBGc}{mg P}$
H	9,832	17,314	8,807	125,33	63,75
S	2,311	14,530	31,440	133,06	287,89
PrS	0,742	4,900	33,108	121,73	822,47
H + FSp	4,940	7,760	7,850	124,55	126,06
S + FSp	1,180	6,880	29,150	128,38	543,97
PrS + FSp	0,396	1,860	23,480	85,68	1.081,84
FSp	0,045	0,000	0,000	0,00	0,00

La obtención de las fracciones H y S y el sistema de incubación empleado son los detallados en Métodos, siendo de 2 horas el tiempo de incubación utilizado. La fracción PrS se obtuvo sembrando 10 ml de S en una columna de Sephadex G-25 grueso (1.8 x 50 cm) equilibrada y corrida con buffer TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,4. La proteína eluida entre los 35 y los 65 ml se usó como fuente de PrS. El factor FSp corresponde a la fracción eluida entre los 85 y 110 ml. La relación de los componentes en la mezcla fue de 1:1 (v:v).

TABLA P.II.2.: Efecto de la diálisis

Fracción	Proteínas (mg/ml)	nmporf.	$\frac{\text{nmporf.}}{\text{mg P}}$	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P}}$
H	8,34	13,040	7,82	135,43	81,22
S	3,49	13,850	19,81	135,30	193,55
H'	8,34	14,290	8,57	131,63	78,94
S'	3,49	15,240	21,80	124,20	177,68
H _{dial}	7,30	5,983	4,09	99,96	68,42
S _{dial}	2,29	6,033	13,20	98,08	214,63

La obtención de las fracciones homogenato (H) y sobrenadante (S) se encuentra descrita en Métodos. En la misma sección se detalla el sistema de incubación; siendo 2 horas el tiempo empleado. Se dializaron 10 ml de ambas fracciones durante 20 horas, contra 2 litros de buffer fosfato de sodio pH 7,4 5 mM, efectuándose un total de cuatro cambios cada 60 minutos. De esta forma se obtuvieron las fracciones H_{dial} y S_{dial}. H' y S' correspondieron a los H y S conservados en heladera a 4 °C en las mismas condiciones de la diálisis. El tubo de diálisis utilizado fue el Visking Tubing 8/32.

TABLA P. II. 3.: Efecto de la diálisis

Fracción	Proteínas (mg/ml)	nmporf.	nmporf. mg p	nmoles PBGc	nmoles PBGc mg P
H	10,52	8,240	3,916	74,59	35,45
S	4,34	8,214	9,463	90,65	104,44
H'	10,52	7,032	3,342	90,48	43,00
S'	4,34	8,250	9,501	109,88	126,59
H _{dial}	9,66	6,460	3,344	89,15	46,14
S _{dial}	3,48	6,990	10,070	87,21	64,04

La obtención de las fracciones enzimáticas H y S y el sistema de incubación empleado se encuentran detallados en Métodos, habiéndose incubado durante 1 hora. Se dializaron 20 ml de cada fracción durante 20 horas, contra 4 litros de buffer TRIS-HCl pH 7,4 5 mM, efectuándose un total de cuatro cambios cada 60 minutos. De esta forma se obtuvieron las fracciones H_{dial} y S_{dial}. H' y S' correspondieron a los H y S conservados en heladera a 4°C en las mismas condiciones de la diálisis. El tubo de diálisis empleado fue el Visking Tubing 8/32.

aproximadamente un 50% en función de las porfirinas formadas; el efecto era mucho menor o ninguno teniendo en cuenta el consumo de sustrato. El solo estacionamiento a 4 °C prácticamente no produjo cambios.

Utilizando buffer TRIS-HCl para la diálisis (Tabla P.II.3.), pues según observaciones preliminares vimos que a igualdad de pH la actividad de la PBG-asa de *Rp. palustris* en buffer fosfato era menor que en TRIS-HCl, tampoco encontramos cambios significativos de la actividad en los dializados o en las muestras estacionadas a 4 °C en función de la formación de porfirinas.

En consecuencia, no hemos hallado ninguna prueba clara sobre la existencia de un factor regulador de la actividad de la PBG-asa en *Rp. palustris*.

P.II.2. Cinética de la reacción y efecto de cationes y aniones

P.II.2.1. Cinética

Ya habíamos observado al determinar la curva de saturación por sustrato que la cinética de la PBG-asa de *Rp. palustris* (Figura P.II.2.): seguía un perfil sigmoideo cuando la velocidad de la reacción se medía en función de las porfirinas formadas, lo cual estaba indicando la existencia de efectos homotrópicos positivos y una cinética no michaeliana asociada a la formación de los porfirinógenos. Esto se confirma y amplifica para la primera zona de la curva realizando el gráfico de Eadie (Figura P.II.3.), donde apreciamos una marcada curvatura correspondiente a una clara cooperatividad positiva, o bien con los gráficos de las dobles recíprocas (Figura P.II.4.) y de un cálculo del coeficiente n de Hill.

Los gráficos de Lineweaver-Burk para la formación de producto son no lineales y el n de Hill es igual a 2.

En cambio si medimos la velocidad en base al consumo de sustrato, el aumento es lineal y la cinética es aparentemente michaeliana, aunque en estas condiciones experimentales no se logró alcanzar la saturación. El perfil luego del gráfico de las dobles recíprocas y el n de Hill igual a 1, estarían de acuerdo con este tipo de comportamiento.

En la Tabla P.II.4. se encuentran las constantes cinéticas; el K_m aparente ó $S_{0,5}$ para la formación de porfirinas está dentro del orden de los valores obtenidos para la PBG-asa de otras fuentes. Es llamativo el valor de la $V_{m\acute{a}x}$ para el sustrato consumido (1.100 nmoles/h), al cual corresponde un K_m de 1,6 mM; ambas cifras resultan aparentemente altas en comparación con los pocos valores existentes acerca de estos parámetros para el complejo de la PBG-asa, pues más frecuentemente se emplea como medida de la actividad la formación de producto; se puede afirmar, sin embargo que son los datos más altos registrados hasta el momento.

En conclusión, se ha observado que la velocidad de formación de los porfirinógenos de tipo III está relacionada en forma sigmoidea con la concentración de sustrato, con un n igual a 2, en tanto que la deaminasa mostró una cinética michaeliana con

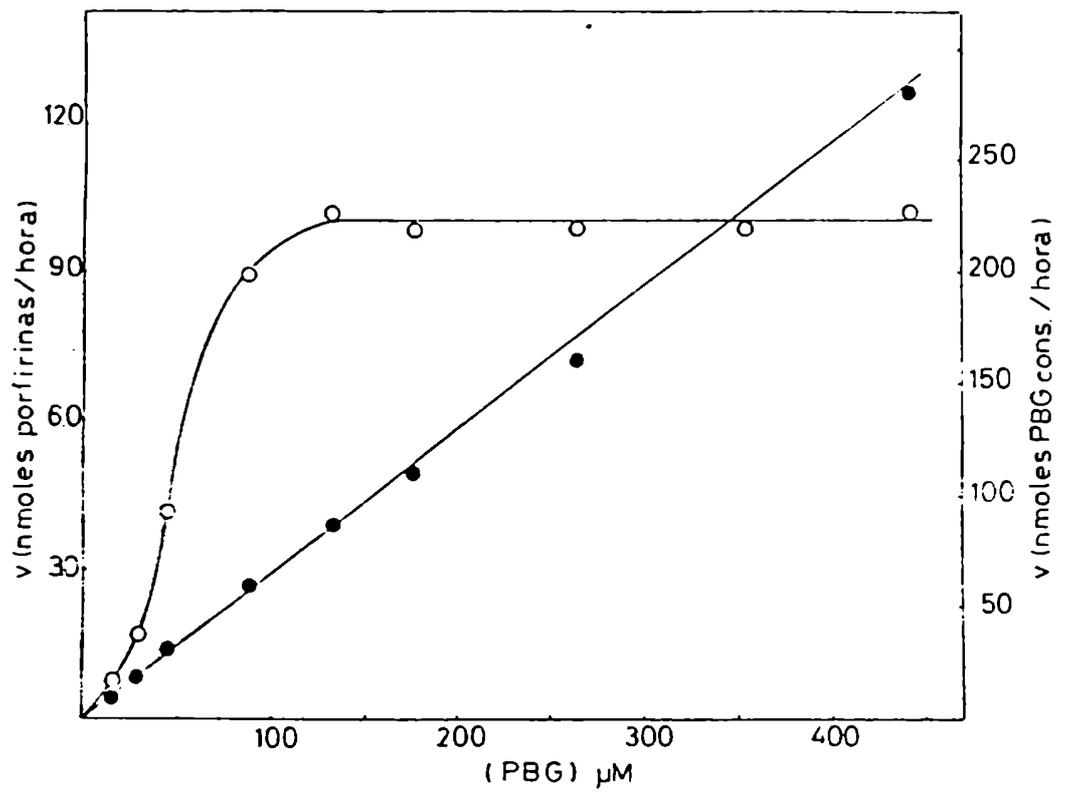


FIGURA P.II.2.: Curva de saturación por sustrato para la fracción sobrenadante.
 ○ nmoles porf/h; ● nmoles PBGc/hora
 La obtención de la fracción S y el sistema de incubación empleado son los detallados en Métodos.

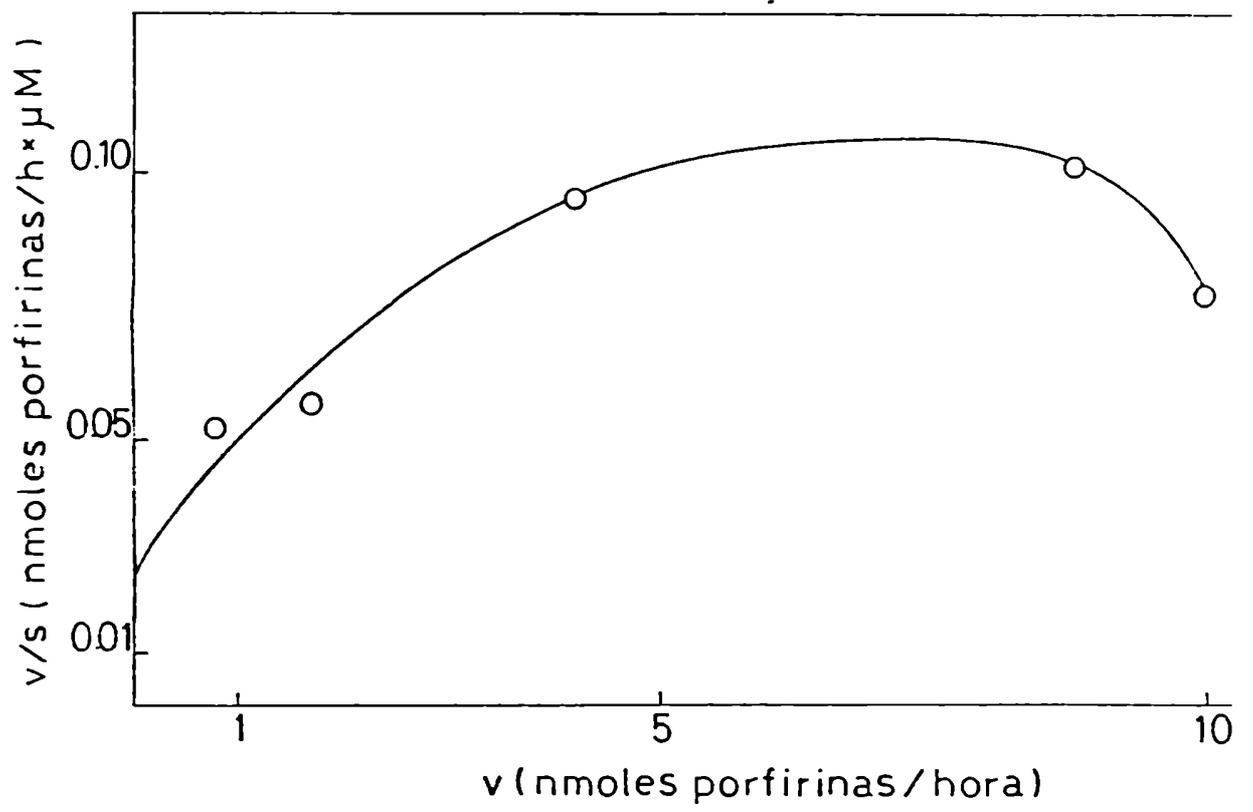


FIGURA P.II.3.: Gráfico de Eadie

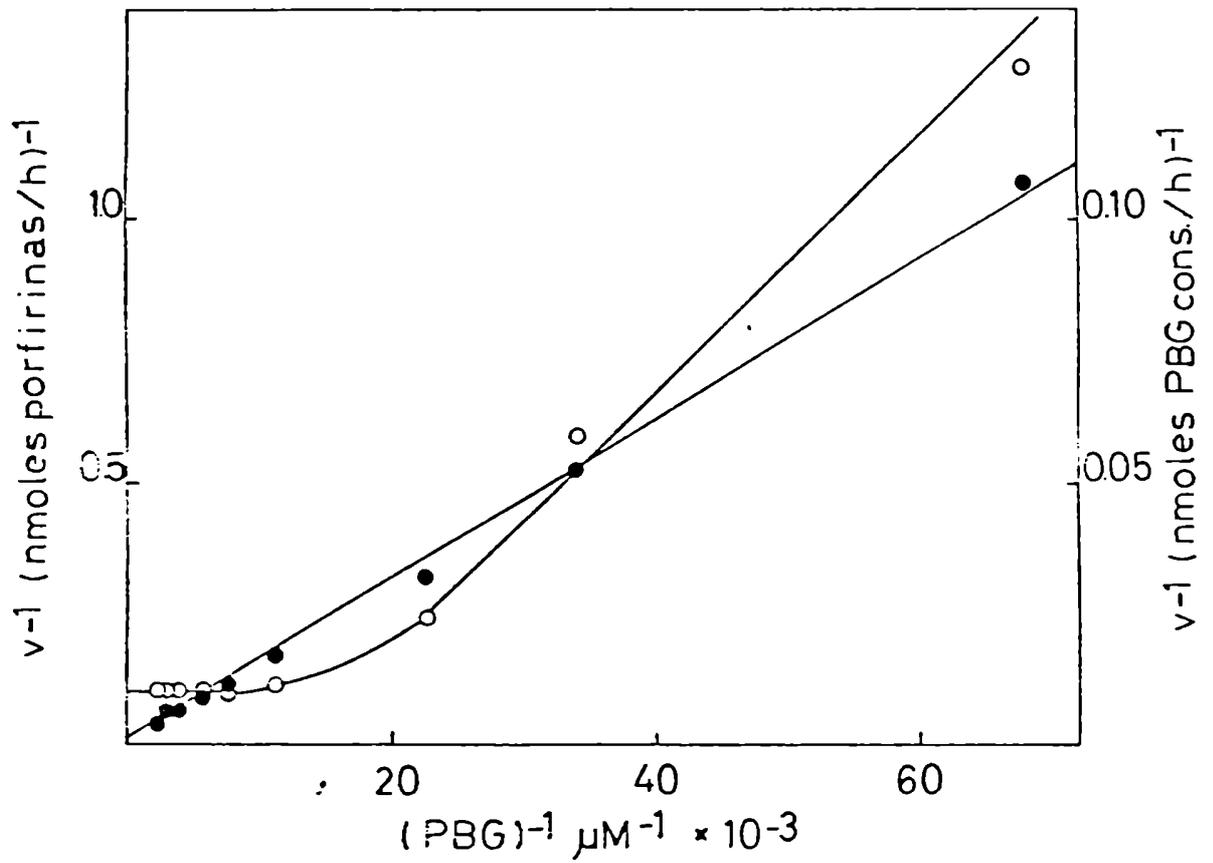


FIGURA P.II.4.: Gráfico de las dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) considerando la velocidad en función de la formación de porfirinas (O) y del consumo de sustrato (●).

TABLA P.II.4.: Constantes Cinéticas

PARAMETROS	PORFIRINAS FORMADAS	PBG CONSUMIDO
V _{máx}	10 nmoles/h	1.100 nmoles PBGc/h
K _m	50 μ M	1,6 mM
n	2	1

Los datos tabulados fueron calculados de los valores representados en la Figura P.II.4.. Los coeficientes de Hill (n) se hallaron de las pendientes de los gráficos de $\log (v/V_{máx}-v)$ en función de $\log (PBG)$.

un n igual a 1 (Kotler et al, 1983).

Se había encontrado un comportamiento similar para las enzimas de hígado bovino y eritrocitos de ave (Sancovich et al, 1969 b; Llambías et al, 1971); de manera que, dado que no existirían fenómenos cooperativos en la reacción catalizada por la deaminasa, se postula que dichos efectos observados para la PBG-asa estarían asociados con la isomerasa. Podría suceder que la entrada de la primer molécula de PBG, así como las siguientes, ocurriera sobre la deaminasa, en tanto que la etapa final de isomerización y ciclación transcurriera sobre la isomerasa. Es decir, existirían por lo menos dos sitios, uno sobre cada entidad proteica.

P.II.2.2. Efecto de iones

P.II.2.2.1. Acción de la mezcla ClNa-Cl₂Mg

Recordemos que la presencia de ciertas concentraciones de iones sodio y magnesio producía una activación de la PBG-asa de hígado vacuno, callos de soya y eritrocitos de ave y paralelamente una inhibición de las decarboxilasas (Sancovich et al, 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a, b); resultó entonces de interés determinar si estos iones poseían una acción similar sobre la PBG-asa de *Rp. palustris*, y eventualmente si su presencia podía influir sobre la cinética de la reacción.

Se emplearon entonces las relaciones conocidas de una mezcla de ClNa 0,6 M: Cl₂Mg 0,12 M (1:1), y se ensayó su efecto sobre las fracciones H y S. En la Tabla P.II.5. se encuentran los resultados obtenidos agregando 0,15 y 0,30 ml de dicha mezcla. No se observó ninguna variación de la actividad, ni del tipo de porfirinas formadas por la presencia de 0,15 ml o volúmenes menores (datos no tabulados).

Cuando se aumentó la relación al doble, apreciamos una inhibición del 10 y 30% sobre las fracciones H y S respectivamente en cuanto al producto formado, acompañada de una disminución del porcentaje de porfirinas de tipo III, sin mayores efectos sobre las decarboxilasas.

No hubo en cambio, alteración en el consumo de sustrato

TABLA P.II.5.: Efecto de la mezcla ClNa-Cl₂Mg

Fracción	nmporf	nmporf/mg P	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P.}}$
H	18,26	9,290	201,92	102,28
S	19,87	43,010	203,87	441,29
H + 0,15 ml	21,59	10,984	203,78	103,65
S + 0,15 ml	20,22	43,770	203,74	440,98
H + 0,30 ml	16,51	8,397	205,60	104,58
S + 0,30 ml	14,21	30,760	205,66	445,14

La obtención de las fracciones H y S y el sistema de incubación empleado se encuentran detallados en Métodos, habiéndose incubado durante 2 horas. Las fracciones enzimáticas H y S contenían 9,83 y 2,3 mg/ml de proteína respectivamente. La concentración final de Na y de Mg fue de 60 mM y 12 mM (0,15 ml) y 120 mM y 24 mM (0,30 ml) respectivamente.

en ningún caso.

Evidentemente esta mezcla de sales de sodio y magnesio no parece tener el mismo efecto estimulante que se observara en otros tejidos; notemos aquí que tampoco había actuado sobre las enzimas de *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978). Sin embargo resultó llamativa la inhibición sobre la fracción S, cuando se duplicó la relación usual. De manera que se decidió estudiar las causas de dicho efecto.

P.II.2.2.2. Efecto de los iones sodio

También empleando las enzimas de hígado bovino, eritrocitos de aves y callos de soya (Llambías, 1971; Sancevich, 1972) se habían encontrado efectos activantes de los iones sodio y potasio a concentraciones entre 1 y 10 mM; a mayores o menores valores no había ocurrido cambio alguno. Se investigó entonces la acción de los iones sodio, bajo las formas de cloruro, acetato y fosfato sobre la actividad de la PBG-asa de *Rp. palustris*.

Los datos se muestran en las Tablas P.II.6., P.II.7. y P.II.8. Podemos concluir rápidamente que la presencia de iones sodio, ya sea en la forma de cloruro o acetato (Tablas P.II.6 y P.II.7.), ni estos mismos aniones, tienen efecto alguno sobre la actividad de nuestra enzima, aún a altas concentraciones; de manera que la inhibición producida por la mezcla de cloruros de sodio y magnesio antes observada (Tabla P.II.5.), no se debe al cloruro ni al sodio, restando entonces sólo la posibilidad del Mg.

Fueron sumamente interesantes los datos obtenidos empleando las sales de fosfato monosódico (Tabla P.II.8.); se encontró una clara y significativa inhibición en la formación de porfirinas pero sin cambios en el tipo isomérico, en tanto que la respuesta sobre el consumo de sustrato fue muchísimo menos pronunciada (Figura P.II.5.). Descartado completamente un efecto debido al sodio, surgió como consecuencia que esta inhibición era producida por el anión PO_4^{3-} ; ya habíamos observado con anterioridad, cuando se estudiara la influencia del pH y el tipo de buffer en la extracción y medición de la actividad, que a igualdad de pH, la PBG-asa de *Rp. palustris* era mucho más activa en buffer TRIS-HCl que en buffer fosfato de sodio (Figura P.I.9.).

TABLA P.II.6.: Efecto del ión sodio

(ClNa) mM	nmporf	nmporf/mg P	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P}}$
1	16,714	18,53	230,86	255,94
10	16,782	18,60	232,16	257,38
50	19,777	21,92	235,89	261,53
100	23,140	25,65	236,78	262,50
150	20,680	22,92	236,20	261,88
--	18,706	20,74	232,71	257,99

La obtención de la fracción sobrenadante y el sistema de incubación se encuentran detallados en Métodos, empleándose 2 horas como tiempo de incubación. Se utilizó una fracción enzimática que contenía 4,5 mg/ml de proteína.

TABLA P.II.7.: Efecto del ión sodio

(AcONa) mM	nmporf	nmporf/mg P	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P}}$
1	11,000	17,52	186,74	297,38
10	12,096	19,26	183,19	291,67
50	12,705	20,23	179,92	286,50
100	13,805	21,98	182,39	290,44
150	14,457	23,02	185,17	294,87
	11,874	18,91	180,62	287,61

La obtención de la fracción sobrenadante y el sistema de incubación se encuentran detallados en Métodos, empleándose 2 horas como tiempo de incubación. Se utilizó una fracción enzimática que contenía 3,14 mg/ml de proteína.

TABLA P.II.8.: Efecto de los iones sodio, como PO₄H₂Na

(PO ₄ H ₂ Na) μM	nmporf	nmporf/mg P	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P}}$
1	15,006	16,418	95,324	104,282
10	14,070	15,390	94,903	103,839
50	3,456	3,780	93,043	101,801
100	1,518	1,661	87,669	95,905
150	1,498	1,639	77,493	184,785
-	16,566 ^a	18,125	94,970	103,905

La obtención de la fracción sobrenadante y el sistema de incubación utilizado se encuentran detallados en Métodos, empleándose 2 horas como tiempo de incubación. La fracción enzimática contenía 4,57 mg/ml de proteína.

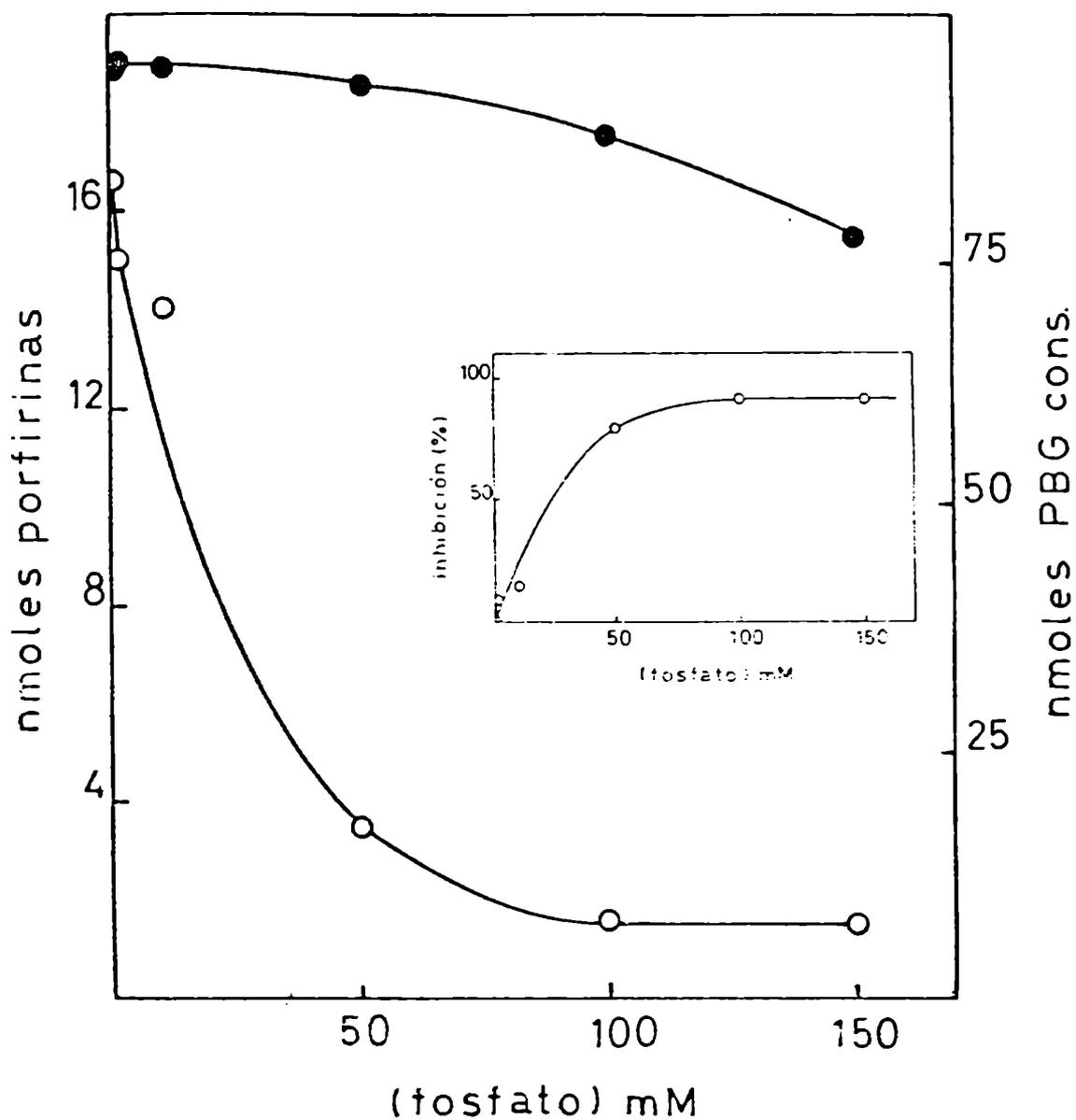


FIGURA P.II.5.: Efecto de distintas concentraciones de fosfato sobre la formación de porfirinas (O) y el consumo de PBG (●). El porcentaje de inhibición graficado (inset) se calculó en función del producto formado.

Teniendo en cuenta estos resultados, dado que la influencia del anión fosfato sobre estas enzimas aún no ha sido estudiada, y que aparentemente podría suministrar información muy útil en cuanto a la acción de la PBG-asa, se procedió a investigar este fenómeno con más detalle.

P.II.2.2.3. Efecto del anión fosfato

En base a la interesante respuesta de la PBG-asa de *Rp. palustris* frente al anión fosfato, se estudió el efecto del mismo a las concentraciones finales de 10, 50 y 100 mM empleando concentraciones variables de sustrato.

Analizando primero los datos de actividad en función de las porfirinas formadas, observamos (Figura P.II.6.) que la presencia de cantidades crecientes de fosfato disminuye la formación de producto, lo cual se aprecia aún mejor graficando directamente el porcentaje de inhibición en función de la concentración del anión (Figura P.II.7.), sin embargo, por lo menos a la concentración más baja de fosfato, no se alteraría la cinética sigmoidea de la reacción, como se confirma al realizar los gráficos de las dobles inversas (Figura P.II.8.) y de un cálculo de los n de Hill, que se mantuvieron en el valor de 2. Se observó además que a las concentraciones mayores de inhibidor (50 y 100 mM) ocurriría aparentemente una cierta inhibición por exceso de sustrato.

Representando, tanto la velocidad directa de la reacción como su inversa, en función de la concentración de fosfato (Figura P.II.9.) se pone de manifiesto una vez más la existencia de una cinética no michaeliana.

Si ahora prestamos atención a las curvas de saturación en base al PBG consumido (Figura P.II.10.), observamos que hasta 10 y 50 mM tampoco se modificó el comportamiento michaeliano, pero ya a 100 mM hubo una desviación del perfil hiperbólico, como también surge de la representación de las dobles recíprocas (Figura P.II.11.), según la cual, a bajas concentraciones, el fosfato parecería actuar en forma incompetitiva. Este tipo de inhibición es bastante raro, en particular cuando se trata de reacciones con un único sustrato, pero tengamos en cuenta que la PBG-asa emplea 4 moléculas del mismo sustrato y eventualmente la isomerasa actuaría sobre un sustrato polipirrimetano;

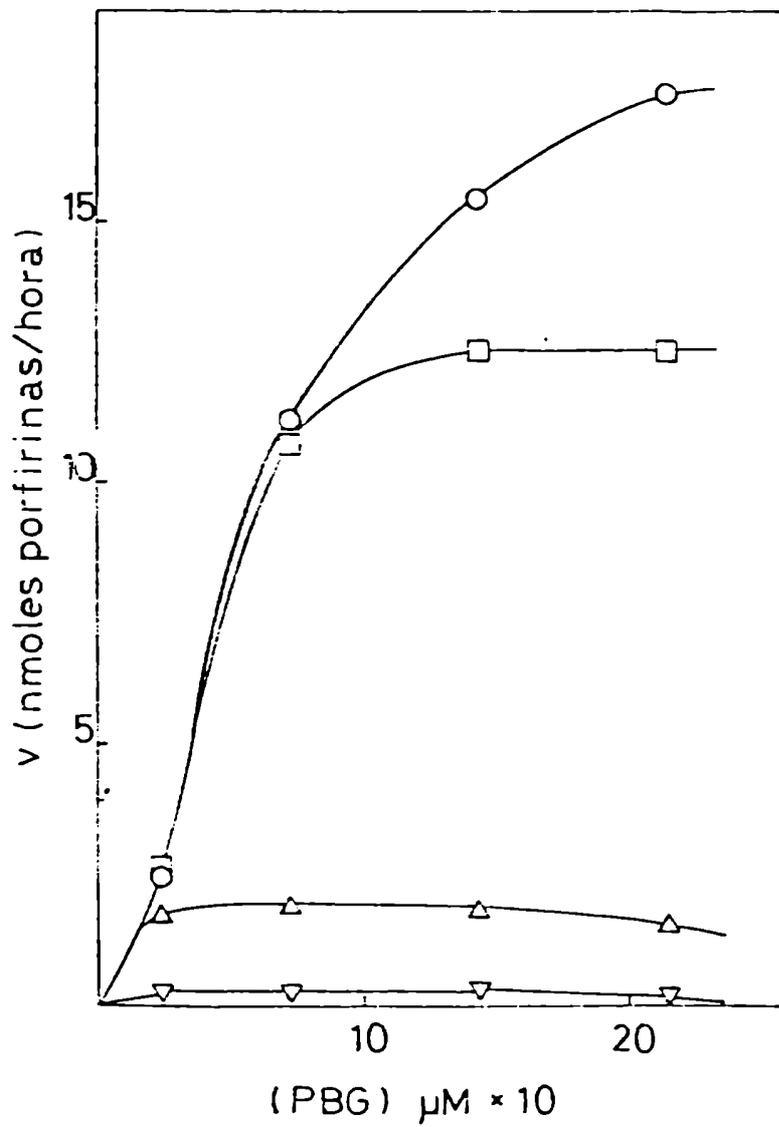


FIGURA P.II.6.: Efecto de distintas concentraciones de fosfato sobre la velocidad de formación de porfirinas
 ○ sin agregado de inhibidor; □ 10 mM; △ 50 mM;
 ▽ 100 mM

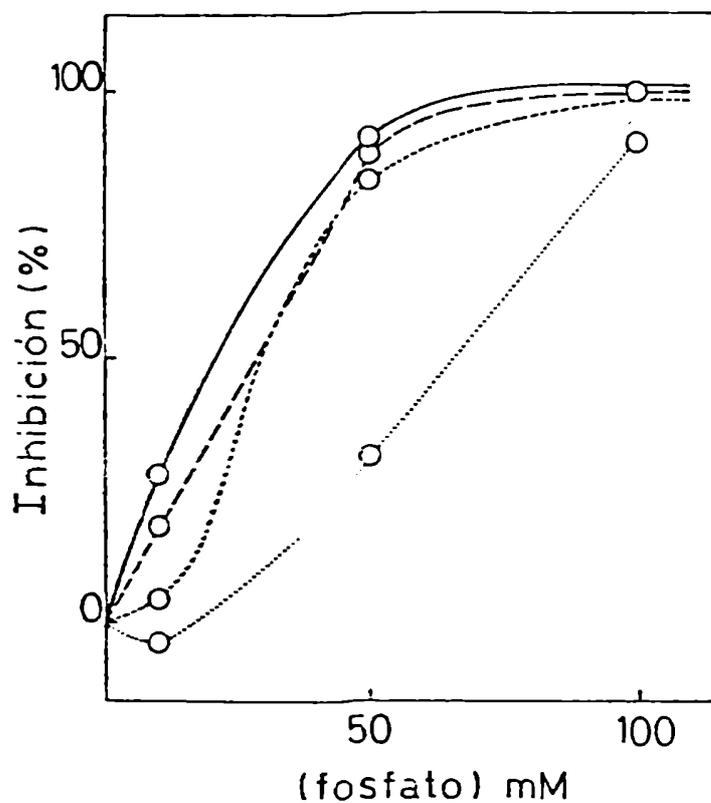


FIGURA P.II.7.: Porcentaje de inhibición (respecto a las porfirinas formadas) en función de la concentración de fosfato.
 (·-○-·) 24 μ M PBG;
 (·-○-·) 72 μ M PBG;
 (-○-) 143 μ M PBG;
 (-○-) 215 μ M PBG

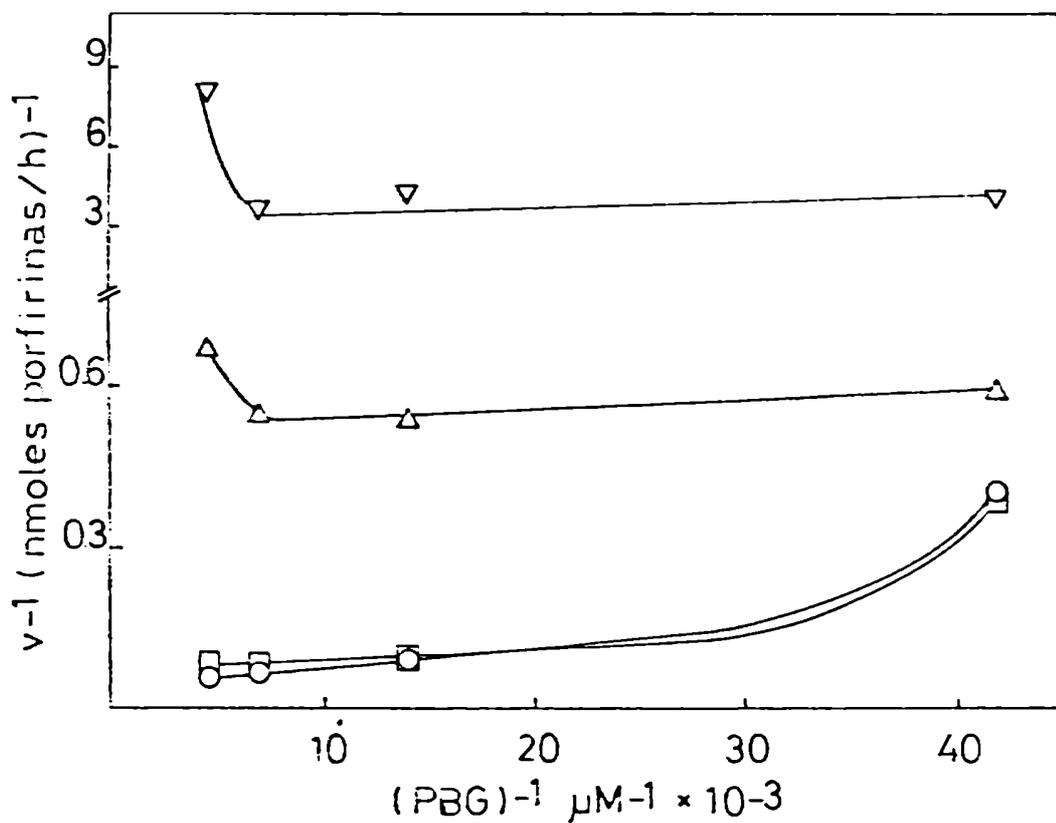


FIGURA P.II.8.: Gráficos de las dobles recíprocas en presencia de distintas concentraciones de fosfato considerando la velocidad en función de la formación de porfirinas.
 O sin agregado de inhibidor; □ 10 mM
 Δ 50 mM; ▽ 100 mM

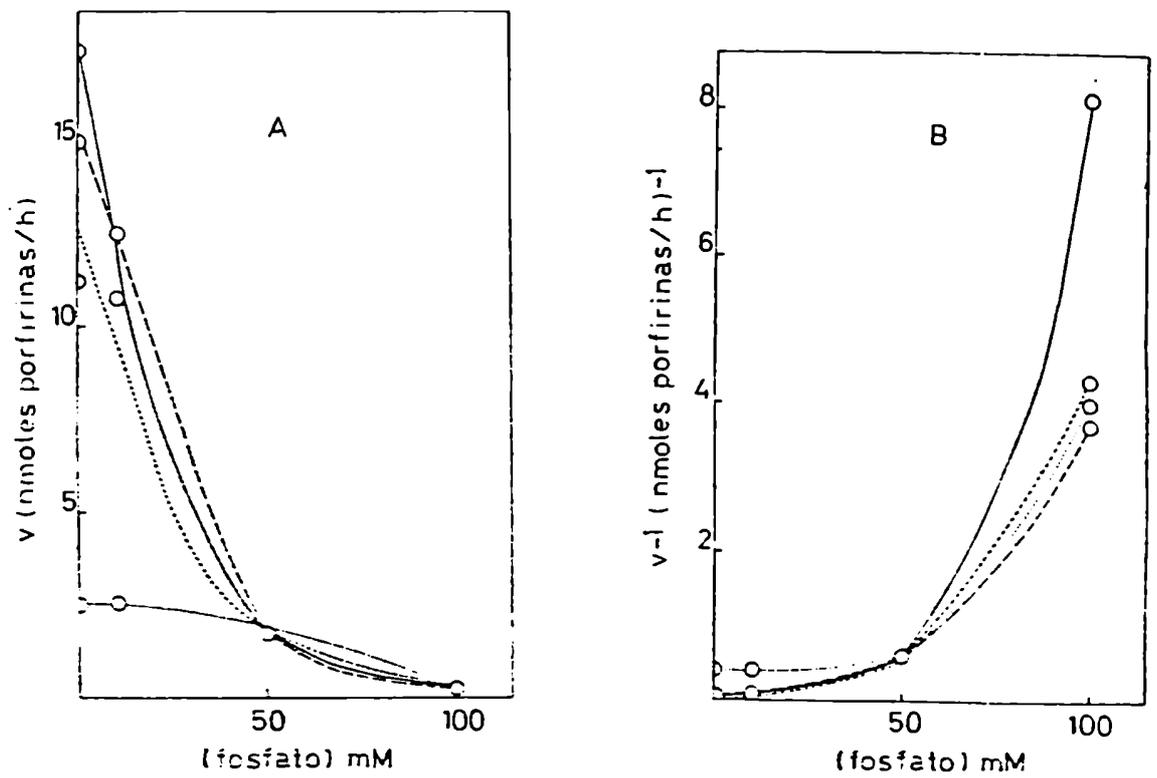


FIGURA P.II.9.: A. Velocidad de formación de porfirinas en función de la concentración de fosfato
 B. Inversa de la velocidad de formación de porfirinas en función de la concentración de inhibidor
 (---O---) 24 μ M PBG; (---O---) 72 μ M PBG;
 (-O-) 143 μ M PBG; (-O-) 215 μ M PBG

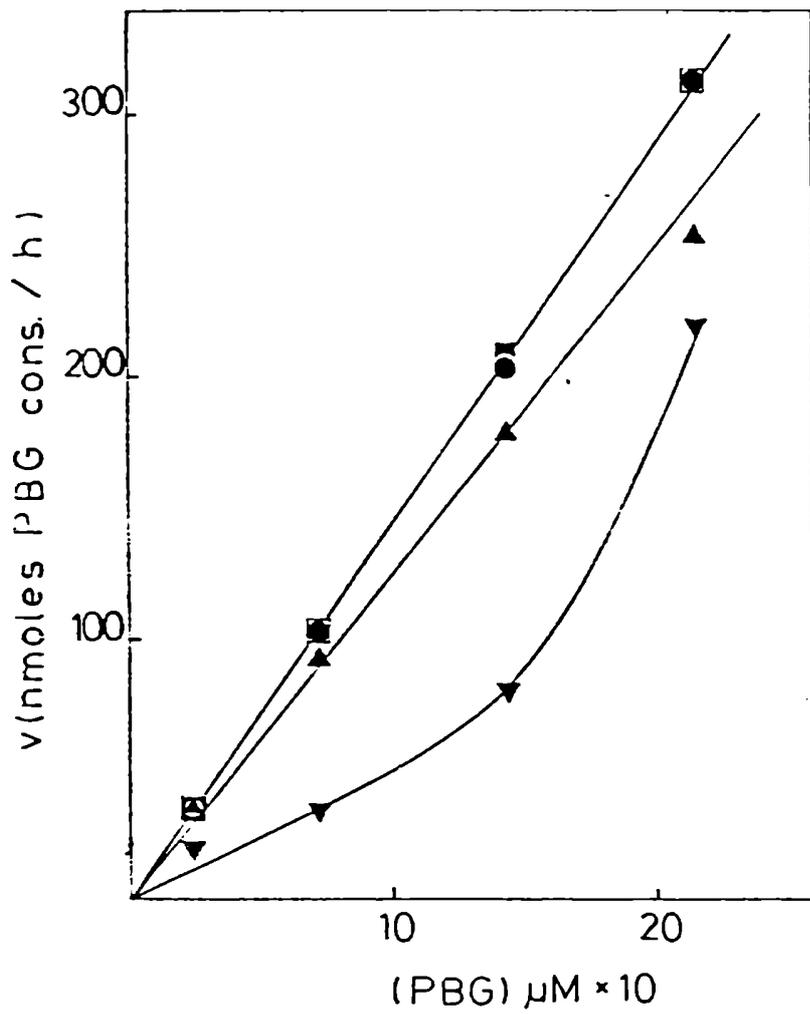


FIGURA P.II.10.: Curva de saturación por PBG en presencia de distintas concentraciones de fosfato, considerando la velocidad como consumo de sustrato.
 ● sin agregado de inhibidor;
 ■ 50 mM; ▲ 10 mM; ▼ 100 mM.

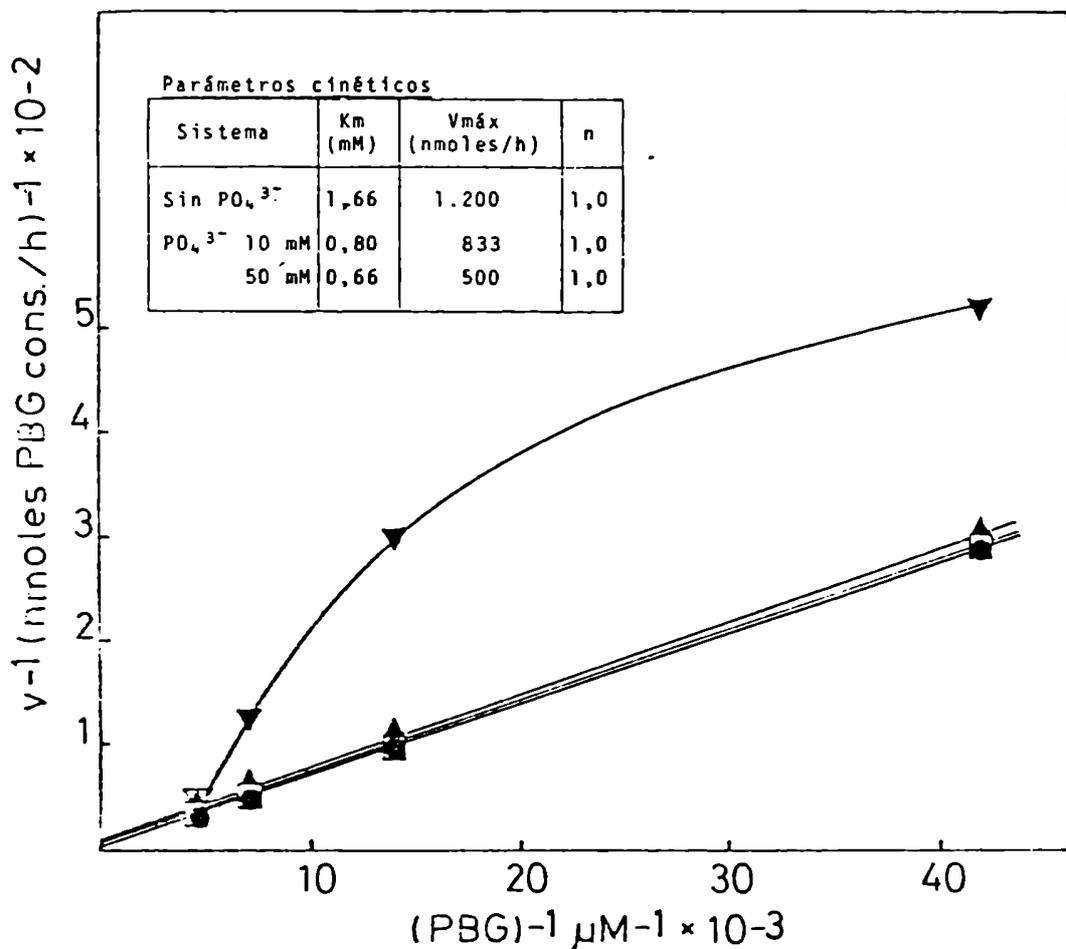


FIGURA P.II.11.: Gráficos de las dobles recíprocas en presencia de distintas concentraciones de fosfato, considerando la velocidad en función del sustrato consumido
 ● sin agregado de inhibidor;
 ■ 10 mM; ▲ 50 mM; ▼ 100 mM

por lo tanto, los efectos cinéticos ejercidos por inhibidores pueden ser bastante más complejos que para el modelo simple de un solo sustrato.

Por otro lado, a una concentración de 100 mM el efecto del fosfato es difícil de interpretar, haciéndose más evidente la existencia de fenómenos de interacción, posiblemente entre el PBG y el inhibidor que modificarían negativamente la velocidad de entrada del primero en la enzima. Esto último podría tal vez explicar la disminución en el consumo de sustrato para concentraciones de fosfato superiores a 50 mM (Figura P.II.12.).

Ya se había observado, que si bien el fosfato inhibía la síntesis total de porfirinas, no modificaba sin embargo el tipo isomérico de las mismas; esto se confirmó con esta nueva serie de ensayos (Figura P.II.13.), comparando por ejemplo los datos provenientes del sistema sin agregado y en presencia de 10 mM de fosfato. El porcentaje de tipo III y I fue coincidente; con exceso de PBG se observó apenas un ligero aumento (12-15%) del tipo III sobre el tipo I, en las mezclas conteniendo fosfato, que si bien podríamos considerar poco significativo, no deja de ser llamativo.

Es evidente entonces, que los iones fosfato poseen un efecto muy particular sobre la PBG-asa de *Rp. palustris*. Notemos que disminuyen la síntesis total de porfirinas, pero no modifican ni la cinética (se conserva el n de Hill igual a 2, para la menor concentración) ni el tipo isomérico, y además, inhiben el consumo de PBG sin alterar tampoco el comportamiento michaeliano, pero sí los correspondientes parámetros cinéticos.

Aceptando que en la reacción de síntesis de porfirinógenos ocurre primero una polimerización del PBG hasta llegar a un tetrapirrilmetano (TPM) lineal, ordenado, producto de cuatro condensaciones cabeza-cola del pirrol, el cual, en ausencia de isomerasa se cicla para dar el Urogen I, en tanto que, en presencia de la Isomerasa, tiene lugar una isomerización del anillo D de ese bilano para luego ciclarse formando el Urogen III; estos datos nos están indicando claramente, que el fosfato actúa a nivel de consumo de PBG, en la etapa de formación de los intermediarios polipirrólicos, disminuyendo su concentración y por ende la cantidad de porfirinas, pero no ejerce ninguna acción sobre la Isomerasa.

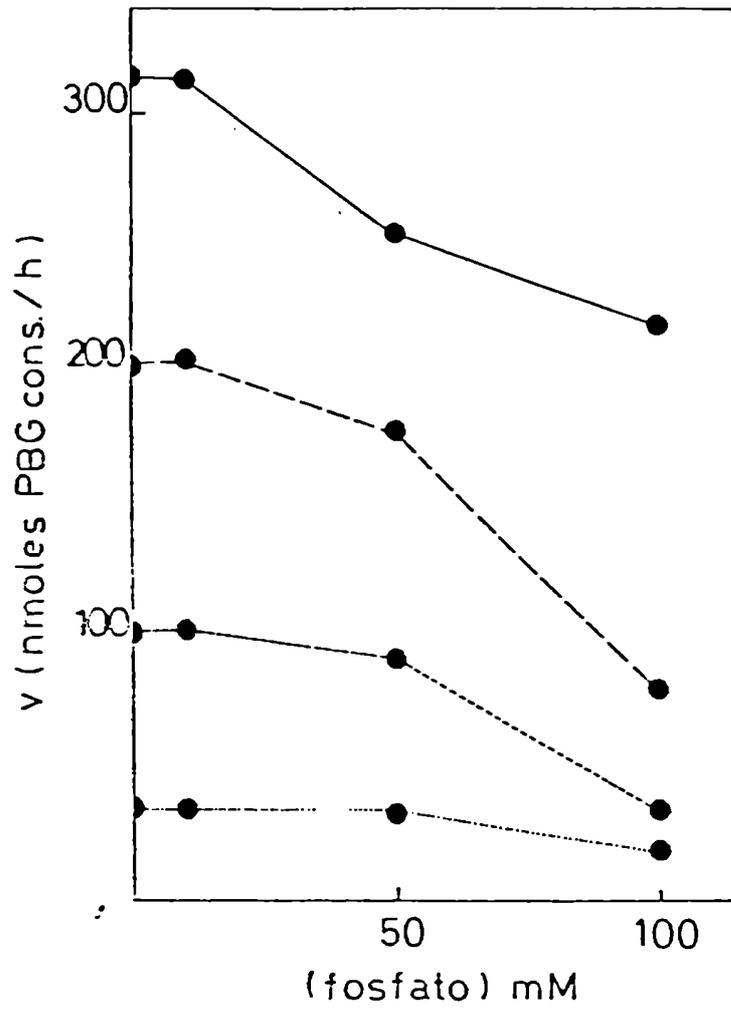


FIGURA P.II.12.: Velocidad de consumo
 de sustrato en función
 de la concentración de
 fosfato
 (···●···) 24 μ M PBG;
 (-·-·-·-) 72 μ M PBG;
 (- - - ● - - -) 143 μ M PBG;
 (-●-) 215 μ M PBG

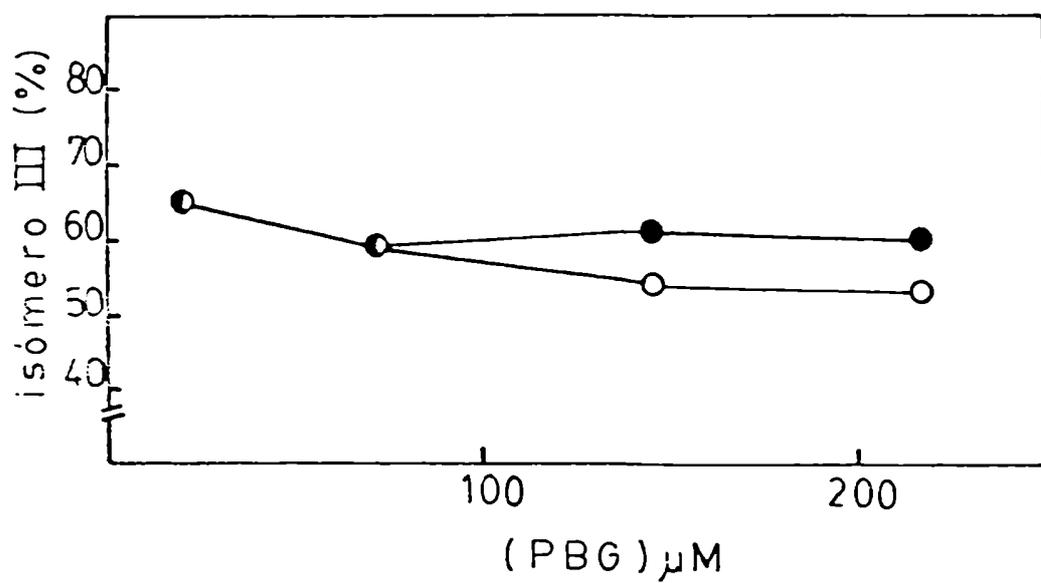


FIGURA P.II.13.: Variación del tipo Isomérico III en función de la concentración de PBG en ausencia (○) y presencia de 10 mM de fosfato (●)

Si es cierto que el sustrato de la Isomerasa es un TPM ordenado, producto de la acción de la Deaminasa sobre el PBG, entonces el fosfato tendría una acción selectiva sobre esta enzima, de manera que resultaría muy interesante determinar si este anión es un efector de la Deaminasa aislada.

Recordando, que habíamos postulado (Batlle y Rossetti, 1977), que, en la unión del PBG a la Deaminasa son importantes ciertos grupos cargados positivamente, probablemente restos ε amino, imidazólicos o guanidinos (Pollack y Russell, 1978), que servirían como sitios de reconocimiento del PBG a través de sus cadenas de propionato y acetato, y dado que este tipo de residuos se encuentra en el sitio activo de una serie de enzimas cuyos sustratos contienen grupos carboxilato o fosfato (Riordan, 1973; Riordan et al, 1977), es posible que en este caso, el anión fosfato neutralice parcial o totalmente estas posiciones. Por cuanto sobre la Deaminasa habría por lo menos dos puntos de contacto de esta naturaleza, podría llegar a formarse un complejo entre la enzima, el PBG y el inhibidor - E-PBG-I - que produciría precisamente un patrón cinético incompetitivo. En esta forma enzimática el PBG no estaría unido correctamente como para continuar condensándose con otras moléculas de sustrato, disminuyendo así su consumo, y no es de esperar que un aumento de sustrato pueda revertir este efecto, como observáramos experimentalmente; como resultado, quedaría menor cantidad total de enzima disponible para la formación de los intermediarios normales y su posterior isomerización y ciclación por la Isomerasa.

No podemos descartar otras explicaciones para estos fenómenos y será muy útil la investigación del efecto de otros aniones polivalentes sobre el comportamiento de la PBG-asa y la Deaminasa, ya que aparentemente el cloruro y acetato no habían mostrado acción alguna (Tablas P.II.6 y P.II.7.):

P.II.2.2.4. Efecto de los iones Mg^{++}

En la búsqueda del conocido efecto estimulante del Mg^{++} sobre la actividad de la PBG-asa de *Rp. palustris* encontramos, que a una determinada concentración de este ión, ocurría una disminución de la cantidad total de porfirinas formadas, en lugar del esperado aumento.

Se trató de averiguar entonces, qué sucedía con esta enzima al variar la concentración de Mg^{++} (bajo la forma de cloruro) entre 1 y 150 mM, empleando una concentración de PBG de 176 μM . Los resultados se muestran en la Figura P.II.14.; ya a 1 mM hubo una cierta inhibición que aumentó al incrementarse la concentración de Mg^{++} .

En base a estos datos se decidió analizar el efecto del Mg^{++} sobre la PBG-asa a concentraciones de 50, 100 y 150 mM, utilizando cantidades variables de PBG.

Teniendo en cuenta la velocidad de formación de porfirinas (Figura P.II.15.), se observó nuevamente el perfil sigmoideo en ausencia de iones, mientras que, con el agregado de Mg^{++} 50 mM habría cierta modificación en la cinética, asociada a una activación a la menor concentración de PBG, seguida de inhibición; para 100 y 150 mM de Mg^{++} hubo disminución de la actividad a todas las concentraciones de sustrato.

Estos fenómenos se visualizan en una forma más directa, si representamos las velocidades de formación de porfirinas (Figura P.II.16.) o el porcentaje de inhibición (Figura P.II.17.) en función de la concentración de Mg^{++} . Para valores de PBG superiores a 72 μM apareció siempre el efecto inhibitorio del Mg^{++} ; sólo para 24 μM de PBG se reveló la acción activadora de dicho catión, pero únicamente a 50 mM de Mg^{++} ; este último efecto se observa aún más amplificado en la Figura P.II.17.

De los gráficos de las dobles recíprocas (Figura P.II.18.) apreciamos en esta serie de ensayos, que el Mg^{++} modifica la cinética inhibiendo la formación de porfirinas y llevando el n de Hill de 2 a 1.

La velocidad de consumo de PBG en función de la concentración de sustrato (Figura P.II.19.) prácticamente no se modificó en presencia de 50 mM de Mg^{++} ; hubo inhibición a 100 mM sin al-

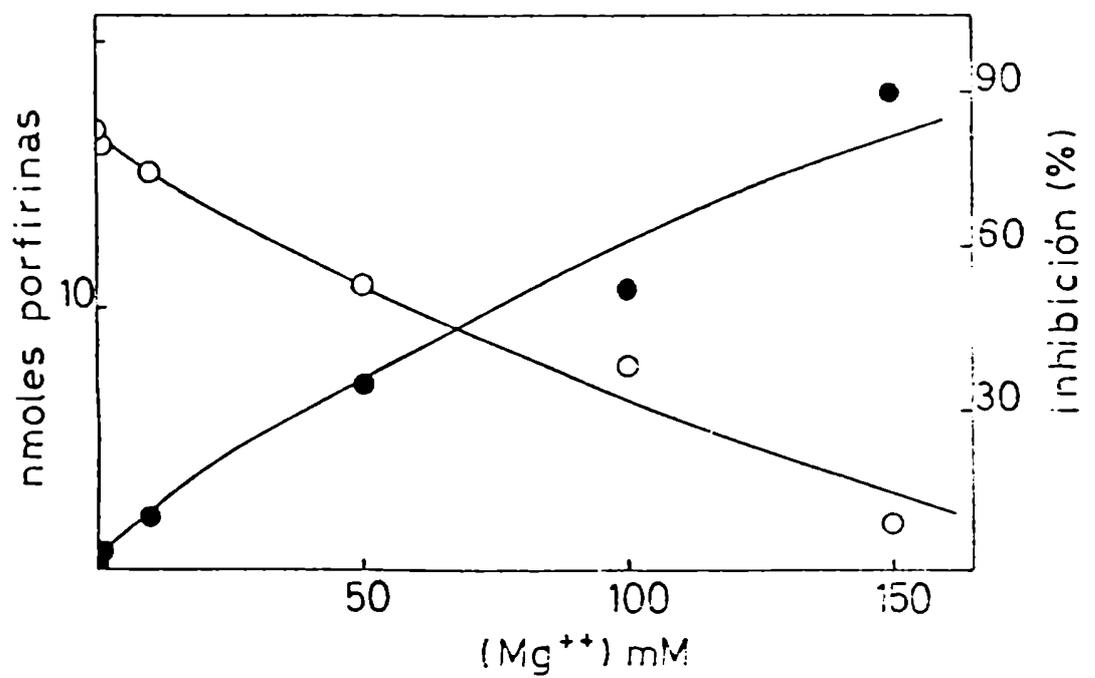


FIGURA P.II.14.: Efecto de distintas concentraciones de Mg⁺⁺ sobre la formación de porfirinas (O) y el porcentaje de inhibición (●). El porcentaje de inhibición se calculó en base a las porfirinas formadas.

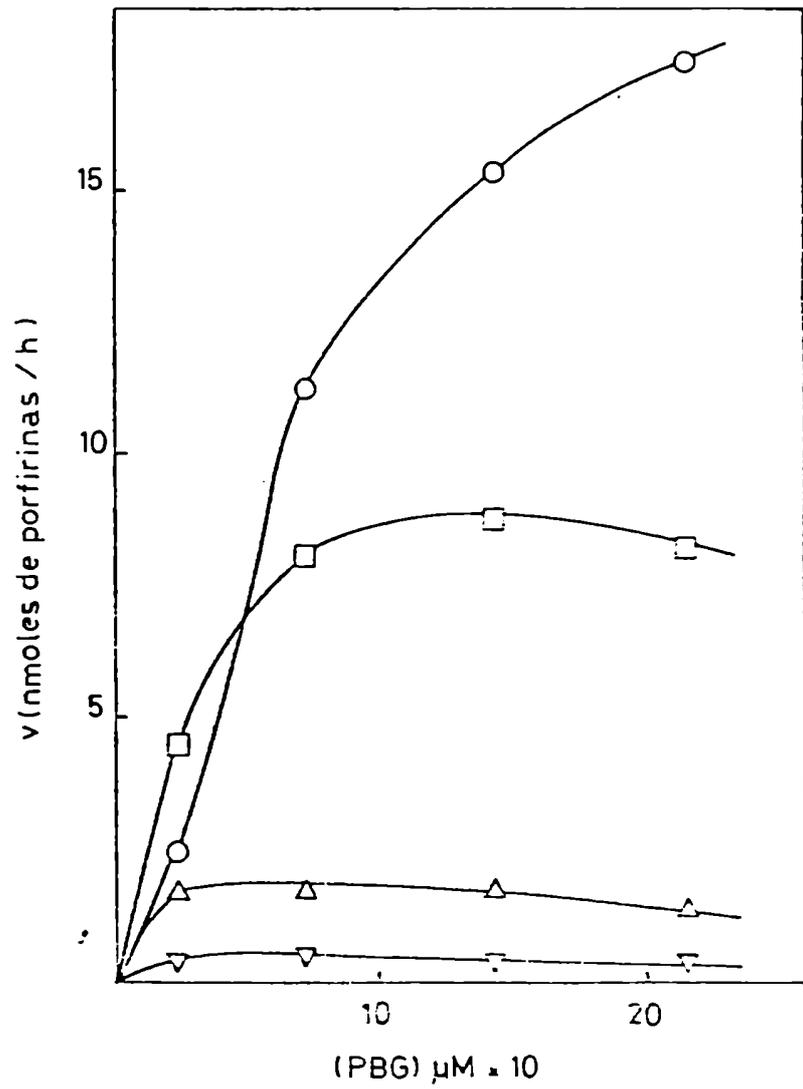


FIGURA P.II.15.: Efecto de distintas concentraciones de Mg^{++} sobre la curva de saturación por PBG, considerando la velocidad como formación de porfirinas
 ○ sin inhibidor;
 ◻ 50 mM; ◄ 100 mM;
 ◃ 150 mM

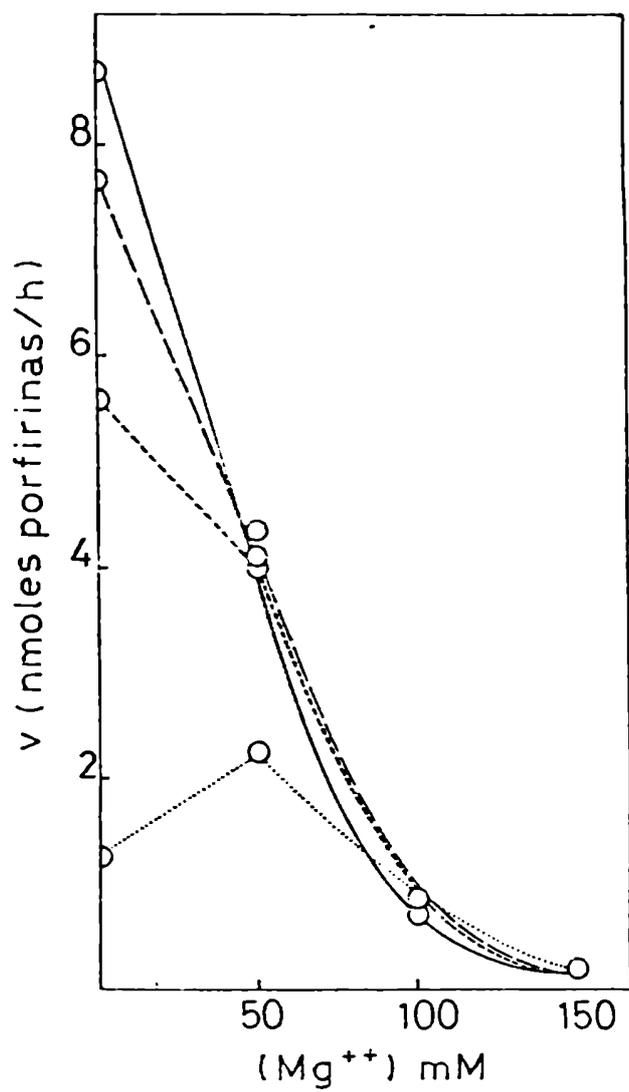


FIGURA P.II.16.: Efecto de distintas concentraciones de Mg^{++} sobre la velocidad de formación de porfirinas
 (··O··) 24 μM PBG;
 (---O---) 72 μM PBG;
 (-O-) 143 μM PBG;
 (-O-) 215 μM PBG

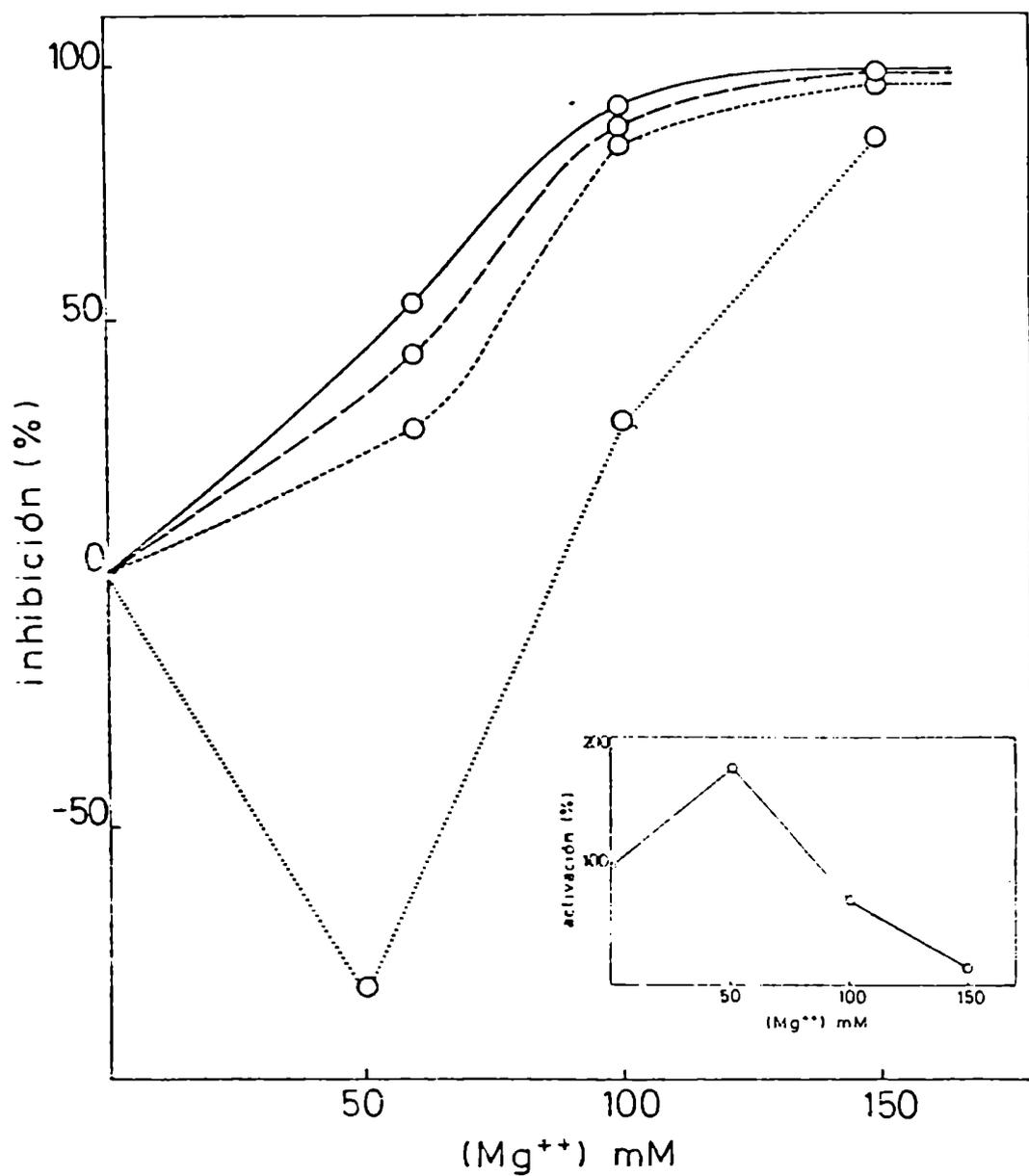


FIGURA P.II.17.: Porcentaje de inhibición (respecto a las porfirinas formadas) en función de la concentración de inhibidor (---○---) 24 μM PBG; (---○---) 72 μM PBG; (-○-) 143 μM PBG; (-○-) 215 μM PBG
 Inset: Porcentaje de activación (respecto a las porfirinas formadas) en función de la concentración de Mg⁺⁺ para 24 μM de PBG

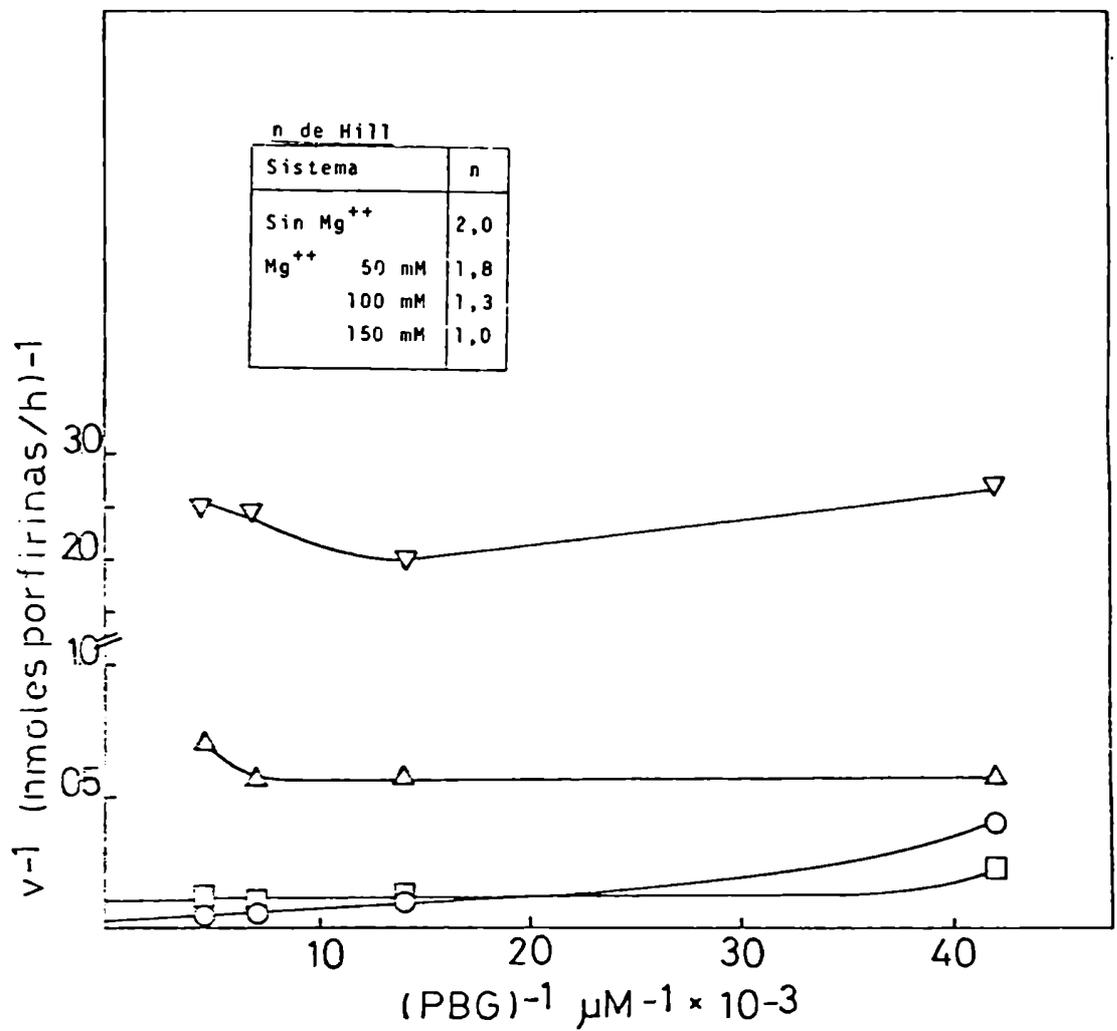


FIGURA P.II.18.: Gráficos de las dobles recíprocas en presencia de distintas concentraciones de Mg⁺⁺ considerando la velocidad en función de la formación de porfirinas.
 O sin agregado de inhi-
 bidor; □ 50 mM; Δ 100 mM;
 ▽ 150 mM

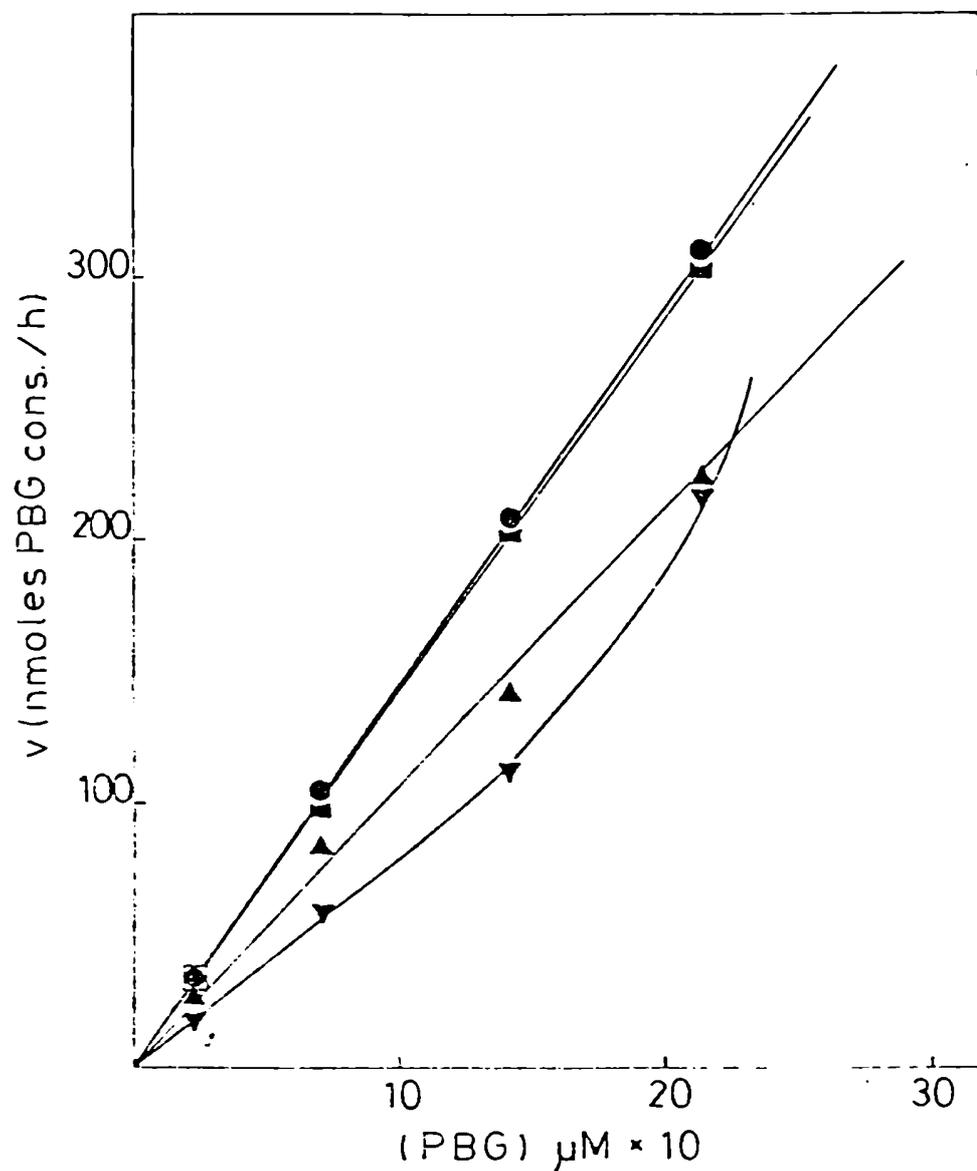


FIGURA P.II.19.: Curva de saturación por PBG en presencia de distintas concentraciones de Mg^{++} , considerando la velocidad como consumo de sustrato

- sin agregado de inhibidor; ■ 50 mM;
- ▲ 100 mM; ▼ 150 mM

terar el perfil cinético, en tanto que a 150 mM el efecto fue mayor, influyendo además sobre el comportamiento michaeliano de la enzima. Estos resultados se aprecian claramente en la Figura P.II.20.

Los gráficos de Lineweaver-Burk (Figura P.II.21.) están de acuerdo con lo ya discutido; sólo debemos añadir que a concentraciones superiores a 100 mM de Mg^{++} también disminuyen el K_m y la $V_{máx}$, pero sin responder a un modelo definido, dado que probablemente estén ocurriendo una combinación de efectos individuales.

En cuanto al tipo isomérico (Figura P.II.22.), es interesante que ya a 50 mM hubo una ligera estimulación del tipo III, cuando la concentración de PBG fue de 24 μM , coincidente con el efecto estimulante sobre la velocidad de formación de porfirinas observado en este sistema; pero, a concentraciones superiores de PBG, el Mg^{++} actuó reduciendo significativamente el porcentaje del tipo III, con el aumento correspondiente del isómero I.

Según los resultados aquí obtenidos con la enzima de *Rp. palustris*, se deduce que la acción del Mg^{++} sobre la PBG-asa es bastante compleja. A baja concentración de sustrato, el Mg^{++} puede, a determinadas concentraciones activar la síntesis total de porfirinas, estimulando ligeramente la serie III, en tanto que, a concentraciones más altas de PBG, por arriba de 50 mM de Mg^{++} , este catión siempre la inhibe, disminuyendo significativamente el tipo III. Hay además cambios en el comportamiento cinético, reduciéndose el n de Hill de 2 a 1.

El Mg^{++} también tiene acción negativa sobre el consumo de sustrato, a concentraciones de 100 mM o mayores, para valores de PBG superiores a 72 μM .

Recordemos una vez más que el Mg^{++} activaba la PBG-asa de callos de soya (Llambías, 1971), de eritrocitos de aves (Llambías y Batlle, 1971 b) y de hígado bovino (Sancovich, 1972) a concentraciones entre 1 y 10 mM, produciendo además una mayor formación del isómero III. Estos hallazgos han sido confirmados recientemente por Clement et al (1982) con la enzima de hígado de rata. Podemos agregar que, a concentraciones mayores que 25 mM de Mg^{++} , la formación de porfirinas producida por la PBG-asa de estas mismas fuentes disminuye fuertemente; esta inhibición se hace extensiva asimismo al consumo de PBG, si bien en menor gra-

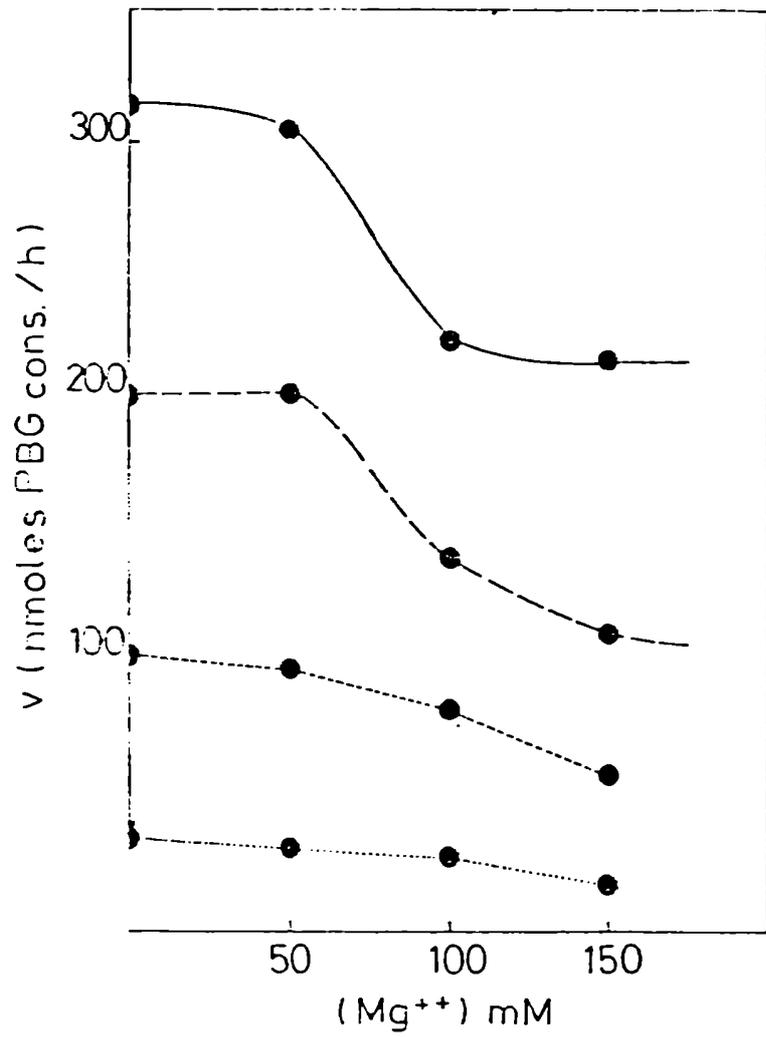


FIGURA P.II.20.: Efecto de distintas concentraciones de Mg⁺⁺ sobre la velocidad de consumo de sustrato

- (●) 24 μM PBG
- (---●---) 72 μM PBG
- (--●--)
- (-●-)

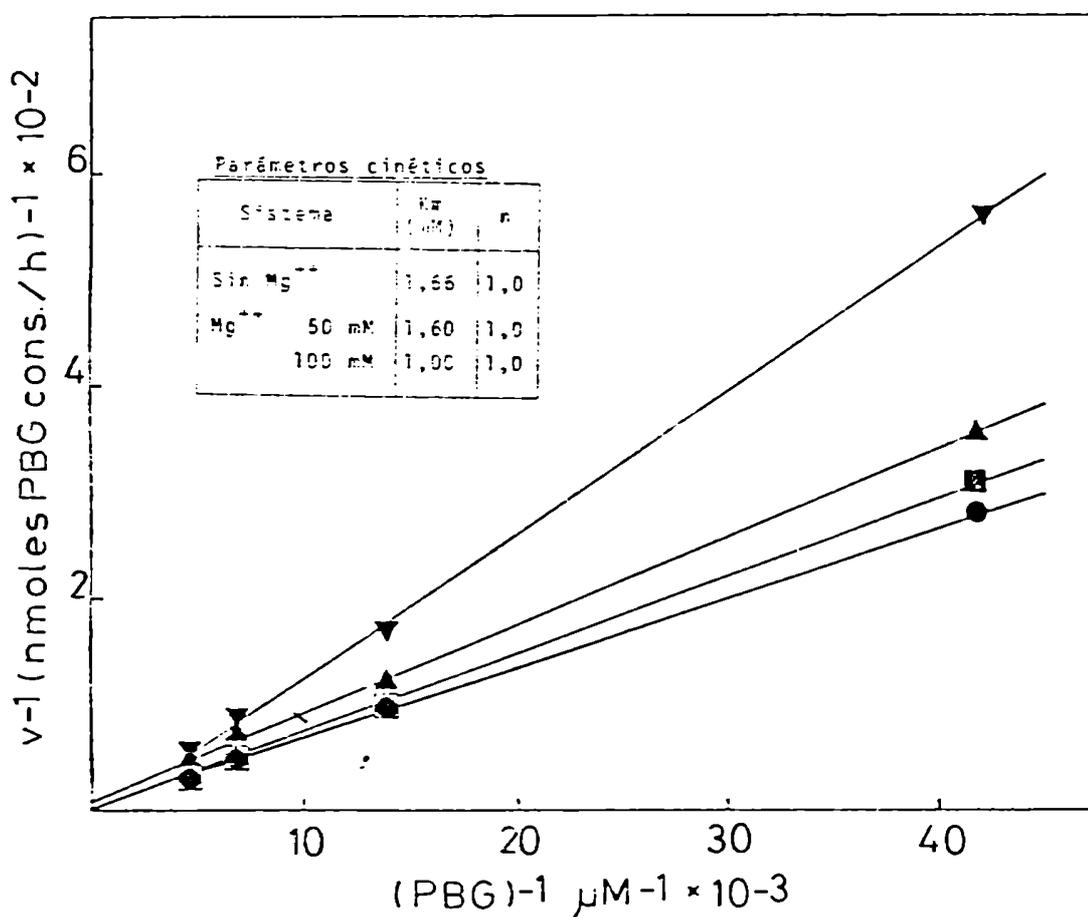


FIGURA P.II.21.: Gráficos de las dobles recíprocas en presencia de distintas concentraciones de Mg^{++} , considerando la velocidad en función del consumo de sustrato.

- (●) sin agregado de inhibidor;
- (■) 50 mM; (▲) 100 mM;
- (▼) 150 mM

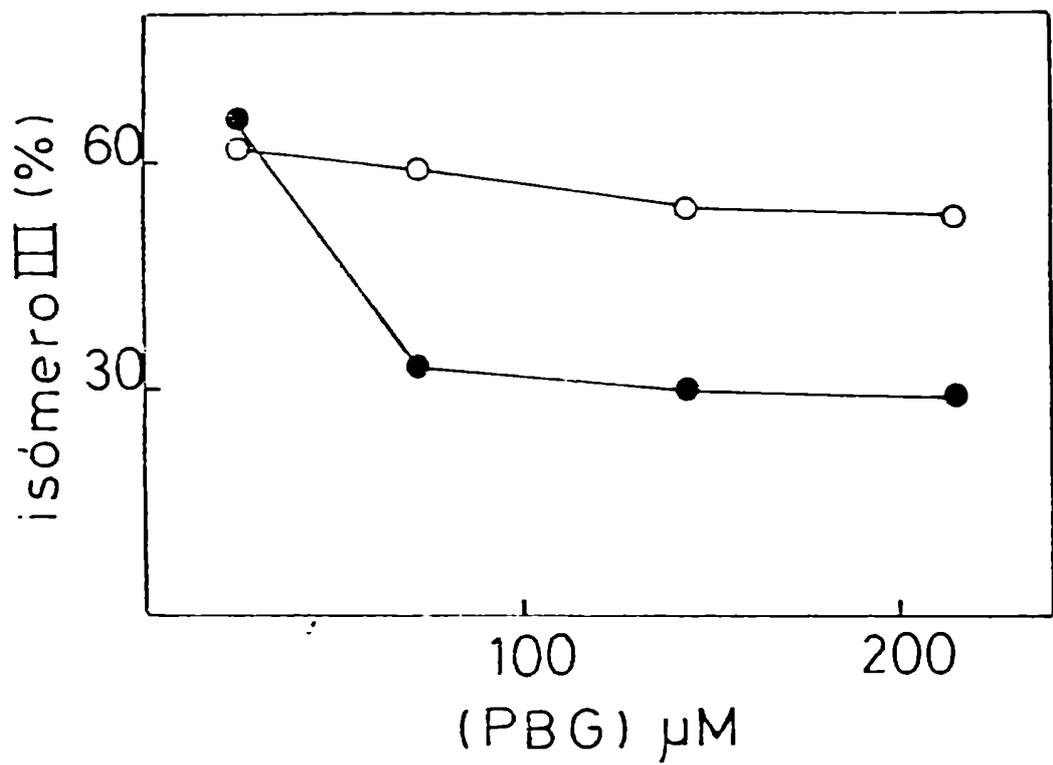


FIGURA P.II.22.: Efecto del Mg^{++} (50 mM) sobre el tipo isomérico de las porfirinas formadas.
 ○ sin Mg^{++} ; ● con Mg^{++}

do. A 10 mM, el Mg^{++} también activó la Deaminasa de hígado bovino (Sancovich, 1972), resultando inhibitorio su efecto a mayores concentraciones; es llamativo que, a concentraciones superiores a 10 mM inhibieron la formación de porfirinas obtenidas a partir de Deaminasa de eritrocitos de ave pero sin afectar significativamente el consumo de PBG (Llambías y Batlle, 1971 b).

En el grupo de experiencias con la PBG-asa de *Rp. palustris* hemos encontrado efecto estimulante con 50 mM de Mg^{++} , pero a bajas concentraciones de PBG. Cuando cubrimos el rango 1-150 mM (Figura P.II.14.), en todos los casos hubo inhibición; sin embargo notemos que en esos ensayos la concentración de PBG fue de 176 μM , concordando luego estos datos con los logrados a ese valor de PBG cuando se varió el rango de sustrato entre 24 y 215 μM (Figura P.II.15.). Además, en todos los otros tejidos en los cuales se había observado el efecto activante del Mg^{++} , entre 1-10 mM, la concentración relativa de PBG había estado entre 5-30 μM .

Resulta entonces concluyente que esa acción estimulante del Mg^{++} sólo se manifiesta a ciertas concentraciones del metal, en el entorno de 10 mM, y aparentemente, cuando la enzima no está totalmente saturada de sustrato.

Asimismo es evidente que el Mg^{++} actúa sobre el complejo de la PBG-asa, tanto a nivel de Deaminasa como de Isomerasa.

Ya habíamos postulado (Batlle y Rossetti, 1977; Llambías, 1971 y Sancovich, 1972), que el Mg^{++} podría producir fenómenos de asociación-disociación de la enzima que condujeran finalmente a un ordenamiento estructural óptimo para la actividad. Se ha propuesto asimismo, que ciertos cationes divalentes, como el Mg^{++} podrían actuar en el sitio catalítico de la Isomerasa (Scott et al, 1976).

Los resultados obtenidos con *Rp. palustris* estarían de acuerdo con estas hipótesis; pero surge además, que el Mg^{++} debería actuar sobre diferentes sitios. Asimismo se vislumbra una cierta interacción con el sustrato y es muy posible que el metal y el PBG tengan un lugar de unión independiente sobre la proteína. A concentraciones relativamente bajas de ambos, cada uno parecería funcionar de manera tal que se lograra dicho ordenamiento estructural óptimo al cual nos hemos referido. Sin embargo por aumento de la concentración de cualquiera de ellos, se des

truiría ese equilibrio ideal; tal vez el Mg^{++} ocupara o bloquear el sitio del PBG tanto sobre la Deaminasa (dado que se reduce el consumo de PBG), como sobre la Isomerasa; eventualmente el Mg^{++} podría disociar a esta última del complejo (por cuanto al aumentar el metal van desapareciendo los efectos homotrópicos característicos de la cupla Deaminasa-Isomerasa), con la consecuente disminución de las porfirinas de tipo III. Otra alternativa adicional sería que el Mg^{++} impidiera la liberación del TPM producto de la Deaminasa y sustrato de la Isomerasa, lo que se traduciría también en una disminución en la formación total de porfirinas (tipos I ó III, según actuara sobre Deaminasa o PBG-asa), y en un menor consumo de PBG, al quedar menos enzima libre disponible para nuevas polimerizaciones del sustrato. Es muy factible que el patrón resultante que observamos experimentalmente, sea entonces una suma de las distintas inhibiciones o efectos individuales sobre los dos componentes del complejo PBG-asa.

Si bien se ha confirmado la acción activadora de los iones Mg^{++} , como dijéramos al comienzo, hemos encontrado una serie de efectos sumamente interesantes, de manera que resultará sin duda valioso, continuar investigándolos, con el objeto de aportar nuevos datos para la elucidación del mecanismo de acción de estas enzimas.

P.II.2.2.5. Efecto de los iones amonio

Es ya muy conocida la acción inhibitoria del amonio sobre el sistema de la PBG-asa (Batlle y Rossetti, 1977).

Recordemos brevemente que estos iones actúan en la etapa de la ciclación e isomerización, modificando fundamentalmente la cantidad total y/o el tipo isomérico de las porfirinas formadas, en tanto que no afectan el consumo de sustrato o lo hacen en mucho menor grado.

Tanto el amonio como la hidroxilamina han sido empleados con frecuencia como inhibidores de la Deaminasa (Davies y Neuberger, 1973; Pluscec y Bogorad, 1970; Radmer y Bogorad, 1972), siendo estos muy útiles para la acumulación de intermediarios polipirrólicos de distinta longitud, en la reacción de polimerización del PBG en porfirinas.

Resultó entonces de interés estudiar la acción del amonio (en la forma de cloruro) sobre la PBG-asa de *Rp. palustris*.

En una primera serie de ensayos, se observó el comportamiento de la enzima frente a cantidades crecientes de amonio a una concentración de PBG de 176 μ M. Los resultados obtenidos (Figura P.II.23) confirman observaciones previas en el sentido de que ya a valores superiores a 1 mM se aprecia una significativa inhibición en la síntesis total de porfirinas; esa inhibición aumenta rápidamente entre 10 y 50 mM, hasta un 36% para la última concentración, pero luego alcanza sólo un 45% con 150 mM. El consumo de PBG en cambio, prácticamente no se alteró.

Como hemos observado a lo largo de este trabajo, la acción de ciertos iones sobre la PBG-asa depende además, de la concentración de sustrato, y recordando que en el caso de las enzimas de hígado bovino se demostró que el amonio inhibía competitivamente la Isomerasa y no competitivamente la Deaminasa (Sancovich et al, 1969 b), se resolvió estudiar el comportamiento de la PBG-asa de *Rp. palustris* frente a 50, 100 y 150 mM de amonio, a concentraciones variables de PBG.

Analizando los gráficos de las directas, la velocidad de formación de porfirinas en función del consumo de sustrato (Figura P.II.24.) mostró nuevamente el perfil sigmoideo correspondiente a la enzima sin agregados, en tanto que concentraciones crecientes de amonio resultaron inhibitorias en grado correspon

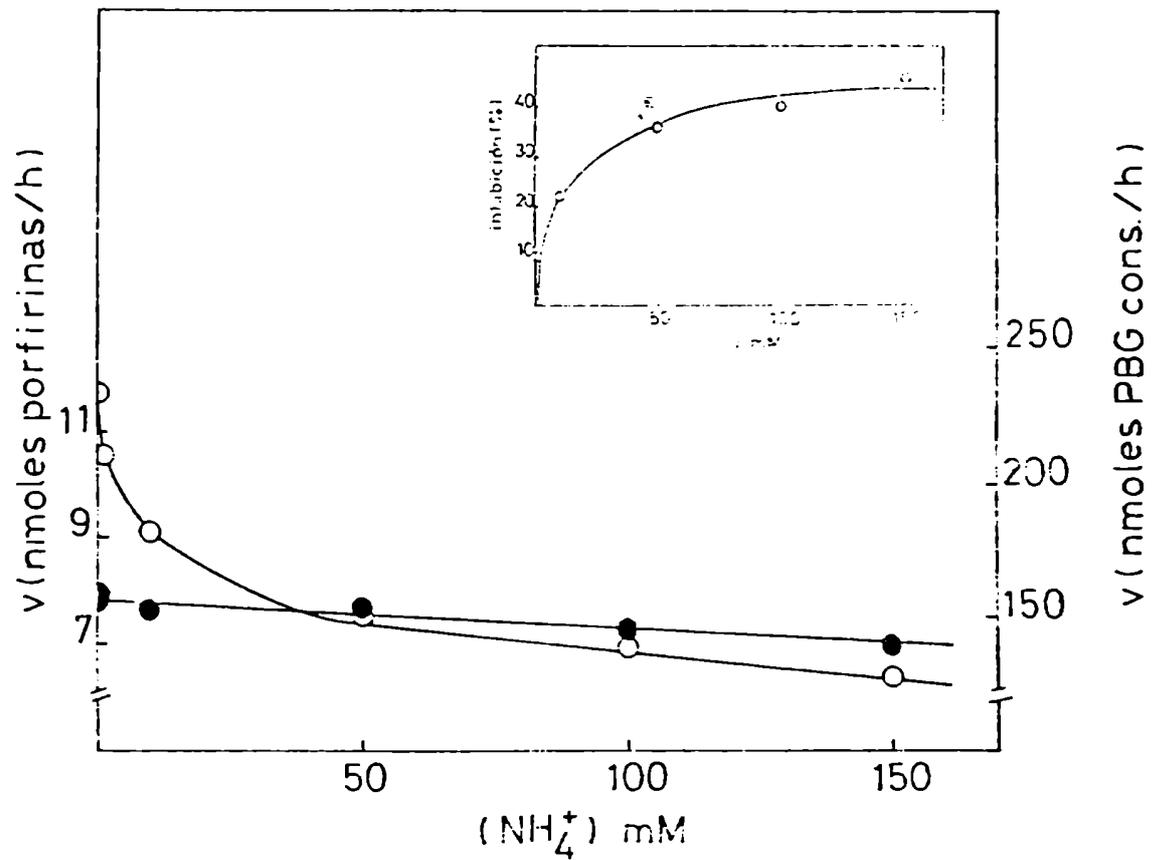


FIGURA P.II.23.: Efecto de distintas concentraciones de NH_4^+ sobre la velocidad de formación de porfirinas (O) y consumo de PBG (●)
 Inset: Porcentaje de inhibición (en base a las porfirinas formadas) en función de la concentración de amonio

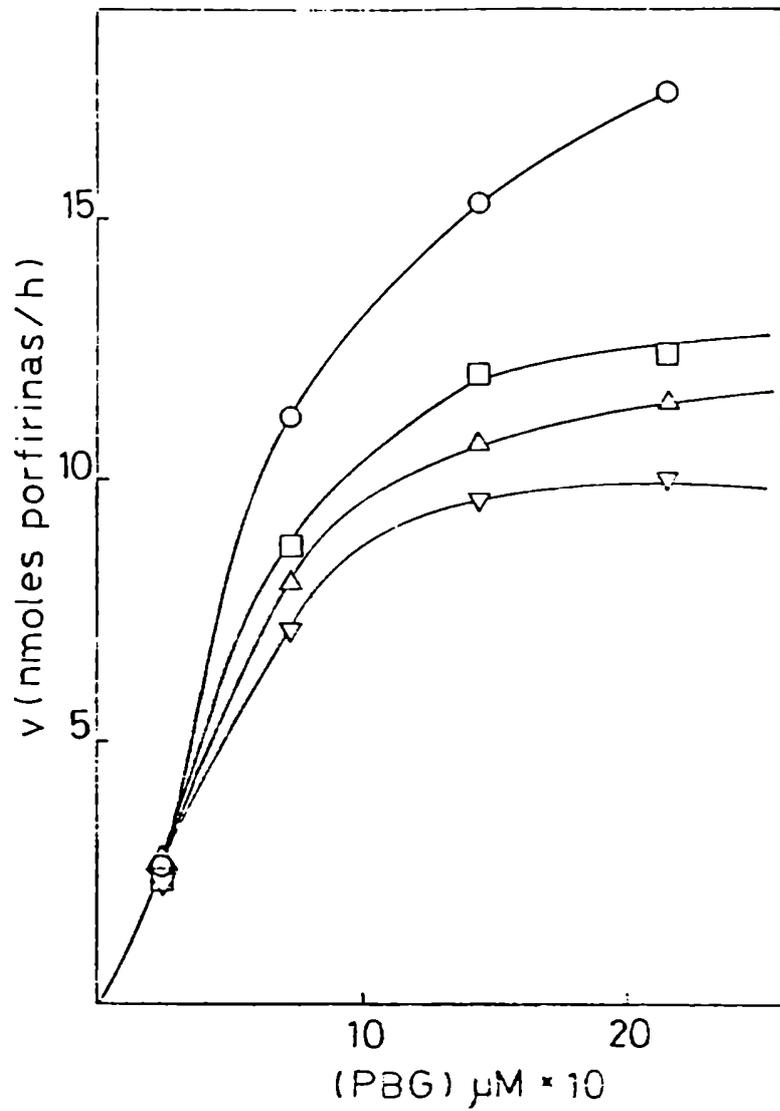


FIGURA P.II.24.: Curva de saturación por sustrato en presencia de distintas concentraciones de NH_4^+ , considerando la velocidad en función de la formación de porfirinas.
 (O) sin agregado de inhibidor;
 (□) 50 mM;
 (Δ) 100 mM;
 (▽) 150 mM

diente, para valores de PBG superiores a 30 μM , aunque modificando sólo parcialmente el perfil cinético. También observamos en esta serie de experiencias, en concordancia con los datos preliminares (Figura P.II.23), que la máxima inhibición lograda estuvo en el orden del 43% (Figura P.II.25), a la mayor concentración de PBG (215 μM) y de inhibidor (150 mM).

En los dos gráficos anteriores, se apreciaba que a la menor concentración de sustrato no había grandes variaciones en la velocidad, lo cual se observa mejor en la Figura P.II.26, insinuándose todavía a 150 mM de amonio un ligero aumento de la formación total de porfirinas. Surge así, claramente que la concentración de sustrato es un factor importante en relación al grado de inhibición del amonio.

De los gráficos de las dobles recíprocas (Figura P.II.27) se confirma que el amonio inhibe la síntesis total de producto, disminuyendo el K_m y la $V_{m\acute{a}x}$, pero sin responder a un modelo conocido, lo cual habla una vez más, de la existencia de una combinación de efectos separados; además, como se insinuaba en las curvas de saturación, el amonio modifica levemente la cinética de la reacción, tendiendo el n de Hill de 2 a 1,5.

Es conveniente a esta altura del análisis ocuparnos de la acción del amonio sobre el tipo isomérico de las porfirinas formadas (Figura P.II.28). En estudios previos de nuestro laboratorio (Batlle y Rossetti, 1977; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Sancovich et al, 1969 a, b) y de otros grupos (Bogorad, 1963; Frydman y Feinstein, 1974), se había observado que el amonio influía en forma considerable sobre la isomerasa.

En cierto modo, los datos de este trabajo han confirmado la idea general, pero indudablemente, el empleo de un rango bastante amplio de concentraciones de PBG ha producido resultados algo inesperados que no son fáciles de explicar, en base a las hipótesis hasta ahora propuestas.

Vemos que a bajas concentraciones de sustrato, el amonio disminuye sensiblemente y en forma creciente el porcentaje de tipo III. Aumentando el PBG, a alrededor de 70 μM , a 50 mM el inhibidor, no solo no afecta la formación de isómero III sino que hasta la estimula ligeramente; por otro lado, a 100 mM apenas disminuye el porcentaje de tipo III siendo también menor su efecto a 150 mM. Cuando llegamos a saturación con sustrato, el

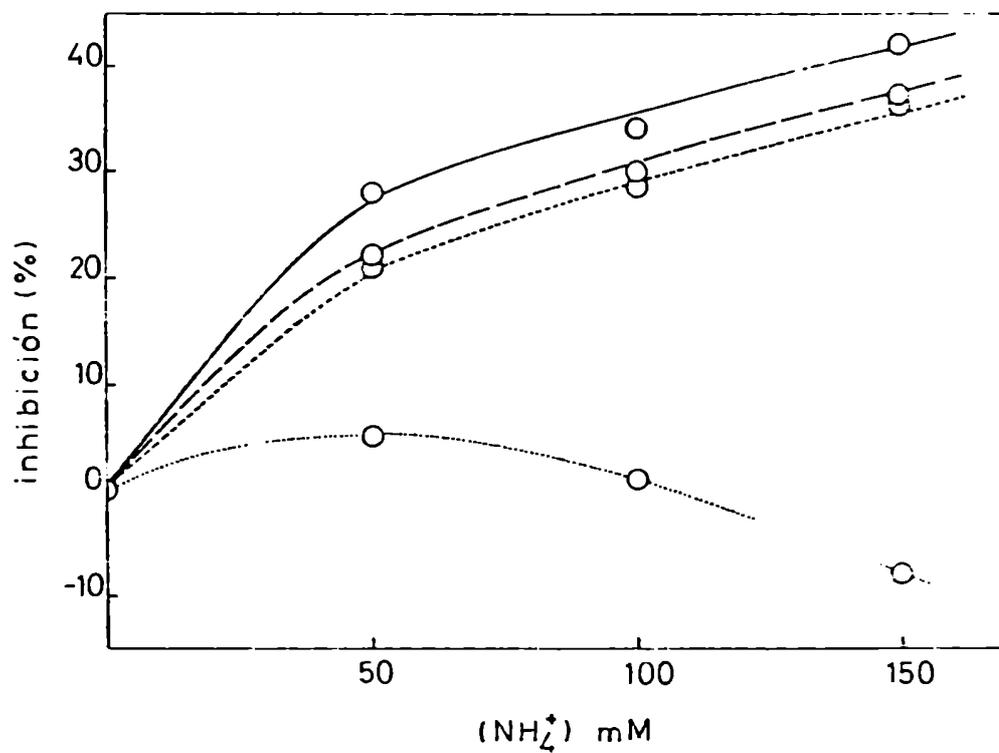


FIGURA P.II.25.: Porcentaje de inhibición (respecto a las porfirinas formadas) en función de la concentración de Mg⁺⁺
 (··· O ···) 24 μM PBG;
 (-· O ·-) 72 μM PBG;
 (- - O - -) 143 μM PBG;
 (- O -) 215 μM PBG.

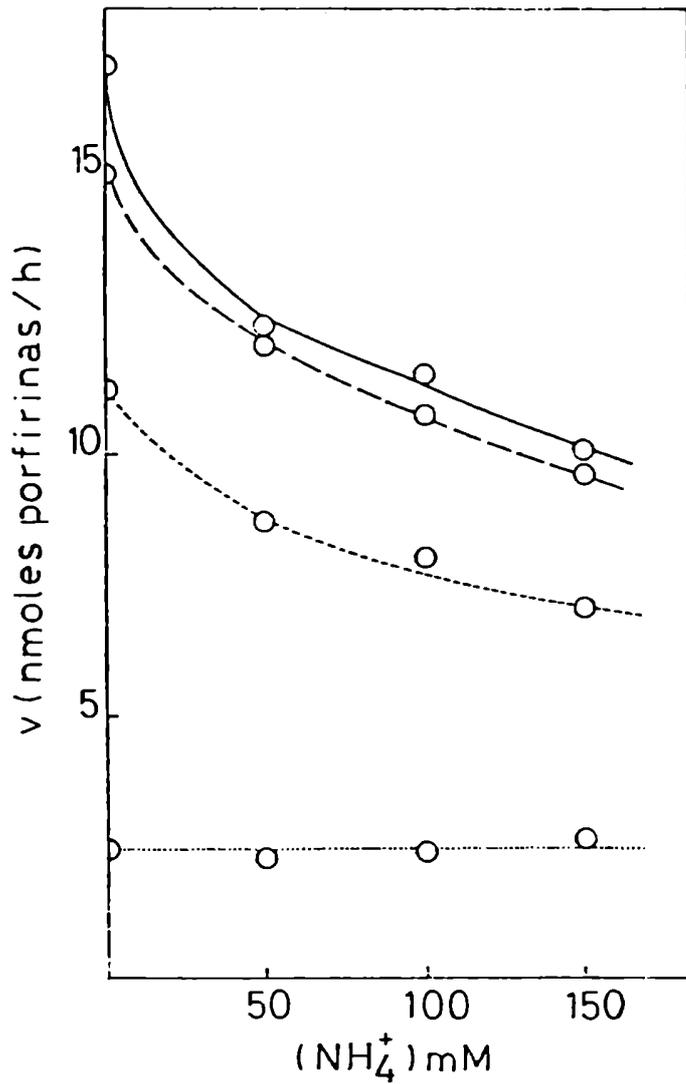


FIGURA P.II.26.: Efecto de distintas concentraciones de amonio sobre la velocidad de formación de porfirinas
 (O···) 24 μM PBG;
 (· O ·) 72 μM PBG;
 (-- O --) 143 μM PBG;
 (— O —) 215 μM PBG

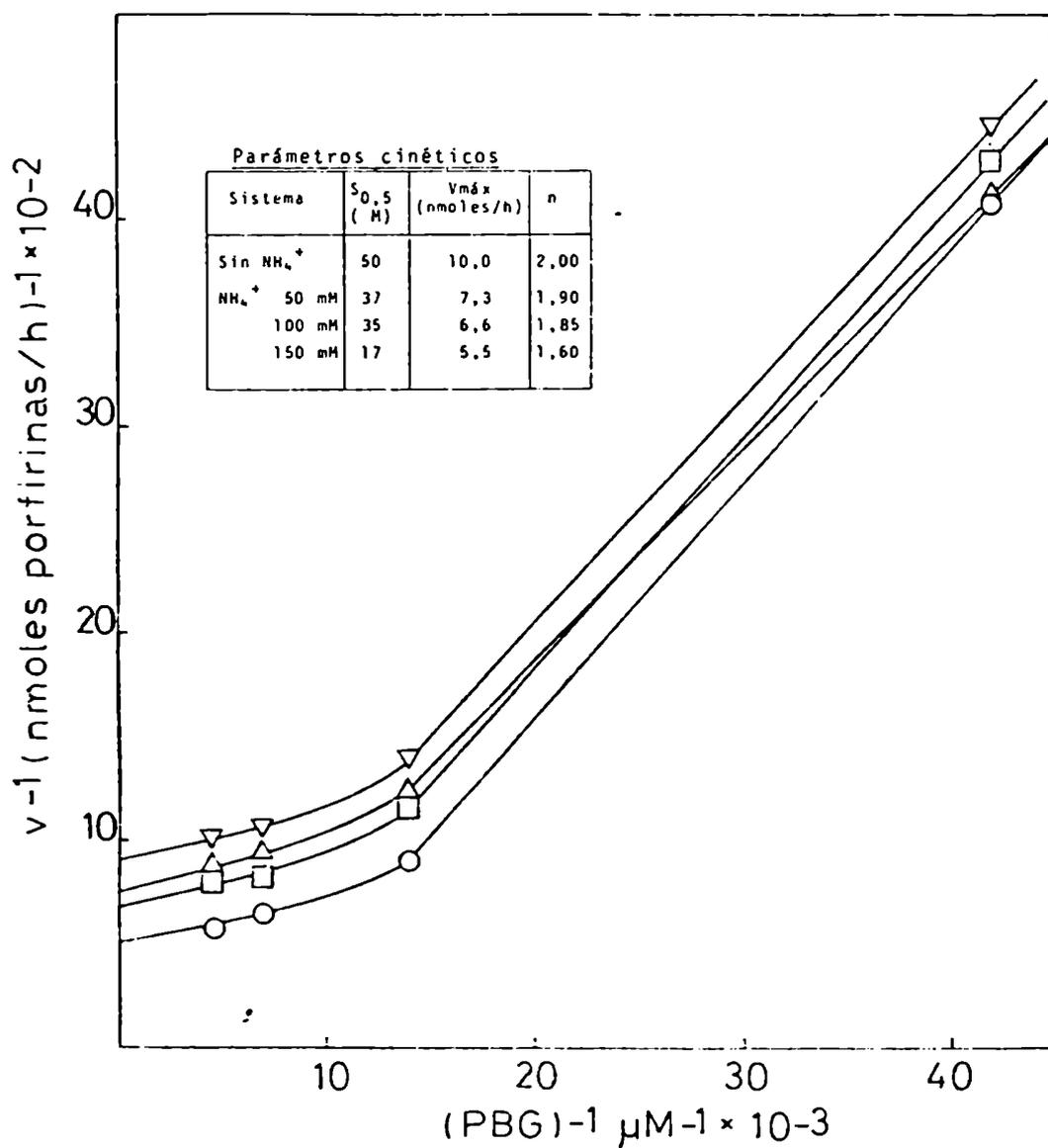


FIGURA P.II.27.: Gráficos de las dobles recíprocas en presencia de distintas concentraciones de amonio, considerando la velocidad en función de la formación de porfirinas.
 (\circ) sin agregado de inhibidor; (\square) 50 mM;
 (\triangle) 100 mM; (∇) 150 mM.

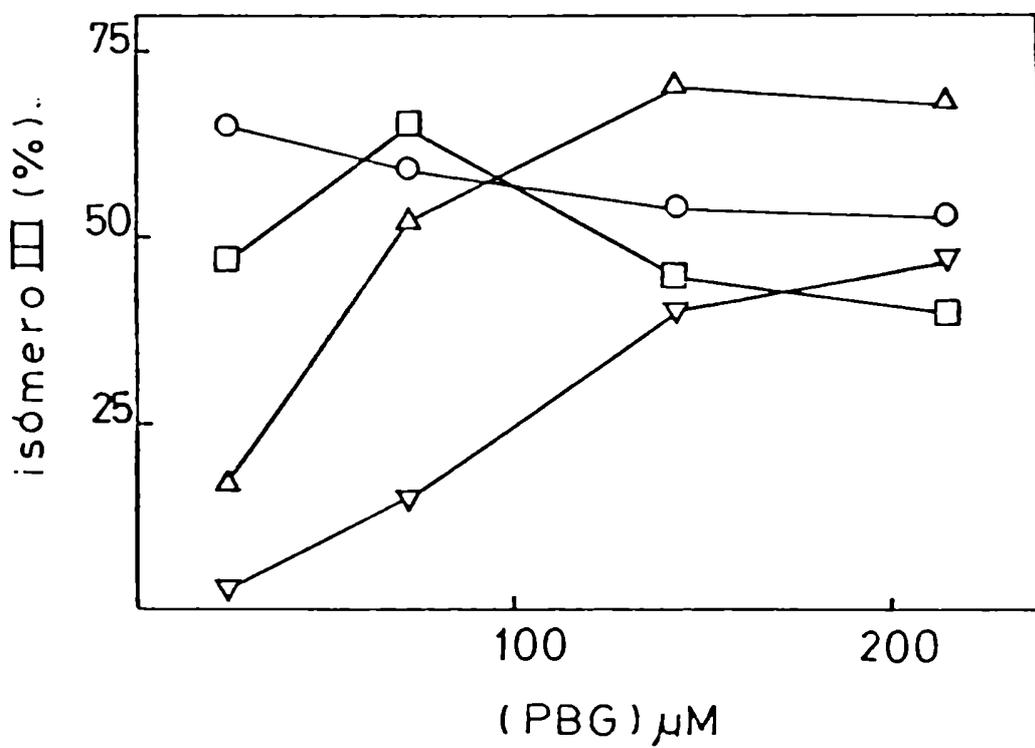


FIGURA P.II.28.: Efecto de la presencia de amonio sobre el tipo isomérico de las porfirinas formadas, a distintas concentraciones de sustrato.
 (O) sin agregado de inhibidor; (□) 50 mM;
 (Δ) 100 mM; (▽) 150 mM

amonio 50 mM vuelve a reducir ligeramente el isómero III, mientras que se compensa o revierte aún más el efecto a 150 mM ya que sólo se reduce en un 10% la proporción de tipo III y a 100 mM sucede algo realmente llamativo, pues aumenta el porcentaje del isómero III, es decir aparentemente habría una activación de la Isomerasa, pues tengamos en cuenta que la síntesis de porfirinas totales era menor que el control. Si incrementamos aún más la concentración de PBG, se mantiene la máxima relación de isómero III obtenida en presencia de amonio 100 mM y ésta mejora aún más en el sistema que contiene 150 mM de amonio.

Con estos datos, decidimos entonces recalcular la velocidad de la reacción, en base, solamente a la cantidad de isómero III formado, como una medida aproximada de la acción del amonio sobre la Isomerasa, y de los gráficos de las dobles recíprocas (Figura P.II.29.), encontramos que para las tres concentraciones más altas de PBG, no se modifica la velocidad máxima de formación de isómero III, si bien aumenta el K_m , de manera que en esas condiciones, el amonio se estaría comportando como un inhibidor competitivo de la Isomerasa. Recordemos que Sancovich et al (1969 b) habían observado que el amonio era un inhibidor competitivo de la Isomerasa, aunque a todas las concentraciones de sustrato ensayadas.

El análisis de los datos de la velocidad de reacción en base al consumo de sustrato es relativamente más simple. El amonio no afecta el consumo de PBG ni el comportamiento cinético de la enzima (Figura P.II.30); se aprecia claramente en la Figura P.II.31 que a todas las concentraciones de sustrato ensayadas, la velocidad de reacción es constante. De la representación de las dobles recíprocas (Figura P.II.32), tanto para el control como para las tres concentraciones de amonio obtenemos trazos lineales prácticamente coincidentes, sin cambios en el K_m , en la $V_{máx}$ ni en el n de Hill.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el amonio disminuye la cantidad total de porfirinas formadas a concentraciones crecientes de inhibidor y sustrato, modificando sólo ligeramente la cinética de la reacción, en tanto que, respecto al tipo isomérico, su acción inhibitoria sobre la Isomerasa disminuye al aumentar la concentración de sustrato, evidenciándose una interacción competitiva entre el PBG y el amonio, y a ciertas concentraciones de sustrato e inhibidor, parece estimularse una

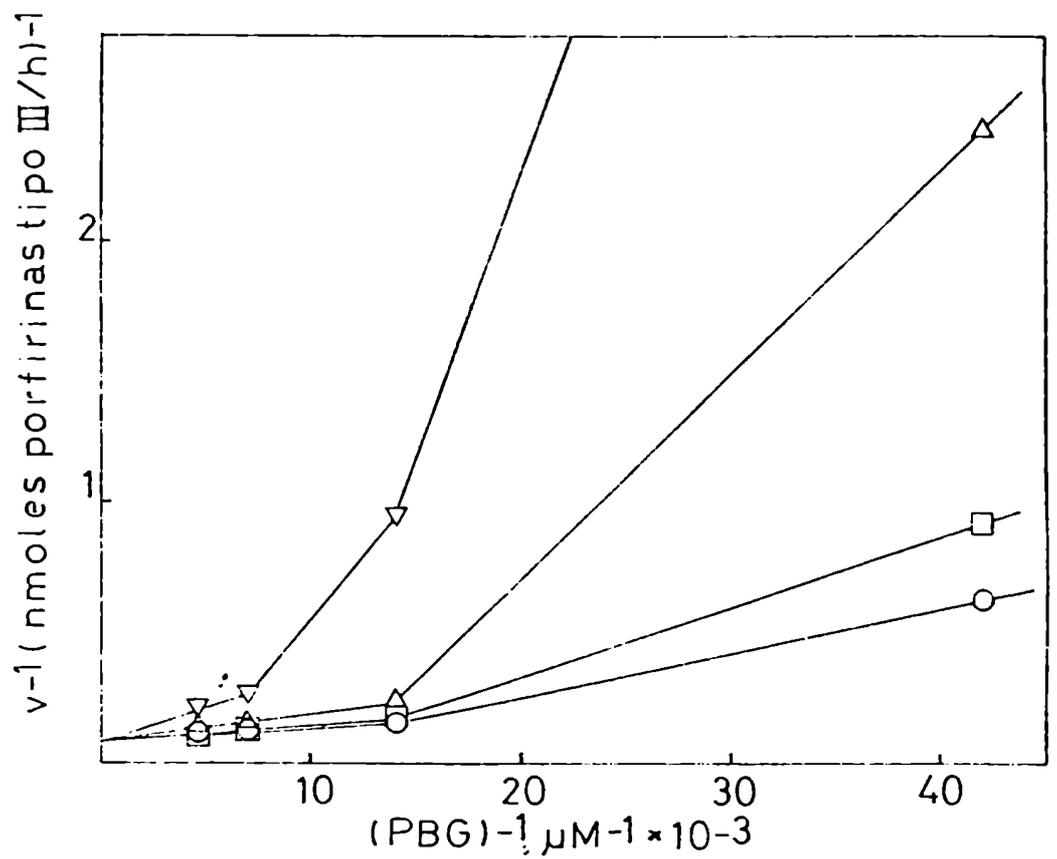


FIGURA P.II.29.: Gráficos de las dobles recíprocas en presencia de distintas concentraciones de amonio considerando la velocidad en función de la cantidad de porfirinas de tipo III formadas.
 (O) sin agregado de inhibidor; (□) 50 mM; (Δ) 100 mM; (▽) 150 mM

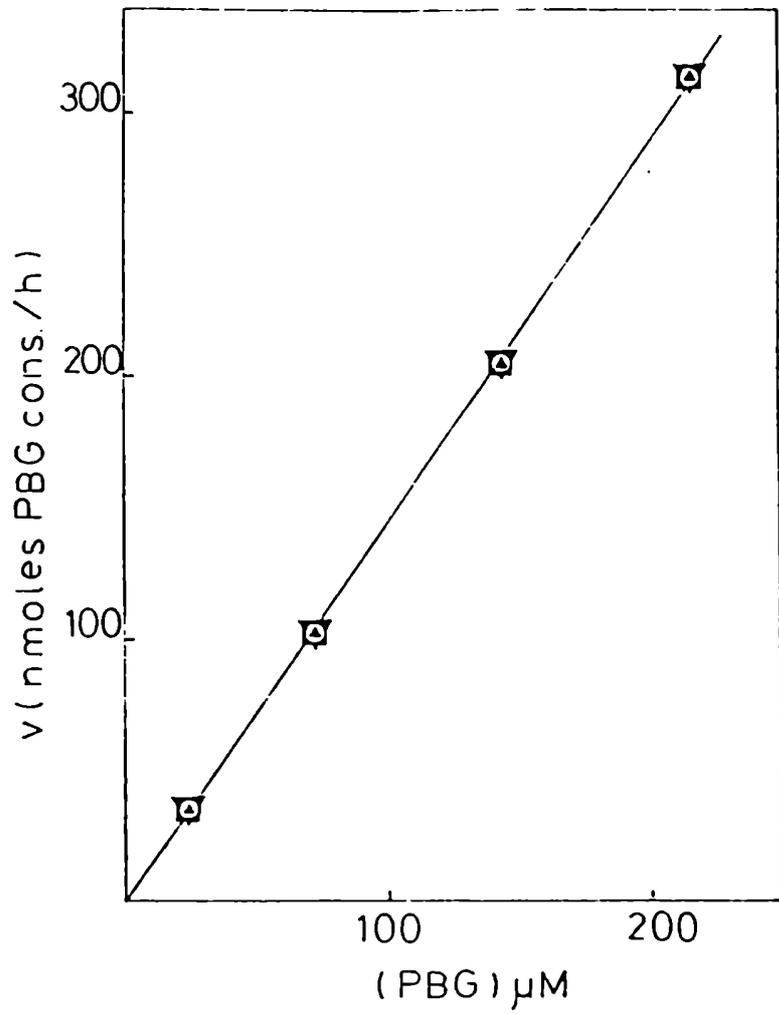


FIGURA P.II.30.: Curva de saturación por sustrato en presencia de distintas concentraciones de amonio, considerando la velocidad en función del consumo de PBG.
 (●) sin agregado de inhibidor;
 (■) 50 mM;
 (▲) 100 mM;
 (▼) 150 mM

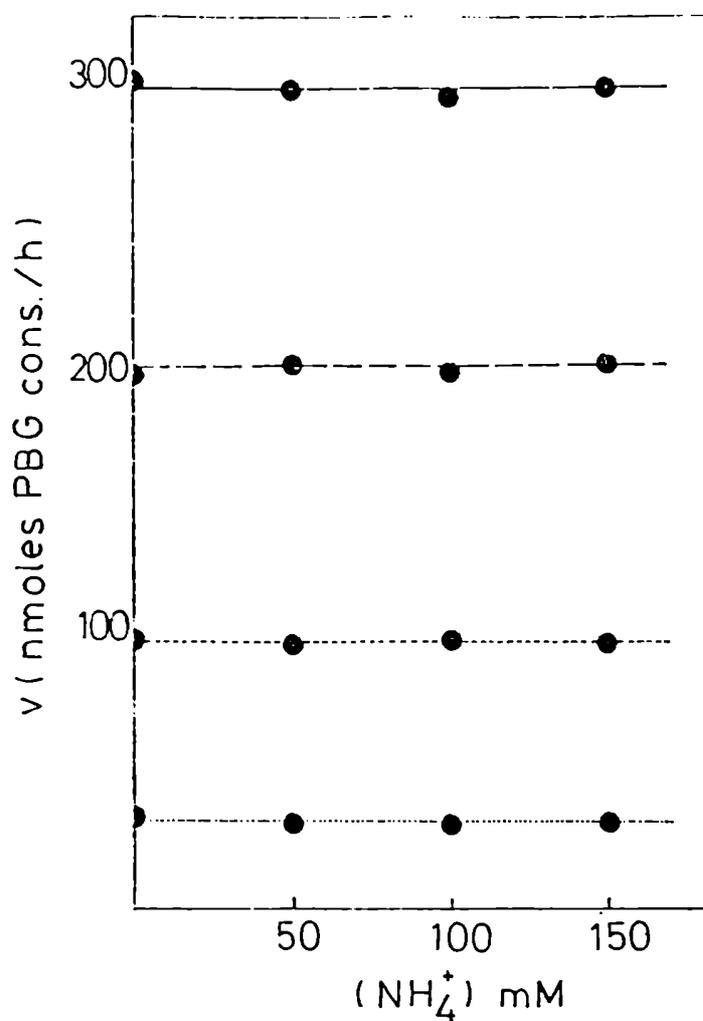


FIGURA P.II.31.: Efecto de distintas concentraciones de amonio sobre la velocidad de consumo de sustrato.
 (●····) 24 μM PBG;
 (·-·-·) 72 μM PBG;
 (-·-·-) 143 μM PBG;
 (-●-) 215 μM PBG.

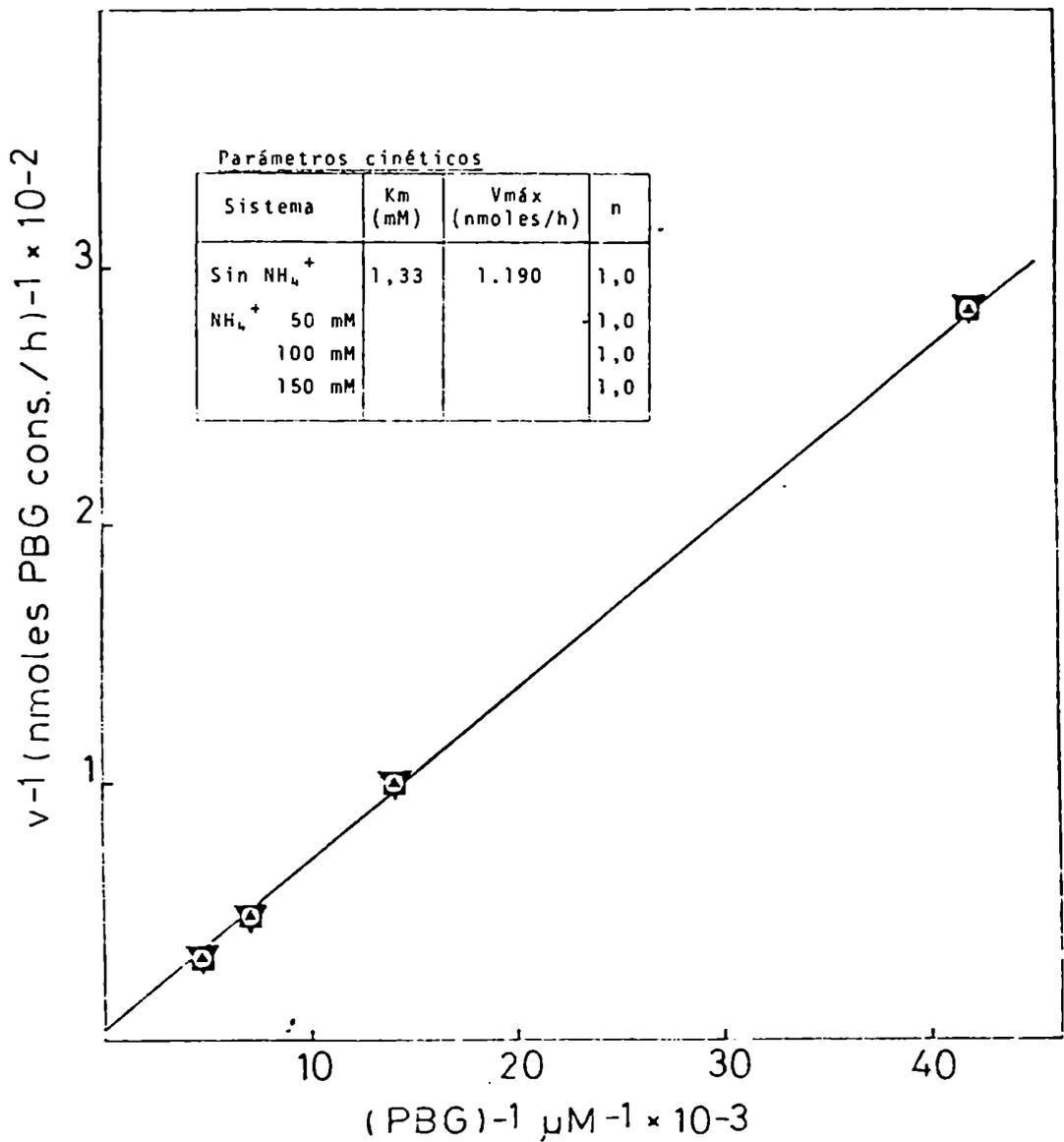


FIGURA P.II.32.: Gráficos de las dobles recíprocas en presencia de distintas concentraciones de amonio, considerando la velocidad en función del consumo de sustrato.
 (●) sin agregado de inhibidor; (■) 50 mM; (▲) 100 mM; (▼) 150 mM

mayor formación de isómero III a expensas del tipo I. El amonio no afecta en cambio el consumo de PBG.

En consecuencia, este inhibidor actuaría, como ya se propusiera, a nivel de la ciclación e isomerización de las porfirinas. Dado que no modifica la velocidad de consumo de PBG, pero disminuye la formación de producto, de acuerdo con las ideas más recientes acerca de que el sustrato de la Isomerasa es el TPM lineal producto de la acción de la Deaminasa (Jordan y Berry, 1980; Battersby et al, 1979), estos datos nos están sugiriendo que el amonio no tendría ningún sitio de unión sobre la Deaminasa, pero como disminuye la cantidad total de porfirinas formadas, debe haber menor cantidad de TPM disponible para su posterior ciclación a Uro I o Isomerización y ciclación a Uro III. Esto podría deberse a una reacción directa del amonio con los intermediarios di y tripirrólicos nacientes, formando un derivado básico con los mismos que se liberaría de la Deaminasa, como lo demostraron Davies y Neuberger (1973) al estudiar la acción del amonio y otras bases nitrogenadas sobre Deaminasa aislada. Sabemos además que los intermediarios libres son sustratos pobres de estas enzimas (Rossetti et al, 1977). Como resultado final de todo este proceso, la cantidad total de porfirinas disminuye. En conclusión, el amonio no actúa directamente sobre la Deaminasa, sino que atrapa y liberaría al medio intermediarios polipirrólicos reduciendo la concentración de TPM unido a la enzima.

Pero la sola disminución de la cantidad de TPM no alcanza a explicar los complejos cambios en el tipo isomérico.

Es muy probable que el amonio posea un sitio de unión alostérico sobre la Isomerasa, de manera que cuando este ión se une a la misma, induce cambios conformacionales en la proteína que finalmente dificultan la entrada del TPM y su consiguiente isomerización, ciclándose directamente a Uro I, disminuyendo así el porcentaje de isómero III. Sin embargo no debe descartarse la probabilidad de que, a ciertas concentraciones el amonio también pueda actuar como un efector positivo, aunque probablemente por unión en otro sitio diferente favoreciendo ya sea la entrada del TPM o una óptima asociación entre Deaminasa-Isomerasa, análogamente a lo propuesto para los iones Mg^{++} , K^+ y Na^+ , por cuanto se ha observado, con las enzimas de hígado bovino (Sancovich et al, 1969 a, b) y eritrocitos de ave (Llambías et al, 1971) que a concentraciones de amonio entre 0,1 y 1 mM, éste

aumenta la síntesis total de porfirinas:

En base al comportamiento competitivo entre el amonio y el PBG, observado sobre la Isomerasa de hígado bovino (Sancovich et al, 1969 a, b) habíamos postulado que los iones amonio podían inhibir la Isomerasa por unión al mismo sitio que el PBG o al sitio de unión del polipirrimetano; en ambos casos sobre esta enzima (Stella et al, 1971; Batlle y Rossetti, 1977). Los resultados de este trabajo excluirían la posibilidad de una acción competitiva con el TPM, o sea a nivel de sitio activo, pero no, la de una unión en un posible sitio del PBG; sólo que tendríamos que modificar o aclarar cuál sería entonces ese sitio de unión para ambas moléculas proponiéndose ahora que el PBG debe tener un sitio de unión sobre la Isomerasa diferente del sitio activo y quizás este razonamiento algo distinto al que veníamos planteando hasta este momento, esté más de acuerdo o o corresponda mejor con algunos parámetros cinéticos.

Es posible entonces, que exista un segundo sitio de unión del PBG sobre el complejo y que sea en realidad un sitio alostérico sobre la Isomerasa. En el sitio activo de la Isomerasa se uniría su verdadero sustrato, el TPM.

Recordemos también, que en algunos tejidos se ha observado una ligera inhibición de la formación de porfirinas por la PBG-asa, debido a exceso de PBG, acompañada frecuentemente de una disminución del isómero III (Cornford, 1964; Clement et al, 1982; Sancovich et al, 1969 a). Tal vez cuando el PBG ocupa ese sitio alostérico actúa regulando (positiva o negativamente) la entrada del TPM, según las necesidades fisiológicas; así, frente a un gran exceso de sustrato por ejemplo, llevará a una disminución de la formación total de porfirinas. En este último caso, no puede descartarse la posibilidad de que una alta concentración de PBG, además bloquee la entrada del TPM al sitio activo.

Se podría por otro lado, considerar a la Isomerasa como la unidad regulatoria del complejo, pues hemos observado que su presencia influye sobre la cinética de la reacción, disminuyendo así o controlando la actividad de la Deaminasa (Batlle y Rossetti, 1977; Sancovich et al, 1969 a); es bien conocido además el hecho de que cuando separamos la Isomerasa de la Deaminasa, ya sea por calentamiento, diálisis, etc., aumenta significativamente la actividad de esta última (Batlle y Rossetti, 1977). Tam-

bién recordemos que el PBG y el amonio protegen a la Isomerasa de su inactivación por el calor y la acción de ciertos reactivos (Llambías, 1971; Sancovich, 1972; Sancovich et al, 1969 a).

En consecuencia, es altamente probable que sobre la Isomerasa tengamos, además del sitio activo para el TPM (sobre el cual eventualmente el PBG podría actuar), un sitio alostérico para el PBG; sin embargo, podemos todavía ser más especulativos y ampliar este concepto, proponiendo que ese sitio sería en realidad un sitio regulatorio en el cual, según las condiciones del medio, pueden ubicarse y actuar, además del PBG, otras moléculas pequeñas como por ejemplo el amonio. Según sus concentraciones relativas y afinidades, estos efectores alostéricos podrían funcionar, ya sea estimulando o inhibiendo el sistema; aún más en la presencia simultánea de dos de ellos, podría llegar a existir una competencia, cuyo efecto final dependería de la clase de efectores en juego. Agreguemos que el hecho de que la inhibición por amonio aún a concentraciones de 150 mM (estos resultados) y hasta 200 mM (Llambías 1971; Sancovich, 1972) no pueda superar nunca el 40-45%, está de acuerdo con un comportamiento competitivo entre sustrato e inhibidor.

Los datos obtenidos en este trabajo se ajustan a la hipótesis propuesta. Vimos que a bajas concentraciones de PBG, no se modificaba la formación total de porfirinas, pero disminuía significativamente el porcentaje de isómero III con cantidades crecientes de amonio. Es decir en estas condiciones, todo el PBG sería transformado muy rápidamente por la Deaminasa en el TPM, sin que el amonio pudiera actuar a nivel de intermediarios, en cambio, éste, se uniría, aparentemente con gran facilidad al sitio alostérico sobre la Isomerasa, dificultando la entrada de ese TPM y disminuyendo correspondientemente la formación de isómero III, tanto más cuanto mayor la concentración de amonio. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que el amonio, a cierto nivel, actúe produciendo una disociación del complejo Deaminasa-Isomerasa o interfiriendo con su interacción, como ya habíamos postulado (Sancovich et al 1969 a, b; Stella et al, 1971).

Al aumentar la concentración de PBG a 72 μ M, aparecía una disminución en la velocidad de formación de porfirinas con el amonio, sin embargo los efectos sobre el tipo isomérico eran mucho menores. En este caso podría ocurrir que parte del PBG

llegara ahora a desplazar al amonio del sitio alostérico sobre la Isomerasa revirtiendo su acción (no necesariamente el PBG debe desplazar al amonio, podría quizás unirse al mismo sitio e impedir que el inhibidor indujera cambios conformacionales negativos en la enzima); adicionalmente el PBG podría producir efectos positivos. De todas maneras a estas concentraciones, ambos efectores estarían actuando competitivamente. El amonio libre sería capaz de atrapar y liberar intermediarios di o tripi rrólicos produciéndose menos TPM.

Llegando a saturación con sustrato (143 μ M) vemos que éste logra revertir aún más eficientemente la acción del amonio, desplazándolo casi totalmente del sitio alostérico o compensando su efecto negativo, para concentraciones hasta 150 mM; aunque en el caso de 100 mM la Isomerasa es todavía más activa que en el control, podría deberse a que en estas condiciones el PBG, además de haber anulado la acción del amonio, tenga capacidad adicional para producir cambios conformacionales positivos, facilitando una mayor entrada de TPM y aumentando así el porcentaje de isómero III. En esta situación hubo además una ligera reducción del n de Hili, sugiriendo una disminución de los efectos cooperativos inicialmente observados sin agregado de inhibidor. En ausencia de amonio, a esa concentración de PBG había disminuído levemente la proporción del isómero III, de manera que frente a un gran exceso de PBG, éste podría comportarse como un efector negativo. El amonio aquí también actúa a nivel de polimerización, atrapando y liberando polipirroles intermediarios.

A la mayor concentración de PBG ensayada, vemos que sucede algo similar al caso anterior, sólo que habría más PBG disponible para competir con el amonio, lo cual se comprueba al observar la casi total reversión de su efecto sobre la Isomerasa a 150 mM. A 100 mM se repitió la activación sobre la misma, pero parece haber llegado a un límite pues no aumentó más el porcentaje de isómero III; debe alcanzarse seguramente un equilibrio entre las distintas formas y tal vez sea también importante la relación molar Deaminasa:Isomerasa, dependiendo de la proporción de Isomerasa presente, la formación de la máxima cantidad posible de isómero III.

En conclusión, el amonio no tendría sitio de unión sobre la Deaminasa e inhibe la formación total de porfirinas atrapando y liberando al medio intermediarios polipirrólicos con menos de

de 4 unidades de PBG. La Isomerasa sería la unidad regulatoria del complejo de la PBG-asa; sobre aquella habría un sitio activo para la unión de su sustrato el TPM y un sitio alostérico, al cual podrían unirse el PBG y el amonio, de manera que según las concentraciones relativas de sustrato e inhibidor, éste podría o no, inhibir la Isomerasa modificando consecuentemente, la proporción de isómero III, y eventualmente podría también ocurrir una activación de la enzima regulatoria.

CONCLUSIONES

P.III.1. Estudios preliminares

P.III.2. Ensayos de purificación

P.III.3. Acerca de la existencia de un factor regulador

P.III.4. Cinética de la reacción

P.III.5. Efecto de iones

P. III. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio de la conversión enzimática del PBG en porfirinógenos, empleando células de *Rhodospirillum rubrum* pueden resumirse de la siguiente manera:

P. III.1. Estudios preliminares

Los ensayos iniciales comprendieron una serie de experiencias tendientes a determinar las condiciones óptimas para la detección, extracción y medición de la actividad enzimática en esta bacteria.

Empleando células de *Rp. palustris* crecidas a la luz, se procedió a cosechar el tejido a las 72 horas, al finalizar la fase exponencial.

La proteína enzimática, se extrajo por sonicación y se separó la fracción sobrenadante (S) donde se concentra la actividad por centrifugación. Estudiando la influencia de la presencia de oxígeno sobre la formación de porfirinas, se encontró que era prácticamente la misma en ambas atmósferas. Se establecieron, las condiciones óptimas en cuanto a la técnica de homogeneización, al buffer de extracción y a la relación de resuspensión de las células. Se determinó que la técnica de sonicación, aplicada durante 60 segundos, en una suspensión de células en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 (lectura de 0,500 a λ 680 nm con dilución 1:200) era la óptima.

Se llevaron también a cabo las curvas de saturación por sustrato. La actividad de la PBG-asa medida en función de las porfirinas formadas siguió un perfil sigmoideo al variar la concentración de PBG. Sin embargo, su consumo mostró un comportamiento lineal sin llegar a la saturación. Se resolvió emplear entonces una concentración de sustrato de 177 μ M.

El estudio del efecto del tiempo de incubación sobre la actividad reveló un incremento lineal en la formación de porfirinas, hasta las tres horas, luego de lo cual parece alcanzarse un Plateau. En cuanto al consumo de PBG, después de la primer hora no hubo utilización adicional de sustrato. Por lo tanto, se adoptó una hora como tiempo standard.

Se determinó el pH óptimo de la reacción, encontrándose que para la formación de porfirinas aparecía un máximo a 7,4 mientras que para el consumo de sustrato se revelaron dos picos, uno a 7,4 y otro a 8,5.

P.III.2. Ensayos de purificación

Se desarrolló un procedimiento para la purificación de la PBG-asa de sobrenadante, luego de la cual se obtuvo una fracción muy activa purificada 22 veces.

Es importante enfatizar que se trataría de la preparación de PBG-asa más activa obtenida hasta ahora.

Por tratamiento con Sephadex G-100 se obtuvo una fracción con actividad exclusiva de PBG-asa, que producía 100% de Uro III (banda I), a la cual le correspondía un PM de 115.000 ± 11.500 . Aparece también un segundo pico (banda II) no totalmente liberada de de carboxilasas para el cual se calculó un PM de 50.000 ± 5.000

P.III.3. Acerca de la existencia de un factor regulador

Del estudio del comportamiento de la fracción sobrenadante por estacionamiento hasta 60 días no hubo indicaciones acerca de la liberación de alguna molécula que afectara la actividad.

Por pasaje de la misma fracción a través de una columna de Sephadex G-25 o por diálisis, tampoco se logró separar ningún componente de bajo peso molecular activante o inhibitorio.

Por lo tanto, no se ha hallado ninguna prueba clara de la existencia de un factor regulador de la actividad de la PBG-asa en *Rp. palustris*.

P.III.4. Cinética de la reacción

La cinética de la PBG-asa de *Rp. palustris* sigue un perfil sigmoideo, con un K_m de $50 \mu M$ y un n de Hill de 2, cuando la velocidad de la reacción se mide en función de las porfirinas formadas. En cambio, la curva de consumo de sustrato mostró una cinética michaeliana, con un K_m de $1.6 mM$ y un n de Hill de 1.

les de sodio y magnesio sobre la actividad de la PBG-asa, no teniendo el mismo efecto estimulante que se observara en otros tejidos. Sin embargo, resultó llamativa la inhibición producida por dicha mezcla sobre la fracción S.

La presencia de iones sodio, ya sea en la forma de cloruro o acetato, ni estos mismos aniones, tienen efecto alguno sobre la actividad de nuestra enzima. De manera que la inhibición producida por la mezcla de cloruros de sodio y magnesio antes observada no se debería al cloruro ni al sodio, restando sólo la posibilidad del Mg.

Según los resultados aquí obtenidos, el Mg^{++} modifica la cinética inhibiendo la formación de porfirinas y llevando el n de 2 a 1. Sin embargo, es interesante resaltar que a 50 mM hubo una ligera estimulación del tipo isomérico III, cuando la concentración de PBG fue de 24 μM , coincidente con un efecto estimulante del Mg^{++} sobre la velocidad de formación de porfirinas. El Mg^{++} también tiene acción negativa sobre el consumo de sustrato, a concentraciones de 100 mM o mayores, para valores de PBG superiores a 72 μM .

Fueron sumamente interesantes también los datos obtenidos empleando las sales de fosfato monosódico, ya que los iones fosfato poseen un efecto muy particular sobre la PBG-asa de *Rp. palustris*. Estos disminuyen la síntesis total de porfirinas pero no modifican ni la cinética (se conserva el n de Hill igual a 2) ni el tipo isomérico y además inhiben el consumo de PBG sin alterar tampoco el comportamiento michaeliano, pero sí los correspondientes parámetros cinéticos.

En cuanto a los resultados obtenidos considerando el amonio éste disminuye la cantidad total de porfirinas formadas a concentraciones crecientes de inhibidor y sustrato, modificando sólo ligeramente la cinética de la reacción, en tanto que, respecto al tipo isomérico, su acción inhibitoria sobre la Isomerasa disminuye al aumentar la concentración de sustrato, evidenciándose una interacción competitiva entre el PBG y el amonio, y a ciertas concentraciones de sustrato e inhibidor, parece estimularse una mayor formación de isómero III a expensas del tipo I. El amonio no afecta en cambio el consumo de PBG.

E

BIOSINTESIS DE PORFIRINOGENOS EN *Euglena gracilis*

CAPITULO E I

CINETICA

E.I. CINETICA

Recordemos nuevamente que la PBG-asa de *Euglena* existe en las formas particulada y soluble (Rossetti y Batlle, 1977).

Estudios previos empleando la enzima unida a membrana habían mostrado que esa fracción tenía un comportamiento cinético poco común en relación al esperado para estas enzimas por cuanto exhibía una cinética michaeliana ($n=1$) para la formación de porfirinas y un perfil sigmoideo con un $n=2$ para el consumo de PBG.

Dado que las enzimas de *Euglena*, en muchos aspectos poseen propiedades muy especiales, se decidió determinar el comportamiento cinético de la enzima soluble.

Recordemos además que la actividad inicial de la enzima soluble presente en el homogenato y aún en el sobrenadante (S) es muy baja, comparada con la del pellet. Esta fracción S, también sufre activación espontánea por estacionamiento, habiéndose determinado que este efecto se debe a la presencia de un factor regulador de la actividad (Juknat de Geralnik et al, 1981). Cuando la fracción S se cromatografía por Sephadex G-25, se puede separar ese factor regulador de bajo peso molecular, obteniéndose una preparación enzimática libre de factor que se conoce como proteína del sobrenadante (PrS) y cuya actividad es superior a la del sobrenadante (Juknat de Geralnik et al, 1981).

Se efectuaron entonces las curvas de saturación con PBG para la fracción S (Figura E.I.1.) observándose que tanto para la formación de porfirinas como para el consumo de sustrato, el comportamiento era no michaeliano, lo cual se confirmó al realizar los gráficos de las dobles recíprocas (Figura E.I.2.) y calcular los n de Hill; según vemos dichos gráficos son no lineales, resultando K_m 's aparentes de 114 y 285 μM para la formación de producto y consumo de PBG respectivamente; en ambos casos el n fue igual a 2.

Así, existirían efectos de interacción, tanto entre los dos sitios de unión para el PBG, importantes a nivel de formación de los intermediarios polipirrólicos como entre los dos sitios de liberación de producto posiblemente involucrados en la ciclación y síntesis final de los porfirinógenos.

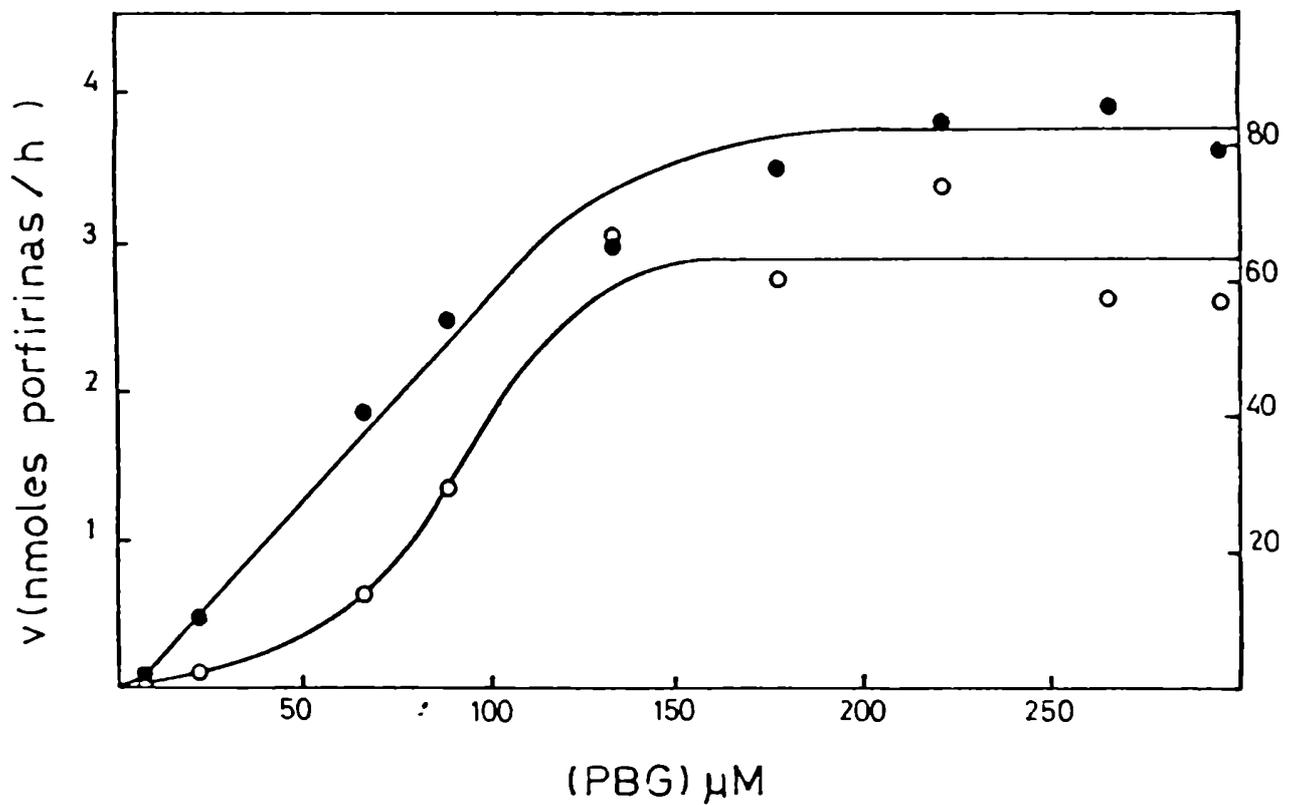


FIGURA E.I.1.: Velocidad de formación de porfirinas (O) y de consumo de PBG (●) en función de la concentración de sustrato. La obtención de la fracción sobrenadante y el sistema de incubación empleado son los detallados en Métodos.

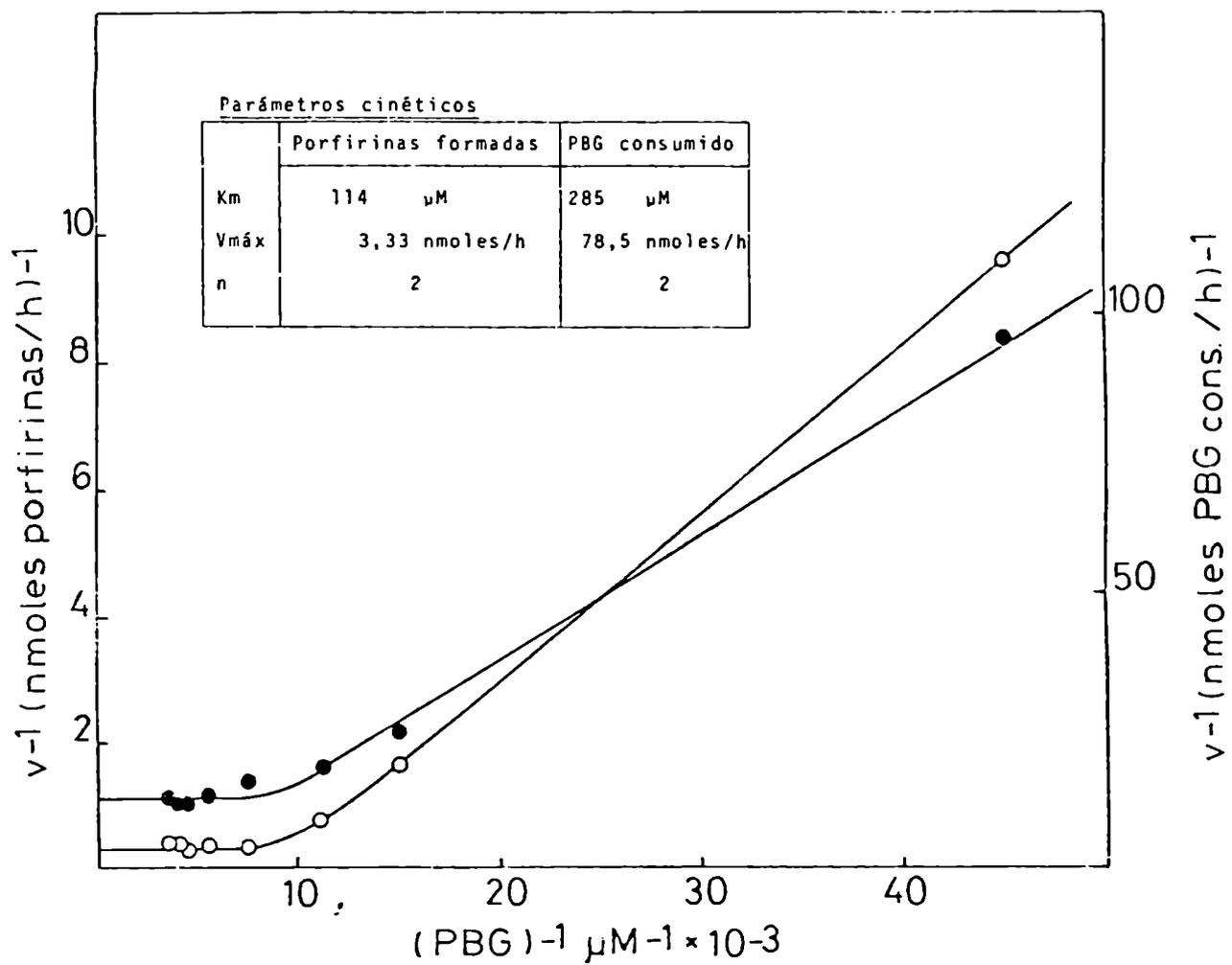


FIGURA E.I.2.: Gráficos de las dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) de la velocidad de formación de porfirinas (O) y de consumo de PBG (●) con respecto a la concentración de sustrato, para la reacción catalizada por la fracción sobrenadante de *Euglena*.

Cuando se obtuvieron los gráficos de las directas para la fracción PrS (Figura E.I.3.), la curva de sustrato en base al producto formado resultó bifásica, en tanto que respecto al consumo de PBG, el aspecto fue similar pero se logró alcanzar la saturación.

De las gráficas de las inversas (Figura E.I.4.), se corroboró la respuesta bifásica de este sistema, revelando la existencia de una cinética compleja, no michaeliana, pero igual a la exhibida por las enzimas de callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a, b). Hasta el momento éstos son los únicos dos sistemas en los cuales se ha podido detectar y aislar, en condiciones normales, polipirrimetanos intermediarios de la síntesis de porfirinógenos a partir de PBG.

Del cálculo de los parámetros cinéticos, encontramos, al igual que con las enzimas de callos, que ambas tienen un comportamiento y constantes diferentes a las de las mismas enzimas de otras fuentes y aún con las obtenidas con otras fracciones de *Euglena*, pero están de acuerdo sin embargo, con la sugerencia de que el sistema enzimático contiene sitios de unión para el PBG que interactúan entre sí.

La presencia de dos Km's para el caso del producto formado está indicando la existencia de sitios con afinidad diferente para la síntesis de porfirinas, los cuales tienen también V_{máx} distintas, es decir que liberarían al producto a diferentes velocidades.

Para el caso del sustrato consumido se obtuvieron dos valores coincidentes de Km, apareciendo así sitios de igual afinidad pero distinta velocidad máxima para la unión del sustrato. La afinidad de estos sitios coincide con la hallada en los sitios de baja afinidad para la formación de porfirinas.

A partir del gráfico de Hill se obtuvieron un $n=1$ para las bajas concentraciones de PBG y un $n \leq 1$ ($n=0,75$) para las mayores, en base al producto formado. Si se observa la Figura E.I.3., la primera parte de la curva presenta un cierto aspecto michaeliano, coincidente con el n obtenido.

Analizando el gráfico de las inversas (Figura E.I.4.), se nota una cierta concavidad hacia abajo lo que podría explicar un $n < 1$ y una cooperatividad negativa.

Considerando el consumo de sustrato, los n obtenidos son

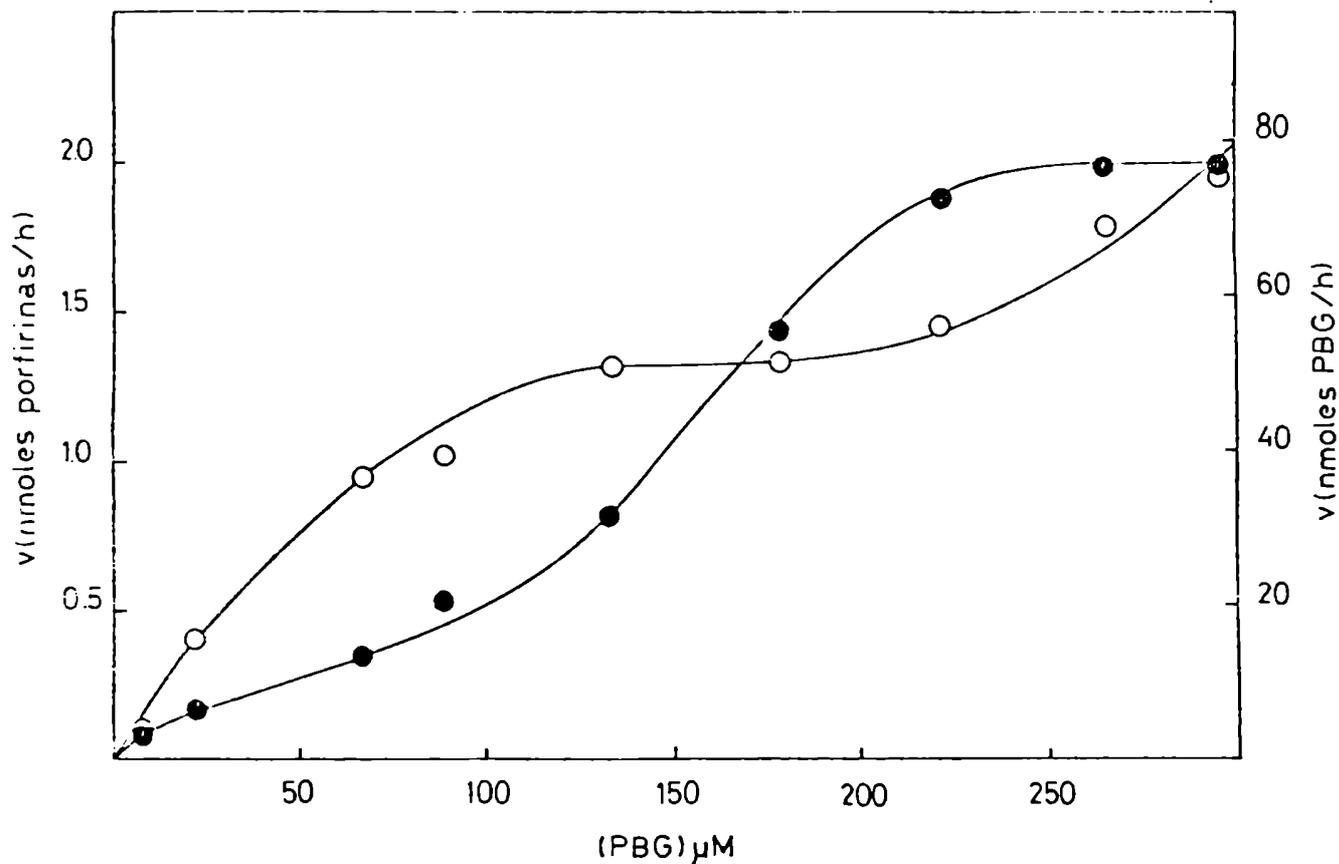


FIGURA E.1.3.: Velocidad de formación de porfirinas (○) y de consumo de PBG (●) en función de la concentración de sustrato. La obtención de la fracción PrS y el sistema de incubación empleado son los detallados en Métodos.

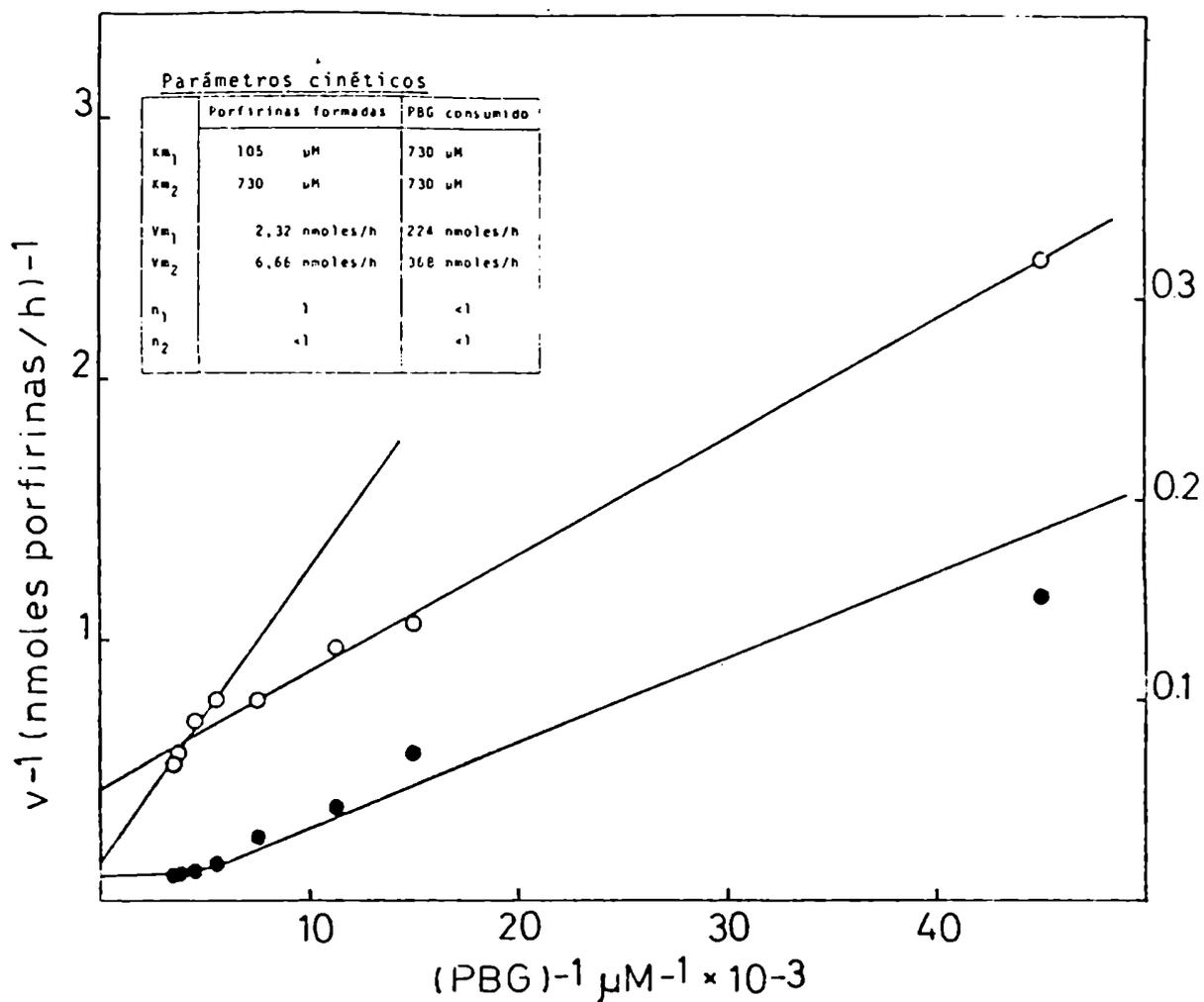


FIGURA E.I.4.: Gráficos de las dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) de la velocidad de formación de porfirinas (O) y de consumo de PBG (●) con respecto a la concentración de sustrato, para la reacción catalizada por la fracción PrS de *Euglena*.

menores que 1 (0,8 y 0,83).

Este conjunto de evidencias están entonces indicando que para la fracción PrS, análogamente a lo encontrado para las enzimas de callos, el comportamiento cinético respondería a la existencia de fenómenos de cooperatividad negativa.

Es también posible, que una combinación de cooperatividad negativa y positiva (Conway y Koshland; 1968), o cooperatividad negativa, además de comportamiento michaeliano, produzcan los desniveles observados en las curvas de saturación (Figura E.I.3.)

Sin embargo, la linealidad de los gráficos de las inversas (Figura E.I.4.) y la definida presencia de dos pendientes, apoyan la posibilidad de la existencia de interacciones negativas entre dos o más centros (Engel y Dalziel, 1969).

CAPITULO E II

SOBRE EL FACTOR DE REGULACION

- E.II.1. Relación entre la cantidad de factor y el grado de acti
vación
- E.II.2. Efecto de ciertos compuestos y de la atmósfera de incu-
bación sobre la actividad enzimática
 - E.II.2.1. Sulfas y otros compuestos
 - E.II.2.2. Efecto de algunos sulfurados
 - E.II.2.3. Efecto de la atmósfera de incubación
- E.II.3. Acción del factor sobre las enzimas de diversas fuentes
 - E.II.3.1. Hígado vacuno
 - E.II.3.2. Eritrocitos humanos
 - E.II.3.3. *Rp. palustris*
 - E.II.3.4. *Euglena gracilis*
- E.II.4. Acerca de la liberación y modo de acción del factor
 - E.II.4.1. Efecto de la diálisis sobre distintas prepara-
ciones enzimáticas y acción del factor F_S so-
bre las mismas
 - E.II.4.2. Mecanismo propuesto para la liberación y ac-
ción del factor regulador
 - E.II.4.3. Aplicación del esquema de acción del factor al
análisis de diferentes situaciones experimenta-
les

E.II. SOBRE EL FACTOR DE REGULACION

E.II.1. Relación entre la cantidad de factor y el grado de activación

En el estudio de la acción activante del factor de *Euglena*, se había utilizado hasta el momento una cierta cantidad del mismo, relativamente constante, de manera que resultó de interés determinar si existía alguna relación entre la cantidad de factor empleado y el grado de activación enzimática.

Utilizando entonces la fracción S, se llevaron a cabo una serie de ensayos, agregando a la misma, volúmenes variables de factor F_S ; en la Figura E.II.1. se muestran resultados típicos, en cuanto a la formación de porfirinas. Se observa un máximo de acción para 0,5 ml, mientras que disminuye su efecto con volúmenes mayores, pero de todas maneras, aún con 1,8 ml de F_S , la actividad de la mezcla S + F_S es 150% superior al control sin factor.

En cuanto al consumo de PBG, luego del aumento inicial ya con 0,1 ml de factor no se aprecian cambios.

Existe entonces una dependencia entre el grado de activación de la formación de porfirinas y la cantidad de factor, con un perfil que podría corresponder a una respuesta de tipo enzimático, pero aún no podemos asegurarlo, mientras que el factor no parece tener ningún efecto sobre el consumo de PBG.

Sobre la fracción PrS, la acción del F_S en relación con la cantidad del mismo fue mucho menos pronunciada (Figura E.II.2.) tanto para la formación de porfirinas como para el consumo de sustrato; luego de un ligero incremento inicial, no ocurren cambios significativos con cantidades crecientes del factor.

Parecería que en el caso de la enzima de PrS, ésta ya hubiera adquirido una configuración activa tal que pequeñas cantidades de factor serían suficientes para activarla al máximo posible.

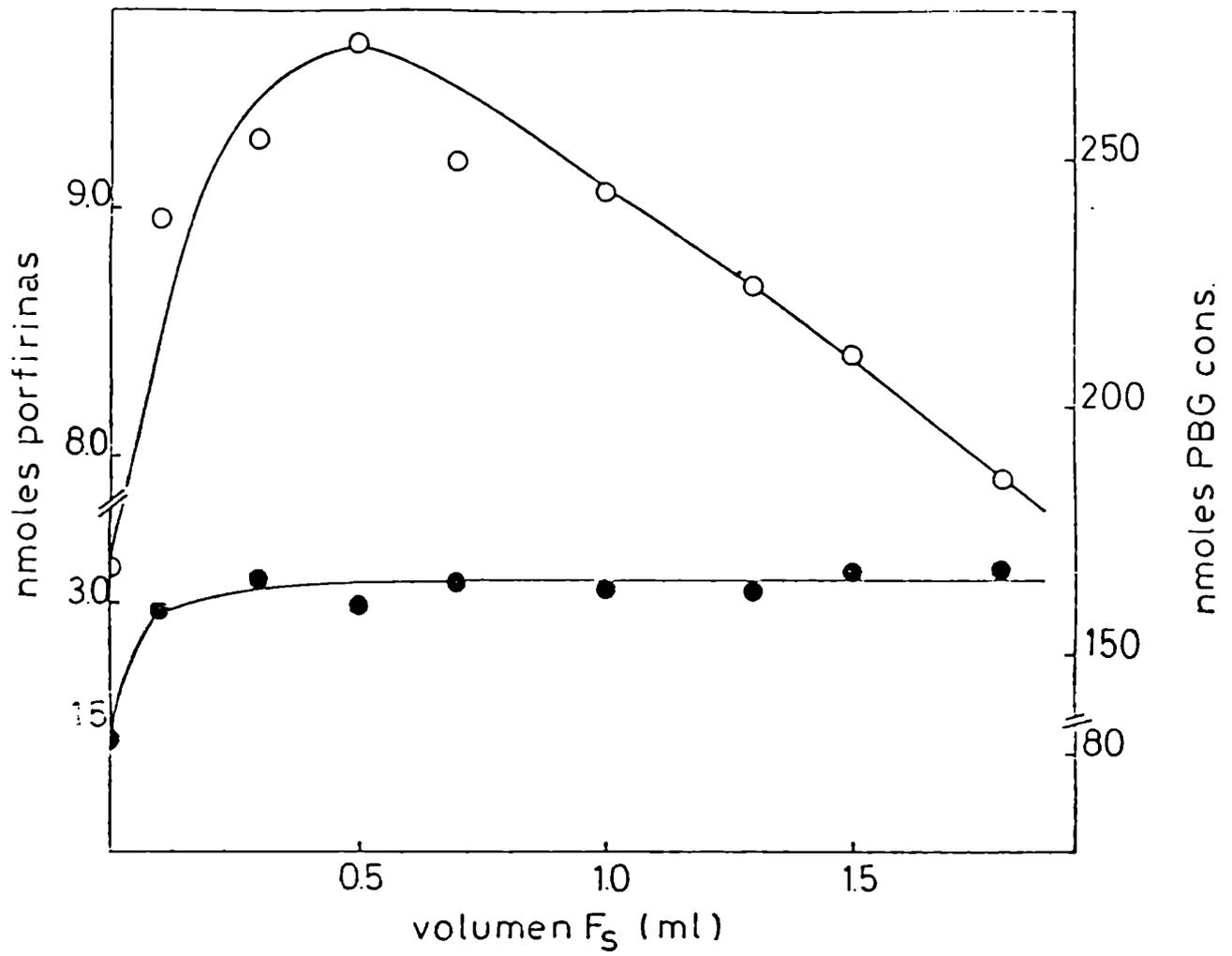
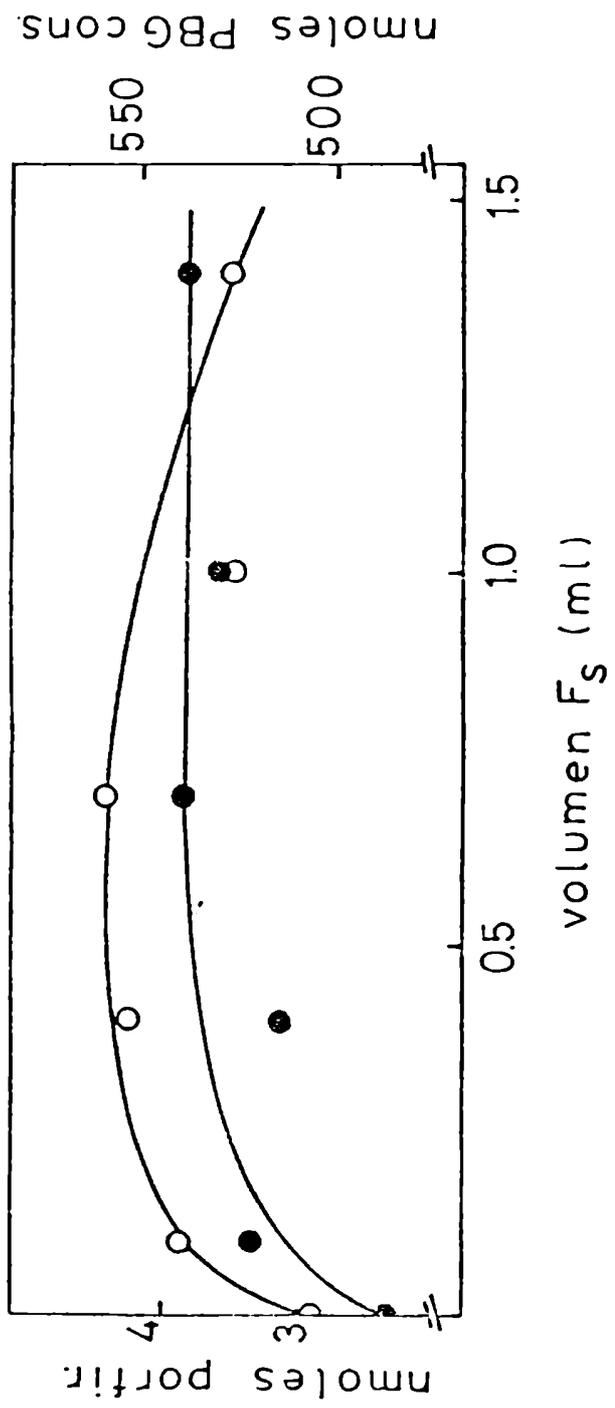


FIGURA E.II.1.: Formación de porfirinas (O) y consumo de PBG (●) en función del volumen de F_S agregado. La obtención de la fracción S y el sistema de incubación empleado son los detallados en Métodos.



E.II.2. Efecto de ciertos compuestos y de la atmósfera de incubación sobre la actividad enzimática

E.II.2.1. Sulfas y otros compuestos

Teniendo en cuenta recientes e interesantes resultados de Peters et al (1980), obtenidos estudiando el efecto de una familia de sulfonamidas sobre la actividad de la Deaminasa de hígado de rata, quienes encontraron que estos compuestos inhibían no competitiva y reversiblemente la Deaminasa *in vitro* y disminuían *in vivo* la incorporación de ALA en el hemo microsomal, aumentando paralelamente la actividad del ALA-S hepática y considerando además que estos compuestos provocan un ataque agudo en pacientes con PAI (Eales, 1971; Stein y Tschudy, 1970) y originan efectos tóxicos en el sistema hematopoyético, probablemente debido a una acción sobre esta misma enzima, y que por otra parte son conocidos inhibidores de la síntesis de ácido fólico, se decidió investigar su efecto sobre la formación *in vitro* de porfirinógenos en *Euglena*, empleando la fracción sobrenadante.

En la Tabla E.II.1. se ilustran los resultados obtenidos con concentraciones variables de sulfamerazina sobre la fracción S y en la Tabla E.II.2. sobre la fracción PrS. No se observan modificaciones considerables en la formación de porfirinas.

Se investigaron también los efectos de la antipirina y del metil-DOPA sobre la actividad de estas fracciones. Se incubaron concentraciones variables de antipirina (2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona, fenazona) con la fracción S (Tabla E.II.3.) y una concentración final de 3 μ M con la fracción PrS (Tabla E.II.4.). No hay variaciones apreciables en la formación de porfirinas ni en el consumo de PBG. Estos mismos resultados aparecen al analizar el efecto de la metil-DOPA (L-2 metil-3 (3,4 dihidroxifenil) alanina) sobre la fracción sobrenadante (Tabla E.II.5.).

Aparentemente, *in vitro*, estos reactivos no tendrían acción sobre la actividad de estas fracciones de *Euglena*, restando la posibilidad de que pudieran antagonizar con la formación *in vivo* del ácido fólico, así como de ciertos derivados pteridínicos de dicho protista (Böhme et al, 1980) y eventualmente con la síntesis y acción del factor de *Euglena*.

TABLA E.II.1.: Efecto de la sulfamerazina sobre la actividad de la fracción S

Fracción	nmporf	nmporf/mg P
S	18,05	0,269
S + Sulf.		
0,1 mM	19,98	0,298
0,5 mM	18,48	0,276
1,0 mM	14,54	0,217
1,5 mM	16,47	0,246
2,0 mM	15,84	0,236
3,0 mM	15,25	0,227
*Sulf (3 mM)	0,36	0,005

La obtención de la fracción sobrenadante y el sistema de incubación empleado se encuentran detallados en Métodos. La fracción enzimática contenía 33,52 mg/ml de proteína. Las soluciones de sulfamerazina se prepararon en el mismo buffer de incubación. (*) Incubación control que posee sulfamerazina, PBG y buffer.

TABLA E.II.2.: Efecto de la sulfamerazina sobre la actividad de la fracción PrS

Fracción	nmporf	nmporf/mg P
PrS	11,158	1,476
PrS + Sulf.		
0,1 mM	11,143	1,474
0,5 mM	10,758	1,424
1,0 mM	12,359	1,635
1,5 mM	12,627	1,670
2,0 mM	9,755	1,290
3,0 mM	10,725	1,420
*Sulf (3 mM)	0,072	0,009

La obtención de la fracción PrS y el sistema de incubación empleado se encuentran detallados en Métodos, con excepción de la concentración de PBG, que en este caso fue de 150 μ g/0,2 ml.

La fracción enzimática contenía 3,78 mg/ml de proteína. Las soluciones de sulfamerazina se prepararon en el mismo buffer de incubación.

(*) Incubación control que posee sulfamerazina, PBG y buffer.

TABLA E.II.3.: Efecto de la antipirina sobre la actividad de la fracción S

Fracción	nmporf	nmporf/mg P	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P}}$
S	12,43	0,186	249	3,73
S + A				
0,1 mM	15,30	0,230	254	3,80
0,5 mM	16,26	0,244	252	3,78
1,0 mM	15,49	0,232	256	3,84
1,5 mM	14,49	0,217	251	3,76
2,0 mM	15,12	0,227	254	3,81
3,0 mM	15,65	0,235	253	3,79
*S + A (3,0 mM)	0,30	0,005	0	0,00
**A (3,0 mM)	0,00	0,000	0	0,00

La obtención de la fracción sobrenadante y el sistema de incubación empleado se encuentran descritos en Métodos. La fracción enzimática utilizada contenía 33,35 mg/ml de proteína. Las soluciones de antipirina se prepararon en el mismo buffer de incubación.

(*) control incubado sin sustrato; (**) control incubado con sustrato.

TABLA E.II.4.: Efecto de la antipirina sobre la actividad de la fracción PrS

Fracción	nmporf	nmporf/mg P
PrS	12,340	1,480
PrS + A (3 mM)	10,850	1,302
* A (3,0 mM)	1,988	0,000
**A + PrS	0,000	0,000

La obtención de la fracción PrS y el sistema de incubación empleado se encuentran descritos en Métodos, con excepción de la concentración de PBG, que en este caso fue de 150 µg/0,2 ml.

La fracción enzimática utilizada contenía 4,17 mg/ml de proteína.

Las soluciones de antipirina se prepararon en el mismo buffer de incubación.

(*) control incubado con sustrato;

(**) control incubado sin sustrato

TABLA E.II.5.: Efecto de la metil-DOPA sobre la actividad de la fracción S

Fracción	nmporf	nmporf/mg P	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P}}$
S	11,00	0,191	201	3,49
S + DOPA				
0,1 mM	13,00	0,226	201	3,49
0,25 mM	10,45	0,182	196	3,41
0,5 mM	11,60	0,201	197	3,43
1,0 mM	11,95	0,208	190	3,30
1,5 mM	13,89	0,241	194	3,37
* S + DOPA (1,5 mM)	0,28	0,005		
** DOPA (1,5 mM)	0,00	0,000	68	

La obtención de la fracción sobrenadante y el sistema de incubación empleado se detallaron en Métodos. Se utilizó una fracción enzimática que contenía 28,75 mg/ml de proteína. La metil-DOPA se preparó en el mismo buffer de incubación. (*) control incubado sin PBG; (**) control incubado con PBG.

E.II.2.2. Efecto de algunos sulfurados

Ya habíamos demostrado que el glutatión a 10^{-3} y 10^{-4} M tenía el mismo efecto que el ácido fólico y el factor F_S , estimulando también la actividad de las fracciones H, S y PrS, si bien la acción sobre esta última era muy leve (Juknat de Geralnik et al, 1981).

Se estudió entonces el efecto de glutatión, cisteína y también tiosulfato a dos concentraciones, observándose (Tabla E.II.6.) acción ligeramente estimulante en algunos casos y sólo inhibición por tiosulfato 10^{-3} M sobre la PrS; de manera que se analizó un poco más esta respuesta del tiosulfato sobre las fracciones S y PrS, en forma comparativa con el agregado de factor (Tabla E.II.7.). Considerando la fracción S, el tiosulfato (10^{-2} M) provocaría aparentemente una estimulación similar a la del factor, que sin embargo no es aditiva; en cambio el tiosulfato inhibe un 90% a la enzima del PrS, acción revertida parcialmente por el agregado del factor. Estos datos estarían sugiriendo que cuando existe una cierta cantidad de factor unido a la proteína, como en la fracción S, el tiosulfato podría actuar sobre el sitio activante de una cierta forma de la enzima aumentando su actividad hasta un máximo; pero en presencia simultánea de factor libre, no se suman sus efectos, aparentemente ambos compuestos ocuparían el mismo lugar. En el caso de que la enzima esté separada del factor, el tiosulfato podría unirse al sitio inhibitor correspondiente al F_S , reduciendo también la actividad. El agregado de factor libre desplazaría al tiosulfato, revirtiendo parcialmente su efecto. Así, podría existir, entonces, alguna analogía entre la estructura del tiosulfato, o su reactividad y la de alguna parte del factor, aunque éste es un fenómeno que requiere mayor estudio.

De todas maneras, hay algunas evidencias que indicarían que el factor podría ser un compuesto sulfurado.

TABLA E.II.6.: Efecto del glutatión, tiosulfato y cisteína sobre la actividad de las fracciones S y PrS

Fracción	nmporf	nmporf/mg P
S	11,58	0,259
PrS	10,49	0,997
S + GSH 10^{-4} M	12,39	0,277
S + GSH 10^{-5} M	12,20	0,273
S + $S_2O_3^{=}$ 10^{-3} M	10,56	0,237
S + $S_2O_3^{=}$ 10^{-5} M	13,05	0,292
S + CiSH 10^{-4} M	12,12	0,272
S + CiSH 10^{-5} M	11,15	0,250
PrS + GSH 10^{-4} M	10,56	1,003
PrS + GSH 10^{-5} M	10,80	1,026
PrS + $S_2O_3^{=}$ 10^{-3} M	8,22	0,781
PrS + $S_2O_3^{=}$ 10^{-5} M	10,46	0,995
PrS + CiSH 10^{-4} M	11,14	1,059
PrS + CiSH 10^{-5} M	11,06	1,051

La obtención de las fracciones S y PrS y el sistema de incubación empleado se encuentran detallados en Métodos.

Las fracciones enzimáticas utilizadas contenían la siguiente cantidad de proteína: S: 22,31 mg/ml
PrS: 5,261 mg/ml

TABLA E.II.7.: Efecto del tiosulfato sobre la actividad de las fracciones S y PrS

Fracción	nmporf	nmporf/mg P
S	2,694	0,042
PrS	11,932	1,159
S + F _S	6,208	0,194
PrS + F _S	7,031	1,306
S + S ₂ O ₃ ⁼ (10 ⁻² M)	6,794	0,210
PrS + S ₂ O ₃ ⁼ (10 ⁻² M)	0,477	0,093
S + F _S + S ₂ O ₃ ⁼ (10 ⁻² M)	6,078	0,186
PrS + F _S + S ₂ O ₃ ⁼ (10 ⁻² M)	1,409	0,262

La obtención de las fracciones S y PrS y el sistema de incubación empleado se encuentran detallados en Métodos.

Las fracciones enzimáticas utilizadas contenían la siguiente cantidad de proteína: S: 32,37 mg/ml; PrS: 5,146 mg/ml

E.II.2,3. Efecto de la atmósfera de incubación

Una serie de evidencias previas (Juknat de Geralnik et al, 1981) y otras provenientes de este trabajo, nos han llevado a pensar que una de las funciones del factor de *Euglena* podría ser la de mantener reducido el nivel rédox del medio en el cual deben funcionar estas enzimas, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que en *Euglena*, la PBG-asa soluble sólo actúa eficientemente en anaerobiosis, además debemos recordar que los intermediarios y sustratos de la Isomerasa son compuestos reducidos.

En base a estas ideas se resolvió investigar el efecto de la atmósfera de incubación y la acción del factor sobre las enzimas. En la Tabla E.II.8. se muestran los datos obtenidos al incubar aeróbicamente varias mezclas; como esperábamos el factor es capaz de expresar su acción estimulante también en aerobiosis, y es notable, en particular su marcado efecto sobre la fracción S. Observemos que la actividad de S incubado solo se encuentra significativamente reducida, de manera que el agregado del factor en aerobiosis, produce un efecto muchas veces superior que en anaerobiosis, si comparamos la actividad de la misma fracción en esas condiciones, aunque en realidad, sabemos que la menor actividad de S se debe a la presencia de una atmósfera oxidante, de lo cual surge que el factor también actuaría compensando la acción del oxígeno y manteniendo el sistema reducido. Es interesante también recalcar que si bien la acción de F_H y F_S es prácticamente la misma, en todos los casos, hubo siempre una estimulación ligeramente superior por el agregado de F_S , un fenómeno que ya habíamos notado con anterioridad (Juknat de Geralnik et al, 1981; Rossetti, 1978).

Estos resultados estarían además de acuerdo con las observaciones de que tanto el ácido fólico a 10^{-7} M como el glutatión a 10^{-3} M, poseen efectos estimulantes de un origen similar al producido por el factor (Juknat de Geralnik et al, 1981), siendo conocida la capacidad reductora de estos reactivos. En consecuencia el factor debe ser también un compuesto con propiedades reductoras.

TABLA E.II.8.: Efecto de la atmósfera de incubación sobre la acción del F_S

Sistema	Actividad específica (aerobiosis)		Actividad relativa *		Unidades de Factor **
	$\frac{\text{nmoles porf}}{\text{mg p}}$	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg p}}$	Anaerobiosis **	Aerobiosis	
H	0,028	1,737	-	-	
S	0,012	2,365	-	-	
PrH	0,126	4,605	9,70	4,50	
PrS	0,171	5,874	11,72	14,25	-
H + F _H	0,108	3,275	4,76	3,86	1,93
H + F _S	0,123	3,355	5,03	4,39	2,19
S + F _H	0,157	4,398	6,67	13,08	6,54
S + F _S	0,173	4,526	6,65	14,42	7,21
PrH + F _H	0,346	7,342	2,02	2,75	1,38
PrH + F _S	0,357	7,673	2,09	2,83	1,42
PrS + F _H	0,415	8,734	2,45	2,43	1,22
PrS + F _S	0,441	9,834	2,27	2,58	1,29

La obtención de las distintas fracciones y el sistema de incubación se encuentran detalladas en Métodos, incubándose en este caso en aerobiosis.

(*) La actividad relativa se calculó tomando los datos de las porfirinas formadas en base a la actividad de cada mezcla, con respecto a su correspondiente control. F_H y F_S no tienen actividad enzimática; (**) Los datos empleados correspondientes a las incubaciones en anaerobiosis, son los tabulados por Juknat de Gernalnik et al (1981); (***) Se define una unidad de factor arbitrariamente como la cantidad del mismo capaz de actuar efectivamente y producir un aumento de 2 veces en la actividad del control.

E.II.3. Acción del factor sobre la actividad de las enzimas de diversas fuentes

Recordemos que teniendo en cuenta la analogía entre el comportamiento del factor de *Euglena* y el ácido fólico (Juknat de Geralnik et al, 1981) sobre las enzimas de esta fuente, la identificación del factor regulador de hígado de rata con un derivado pteridínico de la familia del fólico (Piper y van Lier, 1977), y el hecho de que el defecto enzimático primario de la PAI, es una reducción de la Deaminasa, se aplicó con éxito un nuevo tratamiento para esta enfermedad, que consistió en la administración de 30 mg de ácido fólico diarios, durante 10 días (Wider et al, 1980). Los resultados son altamente positivos, sin embargo, si bien se supone que éstos se deben a una estimulación de la actividad de la enzima deficiente, compensándose así el defecto, no se han encontrado variaciones en los niveles de la Deaminasa eritrocitaria antes, durante o después de la terapia, lo cual no excluye la posibilidad de que la acción ocurra más efectivamente en el hígado, revirtiendo el cuadro clínico y bioquímico agudos.

Se resolvió entonces investigar la acción del factor de *Euglena* sobre las enzimas de otras fuentes.

E.II.3.1. Hígado vacuno

Se emplearon distintas preparaciones de hígado vacuno. En un primer ensayo se trabajó con un sobrenadante S_H (Tabla E.II.9.), sobre el cual el factor de *Euglena* no sólo no produjo estimulación, sino que al aumentar la cantidad de F_S agregado a un volumen el doble del habitual, se apreció un 40% de inhibición. Notemos que la preparación del factor contiene proteína en concentración baja, que si bien consume PBG, un hecho llamativo ya observado que debe tenerse en cuenta, no forma porfirinas.

Sancovich et al (1969 a) habían encontrado que por ultrafiltración de una preparación de hígado bovino se separaba un factor. En nuestro caso, podríamos suponer que el factor de *Euglena* F_S , no pudo actuar sobre el S_H , pues ya estaba saturado con su factor, y por lo tanto el F_S no tuvo sitio de acción. Se

TABLA E.II.9.: Efecto de F_S sobre la actividad de la fracción sobrenadante de hígado vacuno

Fracción	Proteínas (mg/ml)	nmporf.	nmporf. mg p	nmoles PBGc	nmoles PBGc mg P
S	20,990	5,308	0,126	240,42	5,73
S + F_S	10,590	8,709	0,411	203,94	9,63
S_H	2,530	0,789	0,312	83,32	32,93
$S_H + F_S$ (v:v)					
(1:0,5)	1,766	0,796	0,300	91,05	34,36
(1:1)	1,384	0,816	0,295	97,73	35,31
(1:2)	1,002	0,557	0,185	186,26	61,96
F_S	0,238	0,000	0,000	33,99	142,31

La obtención de las fracciones S y F_S de Euglena y el sistema de incubación empleado se encuentran detallados en Métodos. La fracción sobrenadante de hígado vacuno (S_H) y el sistema de incubación utilizado son los descriptos por Sancovich et al (1969 a)

obtuvieron entonces las Fracciones Sobrenadante de hígado bovino (S_H) y un sobrenadante ultrafiltrado (S_{HU}); ensayada la acción del F_S sobre ellas, en distintas relaciones (Tabla E.II.10) tampoco tuvo efecto estimulante. Una vez más el F_S (con una concentración proteica de 0,196 mg/ml), consumió PBG sin formar porfirinas.

Por último se preparó una fracción PrS_H , a partir del S_H por cromatografía en Sephadex G-25 (grueso) y se estudió el comportamiento del F_S sobre ambas (Tabla E.II.11.). Tampoco hubo efectos para destacar, apenas una cierta inactivación del S_H nuevamente, y se repitió la acción del F_S sobre el PBG, con un contenido proteico ligeramente superior al de las preparaciones anteriores.

En consecuencia el factor de *Euglena* no parece tener acción sobre estas fracciones de hígado bovino.

E.II.3.2. Eritrocitos humanos

En una experiencia preliminar se empleó sangre de un individuo normal y de un paciente con PAI, agregando al hemolizado (Batlle et al, 1978) el factor F_S (Tabla E.II.12.) y observándose un ligero incremento de la actividad en ambos casos, mayor para la muestra de PAI.,

Sin embargo, cuando se trabajó con una preparación de Deaminasa de fuentes similares (Tabla E.II.13.), utilizando 3 relaciones de factor, y además estudiando el comportamiento de estos sistemas frente al fólico, resultó clara la reducción a la mitad de la actividad del paciente con PAI con respecto al control, pero luego, ni el factor, ni el fólico alteraron significativamente ninguno de los dos niveles iniciales.

Aparentemente las enzimas de eritrocitos humanos no tendrían sitio receptor para el factor de *Euglena*, ni se afectarían por la presencia de ácido fólico.

E.II.3.3. Rp. palustris

Ya vimos que en *Rp. palustris* parece no existir un factor regulador de naturaleza similar al de *Euglena*; sin embargo, re-

TABLA E.II.10.: Efecto de F_S sobre la actividad de las fracciones S_H y S_U de hígado vacuno

Fracción	Proteínas (mg/ml)	nmorf.	$\frac{\text{nmorf}}{\text{mg P}}$	nmoles PBGc	$\frac{\text{nmoles PBGc}}{\text{mg P}}$
S	20,990	5,308	0,126	240,42	5,73
$S + F_S$	10,590	6,709	0,411	203,94	9,63
S_H	4,450	0,631	0,142	166,19	37,26
F_S	6,138	6,078	0,990	72,40	371,28
S_U		0,9	0,164	111,83	19,45
$S_H + F_S$					
(1:0,5)	3,04	0,691	0,152	142,43	31,25
(1:1)	2,33	0,733	0,157	125,44	26,96
(1:1,5)	1,52	0,686	0,144	145,62	30,63
(1:2)	1,62	0,698	0,143	145,46	30,01
$S_{HU} + F_S$ (v:v)					
(1:0,5)	3,90	0,949	0,162	106,57	18,21
(1:1)	2,97	0,956	0,161	164,07	27,58
(1:1,5)	2,42	0,917	0,152	134,08	22,19
(1:2)	2,05	0,909	0,148	155,56	25,33

La obtención de las fracciones S y F_S de *Euglena* y el sistema de incubación empleado se encuentran detallados en Métodos. La fracción sobrenadante de hígado vacuno (S_H) y el sistema de incubación utilizado son los descritos por San covich et al (1969 a).

El sobrenadante de ultrafiltración (S_{HU}) se obtuvo ultrafiltrando S_H en un sistema Ultrafilter LKB 6300 A durante aproximadamente 8 horas.

TABLA E.II.11.: Efecto del factor F_S sobre la actividad de las fracciones S_H y PrS_H de hígado bovino

Fracción	Proteínas (mg/ml)	nmporf	nmporf. mg p.	nmoles PBGc	nmoles PBGc mg P
S_H	8,625	1,197	0,139	67,63	7,84
PrS_H	3,903	0,681	0,175	48,22	12,35
F_S	0,412	0,000	0,000	35,51	86,20
$S_H + F_S$ (v:v)					
(1:1)	4,52	0,928	0,103	93,37	10,33
(1:2)	3,15	1,091	0,115	82,76	8,76
$PrS_H + F_S$ (v:v)					
(1:1)	2,16	0,711	0,165	53,02	12,29
(1:2)	1,57	0,732	0,155	57,24	12,10

La obtención de la fracción F_S de *Euglena* se encuentra detallada en Métodos. La S_H se preparó según Sancovich et al (1969 a) y la PrS_H como la PrS según Juknat de Gernalnik et al (1981). El sistema de incubación empleado es el descripto por Sancovich et al (1969 a).

TABLA E.II.12.: Efecto del factor F_S sobre la actividad de la PBG-asa de un paciente con PAI

Sistema	nmporf	Incremento actividad %
PBG-asa PAI	15,23	-
PBG-asa + F_S	18,13	19
PBG-asa normal	22,86	-
PBG-asa + F_S	25,15	10

La obtención de la fracción F_S de *Euglena* se encuentra detallada en Métodos. La preparación de la PBG-asa y el sistema de incubación empleado son los descritos por Batlle et al (1978).

TABLA E.II.13.: Efecto del factor F_S obtenido de *Euglena gracilis* sobre la actividad de la deaminasa de sangre de un paciente con PAI y de uno normal

Sistema	nmporf	nmporf/mg P
D_{Normal}	3,740	0,208
D_{PAI}	1,574	0,096
$D_N + F_S$ (v:v)		
(0,2:0,1)	3,845	0,214
(0,2:0,2)	3,735	0,208
(0,2:0,3)	3,506	0,195
$D_{PAI} + F_S$ (v:v)		
(0,2:0,1)	1,303	0,080
(0,2:0,2)	1,460	0,089
(0,2:0,3)	1,358	0,083
$D_N + F_{\text{f\u00f3lico}}$		
10^{-4} M	3,287	0,183
10^{-7} M	3,568	0,199
$D_{PAI} + F_{\text{f\u00f3lico}}$		
10^{-4} M	1,594	0,098
10^{-7} M	1,543	0,094

El factor F_S se obtuvo seg\u00fan se detalla en M\u00e9todos. La sangre entera se calent\u00f3 a 70 °C durante 15 minutos. Se centrifug\u00f3 a 13.000xg durante 30 minutos y el sobrenadante se emple\u00f3 como fuente de deaminasa. El sistema de incubaci\u00f3n conten\u00eda 60 μ gr de P8G, 0,2 ml de enzima y buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,2-7,4 hasta completar un volumen final de 1 ml. Se incub\u00f3 durante 60 minutos en aerobiosis, oscuridad, con agitaci\u00f3n continua y a 37 °C.

sultó de interés determinar si el último podía estimular la actividad de las enzimas de *Rp. palustris*. Por otro lado, se tiene la sospecha de que el factor de *Euglena* tiene alguna relación con la Isomerasa. De manera que se preparó Deaminasa de *Rp. palustris* y además se obtuvo una fracción de Isomerasa de dicha fuente, que se identificó como 80-90% y se estudió la acción del factor F_S y del $F_{S\emptyset}$, de la Isomerasa y la Isomerasa \emptyset , y del ácido fólico (10^{-4} y 10^{-7} M) sobre la Deaminasa de *Rp. palustris* (Tabla E.II.14.). En este caso, el F_S o el $F_{S\emptyset}$, no activaron sino que disminuyeron entre un 15% y un 30% la formación de porfirinas por la Deaminasa. La fracción Isomerasa no la afectó seriamente, en cambio la misma Isomerasa calentada redujo la síntesis de porfirinas mientras que el ácido fólico 10^{-4} M inhibió un 25%, con poca variación a la concentración de 10^{-7} M. La cantidad total de porfirinas formadas fue muy baja en la gran mayoría de los tubos, de manera que solamente se pudo realizar la determinación de tipos isoméricos por hplc en muy pocas muestras.

Los resultados fueron en un caso muy llamativos, pues la presencia del factor calentado, modificó aparentemente el porcentaje de tipo I de la Deaminasa, apareciendo un 30% de isómero III; de acuerdo a lo esperado, el agregado de Isomerasa a la Deaminasa, también llevó a la formación de un 40% de tipo III, a expensas del I.

Sin embargo aún no podemos sacar conclusiones definitivas respecto a este fenómeno interesantísimo que hemos de seguir investigando, por ahora sólo podemos afirmar que el factor de *Euglena* no estimula la síntesis de porfirinas de la Deaminasa de *Rp. palustris*.

E.II.3.4. *Euglena gracilis*

Hasta ahora estuvimos estudiando el efecto del factor de *Euglena*, sobre las fracciones H, S y PrS del mismo origen, observándose en todos los casos su acción estimulante. De los datos anteriores, ha llamado la atención su ineffectividad sobre preparaciones menos crudas, en particular de Deaminasa de *Rp. palustris*; en consecuencia, se resolvió investigar los efectos del F_S , el $F_{S\emptyset}$ y del ácido fólico sobre una fracción parcialmente purificada de Deaminasa de *Euglena* (Tabla E.II.15.). Se encontró que tanto el F_S como el $F_{S\emptyset}$ estimulan la actividad de la Deaminasa; es-

TABLA E.II.14.: Efecto de distintas fracciones sobre la actividad de la deaminasa de *Rp. palustris*

Sistema	Import./mg P	Tipo isomérico (%)	
		I	II
D (0,1 ml)	4,140	98	2
D (0,5 ml)	4,735	98	2
D + F _S			
(0,1 + 0,05)	3,640		
(0,1 + 0,1)	3,360		
(0,1 + 0,2)	2,870		
F _S	0,000		
D + F _S P			
(0,1 + 0,05)	0,254	69	31
(0,1 + 0,1)	0,279	-	-
(0,1 + 0,2)	0,298		
F _S P	0,000		
D + 80-90%			
(0,5 + 0,25)			
(0,5 + 0,50)			
(0,5 + 1,0)			
80-90%			
D + 80-90% P			
(0,1 + 0,05)	0,235		
(0,1 + 0,1)	0,296		
(0,1 + 0,2)	0,275		
80-90% P	0,002		
D + F6lico 10 ⁻⁶ M			
(0,1 + 0,1)	0,228	3,145	
D + F6lico 10 ⁻⁷			
(0,1 + 0,1)	0,272		
F6lico 10 ⁻⁶ M	0,000		
D + F6lico 10 ⁻⁶ M			
(0,1 + 0,1)			
(sin P5G)			
D + F6lico 10 ⁻⁷ M			
(0,1 + 0,1)	0,000		
(sin P5G)			
S	14,994	0,295	
S + F _S	12,962	0,507	

La obtención de las distintas fracciones y el sistema de incubación correspondiente al sistema de Euglena se hallan descritos en Métodos. La fracción 80-90% se preparó siguiendo las etapas 1, 2 y 3 descritas en la Sección II.5 de Métodos. El sobrenadante del fraccionamiento 35-55% con sulfato de amonio se llevó a 80-90%. Esta última se desaló a través de una columna de Sephadex G-25 (grueso) y se empleó como fracción 80-90%. La fracción 80-90% se obtuvo calentando la fracción anterior durante 10 minutos en baño de agua y centrifugando 10 minutos a 13.000xg. El sistema de incubación contenía 60 µgr de P5G, 0,1 ó 0,5 ml de deaminasa y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 hasta completar un volumen final de 1,5 ml. Se incubó en aerobiosis, con agitación continua, en oscuridad, a 37°C durante 30 minutos.

TABLA E.II.15.: Efecto de distintas fracciones sobre la actividad de la deaminasa de *E. gracilis*

Fracción	nmporf	nmporf/mo P	Actividad relativa	Unidades de factor	Tipo isomérico	
					I	III
S	4,567	0,179				100
S + F _S (1:1)	3,119	0,237				80
D	9,425	0,528				
D + F _S						
(1:0,5)	8,057				100	-
(1:1,0)	8,827				96	4
(1:1,5)	8,445				100	-
D + F _S 0						
(1:0,5)						
(1:1,0)						
(1:1,5)						
D + F6lico (10 ⁻⁷ M)						
(1:0,2)	8,389					
D + F6lico (10 ⁻⁷ M)						
(1:0,2)	8,720				100	

Las condiciones de incubación y la obtención de las distintas fracciones son las descritas en Métodos. (*) La actividad relativa se calculó tomando los datos de las porfirinas formadas, en base a la actividad de cada mezcla, con respecto a su correspondiente control.

(**) Se define una unidad de factor arbitrariamente, como la cantidad del mismo capaz de actuar efectivamente y producir un incremento de 2 veces en la actividad del control.

te efecto como de costumbre es ligeramente mayor con el F_5 . El ácido fólico también aumenta la actividad enzimática y este incremento es superior a la menor concentración de fólico, datos todos coincidentes con los observados empleando preparaciones más crudas. Sin embargo, en ningún caso el factor modificó la formación de isómero I.

En consecuencia el factor de *Euglena* tiene capacidad activante sobre la Deaminasa del mismo tejido, en tanto que el ácido fólico produce un efecto de tipo similar.

Dado que con ninguno de los otros tres tejidos empleados se encontró una respuesta estimulante sobre las actividades enzimáticas por parte del factor de *Euglena*, es posible que no exista un sitio receptor para este compuesto en esas enzimas o bien que la actividad de las mismas sea relativamente alta como para que este factor pueda expresarse. Observemos que las enzimas de *Euglena* son muy particulares y su actividad inicial es baja. Se ha detectado la existencia de compuestos reguladores de esta naturaleza, en sistemas enzimáticos que normalmente son poco activos pero que pueden existir en formas más activas, producto, frecuentemente de la acción de moléculas reguladoras de bajo peso molecular (Neuberger et al, 1973; Viale et al, 1980 a; Wider et al, 1971, 1976). Este podría ser también el caso del factor de *Euglena*.

E.II.4. Acerca de la liberación y modo de acción del factor

E.II.4.1. Efecto de la diálisis sobre distintas preparaciones enzimáticas y acción del factor F_S sobre las mismas

El factor regulador de *Euglena* es sin lugar a dudas una molécula de bajo peso molecular, probablemente constituida por una parte no proteica y una proteica; ésta última parecería no ser fundamental para su acción activante, pero podría tener algún otro papel importante que aún no se ha podido aclarar.

Se puede obtener el factor, como ya hemos visto, por medio de una cromatografía en Sephadex G-25 de las fracciones homogenato o sobrenadante (F_H y F_S). De acuerdo con sus propiedades, podríamos también separar el factor de estas mismas preparaciones mediante una diálisis. Se decidió entonces estudiar comparativamente el comportamiento de estos sistemas frente a la diálisis y la filtración por geles y analizar las propiedades del factor aislado por ambos procedimientos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla E.II.16. Si bien es de notar que la actividad inicial del batch de *Euglena* utilizado en estas experiencias era menor que la correspondiente a batches de meses anteriores, veremos que se cumplieron la mayoría de las relaciones conocidas.

El estacionamiento de las fracciones H, P y PrS produjo un aumento de la actividad entre 1,5 y 3 veces como ya habíamos encontrado anteriormente (Juknat de Geralnik et al, 1981).

Se confirmó una vez más la acción activante del factor F_S , sobre las distintas preparaciones de H, S y PrS ya sea sin estacionar o bien luego de 24 horas de estacionamiento.

Por otro lado, como se esperaba, la diálisis del H y S produjo un incremento de actividad de 1,3 a 1,7 veces con respecto a la misma fracción sin dializar, menor que el resultante de una cromatografía por Sephadex, pero indicativo de la separación del factor regulador. Esto se corroboró concentrando el dializado a través de una membrana UM2 (>10.000) en un Amicon y ensayando su acción sobre diferentes fracciones, tanto de la solución que atravesó la membrana (F_{SC}) como de la remanente (F_{SR}) así como también del sobrenadante de calentamiento de F_{SC} , durante 10 minutos a 100 °C ($F_{SC} \emptyset$). Observamos que tanto el factor F_S ,

TABLA E.II.16.: Efecto del factor sobre la actividad, de diferentes preparaciones enzimáticas

Mezcla de Incubación	Actividad		Unidades de factor (**)
	Específica (nmporf/mg P)	Relativa (*)	
MP	0,146		-
P	3,506	24,00 (MF)	
H ₁	0,039		
H ₂	0,103	2,64 (H ₁)	
H ₁ + F _S	0,234	6,00 (H ₁)	
H ₂ + F _S	0,510	5,00 (H ₂)	
H _d	0,150	1,74 (H ₂)	
H _d + F _S	0,518	2,87 (H _d)	
S ₁	0,243		
S ₂	0,385	1,60 (S ₁)	
S ₁ + F _S	0,693	2,85 (S ₁)	
S ₂ + F _S	1,125	2,50 (S ₂)	
S _d	0,504	1,37 (S ₂)	
S _d + F _S	1,512	3,00 (S _d)	
S ₂ + F _{Sc}	1,280	3,25 (S ₂)	
S _d + F _{Sc}	1,544	3,58 (S _d)	
S ₂ + F _{Sc} ^θ	1,190	3,05 (S ₂)	
S _d + F _{Sc} ^θ	1,415	2,80 (S _d)	
S ₂ + F _{Sr}	1,200	3,08 (S ₂)	
S ₂ + F _{Sr}	1,463	2,90 (S _d)	
PrS ₁	0,597	2,50 (S ₁)	
PrS ₂	1,070	2,75 (S ₂)	
PrS ₁ + F _S	1,748	2,92 (PrS ₁)	1,46
PrS ₂ + F _S	1,692	2,83 (PrS ₁)	1,42
F _{Sc}	0,000		
F _{Sc} ^θ	0,000		
F _{Sr}	0,000		

El sistema de incubación y la obtención de las distintas fracciones se encuentran descritas en Métodos.
 MP: enzima particulada; H₂, S₂ y PrS₂: H₁, S₁ y PrS₁ estacionados en heladera a 4 °C durante 20 horas; H_d y S_d: H₁ y S₁ dializadas durante 20 horas a 4 °C durante 20 horas contra buffer fosfato de Na 5 mM pH 7,4; F_{Sc}: F_S que a través la membrana UM2 (>10.000) en un Amicon; F_S remanente que no pasó a través de dicha membrana; F_{Sc}^θ: sobrenadante de F_{Sc} calentado 10 minutos a 100 °C y centrifugado 10 minutos a 13.000xg.
 (*) la actividad relativa se calculó tomando los datos de las porfirinas formadas, en base a la actividad de cada mezcla, con respecto a su correspondiente control; (**) se define una unidad de factor arbitrariamente, como la cantidad del mismo capaz de actuar efectivamente y producir un aumento de 2 veces en la actividad del control.

como el obtenido por diálisis y concentración F_{Sc} , F_{Sr} y aún el calentado $F_{Sc} \emptyset$, poseen un efecto similar sobre el sobrenadante y el sobrenadante dializado. El $F_{Sc} \emptyset$ como ya notáramos antes con el $F_{S\emptyset}$ y el $F_{H\emptyset}$ (Juknat de Geralnik et al, 1981), tiene una acción ligeramente inferior, pero en todos los casos, el incremento de actividad estuvo en el orden de 3 veces, correspondiente a 1,5 unidades de factor, lo cual no sería llamativo ya que se añadió la misma o una cantidad equivalente de factor.

De estos resultados surge además que la cromatografía por Sephadex es más efectiva para la separación del factor que la diálisis, si bien ambos procesos llevan al mismo resultado final.

E.II.4.2. Mecanismo propuesto para la liberación y acción del factor regulador

Los datos experimentales obtenidos en este trabajo han confirmado nuestras ideas previas acerca de la presencia de un factor en *Euglena gracilis* con ciertas propiedades, que regularía la síntesis enzimática de los porfirinógenos, pero además hemos encontrado nuevas evidencias que nos llevan a ampliar el esquema propuesto para explicar el mecanismo de acción de este factor, postulando la existencia de varias formas enzimáticas de la PBG-asa (Figura E.II.3.).

Según nuestro esquema, en el homogenato inicial tendríamos una mezcla de enzima particulada o unida a membrana, MP, activa, que se encuentra siempre en mucha menor proporción que la forma soluble, que llamaremos O, como ya postuláramos (Juknat de Geralnik, 1981). En dicha MP, el factor regulador F estaría unido a la proteína por medio de enlaces no covalentes, a través de determinados residuos dando como resultado una estructura molecular comprimida ("constrained") de muy baja o nula actividad.

Sin embargo, una vez roto el tejido *in vitro*, y según las condiciones y composición del medio o en respuesta a ciertas demandas fisiológicas *in vivo*, este factor podría comenzar a disociarse de la forma enzimática molecular O de un modo más o menos rápido, de manera que luego de una centrifugación, podríamos encontrar en la fracción sobrenadante una mezcla de las formas moleculares O y I. Estas estarían en equilibrio en un comienzo, con

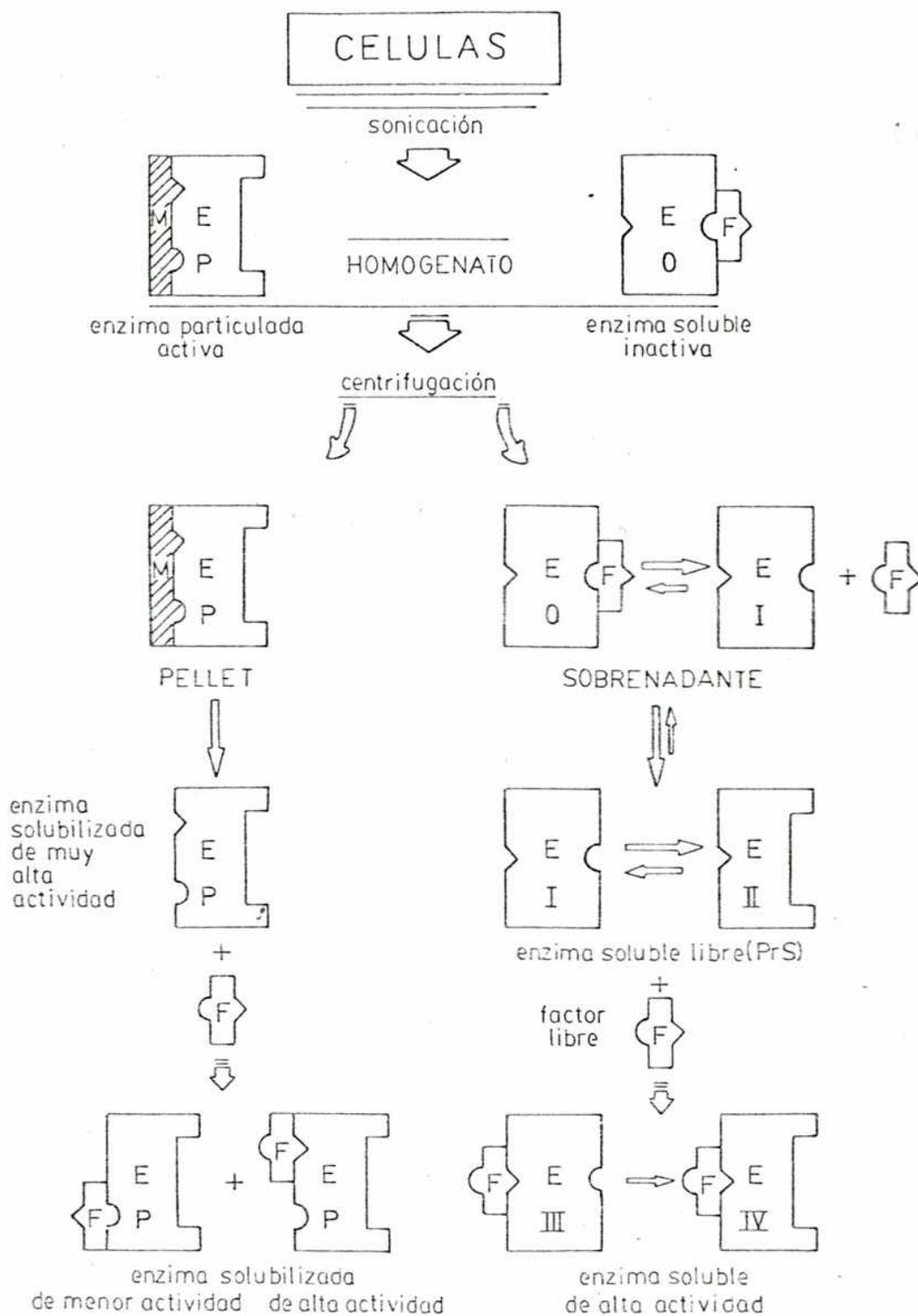


FIGURA E.II.3.: Esquema postulado para la liberación de un factor regulador de la síntesis de porfirinógenos en *Euglena gracilis* y su acción sobre distintas formas enzimáticas de la PBG-asa soluble y particulada. M: membrana; E: enzima; F: factor

un ligero predominio de la 0, pero que se desplazaría hacia la forma I de acuerdo con el estado de la célula y las condiciones del medio. La forma I, sería ahora más activa.

Una vez liberado el factor, éste podría encontrarse en condiciones para manifestar su capacidad reguladora; es posible que su presencia al estado libre favorezca la conversión de toda la 0 en I y, hasta es también muy probable que antes que pueda ejercer sus conocidas propiedades activantes, sea necesaria la completa desaparición de 0.

Separando el factor por filtración molecular o por diálisis, obtendríamos la forma I de la enzima soluble libre, que se identifica con la llamada proteína de Sobrenadante (PrS). Esta forma I podría existir en equilibrio con una forma II, aún más activa pero siempre correspondiente a la especie de enzima soluble libre de factor, en otras palabras la forma II, puede generarse en ausencia del factor.

Agregando ahora el factor a cada una de las formas I y II, éste podría unirse al sitio activante, y producir determinados cambios conformacionales que resultan en una forma molecular III ó IV de enzima soluble de alta actividad.

Es muy posible que la forma III, tenga una muy corta existencia, convirtiéndose rápidamente en la IV.

Ya demostramos que este factor (Juknat de Geralnik et al, 1981) no tiene ningún efecto sobre la enzima particulada, ya sea unida a membrana (MP) o solubilizada (P) y solamente puede actuar sobre las formas naturales solubles.

Aún no podemos explicar cuál sería el mecanismo de liberación y activación del factor. Tengamos en cuenta que al romper la célula y separar la enzima, llevándola a un medio más diluído o en respuesta a una necesidad celular, el factor se disociaría de la proteína, produciendo la forma I, que modificaría su ordenamiento estructural por otro menos comprimido y a su vez podría adoptar una configuración en la cual se facilitara la entrada del factor al sitio activante, por exposición de los grupos funcionales involucrados en la unión del factor a la enzima. De esta forma el factor entonces ejerce su efecto estimulante, convirtiendo la enzima libre activa (I ó II), en una forma de actividad aún mayor (III ó IV). Según nuestras ideas originales es

probable que el factor posea uno o varios grupos funcionales capaces de interactuar específicamente y unirse a ciertos residuos de la enzima soluble ubicados en el llamado sitio activante, produciendo entonces determinados cambios conformacionales en la estructura proteica que a su vez la conviertan en una forma de máxima actividad catalítica.

Recordemos que los grupos sulfhidrilos juegan un papel importante, si bien no totalmente aclarado, en la polimerización del PBG; el factor podría estar relacionado con este aspecto, ya sea exponiendo o reubicando a ciertos restos SH necesarios para una mejor interacción entre la Deaminasa y la Isomerasa, o entre las mismas y su sustrato, o constituyendo, él mismo, a través de estos grupos, un componente del mecanismo de asociación de estas enzimas, o, eventualmente contribuyendo a mantener un cierto estado reducido del sistema que parecería ser indispensable para una óptima actividad, por lo menos con las enzimas de *Euglena*. Ya habíamos postulado, que el factor podría ser un derivado tiólico (Juknat de Geralnik et al, 1981).

Estas alternativas no son excluyentes, de manera que podría darse una combinación de varias de ellas.

No deseamos descartar tampoco las posibilidades de que el factor pueda también proteger a la enzima frente a la acción de ciertos inhibidores impidiendo o bloqueando su unión al sitio activo o a sitios alostéricos correspondientes al inhibidor. Observamos que el factor calentado, independientemente de su forma de obtención, aún posee efectos estimulantes sobre la síntesis de porfirinógenos, pero siempre en grado ligeramente inferior.

El hecho de que el factor no actúe sobre la enzima particulada, unida a membrana o libre, ya lo hemos discutido (Juknat de Geralnik et al, 1981), pero recordemos que en el caso de la forma MP, los sitios receptores del factor deben estar bloqueados, posiblemente embebidos en la membrana; al solubilizar luego la enzima, estos sitios quedarían expuestos, pero lo más probable también es que en estas condiciones la enzima P, adopte una configuración espacial óptima, de manera que no cabría esperar un aumento adicional de su actividad por la acción del factor. Una alternativa mucho menos atractiva, pero que habría que contemplar es que el factor se uniera tanto al sitio activante como

al posible sitio inhibidor, produciendo una mezcla de especies de P más y menos activas, por lo cual no habría cambios netos de actividad. Es muy poco probable que esto ocurra, ya que, aparentemente, una vez liberado el factor de la enzima, no podría volverse a unir al sitio original, es decir, esa disociación es irreversible, la enzima parecería adoptar una nueva configuración en la cual no hay sitio receptor para una acción inhibitoria del factor.

En este esquema se presuponen además que siempre está favorecida la conversión de una forma activa en otra más activa ($O \rightarrow I$ y $I \rightarrow II$) y que cuando se adopta el ordenamiento estructural correspondiente a una máxima actividad (IV y P), la situación es irreversible frente a la acción del factor.

E.II.4.3. Aplicación del esquema de acción del factor al análisis de diferentes situaciones experimentales

Veremos que el esquema actual permite explicar fácilmente todos los cambios de actividad que hemos observado a lo largo de nuestros estudios con las enzimas de *Euglena*, producidos frente a distintas condiciones experimentales.

Apliquemos por ejemplo este esquema al análisis de los datos obtenidos, estudiando el efecto del factor sobre diferentes preparaciones enzimáticas como las empleadas en la experiencia de la Tabla E.II.16.

Separaremos el conjunto de resultados en 3 grupos.

En el Cuadro I, consideramos los cambios de actividad observados en las fracciones H y S sin estacionamiento. Directamente del esquema tenemos que el homogenato inicial H, con una actividad de 0,039 estaría constituido por un 25% de la forma particulada unida a membrana, MP, de actividad 0,146 y un 75% de la inactiva O. El sobrenadante S_1 , de actividad 0,243, a su vez contendría una mezcla en equilibrio de formas O y I, con un 60% de la primera y 40% de la segunda. Esta última forma, la I, se identifica con la llamada PrS_1 de actividad 0,597, que cuando se separa totalmente del factor puede transformarse en la II, de actividad 1,07, que a su vez la identificamos con la PrS_2 . Por acción del factor sobre cualquiera de estas dos formas se produ

CUADRO I: Aplicación del esquema del factor a las preparaciones H, S y PrS, sin estacionamiento de 24 horas

$$\begin{aligned}
 H_1 (0,039) &= 25\% MP (0,146) + 75\% O (0) \\
 S_1 (0,243) &= 60\% O (0) + 40\% I (0,597) \\
 PrS_1 &= I (0,597) \quad (I (0,597) \rightarrow II (1,07)) \\
 PrS_2 &= II (1,07) \\
 I \text{ ó } II + F &= III \rightarrow IV (1,70 - 1,75) \\
 MP (0,146) &\rightarrow P (3,5)
 \end{aligned}$$

MP: Enzima particulada; P: Enzima particulada solubilizada; H: Homogenato; S: Sobrenadante; O, I, II, III y IV: distintas formas de la enzima soluble de diferente actividad ($IV=III>II>I>O$). Los datos de las fracciones analizadas corresponden a los obtenidos para las preparaciones de igual denominación ilustrados en la Tabla E.II.16. (Se ha colocado entre paréntesis el valor de actividad respectivo).

ce una activación, resultando en la especie más activa III, que rápida e irreversiblemente se convierte en la forma IV, ambas con la máxima actividad posible de 1,70-1,75 (para este batch de *Euglena*).

Finalmente ya se demostró que la separación de la enzima particulada de la membrana, producía una forma P solubilizada de muy alta actividad.

En el Cuadro II, hemos aplicado el esquema, con un razonamiento similar al anterior, al análisis de los datos obtenidos con fracciones que han sido estacionadas. Cuando H_1 se deja 24 horas en la heladera, su actividad aumenta de 0,039 a 0,103 en H_2 ; el H_2 será entonces ahora una mezcla de MP y O, pero en estas condiciones es muy probable que haya ocurrido ya cierta separación del factor de la forma O, produciendo la I y factor libre, de manera que el H_2 estaría entonces formado por un 15% de MP, 70% de la forma inactiva O y 15% de la I, de actividad 0,597, además de factor libre. Cuando a H_1 le agregamos factor, sucede algo análogo al efecto del estacionamiento, si bien se ha propuesto que la presencia de factor libre favorece la conversión de la forma inactiva en la I, es de esperar entonces una mayor proporción de esta última con respecto al solo efecto del estacionamiento. En consecuencia, por agregado de F a H_1 tendríamos un 15% de MP y ahora un 60% de O y 25% de I. Este fenómeno se repite en el caso de tener la mezcla $H_2 + F$ sólo que aquí la forma I sería la predominante (80%) y ya casi no quedaría especie O (5%). Cuando S_1 de actividad 0,243, pasa a S_2 de mayor actividad; en este caso existiría un mayor desplazamiento hacia la forma I, a expensas de la O con respecto al equilibrio inicial y en S_2 habría un 40% de O y un 60% de I.

El agregado de factor a S_1 o S_2 va a desplazar posiblemente el equilibrio hacia las formas III (IV) con una correspondiente desaparición de la O; de manera que en $S_1 + F$ habría un 90% de I y 10% de III (IV), mientras que en $S_2 + F$, partes iguales de ambas especies.

Finalmente, el factor actuando sobre PrS_1 o PrS_2 , produciría 100% de la forma más activa III (IV).

Por último, en el Cuadro III, aplicamos el esquema al análisis de los datos obtenidos con la diálisis. En realidad lo que sucede con este procedimiento es que al ser menos efectivo, en

CUADRO II: Aplicación del esquema del factor a las preparaciones
H, S y Pr estacionadas 24 horas

H_1 (0,039) + H_2 (0,103)	$H_2 = MP + 0 \leftrightarrow I + F$
H_2 (0,103)	= 15% MP (0,146) + 70% 0 (0) + 15% I (0,597) + F
$H_1 + F$	= MP + 0 \leftrightarrow I + F
$H_1 + F$ (0,234)	= 15% MP (0,146) + 60% 0 (0) + 25% I (0,597) + F
$H_2 + F$	= MP + 0 \leftrightarrow I + F
$H_2 + F$ (0,510)	= 15% MP (0,146) + 5% 0 (0) + 80% I (0,597) + F
S_1 (0,243) + S_2 (0,383)	$S_2 = 0 \leftrightarrow I + F$
S_2 (0,383)	= 40% 0 (0) + 60% I (0,597)
$S_1 + F$	= 0 + I + III (IV) + F
$S_1 + F$ (0,693)	= 90% I (0,597) + 10% III (IV) (1,70) + F
$S_2 + F$	= 0 + I + III (IV) + F
$S_2 + F$ (1,128)	= 50% I (0,597) + 50% III (IV) (1,70) + F
$PrS_1 + F$	= III (IV) + F $PrS_1 = I (0,597)$
$PrS_1 + F$ (1,748)	= 100% III (IV) (1,70-1,75) + F
PrS_2	= II (1,07)
$PrS_2 + F$ (1,692)	= 100% III (IV) (1,70-1,75) + F

Los datos de este análisis corresponden a los obtenidos para las fracciones de igual denominación ilustrados en la Tabla E.II.16. (entre paréntesis se ha colocado el respectivo valor de actividad).

CUADRO III: Aplicación del esquema del factor a las preparaciones H y S dializadas 24 horas

H_d	$= MP + O \leftrightarrow I + F$
$H_d (0,180)$	$= 15\% MP (0,146) + 55\% O (0) + 30\% I (0,597) + F$
S_d	$= O + I + F$
$S_d (0,504)$	$= 15\% O (0) + 85\% I (0,597) + F$
$H_d + F$	$= MP + O \rightarrow I + F$
$H_d + F (0,518)$	$= 15\% MP (0,146) + 85\% I (0,597) + F$
$S_d + F$	$= O + I + III (IV) + F$
$S_d + F (1,512)$	$= 20\% I (0,597) + 80\% III (IV) (1,70) + F$

Los datos de este análisis corresponden a los obtenidos para las fracciones de igual denominación ilustrados en la Tabla E.II.16. (entre paréntesis el respectivo valor de actividad).

la separación del factor por lo menos en las condiciones de la experiencia, el desplazamiento hacia las formas más activas está afectado correspondientemente. Cuando dializamos H, hay un 15% de MP, 55% de O y un 30% de I; al someter a este tratamiento a S, queda un 15% de O y resulta un 85% de I, que si lo comparamos con las fracciones PrS (sus equivalentes, luego de Sephadex G-25), en ellas no queda más forma inactiva.

El factor actúa sobre el S_d , haciendo desaparecer la especie O y llevando la I a III(IV) de manera que la mezcla S_d+F de actividad 1,512 es la resultante de un 20% de I y un 80% de III (IV).

CONCLUSIONES

E.III.1. Cinética

E.III.2. Sobre el factor de regulación

E.III. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio acerca de la existencia de un factor regulador que controlaría la síntesis enzimática de porfirinógenos en *Euglena*, pueden resumirse considerando los siguientes ítems:

E.III.1. Cinética

Se efectuaron curvas de saturación con PBG para la fracción S, observándose que tanto para la formación de porfirinas como para el consumo de sustrato, el comportamiento era no michaeliano con Km's aparentes de 114 y 285 μM para la formación de producto y consumo de PBG respectivamente. En ambos casos el n fue igual a 2.

En cuanto a la fracción PrS, ésta mostró una respuesta bifásica en base al producto formado, revelando la existencia de una cinética compleja, no michaeliana, en tanto que respecto al consumo de PBG, el aspecto de las curvas fue similar pero se logró alcanzar la saturación. El conjunto de evidencias halladas están indicando que para la fracción PrS, el comportamiento cinético respondería a la existencia de fenómenos de cooperatividad negativa.

E.III.2. Sobre el factor de regulación

Existe una dependencia entre el grado de activación de la formación de porfirinas por la fracción S y la cantidad de factor F_S , con un perfil que correspondería a una respuesta de tipo enzimático, aunque aún no podemos asegurarlo, mientras que el factor no parece tener ningún efecto sobre el consumo de PBG.

Sobre la fracción PrS, la acción del F_S en relación con la cantidad del mismo fue mucho menos pronunciada, tanto para la formación de porfirinas como para el consumo de sustrato.

Se investigó el efecto de sulfamerazina, antipirina y metil-DOPA sobre la actividad de las fracciones S y PrS. Aparentemente, estos reactivos no tendrían acción sobre la actividad de estas fracciones de *Euglena in vitro*, restando la posibilidad

de que pudieran antagonizar con la formación *in vivo* del ácido fólico, así como de ciertos derivados pteridínicos de dicho protista y eventualmente con la síntesis y acción del factor de *Euglena*.

Se estudió también el efecto de glutatión, cisteína y tiosulfato sobre la actividad de las mismas fracciones, observándose acción ligeramente estimulante en algunos casos y sólo inhibición por tiosulfato 10^{-3} M sobre PrS. Nuestras evidencias indicarían que el factor podría ser un compuesto sulfurado. Resultados provenientes de nuestro trabajo nos han llevado a pensar que una de las funciones del factor de *Euglena* podría ser la de mantener reducido el nivel redox del medio en el cual debe funcionar la PBG-asa. Se estudió entonces la acción del factor variando la atmósfera de incubación, observándose que el F_5 es también capaz de expresar su acción estimulante en aerobiosis. De acuerdo con nuestros datos el factor debe ser también un compuesto con propiedades reductoras.

Se resolvió también investigar la acción del factor de *Euglena* sobre las enzimas de otras fuentes. Dado que con ninguno de los tres tejidos empleados (hígado vacuno, eritrocitos humanos y *Rp. palustris*) se encontró una respuesta estimulante sobre las actividades enzimáticas por parte del F_5 , es posible que no exista sitio receptor para este compuesto o bien que la actividad de las mismas sea relativamente elevada como para que este factor pueda expresarse.

El factor regulador de *Euglena* es sin lugar a dudas, una molécula de bajo peso molecular, constituida probablemente por una parte no proteica y una proteica. Como ya hemos visto, dicho factor se puede obtener por medio de una cromatografía en Sephadex G-25 de las fracciones H ó S o mediante una diálisis de las mismas. De acuerdo con nuestros resultados, surge que la cromatografía por Sephadex es más efectiva para la separación del factor que la diálisis, si bien ambos procesos llevan al mismo resultado final.

Los datos experimentales obtenidos en este trabajo han confirmado nuestras ideas previas acerca de la presencia de un factor en *Euglena gracilis*, que regularía la síntesis enzimática de los porfirinógenos. Además hemos encontrado nuevas evidencias que nos llevan a ampliar el esquema propuesto para explicar el mecanismo de acción de este factor, postulando la existencia

de varias formas enzimáticas de la PBG-asa. Según este esquema actual se pueden explicar fácilmente todos los cambios de actividad que hemos observado a lo largo de nuestros estudios con las enzimas de *Euglena*, producidos frente a distintas condiciones experimentales.

Jack & Joe Jacob



REFERENCIAS

- Batlle, A.M. del C. & Rossetti, M.V. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 251.
- Batlle, A.M. del C.; Wider, E.A. & Stella, A.M. (1978), *Int. J. Biochem.* 9, 871.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1979), *J.C.S. Chem. Comm.*, 1155.
- Bogorad, L. (1963), *Ann. N.Y. Ac. Sci.* 104, 676.
- Böhme, M.; Pfleiderer, W.; Elstner, E. & Richter, W. (1980), *Angew. Chem. Int.* 19, 473.
- Clement, R.P.; Kohashi, M. & Piper, W.N. (1982), *Arch. Biochem. Biophys.* 214 (2), 657.
- Conway, A. & Koshland, D.E. (1968), *Biochemistry* 7, 4011.
- Cornford, P. (1964), *Biochem. J.* 91, 64.
- Davies, R. & Neuberger, A. (1973), *Biochem. J.* 133, 471.
- Eales, L. (1971), *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* 17, 120.
- Engel, P.C. & Dalziel, K. (1959), *Biochem. J.* 115, 621.
- Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 350, 358.
- Frydman, R.B.; Tomáro, M.L.; Wanschelbaum, A. & Frydman, B. (1972), *FEBS Letters* 26 (1), 203.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1980), *FEBS Letters* 112 (1), 86.
- Juknat de Geralnik, A.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1981), *Int. J. Biochem.* 13 (3), 343.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1983) en preparación.
- Llambías, E.B.C. (1971), Tesis de Doctorado en Química (UBA).
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 a), *Biochim. Biophys. Acta* 220, 552.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 b), *FEBS Letters* 9 (3), 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 a), *Biochem. J.* 121, 327.

- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 b), *Biochim. Biophys. Acta* 227, 180.
- Llambías, E.B.C.; Locascio, G.A. & Batlle, A.M. del C. (1971), *Anales Asoc. Quím. Argentina* 59, 271.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G. (1973), *Biochem. J.* 136, 477.
- Peters, P.G.; Sharma, M.L.; Hardwicke, D.M. & Piper, W.N. (1980), *Arch. Biochem. Biophys.* 201 (1), 88.
- Piper, W.N. & van Lier, R.B.L. (1977), *Mol. Pharmacol.* 13, 1126.
- Pluscec, J. & Bogorad, L. (1970), *Biochemistry* 9, 4736.
- Pollack, S.E. & Russell, C.S. (1978), *FEBS Letters* 90 (1), 47.
- Radmer, R. & Bogorad, L. (1972), *Biochemistry* 11, 904.
- Riordan, J.F. (1973), *Biochemistry* 12, 3915.
- Riordan, J.F.; Mc Elvany, R.D. & Borders, C.L., Jr. (1977) *Science* 195, 884.
- Rossetti, M.V. (1978), Tesis de Doctorado en Química (UBA).
- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 277.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 781.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Sancovich, H.A. (1972), Tesis de Doctorado en Química (UBA)
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969 a), *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969 b), *FEBS Letters* 3 (3), 223.
- Scott, A.I.; Ho, K.S.; Kajiwara, M. & Takahashi, T. (1976), *J. Am. Chem. Soc.* 98 (6), 1589.
- Stella, A.M.; Parera, V.E.; Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 252, 481.
- Stein, J.A. & Tschudy, D.P. (1970), *Medicine* 49, 1.

- Tephly, T.R. (1975), "Porphyrins in Human Disease" Report of the discussions, p. 128.
- Tomaro, M.L.; Frydman, R.B. & Frydman, B. (1977), Arch. Biochem. Biophys. 180, 239.
- Viale, A.A. (1978), Tesis de Doctorado en Química (UBA).
- Viale, A.A.; Wider, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980 a), Int. J. Biochem. 12, 729.
- Viale, A.A.; Lorenti, A.S.; Wider, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980 b), Revista Argentina de Microbiología 12 (1), 1.
- Wider, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H.A. (1971), Biochim. Biophys. Acta 235, 511.
- Wider, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R.C. & Neuberger, A. (1976), Phil. Trans. R. Soc. London B 273, 79.
- Wider, E.A.; Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M. & Malamud, S. (1980), Int. J. Biochem. 12, 879.