

Tesis de Posgrado

Efectos del antibiótico cicloheximida sobre el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*

Widuczynski, Isaac

1963

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:

Widuczynski, Isaac. (1963). Efectos del antibiótico cicloheximida sobre el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1165_Widuczynski.pdf

Cita tipo Chicago:

Widuczynski, Isaac. "Efectos del antibiótico cicloheximida sobre el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1165_Widuczynski.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efectos del antibiótico cicloheximida sobre el metabolismo de

Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus

Isaac Widuczynski

TESIS: 1165

Tesis presentada para optar al Título de

Doctor en C. Químicas

Año 1963



El presente trabajo se realizó en el Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires durante la comisión autorizada por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, institución a la cual pertenezco. La concreción del mismo fue posible gracias al espíritu de colaboración ofrecido en todo momento por el Dr. Andrés O.M. Stoppani, quien dirigió esta tesis con la profundidad y la crítica constructiva necesarias para permitir que me introdujera en el estudio de algunos de los problemas que la microbiología presenta constantemente con enfoque bioquímico moderno; al Ing. Agr. Augusto P. Cercós, Jefe del Equipo de Antibióticos del Instituto de Microbiología e Industrias Agropecuarias del I.N.T.A., quien me alentó constantemente para que me especializara en los estudios de los mecanismos de acción de los compuestos producidos por microorganismos; al Ing. Agr. Enrique Sahiel, Director del Instituto de Microbiología e Industrias Agropecuarias del I.N.T.A., quien permitió que la comisión de trabajo fuera posible; al Ing. Agr. Ubaldo C. García, Director General del I.N.T.A., quien autorizó la presentación del presente trabajo como tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas.

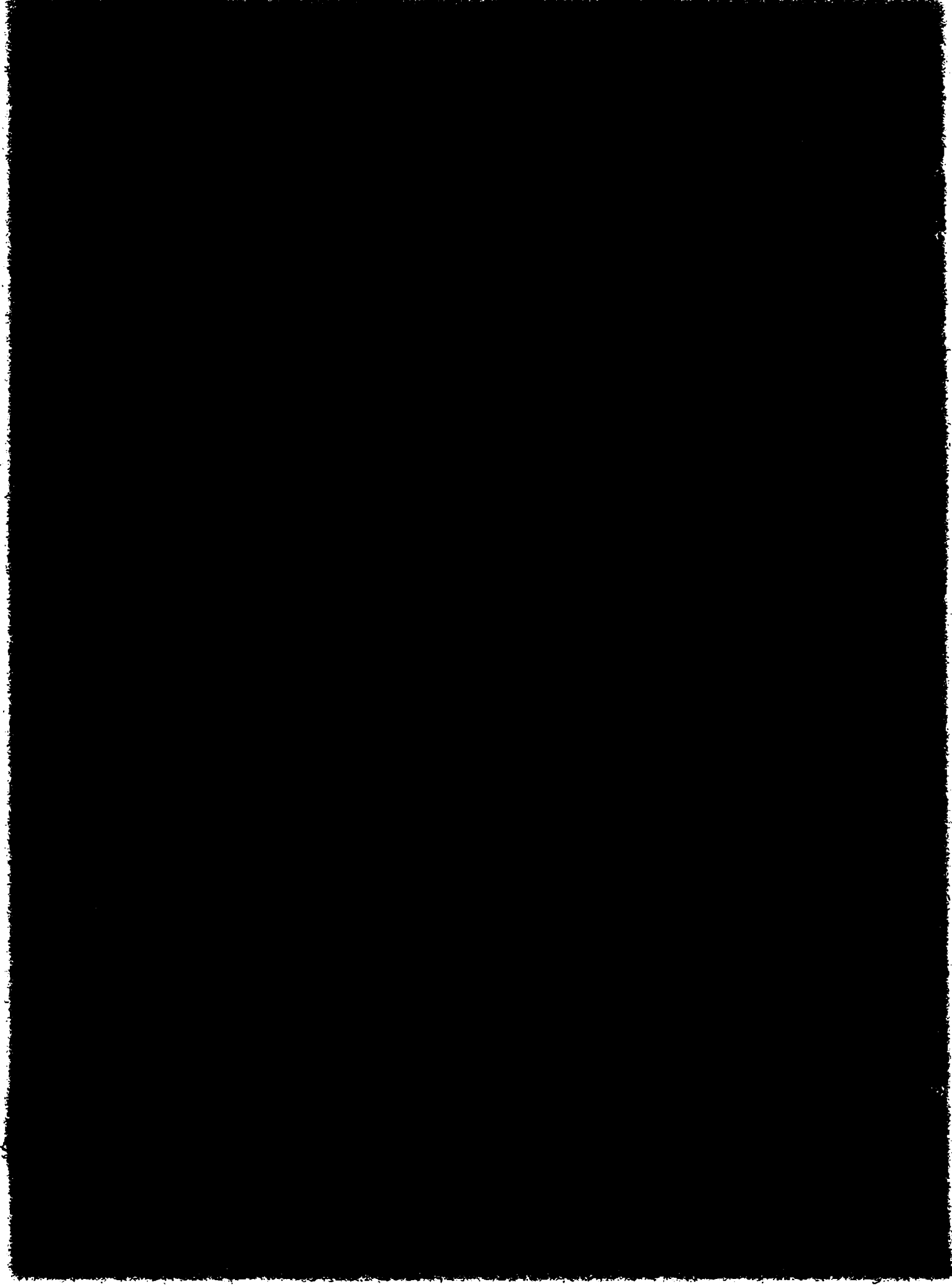
Agradezco el aliento manifestado por los integrantes del Equipo de Antibióticos y a la ayuda y al compañerismo brindados por todos y cada uno de los componentes del Instituto de Química Biológica, durante mi permanencia en dicho lugar.

Agradezco a The Upjohn Co. por haber suministrado el antibiótico Acti-dione y la información referente al tema.

1944

A mis padres

A mi esposa



CAPITULO I

INTRODUCCION

El conocimiento del modo de acción de los antibióticos ha sido el objetivo de numerosos estudios desde que se descubrieron estas sustancias y fueron utilizadas en el tratamiento de enfermedades que afectan tanto al hombre como a vegetales y animales. El interés se basa en que el saber cómo actúan permitiría una mejor aplicación y en el hecho de ser herramientas de gran utilidad para dilucidar diversas secuencias en los procesos metabólicos.

En el control de cualquier enfermedad producida por microorganismos, llama la atención la acción de los antibióticos y quimioterápicos en general por su especificidad sobre el patógeno, mientras que sobre el huésped tiene un efecto pequeño o nulo. Por eso es conveniente tener en cuenta ciertos criterios al estudiar el efecto de un antibiótico: la reacción al terada debe ser de necesidad vital para la célula microbiana; la inhibición debe ser específica en los organismos cuyo crecimiento es susceptible a la acción de la droga; se debe producir en el mismo orden de concentración en que inhibe el desarrollo; la inhibición debe depender de la estructura química del antibiótico así como de su reacción con grupos funcionales de importancia para el crecimiento del microorganismo. Además se considera de utilidad observar los efectos sobre la célula entera y sobre una enzima o sistema de enzimas.

Dada la complejidad del metabolismo microbiano y de su estructura celular, en primer lugar podría considerarse que actúan sobre su multiplicación, determinando que disminuya el número de células viables o produciendo sólo una bacteriostasis. Por otra parte pueden afectar procesos metabólicos generales como son los de la respiración o bien interferirlos específicamente, como podría ser el metabolismo de las proteínas o la competencia con metabolitos esenciales para el crecimiento.

A pesar de la gran cantidad de trabajos realizados para dilucidar el mecanismo de acción de los diversos antibióticos, poco se conoce en relación a su especificidad. Entre las revistas aparecidas se pueden mencionar las siguientes: Hotchkiss (1), Benedict y Langlykke (2), Bailey y Cavallito (3), Brownlee (4), Kirby (5), Eagle y Saz (6), Umbreit (7) y Hahn (8).

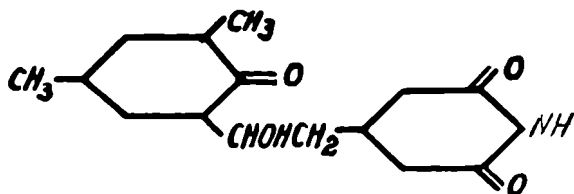
La insistencia en esta línea de trabajo permitirá, entre otras cosas, cuando se conozcan los procesos metabólicos inhibidos y en base a una modificación conveniente de la estructura de los antibióticos, obtener nuevos productos con una acción más eficaz y menores efectos sobre el huésped.

Obtención de cicloheximida

Whiffen, Bohonos y Emerson (9) en 1946 observaron que un caldo de cultivo, proveniente de la fermentación de la cepa de Streptomyces griseus productora de estreptomocina en una concentración de 130 µg/ml de caldo, inhibía en la dilución 1:100 el crecimiento de un hongo patógeno, Cryptococcus neoformans, mientras que no ocurría lo mismo con estreptomocina purificada. La sustancia de propiedades antifúngicas se obtuvo por extracción con cloroformo evaporando al vacío y disolviendo el residuo en metanol. Además de diferir en su actividad antimicrobiana, el agente antifúngico se solubilizaba en cloroformo y éter. Leach, Ford y Whiffen (10) obtuvieron el producto crudo de caldos de cultivo productores de estreptomocina absorbiendo con carbón, eluyendo con acetona 80%, destilando la acetona y extrayendo la solución acuosa remanente con cloroformo. El extracto cloroformico se decoloró con carbón y luego se evaporó el solvente. La purificación se hizo por distribución en contracorriente en un sistema benceno-agua. Sugirieron como fórmula molecular $C_{27}H_{42}N_2O_7$. Propusieron

el nombre actidione por considerar que era una dicetona producida por un actinomicete. Whiffen (11) produjo variación en la producción de los dos antibióticos con cambios en el medio de cultivo. Por efecto de rayos X sobre los conidios de Streptomyces griseus obtuvo mutantes que alteraron la producción de uno o de los dos antibióticos. De acuerdo al espectro antimicrobiano el actidione era inactivo contra bacterias y muy activo contra ciertas levaduras, incluyendo algunos hongos patógenos. La toxicidad variaba de acuerdo a la especie; así por ejemplo la DL_{50} para ratas era 2,5 mg/kg y para ratones 150 mg/kg.

Ford y Leach (12) determinaron que el P.F. era 115-116,5 °C después de varias reorristalizaciones de acetato de amilo y 115-117 °C de agua o metanol 30%. La rotación específica era -3,0° en metanol y + 6,8° en agua. El producto cristalino se solubilizaba en solventes orgánicos, excepto hidrocarburos saturados. Datos analíticos de C, H y N estaban más de acuerdo con la fórmula molecular $C_{15}H_{23}NO_4$ que la anterior $C_{27}H_{42}N_2O_7$. Kornfeld y Jones (13) proponen como fórmula estructural.



β -[2-(3,5-dimetil-2-oxiciclohexil)-2-hidroxi-etil]-glutarimida.

Kornfeld, Jones y Parke (14) confirmaron la fórmula anterior mediante un cierto número de reacciones y transformaciones llevadas a cabo sobre el actidione. Resultó ser una monocetona, sugiriendo el nombre de cicloheximida. Su estructura aún no ha sido confirmada por síntesis total. Phillips, Acitelli y Meinwald (15) realizaron intentos de condensar la porción glutarimida de la molécula con (+) -2,4- dimetilciclohexanona en la espera de alcanzar la síntesis del antibiótico. Eisenbraun, Osiecki y Djerassi (16) determinaron la configuración absoluta de la (+) -2,4- dimetilciclohexanona, obtenida en un solo paso por tratamiento alcalino del antibiótico. Los dos metilos se encontraron en posición cis, siendo (+) -cis-2,4- dimetilciclohexanona. Brown y Hagen (17) demostraron que 2 agentes antifúngicos fueron producidos en un cultivo de Streptomyces noursei, nistatina en el micelio y cicloheximida en el caldo de cultivo.

Efectos del antibiótico

Whiffen (18) probó el efecto inhibitorio frente a una gran variedad de fitopatógenos incluyendo 1 orden de Phycmycetes, 4 de Ascomycetes y 1 de Basidiomycetes y 12 del género Fungi Imperfecti. La cicloheximida inhibió *in vitro* el crecimiento de 33 especies de hongos fitopatógenos, variando la concentración mínima inhibitoria utilizada entre 0,125 y 100,0 $\mu\text{g/ml}$.

Wallen, Sutton y Skolko (19) estudiaron la acción del antibiótico sobre suspensiones de esporos de varios hongos fitopatógenos, registrando que los esporos de Ascochyta pisi y Colletotrichum lindemuthianum fueron inhibidos completamente con 1 $\mu\text{g/ml}$. Loefer y Matney (20) observaron que ciertos protozoarios eran muy sensibles a la cicloheximida, así varias cepas de Tetrahymena gelii y Euglena gracilis eran inhibidas por 1 $\mu\text{g/ml}$ o menos. Palmer y Maloney (21) encontraron que este antibiótico tenía acción sobre ciertas algas. Zehnder y Hughes (22) hicieron estudios en igual sentido. Traub, Dewitt, Welch y Newman (23) y Welch (24) realizaron estudios para clasificar sustancias como repelentes de roedores y de 4.000 compuestos, la cicloheximida resultó ser la más efectiva frente a ratas de laboratorio. Las ratas rechazaron beber agua que contenía 1 ppm aún cuando no hubiera otro agua presente.

Reilly, Stock, Buckley y Clark (25) probaron la capacidad de 33 antibióticos ya conocidos para retardar el crecimiento del Croker Sarcoma 180 en ratones; ninguno fue marcadamente efectivo, 5 tuvieron ligero efecto retardante (nunca más que la mitad) y sólo la cicloheximida lo alcanzó con dosis no tóxicas para el huésped. Inyectando por vía intraperitoneal con dosis diarias de 0,1 mg de cicloheximida, Nitta, Takeuchi, Yamamoto y Umezawa (26) no inhibieron el crecimiento de células ascíticas, sin embargo, con inyecciones diarias de 1,0 mg inhibieron el incre-

mente de células ascíticas pero no prolongó el período de supervivencia.

Smith, Lummis y Grady (27) utilizando un cultivo de tejido de la cepa KB de carcinoma humano epidermoide estudiaron el efecto de los antibióticos estreptovitacina A y B y cicloheximida, siendo las dosis para obtener el 50% de inhibición (DI_{50}) de 0,035; 0,48 y 0,10 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Efectos sobre la morfología de algunos hongos. Trabajando con Gymnosporangium y concentraciones de antibiótico entre 5 y 500 ppm, Berliner y Olive (28) observaron que con las concentraciones mayores casi se inhibe el desarrollo basidial y los núcleos se vuelven muy grandes y con cromosomas alargados; causa una bifurcación de los basidios similar a la producida por penicilina. Concentraciones bajas produjeron el retorno de uno de los núcleos al teliospore. Además observaron un efecto sorprendente: la presencia de muchos basidios con dos núcleos estrechamente asociados o aún conectados por hilos cromáticos. Sugirieron que se debería a un mal funcionamiento o desintegración del huso.

Por exposición continua a concentraciones mayores de los niveles tóxicos mínimos aceptados por los hongos Sclerotinia fructicola y Sclerotinia laxa, Grover y Moore (29) determinaron que el proceso de adaptación va acompañado con cambios morfológicos en los caracteres de las colonias y que no involucra selección genética ya que las colonias adaptadas retornaron al tipo de las colonias originales después de crecer de 2 a 5 generaciones en un medio sin inhibidor.

Cuando Gundersen (30) puso a crecer Fomes annosus en presencia de cicloheximida observó que el hongo adoptaba formas características, células globulares con grandes vacuolas.

Después de 7 reinoculaciones sucesivas de Fomes annosus en un medio de cultivo que contenía 1 ppm de cicloheximida, Gundersen (31) obtuvo una cepa cuya DE_{50} era 2,5 veces más alta que la original, pero esta resistencia no se aumentaba utilizando medios de cultivo con cantidades crecientes del antibiótico. La cepa resistente en un medio sin el inhibidor perdía parcialmente la resistencia, pero la mantenía más de 110 generaciones. Esta cepa produjo dos sustancias: una se solubilizaba en agua dando una coloración rojiza en un medio ligeramente alcalino, la otra era cristalina e insoluble en agua y de fórmula $C_{15}H_{16}O_3$. Esta última sustancia también se produjo en ausencia del antibiótico. Este autor sugirió que esta resistencia fue en parte la reducción de la facultad del inhibidor de combinarse o ad-

sorberse y la combinación de adaptación y mutación a nivel del núcleo.

Empleando Saccharomyces pastorianus, Gundersen y Wadstein (32) determinaron la inhibición del crecimiento en un 50% con 0,013 ppm de cicloheximida y completa con 0,1 ppm, en un medio de cultivo líquido después de 24 horas y a 28°C. A concentraciones subinhibitorias se formaron células anormalmente grandes, 3 ó más veces el diámetro común, y agregados celulares como probable resultado de la interferencia con la síntesis de materiales estructurales de la pared celular. Cuando la levadura fue cultivada en concentraciones sucesivamente más elevadas de antibiótico se desarrollaron organismos parcialmente resistentes que no formaron agregados ni células gigantes en presencia del antibiótico pero que inoculados posteriormente en un medio libre de cicloheximida crecieron lentamente y formaron pequeñas colonias en agar nutriente. Después de unas pocas transferencias en un medio libre del inhibidor los organismos resistentes revertieron al tipo normal. Además vieron que la resistencia a la cicloheximida no fue producto de la habilidad de descomponer o inactivar al compuesto. Estos cambios morfológicos sólo se produjeron en organismos en crecimiento y que no fueron privados de reservas nutrientes, pero no sucedió lo mismo en levaduras empobrecidas y suspendidas en un medio libre de nutrientes.

Monreal (33) obtuvo la inhibición completa de la esporulación de Saccharomyces var. ellipsoideus con 3,2 ppm del antibiótico y la disminución de la relación entre los ejes menor y mayor sin que hubiera cambio de volumen.

Modo de acción de cicloheximida

Por el hecho de ser éste uno de los pocos antibióticos que en fitopatología ha controlado enfermedades producidas por hongos, fue despertando el interés de diversos grupos de trabajo por conocer su acción sobre el metabolismo de los patógenos a los cuales ataca. Los estudios se fueron orientando fundamentalmente en dos sentidos: por un lado efectos sobre los procesos de la respiración y por el otro biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos. A pesar de lo realizado hasta el presente los conocimientos son un tanto inciertos e incompletos y hasta llegan a contradecirse en más de una oportunidad.

Efectos sobre la respiración. Estudiando el efecto de cicloheximida sobre la germinación y la respiración de los esporos y micelio de Myrothecium verrucaria, Walker y Smith (34) determinaron que la respiración de esporos fue aproximadamente 4 veces más sensible que la germinación y 10 veces más sensible que la respiración micelial y que la inhibición de la respiración

decrecía con el tiempo. Verona y Picci (35) no pudieron utilizar este anti-biótico para impedir fermentaciones secundarias producidas por levadura de tipo apiculata ya que necesitaban concentraciones mucho mayores que para S. ellipsoideus, causante de la fermentación vinaria. Efecto semejante observaron Szilvinyi, Klaushofer y Rauch (36) al intentar emplearlo en control de industrias. Mc Callan, Miller y Weed (37) analizaron el efecto de un cierto número de fungicidas, solubles o relativamente insolubles en agua sobre el consumo de oxígeno y la germinación de esporos de Neurospora sitophila, Monilia fructicola, Myrothecium verrucaria, Cephalosporium acremonium, Alternaria oleracea, Aspergillus niger, Stemphylium sarcinaeforme y Rhizopus nigricans. En general los valores DE_{50} (dosis efectivas para reducir a un 50% la acción) fueron menores para germinación que para consumo de oxígeno, indicando que los primeros son una medida más sensible de toxicidad que los segundos, ubicándose la cicloheximida en el grupo que no reducía el consumo de oxígeno pero que era tóxico para la germinación.

Observando el consumo de oxígeno por conidios de Fusarium roseum, tanto por células en crecimiento como en reposo, Sisler y Marshall (38) vieron que frente a cicloheximida las primeras fueron algo más sensibles, que la inhibición de las segundas fue aproximadamente de un 50% y que no aumentaba con concentraciones mayores. En el caso de la producción anaeróbica de anhídrido carbónico por S. pastorianus en presencia o ausencia de nitrógeno, fue tan sensible a cicloheximida como el consumo de oxígeno por estas células. La producción de anhídrido carbónico y el consumo de oxígeno alcanzó a alrededor de un 35% en el caso de las células en reposo y de un 50% en el de las células en crecimiento. Según estos autores el antibiótico tenía algún efecto directo sobre la oxidación de los hidratos de carbono o afectaba parte del metabolismo asociado estrechamente con la oxidación de hidratos de carbono como para causar cierta inhibición en este proceso.

Kielhöfer y Aumann (39) determinaron que la cicloheximida no inhibía el complejo zimasa del jugo de maceración de levadura de vino, ni la fermentación exógena o endógena de sus células y que su respiración era ligeramente dañada de manera inespecífica; la utilización de fosfato inorgánico no era afectada. En cambio agentes fungicidas como el ácido salicílico, anhídrido sulfuroso, alilisotiocianato y Captan actuaban sobre todos esos sistemas. El antibiótico inhibía la síntesis de glucógeno. Su absorción por la levadura era mucho menor si se comparaba con los otros fungicidas. Para los autores la restitución de las células de levadura y la reproducción enzimática fueron inhibidas específicamente y sugirieron una acción exclusiva del antibiótico sobre el anabolismo celular.

Con concentraciones de antibiótico de 1 a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Greig, Walk y Gibbons (40) inhibieron la fermentación de glucosa y sacarosa por levadura de panadería comercial y S. cerevisiae, pero propusieron que ésta era una acción superficial ya que no afectaron la fermentación por extractos libres de célula.

El efecto inhibitorio sobre células enteras fue aumentado por iones cobalto con concentraciones que variaban entre 0,5 y 2 veces la equivalencia molar de cicloheximida.

Después de probar aproximadamente unos 50 antibióticos como posibles inhibidores de sistemas fosforilantes y respiratorios de mitocondria y de glicólisis de células de tumor ascítico, Lardy, Johnson y Mc Murray (41) observaron que concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cicloheximida no actuaban sobre estos sistemas de mitocondria de hígado utilizando glutamato, succinato y β -hidroxibutirato como sustratos.

Un estudio sobre la acción de cicloheximida sobre la incorporación y distribución de fosfato por células de levadura, fue realizado por Van de Pol y Berends (42). Utilizando una levadura que previamente se cultivó en un medio deficiente en fosfato, fue colocada en otro con fosfato y glucosa, produciéndose una intensa incorporación de fosfato que no afectó con 100 μg de antibiótico por ml de cultivo. Si bien el antibiótico no tuvo acción sobre la distribución, obtuvieron resultados experimentales que mostraron una actividad específica mayor del fosfato en diversas fracciones celulares.

Según Latuasan y Berendr (43) las levaduras de cociente respiratorio altos eran especialmente sensibles al antibiótico. Estas observaciones los llevaron a analizar el efecto de cicloheximida sobre el ciclo Embden-Meyerhof en células de levadura en reposo, tomando a la alcohol-dehidrogenasa para verificarlo. Esta enzima fue inhibida al cabo de 1 hora en un 90% de su actividad con 10 μg de antibiótico por ml. Estudiaron otra enzima, la ácido lácticodehidrogenasa, que también contiene DPN como coenzima determinando que manifestaba una sensibilidad semejante pero que la concentración más adecuada era entre 20 y 50 μg de cicloheximida por ml. Para dilucidar la causa de este efecto probaron glutarimida y succinimida in vitro, determinando que tenían igual actividad sobre estas enzimas y que la sustitución del imino grupo destruía la actividad de estas sustancias. Sin embargo al poner en contacto estas iminas con S. carlsbergensis en crecimiento en una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no tenían ninguna acción.

Si una cepa de Candida krusei sensible a cicloheximida se ponía en contacto con el ion ferroso el antibiótico experimentaba la pérdida de su actividad, Blumauerová y Stárka (44). Manganeso y zinc también antagonizaron el efecto inhibitorio del antibiótico; calcio, magnesio y cadmio fueron menos activos y cobre no tuvo ningún efecto detectable. Estas observaciones hicieron sugerir que la cicloheximida formaba quelatos con metales bivalentes y que estos complejos eran antibióticamente inactivos.

Para probar el efecto antagónico entre la cicloheximida y 160 compuestos orgánicos, Coursen y Sisler (45) utilizaron sobre S. pastorianus entre otras sustancias: aminoácidos, purinas y pirimidinas, nucleósidos, ácidos orgánicos y grasos, hidratos de carbono, terpenos, vitaminas, cetonas cíclicas y un cierto número de medios complejos; solamente manifestaron actividad: 4-metilciclohexanona, 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanona, metilciclohexanona y vitamina A, como acetato y alcohol. Por otra parte los autores estudiaron la distribución de C^{14} después de incubar la levadura con glucosa uniformemente marcada con y sin antibiótico, observando que por acción del inhibidor no se rotuló la glutamina y fue menor en el caso del ácido glutámico, en cambio fue mayor en la alanina y ácido aspártico y también en tirosina y treonina. Sugirieron que se pudo haber inhibido la glutámico dehidrogenasa, siendo otra posibilidad la glutamina sintetasa, pero al añadir los ácidos glutámico y α -cetoglutárico y glutamina no se antagonizó la acción de cicloheximida.

Después de obtener cepas de S. cerevisiae resistentes a cicloheximida por cultivo sucesivo en medio líquido y por presencia de dosis crecientes del antibiótico Scardovi (46) determinó que eran invariablemente de respiración deficiente que el crecimiento de mutantes de respiración deficiente, presentes normalmente en la población original era menos sensible al inhibidor que el crecimiento de las formas normales, que no había evidencia de una acción mutagénica del antibiótico en este carácter. La oxidación de glucosa, ácidos pirúvico y succínico por células en reposo de Saccharomyces cerevisiae y Rhodotorula gracilis era inhibida por cicloheximida, mientras que la oxidación de ácido acético era insensible. La inhibición de la respiración fue completamente suprimida cuando el pH era cercano a 3, siendo un efecto totalmente reversible; pero esta dependencia del pH no se observó en células en crecimiento. No se manifestó ninguna acción inhibitoria del antibiótico sobre la degradación del ácido pirúvico por extractos libres de célula y preparaciones de mitocondrias. El autor sugirió que un punto más crítico fue la acción ejercida sobre la oxidación del ácido succínico por células en reposo de Rhodotorula gracilis, aunque al pa-

recer no se realizó sobre la dehidrogenasa succínica. El metabolismo anaeróbico de la glucosa no fue sensible a cicloheximida.

Estudiando 17 hongos que crecieron en un medio de cultivo con glucosa Bradley (47) no encontró relación entre el cociente respiratorio y la susceptibilidad a cicloheximida. El metabolismo aeróbico y anaeróbico de glucosa por S. pastorianus no fue inhibido apreciablemente por 2 μg de antibiótico por ml, aunque 0,5 detuvo el crecimiento. La fermentación de células adaptadas a maltosa no fue significativamente retardada por 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pero el proceso inducido fue totalmente suprimido. Cicloheximida no inhibió prácticamente la actividad de las enzimas glicolíticas pero previno la síntesis de nuevas enzimas.

El crecimiento de Zygosaccharomyces soja en condiciones aeróbicas fue completamente inhibido por 5 μg de cicloheximida por ml, Tsukada, Sugimori, Imai y Katagiri (48). Agitando continuamente el cultivo durante más de 96 horas en presencia del inhibidor, se restauró el crecimiento acompañado por la excreción de riboflavina en una proporción de 30 μg por ml de cultivo. El cociente respiratorio de la cepa obtenida varió en relación con la cepa madre, mientras que en ésta era 4 en la primera fue 1. El metabolismo de la glucosa, considerando consumo de oxígeno y desprendimiento de anhídrido carbónico, por células en reposo demostró que la inhibición de la glicólisis no fue significativa. Los autores lo verificaron comparando actividades de varias dehidrogenasas en extractos libres de célula, no habiendo diferencias esenciales. Además sugirieron que el antibiótico desacoplaba la formación de ATP o que bloqueaba el consumo de ATP durante la síntesis celular.

Efectos sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Loveless, Spcerl y Weisman (49) encontraron que el crecimiento y la división celular de S. cerevisiae eran inhibidos por cicloheximida.

Creaser (50) utilizando una concentración de cicloheximida que no inhibía el crecimiento de Staphylococcus aureus, 3.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dañó en un 72% la formación de β -galactosidasa, una enzima de adaptación del mismo microorganismo que para su formación requería las mismas condiciones que para la síntesis proteica.

Kerridge (51) y (52) con concentraciones mínimas de cicloheximida entre 0,5 y 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que inhibían el crecimiento de S. carlsbergensis, no encontró acción sobre la respiración y fermentación pero era posible mostrar un aumento en el fosfato ácido soluble lábil a 7 minutos, por lo que era improbable una acción sobre los mecanismos productores de energía. Otros estudios con las mismas concentraciones de antibiótico revelaron una inhibición com -

plata de la síntesis de proteínas y parcial de los ácidos nucleicos. Fraccionados éstos últimos se observó inhibición total del ácido deoxiribonucleico (DNA), mientras que la actividad residual era debida al ácido ribonucleico (RNA).

Resultados similares a los anteriores obtuvo Shepherd (53) trabajando con Aspergillus nidulans.

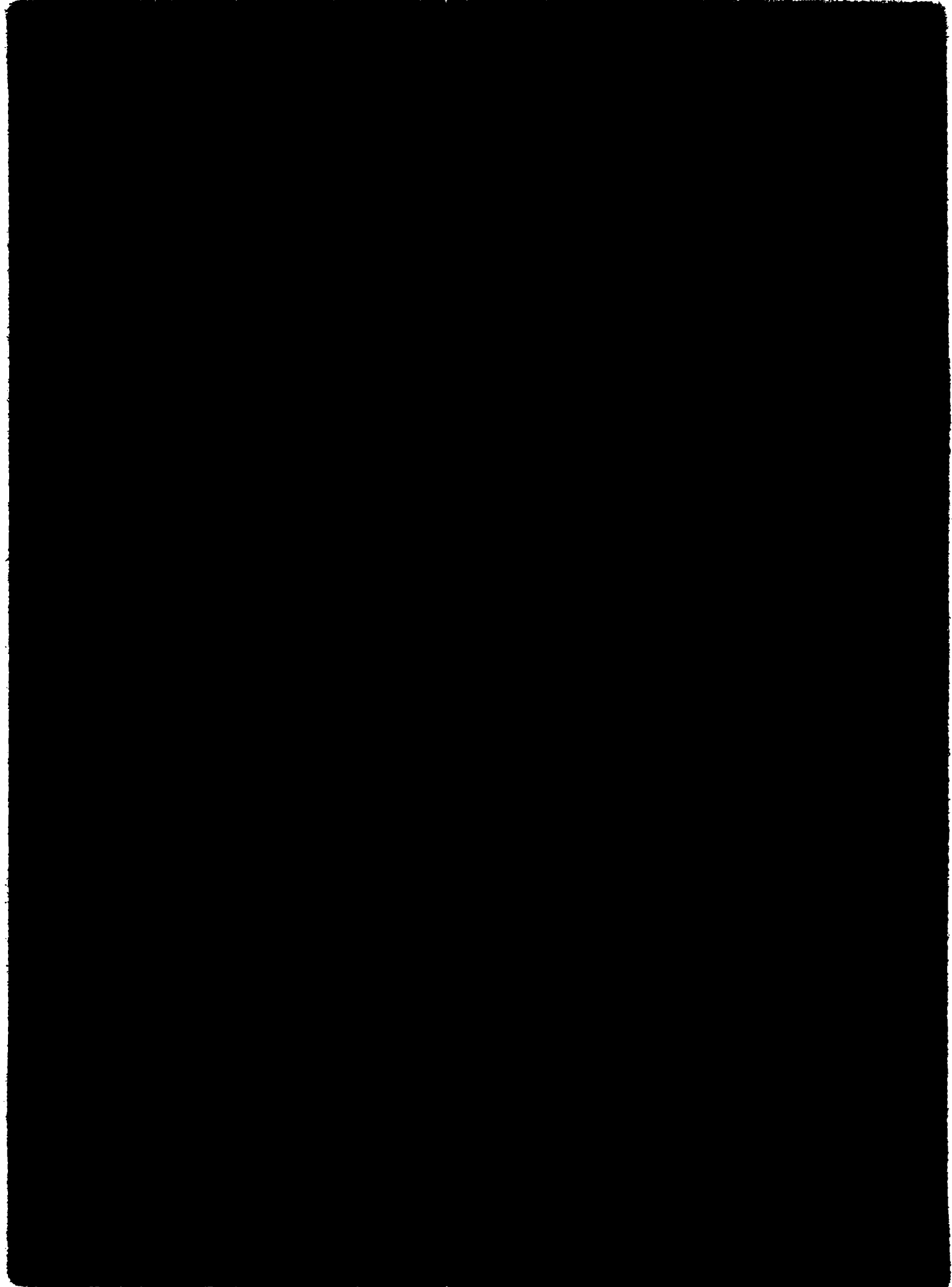
Aunque el crecimiento de levadura de panadería era retardado por cicloheximida no se modificó el contenido de material reactivo con la hidroxiribosina, deduciendo Harris y Neal (54) que no había inhibición en la formación de peptidil-nucleotidatos, uno de los pasos en la síntesis proteica.

Los estudios de Siegel y Sisler (54a) sobre el efecto del antibiótico en S. pasteuriana revelaron que ciertos nucleótidos ácido solubles y la síntesis de RNA eran fuertemente estimulados; que los niveles de ácidos orgánicos y aminoácidos libres, excepto glutamina, no fueron marcadamente afectados; que la activación de aminoácidos y la transferencia de aminoácidos activados a RNA soluble en los procesos de síntesis proteica no fueron inhibidas. Los análisis bioquímicos de las células sugirieron que el desvío en el metabolismo fue resultado del bloqueo inicial de la síntesis proteica y que la síntesis de DNA pudo ser inhibida por la acumulación de ribonucleótidos o RNA.

Monreal (33) además de observar modificaciones morfológicas por efecto de cicloheximida, determinó que el contenido total de nitrógeno de las células tratadas se reducía en un 25%; que si amoníaco y ácido glutámico estaban presentes en el medio de cultivo el consumo del aminoácido se inhibía en anaerobiosis y que si solamente estaba el ácido glutámico se excretaba amoníaco en presencia de cicloheximida. No hubo modificación en la composición de los aminoácidos en las células tratadas o no tratadas. Con 100 ppm no hubo ningún efecto sobre las transaminasas ácido glutámico-ácido oxalacético y ácido glutámico-ácido pirúvico.

De acuerdo a Gundersen (55) la inhibición del crecimiento de las células de Fomes anosoma no se debió a la deficiencia de minerales causada por la acción quelante del antibiótico. Tampoco hubo evidencia que se interfiriera el metabolismo de las sustancias féculicas o la síntesis de aminoácidos aromáticos. Suponiendo que la cicloheximida actuará como un antimetabolito, el autor probó el efecto antagónico del ácido p-aminobenzoico y de ciertas purinas y pirimidinas; entonces determinó que el ácido p-aminobenzoico, la pirimidina uracilo y las purinas xantina, guanina y

además contrarrestaban parcialmente el efecto del antibiótico cuando éste se utilizaba en concentraciones bajas, 1 a 3 ppm. Por cierta similitud de las estructuras químicas de las bases y el antibiótico se sugirió que la acción era sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y que el ácido p-aminobenzoico, vía ácido fólico, actuaría en la síntesis de purinas y pirimidinas. Sin embargo con concentraciones más altas de antibiótico, de 5 a 10 ppm, la inhibición era irreversible y total.



CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Cepa. Se empleó la cepa de levadura de vino N° 31, Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus, obtenida por el Ing. N.S. Palleroni de mostos en fermentación de la Provincia de San Juan.

Medio de cultivo. El medio de cultivo líquido contenía por litro: glucosa, 10 g; extracto de levadura Difco, 3 g; fosfato monopotásico, 2g; sulfato de amonio 0,8 g; mosto, 200 ml, pH aproximado, 5,0. El medio de cultivo sólido contaba además con 2,5 g por ciento de agar en rama. Se esterilizó a 121°C durante 15 min.

Células proliferativas. Previo cultivo en tubos con agar durante 24 horas, se transferían las células a erlenmeyers. Se cultivaron en agitador rotatorio durante 16-18 horas, tiempo cercano al máximo de la fase logarítmica de la curva de crecimiento. Si era de interés obtener una masa mayor de levadura se hacía un cultivo previo de unas 8 horas. Cuando se preparó polvo acetónico de células los cultivos se realizaron en los fermentadores con que cuenta la planta piloto del Equipo de Antibióticos del Instituto de Microbiología e Industrias Agropecuarias del I.N.T.A. En estos casos la esterilización se hizo a 121°C durante 50 minutos.

Células en reposo. La levadura obtenida por cultivo se aislaba por centrifugación, se lavaba 2 veces con agua destilada estéril desechándose las aguas de lavado y finalmente se ayunaron las células mediante aireación en agua destilada estéril por una noche a 30°C (56). En todos los casos la concentración celular se determinó por turbidimetría leída en el fotocolorímetro, previa comparación con una curva patrón de concentraciones conocidas por peso seco a 104-105°C hasta constancia de peso. Se expresaron como mg de peso seco de células por ml de medio de cultivo.

Técnicas manométricas. Se efectuaron en aparato de Warburg a 30°C. El consumo de oxígeno se determinó por el método directo de Warburg (57) y los resultados se expresaron en μ l de oxígeno por hora y por mg de células. El anhídrido carbónico desprendido se recogió en NaOH 5N, colocado en la ¹/_{c.p.} central del vaso de Warburg. El volumen final en el vaso de Warburg así como el tiempo de agitación dependió de cada experiencia.

Técnicas de incubación. Para estudiar la cinética de la incorporación y distribución de los compuestos radiativos en presencia del inhibidor, se hicieron cultivos en erlenmeyers a 30°C. Después de 3-4 horas la levadura ya en su fase logarítmica alcanzaba una concentración celular adecuada para introducir las sustancias mencionadas. A partir de ese momento se tomaron partes alícuotas.

Fraccionamiento de las células.

a) Fraccionamiento de las muestras después de incorporar C¹⁴. Una vez obtenidas las muestras, el material celular que se encontraba en los vasos de Warburg o las alícuotas de las incubaciones, se centrifugaban a 1°C por 10 minutos y a 2.000 r.p.m. Las células se lavaron 2 veces con agua destilada estéril o con buffer ftalato pH 4,5 centrifugándose de acuerdo a las condiciones anteriores.

Luego se suspendió en una mezcla de metanol-agua (9:1) cuya densidad era 0,81, determinando en primer lugar la radiactividad sobre alícuotas de la suspensión de levaduras y de las sustancias solubles en dicha mezcla de solventes. El sobrenadante se decantó y concentró al vacío y en frío y el residuo fue cromatografiado.

El precipitado estaba constituido principalmente por ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos.

Ácidos nucleicos. Después de lavarse el precipitado con metanol, se realizó una extracción con TCA al 5% a 90°C durante 30 minutos (58), hubo una centrifugación a 1.500 r.p.m. y el precipitado se lavó una vez con TCA al 5%. Los ácidos nucleicos son los principales constituyentes de esta fracción; sobre una alícuota se determinó la radiactividad y el resto fue hidrolizado para obtener las bases, nucleósidos y nucleótidos. La hidrólisis tuvo lugar al añadir HCl hasta una concentración final 0,5 N (59) y calentar a 100°C durante 1 hora. El TCA se eliminó extrayendo varias veces con éter etílico. Después de concentrar a sequedad al vacío y en frío se cromatografió el producto de la hidrólisis.

Cuando se estudió la incorporación de adenina-8-C¹⁴ previo a la extracción con TCA en caliente, se hizo una extracción de los nucleótidos libres que en las experiencias restantes formaron parte de la fracción ácidos nucleicos. Para lograrlo se calentó con etanol al 50% durante breves minutos, repitiéndose la operación 2 veces más (60). La hidrólisis con HCl 0,5N se efectuó en las mismas condiciones que en el caso de los ácidos nucleicos.

Preparación. El principal constituyente del resto del residuo eran proteínas que fueron hidrolizadas con HCl 6N en tubos cerrados a la llama, durante unas 15 horas y a 105-108°C (61). Las huminas formadas se eliminaron por centrifugación. La concentración se hizo en frío y al vacío y varias veces se añadió metanol para favorecer la eliminación de HCl. Finalmente se cromatografió.

b) Fraccionamiento de las muestras después de incorporar P^{32} . Una vez obtenidas las muestras fueron lavadas como en a). La primera extracción se hizo con TCA al 10% empleando un agitador que se hallaba en cámara fría a 4°C durante 60 minutos, luego se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 15 minutos a 1°C. Se recogió el sobrenadante, repitiéndose otras 2 veces la extracción del residuo. El volumen total del sobrenadante era de 10 ml y se guardó congelado para evitar posterior hidrólisis. El contenido total de fósforo de esta fracción se llamó fósforo ácido soluble ($P_{A.S.}$) y estaba constituido principalmente por ortofosfato (P_I), fósforo hidrolizable 7 minutos de la fracción ácido soluble ($P_{7'A.S.}$) y fósforo orgánico (P_O). El residuo estaba constituido desde el punto de vista del contenido en fósforo por: fosfolípidos (P_L), ácidos nucleicos (P_N) y fósforo residual (P_R).

Dosaje del fósforo. De acuerdo a las fracciones consideradas en cada oportunidad se utilizaron dos métodos: el de Fiske y Subbarow (62) previa destrucción de materia orgánica y el de Ernster y col. (63) que permitía la determinación de la radiactividad sobre una alícuota del fósforo extraído con la mezcla de isobutanol-benceno.

Fósforo total (P_T). El fósforo se valoró sobre la suspensión de células en TCA al 10% por el método de Fiske y Subbarow y la radiactividad sobre una alícuota de la misma.

Fósforo ácido soluble total ($P_{A.S.}$). Se trabajó en iguales condiciones que para el fósforo total, sobre el sobrenadante de extraer con TCA al 10% en frío.

Fósforo inorgánico (P_I). Se empleó el método de Ernster, determinándose el fósforo y la radiactividad sobre alícuotas del extracto isobutanol-benceno.

Fósforo hidrolizable 7 minutos del ácido soluble total ($P_{7'A.S.}$). A una porción de lo extraído con TCA se añadió H_2SO_4 10N hasta lograr una concentración del ácido 1N, se llevó a baño maría hirviendo durante 7 minutos. Después de enfriar hasta temperatura ambiente se dosó el fósforo por el método de Ernster. Los resultados incluían el P_I por lo que el $P_{7'A.S.}$ fue consecuencia

oía de la diferencia entre el resultado obtenido y el P_I .

Fósforo orgánico (P_C). Se obtiene por diferencia entre $P_{A.S.}$ y la suma de P_I y $P_{7'A.S.}$.

Fósforo de lípidos (P_L). Esta fracción se consiguió después de tratar el residuo con la mezcla de Bloor (3 partes de etanol por 1 de éter) en un baño maría a 50°C durante 15 minutos. La radiactividad se valoró sobre una parte del sobrenadante y el fósforo por Fiske y Subbarow, previa destrucción de materia orgánica sobre el residuo resultante de evaporar la mezcla de solventes.

Fósforo de ácidos nucleicos (P_N). Después de extraer los lípidos, se obtuvieron los ácidos nucleicos por extracción con solución de NaCl 10% en baño maría hirviendo durante 60 minutos, agitando a intervalos con varilla de vidrio (64). El mismo procedimiento se repitió 2 veces más. Se midió la radiactividad y el contenido de fósforo mediante el método de Fiske y Subbarow. Como estas determinaciones llevaban involucradas una cierta cantidad de fósforo correspondiente a una fracción hidrolizable a los 7 minutos del ácido insoluble ($P_{7'A.I.}$), los valores de fósforo de ácidos nucleicos fueron producto de la diferencia entre los primeros resultados y $P_{7'A.I.}$.

Fósforo residual (P_R). El remanente del insoluble contenía principalmente proteínas. Previa preparación de una suspensión acuosa, se determinaba la radiactividad de una alícuota y en otra se valoraba el contenido de fósforo por el método de Fiske y Subbarow, previa destrucción de materia orgánica.

Técnicas para cromatografía sobre papel

Para sustancias solubles en metanol-agua y productos de la hidrólisis de proteínas. En estos casos las cromatografías fueron bidimensionales y descendentes según Benson y col. (65) sobre hojas de papel Whatman N°4 que fueron tratadas previamente con una solución de ácido oxálico al 10% para complejar la probable presencia de metales, luego se lavaron hasta eliminación total del ácido oxálico y finalmente fueron secadas bajo una corriente de aire. En el sentido longitudinal se utilizó el sistema fenol-agua destilada durante 10-12 horas y una vez eliminados los solventes se empleó en el otro el sistema butanol-ácido propiónico-agua destilada durante unas 8 horas. Más adelante las cromatografías fueron radioautografiadas al ponerse en contacto con placas radiográficas de 35,6 x 43,2 cm durante un

mes aproximadamente. Para la identificación de las manchas se hicieron en primer lugar revelados generales para ubicar los grupos reactivos y después se realizaron cocromatografías con drogas puras, se corrían en varios sistemas de solventes y se sometían a una nueva radioautografía. Para revelar la presencia de aminoácidos se utilizó ninhidrina al 0,1 % en acetona; los ácidos orgánicos con azul de bromo fenol al 0,05% en etanol a pH 4,8; trehalosa con AgNO_3 en acetona y luego NaOH al 0,5% en etanol; las bases y nucleótidos fueron ubicados por su absorción en 260 A con lám para ultravioleta.

Los aminoácidos glicina y serina casi no se separaban la mayor parte de las veces en que aparecían en los cromatogramas, haciéndose difícil la posibilidad de contar la radioactividad de cada una de estas manchas. Para obviar el inconveniente, en los casos que interesaba se eluyeron las manchas correspondientes a las dos sustancias, se recromatografiaron corriendo bidimensionalmente con el mismo sistema de solventes, fenol-agua, y se realizaron radioautografías. Se verificó una separación tal de ambas manchas que permitió el conteo de la radioactividad correspondiente a cada una de ellas.

La identificación de los aminoácidos provenientes de la hidrólisis de las proteínas fue un problema no resuelto ya que su distribución se alteró de tal manera que fue casi imposible orientarse por los resultados anteriores. Se pudo señalar 2 zonas donde los aminoácidos se agruparon principalmente: una cercana al origen y la otra en el extremo opuesto, casi junto a los frentes de solvente. Muy probablemente la cantidad relativamente grande de aminoácidos ejerciera una interacción entre los mismos que modificó notablemente los R_f , al mismo tiempo unas manchas se fraccionarían en varias mientras que otras se verían incluidas entre sí. De todas maneras la cicloheximida inhibió prácticamente en su totalidad la incorporación de sustancia radiactiva a las proteínas.

Para bases, nucleósidos y nucleótidos. Las cromatografías fueron monodimensionales sobre hojas de papel Whatman N°1 sin lavar, de acuerdo a Wyatt (66). El sistema de solventes fue isopropanol libre de peróxidos, HCl (d: 1,19) y agua (68:17,6:14,4) y el tiempo de 36-38 horas. Las manchas se ubicaron con la lámpara ultravioleta y las identificaciones también se hicieron por cocromatografías con sus sustancias patrones.

Medida de la radioactividad. Las alícuotas que se separaban en cada oportunidad para determinar su radioactividad, se colocaron sobre planchetas de aluminio evaporando el medio líquido hasta sequedad con aire caliente y uniformando su distribución con un agitador rotatorio o con una lámpara de in-

frarrojo. Las medidas se efectuaron con un tubo Geiger Müller conectado a un escalímetro decimal. Los valores obtenidos se refirieron siempre a un standard de C^{14} al que se le asignó un valor de 700 cuentas por minuto (cts./min.). Los resultados se expresaron en cts./min./mg de peso seco de células de acuerdo a la fórmula siguiente (56):

$$A \rightarrow \frac{(C_m - C_b) \times 700 \times P_m \times V}{0,81 \times v \times C_{st} \times p \times L}$$

A: cts./min./mg de células; C : cts./min. de la muestra; C_b : cts./min. del blanco; P : peso de la suspensión de células de levadura en la mezcla metanol-agua 90%; V: volumen total de la mezcla de incubación; 0,81; peso específico de la mezcla metanol-agua; v: volumen de la alícuota tomada para medir la radiactividad; C_{st} : actividad hallada con standard C^{14} ; p: peso de la muestra de suspensión de levadura recogida; L: peso seco total en mg de las células de levadura empleadas en el experimento. En todas las oportunidades las determinaciones se hicieron por duplicado, promediándose los resultados.

Para medir la radiactividad del anhídrido carbónico desprendido que se marcó con C^{14} durante los experimentos, éste se fijó sobre el álcali de la copa central de los vasos de Warburg precipitándose como $BaCO_3$ mediante el agregado de 1 ml de NH_4Cl 1N y 1 ml de $BaCl_2$ 1M(56). El precipitado se depositó sobre un papel de filtro Schleicher y Schull 589 previamente pesado y cuyo diámetro era el de la plancheta de alumnio sobre la cual se apoyó para introducirlo bajo el tubo Geiger Müller. La filtración se hizo empleando un filtro adecuado para tal finalidad. Las actividades se expresaron como cts./min. y las actividades específicas como cts./min./mg de $BaCO_3$. Como el espesor de la capa de $BaCO_3$ retenido por el papel de filtro absorbía una cierta cantidad de radiactividad, los valores obtenidos se corrigieron de acuerdo a una escala construida previamente.

Las áreas radiactivas localizadas en las cromatografías bidimensionales se contaron con un tubo Geiger Müller tipo Scott apoyado directamente sobre el papel. Los resultados se expresaron en porcentaje de cada una de las manchas en relación con la radiactividad total distribuida sobre el cromatograma y también como radiactividad de cada una de esas manchas por mg de células de levadura.

En el caso de las cromatografías monodimensionales las áreas radiactivas se midieron mediante el empleo de un tubo Geiger conectado a un integrador Tracerlab SC-79 al que se le acopló un registrador que inscribió la intensidad y dimensiones de las manchas sobre una carta de papel.

Quando se trabajó con P^{32} la radiactividad se refirió al tiempo 0 ya que la vida media de este elemento es de 14,3 días.

Técnicas para romper las células de levadura.

Debido a las dificultades en algunos casos y al escaso rendimiento de las fracciones libres de células en otros, se aplicaron varios procedimientos con intención de subsanar los inconvenientes.

1) Se homogeneizó la pasta de levadura con 3 veces su peso en perlas de vidrio y un volumen del medio de Chao-Schachman (67) ($2,5 \times 10^{-3}$ M K_2HPO_4 , $2,5 \times 10^{-3}$ M KH_2PO_4 y $7,5 \times 10^{-4}$ $CaCl_2$) utilizando un homogeneizador Virtis 45 enfriado con hielo y a su velocidad máxima durante 3 períodos de 5 minutos con intervalos entre sí de 3 minutos. A partir de esta etapa las operaciones restantes se efectuaron a 0°C. Un volumen del medio Chao-Schachman se usó para transferir la preparación a los tubos de centrifuga, centrifugándose a $1.500 \times g$ por 5 minutos. Las perlas de vidrio se lavaron 3 veces con un volumen del mismo medio. Todas las fracciones de los sobrenadantes se combinaron para su posterior tratamiento.

2) En este caso se utilizó polvo de cuarzo y el homogeneizado se hizo a mano en mortero de ágata a 4°C durante unos 20 minutos. La extracción con el medio de Chao-Schachman y la centrifugación se realizaron igual que en el procedimiento anterior.

3) Se preparó polvo acetónico de células de levadura de acuerdo al método empleado por Albert, Buchner y Rapp, modificado por Stoppani y Milstein (68). Los pasos seguidos fueron: suspensión en acetona destilada fría en relación aproximada de 300 ml por cada 100 g de pasta de levadura, agitación en un homogeneizador durante 1 minuto, se filtró la suspensión por succión en un embudo de Buchner enfriado, se repitió el tratamiento con acetona 2 veces más y luego se lavó con éter etílico libre de peróxidos, se extendió la levadura así tratada sobre una hoja de papel de filtro secándose bajo una corriente de aire. Se guardó al vacío a -5°C. El polvo acetónico de levadura se extraía con el medio de Chao-Schachman por agitación durante 2 horas, se centrifugaba y el sobrenadante se reunía con el producto de extraer durante otras 2 horas más la misma masa de

levadura. Los sobrenadantes sufrieron más adelante otros fraccionamientos.

Preparación directa de ácido ribonucleico de bajo peso molecular (S-RNA).

Para esta preparación se aplicó con algunas modificaciones el método descrito por Monier, Stephenson y Zamecnik (69), a su vez basado en el de Kirby (70). Aproximadamente 100 g de pasta de levadura fresca producida por un cultivo de la cepa estudiada de Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus durante 14-16 horas, se lavó 2 veces con agua destilada helada y se suspendió en 200 ml de agua destilada. A esta mezcla se añadió 300 ml de fenol-agua 90% (p/p) agitándose durante 2 horas en un agitador mecánico a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a $16.300 \times g$ en centrífuga Servall SS-1 a $0^{\circ}C$ durante 30 minutos (71). Se extrajo la capa acuosa pipeteando y se repitió la extracción de la fase remanente con 300 ml de agua agitando durante 1 hora. Reunidas las 2 capas acuosas, el total se centrifugó a $16.300 \times g$ a $0^{\circ}C$ durante 30 minutos. Se añadió 0,1 volumen de acetato de potasio al 2% y 2 volúmenes de etanol precipitando el RNA crudo después de permanecer a $-5^{\circ}C$ durante 16-18 horas. El precipitado se disolvió en unos 40 ml de agua y si después de dejar en reposo a $0^{\circ}C$ por 10 minutos aparecía un precipitado se eliminaba centrifugando 10 minutos a $25.000 \times g$ a $0^{\circ}C$. A partir de esta operación las restantes se mantuvieron a $0^{\circ}C$. El sobrenadante se agitaba durante 20 minutos con 1 g de carbón Acticarbón SML 50 lavado con ácido de acuerdo a la técnica descrita por Smith (72). El carbón era separado por centrifugación a alta velocidad y posteriormente lavado con 5 ml de agua. El RNA presente en las 2 porciones de agua reunidas fue vuelto a precipitar con 0,1 volumen de acetato de potasio 20% y 2 volúmenes de etanol. El precipitado resultante se disolvió en aproximadamente 17 ml de agua y cualquier resto insoluble se removió por centrifugación. La solución límpida se extrajo 2 veces con 2-metoxietanol para eliminar los polisacáridos que impurifican el RNA, según Kirby (70): la solución acuosa, 1 volumen, se mezcló con igual volumen de K_2HPO_4 2,5 M, 0,05 volúmenes de H_3PO_4 33,3% y 1 volumen de 2-metoxietanol; las capas inferiores y cualquier insoluble se lavaron una vez con una mezcla de 2-metoxietanol-agua- K_2HPO_4 2,5 M- H_3PO_4 33,3% (1:1:1:0,05 partes). Reunidas las capas superiores se eliminó cualquier insoluble por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 1 hora. El RNA presente se volvió a precipitar añadiendo acetato de potasio y etanol. El precipitado se solubilizó en cantidad mínima de agua y luego se dializó en frío durante 24 horas contra agua destilada que por lo menos fue cambiada 3 veces. Se liofilizó y el producto se guardó en congeladora.

Preparación de las enzimas pH 5,0. Para obtener las enzimas pH 5,0 se tuvieron en consideración el método de Monier y col. (69) basado en los desarrollados por el grupo de Zamecnik (73), (74) y (75) y con las modificaciones que se con-

sideraron oportunas: los sobrenadantes que resultaron de extraer las células rotas con el medio de Chao-Schachman primero se centrifugaron a 25.000 x g durante 10 minutos y se descartó el precipitado. La solución límpida se centrifugó durante 3 horas a 105.000 x g en una ultracentrífuga preparativa Spinco. El sobrenadante, de aproximadamente pH 6,5, se llevó a pH 5,0 con ácido acético al 10%. Cerca de los 5 minutos de haberse iniciado la operación el precipitado se recogió por centrifugación a 25.00 x g durante 5 minutos, lavándose una vez con acetato de sodio 0,1M, pH 5,0. El precipitado se suspendió en buffer Tris 0,05M-HCl, pH 7,6 que contenía $MgCl_2$ 0,005M y se ajustó el pH a 7,6 con KOH 1N. Cualquier residuo insoluble se eliminó por centrifugación a 25.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se dializó durante la noche contra buffer Tris 0,05M-HCl pH 7,6 y $MgCl_2$ 0,005M. Si se formaba un precipitado se lo eliminaba por centrifugación. La preparación enzimática resultante se guardaba a $-10^{\circ}C$.

La fracción enzimática pH 5,0 preincubada se preparó según Hecht, Stephen y Zameonik (76) incubando a $37^{\circ}C$ en ausencia de nucleótidos y aminoácidos por 2 veces; la primera durante 30 minutos y la segunda 20 minutos, precipitando con ácido acético al 10%, redisolviendo en buffer Tris 0,05M-HCl pH 7,6 y $MgCl_2$ 0,005M y descartando los insolubles en cada oportunidad.

Preparación de S-RNA. La solución remanente después de precipitarse las enzimas pH 5,0 se lleva a un pH cercano a 6,8 con KOH 0,5N y el S-RNA se extrae con fenol-agua repitiendo a partir de este paso, los efectuados en la preparación directa de S-RNA.

Preparación de RNA ribosomal. El insoluble que se obtuvo después de centrifugar durante 3 horas a 105.00 x g en la preparación de las enzimas pH 5,0, se lavó una vez con el medio de Chao-Schachman, se centrifugó en las condiciones anteriores, se volvió a resuspender en el medio de Chao-Schachman, se trató con fenol-agua y repitieron todo lo realizado en la preparación de S-RNA.

Enriquecimiento de la actividad específica del S-RNA. El S-RNA preparado por extracción fenólica fue tratado con álcali a pH 10 durante 1 hora a $37^{\circ}C$ para remover los aminoácidos esterificados (77).

El dosaje de las proteínas se hizo por el método de Gornal y col. (78) y el de las hidroxilamina para aminoácidos activados según Koningsberger y col. (79).

Incorporación de L-leucina- C^{14} (U) a S-RNA. Las incubaciones se efectuaron a $37^{\circ}C$ durante 20 minutos de acuerdo a las técnicas de Hecht y col. (76) y (80)

que también fueron tenidas en consideración para aislar después el S-RNA re tulado con C^{14} y determinar su radiactividad.

Transferencia de aminoácido desde S-RNA a RNA ribosomal. Esta transferencia se logró mediante incubaciones realizadas a $37^{\circ}C$ durante 20 minutos en un vo lumen final de 1 ml. El método aplicado para las incubaciones y la prepara - ción de las muestras para medir la radiactividad fue el de Hoagland y col. (81), considerando al mismo tiempo las modificaciones introducidas por Hüls - mann y Lipmann (82).

Reactivos: ftalato ácido de potasio, Merck; Acti-dione, The Upjohn Co. Kala - mazoo, Michigan; hidroxilamina, Analar. Hopkin y Williams Ltd.; ácido fosfoe nolpirúvico, Sigma Chemical; kinasa fosfoenolpirúvica, Sigma Chemical; Acti - carbone SML 50, Ceca Argentina; GTP, Sigma Chemical; CTP, Sigma Chemical; ATP, Sigma Chemical; fosfato dibásico de potasio, Merck; fosfato monopotásico, May y Baker Ltd.; cloruro de bario, Riedel-de Haën; ácido 1-2-4-aminonaftolsulfó nico, Rhône-Poulenc; bisulfito de sodio, Merck; sulfito de sodio, Analar. Hop kin y Williams Ltd.; ácido perclórico, Baker; cloruro de sodio, May y Baker Ltd.; acetato de potasio, May y Baker; cloruro estannoso, Merck, ácido tri - cloracético, Merck; Tris (hidroximetil)aminometano, Sigma Chemical; cloruro de magnesio, Merck; 2-metoxietanol, Shell Argentina.

Compuestos radiactivos. Las muestras se prepararon en The Radiochemical Cen - tre (Amersham, Inglaterra). Las actividades específicas de los compuestos u - tilizados fueron: acetato- $2-C^{14}$, 1 mC/16 mg; D-glucosa- $6-C^{14}$, 0,5 mC/4,0 mg; L-valina- $C^{14}(G)$, 0,1 mC/1,5 mg; glicina- $1-C^{14}$, 0,5 mC/10,8 mg; L-ácido glutá mico- $C^{14}(G)$ (como sal monoamónica), 0,1 mC/4,27 mg; L-leucina- $C^{14}(u)$ 0,1 mC/ 0,68 mg; P^{32} , solución en ácido clorhídrico diluido pH 2-3 de ortofosfato li - bre de portador, actividad 10,0 mC; sulfato de adenina- $8-C^{14}$, 1,0 mC/20,1 mg.

Abreviaturas. ATP: adenosina-5'-trifosfato; ADP: adenosina-5'-difosfato; AMP: adenosina-5'-monofosfato; GTP: guanosina-5'-trifosfato; CTP: citidina-5'-tri - fosfato; RNA: ácido ribonucleico; DNA: ácido deoxiribonucleico; PP: pirofos - fato; DNP: difosfopiridin nucleótido; TCA: ácido tricloracético; Tris: tris (hidroximetil)aminometano.

CAPITULO III

EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE EL METABOLISMO DE GLUCIDOS EN LEVADURA

Los múltiples pasos que concatenados entre sí dan lugar a los procesos metabólicos de los organismos vivos, se vieron explicados en diversas oportunidades mediante el empleo de sustancias que los alteraban. Por otra parte el conocimiento de las etapas en que se llevan a cabo la transformación de los variados metabolitos, permite estudiar la acción ejercida por compuestos que perturban—por aumento o disminución e incluso frenando—los procesos vitales de las células. Sumando la aplicación de técnicas modernas se pudo avanzar rápidamente en el dominio del metabolismo celular.

Los procesos respiratorios de los microorganismos son un ejemplo de lo mencionado. Así en la levadura y también en muchos otros organismos se demostró que a través del ciclo de Embden-Meyerhof se inicia la combustión del carbono de los monosacáridos y la obtención de la energía necesaria para los fenómenos esenciales de la vida. Más adelante se evidenció que la respiración de la levadura se completaba mediante el acoplamiento del ciclo del ácido tricarbóxico. Esto había sido cuestionado por su descubridor en los tejidos animales (83), pero en los últimos años De Moss y Swim (84), Stoppani y col. (85, 56 y 86) y el resumen de Kornberg (87) confirmaron la existencia del ciclo del ácido cítrico como etapa final en la respiración de la levadura.

La glucosa es oxidada a través del ciclo de Embden-Meyerhof hasta ácido pirúvico, el que se descarboxila y como acetyl-CoA entra en el ciclo del ácido tricarbóxico hasta completar su oxidación a CO_2 y H_2O . Estos estudios se hicieron analizando los compuestos intermedios que se forman, marcando estas sustancias con isótopos radiactivos y observando el orden en el cual se realizaba y la posición de los elementos rotulados dentro de la molécula y por último demostrando la presencia de las enzimas activantes de cada uno de los pasos cumplidos.

Además de la importancia del ciclo en la oxidación terminal de las células de levadura, se verificó que actuando en el sentido opuesto (88 y 56), (89) se provoca la formación de los esqueletos carbonados de los compuestos intermedios del ciclo del ácido cítrico, participando así en la síntesis de hidratos de carbono y proteínas.

Consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno que células de levadura ayunada provocan por oxidación de acetato en un experimento y de glucosa en otro se ve afectado por concentraciones de cicloheximida que ejercen una mayor acción cuando se aumenta la cantidad de antibiótico. En la zona donde la levadura se frena en su crecimiento con la mínima concentración del inhibidor

(1-2,5 $\mu\text{g/ml}$), el consumo de oxígeno disminuye en un 20% aproximadamente y en alrededor de 1/3 con 10,0 $\mu\text{g/ml}$. El fenómeno es similar con ambos sustratos. Los cocientes respiratorios guardan igual relación.

Estudiando los procesos respiratorios bajo el punto de vista del desprendimiento de anhídrido carbónico que se fijó como BaCO_3 , se ve que este fenómeno se altera por presencia del antibiótico en las mismas proporciones que ocurre con el consumo de oxígeno (ver Figuras III-I y III-2 y Tabla III-I).

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de C^{14} .

a) Por oxidación de acetato-2- C^{14} . La incorporación de C^{14} a las células totales disminuye a cerca de la mitad cuando se trata con la concentración mínima inhibitoria del antibiótico o más. Pero como la radiactividad presente en la fracción metanol-agua se mantiene casi en el mismo nivel, ligeramente mayor con concentraciones bajas de cicloheximida y menor en el caso inverso, la fracción insoluble es la que incorpora menos C^{14} por acción del agente antifúngico. El C^{14} correspondiente al anhídrido carbónico desprendido disminuyó por presencia de cicloheximida en relación semejante a la cantidad de BaCO_3 obtenida, por lo que se determinó que su actividad específica casi no se afectó. Para concentraciones de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de inhibidor se alteró en menos de un 10%.

b) Por oxidación de D-glucosa-6- C^{14} . La incorporación del C^{14} a las células totales disminuye a cerca de la mitad cuando son tratadas con cicloheximida en diversas concentraciones, pero en cambio la fracción que contiene las sustancias solubles en metanol-agua incorpora hasta un 50% más de C^{14} en presencia del antibiótico, por lo que la fracción insoluble es la más afectada. El C^{14}O_2 producido se reduce gradualmente hasta la mitad con cantidades crecientes del inhibidor, pero la actividad específica se afecta entre 1/4 y 1/3 con respecto al testigo.

Diferencias en la incorporación de C^{14} de acuerdo a los sustratos. Si bien en ambos casos la cantidad de sustrato radiactivo es la misma (5 μC) y la concentración de acetato es el doble que la de glucosa (30 y 15 μM respectivamente) por tenerse en cuenta que esa es la relación en los procesos de oxidación, se observaron diferencias cuantitativas en el proceso metabólico del C^{14} . Mientras que los metabolitos solubles en metanol incorporan en los testigos prácticamente la misma radiactividad, el insoluble marcado con acetato-2- C^{14} fija la mitad de C^{14} en relación con el que incorpora glucosa-6- C^{14} . En cambio el C^{14} fijado como BaCO_3 es el doble cuando se opera con acetato.

Tabla III-1. Acción de cicloheximida sobre la incorporación de acetato-2-C¹⁴ y D-glucosa-6-C¹⁴ por *S cerevisiae* 4,95 mg de levadura ayunada suspendida en 50 μ M de buffer ftalato pH 4,5; 30 μ M de acetato-2-C¹⁴ (5 μ C) o 15 μ M de D-glucosa-6-C¹⁴ (5 μ C); concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10,0 μ g/ml; incubadas en vasos de Warburg con 0,25 ml / NaOH 5N en la copa central y volumen final 3 ml; aire en la fase gaseosa; 30°C; 90 min. de incubación. El C¹⁴ incorporado se expresa en (cts/min/mg cél.) $\times 10^3$; C¹⁴ total en BaCO₃ en (cts/min) $\times 10^3$ y su actividad específica en (cts/min/mg BaCO₃) $\times 10^3$.

Glucosa (μ M)	Acetato (μ M)	Cicloheximida (μ g/ml)	Consumo de O ₂ (μ l)	Q _{O₂}	C ¹⁴ incorporado Total Metanol- Soluble	BaCO ₃ (mg ³)	C ¹⁴ en BaCO ₃ Total Específico
-	30	0	610	67,5	5,35	6,0	186,1
-	30	0,5	515	59,0	7,69	5,5	171,5
-	30	1,0	608	56,5	7,07	4,7	148,0
-	30	2,5	385	49,1	5,62	5,0	149,8
-	30	5,0	478	58,6	4,38	4,6	129,4
-	30	10,0	437	52,5	3,88	3,9	112,4
15	-	0	545	76,8	6,24	5,4	83,6
15	-	0,5	504	66,6	7,05	5,1	73,5
15	-	1,0	484	61,4	10,07	4,9	66,7
15	-	2,5	440	60,6	8,55	4,5	56,9
15	-	5,0	401	56,5	9,70	3,7	45,5
15	-	10,0	374	44,5	10,64	3,7	38,4

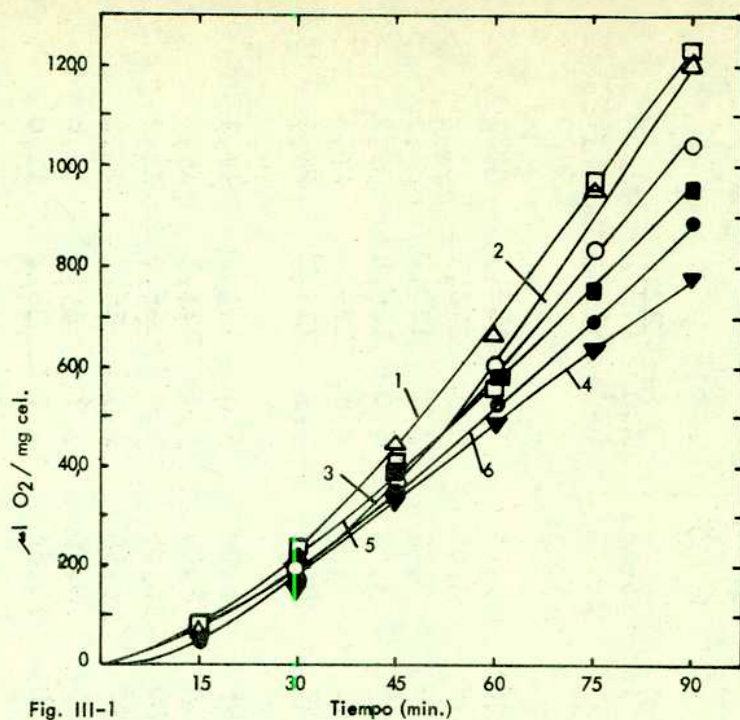


Fig. III-1

Efecto de la cicloheximida sobre el consumo de oxígeno durante la oxidación de glucosa por *S. cerevisiae*. Condiciones experimentales descritas en Tabla III-1. 1, 0; 2, 0,1; 3, 1,0; 4, 2,5; 5, 5,0; 6, 10,0 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida.

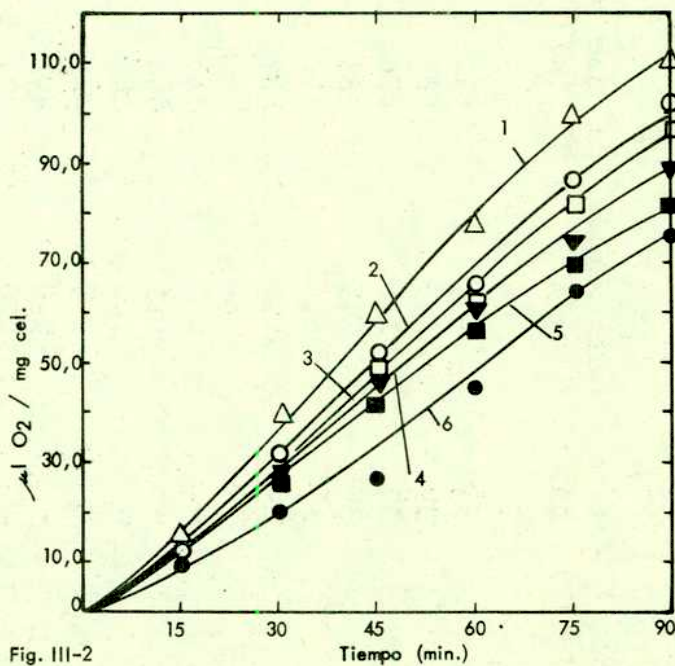


Fig. III-2

Efecto de la cicloheximida sobre el consumo de oxígeno durante la oxidación de acetato por *S. cerevisiae*. Condiciones experimentales descritas en Tabla III-1. 1, 0; 2, 0,1; 3, 1,0; 4, 2,5; 5, 5,0; 6, 10,0 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida.

La no marcación de las proteínas insolubles después que se oxidó acetato- C^{14} , Stoppani, Ramos y de Favelukes (86) y Kornberg y Krebs (87) permite señalar que la glucosa-6- C^{14} se incorpora en los polisacáridos en la relación 2:1 con respecto al acetato-2- C^{14} y que este último sustrato mantiene la proporción mencionada en la oxidación terminal.

Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en los metabolitos solubles en metanol-agua.

a) Por oxidación de acetato-2- C^{14} . Esta fracción que casi no modificó la incorporación de C^{14} por acción del antibiótico, sufre su mayor efecto en la distribución del C^{14} . Este fenómeno ya se nota con la concentración más baja del inhibidor utilizada en las experiencias. El ácido glutámico pasó de 35% a 50 en presencia de 0,1 μ g de cicloheximida/ml y a alrededor de 55% con las concentraciones mayores; en cambio la trehalosa fue de 30% a 10 y después a 5. Bajó el porcentaje de ácido aspártico: de 9 a 3,5%. Los aminoácidos glicina y serina que sumados representaban 0,3% de la radiactividad, a causa del antibiótico sufrió un férte incremento: alrededor de un 4% que se repartió en partes iguales entre las 2 sustancias. La totalidad de los ácidos orgánicos intermediarios del ciclo de Krebs aumentaron de 3 a 7%. La glutamina pasó de 6% a alrededor de 7% por acción de 0,1 y 1,0 μ g/ml de cicloheximida para bajar a menos de 3% con 2,5; 5,0 y 10,0 μ g/ml del inhibidor. Para Coursen y Sisler (45) se suprimía completamente la rotulación de la glutamina por concentraciones similares del antibiótico sobre una cepa de *S. pastorianus*. El resto de los metabolitos mantienen su marcación por C^{14} dentro de los mismos niveles que los testigos (ver Tabla III-2 y Figura III-3).

Es interesante observar las relaciones que se establecen entre la radiactividad del ácido glutámico, aminoácido que incorpora la mayor proporción de C^{14} , y la radiactividad que manifiestan otros metabolitos metanol-agua solubles como el ácido aspártico, glutamina, trehalosa y glicina-serina (Tabla III-4).

b) Por oxidación de D-glucosa-6- C^{14} . El ácido glutámico que incorporaba 30% de la radiactividad total presente en la fracción metanol soluble del testigo pasó a 50% ya desde la concentración más baja de cicloheximida. La trehalosa que contaba casi con el 50% de la marcación bajó a alrededor del 20%. El ácido aspártico fue de 4 a 2%. Glicina y serina que en ausencia de inhibidor sumados incorporaron 0,6%, por acción del antibiótico llegaron a cerca del 3%. Los ácidos intermediarios del ciclo de Krebs se rotularon aproximadamente en el testigo en un 3%, con concentraciones de ciclohexi -

Tabla III-3. Acción de la cicloheximida sobre la distribución de 14 C Incremento por oxidación de D-glucosa-6-C en *S. cerevisiae*. Después de incubar según Tabla III-1, las células fueron lavadas y extraídas con metanol, cromatografiándose el sobrenadante. De acuerdo a la concentración de cicloheximida en μ g/ml se numeraron las columnas: $\bar{1}$:0; $\bar{2}$:0,1; $\bar{3}$:1,0; $\bar{4}$:2,5; $\bar{5}$:5,0; $\bar{6}$:10,0. Los valores se agrupan en: $\bar{1}$: radiactividad relativa; $\bar{2}$: radiactividad en cts/min/mg cél.

Sustancia	$\bar{1}$	A.E.	$\bar{2}$	A.E.	$\bar{3}$	A.E.	$\bar{4}$	A.E.	$\bar{5}$	A.E.	$\bar{6}$	A.E.
Aminoácidos:												
Acido aspártico	4,15	258	1,98	140	2,10	211	1,93	165	1,55	149	2,57	273
Acido glutámico	29,35	1.830	49,70	3.500	49,95	5.010	50,55	4.320	54,22	5.200	51,40	9.460
Cisteína	0,84	52	0,98	69	0,48	48	1,08	93	0,26	25	0,60	64
Serina-Glicina	0,64	40	1,80	127	2,76	277	2,98	254	2,15	206	4,42	470
Glutamina	3,19	199	5,22	367	4,86	488	1,33	141	1,50	144	1,33	141
Treonina	0,60	37	0,88	48	0,76	73	0,29	25	0,31	30	0,68	72
Alanina	1,41	68	2,30	162	3,65	368	3,14	268	2,29	220	4,26	453
Tirosina	0,37	25	1,01	113	1,84	185	1,46	126	1,20	115	1,30	138
Prolina	0,56	35	0,81	57	1,07	107	0,96	82	0,75	72	0,73	78
Valina	0,90	56	1,97	139	2,55	256	2,68	229	4,02	384	2,05	218
Leucina-Isoleucina	2,02	126	1,35	95	1,03	103	1,02	87	0,83	80	2,91	309
Gonitina-Histidina-Lisina	1,36	85	1,30	91	1,95	196	1,60	154	1,18	113	0,87	93
Acidox- ϵ -diaminoplaióico?	0,20	12	0,46	34	0,64	64	1,14	97	0,50	48	0,66	61
Ácidos orgánicos:												
Cítrico	0,16	11	0,46	32	0,32	32	0,34	29	0,35	34	0,27	29
Málico	1,43	83	3,02	212	2,15	216	3,45	295	1,69	165	1,64	175
Fumárico	0,40	25	0,77	54	0,62	62	0,57	49	0,25	24	0,50	53
Succínico	0,78	49	0,86	61	1,57	157	1,22	104	0,59	57	0,79	84
Láctico	0,50	31	1,71	120	1,08	108	0,95	81	0,67	63	0,36	38
Disacárido:												
Trehalosa	48,90	3.050	19,90	1.400	17,07	1.715	17,59	1.509	22,15	2.130	20,78	2.210
No Identificados	3,90	244	6,44	453	6,62	665	8,25	704	5,05	489	3,33	354

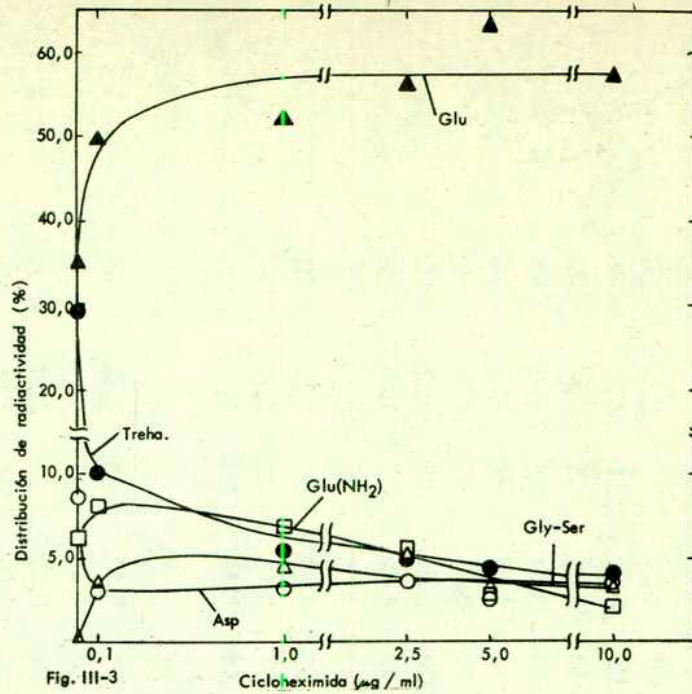


Fig. III-3 Efecto de la cicloheximida sobre la distribución relativa de C¹⁴ durante la oxidación de acetato-2-C¹⁴ por *S. cerevisiae*. Condiciones experimentales descritas en Tabla III-2. Glu, ácido glutámico; Treha, trehalosa; Asp, ácido aspártico; Glu(NH₂), glutamina; Gly-Ser, glicina-serina.

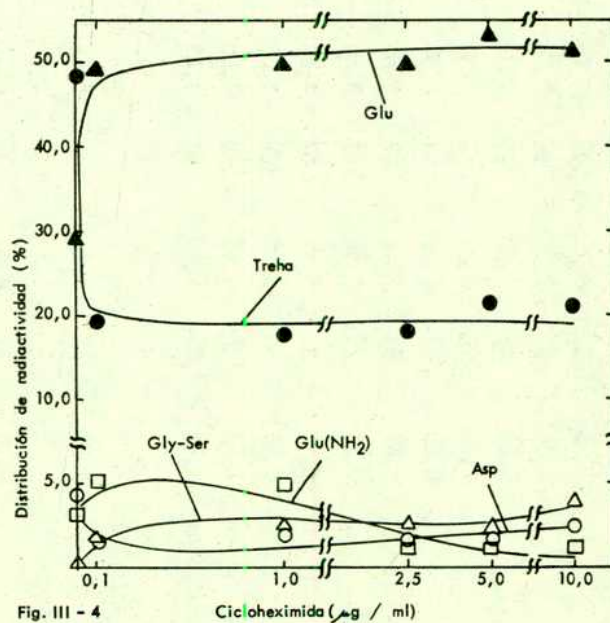


Fig. III-4 Efecto de la cicloheximida sobre la distribución relativa del C¹⁴ durante la oxidación de D-glucosa-6-C¹⁴ por *S. cerevisiae*. Condiciones experimentales descritas en Tabla III-3. Glu, ácido glutámico; Treha, trehalosa; Asp, ácido aspártico; Glu(NH₂), glutamina; Gly-Ser, glicina-serina.

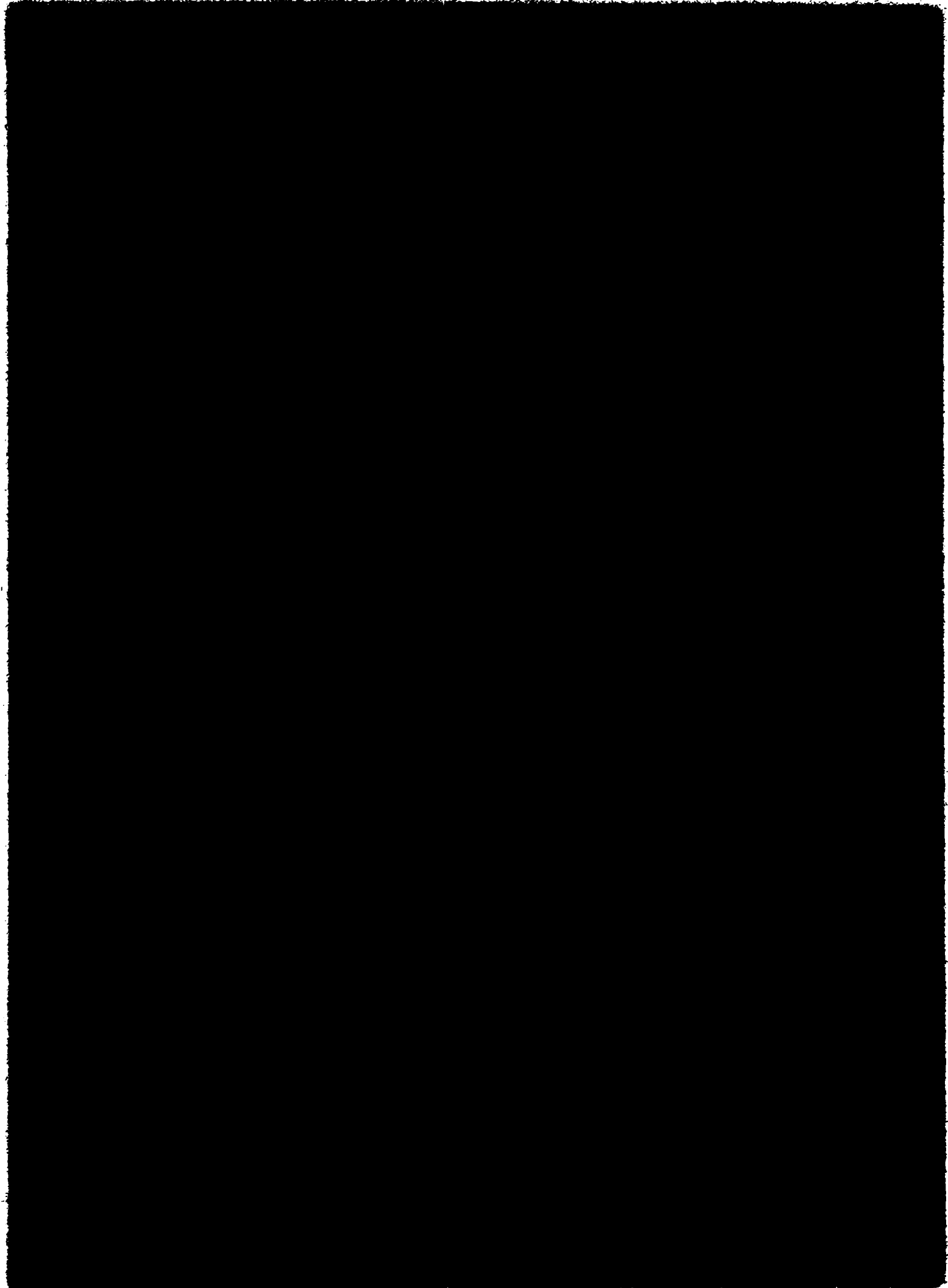
mida hasta 2,5 $\mu\text{g/ml}$ duplicaron su contenido en C^{14} y con 5,0 y 10,0 $\mu\text{g/ml}$ del inhibidor retrocedieron a los valores del testigo. Nuevamente la glutamina con 3% de incorporación en la incubación sin el agente antifúngico, aumentó ligeramente con concentraciones bajas de cicloheximida, 0,1 y 1,0 $\mu\text{g/ml}$, para luego disminuir a 1,3% con las cantidades mayores. Aquí la alanina incorpora aproximadamente el doble de radiactividad cuando las células son tratadas con el antibiótico, siendo 1,4% el valor del testigo; esta alteración no se manifestó cuando las incubaciones se hicieron oxidando acetato-2- C^{14} . Fenómeno semejante al caso de la alanina se pudo observar con tirosina y valina. Ver Tabla III-3 y Figura III-4. Las relaciones entre la incorporación de ácido glutámico y ácido aspártico, glutamina, trehalosa y glicina-serina y el efecto de diversas concentraciones de cicloheximida se pueden observar en la Tabla III-5.

Tabla III-4. Relación de la radioactividad total entre el ácido glutámico y ácido aspártico, glutamina, trehalosa y glicina-serina después de la oxidación de acetato-¹⁴C en presencia de diversas concentraciones de células viables. Las cifras representan cts/ min/mg de células para cada sustancia y entre paréntesis los valores de los experimentos. Condiciones experimentales descritas en Tabla III-2. Las columnas se numeraron de acuerdo a la concentración del antibiótico (µg/ml): 1:0; 2:0,1; 3:1,0; 4:2,5; 5:5,0; 6:10,0.

	1	2	3	4	5	6
Glutámico	$\frac{1.900(4,0)}{451}$	$\frac{3.840(14,5)}{266}$	$\frac{3.710(15,5)}{240}$	$\frac{3.140(14,3)}{220}$	$\frac{2.830(23,2)}{117}$	$\frac{2.190(15,6)}{140}$
Aspártico						
Glutámico	$\frac{1.800(5,7)}{318}$	$\frac{3.840(6,8)}{561}$	$\frac{3.710(7,7)}{484}$	$\frac{3.140(10,8)}{290}$	$\frac{2830(23,2)}{122}$	$\frac{2.190(24,8)}{88}$
Glutamina						
Glutámico	$\frac{1.800(1,2)}{1.505}$	$\frac{3.840(5,0)}{770}$	$\frac{3.710(9,5)}{391}$	$\frac{3.140(10,8)}{206}$	$\frac{2.830(14,5)}{105}$	$\frac{2.190(14,6)}{150}$
Trehalosa						
Glutámico	$\frac{1.800(128,7)}{14}$	$\frac{3.840(13,5)}{284}$	$\frac{3.710(11,2)}{332}$	$\frac{3.140(10,9)}{288}$	$\frac{2.830(18,3)}{155}$	$\frac{2.190(16,2)}{135}$
Glicina-Serina						

Tabla III-5. Relación de la radioactividad total entre el ácido glutámico y ácido aspártico, Glutamina, trehalosa y glicina-serina después de la oxidación de D-glucosa-6-C¹⁴ en presencia de diversas concentraciones de cicloheximida. Las cifras representan cts/min/mg de células para cada sustancia y entre paréntesis los valores de los cuocientes. Condiciones experimentales descriptas en Tabla III-3. Las columnas se numeraron de acuerdo a la concentración del antibiótico (µg/ml): 1:0; 2:0,1; 3:1,0; 4:2,5; 5:5,0; 6:10,0.

	1	2	3	4	5	6
<u>Glutámico</u>	$\frac{1.830}{258}(7,1)$	$\frac{3.500}{140}(25,0)$	$\frac{5.020}{211}(23,8)$	$\frac{4.320}{165}(26,2)$	$\frac{5.200}{149}(35,0)$	$\frac{5.460}{273}(20,0)$
<u>Aspártico</u>						
<u>Glutámico</u>	$\frac{1.830}{199}(9,2)$	$\frac{3.500}{367}(9,5)$	$\frac{5.010}{488}(10,3)$	$\frac{4.320}{141}(30,6)$	$\frac{5.200}{144}(36,2)$	$\frac{5.460}{141}(38,8)$
<u>Glutamina</u>						
<u>Glutámico</u>	$\frac{1.830}{3.050}(0,60)$	$\frac{3.500}{1.400}(2,5)$	$\frac{5.010}{1.715}(2,9)$	$\frac{4.320}{1.500}(2,9)$	$\frac{5.200}{2.130}(2,5)$	$\frac{5.460}{2.210}(2,5)$
<u>Trehalosa</u>						
<u>Glutámico</u>	$\frac{1.830}{40}(45,8)$	$\frac{3.500}{127}(27,6)$	$\frac{5.010}{277}(18,1)$	$\frac{4.320}{254}(17,0)$	$\frac{5.200}{206}(25,2)$	$\frac{5.460}{470}(11,6)$
<u>Glicina-Serina</u>						



CAPITULO IV

EFFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE EL METABOLISMO DE FOSFATO EN LEVADURA

En un trabajo aparecido hace ya años, Hevesy y col. (90) observaron que la levadura no diferencia entre el P^{31} y P^{32} , que su incorporación en la célula proliferativa requiere el consumo de un azúcar y que es bloqueada por bajas temperaturas.

Schmidt y col. (91) (92) señalaron que para la absorción de fosfato es necesaria la presencia de cationes, especialmente potasio.

Kamen y Spiegelman (93) encontraron que el consumo de fosfato está unido a reacciones generales de glucólisis y que la inhibición de su incorporación por ciertos agentes debe estar conectada con su propiedad de desacoplar las etapas oxidativas de las etapas fosforilativas asociadas.

Goodman y Rothstein (94) determinaron que la ausencia de un sustrato exógeno provocaba un intercambio de fosfato celular y extracelular muy lento. Sin embargo, el fosfato extracelular puede distribuirse en el espacio de la pared celular y durante el metabolismo de azúcares ser transportado activamente al interior de la célula de levadura por un mecanismo que incluye reacciones de glucólisis. El movimiento realizado en este sentido llega a cumplirse contra un gradiente de concentración de 100 a 1. El pH óptimo para el consumo de fosfato de 6,5 es corrido hacia el lado ácido por los cationes potasio.

Es de interés el efecto de las sales de amonio sobre la incorporación de P^{32} .

El suministro de iones amonio como sulfato en una cantidad correspondiente al 50% del contenido del nitrógeno proteico de la levadura cantidad suficiente para permitir la asimilación pero no la división celular permitió a Juni y col. (95) (96) observar que el aumento de las actividades específicas del P^{32} incorporado en las diversas fracciones era aproximadamente de 4 veces.

Holzer (97) (98) sintetiza sus observaciones referentes a los efectos producidos por los iones amonio sobre células de levadura que se encuentran oxidando glucosa, estableciendo que se modifican las concentraciones de diversos metabolitos, condicionando la activación del ciclo de las pentosas fosfato (99) (100). Disminuyen: α -cetoglutarato y glucosa-6-fosfato y se incrementan: fosfato, fructosa-1,6-difosfato, ácido glucónico-6-fosfato y trifosfopiridin nucleótido (TPN) oxidado, siendo la presencia de éste últi

mo factor limitante del ciclo de las pentosas fosfato.

Efecto de cicloheximida sobre la incorporación de P^{32}

a) Por células proliferativas. Se realizan estudios cinéticos para observar la acción del antibiótico, para lo cual se toman alícuotas de los cultivos durante 2 horas, se fraccionan a cada una de ellas, dosando el contenido en fósforo y la radiactividad de las mismas. En líneas generales se puede decir que el fósforo dosado químicamente no se altera o aumenta muy ligeramente en presencia de cicloheximida, en cambio la radiactividad de las muestras se ven incrementadas por acción del inhibidor en la zona que corresponde a su mínima concentración inhibitoria.

Si denominamos actividad específica de una muestra a la relación establecida entre su radiactividad expresada en cts/min/mg cél. y la cantidad de fósforo ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cél.) de la misma, se observa que: en los 12 primeros minutos la actividad específica de la fracción P_T se incrementa en más de 4 veces por efecto del antibiótico; en los tiempos posteriores va aumentando en una mayor proporción la radiactividad de las muestras testigo hasta alcanzar al final de las 2 horas de cultivo una actividad específica que es la mitad de la obtenida por presencia de cicloheximida. Efecto análogo se determina en la fracción $P_{A.S.}$. En la fracción P_I hay algunas modificaciones: la radiactividad de las muestras testigo se cuadruplican en las 2 horas y la de las muestras tratadas con antibiótico, si bien es 5 veces mayor que sin inhibidor en el primer tiempo, sólo aumenta un 10% en las 2 horas; por lo tanto la relación de las actividades específicas del segundo y primero que era de 4,9 en los primeros minutos, disminuyó al 1,5 al cabo de incubar 2 horas. La incorporación de P^{32} en la fracción $P_{7'A.S.}$ recién se evidencia después de los 30 min., es muy baja y se ve incrementada por acción del antibiótico. La radiactividad que asimila la fracción P_0 mantiene la proporción de 1 a 3 durante toda la cinética entre las células no y si tratadas con cicloheximida. Las fracciones ácido insolubles P_N , P_L y P_R incorporan poco P^{32} y que es mayor por efecto del inhibidor. Los valores están registrados en la Tabla IV y Figura 27-1.

b) Por célula en reposo - Las incubaciones se realizan en vasos de Warburg utilizando o no glucosa como sustrato. Aquí los efectos del antibiótico en relación a la incorporación de P^{32} no son tan marcados y en algunos casos opuestos, cuando se comparan con las células proliferativas. El dosaje de fósforo proporciona resultados semejantes a los obtenidos en la cinética.

Si la glucosa se elimina como sustrato, la cicloheximida actúa aumentando la actividad específica en una proporción mucho menor, pero cuando la glucosa participa en las incubaciones, los resultados se modifican en parte. La

incorporación de radiactividad en la fracción P_T es ligeramente mayor en las células tratadas, ocurriendo lo mismo en la fracción $P_{7'A.S.}$. El efecto es contrario en las fracciones $P_{A.S.}$, P_I y P_O . Ver Tabla IV-2.

Efecto de cicloheximida sobre la distribución de P^{32}

Sin glucosa como sustrato - Después de incubarse sin glucosa las células de levadura que previamente fueron ayunadas en P^{32} se observa una disminución en el contenido de fósforo dosado químicamente de las fracciones $P_{A.S.}$, P_I y $P_{7'A.S.}$. Seméjante variación sufre el P^{32} de las mismas fracciones, por lo que las actividades específicas de fosfato en las diversas fracciones no modifican sus valores cuando se incuban las células en reposo sin glucosa y en presencia de cicloheximida.

Con glucosa como sustrato - Cuando las incubaciones se realizan colocando glucosa en el medio se observa que el fósforo disminuye en la fracción P_I y aumenta en la fracción $P_{7'A.S.}$ por acción del antibiótico. Igual efecto experimenta el P^{32} de estas fracciones, por lo tanto también en este caso las actividades específicas de fosfato no varían por acción del agente antifúngico. Ver Tabla IV-3.

Tabla IV-1.- Efecto de cicloheximida sobre la incorporación de P^{32} por *S. cerevisiae*. A los 12, 25, 42, 62 y 123 min. se tomaron alícuotas de células proliferativas de levadura cultivadas en erlenmeyers a 30°C, aire en la fase gaseosa, 50 μ de fosfato P^{32} (0,4mC), concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,1; 0,5; 1,0 y 10,0 μ g/ml. Los valores se agruparon en: 1: μ g de P/mg oél. y 2: (cts/min/cél.) $\times 10^3$.

Tiempo (min)	Cicloheximida (μ g/ml)	P _T		P _{A.S.}		P _I		P _{T.A.S.}		P _N		P _L		P _R	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
12	0	19,1	0,30	14,7	0,27	4,1	0,17	3,6	0	1,5	0,01	1,2	0	0,5	0
12	0,1	19,0	0,34	14,4	0,29	4,3	0,24	3,5	0	2,3	0,01	1,4	0	0,5	0
12	0,5	18,7	0,35	13,2	0,33	3,8	0,22	3,6	0	1,9	0,01	1,3	0	0,4	0
12	1,0	19,0	0,53	13,4	0,45	4,2	0,33	3,9	0	2,1	0,02	1,8	0	0,6	0,01
12	10,0	19,3	1,37	14,6	1,26	4,7	0,95	3,9	0	2,5	0,04	1,4	0,02	0,5	0,02
25	0	17,3	0,40	12,8	0,37	3,8	0,26	3,7	0	1,9	0,02	1,2	0	0,5	0
25	0,1	17,9	0,43	13,2	0,39	3,7	0,28	3,7	0	2,3	0,02	1,2	0	0,6	0
25	0,5	18,2	0,43	13,4	0,46	3,8	0,33	3,1	0	2,0	0,04	1,1	0	0,6	0,01
25	1,0	18,5	1,22	13,7	0,79	4,0	0,74	3,1	0	2,2	0,05	1,2	0	0,6	0,03
25	10,0	18,4	1,72	13,4	1,41	3,9	0,96	3,1	0,10	2,2	0,10	1,2	0,03	0,6	0,03
42	0	18,6	0,54	13,7	0,45	3,6	0,34	3,4	0	2,5	0,03	1,2	0	0,6	0,01
42	0,1	19,1	0,64	15,0	0,50	4,0	0,35	3,0	0	2,1	0,03	1,1	0	0,6	0,01
42	0,5	18,9	0,65	14,6	0,56	3,7	0,38	3,5	0	1,5	0,03	1,4	0	0,5	0,02
42	1,0	19,7	1,55	14,4	1,31	3,9	0,94	3,8	0,26	2,4	0,06	1,4	0	0,6	0,03
42	10,0	19,6	2,08	14,5	1,62	3,5	0,88	3,3	0,09	2,2	0,13	1,7	0,03	0,6	0,03
62	0	18,8	0,57	14,1	0,58	3,6	0,38	3,6	0	2,3	0,03	1,1	0	0,6	0,01
62	0,1	18,6	0,70	13,9	0,60	3,6	0,39	3,2	0	2,3	0,04	1,0	0	0,5	0,01
62	0,5	19,7	0,85	14,7	0,68	4,0	0,51	3,8	0	2,8	0,04	1,4	0	0,6	0,02
62	1,0	18,8	1,75	13,8	1,50	4,2	1,47	3,3	0,20	1,9	0,10	1,8	0,02	0,6	0,06
62	10,0	20,0	2,04	14,6	1,66	3,9	0,98	3,6	0,12	2,6	0,15	1,6	0,04	0,7	0,03
123	0	19,0	1,16	13,8	0,97	3,8	0,67	3,4	0,02	2,2	0,04	1,3	0,01	0,6	0,02
123	0,1	19,8	1,14	15,1	0,97	4,2	0,63	3,7	0,06	2,1	0,05	1,3	0,02	0,6	0,03
123	0,5	19,6	1,20	14,9	1,06	4,1	0,68	3,6	0,06	2,3	0,05	1,2	0,02	0,6	0,03
123	1,0	20,6	2,69	15,4	2,20	4,3	0,86	4,2	0,95	2,3	0,20	1,4	0,05	0,6	0,06
123	10,0	21,1	2,79	15,8	2,08	4,3	1,10	4,6	0,15	2,3	0,24	1,6	0,06	0,7	0,05

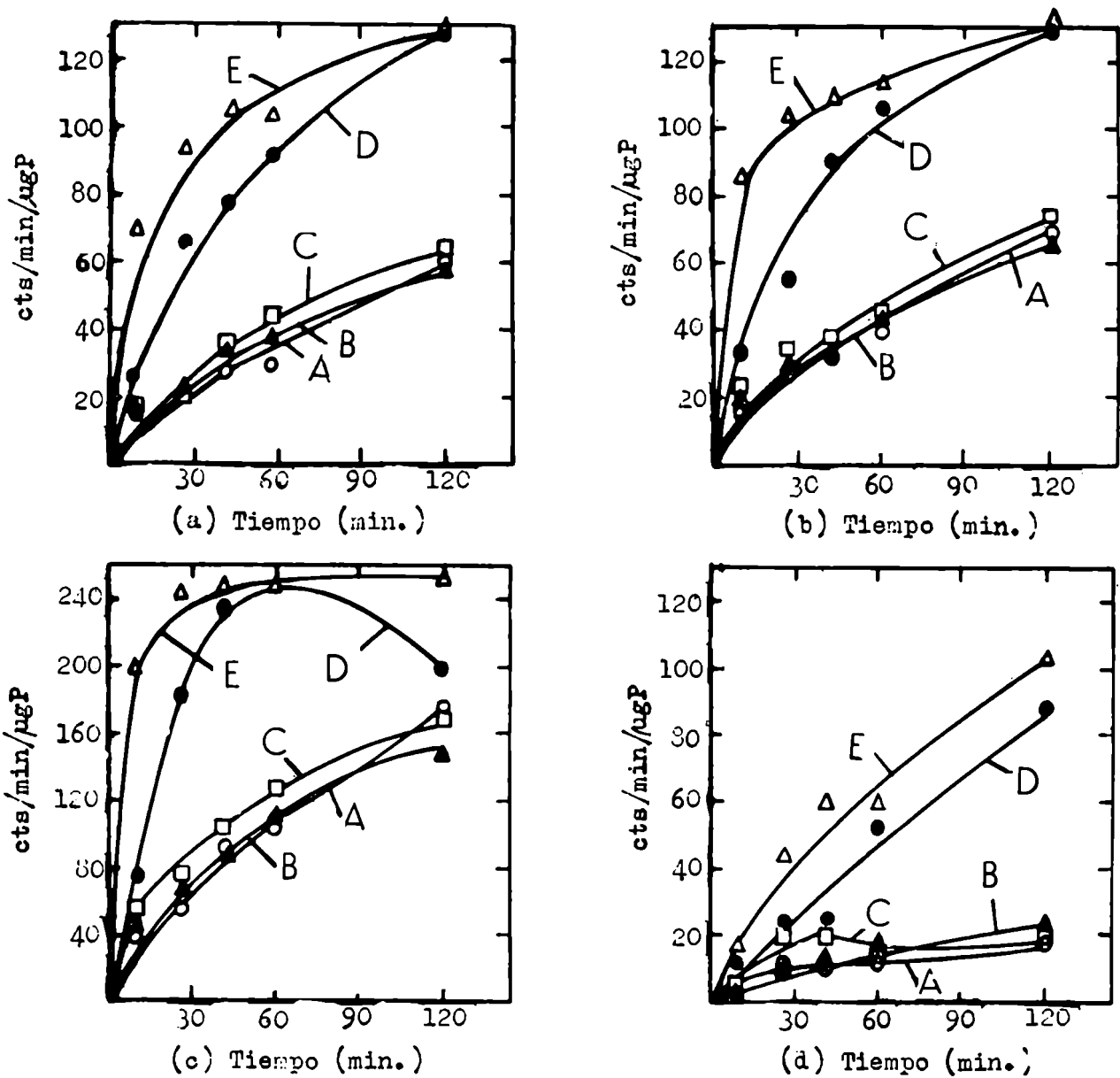


Fig. IV-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la actividad específica de ^{32}P incorporado por células proliferativas de *S. cerevisiae* en las fracciones: (a) fósforo total, (b) fósforo ácido soluble total, (c) fósforo inorgánico ácido soluble y (d) fósforo de ácidos nucleicos. Condiciones experimentales descritas en Tabla IV-1. A: 0,; B: 0,1; C: 0,5; D: 1,0 y E: 10,0 μg de cicloheximida por ml.

Tabla IV-2.- Efecto de cicloheximida sobre la incorporación de P^{32} por *S. cerevisiae*. 7,4 mg de levadura ayunada suspendida en 100 μ M de buffer italato pH 4,5; concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,1 y 1,0 μ g/ml; 15 μ M de glucosa; 30 μ M de fosfato monopotásico- P^{32} (0,2 μ C); incubación en vasos de Warburg con 0,15 ml de NaOH 5N en la copa central y volumen final 3 ml; aire en la fase gaseosa; 30°C; 120 min. de incubación. Los valores se agruparon en: 1: μ g de P/mg cél. y 2: (ots/min/mg cél.) $\times 10^3$.

Sustrato	Cicloheximida (μ g/ml)	CO ₂	P _T		P _{A.S.}		P _I		P _{7'A.S.}		P _N		P _L		P _R			
			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Ninguno	0	3,0	17,4	1,9	13,3	1,2	7,3	0,8	2,4	0,2	1,5	0,1	1,1	0,1	0,7	0,2	0,2	0,2
Glucosa	0	77,0	19,3	55,2	16,0	47,8	6,3	22,5	3,9	8,0	1,4	1,0	0,9	0,9	0,6	1,1	1,1	1,1
Ninguno	0,1	2,1	19,6	1,8	15,7	1,2	8,3	0,7	1,8	0,1	1,8	0,1	1,0	0,1	0,5	0,2	0,2	0,2
Glucosa	0,1	85,2	17,2	51,3	13,5	42,7	6,4	21,3	2,8	9,1	1,7	1,2	1,5	1,0	0,3	0,8	0,8	0,8
Ninguno	1,0	2,1	18,1	2,4	14,6	1,7	6,4	1,0	2,8	0,2	1,4	0,1	1,7	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1
Glucosa	1,0	76,4	19,0	67,5	15,0	45,9	5,1	18,6	4,1	13,0	1,6	1,5	1,5	1,2	0,5	0,8	0,8	0,8

Tabla IV-3.- Efecto de cicloheximida sobre la distribución del P^{32} en *S. cerevisiae* durante el consumo de sus sustratos endógenos. 17,6 mg de levadura previamente ayunada en P^{32} suspendida en 100 μ M de buffer fitalato pH 4,5; concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,1; 0,5; 1,0 y 10,0 μ g/ml; 15 μ M de glucosa; incubación en vasos de Warburg con 0,15 ml de NaOH 5N en la copa central y volumen final 3 ml; aire en la fase gaseosa; 30°C; 120 min. de incubación. Los valores se agruparon en: 1: μ g de P /mg cél. y 2: (ots/min/mg oél.) $\times 10^3$.

Sustrato	Cicloheximida (μ g/ml)	QO ₂	P _T		P _{A.S.}		P _I		P _{A.S.}		P _M		P _L		P _R	
			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Ninguno	0	1,6	9,8	39,9	7,6	33,9	3,9	17,1	1,4	6,2	0,8	0,8	0,7	1,0	0,2	0,7
Glucosa	0	45,4	12,1	37,8	8,6	30,4	3,7	11,7	1,0	8,2	1,5	1,7	0,7	1,4	0,2	1,3
Ninguno	0,1	1,0	10,4	39,0	7,8	33,2	4,0	15,5	1,4	8,5	1,1	1,1	0,6	0,9	0,2	0,7
Glucosa	0,1	39,8	11,3	39,7	8,1	30,5	3,8	12,0	1,2	8,1	1,1	1,8	0,7	1,4	0,2	1,1
Ninguno	0,5	1,0	10,8	39,3	7,8	33,9	3,7	15,2	1,8	6,8	0,7	0,8	0,8	0,9	0,7	0,7
Glucosa	0,5	40,3	11,7	39,6	8,9	31,9	3,6	12,8	1,5	8,2	0,9	1,4	0,8	1,4	0,2	0,9
Ninguno	1,0	1,5	11,0	40,3	8,4	34,8	4,1	15,7	1,8	8,9	0,8	0,9	0,8	1,0	0,3	0,8
Glucosa	1,0	35,4	11,9	40,5	8,8	32,4	3,3	11,0	1,7	9,1	0,7	1,2	0,9	1,4	0,3	0,8
Ninguno	10,0	1,7	10,1	35,2	7,3	29,1	3,4	13,1	1,0	4,5	0,6	0,7	0,6	1,1	0,2	0,6
Glucosa	10,0	35,0	11,9	38,2	8,9	30,7	3,1	9,4	1,9	9,6	0,8	1,5	0,9	1,5	0,2	0,8

CAPITULO V

EFFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS EN LEVADURA

Efecto de la cicloheximida sobre la asimilación de valina

La valina, aminoácido de la familia del ácido pirúvico, experimenta escasa metabolización por las células de levadura. De acuerdo a trabajos realizados con tejidos de animales (101) y con células de E. coli (102) este aminoácido se incorpora en la proteína como tal y parcialmente como leucina que se formaría por desaminación de la valina, descarboxilación del ácido α -cetoisovalérico y posterior reacción con un grupo acetato daría lugar al ácido α -cetoisocaproico, cetoácido correspondiente a la leucina.

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de C^{14} por levadura.- Realizado un estudio cinético sobre la incorporación de C^{14} en presencia de cicloheximida, se observa que en ausencia del antibiótico el aminoácido es asimilado por la célula entera proporcionalmente al tiempo transcurrido. En cambio ya 0,1 $\mu\text{g/ml}$ del inhibidor solamente permite la incorporación de valina- C^{14} en alrededor de un 50%; 0,5 μg de cicloheximida determina una inhibición de aproximadamente 70% y más de 1,0 μg pero dentro de la zona de mínima concentración inhibitoria, suprime la incorporación de valina casi en su totalidad (Tabla V-1).

Fraccionada la célula de levadura, se observa que la porción de metabolitos solubles en metanol-agua incorpora poca radiactividad en relación con la célula entera, llegando al máximo en la primera hora de incubación. Cuando se emplea 0,1 μg de cicloheximida por ml de caldo de cultivo se inhibe la incorporación de C^{14} por esta fracción en aproximadamente un 30%. El resto de las concentraciones de antibiótico utilizadas producen un estímulo, especialmente la presencia de 10,0 μg del inhibidor. (Figura V-1 (a)).

La fracción extraída con ácido tricloroacético y en caliente, formada principalmente por ácidos nucleicos, no incorpora radiactividad.

El resto insoluble, constituido en su mayor parte por proteínas, experimenta una incorporación de C^{14} semejante a la célula entera pero con un efecto todavía más marcado: se inhibe en más del 80% con 1,0 μg de antibiótico y de casi un 100% con 10,0 $\mu\text{g/ml}$. (Figura V-1 (b)).

Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14}

En la fracción metanol-soluble - El aminoácido valina no sufre ninguna modificación en esta fracción, correspondiendo totalmente la medida de la radiactividad a este compuesto.

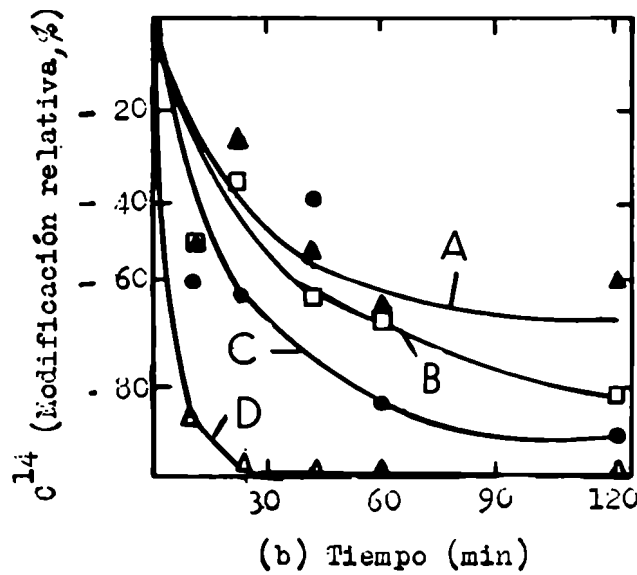
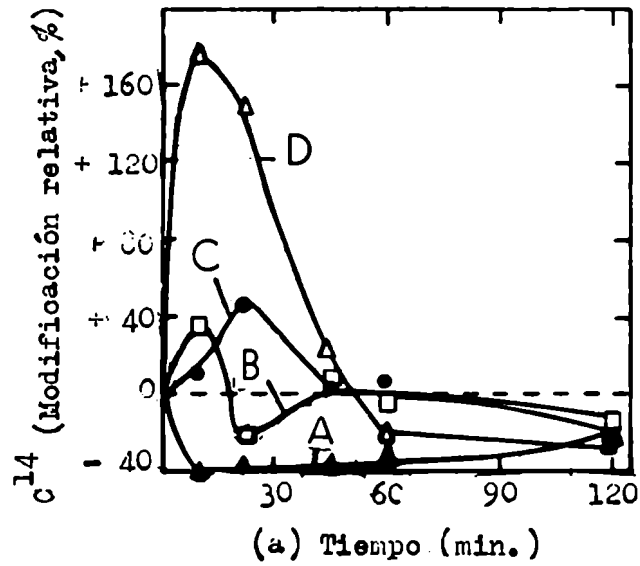


Fig. V-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa β de C^{14} por incorporación de L-leucina- C^{14} (G) en células proliferativas de *S.cerevisiae* en las fracciones: (a) metabolitos solubles en metanol-agua y (b) proteínas. Condiciones experimentales descritas en Tabla V-1. A: 0,1; B: 0,5; C: 1,0 y D: 10,0 μ g de cicloheximida por ml.

E. La fracción proteína residual - La valina contribuye con más de las 3/4 partes de la radiactividad, correspondiendo el resto probablemente a leucina, ya que aparecen solamente 2 sustancias marcadas con C^{14} , no siendo posible la identificación de la segunda. La proporción de la distribución se mantiene mientras no se utiliza más de 1,0 μ g de antibiótico; con concentraciones mayores del inhibidor la marcación es muy pequeña y únicamente está constituida por valina.

Efecto de la cicloheximida sobre la asimilación de glicina

La glicina participa de la reserva de aminoácidos libres con que cuentan las células de levadura (103), constituyendo con la serina y cisteína la familia de la serina. Si bien se consideraba a este aminoácido como un compuesto que experimentaba escasa transformación durante los procesos metabólicos, se observó que a través de la interconversión glicina-serina contribuye en la formación de numerosas sustancias: añadiendo una unidad de C_1 a la glicina se da lugar a serina. Contando con el ácido fórmico como unidad de C_1 , se probó su presencia en la serina de tejidos de animales (104), bacterias, plantas superiores (105) y levadura (106). Para que esta modificación se produzca en microorganismos (107)(108) hace falta la presencia del ácido pteroil-glutámico como transportador activo de la unidad de C_1 , o más bien su tetrahidro derivado y para que la reversibilidad enzimática del proceso se mantenga se necesita de piridoxal fosfato (109).

La glicina contribuye con sus 2 átomos de carbono y el de nitrógeno en la biosíntesis del núcleo de las purinas de la levadura, de manera semejante a lo operado en otros organismos vivientes. Trabajando con levadura Abrams y col. (110) señalaron que el nitrógeno de la glicina ocupaba la posición 7 del núcleo purínico; Emonds y col. (111) observaron que la purina incorpora el carbono del metilo en la posición 5 y Heinrich y col. (112) demostraron que el carbono radiactivo de la glicina- $1-C^{14}$ rotura el carbono que ocupa la posición 4 de la purina.

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de glicina- $1-C^{14}$ por la levadura - La incorporación de C^{14} proveniente de glicina- $1-C^{14}$ por la célula entera de levadura se encuentra inhibida por acción de la cicloheximida, efecto que se acentúa con el tiempo y concentraciones crecientes del antibiótico. En presencia de 0,5 μ g de cicloheximida por ml de caldo, la inhibición es de 12% en los 10 min. iniciales, de 32 a los 60 min. y de 55 a los 120 min. Con 1,0 μ g es de 50% a los 60 min. y 65 a los 120 min. Utilizando 2,5 μ g el efecto es de 76% a los 120 min. y con 10,0 μ g es de 82%.

El fraccionamiento celular permite observar que los testigos de la fracción de compuestos solubles en metanol-agua incorporan casi la misma radiac

Tabla V-1- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-valina- C^{14} (G) por *S.cerevisiae*. Se cultivaron células proliferativas de levadura en 50 ml de caldo a 30°C, aire en la fase gaseosa, hasta alcanzar una densidad óptica correspondiente a 1,0 mg de peso seco de células de levadura por ml de caldo; considerando tiempo=0 se añadió 300 λ de L-valina- C^{14} (G) ($3\mu C$) y concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,1; 0,5; 1,0 y 10,0 $\mu g/ml$. A los tiempos 10, 22,45, 60 y 120 min. Se tomaron muestras de 7 ml de cada uno de los erlenmeyers, dosándose el contenido en levadura. Las células se lavaron y fraccionaron.

Tiempo (min.)	Cicloheximida ($\mu g/ml$)	C^{14} (cts/min/mg cél) en:		
		Total	Metanol soluble	Insoluble
10	0	181,0	10,4	170,6
10	0,1	94,8	6,2	88,6
10	0,5	103,0	14,4	88,6
10	1,0	79,2	11,6	67,6
10	10,0	31,4	28,9	2,5
22	0	175,0	14,3	160,7
22	0,1	122,0	9,1	112,9
22	0,5	112,0	10,3	101,7
22	1,0	74,2	21,4	52,8
22	10,0	44,2	35,6	8,6
45	0	292,0	20,6	271,4
45	0,1	150,0	12,6	137,4
45	0,5	115,0	22,2	92,8
45	1,0	88,5	21,0	67,5
45	10,0	34,4	26,6	7,8
60	0	360,0	23,4	336,6
60	0,1	149,2	15,9	133,3
60	0,5	116,5	22,3	94,2
60	1,0	74,0	24,8	49,2
60	10,0	31,3	18,5	12,8
120	0	519,0	19,4	499,6
120	0,1	226,0	14,4	211,6
120	0,5	101,5	17,5	84,0
120	1,0	80,0	14,7	65,3
120	10,0	33,9	22,3	11,6

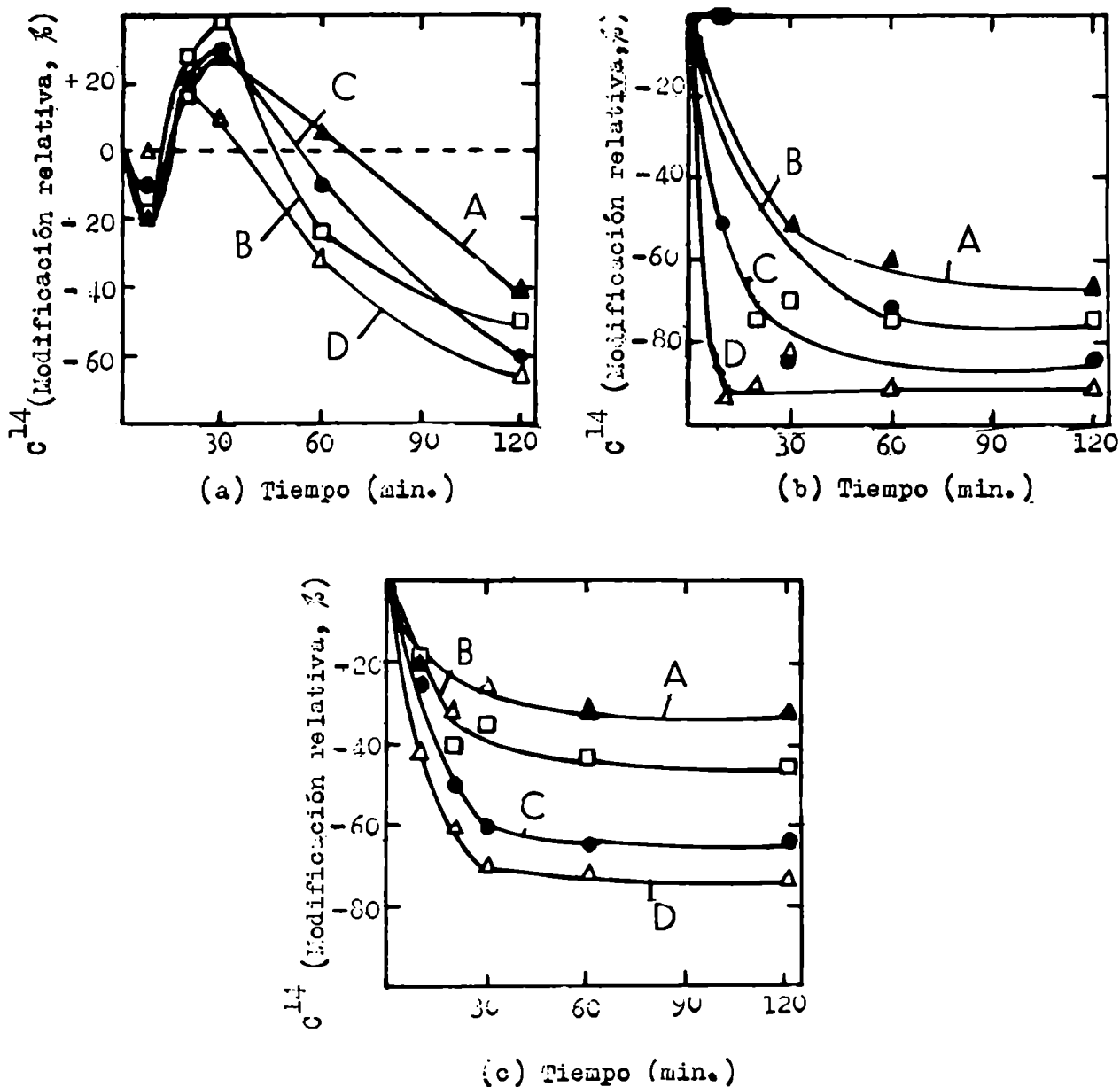


Fig. V-2.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa β de C^{14} por incorporación de glicina -l- C^{14} en células proliferativas de *S. cerevisiae* en las fracciones: (a) metabolitos solubles en metanol-agua, (b) proteínas y (c) ácidos nucleicos. Condiciones experimentales descritas en Tabla V-2. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5 y D 10,0 μg de cicloheximida por ml.

tividad en los primeros 30 min. y luego aumenta en relación al tiempo transcurrido. La marcación de esta fracción es modificada por el antibiótico de la siguiente manera: en los 10 primeros minutos casi no hay alteración; a los 20 y 30 minutos las diversas concentraciones de cicloheximida exaltan la entrada de C^{14} ; a los 60 minutos salvo la menor concentración del inhibidor que incrementa ligeramente la presencia de C^{14} , las restantes cantidades del antibiótico utilizado la disminuye y al final de la cinética mientras los testigos continúan incorporando carbono marcado, los metabolitos solubles en metanol-agua tratados no incorporan más radiactividad en relación a la realizada hasta los 60 minutos.

Observando la incorporación de C^{14} proveniente de glicina- $l-C^{14}$ en la fracción ácidos nucleicos se puede señalar que la misma se detiene pasados los 60 minutos iniciales de la experiencia, que la inhibición es mayor con concentraciones más elevadas de antibiótico y que los porcentajes de inhibición eran de 30, 50, 60 y 75 con cantidades respectivas de 0,5; 1,0; 2,5 y 10 μg de antibiótico por ml de caldo.

El mayor efecto de la cicloheximida es sobre el resto insoluble que está constituido principalmente por proteínas. Los porcentajes de inhibición son de 66, 75, 87, y 92 con las concentraciones crecientes de antibiótico. (Tabla 7-2). (Figura V-2)

Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14}

En la fracción metanol-agua soluble.- Los compuestos de esta fracción que incorporan radiactividad son los aminoácidos glicina, serina, cisteína, ácidos glutámico y aspártico y treonina y el nucleótido adenosina monofosfato. De acuerdo a la distribución relativa de la radiactividad se evidencia que la glicina es el componente que experimenta una mayor marcación: alrededor de la mitad en los primeros 20 minutos y que no varía sustancialmente por acción de las diversas concentraciones de cicloheximida; a los 30 minutos la glicina del testigo incorpora 38% de la radiactividad total, alrededor del 44% con 0,5 y 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del inhibidor y del 32% con 2,5 y 10,0; a los 60 y 120 minutos los testigos incorporan 38%, mientras que los tratados con antibiótico aproximadamente un 30%. La serina de los testigos se marca pobremente en los 30 minutos iniciales, cerca del 5%, para aumentar luego a 12%; por efecto de las concentraciones de cicloheximida utilizadas y en el transcurso de los 120 minutos de la experiencia, el porcentaje correspondiente a serina se ve incrementado alcanzando hasta un 25% al final. La cisteína no se ve alterada mayormente en su marcación, siendo este efecto semejante para los aminoácidos ácidos glutámico y aspártico y para el restante que se supone es treonina, pero que no pudo

Tabla V-2 - Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de glicina-1-C¹⁴ por S.cerevisiae. Se cultivaron células urcliferativas de levadura en 50 ml de caldo a 30°C, aire en la fase gaseosa, hasta alcanzar una densidad óptica correspondiente a 2,2 mg de peso seco de células de levadura por ml de caldo; considerando tiempo=0 se añadió 200 λ de glicina-1-C¹⁴ (20 μC) y concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,5; 1,0; 2,5; y 10,0 μg/ml. A los tiempos 10,20,30,60 y 120 min. se tomaron muestras de 8 ml de cada uno de los erlenmeyera, dosándose el contenido en levadura. Las células se lavaron y fraccionaron.

Tiempo (min.)	Cicloheximida (μg/ml)	C ¹⁴ (cts/min/μg cél) en :			
		Total	Metanol-soluble	A.nucleicos	Insoluble
10	0	272,0	163,0	22,4	86,6
10	0,5	240,0	127,0	18,0	95,0
10	1,0	244,0	131,0	19,0	94,0
10	2,5	205,0	147,0	17,2	40,8
10	10,0	182,0	164,0	13,0	5,0
20	0	513,0	173,0	51,2	288,8
20	0,5	325,0	210,0	35,2	79,8
20	1,0	323,0	221,0	30,8	71,2
20	2,5	302,0	212,0	25,5	64,5
20	10,0	252,0	202,0	20,5	29,5
30	0	617,0	185,0	63,4	36,6
30	0,5	460,0	237,0	47,4	1,6
30	1,0	409,0	256,0	41,0	112,0
30	2,5	321,0	239,0	25,3	56,7
30	10,0	290,0	203,0	19,6	7,4
60	0	973,0	354,0	92,3	526,7
60	0,5	663,0	374,0	63,4	225,6
60	1,0	490,0	318,0	44,2	127,8
60	2,5	446,0	270,0	33,0	143,0
60	10,0	300,0	237,0	25,4	37,6
120	0	1.766,0	600,0	95,7	1.070,3
120	0,5	790,0	358,0	67,0	365,0
120	1,0	625,0	306,0	55,5	263,5
120	2,5	430,0	248,0	37,2	144,8
120	10,0	318,0	202,0	25,5	90,5

Tabla V-3 - Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C¹⁴ en los metabolitos metanol-agua solubles por incorporación de glicina-1-C¹⁴ en *S. cerevisiae*. Después de incubar según Tabla V-2, las células fueron lavadas y extraídas con metanol, cromatografiándose el sobrenadante. Se numeraron las columnas de acuerdo a la concentración de cicloheximida, en $\mu\text{g/ml}$. Los valores se agruparon en %: radiactividad relativa, A.E.: radiactividad en cts/min/mg cél.

Tiempo: 10 min.

Sustancia	0		0,5		1,0		2,5		10,0	
	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.
Aminoácidos:										
Glicina	45,7	50	55,7	71	51,8	68	57,0	84	45,7	75
Serina	6,6	7	4,8	6	4,5	6	8,9	13	18,7	31
Cisteína	11,0	12	11,9	15	12,3	16	8,5	12	14,8	24
Acido glutámico	4,7	5	7,8	10	5,9	8	0	0	0	0
Nucleótidos:										
AMP	32,0	35	19,8	25	25,5	33	25,6	38	20,8	34

Tabla V-3 : Tiempo: 20 min.

Sustancia	0		0,5		1,0		2,5		10,0	
	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.
Aminoácidos:										
Glicina	50,3	87	47,6	100	44,6	99	48,3	102	47,8	96
Serina	2,6	4	11,6	24	11,4	25	20,7	44	16,9	34
Cisteína	12,0	21	13,0	27	16,0	35	8,6	18	9,8	20
Acido glutámico	3,1	5	4,3	9	5,0	11	5,8	12	3,9	8
Nucleótidos:										
AMP	32,0	54	23,5	49	23,0	50	16,6	35	21,6	43

Tabla V-3 : Tiempo: 30 min.

Sustancia	0		0,5		1,0		2,5		10,0	
	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.
Aminoácidos:										
Glicina	38,0	71	44,2	105	43,6	112	31,6	75	32,6	66
Serina	4,1	7	13,4	32	19,2	49	23,0	55	22,4	46
Cisteína	8,0	15	11,8	28	8,9	23	8,5	20	10,1	20
Acido glutámico	2,7	5	3,1	7	6,2	16	4,1	10	6,4	13
Acido aspártico	1,5	3	4,6	11	0,5	1	0	0	0	0
Treonina?	3,8	7	3,6	8	4,7	12	10,0	24	7,9	16
Nucleótidos:										
AMP	35,6	65	19,3	45	16,9	43	22,8	54	20,6	41
No identificados	6,3	12								

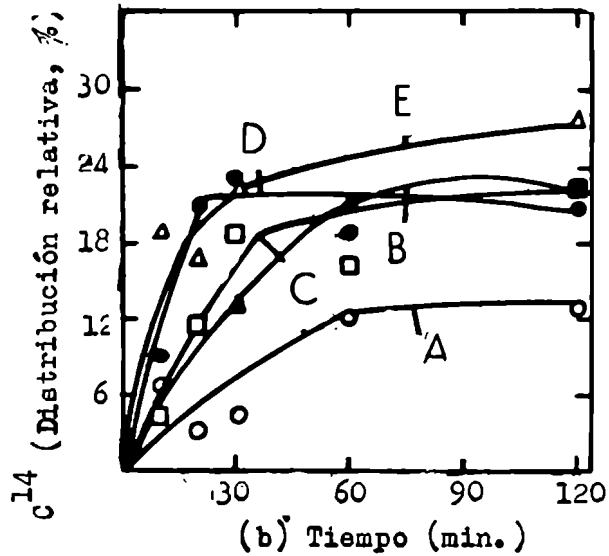
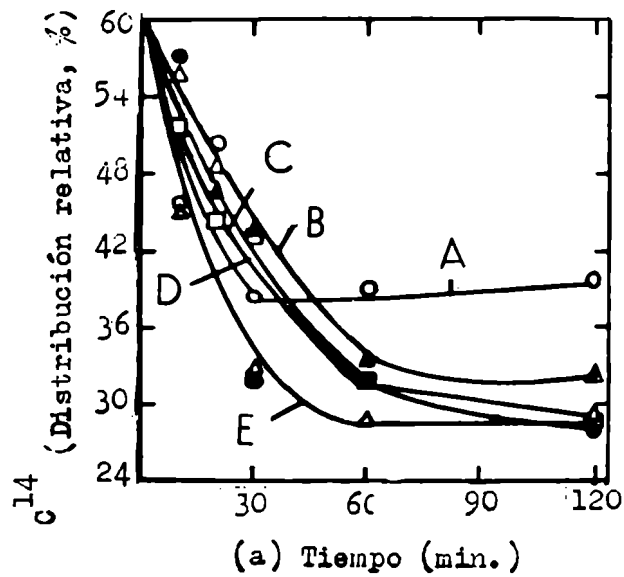


Fig. V-3.- Efecto de la cicloneiximida sobre la distribución relativa % de C^{14} por incorporación de glicina- 1-C^{14} en células proliferativas de *S. cerevisiae* en los metabolitos metanol-agua solubles: (a) glicina y (b) serina. Condiciones experimentales descritas en Tabla V-3 y Tabla V-2. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5 y D: 10 μg de cicloneiximida por ml.

Tabla V-3 : Tiempo: 60 min.

Sustancia	<u>0</u>		<u>0,5</u>		<u>1,0</u>		<u>2,5</u>		<u>10,0</u>	
	<u>%</u>	<u>A.E.</u>	<u>%</u>	<u>A.E.</u>	<u>%</u>	<u>A.E.</u>	<u>%</u>	<u>A.E.</u>	<u>%</u>	<u>A.E.</u>
Aminoácidos:										
Glicina	38,5	136	33,8	127	32,1	102	33,5	90	28,6	68
Serina	11,8	42	20,6	77	16,6	53	18,4	50	20,4	48
Cisteína	10,9	39	10,7	40	11,7	37	13,2	36	9,7	23
Acido glutámico	2,2	8	2,3	9	2,4	8	3,7	10	2,7	7
Acido aspártico	2,0	7	1,9	7	2,2	7	2,3	6	1,6	4
Treonina?	7,4	26	8,9	23	10,7	34	10,5	28	12,5	30
Nucleótidos:										
AMP	27,2	94	21,8	82	24,3	77	18,4	50	24,5	57

Tabla V-3 : Tiempo : 120 min.

Sustancia	<u>0</u>		<u>0,5</u>		<u>1,0</u>		<u>2,5</u>		<u>10,0</u>	
	<u>%</u>	<u>A.E.</u>	<u>%</u>	<u>A.E.</u>	<u>%</u>	<u>A.E.</u>	<u>%</u>	<u>A.E.</u>	<u>%</u>	<u>A.E.</u>
Aminoácidos:										
Glicina	39,6	238	32,3	116	29,3	90	28,7	70	29,0	58
Serina	12,7	76	22,5	80	22,5	69	20,7	51	27,7	56
Cisteína	16,0	96	18,4	66	16,4	50	27,8	69	21,2	43
Acido glutámico	2,3	13	3,0	11	3,3	10	3,2	8	4,7	10
Acido aspártico	1,1	6	1,9	7	0,2	1	0,3	1	0,2	1
Treonina?	7,5	45	4,7	17	5,8	18	4,3	11	1,9	4
Nucleótidos:										
AMP	20,8	124	17,2	62	22,5	69	15,0	37	15,3	31

ser identificado con certeza. El AMP incorpora radiactividad en los testigos que oscila entre una tercera y cuarta parte, disminuyendo por acción del antibiótico y a través del tiempo. (Tabla V-3). En la Figura V-3 se observa la modificación de la distribución relativa en glicina y serina.

En la fracción ácidos nucleicos.- En esta fracción la radiactividad se distribuye en las bases guanina y adenina y en sus nucleótidos y nucleótidos correspondientes, pero ya que muchas veces debido al grado de hidrólisis de los ácidos nucleicos solamente aparecen marcadas las bases y es de igual la radiactividad que experimentan los otros productos de esta operación, los resultados se expresan como distribución de C^{14} en guanina y adenina. Observando la distribución relativa en ambas bases durante la

marcha de la cinética se puede afirmar que oscilan entre un 40 y 60%; que hasta los 30 minutos es mayor de 50% en la guanina, de 50% a los 60 minutos y menos de la mitad a los 120 minutos y que la adenina sufre un efecto complementario. La acción de la cicloheximida sobre la distribución en las bases del C^{14} proveniente de la glicina- $l-C^{14}$ casi no se evidencia. (Tabla V-4).

En la fracción proteína residual.- El hecho de que la cicloheximida inhibe la incorporación de la radiactividad en esta fracción en más del 90%, impidió la posibilidad de estudiar el efecto sobre la distribución del car bono marcado.

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de glicina- $l-C^{14}$ por células de levadura en reposo. El efecto de la cicloheximida sobre las células enteras en reposo es menor en relación con las células proliferativas. La célula entera incorpora la misma cantidad de C^{14} en los 10 primeros minutos a pesar de la presencia de las diversas concentraciones del antibiótico. Durante los 60 minutos de la experiencia las células tratadas con 0,5 y 1,0 μg de inhibidor no modifican la incorporación de radiactividad; 2,5 y 10,0 μg producen una inhibición de 20 y 40% respectivamente.

Los metabolitos solubles en metanol-agua de las células utilizadas como testigos alcanzan el máximo de rotulación con C^{14} a los 30 minutos de iniciada la incubación; cuando la levadura es tratada con 0,5 y 1,0 μg de cicloheximida, incorpora un 50% de mayor radiactividad a los 60 minutos; este efecto no es tan marcado al emplearse 2,5 μg y casi no se evidencia con 10,0 μg .

En los 10 minutos iniciales, los nucleótidos libres de las células que fueron incubadas con las diversas concentraciones del antibiótico incorporaron mayor radiactividad que las células testigo; durante el tiempo restante este efecto se mantiene para la levadura tratada con 0,5; 1,0 y 2,5 μg de cicloheximida, pero cuando se utilizan 10,0 μg , la rotulación con C^{14} es igual o ligeramente inferior a la experimentada por los testigos. La cicloheximida provoca el mismo efecto sobre la fracción de los ácidos nucleicos.

La fracción proteica es la que continúa experimentando la principal acción inhibitoria del antibiótico; a los 60 minutos de incubar con cicloheximida el porcentaje de este efecto es de 69, 88, 96, y 98 cuando se aplican 0,5; 1,0; 2,5 y 10,0 μg . (Tabla V-5). Las modificaciones relativas se observan en la Figura V-4.

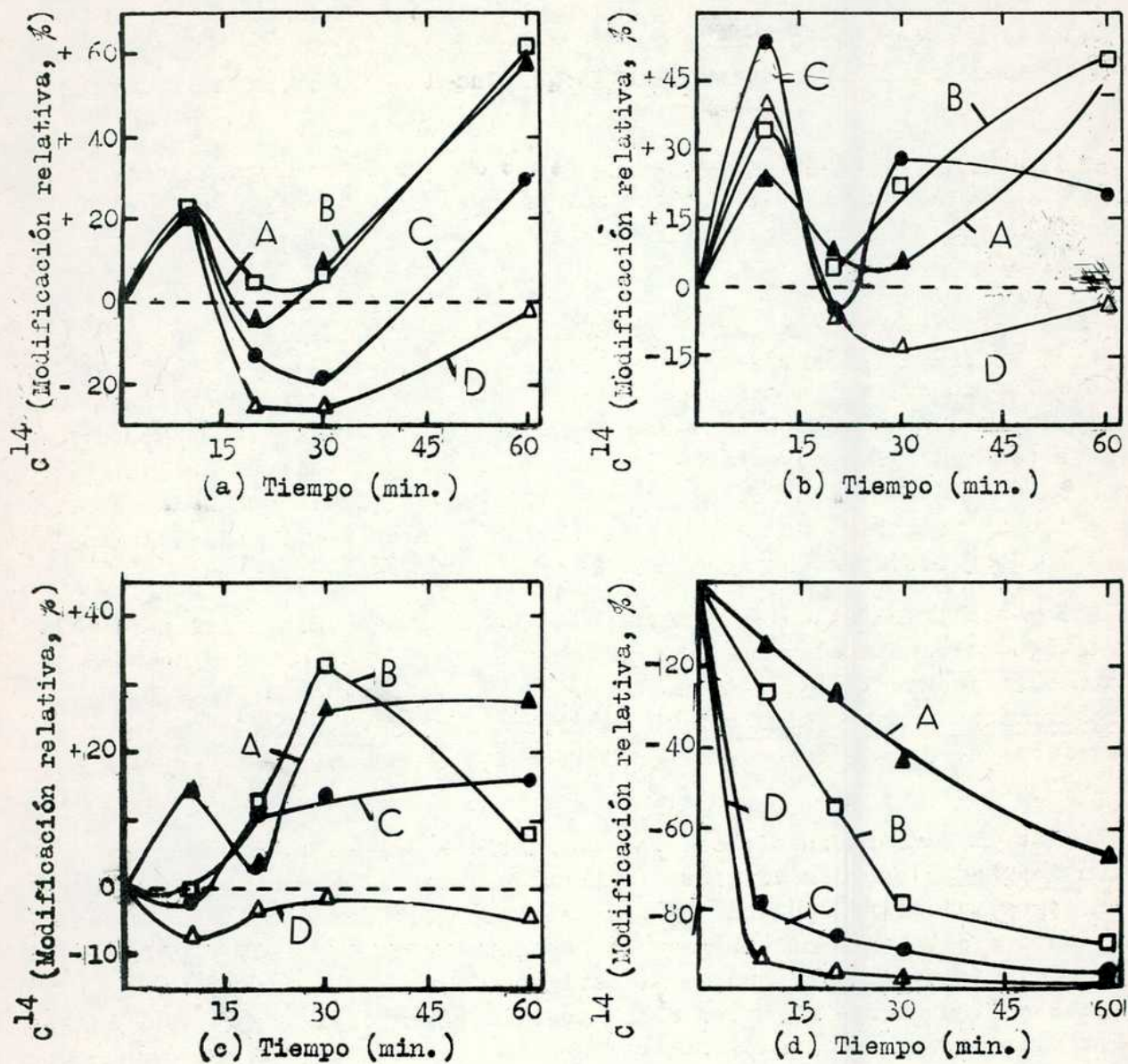


Fig. V-4.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de ^{14}C por incorporación de glicina- ^{14}C en las células en reposo de *S. cerevisiae* en las fracciones: (a) metabolitos solubles en metanol-agua, (b) nucleótidos libres, (c) ácidos nucleicos y (d) proteínas. Condiciones experimentales descritas en Tabla V-5. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5 y D: 10,0 μg de cicloheximida por ml.

Tabla V-4.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C¹⁴ en la fracción ácidos nucleicos. Después de incubar según Tabla V-2, la fracción ácidos nucleicos se hidrolizó y cromatografió. Los valores se agruparon en: ℄: radiactividad relativa; A.E.: radiactividad en cts/min/mg cél.

Tiempo (min)	Cicloheximida (ug/ml)	Acidos nucleicos		Guanina		Adenina	
		<u>A.E.</u>	<u>℄</u>	<u>A.E.</u>	<u>℄</u>	<u>A.E.</u>	<u>℄</u>
10	0	22,4	52,6	11,8	47,4	10,6	
10	0,5	18,0	60,0	10,8	40,0	7,2	
10	1,0	17,0	59,0	11,2	41,0	7,8	
10	2,5	17,2	56,9	9,8	43,1	7,4	
10	10,0	13,0	44,6	5,8	55,4	7,2	
20	0	51,2	53,6	27,4	46,4	23,8	
20	0,5	35,2	53,2	18,7	46,8	16,5	
20	1,0	30,8	52,5	16,2	47,5	14,6	
20	2,5	25,5	50,4	12,9	49,6	12,6	
20	10,0	20,5	50,7	10,4	49,3	10,1	
30	0	63,4	55,7	35,3	44,3	28,1	
30	0,5	47,4	56,0	26,5	44,0	20,9	
30	1,0	41,0	52,0	21,3	48,0	19,7	
30	2,5	25,3	50,8	12,9	49,2	12,4	
30	10,0	19,6	41,1	8,1	58,9	11,5	
60	0	92,3	50,3	46,4	49,7	45,9	
60	0,5	63,4	47,4	30,0	52,6	33,4	
60	1,0	44,2	46,5	20,6	53,5	23,6	
60	2,5	33,0	47,1	15,5	52,9	17,5	
60	10,0	25,4	46,1	11,7	53,9	13,7	
120	0	95,7	40,8	38,9	59,2	56,8	
120	0,5	67,0	48,1	32,2	51,9	34,8	
120	1,0	55,5	44,9	24,9	55,1	30,6	
120	2,5	37,2	45,0	16,7	55,0	20,5	
120	10,0	25,5	45,5	11,6	54,5	13,9	

Tabla V-5.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de glicina- ^{14}C por S. cerevisiae. 68,4 mg de células de levadura en reposo suspendidas en 1,25 ml de buffer fosfato pH 6,0; 31 μM de glucosa, volumen final 25 ml, aire en la fase gaseosa, durante 60 min., con 200 λ de glicina- ^{14}C (20 μC) y concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,5; 1,0; 2,5 y 10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se tomaron alícuotas a los 10, 20, 30 y 60 min.

Tiempo (min)	Cicloheximida ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	^{14}C (cts/min/mg cél.) en :				
		Total	Metanol-soluble	Nucleótidos libres	Ácidos nucleicos	Insoluble
10	0	3.896	2.310	796	45	745
10	0,5	4.439	2.770	985	52	632
10	1,0	4.594	2.920	1.077	45	552
10	2,5	4.321	2.890	1.227	44	160
10	10,0	4.014	2.800	1.110	42	62
20	0	11.091	7.320	1.882	104	1.785
20	0,5	10.588	7.100	2.030	108	1.350
20	1,0	10.503	7.600	1.985	122	796
20	2,5	8.435	6.310	1.785	116	224
20	10,0	7.380	5.430	1.765	101	84
30	0	16.054	10.260	2.250	204	3.340
30	0,5	15.828	11.300	2.380	258	1.890
30	1,0	14.903	11.050	2.780	270	803
30	2,5	11.776	8.360	2.880	233	303
30	10,0	9.935	7.640	1.980	202	113
60	0	21.498	10.020	2.640	378	8.460
60	0,5	22.726	15.800	3.800	482	2.644
60	1,0	21.725	16.350	3.920	408	1.047
60	2,5	17.106	13.150	3.150	444	362
60	10,0	12.836	9.710	2.590	363	173

Efecto de la cicloheximida sobre la asimilación de ácido glutámico

El ácido glutámico ocupa un lugar destacado en los procesos metabólicos esenciales debido a que además de ser el principal constituyente de la reserva de aminoácidos libres (113) por las transformaciones que soporta se convierte en un punto de unión de importancia entre el metabolismo del nitrógeno y los glúcidos. Así por acción de la enzima ácido glutámico dehidrogenasa se da lugar al ácido α -cetoglutarico, pero en las células de levadura el equilibrio de la reacción se encuentra favoreciendo la síntesis del aminoácido. Por otra parte la presencia de las transaminasas determina la síntesis de aminoácidos a partir del α -cetoácido correspondiente y el grupo amino de un aminoácido que se convierte en su α -cetoácido, pero para que la reacción de transaminación proceda parece ser necesaria la presencia previa de ácido glutámico y ácido α -cetoglutarico y el equilibrio de esta reacción se halla desplazado hacia la síntesis del nuevo aminoácido.

La formación de glutamina que se realiza por acción de la enzima glutamina sintetasa (114), proporciona un sistema muy eficaz en el suministro y almacenaje de iones amonio.

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-glutámico- C^{14} (G) por levadura.-

Las células proliferativas de levadura incorporan C^{14} al introducirse glutamato- C^{14} en el medio de cultivo; lo realizan en proporción al tiempo hasta los 30 minutos iniciales, aumenta un 10% más a los 60 minutos y finalmente decae a los 120 minutos. En los 10 primeros minutos las células en teras asimilan casi la misma cantidad de C^{14} cuando son tratadas con cicloheximida, pero más adelante las concentraciones crecientes del antibiótico inhiben la incorporación de C^{14} , acentuándose esta acción con el tiempo. Así de acuerdo a las cantidades del inhibidor, a los 120 minutos los porcentajes fueron de 28, 35, 52 y 64.

Después de fraccionar la levadura sometida a la cicloheximida se evidencia que las porciones obtenidas experimentan distintos efectos. Los metabolitos solubles en metanol-agua acumulan durante los 120 minutos mayor radioactividad que los que actuaron como testigos. Mientras estos últimos representan en relación a la marcación total una proporción relativa que oscila entre 70 y 27% al final de la experiencia, en las células tratadas con 0,5 μ g de cicloheximida esta fracción contiene el 75% de la radioactividad total en los 10 minutos iniciales para disminuir hasta el 60%; con las concentraciones restantes del antibiótico en el comienzo constituye casi el 100% para decaer lentamente hasta alrededor del 80%.

La fracción extraída con TCA en caliente sufre el efecto de la cicloheximida, incorporando menor radiactividad que los testigos. Pero si bien en la primer hora el porcentaje de inhibición es cercano al que presenta la incorporación de glicina- C^{14} , 24, 30, 54 y 72 con las concentraciones crecientes del antibiótico, al final de la segunda hora estos porcentajes se reducen a los valores 15, 16, 47 y 40.

La mayor inhibición es acusada por la fracción proteica. Con 0,5 μ g de cicloheximida el efecto es de cerca del 70%; con 1,0 μ g es de más del 80% y con 2,5 y 10,0 μ g por ml de caldo la incorporación en esta fracción se frena en más del 90% (Tabla V-6). Las modificaciones relativas se observan en la Figura V-5.

Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} .

En la fracción metanol-agua soluble.— Los compuestos que en esta fracción se van marcando son: los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, cistina, glutamina, alanina, tirosina, prolina, ornitina, histidina y los ácidos orgánicos cítricos, málico y succínico. Las sustancias que previsten mayor interés por su evolución durante la experiencia son el ácido glutámico, glutamina y prolina. La suma de la distribución relativa de estos tres componentes representan alrededor del 90% en los primeros 20 minutos, para luego decaer lentamente: a los 60 minutos constituye algo más del 80% y al finalizar la cinética solamente alcanza el 75%. Esta suma no se modifica prácticamente por acción de la cicloheximida, pero considerando a cada una de estas sustancias individualmente se observa una alteración en la distribución. El ácido glutámico incorpora al comienzo el 76% de la radiactividad, valores que descienden gradualmente con el tiempo y llegan al 48% en el final de la experiencia; aquí el antibiótico disminuye la marcación del aminoácido en una escala pequeña, no más del 10%. En el caso de la glutamina se observa un incremento en su marcación que se acentúa con el tiempo y por tratamiento con cicloheximida: en el comienzo los testigos cuentan con el 10% de la radiactividad de esta fracción, proporción que se eleva hasta alrededor del 16%; el antibiótico intensifica el aumento, ya desde las concentraciones más bajas, alcanzando a más del 30%. La rotulación de la prolina es diferente: mientras que la presencia de C^{14} aumenta con el tiempo en los testigos, la cicloheximida inhibe enérgicamente este efecto; a los 120 minutos, la prolina constituye el 11% de la radiactividad de los cultivos sin antibiótico, descendiendo a un 3% en su presencia.

La marcación del resto de los componentes de esta fracción sufren los siguientes efectos: los ácidos orgánicos, histidina, valina y tirosina no se alteran durante el tiempo transcurrido por las diversas concentraciones de antibiótico; otro grupo no se modifica por la presencia del antibiótico

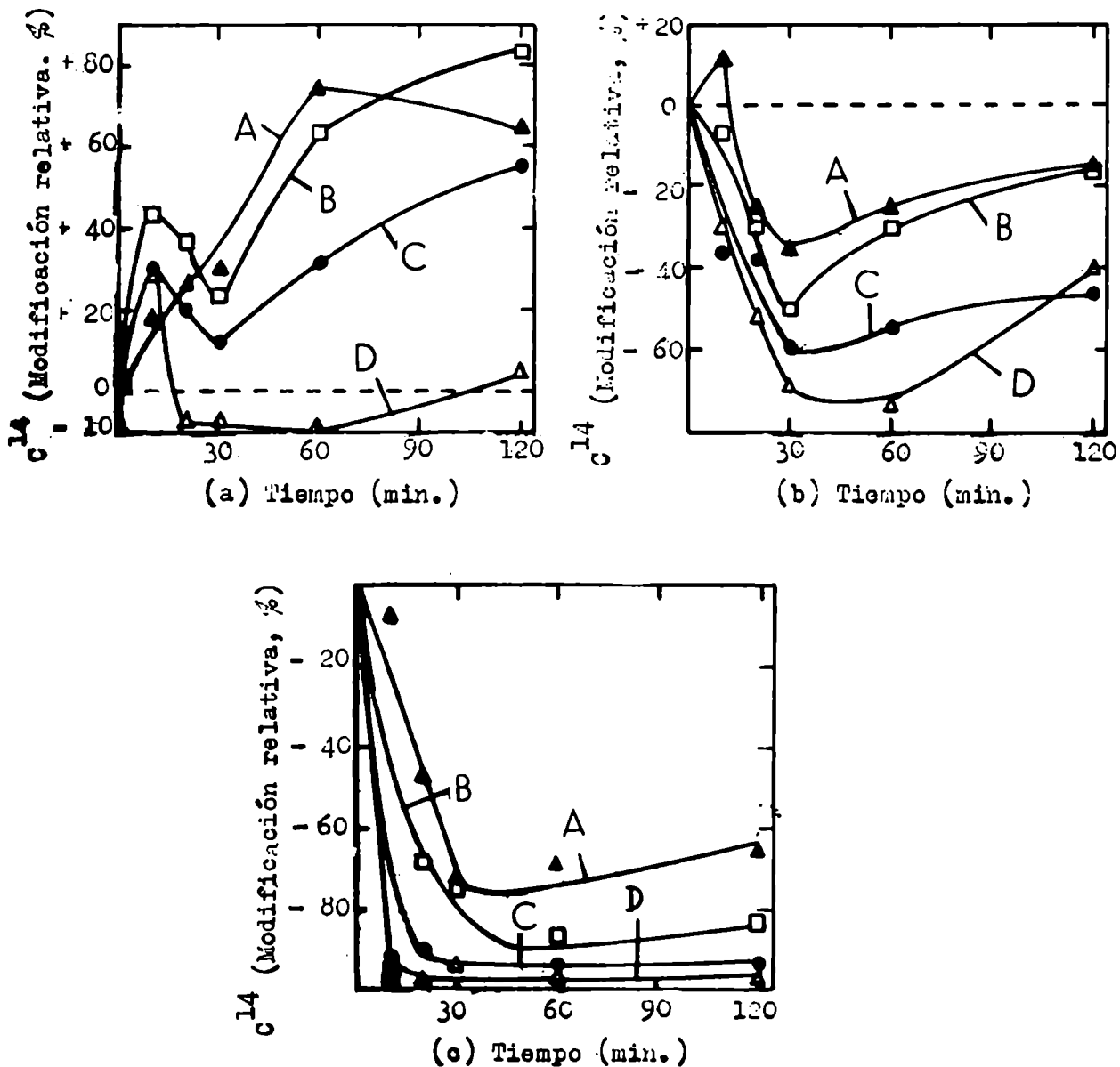


Fig. V-5.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de L-ácido glutámico- C^{14} (G) en células proliferativas de *S.cerevisiae* en las fracciones: (a) metabolitos solubles en metanol-agua, (b) ácidos nucleicos y (c) proteínas. Condiciones experimentales descritas en Tabla V-6. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5 y D: 10,0 μg de cicloheximida por ml.

pero aumenta la incorporación con el tiempo: la ornitina llega a cerca del 3%, la cistina pasa de 2 a 8% y la alanina del 1 al 2; el ácido aspártico asimila poco C^{14} (1%) que se incrementa ligeramente con el antibiótico (Tabla V-7). En la Figura V-6 se observan las modificaciones de la distribución relativa en ácido glutámico, glutamina y prolina.

En la fracción ácidos nucleicos. Una vez que se determinó la incorporación de C^{14} en esta fracción, se la hidrolizó para verificar la presencia de bases rotuladas. Después de las autoradiografías se comprobó que las manchas radiactivas no coincidían con las que manifestaban absorción en el ultravioleta, pero se superponían en parte, la más cercana al origen (mancha N°1) con guanina y la otra (mancha N°2) con adenina. Se realizaron entonces diversos revelados con reactivos químicos, obteniéndose 2 manchas características que los aminoácidos dan con ninhidrina, coincidentes con las radiactivas. Se efectuaron eluciones y con el material obtenido se hicieron recromatografías y cocromatografías. Los resultados permiten decir que el C^{14} incorporado por esta fracción no se distribuye en los componentes de los ácidos nucleicos y en cambio se realiza en dos aminoácidos, el N°1 es probablemente cistina, cisteína o ácido cisteico y el N°2 es ácido glutámico; los aminoácidos se encuentran libres porque no dan reacción positiva con la hidroxilamina, bien ya sea por ser así extraídos o por ser liberados cuando la hidrólisis de los ácidos nucleicos. La mancha N°2 contiene entre 2/3 y 3/4 partes de la radiactividad, siendo valores que se incrementan en pequeña proporción cuando las células son tratadas con cicloheximida (Tabla V-8).

En la fracción proteína residual.- El efecto del antibiótico sobre la distribución de C^{14} en esta fracción no pudo ser estudiado ya que su incorporación es inhibida casi totalmente.

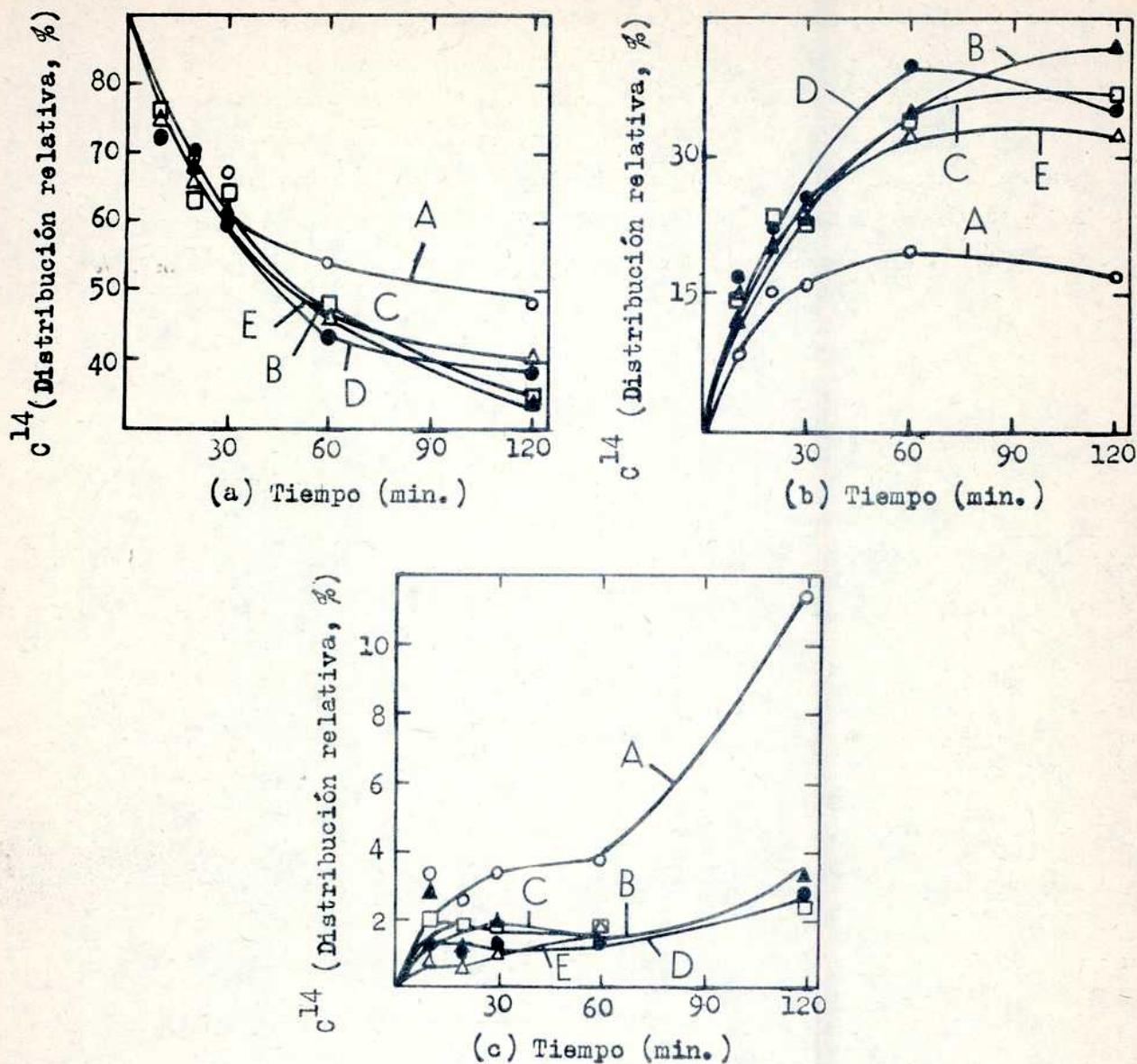


Fig. V-6.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución relativa % de C^{14} por incorporación de L-ácido glutámico- C^{14} (G) en células proliferativas de *S.cerevisiae* en los metabolitos metanol-agua solubles: (a) ácido glutámico, (b) glutamina y (c) prolina. Condiciones experimentales descritas en Tabla V-7 y Tabla V-6. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5 y D: 10,0 μ g de cicloheximida por ml.

Tabla V-6.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-ácido glutámico- C^{14} (G) por *S.cerevisiae*.- Se cultivaron células proliferativas de levadura en 50 ml de caldo a 30°C, aire en la fase gaseosa, hasta alcanzar una densidad óptima correspondiente a 2,4 mg de peso seco de células de levadura por ml de caldo; considerando t=0 se añadió 100 λ de L-ácido glutámico- C^{14} (G) (20 μ C) y concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,5; 1,0; 2,5 y 10,0 μ g/ml. A los tiempos 10, 20, 30, 60 y 120 min. se tomaron muestras de 8 ml de cada uno de los erlenmeyers, dosándose el contenido en levadura. Las células se lavaron y fraccionaron.

Tiempo (min)	Cicloheximida (μ g/ml)	Total	C^{14} (cts/min/mg cél.) en :		
			Metanol-soluble	Acidos nucleicos	Insoluble
10	0	1.280,0	915,0	13,2	351,8
10	0,5	1.440,0	1.090,0	14,8	335,2
10	1,0	1.340,0	1.310,0	12,4	17,6
10	2,5	1.237,0	1.200,0	8,4	28,6
10	10,0	1.170,0	1.150,0	9,1	10,9
20	0	2.170,0	1.244,0	36,2	889,8
20	0,5	2.070,0	1.570,0	27,2	472,8
20	1,0	2.020,0	1.712,0	26,2	281,8
20	2,5	1.610,0	1.490,0	22,4	97,6
20	10,0	1.228,0	1.185,0	16,7	26,3
30	0	2.770,0	1.420,0	64,2	1.285,8
30	0,5	2.230,0	1.830,0	42,0	358,0
30	1,0	2.110,0	1.750,0	31,4	328,6
30	2,5	1.710,0	1.594,0	25,4	90,6
30	10,0	1.425,0	1.310,0	19,6	95,4
60	0	3.060,0	1.220,0	84,1	1.755,9
60	0,5	2.760,0	2.140,0	64,0	556,0
60	1,0	2.270,0	1.980,0	58,9	231,1
60	2,5	1.777,0	1.603,0	38,4	135,6
60	10,0	1.220,0	1.110,0	23,8	86,2
120	0	2.520,0	675,0	97,8	1.747,2
120	0,5	1.820,0	1.110,0	82,8	627,2
120	1,0	1.640,0	1.243,0	82,5	314,5
120	2,5	1.210,0	1.050,0	51,7	108,3
120	10,0	915,0	712,0	58,8	144,2

Tabla V-7.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C¹⁴ en los metabolitos meta- y L-agua solubles por incorporación de L-ácido glutámico-C¹⁴ (G) en S.cerevisiae.-Después de incubar según Tabla V-6, las células fueron lavadas y extraídas con metanol, cromatografiándose el sobrenadante. Se numeraron las columnas de acuerdo a la concentración de cicloheximida, en µg/ml. Los valores se agruparon en: %: radiactividad relativa; A.E.: radiactividad en cts/min/mg cél.

Tiempo: 10 min.

Sustancia	0		0,5		1,0		2,5		10,0	
	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.
Aminoácidos:										
Acido aspártico	1,4	12	0,6	7	1,9	25	2,1	25	2,2	26
Acido glutámico	76,4	690	73,6	802	76,2	1.000	73,0	876	74,5	870
Cistina	1,9	17	1,9	20	1,2	16	2,0	24	2,2	25
Glutamina	10,2	93	12,8	140	14,2	185	16,6	199	15,2	177
Alanina	0,9	8	0,8	8	0,6	8	0,6	8	1,0	12
Tirosina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prolina	3,3	30	2,8	30	2,0	26	1,2	14	0,9	11
Valina	1,8	16	2,4	26	1,4	18	1,9	23	1,4	16
Ornitina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Histidina	1,0	9	0,7	7	0,6	8	0,6	8	0,7	8
Acidos orgánicos:										
Cítrico	0,5	4	0,4	4	0,2	3	0,4	5	0,2	2
Málico	0,8	7	0,6	7	0,5	7	0,5	6	0,4	4
Succínico	1,4	13	1,6	17	0,2	3	0,6	7	0,4	4
No identificados	0,4	4	1,8	19	1,0	13	0,5	6	0,9	11

Tabla V-7: Tiempo: 20 min.

Sustancia	0		0,5		1,0		2,5		10,0	
	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.
Aminoácidos:										
Acido aspártico	1,2	15	1,1	17	1,8	31	1,1	16	1,7	20
Acido glutámico	69,5	864	67,0	1.050	63,6	1.090	69,5	1.037	66,7	790
Cistina	2,7	34	2,7	42	3,3	55	1,7	25	4,4	52
Glutamina	15,4	192	20,4	320	23,3	398	22,1	328	22,7	268
Alanina	0,6	8	0,7	10	0,4	7	0,4	5	0,3	4
Tirosina	0,7	9	0,5	8	0,8	14	0,7	10	0,5	6
Prolina	2,5	31	1,4	22	1,7	28	0,9	13	0,6	7
Valina	2,0	25	1,9	30	1,3	22	1,0	15	1,0	11
Ornitina	0,2	2	0,3	5	0,8	14	0,5	7	0,7	8
Histidina	0,6	8	0,6	9	0,5	9	0,3	5	0,4	4
Acidos orgánicos:										
Cítrico	0,3	4	0,2	3	0,2	3	0,2	3	0,1	1
Málico	0,6	7	0,4	6	0,4	7	0,3	4	0,2	3
Succínico	1,5	19	1,5	24	0,5	9	0,5	7	0,3	3
No identificados:	2,2	27	1,3	20	1,4	24	0,8	12	0,4	4

Tabla V-7: Tiempo: 30 min.

Sustancia	0		0,5		1,0		2,5		10,0	
	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.F.	%	A.E.
Aminoácidos:										
Acido aspártico	0,8	12	1,3	24	1,1	19	1,2	20	1,5	20
Acido glutámico	67,5	958	61,5	1.125	64,7	1.130	59,6	950	60,3	790
Cistina	2,2	32	3,8	69	3,5	62	4,1	65	3,4	57
Glutamina	15,4	219	23,0	421	22,2	388	25,9	412	15,2	330
Alanina	0,6	8	0,8	15	0,4	8	0,5	7	0,9	12
Tirosin	0,7	10	1,2	21	0,9	17	0,6	10	1,1	15
Prolina	3,4	48	2,0	37	1,6	27	1,3	21	1,0	13
Valina	2,3	32	1,4	26	2,7	47	2,6	41	2,9	38
Crnitina	1,4	20	1,3	24	0,8	14	0,9	14	0,8	10
Histidina	1,8	26	0,7	13	0,6	10	0,5	8	0,5	6
Acidos orgánicos:										
Cítrico	0,2	2	0,1	2	0,1	2	0,2	3	0,2	2
Málico	0,4	6	0,3	5	0,1	2	0,2	3	0,1	1
Succínico	0,9	13	0,4	8	0,2	4	0,3	5	0,2	2
No identificados	2,4	34	2,2	41	1,1	19	2,1	33	1,9	25

Tabla V-7: Tiempo: 60 min.

Sustancia	0	0,5	1,0	2,5-	10,0-
Aminoácidos:					
Acido aspártico	0,8	1,5	1,7	1,6	2,1
Acido glutámico	54,2	46,0	46,9	43,4	47,0
Cistina	5,4	4,6	6,1	5,8	6,3
Glutamina	19,7	34,6	34,1	40,2	32,2
Alanina	0,9	0,5	0,2	0,2	0,7
Tirosina	0,7	1,4	1,0	0,2	0,9
Prolina	3,8	1,5	1,8	1,3	1,8
Valina	3,2	3,2	2,4	1,8	2,3
Ornitina	1,5	1,4	1,9	0,8	0,4
Histidina	2,3	1,9	0,6	0,5	0,4
Acidos orgánicos:					
Cítrico	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
Mélico	0,5	0,2	0,2	0,2	0,7
Sucofnico	1,0	0,7	0,6	0,6	0,7
No identificados	5,7	2,4	2,4	3,3	4,4
	<u>A.E.</u>	<u>A.E.</u>	<u>A.E.</u>	<u>A.E.</u>	<u>A.E.</u>
	10	32	34	25	24
	660	985	926	728	522
	66	98	121	93	70
	240	740	670	644	358
	10	10	4	4	7
	8	31	20	4	11
	46	32	35	21	20
	38	68	48	29	26
	18	31	37	13	5
	28	41	13	8	5
	4	2	2	2	1
	6	4	4	4	8
	12	15	13	12	8
	70	51	48	52	50

Tabla V-7: Tiempo: 120 min.

Sustancia	0		0,5		1,0		2,5		10,0	
	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.
Aminoácidos:										
Acido aspártico	1,1	8	1,7	18	1,9	24	1,8	19	1,9	14
Acido glutámico	48,3	326	34,1	378	34,4	427	38,3	402	43,3	308
Cistina	7,7	52	7,8	86	10,8	125	8,1	85	8,3	59
Glutamina	16,3	110	41,0	454	36,3	451	34,4	362	30,7	218
Alanina	2,2	15	1,8	20	2,6	32	2,6	27	2,0	14
Tirosina	0,7	5	0,8	9	1,7	21	1,3	14	1,1	8
Prolina	11,5	77	3,4	38	2,4	29	3,0	32	2,5	18
Valina	3,0	20	2,5	28	2,2	27	2,0	21	1,6	11
Ornitina	2,8	19	2,8	31	4,4	55	3,6	38	2,7	19
Histidina	2,8	19	1,3	14	1,1	13	1,7	18	2,4	17
Acidos orgánicos:										
Cítrico	0,1	1	0,1	1	0,1	1	0,2	2	0,1	1
Málico	0,5	4	0,2	2	0,1	1	0,3	3	0,3	2
Succínico	1,2	8	0,9	10	0,8	10	0,8	8	0,7	5
No identificados:	1,8	12	1,6	17	1,2	15	1,9	20	2,4	17

Tabla V-8.-Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C¹⁴ en la fracción ácidos nucleicos. Después de incubar según Tabla V-6, la fracción ácidos nucleicos se hidrolizó y cromatografió. Los valores se agruparon en: $\frac{\%}{\%}$: radiactividad relativa; $\frac{A.E.}{A.E.}$: radiactividad en cts/min/mg cél.

Tiempo (min)	Cicloheximida ($\mu\text{g/ml}$)	Acidos nucleicos		Mancha N°1		Mancha N°2	
		A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%
10	0	13,2	40,3	5,7	59,7	7,5	7,5
10	0,5	14,8	35,2	5,2	64,8	9,6	9,6
10	1,0	12,4	26,2	3,2	73,8	9,2	9,2
10	2,5	8,4	30,3	2,5	69,7	5,9	5,9
10	10,0	9,1	28,6	2,6	71,4	6,5	6,5
20	0	36,2	28,4	10,3	71,6	25,9	25,9
20	0,5	27,2	24,9	6,8	75,1	20,4	20,4
20	1,0	26,2	20,0	5,2	80,0	21,0	21,0
20	2,5	22,4	25,4	5,7	74,6	16,7	16,7
20	10,0	16,7	24,4	4,1	75,6	12,6	12,6
30	0	64,2	20,0	12,8	80,0	51,4	51,4
30	0,5	42,0	19,0	8,0	81,0	34,0	34,0
30	1,0	31,4	19,3	6,1	80,7	25,3	25,3
30	2,5	25,4	15,7	4,0	84,3	21,4	21,4
30	10,0	19,6	14,0	2,7	86,0	16,9	16,9
60	0	84,1	26,8	22,6	73,2	61,5	61,5
60	0,5	64,0	21,4	13,7	78,6	50,3	50,3
60	1,0	58,9	22,2	13,1	77,8	45,8	45,8
60	2,5	38,4	27,2	10,4	72,8	28,0	28,0
60	10,0	23,8	21,4	5,1	78,6	18,7	18,7
120	0	97,8	20,4	20,0	79,6	77,8	77,8
120	0,5	82,8	26,8	22,2	73,2	60,6	60,6
120	1,0	82,5	19,2	15,8	80,8	66,7	66,7
120	2,5	51,7	28,2	14,6	71,8	37,1	37,1
120	10,0	58,8	28,0	16,5	72,0	42,3	42,3

CAPITULO VI

EFFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE EL METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS EN LEVADURA

Asimilación de adenina

Kerr y col. (115) estudiaron la incorporación de adenina-8-C¹⁴ por levadura en crecimiento y observaron que es utilizada casi totalmente en la formación de adenina y guanina de su RNA, que la guanina preformada inhibe la transformación de adenina a guanina, y que esta base solamente se incorpora como tal en el RNA; nucleósidos y nucleótidos de adenina y guanina son asimilados en escala muy pequeña para la síntesis de RNA. Lactobacillus casei (116) puede transformar rápidamente guanina en adenina y la interconversión de las dos purinas tiene lugar en presencia de cantidades adecuadas de las mismas, evidenciando un comportamiento distinto a la levadura. Abrams (117) comparó el comportamiento de una cepa de S.cerevisiae y su mutante dependiente de adenina: la adenina-8-C¹³ fue precursor de adenina y guanina en estas levaduras y, bajo las condiciones de crecimiento utilizadas, la mayor concentración isotópica se detectó siempre en guanina. Trabajando con médula ósea (118) la hipoxantina-8-C¹⁴ resultó ser precursor de adenina y guanina de los ácidos nucleicos. Levadura en crecimiento incorpora formato-C¹⁴ en las purinas de RNA, distribuyéndose por partes iguales en adenina y guanina (119); la adenina reduce la incorporación de formato en adenina y guanina de RNA; guanina y 2,6-diaminopurina disminuyen su incorporación en ácido guanílico, aumentando en cambio la utilización de formato para síntesis de adenina.

Para conocer el camino por el cual se llega a la conversión de adenina a guanina resultan de interés los estudios efectuados con el ácido inosínico y su pasaje a los ácidos adenílico y guanílico: a) el ácido inosínico se transforma en adenílico a través del adenilsuccínico como intermediario (120), siendo las dos reacciones reversibles; b) para lograr el ácido guanílico se pasa por intermedio del ácido xantílico que se obtiene por acción de una dehidrogenasa y en presencia de DPN, y que luego es aminado con glutamina como fuente de nitrógeno y ATP, y por efecto de una enzima que se purificó parcialmente de timo de ternero (121).

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de adenina-8-C¹⁴ por células proliferativas de levadura.- La célula entera de levadura incorpora mayor radiactividad cuando es tratada con el antibiótico: en los 20 minutos iniciales el incremento es de alrededor de un 20%; a los 30 minutos la marcación con

C^{14} aumenta en un 50% en relación con las células que no sufren la acción del antibiótico; a los 60 minutos es del 80% y a los 120 minutos desciende a un 50%.

La distribución relativa de C^{14} en la fracción nucleótidos libres va disminuyendo en los testigos durante el desarrollo de la experiencia: en los minutos iniciales representa el 65% de la radiactividad total, que desciende rápidamente al 47% a los 30 minutos y luego lentamente hasta llegar al 37% a los 120 minutos. La cicloheximida condiciona una acumulación de radiactividad en esta fracción que ya se puede notar por la presencia de 0,5 μ g de antibiótico y que se acentúa con mayores concentraciones; si bien a través del tiempo disminuye ligeramente este aumento, menos del 10%, se mantiene en valores más altos con respecto a los testigos. La rotulación total de los nucleótidos libres sufren las siguientes modificaciones: en los testigos desciende de 4.880 cuentas por minuto a 2.200; utilizando 0,5 μ g de cicloheximida este efecto ya no es tan acentuado (de 6.000 a 4.600) y con las concentraciones restantes de antibiótico que se aplicaron durante la experiencia se observa un incremento en los primeros 30 minutos que luego desciende hasta los valores iniciales.

La radiactividad relativa que se determina en los ácidos nucleicos es complementaria con la de los nucleótidos libres: aumento del porcentaje en los testigos durante los 120 minutos del experimento; inhibición en las células tratadas con antibiótico, efecto que se hace menor con el transcurso del tiempo. La radiactividad total de los testigos alcanza rápidamente un máximo que se mantiene hasta el final. Las células tratadas con cicloheximida incorporan menor radiactividad, pero la diferencia con los testigos se hace más pequeña después de los 120 minutos. (Tabla VI-1). Las modificaciones relativas se observan en la Figura VI-1.

Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en:

Nucleótidos libres: La adenina se transforma parcialmente en guanina, siendo las 2 únicas bases purinicas que incorporan radiactividad. La distribución relativa de C^{14} en los testigos se mantiene sin modificación a lo largo de la experiencia, correspondiendo alrededor del 87% a la adenina y el resto a la guanina; en cambio el antibiótico facilita la interconversión de la primera a la segunda, fenómeno que se acentúa con concentraciones más elevadas del inhibidor y durante el transcurso del experimento. La radiactividad total que corresponde a la adenina de los testigos disminuye de algo más de 4.000 cuentas por minuto a 2.000; las células que fueron puestas en presencia de cicloheximida incorporan alrededor de 5.000 cuentas por minuto en los primeros 10 minutos, aumenta ligeramente hasta los 30 minutos para disminuir luego hasta llegar a unas 4.000 cuentas al final de la incubación. La incorporación de C^{14} en

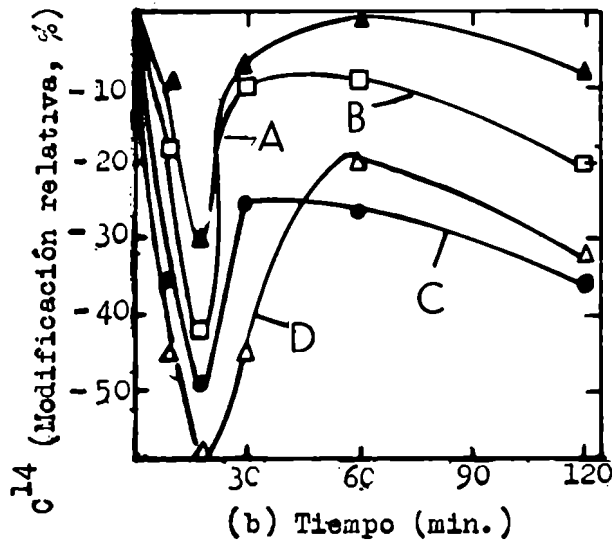
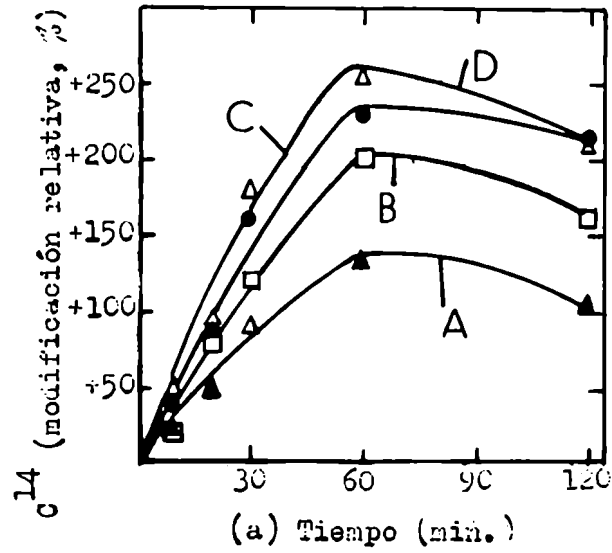


Fig. VI-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de adenina- β - C^{14} en células proliferativas de *S. cerevisiae* en las fracciones: (a) nucleótidos libres y (b) ácidos nucleicos. Condiciones experimentales descritas en Tabla VI-1. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5 y D: 10,0 μ g de cicloheximida por ml.

Tabla VI-1. Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de adenina-8-C¹⁴ en nucleótidos libres y ácidos nucleicos de células proliferativas de S.cerevisiae.-

Se cultivó la levadura en caldo a 30°C, aire en la fase gaseosa, hasta alcanzar una densidad óptica correspondiente a 3,0 mg de peso seco por ml de caldo, entonces se consideró tiempo=0 y se añadió 100 λ de adenina-8-C¹⁴ (16,7 μC) y concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,5; 1,0; 2,5 y 10,0 μg/ml. A los tiempos 10, 20, 30, 60 y 120 min. se tomaron muestras de 6 ml de cada uno de los erlenmeyers, dosándose el contenido en levadura. Las células se lavaron y fraccionaron. Los valores se agruparon en: ℅: radiactividad relativa; A.E.: radiactividad en cts/min/mg cél.

Tiempo (min.)	Cicloheximida (μg/ml)	Totales		Nucleótidos libres		Acidos nucleicos	
		<u>A.E.</u>	<u>℅</u>	<u>A.E.</u>	<u>℅</u>	<u>A.E.</u>	<u>℅</u>
10	0	7.500	65,0	4.880	35,0	2.620	
10	0,5	8.520	71,9	6.130	28,1	2.390	
10	1,0	8.160	73,5	6.000	26,5	2.160	
10	2,5	8.410	79,6	6.700	20,4	1.710	
10	10,0	8.740	83,5	7.300	16,5	1.440	
20	0	8.600	51,2	4.410	48,8	4.190	
20	0,5	9.490	69,2	6.570	30,8	2.920	
20	1,0	10.320	76,4	7.890	23,6	2.430	
20	2,5	10.020	79,0	7.880	21,0	2.140	
20	10,0	9.400	83,0	7.800	17,0	1.600	
30	0	7.000	46,7	3.270	53,3	3.730	
30	0,5	9.630	64,1	6.170	35,9	3.460	
30	1,0	10.550	68,0	7.170	32,0	3.380	
30	2,5	11.340	75,4	8.560	24,6	2.780	
30	10,0	11.200	81,8	9.160	18,2	2.040	
60	0	5.360	41,8	2.240	58,2	3.120	
60	0,5	8.720	60,3	5.260	39,7	3.460	
60	1,0	9.600	70,4	6.760	29,6	2.840	
60	2,5	9.750	76,4	7.450	23,6	2.300	
60	10,0	11.370	77,9	8.860	22,1	2.510	
120	0	6.150	37,0	2.280	63,0	3.870	
120	0,5	8.180	56,3	4.600	43,7	3.580	
120	1,0	9.000	65,6	5.900	34,4	3.100	
120	2,5	9.650	74,6	7.200	25,4	2.450	
120	10,0	9.650	72,6	7.000	27,4	2.650	

la guanina de los testigos disminuye de 600 a 300 cuentas por minuto, en cambio la levadura que fue previamente tratada con el antibiótico se encuentra más marcada con C^{14} , alcanzando ya a los 60 minutos el máximo de este efecto.

En los 10 minutos iniciales, por acción de las concentraciones crecientes de cicloheximida se determina un incremento de la radioactividad en la adenina que va del 20 al 30% y en la guanina del 40 al 140%; a los 30 minutos, este efecto oscila en la primera entre el 80 y 140% y en la segunda entre 130 y 300% y ya en la primer hora de incubación se llega al máximo: en la adenina se incorpora algo más del doble de la radioactividad en relación con los testigos y en la guanina el aumento está entre 4 y 9 veces. En la Figura VI-2 se observan las modificaciones relativas de adenina y guanina en nucleótidos libres.

Acidos nucleicos: En ausencia del antibiótico la radioactividad relativa se modifica poco, para la adenina oscila entre el 74 y 78% correspondiendo el resto a guanina. La cicloheximida facilita la acumulación relativa de adenina marcada con C^{14} durante los primeros 60 minutos, desapareciendo este efecto en el transcurso de la segunda hora de incubación. La otra base purínica experimenta el proceso contrario.

La radioactividad total que incorpora la adenina se ve afectada por la presencia del agente fungistático; en los 30 minutos iniciales el efecto es más evidente, llega al 58% de inhibición en vinculación con los testigos y luego desciende hasta un 30%. En la guanina la inhibición es más acentuada: 75% a los 20 minutos y después también disminuye el porcentaje a alrededor del 30. (Tabla VI-2).

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de adenina-8- C^{14} por células en reposo de levadura.- La cicloheximida provoca una mayor incorporación de radioactividad en la célula entera: si bien en los 10 minutos iniciales casi no se notan diferencias, a los 20 minutos de incubación con cantidades crecientes de antibiótico el incremento llega a más del 30%; a los 30 minutos se alcanza el 80% y a los 60 minutos se duplica la cantidad de C^{14} en relación con los testigos. Los nucleótidos libres representan más del 90% de la radioactividad total que asimilan los testigos, siendo una proporción que no se altera durante la experiencia; sin embargo en las células tratadas se encuentra una disminución en el porcentaje correspondiente a esta fracción, efecto que se intensifica con el tiempo. En la fracción de los ácidos nucleicos esta acción se realiza en el sentido contrario.

La marcación total con C^{14} de los nucleótidos libres casi no se modifica a los 10 minutos de iniciada la experiencia, a los 20 minutos se incre-

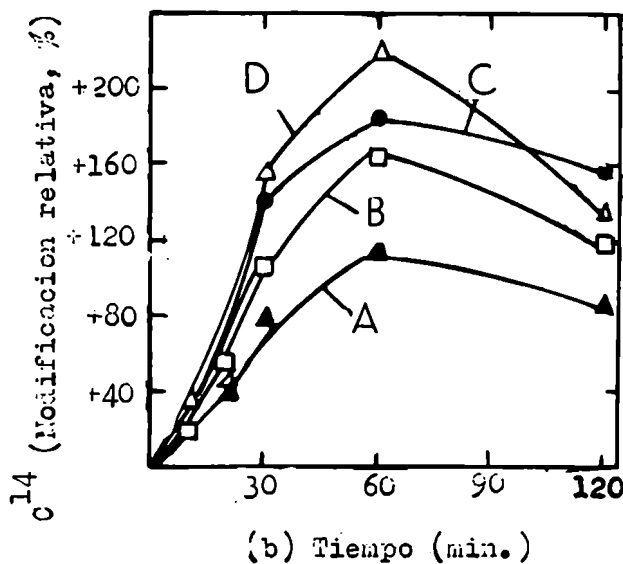
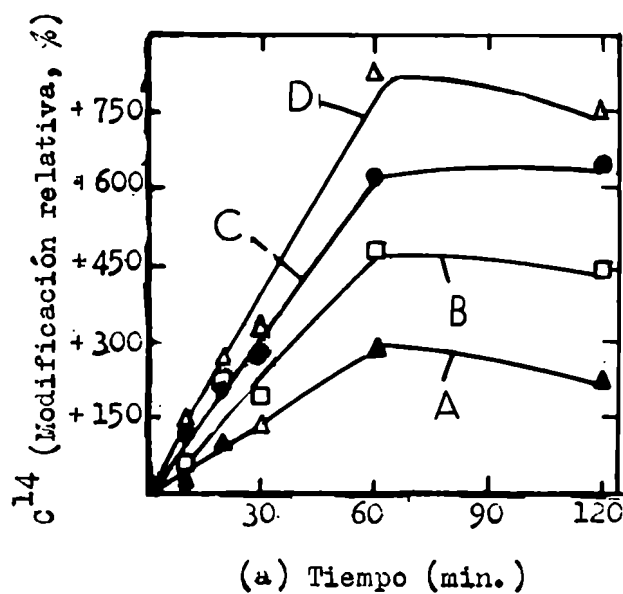


Fig.VI-2.-Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de adenina- $\delta-C^{14}$ en células proliferativas de *S. cerevisiae* en las bases de los nucleótidos libres: (a) guanina y (b) adenina. Condiciones experimentales descritas en Tabla VI-2 y Tabla VI-1. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5; y D: 10,0 μ g de cicloheximida por ml.

Tabla VI-2. Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C¹⁴ en nucleótidos libres y ácidos nucleicos de células proliferativas de *S.cerevisiae*.- Condiciones experimentales iguales a las descritas en la Tabla VI-1.

Tiempo (min)	Cicloheximida (µg/ml)	Nucleótidos libres				Acidos nucleicos			
		Guanina		Adenina		Guanina		Adenina	
		%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.	%	A.E.
10	0	13,2	640	86,8	4.240	26,0	683	74,0	1.937
10	0,5	14,0	860	86,0	5.270	23,5	563	76,5	1.827
10	1,0	16,3	980	83,7	5.020	23,5	509	76,5	1.651
10	2,5	21,8	1.460	78,2	5.240	21,1	362	78,9	1.348
10	10,0	21,2	1.550	78,8	5.750	18,0	260	82,0	1.180
20	0	13,0	570	87,0	3.840	24,6	1.031	75,4	3.159
20	0,5	17,5	1.150	82,5	5.420	24,3	710	75,7	2.210
20	1,0	23,8	1.890	76,2	6.000	19,6	477	80,4	1.953
20	2,5	22,9	1.800	77,1	6.080	17,0	365	83,0	1.775
20	10,0	27,6	2.160	72,4	5.640	16,8	268	83,2	1.332
30	0	15,8	510	84,2	2.760	23,0	858	77,0	2.872
30	0,5	18,6	1.150	81,4	5.020	23,0	795	77,0	2.665
30	1,0	20,2	1.450	79,8	5.720	18,2	615	81,8	2.765
30	2,5	22,2	1.900	77,8	6.660	17,5	486	82,5	2.294
30	10,0	23,5	2.160	76,5	7.000	18,4	376	81,6	1.664
60	0	11,9	260	88,1	1.980	20,5	640	79,5	2.480
60	0,5	19,1	1.010	80,9	4.250	24,2	838	75,8	2.622
60	1,0	22,4	1.510	77,6	5.250	25,9	736	74,1	2.104
60	2,5	24,8	1.850	75,2	5.600	18,1	416	81,9	1.884
60	10,0	28,1	2.490	71,9	6.370	18,0	453	82,0	2.057
120	0	12,4	280	87,6	2.000	21,7	840	78,3	3.030
120	0,5	19,3	890	80,7	3.710	23,5	841	76,5	2.739
120	1,0	25,7	1.520	74,3	4.380	24,7	768	75,3	2.332
120	2,5	29,2	2.100	70,8	5.100	21,8	534	78,2	1.916
120	10,0	34,0	2.380	66,0	4.620	22,4	595	77,6	2.055

Tabla VI-3. Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de adenina-8-C¹⁴ en nucleótidos libres y ácidos nucleicos de células en reposo de S.cerevisiae.- 56,4mg de células de levadura en reposo suspendidas en 1,25mM de buffer fosfato pH 6,0; 31 μ M de glucosa, volumen final 25 ml, aire en la fase gaseosa, incubadas durante 60 min. con 100 λ de adenina-8-C¹⁴ (16,7 μ C) y concentraciones finales de cicloheximida de 0; 0,5; 1,0; 2,5 y 10,0 μ g/ml. Se tomaron alícuotas a los 10, 20, 30, 60 y 120 min. Los valores se agruparon en: $\%$: radiactividad relativa; A.E.: radiactividad en cts/min/mg.cél.

Tiempo (min.)	Cicloheximida (μ g/ml)	Totales		Nucleótidos libres		Ácidos nucleicos	
		<u>A.E.</u>	$\%$	<u>A.E.</u>	$\%$	<u>A.E.</u>	
10	0	6.352	94,0	5.970	6,0	382	
10	0,5	6.848	92,3	6.320	7,7	528	
10	1,0	7.208	92,7	6.680	7,3	528	
10	2,5	7.770	91,8	7.140	8,1	630	
10	10,0	6.623	88,8	5.880	11,2	743	
20	0	10.286	92,8	9.550	7,2	736	
20	0,5	12.083	90,9	10.980	9,1	1.103	
20	1,0	13.402	90,6	12.140	9,4	1.262	
20	2,5	14.498	88,8	12.880	11,2	1.618	
20	10,0	13.565	87,9	11.920	12,1	1.645	
30	0	11.189	93,0	10.400	7,0	789	
30	0,5	12.580	88,2	11.100	11,8	1.480	
30	1,0	15.915	85,3	13.580	14,7	2.335	
30	2,5	18.650	86,0	16.050	14,0	2.600	
30	10,0	18.900	85,7	16.200	14,3	2.700	
60	0	13.247	92,1	12.200	7,9	1.047	
60	0,5	19.700	82,7	16.300	17,3	3.400	
60	1,0	25.710	86,0	22.100	14,0	3.610	
60	2,5	26.470	84,6	22.400	15,4	4.070	
60	10,0	27.350	81,9	22.400	18,1	4.950	

menta hasta un 25%, a la media hora el aumento llega al 55% y a los 60 minutos se alcanza un 83%. Este efecto se encuentra acentuado en los ácidos nucleicos: hasta los 20 minutos se duplica la marcación de esta fracción cuando actúa el antibiótico, a los 30 minutos se triplica y a los 60 minutos se cuadruplica. (Tabla VI-3). Las modificaciones relativas se observan en la Figura VI-3).

Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en:

Nucleótidos libres: En las células que no fueron tratadas con el antibiótico, hasta los 10 primeros minutos la adenina representa más del 90% de la radiactividad correspondiente a esta fracción, pero a partir de los 20 minutos se llega al equilibrio en la interconversión adenina-guanina: alrededor del 84% para la primera y el resto para guanina. Cuando actúa la cicloheximida el equilibrio se desplaza hacia una mayor formación de guanina, correspondiéndole a esta base purínica cerca de $1/4$ de la radiactividad y $3/4$ a la adenina. La mayor incorporación de C^{14} provocada por el antibiótico se diferencia según sea la base en la cual se realice: en la adenina el incremento llega al 60% (de 10.000 a 16.000 cuentas por minuto y mg de célula) a los 60 minutos de incubación; en la guanina se alcanza a triplicar la cantidad de C^{14} . En la Figura VI-4 se observan las modificaciones relativas de adenina y guanina en nucleótidos libres.

Ácidos nucleicos: La radiactividad relativa que le corresponde a la adenina varía entre el 79 y 75% y el resto a guanina. Cuando se pone a la levadura en presencia del inhibidor se manifiestan escasas modificaciones en la distribución porcentual del C^{14} . La marcación total de cada una de las bases experimentan por acción del antibiótico un aumento semejante al que sufren los ácidos nucleicos: duplicación hasta los 20 minutos, se triplica a la media hora y cuadruplica al final. (Tabla VI-4).

Incorporación y transferencia de L-leucina- C^{14} por preparados libres de célula de levadura

Desde hace varios años se vienen realizando numerosos trabajos tendientes a explicar los mecanismos por los cuales se provoca la biosíntesis de las proteínas y el papel que le cabe a los diversos componentes de los ácidos nucleicos en dicho proceso. Resultados similares se fueron obteniendo con preparados libres de célula de tejidos animales, así como de plantas, bacterias y hongos. Al mismo tiempo se fueron programando estudios con sistemas in vivo con la finalidad de alcanzar respuestas similares a las que se llegaron con sistemas in vitro.

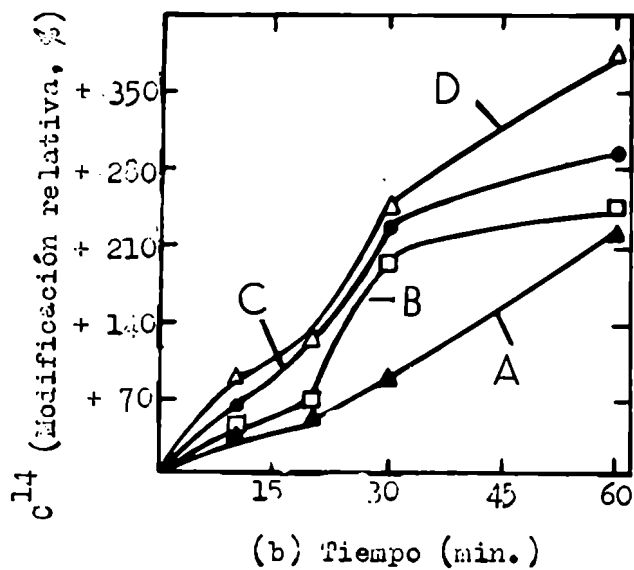
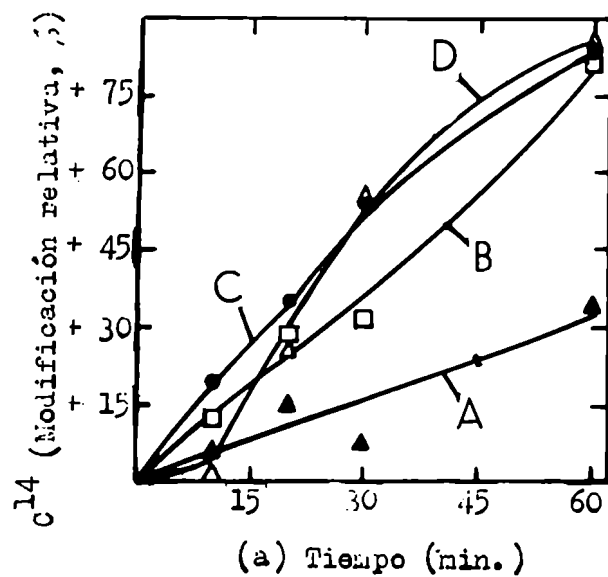


Fig. VI-3.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de adenina- $3-C^{14}$ en células en reposo de *S. cerevisiae* en las fracciones: (a) nucleótidos libres y (b) ácidos nucleicos. Condiciones experimentales descritas en Tabla VI-3. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5 y D: 10,0 μg de cicloheximida por ml.

Hoagland (122) y Hoagland y col. (123) señalaron que para que hubiera incorporación de aminoácidos en los ribosomas (partículas de ribonucleo - proteínas) era necesaria la presencia de un complejo de enzimas, llamadas de pH 5, que catalizan la activación del grupo carboxilo de los aminoácidos y que por reacción con ATP da lugar a un adenil-derivado y pirofosfato. DeMoss y Novelli (124) (125) y Berg (126) observaron el mismo efecto en preparados libres de célula obtenidos a partir de bacterias y levadura. Después de separar los ribosomas por centrifugación a 100.000 x g, se encontró en la fracción soluble un tipo de RNA de bajo peso molecular (127) (81) que representa entre el 10 y 20% del RNA total, cuya función es la de unirse al aminoácido activado y transferirlo al ribosoma, de allí su nombre de RNA soluble (S-RNA) o RNA de transferencia. Diversos autores destacaron que el S-RNA también se encuentra presente en diversos microorganismos; entre otros Tissières (128) en E.coli y Monier y col. (69) en levadura. Lacks y Gros (129) estudiaron los fenómenos de transferencia de aminoácidos en sistemas in vivo de E.coli. Esta fracción se aisló de los preparados libres de célula, mediante el empleo de la técnica de Kirby (70) y también de la célula entera de levadura por extracción directa con fenol (69).

La utilización de diversas técnicas llevaron a la conclusión de que la fracción S-RNA era en realidad una mezcla de S-RNA específicos para cada aminoácido. Smith y col. (130) emplearon técnicas cromatográficas; Holley y col. (131) (132) (133) (134) consiguieron separar S-RNA específicos mediante la distribución en contracorriente; Hartmann y Coy (135) utilizaron hidroxilapatita; Ofengand y col. (136) realizaron cromatografía sobre Ecteola-celulosa; Zamecnik y col. (137), Portatius y col. (138) y Zubay (139) aprovecharon la presencia de los dos hidroxilos libres de la ribosa terminal del S-RNA para oxidarlos a dialdehído y por la reactividad de estos grupos se separa el S-RNA específico.

Por los trabajos de Hecht y col. (80) (76) y Herbert (140) (141) se considera que el nucleótido terminal de las moléculas de S-RNA es AMP y que los dos siguientes son dos moléculas de CMP y que la unión se realiza por la acción de un sistema enzimático específico. Las enzimas que activan a los aminoácidos resultaron ser específicas para cada uno de ellos y también las causas de la unión del aminoácido activado con el S-RNA (142) (143) (144). Esta unión se realiza a través del carboxilo del primero y el hidroxilo 2' o 3' libre de la ribosa del AMP terminal del segundo (145) (146) (147).

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-leucina-C¹⁴ en S-RNA.-

Se aplicaron varias técnicas (ver Material y Métodos) para fraccionar la célula de levadura y se introdujeron variantes en los componentes que constituían el sistema de incubación hasta lograr las cifras que se verifican en la tabla

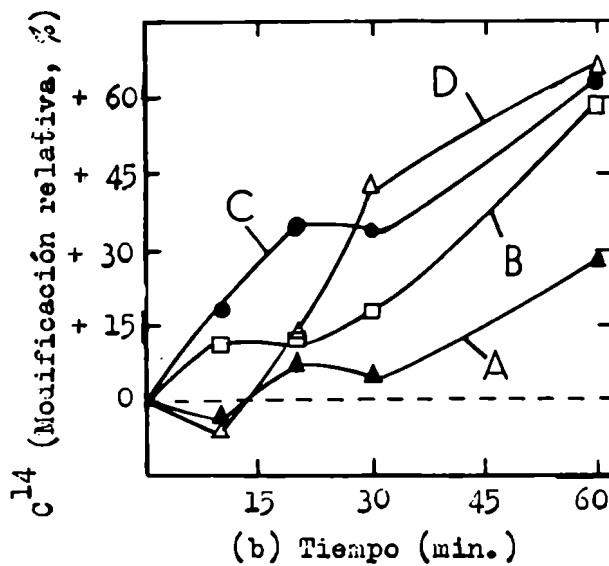
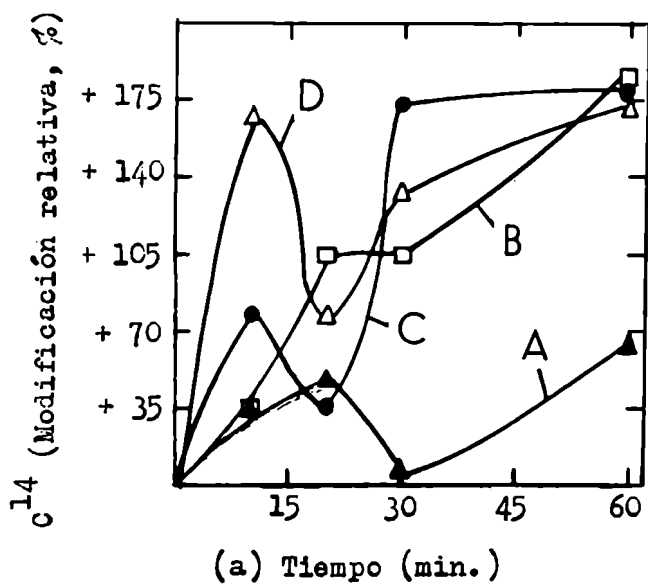


Fig. VI-4.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de adenina-8- C^{14} en células en reposo de *S.cerevisiae* en las bases de los nucleótidos libres: (a) guanina y (b) adenina. Condiciones experimentales descritas en Tabla VI-4 y Tabla VI-3. A: 0,5; B: 1,0; C: 2,5; y D: 10,0 μ g de cicloheximida por ml.

Tabla VI-4. Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C¹⁴ en nucleótidos libres y ácidos nucleicos de células en reposo de S. cerevisiae.- Condiciones experimentales iguales a las descritas en la Tabla VI-3.

Tiempo (min.)	Cicloheximida (µg/ml)	Nucleótidos libres		Acidos nucleicos		
		Guanina %	Adenina %	Guanina %	Adenina %	
		A.E.	A.E.	A.E.	A.E.	
10	0	2,6	97,4	20,9	79,1	302
10	0,5	11,1	88,9	33,5	66,5	352
10	1,0	3,1	96,9	26,2	73,8	390
10	2,5	4,0	96,0	16,2	83,8	528
10	10,0	7,0	93,0	18,0	82,0	609
20	0	16,4	83,6	21,2	78,8	580
20	0,5	21,8	78,2	20,3	79,7	879
20	1,0	26,5	73,5	20,1	79,9	1.010
20	2,5	16,5	83,5	23,0	77,0	1.246
20	10,0	24,0	76,0	16,8	83,2	1.369
30	0	15,4	84,6	20,4	79,6	628
30	0,5	16,6	83,4	23,0	77,0	1.140
30	1,0	23,7	76,3	25,1	74,9	1.749
30	2,5	27,0	73,0	29,7	70,3	1.828
30	10,0	22,6	77,4	26,2	73,8	1.993
60	0	16,8	83,2	24,4	75,6	791
60	0,5	20,0	80,0	28,8	71,2	2.420
60	1,0	27,3	72,7	29,2	70,8	2.557
60	2,5	26,4	73,6	30,9	69,1	2.810
60	10,0	24,3	75,7	24,6	75,4	3.730

VI-5. En la misma se observa que con una concentración elevada de antibiótico, la incorporación del aminoácido solamente se inhibe en 12,5%.

Efecto de la cicloheximida sobre la transferencia de L-leucina-C¹⁴ desde S-RNA a ribosoma.- Con las mismas aclaraciones que se tuvieron en cuenta en el párrafo anterior, se constata el efecto del antibiótico sobre la transferencia del aminoácido en la Tabla VI-6: la cicloheximida inhibe en un 60% la incorporación en el ribosoma del aminoácido unido al S-RNA.

Tabla VI-5.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-leucina-C¹⁴(U) en S-RNA de levadura.-El sistema contenía 10 μ M Mg-ATP, 0,5 μ M CTP, 50 μ M buffer Tris-HCl (pH 7,6), 5 μ M MgCl₂, 0,2 mg S-RNA, 0,3 ml de enzimas pH 5,0 preincubadas y 0,26 μ M L-leucina-C¹⁴ (U) en un volumen final de 1,0 ml. Se incubó con cicloheximida (20 μ g/ml) durante 20 min. a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo en frío: 1 vez HClO₄ 0,4N; 3 veces HClO₄ 0,2N; 1 vez una mezcla de etanol-HClO₄ 0,2N (5:1); 3 veces etanol; 1 vez acetona y 2 veces éter etílico. Luego se determinó la radiactividad.

	L-leucina unida a S-RNA (μ M/mg S-RNA)	% Inhibición
Sistema completo	0,40	-
Sistema completo+cicloheximida	0,35	12,5

Tabla VI-6.- Efecto de la cicloheximida sobre la transferencia de L-leucina-C¹⁴ (U) desde S-RNA a ribosoma de levadura. El sistema contenía 10 μ M Mg-ATP; 0,5 μ M GTP, 50 μ M buffer Tris-HCl (pH 7,6), 5 μ M MgCl₂, 50 μ M KCl, 1 μ M GSH, 1 mg (proteínas) enzimas pH 5,0, 0,2 mg L-leucina-C¹⁴(U) unida a S-RNA y 5,6 mg de ribosomas en un volumen final de 1,0 ml. Se incubó con cicloheximida (20 μ g/ml) durante 20 min. a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo en frío TCA 5%, el precipitado se lava 2 veces con TCA 5% y una vez con etanol-éter etílico (3:1), luego se calienta a 90°C durante 15 min. con TCA 5%, se enfría, centrifuga y descarta el sobrenadante; el precipitado se lava una vez más con etanol-éter. Finalmente se determinó la radiactividad.

	L-leucina-C ¹⁴ transferida (μ M/ml)	% Inhibición
Sistema completo	0,20	-
Sistema completo+cicloheximida	0,08	60

CAPITULO VII

DISCUSION

Previo a la discusión de los resultados obtenidos, es conveniente reseñar las observaciones realizadas durante el estudio del efecto de la cicloheximida sobre diversos procesos metabólicos de la célula de levadura considerada en dos etapas de su desarrollo, exponencial y reposo.

A. Síntesis de proteínas:

- a) La asimilación de aminoácidos no se modifica y a veces hay acumulación del C^{14} proveniente de los aminoácidos marcados, pero se altera la distribución del C^{14} incorporado en los metabolitos solubles.
- b) La activación de aminoácidos no es afectada.
- c) La unión del aminoácido activado al S-RNA disminuye ligeramente con concentraciones relativamente elevadas de antibiótico.
- d) La transferencia del aminoácido unido al S-RNA hacia el ribosoma se inhibe en un 60% con 20 μ g/ml.
- e) La incorporación de aminoácidos en las proteínas de la célula entera se inhibe casi íntegramente con las concentraciones mínimas inhibitorias de la cicloheximida.

B. Síntesis de ácidos nucleicos.

- a) Los nucleótidos libres de células proliferativas y en reposo acumulan C^{14} con modificación de la conversión de adenina en guanina (aumento de guanina).
- b) Los ácidos nucleicos de células proliferativas incorporan menos C^{14} proveniente de glicina-1- C^{14} y adenina-8- C^{14} .
- c) Los ácidos nucleicos de células en reposo incorporan más C^{14} proveniente de glicina-1- C^{14} y adenina-8- C^{14} .

C. Procesos
metabólicos.

- a) La oxidación de glucosa y acetato disminuye en un 20% con las concentraciones mínimas inhibitorias.
- b) La asimilación de glucosa y acetato no se altera pero se modifica la distribución del C¹⁴.
- c) La incorporación en la fracción insoluble del C¹⁴ proveniente de glucosa y acetato se inhibe en un 50%.

D. Incorporación
de P³²

- a) El P³² se incrementa dentro de la célula sin modificación de la concentración del fósforo desde ni de su distribución.

Efecto de la cicloheximida sobre la síntesis de las proteínas y ácidos nucleicos.-

La interdependencia entre la presencia de los ácidos nucleicos y la síntesis de las proteínas ha llamado la atención desde hace tiempo (148), por lo que se determinó una relación directa entre el contenido de ácidos nucleicos y la síntesis proteica, Magasanik y col. (149) y Gros (150). Por otra parte, se demostró la necesidad de la participación de aminoácidos para asegurar la síntesis de RNA, (Gale y Folkes (151), Pardee y Prestige (152) y Gros (153)). El presente trabajo se realizó teniendo en cuenta estas ideas y a los trabajos de Kerridge (51) (52) quien informó que el efecto de la cicloheximida sobre S. carlsbergensis se ejercía sobre la síntesis de las proteínas y ácidos nucleicos.

La inhibición que la cicloheximida condiciona sobre la síntesis de las proteínas en células de levadura es un hecho de innegable evidencia: prácticamente no incorporan la radiactividad proveniente del C¹⁴ de varios aminoácidos marcados, cuando se encuentran frente a las concentraciones mínimas inhibitorias del antibiótico. Este fenómeno no se puede atribuir a la ausencia de aminoácidos, ya que la asimilación de los mismos se ve libre sin impedimentos, estando la radiactividad total presente en los metabolitos solubles poco alterada, e incluso a veces se acumula por acción de la cicloheximida.

Se hicieron preparados in vitro buscando caracterizar las posibles etapas de la biosíntesis proteica que el antibiótico inhibiría: no se afectó la activación de los aminoácidos y la unión de éstos con S-RNA solamente se modifica en pequeña escala y con concentraciones relativamente elevadas del antibiótico, sin observarse una acción sobre las enzimas ac-

tivantes de pH 5,0; en cambio la transferencia de aminoácidos unidos al S-RNA hacia los ribosomas se inhibe en un 60%, aunque utilizando 20 µg de cicloheximida por ml. Si bien no se alcanza al casi 100% de inhibición que sufre la síntesis de las proteínas en la célula entera tratada con las concentraciones mínimas inhibitorias del antibiótico (1 a 2,5 µg/ml), el resultado sugiere la desorganización de la síntesis del RNA de mayor pesos molecular, con la acumulación de fragmentos de RNA de menor peso molecular. Estas observaciones hechas in vitro se deben vincular con las realizadas cuando se estudió la incorporación de glicina-1-C¹⁴ y adenina-8-C¹⁴ en las bases de los ácidos nucleicos, ya que es probable que la alteración de la síntesis de los ácidos nucleicos explique la inhibición de la síntesis de las proteínas.

La incorporación de glicina-1-C¹⁴ y adenina-8-C¹⁴ en una menor escala dentro de las bases purínicas de los ácidos nucleicos de las células proliferativas, revelan una disminución de la síntesis de novo de los ácidos nucleicos de la cicloheximida, sin que se observen modificaciones en la distribución del C¹⁴ de la glicina en adenina y guanina, ni en la conversión de adenina incorporada en guanina. Sin embargo las células en reposo no experimentan esta inhibición; por el contrario, acumulan la radiactividad proveniente de los sustratos marcados, y aquí tampoco se provoca una alteración en la distribución de la radiactividad entre las bases purínicas. Este comportamiento distinto de las células en reposo en relación con lo que ocurre en las células proliferativas cuando se las coloca frente a la cicloheximida, se puede explicar con la siguiente argumentación: la reserva de aminoácidos y nucleótidos en una levadura que crece exponencialmente se convierten irreversiblemente en proteínas y ácidos nucleicos (154), mientras que las células en reposo son capaces de volver a integrar sus reservas de aminoácidos y nucleótidos libres por degradación de las proteínas intracelulares y ácidos nucleicos, y con una fuente de energía externa estos productos de degradación son reutilizados para la síntesis de nuevas proteínas y ácidos nucleicos (155).

El análisis de la fracción de los nucleótidos libres revela la existencia de una acumulación de los mismos provocada por la acción del antibiótico, con la característica de que la conversión de adenina a guanina que normalmente tiene lugar en la levadura, se halla desplazada hacia una mayor presencia de guanina. Esta conversión procedería de la siguiente manera: una vez que la adenina pasa a su respectivo nucleótido por reacción con fosforil boalfosfato y en presencia de la pirofosforilasa correspondiente, el ácido adenílico se modificaría hasta llegar a ácido guanílico pasando previamente por ácido inosínico que entonces se transforma en ácido xantílico, nucleótido que enzimáticamente es aminado por la glutamina (o amoníaco en el caso

de algunos microorganismos) para llegar a ácido guanílico (^{14}C), el aumento de los nucleótidos libres que tiene lugar en la levadura tratada con cicloheximida es válido tanto para las células proliferativas como para las células en reposo, aunque en el primer caso hay una mayor proporción de adenina transformada en guanina.

El aumento de guanina a expensas de la adenina incorporada se podría deber al hecho de que la cicloheximida antagonizara al ácido fólico. Esta hipótesis ha sido propuesta por Goldthwait y Bendish (196) quienes trabajando con diversos órganos de ratas observaron que la cicloheximida, antagonista del ácido fólico, al inhibir la síntesis de pyc de los ácidos nucleicos, menos incorporación de ^{14}C los mismos, determinando que la guanina proveniente de adenina- N^{15} exógena se encuentre considerablemente aumentada. Aquí se nota un estrecho paralelismo con la acción que la cicloheximida imprime sobre las células proliferativas de levadura, al disminuir la incorporación de glicina- $l-C^{14}$ en los ácidos nucleicos y un incremento en guanina proveniente de la adenina- $o-C^{14}$ asimilada durante condiciones experimentales semejantes para ambos sustratos marcados.

El haber aplicado la técnica de Harris y Thompson (60), es decir la extracción de la fracción constituida por nucleótidos libres con una solución hidroalcohólica antes de obtener la fracción de los ácidos nucleicos con TCA en caliente, ha permitido obtener la menor incorporación de adenina- $o-C^{14}$ en los ácidos nucleicos de las células proliferativas tratadas con cicloheximida y la consiguiente acumulación de nucleótidos libres. La extracción directa con TCA en caliente hubiera inducido a creer que la cicloheximida provocaría un incremento en la síntesis de los ácidos nucleicos, ya que la suma de la radioactividad incorporada por ambas fracciones es mayor que en las células normales.

La acumulación de nucleótidos libres con una alteración en la composición relativa de sus bases, la menor síntesis de los ácidos nucleicos en las células proliferativas y la inhibición casi total de la síntesis de las proteínas, sugieren algunas ideas con respecto al modo de acción de la cicloheximida sobre la levadura: podría modificarse el funcionamiento de la polirribonucleótido fosforilasa impidiendo la formación de polirribonucleótidos; una alteración o inhibición del "RNA mensajero" bloquearía el transporte del código determinante de las secuencias de los aminoácidos, desde el mRNA a las fracciones ribosomales donde ocurre la síntesis de las proteínas; estaría inhibida la síntesis del DNA o cambiada de tal manera su organización que se impediría obtener la información necesaria para la síntesis de las proteínas.

Otros efectos de la cicloheximida

Efecto de la cicloheximida sobre el metabolismo de aminoácidos

La célula de levadura que incorpora la radiactividad previamente de aminoácidos marcados en C^{14} , en presencia de cicloheximida ve modificada la distribución del C^{14} entre los metabolitos solubles en metanol-agua, salvo en el caso de la asimilación de valina- C^{14} que no se modifica como metabolito soluble y que normalmente se encuentra presente en la reserva de aminoácidos libres en una concentración relativamente pequeña.

Cuando se introduce glicina marcada en un medio de cultivo que cuenta con cicloheximida como inhibidor, se observa la modificación de los valores alcanzados en la interconversión glicina-serina, provocándose una mayor acumulación de serina retulada. Un fenómeno análogo sucede cuando se utiliza formato- C^{14} (106). Una posible explicación se podría encontrar en la inhibición de la transferencia del carbono β de la serina por bloqueo del metabolismo del ácido fólico. Estudios en ratas revelaron una reducción de la conversión de serina a glicina, al suministrar se dietas deficientes en ácido fólico (157).

Después de cultivar la levadura en un medio que contenía ácido glutámico marcado y en presencia de cicloheximida, se modifica la distribución de la radiactividad entre los metabolitos solubles, observándose en primer lugar una acumulación de glutamina a expensas de la presencia del ácido glutámico; este hecho se podría deber a que por aumento del nitrógeno asimilable se activaría la glutamina sintetasa, que para otros autores estaría inhibida (45). También se halla disminuida la formación de prolina vía semialdehído del ácido glutámico y ácido pirrolina carboxílico, donde actúa una enzima que reduce a este último compuesto con formación de prolina, en presencia de TPNH o DPNH (158).

Efecto de la cicloheximida sobre la respiración celular.

De acuerdo con Sisler y Marshall (38) y Bradley (47) se puede decir que el antibiótico no ejerce una acción específica sobre la respiración de la levadura, determinada por el consumo de oxígeno y el desprendimiento de anhídrido carbónico; este proceso metabólico es inhibido en una proporción relativamente pequeña, alrededor del 20%, cuando las mínimas concentraciones de cicloheximida impiden el crecimiento de la levadura (1 a 2,5 $\mu\text{g/ml.}$). Scardovi (46) señala haber encontrado diferencias en la oxidación de los sustratos: se inhibiría la oxidación de la glucosa y el ácido acético

sería insensible a este efecto; estas diferencias no se evidenciaron en la oxidación de glucosa y acetato que se alteraron por igual. Las diferencias que se observaron entre los ² sustratos están en la distribución de la radiactividad: el acetato- $2-C^{14}$ participaría con mayor intensidad en el ciclo de Krebs, proceso final de la respiración, por lo que aparece el anhídrido carbónico rotulado en una proporción que es el doble a lo que sucede con glucosa- $6-C^{14}$; por otra parte este último sustrato participa más intensamente que el acetato en la marcación de la fracción insoluble, habiéndose utilizado a ambos sustratos con actividades específicas equivalentes. Tanto la glucosa como el acetato son asimilados por la levadura en presencia de cicloheximida, observándose una ligera acumulación de C^{14} en sus concentraciones mínimas inhibitorias; en dichas condiciones la incorporación de C^{14} en la fracción insoluble se halla afectada en un 50%.

Efecto de la cicloheximida sobre la síntesis de trehalosa

Las diferencias llamativas que se notan en la distribución de la radiactividad entre los metabolitos solubles, fuerte disminución en la marcación de la trehalosa y aumento en el glutamato se podría explicar mediante las siguientes observaciones: la inhibición de la síntesis de las proteínas condicionaría un incremento de nitrógeno asimilable; las células de levadura en presencia de cicloheximida excretan amoníaco reduciendo su contenido en nitrógeno (33); Trevelyan y Harrison (159) señalaron que la fermentación de glucosa y otros glúcidos por parte de la levadura está acompañada por un rompimiento inicial de la trehalosa que se resintetiza en un medio libre de nitrógeno asimilable, mientras que su presencia impide la resíntesis del disacárido por lo menos durante las ² primeras horas de la fermentación de glucosa. Si a estos resultados se unen los estudios de Muntz (160) y Holzer y col. (97) ~~(98) (99) (100)~~ referentes a la acción de los iones amonio sobre la oxidación de glucosa por levadura, se puede decir que la presencia de iones amonio más TPNH determina la disminución de α -cetoglutarato por formación de glutamato (hay mayor marcación del mismo) y un incremento de TPNH; esta coenzima por su acción oxidativa sobre glucosa-6-fosfato permite la formación de ácido glucónico-6-fosfato que hace viable el ciclo de las pentosas; la disminución de glucosa-6-fosfato condiciona el fracaso de la síntesis de trehalosa, de acuerdo a Cabib y Le-loir (161), quienes estudiaron la formación del disacárido por la acción de una enzima que cataliza la reacción entre uridina difosfo-glucosa y glucosa-6-fosfato, para dar uridina difosfato y trehalosa-fosfato que se transforma en trehalosa por una fosfatasa específica presente en la enzima purificada. La disminución de α -cetoglutarato provoca una inhibición de

la respiración así como de la fosforilación oxidativa, por lo que se produce un rápido incremento en la concentración de fosfato; durante el aumento de fosfato ocurre lo mismo con la dehidrogenación de la triosa-fosfato, condicionando así la mayor presencia de piruvato y acetaldehído. El aumento de este último compuesto por acción de la cicloheximida sobre la levadura fue informado por Latuasan y Berends (43).

Los resultados obtenidos al estudiar la distribución de C^{14} proveniente de la oxidación de glucosa y acetato, se contradicen en parte con los que Coursen y Sisler (45) presentan después de trabajar con S. pastorianus: menor rotulación de glutamina, menor rotulación de glutamato y una mayor radiactividad presente en alanina, ácido aspártico y también tirosina y treonina, sugiriendo una inhibición de la glutámico dehidrogenasa. Takada y col. (48) empleando Zygosaccharomyces soja no encontraron efecto significativo de la cicloheximida sobre la actividad de varias dehidrogenasas. Como ya se vió en el Capítulo III, la glutamina se marcó, aunque en un grado menor de lo que sucede en las células no tratadas con antibiótico; hubo un aumento considerable en la marcación del ácido glutámico; menos radiactividad presente en ácido aspártico; la marcación de alanina y tirosina no se modifica cuando se utiliza acetato como sustrato y se incrementa en presencia de glucosa, ocurriendo lo contrario en la treonina; además hay un aumento de la radiactividad en glicina-serina.

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de P^{32}

Kialhöfer y Aumann (39) expresaron que la utilización de fosfato inorgánico no era afectada; Van de Pol y Berends (42) informaron que no se modificaba la incorporación de fosfato ni su distribución, pero que la actividad específica del fosfato era mayor en diversas fracciones celulares. Utilizando tanto células proliferativas como células en reposo de la levadura, se ha observado un efecto semejante; una incorporación de fosfato radiactivo varias veces mayor cuando las células son tratadas con cicloheximida, sin que se evidencien modificaciones en la cantidad de fosfato dosado químicamente y en su distribución dentro de las diversas fracciones celulares. Aquí también se manifiesta un efecto que ocurre como si hubiera una acumulación de iones amonio, ya de Juni y col. (95) (96) estudiaron un fenómeno semejante que tiene lugar en presencia de una concentración tal de iones amonio que permite la asimilación pero no la división celular.

El modo de actuar de la cicloheximida también se podría explicar con un antagonismo ejercido sobre la biotina. El incremento de glutamina -experiencia con glutamato- C^{14} - y de glutamato -experiencia con acetato- $2-C^{14}$ y glucosa- $6-C^{14}$ revelan un incremento de iones amonio no asimilados; hecho simi-

lar observaron Winzler y col. (162) en una cepa de levadura dependiente de biotina; Friedman y Most (163) señalaron la acumulación de compuestos intermediarios de la síntesis de purinas en una levadura deficiente en biotina y también se estudió la inhibición de la fijación de anhídrido carbónico en purinas por deficiencia de biotina (164) (165).

Es de esperar que la continuación de los estudios relacionados con la alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos provocada por la presencia de la cicloheximida, proporcionará una información más ajustada en cuanto a la acción que este antibiótico ejerce sobre el metabolismo de las células de levadura, la inhibición prácticamente total de la síntesis de las proteínas.

RESUMEN

- 79 -

La acción de la cicloheximida sobre células de levadura en reposo establece que la respiración, estudiada por el CO_2 y el anhídrido carbónico desprendido por consumo de sustratos de D-glucosa-6- C^{14} y acetato-2- C^{14} , disminuye en un 20% con concentraciones mínimas inhibitorias del antibiótico (1 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$) y en una tercera parte con 10 $\mu\text{g/ml}$. Ambos sustratos son asimilados por la levadura en presencia de cicloheximida, observándose una acumulación de C^{14} en la fracción de los metabolitos solubles en metanol-agua cuando se aplica en sus concentraciones mínimas inhibitorias; la incorporación de radiactividad en la fracción insoluble se inhibe en un 50%. La distribución de la radiactividad entre los metabolitos solubles en metanol-agua se modifica por efecto del antibiótico: disminuye fuertemente la marcación de trehalosa y en un grado menor glutamina y ácido aspártico, aumenta la marcación de ácido glutámico y glicina-serina. El anhídrido carbónico desprendido contiene el doble de cantidad de C^{14} cuando se oxida acetato-2- C^{14} y en la fracción insoluble ocurre lo mismo al oxidarse D-glucosa-6- C^{14} , aunque ambos sustratos se emplearon con actividades específicas equivalentes.

La cicloheximida determina tanto en células proliferativas como en reposo una acumulación de P^{32} de 3 a 4 veces más en relación a lo que incorporan las células no tratadas, sin que se evidencien modificaciones en la cantidad de fosfato dosado y en su distribución dentro de las diversas fracciones celulares.

La cicloheximida en sus concentraciones mínimas inhibitorias impide casi totalmente la incorporación de los aminoácidos L-valina- $\text{C}^{14}(\text{O})$, glicina-1- C^{14} y L-ácido glutámico- $\text{C}^{14}(\text{G})$ en las proteínas de levadura. Los aminoácidos son asimilados por la levadura y la radiactividad total presente en los metabolitos solubles en metanol-agua se altera en escasa medida e incluso llega a acumularse, por lo menos durante la primer hora de incubación, cuando está presente el antibiótico. En células proliferativas cultivadas en presencia de glicina-1- C^{14} la cicloheximida modifica la interconversión glicina-serina, aminoácidos que se hallan como metabolitos solubles, determinando el aumento de la radiactividad dentro de la serina. Cuando se cultivan células proliferativas de levadura junto con L-ácido glutámico- $\text{C}^{14}(\text{G})$, el antibiótico también altera la distribución de C^{14} dentro de los metabolitos solubles en metanol-agua: disminuye la cantidad de ácido glutámico y prolina marcados y se incrementa la glutamina rotulada.

Cultivos de células proliferativas en presencia de glicina-1-C¹⁴ y otros con adenina-8-C¹⁴ señalan inhibición de la síntesis de novo de los ácidos nucleicos por acción de la cicloheximida; en cambio las células en reposo acumulan radiactividad en dicha fracción cuando se encuentran frente al antibiótico. No se observa modificación de la distribución de la radiactividad en las bases purínicas de los ácidos nucleicos.

La cicloheximida condiciona una mayor cantidad de C¹⁴ en la fracción de los nucleótidos libres de células proliferativas y en reposo que se incubaron con adenina-8-C¹⁴. Analizada la distribución de la radiactividad dentro de las bases de los nucleótidos libres se observa que la conversión de adenina a guanina se desplaza hacia el incremento de guanina, efecto que se hace más notorio en las células proliferativas.

La fracción obtenida como ácidos nucleicos de las células proliferativas incubadas con L-ácido glutámico-C¹⁴ (G) incorporaron radiactividad debido a la presencia de 2 aminoácidos que se extrajeron junto con los ácidos nucleicos: uno era ácido glutámico y el otro un aminoácido azufrado, probablemente cistina, cisteína o ácido cistéico.

Se hicieron preparados de S-RNA, ribosomas y enzimas de pH 5,0 para observar el efecto de la cicloheximida sobre la biosíntesis de proteínas: no se altera la activación de aminoácidos; la unión de L-leucina-C¹⁴ (U) con S-RNA se modifica en una pequeña escala cuando se utilizan concentraciones relativamente elevadas del antibiótico; la transferencia de este aminoácido desde S-RNA a los ribosomas se inhibe en un 60%, proporción que no alcanza al casi 100% de inhibición de la incorporación de aminoácidos a proteínas que tiene lugar en la célula entera de levadura.

BIBLIOGRAFIA

1. Hetokissa, R.D., *Advances in Enzymol.*, 4, 153 (1944).
2. Benedict, R.G. y Langlykke, A.F., *Ann. Rev. Microbiol.*, 1, 193 (1947).
3. Bailey, J.H. y Cavallito, C.J., *Ann. Rev. Microbiol.*, 2, 143 (1948).
4. Brownlee, G., *Ann. Rev. Microbiol.*, 5, 197 (1951).
5. Kirby, W.M.M., *Ann. Rev. Microbiol.*, 6, 387 (1952).
6. Eagle, H. y Saz, A.K., *Ann. Rev. Microbiol.*, 9, 173 (1955).
7. Umbreit, W.E., *Giorn. Microbiol.*, 2, 398 (1956).
8. Hahn, F.E., en *Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna* (Ed. Hoffmann-Ostenhof, O.) Pergamon Press, Vol. V: Symposium V(1960).
9. Whiffen, A.J., Bohonos, N. y Emerson, R.L., *J. Bacteriol.*, 52, 610 (1946).
10. Leach, B.E., Ford, J.H. y Whiffen, A.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 474 (1947).
11. Whiffen, A.J., *J. Bacteriol.*, 56, 283 (1948).
12. Ford, J.H. y Leach, B.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 1223 (1948).
13. Kornfeld, E.C. y Jones, R.G., *Science*, 108, 437 (1948).
14. Kornfeld, E.C., Jones, R.G. y Parks, T.V., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 150 (1949).
15. Phillips, D.D., Acitelli, M.A. y Meinwald, J., *Abstracts of Papers, 131 Meeting, American Chemical Society, Miami, Florida* (1957).
16. Eisenbraun, E.J., Osiecki, J. y Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1261 (1958).
17. Brown, R. y Hazen, E.L., *Antibiotics Annual 1955-1956*, p. 245. New York, Medical Encyclopedia, Inc. (1956).
18. Whiffen, A.J., *Mycologia*, 42, 253 (1950).
19. Wallen, V.R., Sutton, M.D. y Skolke, A.J., *Phytopathology*, 40, 156 / (1950).
20. Loefer, J.B. y Matney, T.S., *Physiol. Zool.*, 25, 272 (1952).
21. Palmer, C.M. y Maloney, T.E., *Ohio J. Sci.*, 55, 1 (1955).
22. Zahnder, A. y Hughes, E.O., *Can. J. Microbiol.*, 4, 399 (1958).
23. Traub R., Dewitt,, J.B., Welch, J.F. y Newman, D., *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, 39, 552 (1950).
24. Welch, J.F., *J. Agr. Food Chem.*, 2, 142 (1954).
25. Reilly, H.C., Stock, C.C., Buskley, S.M. y Clark, D.A., *Cancer Res.*, 13, 684 (1953).
26. Nitta, K., Takeuchi, T., Yamamoto, T. y Umezawa, H., *J. Antibiotics, Ser. A*, 8, 120 (1955).
27. Smith, C.G., Lummis, W.L. y Grady, J.E., *Cancer Res.*, 19, 843 (1959).
28. Berliner, M.D. y Olive, L.S., *Science*, 117, 652 (1953).

29. Grever, R.K. y Moore, J.D., *Phytopathology*, 51, 399 (1961).
30. Gundersen, K., *Acta Horti Gotoburgensis*, 24, 1(1961).
31. Gundersen, K., *Acta Horti Gotoburgensis*, 25, 1(1962).
32. Gundersen, K. y Wadstein, T., *J. Gen. Microbiol.*, 28, 325 (1962).
33. Monreil, K., *Angew. Bot.*, 35, 24 (1961).
34. Walker, A.T. y Smith, F.G., *Proc. Exptl. Biol. Med.*, 81, 556 (1952).
35. Verona, O. y Picci, G., *Hand. Acad. Nas. Lincei, serie VIII*, 14, 680 (1953).
36. Szilvinyi, A., Klaushofer, H. y Rauch, C., *Mitt. Vers. Gärunga.*, 8, 101 (1954).
37. Mc Callan, S.E.A., Miller, L.P. y Weed, R.M., *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 18, 39 (1954).
38. Sisler, H.D. y Marshall, N.L., *J. Wash. Acad. Sci.*, 47, 321 (1957).
39. Kielhöfer, E. y Amann, H., *Z. Lebensm. - Untersuch. U - Forsch.*, 105, 283 (1957).
40. Greig, M.E., Walk, R.A., y Gibbons, A.J., *J. Bacteriol.*, 75, 489 (1958).
41. Lardy, H.A. Johnson, D. y Mc Murray, W.C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 78, 587 (1958).
42. Van de Pol, J.H. y Berends, W., *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, 77, 719 (1958).
43. Latuasan, H.E. y Berends, W., *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, 77, 416 (1958).
44. Blumauerová, M. y Stárka, J., *Nature*, 183, 261 (1959).
45. Coursen, B.W. y Sisler, H.D., *Am. J. Botany*, 47, 541 (1960).
46. Scardovi, V., *Annali di Microbiologia*, 10, 82 (1960).
47. Bradley, S.G., *Nature*, 194, 315 (1962).
48. Tsukada, Y., Sugimori, T., Imai, K. y Katagiri, H., *J. Bacteriol.*, 83, 70 (1962).
49. Loveless, L.E., Spoerl, E. y Weisman, T.H., *J. Bacteriol.*, 68, 637 (1954).
50. Creaser, E.H., *J. Gen. Microbiol.*, 12, 288 (1955).
51. Kerridge, D., *J. Gen. Microbiol.*, 16, V (1957).
52. Kerridge, D., *J. Gen. Microbiol.*, 19, 497 (1958).
53. Shepherd, C.J., *J. Gen. Microbiol.*, 18, IV (1958).
54. Harris, G. Y Neal, G.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 122 (1961).
- 54a. Siegel, M.R. y Sisler, H.D., *Phytopathology*, 52, 27 (1961).
55. Gundersen, K., *Acta Horti Gotoburgensis*, 25, 33 (1962).
56. Stoppani, A.O.M., Conches, L., de Favelukes, S.L.S. y Sacerdote, F.L., *Biochem. J.*, 70, 438 (1958).
57. Warburg, C.; en Umbreit, W.W., Burriss, R.H. y Stauffer, J.F.; *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*; Burgess Publish. Co., Minn. (1957).

58. Schneider, W.C., *J. Biol. Chem.*, 161, 293 (1945).
59. Schmidt, G. y Thannhauser, S.J., *J. Biol. Chem.*, 161, 83 (1945).
60. Harris, G. y Thompson, C.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 293 (1962).
61. Roberts, R.B., Abelson, P.H., Cowie, D.B., Bolton, E.T. y Britten, R. J., *Studies of Biosynthesis in Escherichia coli*. Carnegie Inst. of Wash. Washington, D.C. Publ. 607. p. 25 (1957).
62. Fiske, C.H. y Subbarow, Y., *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925).
63. Ernster, L., Zetterström, R. y Lindberg, O., *Acta Chem. Scand.*, 4, 942 (1950).
64. Magasanik, B., *The Nucleic Acids* (Ed. Chargaff, E. y Davidson, J.H.) Academic Press, vol. I, 373 (1955).
65. Benson, A.A., Bascham, J.A., Calvin, M., Goodale, T.C., Haas, V.A. y Stepka, W., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1710 (1950).
66. Wyatt, G.E., *Biochem. J.*, 48, 584 (1951).
67. Fu-Chuan Chao y Schachman, H.K., *Arch. Biochem. Biophys.*, 61, 220 (1956).
68. Milstein, C., *Teis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.-B.A.* (1957).
69. Monier, R., Stephenson, M.L. y Zamecnik, P.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 43, 1 (1960).
70. Kirby, K.S., *Biochem. J.*, 64, 405 (1956).
71. Oasma, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 43, 110 (1960).
72. Smith, I., *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Interscience Publish Inc. N.Y., vol. I, p. 242 (1960).
73. Littlefield, J.W., Keller, E.B., Cross, J. y Zamecnik, P.C., *J. Biol. Chem.*, 217, 111 (1955).
74. Hoagland, M.B., Keller, E.B., y Zamecnik, P.C., *J. Biol. Chem.*, 218, 345 (1956).
75. Littlefield, J.W. y Keller, E.B., *J. Biol. Chem.*, 224, 13 (1957).
76. Hecht, L.I., Stephenson, M.L. y Zamecnik, P.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45, 505 (1959).
77. Zamecnik, P.C. y Stephenson, M.L., *Fed. Proc.*, 19, 346 (1960).
78. Gornal, A.G., Bardawill, C.J. y David, M.M., *J. Biol. Chem.*, 177, 751 (1949).
79. Koningsberger, V.V., van der Grinten, C.O. y Overbeek, J.T.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 26, 483 (1957).
80. Hecht, L.I., Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L. y Scott, J.F., *J. Biol. Chem.*, 231, 954 (1958).
81. Hoagland, M.B., Stephenson, M.L., Scott, J.F., Hecht, L.I. y Zamecnik, P.C., *J. Biol. Chem.*, 231, 241 (1958).
82. Hülsmann, W.C. y Lipmann, F., *Biochim. Biophys. Acta*, 43, 123 (1960).
83. Krebs, H.A., en *Chemical Pathways of Metabolism* (Greenberg, D.M., Ed.,

- Academic Press, Inc., New York, N.Y.) 1, 109 (1954).
84. DeMoss, J.A. y Swain, H.E., *J. Bacteriol.*, 74, 445 (1957).
 85. Stoppani, A.O.M., de Favelukes, S.L.S. y Conches, L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 75, 453 (1958).
 86. Stoppani, A.O.M., Ramos, E.H. y de Favelukes, S.L.S., *An. Asoc. Quím. Argent.*, 48, 65 (1960).
 87. Kornberg, H.L., *Ann. Rev. Microbiol.*, 13, 49 (1959).
 88. Stoppani, A.O.M., Conches, L., de Favelukes, S.L.S. y Sacerdote, F. L., *An. Asoc. Quím. Argent.* 45, 91 (1957).
 89. Barnett, J.A. y Kornberg, H.L., *J. Gen. Microbiol.*, 23, 65 (1960).
 90. Hovey, G., Linderstrom-Lang, K. y Nielsen, H., *Nature*, 140, 725 (1937).
 91. Schmidt, G., Hecht, L. y Thannhauser, S.J., *J. Biol. Chem.*, 166, 775 (1946).
 92. Schmidt, G., Hecht, L., Thannhauser, S.J., *Fed. Proc.*, 6, 289 (1947).
 93. Kamen, M.D. y Spiegelman, S., *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 13, 151 (1948).
 94. Goodman, J. y Rothstein, A., *J. Gen. Physiol.*, 40, 915 (1957).
 95. Juni, E., Kamen, M.D., Spiegelman, S. y Wiame, J.M., *Nature*, 160, 717 (1947).
 96. Juni, E., Kamen, M.D., Reiner, J.M. y Spiegelman, S., *Arch. Biochem.*, 18, 387 (1948).
 97. Holzer, H., *Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism*, J. y A. Churchill Ltd., London, 277 (1959).
 98. Holzer, H., *Ann. Rev. Biochem.*, 28, 171 (1959).
 99. Holzer, H. y Witt, I., *Biochim. Biophys. Acta*, 38, 163 (1960).
 100. Holzer, H. y Grunike, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 53, 591 (1961).
 101. Meister, A., *Biochemistry of the Amino Acids*, Academic Press Inc. N.Y., p. 296 (1957).
 102. Roberts, R.B., Abelson, P.H., Cowie, D.B., Bolton, E.T. y Britten, R.J., *Studies of Biosynthesis in Escherichia coli*, Carnegie Inst. of Wash. Washington, D.C. Publ. 607, p. 158 (1957).
 103. Spiegelman, S., Halverson, H.O. y Ben-Israel, R., *Amino Acid Metabolism* (Ed. Mc Elroy, W.D. y Glass, B.) Johns Hopkins Press, Baltimore. p. 124 (1955).
 104. Sakami, W., *J. Biol. Chem.*, 176, 995 (1948).
 105. Tolbert, H.E., *J. Biol. Chem.*, 215, 27 (1955).
 106. de Boiso, J.F., *Teis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.B.A.* (1963).
 107. Lancelles, J., Cross, M.J. y Woods, D.D., *J. Gen. Microbiol.* 10, 267 (1954).
 108. Lancelles, J. y Woods, D.D., *Biochem. J.*, 58, 486 (1954).

109. Makley, R.L., *Biochem. J.*, 61, 115 (1955).
110. Abrams, R., Hammarsten, E. y Szentl, D., *J. Biol. Chem.*, 173, 429 (1948).
111. Edwards, H., DeLbrun, A.M. y Wilson, D.W., *J. Biol. Chem.*, 197, 215 (1952).
112. Heinrich, M.E. y Wilson, D.W., *J. Biol. Chem.*, 186, 447 (1950).
113. Linden, O. y Wark, E., *Biochem. J.*, 45, 137 (1951).
114. Elliot, W.H., *J. Biol. Chem.*, 201, 661 (1953).
115. Kerr, S.E., Segallarian, K. y Brown, G.B., *J. Biol. Chem.*, 188, 207 (1951).
116. Balis, M.E., Brown, G.B. Elicon, G.E., Hitchings, G.H. y VanderWerff, H., *J. Biol. Chem.*, 182, 217 (1951).
117. Abrams, R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 37, 270 (1952).
118. Abrams, R. y Goldberger, J.M., *Arch. Biochem. Biophys.* 35, 243 (1952).
119. Kerr, S.E. y Chernigov, F., *J. Biol. Chem.*, 200, 887 (1953).
120. Carter, C.R. y Cohen, L.M., *J. Biol. Chem.*, 232, 17 (1956).
121. Abrams, R. y Bentley, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 19, 91 (1959).
122. Hongland, M.B., *Biochim. Biophys. Acta*, 15, 288 (1955).
123. Hongland, M.B., Keller, E.B. y Zamecnik, P.C., *J. Biol. Chem.*, 221, 45 (1956).
124. DeMoss, J.A. y Novelli, G.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 18, 592 (1955).
125. DeMoss, J.A. y Novelli, G.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 49 (1956).
126. Berg, P., *J. Biol. Chem.*, 232, 1045 (1956).
127. Hongland, M.B., Zamecnik, P.C. y Stephenson, M.L., *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 215 (1957).
128. Tiasiores, A., *J. Mol. Biol.*, 1, 165 (1959).
129. Laeka, S. y Gros, F., *J. Mol. Biol.*, 1, 301 (1959).
130. Smith, K.G., Cordes, S. y Schweet, R.S., *Biochim. Biophys. Acta*, 33, 286 (1959).
131. Holley, R.W., Doctor, E.P., Merrill, S.H. y Saad, F.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 35, 272 (1959).
132. Holley, R.W. y Merrill, S.H., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 753 (1959).
133. Everett, G.A., Merrill, S.H. y Holley, R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 5757 (1960).
134. Holley, R.W., Aggar, J. y Doctor, E.P., *Ann. N.Y. Sci.*, 88, 745 (1960).
135. Hartmann, G. y Coy, U., *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 612 (1961).
136. Ofengand, E.J., Dieckmann, M. y Doty, P., *J. Biol. Chem.*, 236, 1741 (1961).
137. Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L. y Scott, J.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 46, 311 (1960).
138. Portatius, H., Doty, P. y Stephenson, M.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 3351 (1961).

139. Zubay, G., *J. Mol. Biol.*, 4, 347 (1962).
140. Herbert, E., *J. Biol. Chem.*, 231, 975 (1958).
141. Herbert, E., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 81, 679 (1959).
142. Davie, E.W., Koningsberger, V.V. y Lipmann, F., *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 21 (1956).
143. Van de Ven, A.M., Koningsberger, V.V. y Overbeek, J.T.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 28, 134 (1958).
144. Schweet, R.S. y Allen, E.H., *J. Biol. Chem.*, 233, 1104 (1958).
145. Zachau, H.G., Acs, G. y Lipmann, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44, 885 (1958).
146. Acs, G., Hartmann, G., Bonan, H.G. y Lipmann, F., *Fed. Proc.*, 18, 178 (1959).
147. Preiss, J., Berg, P., Ofengand, E.J., Bergmann, F.H. y Dieckmann, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45, 319 (1959).
148. Brachet, J., *The Nucleic Acids* (Ed. Chargaff, E. y Davidson, J.N.) Academic Press, vol. II, p. 475 (1955).
149. Magasanik, B., Magasanik, A.K. y Neidhardt, F.C., *Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism*, J. y A. Churchill Ltd., London, 334 (1959).
150. Gros, F., *The Nucleic Acids* (Ed. Chargaff, E. y Davidson, J.N.) Academic Press, vol. III, p. 409 (1960).
151. Gale, E.F. y Folkes, J.P., *Biochem. J.*, 53, 483 (1953).
152. Pardee, A.B. y Prestige, L.S., *J. Bacteriol.*, 71, 677 (1956).
153. Gros, F. y Gros, F., *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 200 (1956).
154. Halvorson, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 267 (1958).
155. Halvorson, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 255 (1958).
156. Goldthwait, D.A. y Bendich, A., *J. Biol. Chem.*, 196, 841 (1952).
157. Elwyn, D. y Sprinson, D.B., *J. Biol. Chem.*, 184, 475 (1950).
158. Yura, T. y Vogel, H.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 582 (1955).
159. Trevelyan, W.E. y Harrison, J.S., *Biochem. J.*, 62, 177 (1956).
160. Muntz, J.A., *J. Biol. Chem.*, 171, 653 (1947).
161. Cabib E. y Leloir, L.F., *J. Biol. Chem.*, 231, 259 (1958).
162. Winzler, R.J., Burk, D. y du Vigneaud, V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 5, 25 (1944).
163. Friedman, H. y Moat, A.G., *Arch. Biochem. Biophys.*, 78, 146 (1958).
164. MacLeod, P.R. y Lardy, H.A., *J. Biol. Chem.*, 179, 733 (1949).
165. Wabba, A.J. y Shive, W., *J. Biol. Chem.*, 211, 155 (1954).

I N D I C E

CAPITULO I

INTRODUCCION

Obtención de la cicloheximida	Pág.	2
Efectos del antibiótico	"	3
Modo de acción de la cicloheximida	"	5
Efectos sobre la respiración	"	5
Efectos sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos ...	"	9

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Cepa	"	13
Medios de cultivo	"	13
Células proliferativas	"	13
Células en reposo	"	13
Técnicas monométricas	"	13
Técnicas de incubación	"	14
Fraccionamiento de las células	"	14
a) Fraccionamiento de las muestras después de incorporar C^{14} .	"	14
Ácidos nucleicos	"	14
Proteínas	"	15
b) Fraccionamiento de las muestras después de incorporar P^{32} .	"	15
Dosaje de fósforo	"	15
Fósforo total	"	15
Fósforo ácido soluble total	"	15
Fósforo inorgánico	"	15
Fósforo hidrolizable 7 minutos del ácido soluble total	"	15
Fósforo orgánico	"	16
Fósforo de lípidos	"	16
Fósforo de ácidos nucleicos	"	16
Fósforo residual	"	16
Técnicas cromatográficas sobre papel	"	16
Para sustancias solubles en metanol-agua y productos de la hidrólisis de proteínas	"	16
Para bases, nucleósidos y nucleótidos	"	17
Medidas de la radiactividad	"	17
Técnicas para romper las células de levadura	"	19

Preparación directa de ácido ribonucleico de bajo peso molecular.	Pág. 20
Preparación de las enzimas pH 5,0	" 20
Preparación de S-RNA	" 21
Preparación de RNA ribosomal	" 21
Enriquecimiento de la actividad específica del S-RNA	" 21
Incorporación de L-leucina-C ¹⁴ (U) a S-RNA	" 22
Reactivos	" 22
Compuestos radiactivos	" 22
Abreviaturas	" 22

CAPITULO III

EFFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE EL METABOLISMO DE GLUCIDOS EN LEVADURA

Consumo de oxígeno	" 23
Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de C ¹⁴ por	
a) Oxidación de acetato-2-C ¹⁴	" 24
b) Oxidación de D-glucosa-6-C ¹⁴	" 24
Diferencias en la incorporación de C ¹⁴ de acuario a los sustratos	" 24
Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C ¹⁴ en los metabolitos solubles en metanol-agua por	
a) Oxidación de acetato-2-C ¹⁴	" 27
b) Oxidación de D-glucosa-6-C ¹⁴	" 27
Tabla III-1.- Acción de la cicloheximida sobre la incorporación de acetato-2-C ¹⁴ y D-glucosa-6-C ¹⁴ por <u>S. cerevisiae</u>	" 25
Tabla III-2.- Acción de la cicloheximida sobre la distribución de C ¹⁴ incorporado por oxidación de acetato-2-C ¹⁴ en <u>S. cerevisiae</u> .	" 28
Tabla III-3.- Acción de la cicloheximida sobre la distribución de C ¹⁴ incorporado por oxidación de D-glucosa-6-C ¹⁴ en <u>S. cerevisiae</u> ..	" 29
Tabla III-4.- Relación de la radiactividad total entre el ácido glutámico y ácido aspártico, glutamina, trehalosa y glicina-serina después de la oxidación de acetato-2-C ¹⁴ en presencia de diversas concentraciones de cicloheximida	" 32
Tabla III-5.- Relación de la radiactividad total entre el ácido glutámico y ácido aspártico, glutamina, trehalosa y glicina-serina después de la oxidación de D-glucosa-6-C ¹⁴ en presencia de diversas concentraciones de cicloheximida	" 33
Fig. III-1.- Efecto de la cicloheximida sobre el consumo de oxígeno durante la oxidación de acetato por <u>S. cerevisiae</u>	" 26
Fig. III-2.- Efecto de la cicloheximida sobre el consumo de oxígeno durante la oxidación de glucosa por <u>S. cerevisiae</u>	" 26

Fig. III-3.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución relativa del C^{14} durante la oxidación de acetato-2- C^{14} por <u>S. cerevisiae</u>	Pág.	30
Fig. III-4.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución relativa del C^{14} durante la oxidación de D-glucosa-6- C^{14} por <u>S. cerevisiae</u>	"	30

CAPITULO IV

EFFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE EL METABOLISMO DE FOSFATO EN LEVADURA

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de P^{32} por		
a) Células proliferativas	"	36
b) Células en reposo	"	36
Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de P^{32}		
Sin glucosa como sustrato	"	37
Con glucosa como sustrato	"	37
Tabla IV-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de P^{32} por <u>S. cerevisiae</u>	"	38
Tabla IV-2.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de P^{32} por <u>S. cerevisiae</u>	"	39
Tabla IV-3.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución del P^{32} en <u>S. cerevisiae</u> durante el consumo de sus sustratos endógenos	"	40
Fig. IV-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la actividad específica de P^{32} incorporado por células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u> en las fracciones: (a) fósforo total, (b) fósforo ácido soluble total, (c) fósforo inorgánico ácido soluble y (d) fósforo de ácidos nucleicos	"	38 bis

CAPITULO V

EFFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS EN LEVADURA

Efecto de la cicloheximida sobre la asimilación de valina	"	41
Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14}		
En la fracción metanol-agua soluble	"	41
En la fracción proteína residual	"	42
Efecto de la cicloheximida sobre la asimilación de glicina	"	42

Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de glicina- l - C^{14} por levadura	Pág.	42
Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14}		
En la fracción metanol-agua soluble	"	44
En la fracción ácidos nucleicos	"	47
En la fracción proteína residual	"	48
Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de glicina- l - C^{14} por células de levadura en repose	"	48
Efecto de la cicloheximida sobre la asimilación de ácido glutámico	"	51
Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-ácido glutámico- C^{14} (G) por levadura	"	51
Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14}		
En la fracción metanol-agua soluble	"	52
En la fracción ácidos nucleicos	"	53
En la fracción proteína residual	"	53
Tabla V-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-valina- C^{14} (G) por <u>S. cerevisiae</u>	"	43
Tabla V-2.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de glicina- l - C^{14} por <u>S. cerevisiae</u>	"	45
Tabla V-3.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en los metabolitos metanol-agua solubles por incorporación de glicina- l - C^{14} en <u>S. cerevisiae</u>	"	46-47
Tabla V-4.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en la fracción ácidos nucleicos	"	49
Tabla V-5.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de glicina- l - C^{14} por <u>S. cerevisiae</u>	"	50
Tabla V-6.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-ácido glutámico- C^{14} (G) por <u>S. cerevisiae</u>	"	54
Tabla V-7.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en los metabolitos metanol-agua solubles por incorporación de L-ácido glutámico- C^{14} (G) en <u>S. cerevisiae</u>	"	55-59
Tabla V-8.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en la fracción ácidos nucleicos	"	60
Fig. V-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de L-leucina- C^{14} (G) en células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u> en las fracciones: (a) metabolitos solubles en metanol-agua y (b) proteínas	"	41 bis
Fig. V-2.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de glicina- l - C^{14} en células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u> en las fracciones: (a) metabolitos solubles en metanol-agua, (b) proteínas y (c) ácidos nu-		

ácidos nucleicos	Pág.	43 bis
Fig. V-3.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución relativa % de C^{14} por incorporación de glicina- $l-C^{14}$ en células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u> en los metabolitos metanol-agua solubles: (a) glicina y (b) serina	"	46 bis
Fig. V-4.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de glicina- $l-C^{14}$ en células en reposo de <u>S. cerevisiae</u> en las fracciones: (a) metabolitos solubles en metanol-agua, (b) nucleótidos libres, (c) ácidos nucleicos y (d) proteínas	"	48 bis
Fig. V-5.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de L-ácido glutámico- C^{14} (G) en células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u> en las fracciones: (a) metabolitos solubles en metanol-agua, (b) ácidos nucleicos y (c) proteínas	"	52 bis
Fig. V-6.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución relativa % de C^{14} por incorporación de L-ácido glutámico- C^{14} (G) en células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u> en los metabolitos metanol-agua solubles: (a) ácido glutámico, (b) glutamina y (c) prolina	"	53 bis

CAPITULO VI

EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE EL METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS EN LEVADURA

Asimilación de adenina	"	61
Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de adenina- $8-C^{14}$ por células proliferativas de levadura	"	61
Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en:		
Nucleótidos libres	"	62
Ácidos nucleicos	"	64
Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de adenina- $8-C^{14}$ por células en reposo de levadura	"	64
Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en:		
Nucleótidos libres	"	67
Ácidos nucleicos	"	67
Incorporación y transferencia de L-leucina- C^{14} por preparatos libres de célula de levadura	"	67
Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-leucina- C^{14} en S-RNA	"	68

Efecto de la cicloheximida sobre la transferencia de L-leucina- C^{14} desde S-RNA a ribosoma	Pág. 70
Tabla VI-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de adenina-8- C^{14} en nucleótidos libres y ácidos nucleicos de células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u>	" 63
Tabla VI-2.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en nucleótidos libres y ácidos nucleicos de células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u>	" 65
Tabla VI-3.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de adenina-8- C^{14} en nucleótidos libres y ácidos nucleicos de células en reposo de <u>S. cerevisiae</u>	" 66
Tabla VI-4.- Efecto de la cicloheximida sobre la distribución de C^{14} en nucleótidos libres y ácidos nucleicos de células en reposo de <u>S. cerevisiae</u>	" 69
Tabla VI-5.- Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de L-leucina- C^{14} (U) en S-RNA de levadura	" 70
Tabla VI-6.- Efecto de la cicloheximida sobre la transferencia de L-leucina- C^{14} (U) desde S-RNA a ribosoma de levadura	" 70
Fig. VI-1.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de adenina-8- C^{14} en células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u> en las fracciones: (a) nucleótidos libres y (b) ácidos nucleicos	" 62 bis
Fig. VI-2.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de adenina-8- C^{14} en células proliferativas de <u>S. cerevisiae</u> en las bases de los nucleótidos libres: (a) guanina y (b) adenina	" 64 bis
Fig. VI-3.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de adenina-8- C^{14} en células en reposo de <u>S. cerevisiae</u> en las fracciones: (a) nucleótidos libres y (b) ácidos nucleicos	" 67 bis
Fig. VI-4.- Efecto de la cicloheximida sobre la modificación relativa % de C^{14} por incorporación de adenina-8- C^{14} en células en reposo de <u>S. cerevisiae</u> en las bases de los nucleótidos libres: (a) guanina y (b) adenina	" 68 bis

CAPITULO VII

DISCUSION

Efecto de la cicloheximida sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos	" 72
Otros efectos de la cicloheximida	

Efecto de la cicloheximida sobre el metabolismo de aminoácidos.	Pág.	75
Efecto de la cicloheximida sobre la respiración celular	"	75
Efecto de la cicloheximida sobre la síntesis de trehalosa	"	76
Efecto de la cicloheximida sobre la incorporación de P ³²	"	77
RESUMEN	"	79
BIBLIOGRAFIA	"	81
INDICE	"	87

