

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

**MODO DE ACCION, SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD
DE LOS ANTIBIOTICOS**

DISCURSO

LEIDO EN EL ACTO DE SU RECEPCION

EL DIA 24 DE NOVIEMBRE DE 1982

POR EL

Excmo. Sr. D. DAVID VAZQUEZ MARTINEZ

Y

CONTESTACION

DEL

Excmo. Sr. D. ANGEL MARTIN MUNICIO



Domicilio de la Academia
VALVERDE, 22. TELEFONO 221 25 29
MADRID, 1982

MALQUISA - ROSARIO ROMERO. 6 - TEL. 215 44 33 - MADRID - 29
D. L. M. 36560 - 1982 I. S. B. N. 84-300-8047-3

**DISCURSO
DEL
EXCMO. SR. D. DAVID VAZQUEZ MARTINEZ
MODO DE ACCION, SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD
DE LOS ANTIBIOTICOS**

Excmo. Sr. Presidente,
Excmos. Sres. Académicos,
Señoras y Señores:

Constituye para mí motivo de gran satisfacción este nombramiento con el que se me honra al haberse juzgado, creo que con generosidad, los méritos que en mi persona pudieran concurrir para merecer esta distinción que se me concede de traerme a esta Real Academia para colaborar y participar en el futuro en las tareas de esta corporación.

Puesto que el puesto que se me asigna en la Academia es de nueva creación, no procede en este momento el hacer el habitual panegírico del Académico precedente en la posesión de la medalla. Sin embargo, quiero aprovechar esta oportunidad para rendir un sentido homenaje a la memoria de nuestro compañero don Florencio Bustinza Lachiondo, recientemente fallecido, que con gran entusiasmo y acierto nos precedió en las tareas académicas. Don Florencio Bustinza fue mi Ponente en la Tesis Doctoral en Ciencias, tarea en la cual *mostró una gran paciencia y comprensión no ajena de rigor científico*, criticando y corrigiendo mi trabajo cuando procedía. Pero, lo que es más importante, don Florencio Bustinza ha sido el pionero en España de los estudios sobre los antibióticos, tema en el que se interesó muy pronto en la década de los años cuarenta, previendo con gran acierto la gran importancia y desarrollo futuro de los mismos y conoció directamente a las figuras más relevantes del fascinante capítulo histórico del descubrimiento y desarrollo inicial de los antibióticos.

Precisamente los antibióticos son las sustancias a cuyas investigaciones he dedicado yo preferentemente los últimos veinte años. Por ello quiero dedicar como un emocionado recuerdo a don Florencio Bustinza mi disertación, que versará sobre las bases moleculares de la especificidad y selectividad de los grupos de antibióticos inhibidores de la síntesis del peptidoglicano y de proteínas y su importancia en el esclarecimiento del proceso de la evolución celular.

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS ANTIBIOTICOS

Todas las células vivas tienen una cierta similitud funcional, puesto que en todos los casos tienen que llevar a cabo una serie de reacciones que les permita crecer y dividirse. Esta similitud funcional de las diversas células determina su gran semejanza bioquímica y estructural y de ahí la enorme dificultad en la acción inhibitoria y la terapia selectivas. Por ello es relativamente reciente el conocimiento de los antibióticos y agentes quimioterápicos de acción inhibitoria celular selectiva, aunque ciertamente la existencia de sustancias que causan la muerte celular a pequeñas concentraciones ya es conocida desde hace muchos años. Efectivamente cuando surgieron grandes polémicas en el siglo XIX en relación con la disputa sobre si las levaduras eran seres vivos o no, uno de los mejores argumentos en favor de la viabilidad de dichas partículas estaba basado en los hechos experimentales, mostrando que el calor, el arseniato y el cloruro mercurico destruían su crecimiento, división y actividades enzimáticas y, por tanto, las levaduras deberían considerarse como células vivas. Aún más, puede decirse que la posible existencia de los antibióticos ya la intuyó Pasteur cuando escribió «entre las formas más inferiores de vida, incluso aún más que entre las especies superiores de animales y plantas, la vida inhibe la vida» (citado por NAJARAGAN, 1972).

Sin embargo, los fundamentos básicos de la acción selectiva de los agentes quimioterápicos no fueron enunciados hasta que Ehrlich en 1913 postuló que los parásitos poseen toda una serie de quimio-receptores que difieren específicamente entre sí y por tanto existirían enormes posibilidades de éxito si se descubrieran en dichos parásitos algunos receptores que no estén presentes en la célula huésped, con lo cual tendríamos la posibilidad de obtener un medicamento ideal seleccionando un grupo haptóforo que encaja selectivamente con este receptor particular del parásito; un agente quimioterápico provisto de dicho grupo haptóforo sería enteramente inocuo porque no interaccionaría con las células del huésped y sin embargo sería

activo sobre los parásitos con toda su potencia inhibidora, y en este sentido «correspondería a las sustancias inmunes que buscan al enemigo como si fueran balas mágicas» (HIMMELWEIT, 1960). La visión de Ehrlich fue extraordinaria, pues no sólo previó la teoría de la acción selectiva de los agentes quimioterápicos sino que para definir su hipótesis empleó unos términos tan precisos que difícilmente podemos mejorarlos actualmente, casi setenta años después de los revolucionarios postulados de aquel hombre genial. Ciertamente, cuando Ehrlich propuso estos postulados en 1913 ya hacía seis años que había descrito él mismo el atoxil, que quizá pueda ser considerado como el primer agente quimioterápico con una cierta acción selectiva, pero aún transcurrieron dieciséis años hasta que Fleming describió los experimentos que le condujeron al descubrimiento de la penicilina (FLEMING, 1929), iniciándose con ello la era de los antibióticos, que han sido hasta ahora los inhibidores celulares selectivos más importantes en terapéutica y en biología.

La problemática de la acción de los antibióticos podemos decir que se centra esencialmente en la contestación a un breve número de preguntas, como pueden ser las siguientes:

- (a) ¿Cómo penetra un antibiótico en la célula en que actúa?
- (b) Al actuar un antibiótico en una célula, ¿con qué moléculas o estructuras celulares interacciona dicho antibiótico?
- (c) ¿Qué consecuencias biológicas se derivan de dichas interacciones de un antibiótico con los componentes o estructuras celulares?
- (d) ¿Por qué los antibióticos actúan en unas células y no en otras?
- (e) ¿Por qué los antibióticos pueden ser tóxicos al huésped?
- (f) ¿Por qué algunas células o microorganismos sensibles a un antibiótico pueden hacerse resistentes al mismo?

Ciertamente la contestación correcta a estas preguntas nos aclara los problemas del modo de acción, especificidad, selectividad, resistencia y toxicidad de los antibióticos, pero el progreso en el conocimiento de estos problemas avanza paralelamente con el estudio de las estructuras celulares y rutas bioquímicas que son afectadas por los antibióticos. Estos estudios han sido objetivos importantes en la investigación biológica en los últimos cuarenta años y han permitido

llegar a una situación como la actual, en la que ciertamente podemos contestar con gran precisión a algunos de los interrogantes anteriormente planteados.

En general los antibióticos de mayor interés en Biología y Medicina son muy específicos en su acción inhibitoria, pues a bajas concentraciones interaccionan solamente con un componente celular. Sin embargo, una inhibición de diversas reacciones por un antibiótico puede tener lugar o bien como consecuencia directa de dicha interacción específica o bien debido a su efecto secundario derivado de la actividad inhibitoria primordial del antibiótico o bien motivado por diversas interacciones del antibiótico de menor afinidad que la causante de su efecto principal. Así, todos los inhibidores de la síntesis del mRNA tienen como un efecto secundario muy inmediato la inhibición de biosíntesis de proteínas, mientras que por otra parte son muy numerosos los compuestos que como consecuencia de su interacción con el DNA celular bloquean simultáneamente la síntesis de DNA y de RNA. Considerados muy ampliamente, podemos decir que la mayoría de los antibióticos de mayor interés pueden ser clasificados de acuerdo con su especificidad de acción primordial y de una manera simplificada dentro de alguno de los siguientes grupos:

- (a) Inhibidores de la síntesis de la pared celular.
- (b) Inhibidores que afectan las funciones de permeabilidad selectiva de la membrana celular.
- (c) Inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos.
- (d) Inhibidores de la síntesis de las proteínas.

Aunque conocemos bastantes antibióticos que actúan primordialmente en otros procesos o estructuras celulares, como son los que intervienen en las reacciones de obtención de la energía o interfieren con el metabolismo intermediario, podemos decir que la mayoría de los antibióticos antibacterianos que tienen utilidad en terapéutica podemos clasificarlos dentro de alguna de las cuatro categorías o grupos indicados anteriormente. Por ello, consideraremos inicialmente estas cuatro categorías de inhibidores aunque, posteriormente y por motivos de extensión, sólo nos referiremos a los inhibidores de la síntesis de la pared celular y a los inhibidores de la biosíntesis de las proteínas.

Selectividad de acción de los antibióticos

La selectividad de los antibióticos, considerada de una manera amplia y sin referirnos a casos muy concretos, está basada generalmente en diferencias estructurales y en algunas peculiaridades funcionales de los distintos tipos de células. En el pasado se han considerado esencialmente dos amplios grupos de células que comprenderían prácticamente todas las conocidas hasta ahora. En uno de estos grupos se incluyen las células eucarióticas que, como su nombre indica, tienen un núcleo verdadero rodeado de la membrana nuclear. En el otro grupo se han venido incluyendo todas las células procarióticas que no tienen un núcleo verdadero, pues su material genético nunca está dispuesto en un orgánulo rodeado de la membrana nuclear. Dentro de las células procarióticas se han venido considerando las bacterias y las algas azules, mientras que dentro de las células eucarióticas se incluían todas las demás células del mundo viviente. Sin embargo, durante los últimos ocho años se han venido realizando estudios a nivel molecular con una serie de microorganismos o bien recientemente descubiertos o que aunque ya se conocían estaban clasificados dentro de las bacterias, pero sin poder encajarlas taxonómicamente de una manera satisfactoria. Estas investigaciones demuestran que hay que considerar un nuevo grupo de microorganismos procarióticos que difieren ampliamente de bacterias y algas azules y en muchos aspectos están incluso más próximos a las células eucarióticas. Efectivamente, este reducido grupo de microorganismos procarióticos se agrupa actualmente con el nombre de arqueobacterias o metabacterias (FOX y cols., 1980; WOESE, 1981; DOOLITTLE, 1980; CARLILE, 1982). El nombre de arqueobacterias es poco adecuado, pues sugiere una mayor antigüedad evolutiva que las bacterias, creencia que no es aceptada actualmente pero, a pesar de ello, el nombre de arqueobacterias para estos microorganismos recientemente estudiados es el más difundido. El nombre de metabacterias alude a que diversos microorganismos productores de metano están incluidos en este grupo, pero es realmente una denominación muy restringida, pues también se incluyen dentro de las arqueobacterias diversos microorganismos extremadamente halofílicos o termofílicos aunque debemos de tener en cuenta que no todos los microorganismos termofílicos son arqueobacterias.

Por otra parte y desde el punto de vista de la acción selectiva inhibidora de los antibióticos debemos de tener siempre presente que todas las células eucarióticas podríamos considerarlas como una simbiosis de una célula urcariótica (la célula primitiva provista de núcleo) y al menos un tipo de orgánulo celular (mitocondria) que evolutivamente es de tipo procariótico. Además de las mitocondrias (normalmente de 1 a 12 por célula eucariótica) las células eucarióticas fotosintéticas (algas superiores y células superiores del reino vegetal) también contienen en su citoplasma otros orgánulos de tipo procariótico que son los cloroplastos. Hay abundante evidencia experimental en favor de que los citados orgánulos celulares de tipo procariótico (mitocondrias y cloroplastos) son evolutivamente células procarióticas en vida simbiótica obligada con una célula urcariótica, constituyendo esta simbiosis la actual célula eucariótica (DOOLITTLE, 1980). Por este motivo el problema de coseguir una selectividad inhibidora antibacteriana por antibiótico o agente quimioterápico que no sea activo en una célula eucariótica ha sido realmente de difícil solución.

Las características estructurales más acusadas que diferencian entre sí los distintos tipos de células indicadas anteriormente podemos presentarlas de una manera muy simplificada, como se indica en la Tabla 1. Considerando los sitios o reacciones primordiales de acción de los antibióticos indicados al hablar de la especificidad de acción de los mismos (síntesis de la pared celular, permeabilidad de la membrana, síntesis de los ácidos nucleicos y síntesis de proteínas), podemos ver en la Tabla 1 que ciertamente hay importantes diferencias entre las estructuras o componentes celulares. Precisamente la acción selectiva de los antibióticos más importantes está basada en estas diferencias. Así, cuando en la Tabla indicamos «tipo procariótico» o «tipo arqueobacteria» o «tipo eucariótico», al referirnos a una determinada estructura es porque dentro de cada uno de estos tipos de células hay una gran uniformidad estructural que nos permite considerar como similares a las estructuras del mismo tipo de células. Esto realmente ocurre así, y aunque pudiera parecer sorprendente, podemos decir que de hecho la sensibilidad a los antibióticos y agentes quimioterápicos de todos los ribosomas de tipo eucariótico es muy similar aunque procedan ya sea de células aparentemente tan distantes como las de hongos, protozoos, algas superiores, vegetales, animales inferiores y mamíferos (VAZQUEZ, 1979a). Lo mismo ocurre

TABLA 1 (1.ª parte)

<i>Características estructurales más importantes de los distintos tipos de células Procariontes</i>	
<i>Eubacterias (Bacterias y algas azules)</i>	<i>Células procariontes</i>
<i>Arqueobacterias</i>	
Envolturas celulares externas	<p>Pared celular con peptidoglicano</p> <p>Membrana sin esteroides</p> <p>Lípidos con enlaces éster (fosfolípidos)</p> <p>Ribosomas «tipo procarionte»</p> <p>RNA polimerasa «tipo procarionte»</p> <p>Sin mitocondrias</p> <p>Sin cloroplastos</p>
Citoplasma	<p>Sin pared o con pared sin peptidoglicano</p> <p>Membrana sin esteroides</p> <p>Lípidos con enlace éter «tipo arqueobacteriano»</p> <p>Ribosomas «tipo arqueobacteriano»</p> <p>RNA polimerasa «tipo arqueobacteriano»</p> <p>Sin mitocondrias</p> <p>Sin cloroplastos</p>
Estructura conteniendo el material genético	<p>No bien estudiado. Probablemente similar al caso de las demás células procariontes</p> <p>Ciertamente sin verdadero núcleo</p> <p>DNA unido a proteínas quizá equivalentes a las histonas eucariotes pero diferentes lógicamente</p>

TABLA 1 (2.ª parte)

Características estructurales más importantes de los orgánulos celulares de tipo procariontíco y de las células eucariontícas

	<i>Orgánulos celulares de tipo procariontíco</i>		<i>Células eucariontícas</i>
	<i>Mitocondrias</i>	<i>Cloroplastos</i>	
<i>Envolturas celulares externas</i>	Sin pared	Sin pared	Sin pared o con una pared que no tiene peptidoglicano
	Membrana con esteroides	Membrana sin esteroides	Membrana con esteroides
	Lípidos con enlaces éster (fosfolípidos)	Lípidos con enlaces éster (fosfolípidos)	Lípidos con enlaces éster (fosfolípidos)
	Ribosoma «tipo procariontíco»	Ribosoma «tipo procariontíco»	Ribosoma «tipo eucariontíco»
<i>Citoplasma</i>	RNA polimerasa «tipo procariontíco»	RNA polimerasa «tipo procariontíco»	RNA polimerasa «tipo eucariontíco»
	—	Sin mitocondrias	Con mitocondrias
	Sin cloroplastos	—	Algunas tienen cloroplastos (algas superiores y vegetales)
<i>Estructura genética</i>	Genomio constituido por DNA circular de doble banda en una sola pieza. Haploide. Sin verdadero núcleo. Sin membrana nuclear.	Genomio constituido por DNA circular de doble banda en una sola pieza. Haploide. Sin verdadero núcleo. Sin membrana nuclear.	Núcleo en el que el DNA está unido a proteínas mas; envuelto en la básicas en los cromosoma membrana nuclear.
			Células diploides.

con las estructuras que indicamos de «tipo arqueobacteriano». Hay algunas diferencias algo mayores en el caso de las estructuras que denominamos de «tipo procariótico», puesto que en algunos casos hay una mayor diferencia de sensibilidad a los antibióticos y agentes quimioterápicos de dichas estructuras, según provengan de bacterias Gram positivas o bacterias Gram negativas. A pesar de lo dicho anteriormente puede haber sin embargo una cierta diferencia entre las distintas células eucarióticas en su sensibilidad o resistencia a los antibióticos y agentes quimioterápicos; esto es debido a ciertas diferencias en sus envolturas externas, no reflejadas en la Tabla 1, que determinan una gran diferencia en su barrera de la permeabilidad a las distintas moléculas.

Asimismo existe una gran diferencia entre la pared celular de las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas que condicionan muy importantes diferencias de sensibilidad a los antibióticos. Es asimismo de resaltar que el peptidoglicano es un componente único en la pared celular de bacterias y algas azules (Tabla 1), por lo cual los numerosos antibióticos que bloquean específicamente la síntesis de este polímero de la pared celular no actúan ni en arqueobacterias, ni en mitocondrias, ni en cloroplastos, ni en ninguna célula eucariótica, lo cual tiene importantísimas consecuencias en su uso en terapéutica.

En general los antibióticos cuyo modo de acción ha sido estudiado más detalladamente son aquellos de mayor efecto selectivo. Efectivamente esta mejor selectividad ha determinado un importante interés en Biología y en Terapéutica de los inhibidores de la biosíntesis de proteínas y los compuestos que afectan la formación de la pared celular por bloquear la biosíntesis del peptidoglicano. Por ello nos centraremos en nuestra exposición en el estudio de estos dos grupos de compuestos aun a sabiendas de que hay otros antibióticos de interés que no consideraremos en esta exposición.

Pared celular

Desde el punto de vista funcional se define la pared celular como una estructura presente en ciertas células en la parte externa de la membrana plasmática que proporciona soporte externo a dicha membrana, confiere la forma característica a la célula y contiene los sitios responsables para la absorción de los virus, el reconocimiento y

transporte de algunas sustancias y la interacción entre las células. Es mucho más difícil definir brevemente la pared celular desde el punto de vista químico dada su gran heterogeneidad en las distintas células. En general las células de los animales multicelulares no tienen pared. Por el contrario, están provistas de pared celular las plantas superiores, los hongos, algunos protozoos, las algas superiores, las bacterias, las algas azules y algunas arqueobacterias. Las paredes celulares de plantas superiores están formadas por microfibras de celulosa empotradas en una matriz amorfa de hemicelulosas y pectinas; en ciertos casos estas paredes están impregnadas de lignina. Es difícil definir la composición de las paredes celulares de algas superiores y protozoos, puesto que mientras que algunos de estos microorganismos no tienen pared celular, la mayoría sí tienen esta estructura, siendo su componente absolutamente mayoritario o bien la celulosa o las proteínas o incluso la sílice. Las paredes de los hongos pluricelulares están constituidas esencialmente en la mayoría de los casos, por quitina, que es una poli- β -1,4-N-acetilglucosamina. Sin embargo, en las paredes celulares de las levaduras los dos principales componentes son el glucano (un polímero de glucosa) y el manano, que es esencialmente un complejo que contiene proteína y un polisacárido (formado por dos cadenas distintas conteniendo polímeros de manosa, pero ambas con uniones distintas con la parte proteica del manano).

Las paredes de bacterias y algas azules tienen en común el componente denominado peptidoglicano o mureína, que es un polímero de naturaleza glicopeptídica, cuya estructura glicosídica está formada por la N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetil-murámico (3-carboxietil-N-acetil-glucosamina), alternando en el polímero siempre unidos por enlaces β 1,4, extendiéndose en cadenas de hasta 500 disacáridos. En esta cadena los grupos $-\text{COOH}$ de los radicales carboxietil (lactil) de los ácidos N-acetil-murámicos están unidos a un corto polipéptido que tiene unos aminoácidos de configuración D y otros de configuración L; a través de estas cadenas peptídicas unidas entre sí distintos monómeros glicopeptídicos o incluso distintas cadenas de peptidoglicano, formando una red tridimensional de gran fortaleza y plasticidad y muy resistente a los agentes físicos y químicos (POSTE y NICOLSON, 1977).

Hay una gran diversidad en la envoltura externa de las arqueobacterias, pues mientras que en algunos casos como en los géneros

Metanobacterium y *Metanobrevibacter* tienen una pared de pseudomureína (un polímero de naturaleza glicopeptídica, cuya estructura glicosídica está formada por poli β -1,4-N-acetilglucosamina y un ácido urónico estando unidas a estos ácidos urónicos pequeños péptidos que contienen solamente L-aminoácidos), mientras que algunos otros géneros tienen una envoltura externa compuesta por heteropolisacáridos; por otra parte, *Halobacterium* y *Thermoplasma* carecen de pared celular propiamente dicha y similarmente a como ocurre en las células eucarióticas, tienen glicoproteínas en la parte externa de la membrana (GHUYSEN, 1980; WOESE, 1981). Por este motivo se ha postulado que las glicoproteínas podrían ya haberse originado en las células más primitivas, que existieron antes de la divergencia de los tres mayores líneas celulares de descendencia o reinos; eubacterias (bacterias y algas azules), células eucarióticas y arqueobacterias, posiblemente como un componente celular para estabilizar la membrana celular (MESCHER, 1981). De ser esta hipótesis cierta, el peptidoglicano y la pseudomureína tendrían como un componente original estructural más antiguo las glicoproteínas.

Puesto que la pared celular es de constitución química muy diferente y compleja en los distintos tipos de células, podría parecer poco concreto el hablar de inhibidores de la síntesis de la pared celular, puesto que en un sentido muy amplio cualquier compuesto que bloquee la síntesis de alguno de los componentes de dicha estructura en los distintos tipos de células podría considerarse como un inhibidor de la pared celular. Sin embargo, al considerar solamente los compuestos que bloquean el crecimiento celular como consecuencia de su efecto específico y selectivo en algún componente de la pared celular, prácticamente sólo hay dos grupos conocidos de inhibidores específicos de pared celular. Uno de estos grupos, es más bien pequeño y relativamente de poca importancia y está constituido por los compuestos que bloquean específicamente la síntesis de la quitina, que sólo está presente en la pared celular de los hongos y en el exoesqueleto de algunos invertebrados; la polioxina A es el antibiótico mejor conocido dentro del grupo de los inhibidores de la síntesis de quitina (GALE, cols., 1981). El otro grupo es más amplio y de mayor interés, pues incluye numerosos antibióticos que actúan en eubacterias (bacterias y algas azules), por inhibir específicamente la síntesis del peptidoglicano que está presente solamente en estos microorganismos procarióticos. Dentro de este segundo grupo se

incluye un amplio número de compuestos que actúan selectivamente en bacterias y algas azules y otra serie de compuestos dotados de una menor selectividad.

Por lo anteriormente descrito y a la vista de la Tabla 1 es evidente de gran trascendencia práctica la existencia y conocimiento de los inhibidores de la síntesis de peptidoglicano por su gran especificidad y selectividad. Ahora bien, hay que tener en cuenta que dentro de las bacterias podemos distinguir al menos tres grupos de acuerdo con su manera de comportarse en las tinciones de Gram y de microorganismos ácido-alcohol resistentes, un comportamiento que está fundamentado principalmente en las diferencias estructurales de la pared celular de las bacterias Gram positivas, Gram negativas y ácido-alcohol resistentes. En las bacterias Gram positivas el peptidoglicano es un componente estructural y cuantitativamente muy importante en su pared celular (30-90 %), que además puede tener en ciertas especies diversas proporciones de ácidos teicoicos (poliribitol-fosfatos o poliglicerol-fosfatos), proteínas y polisacáridos. Las paredes celulares de las bacterias ácido-alcohol resistentes se caracterizan por su elevado contenido no sólo de peptidoglicano sino también de ceras y de un peptidoglicolípido muy característico que en el caso de las micobacterias es el ácido micólico; las ceras y el ácido micólico determinan la difícil permeabilidad de estas bacterias. Las bacterias Gram negativas tienen menor proporción de peptidoglicano en su pared celular (4-20 %) que tiene como componentes importantes diversos lipopolisacáridos, lipoproteínas, proteínas y fosfolípidos. Es de resaltar que mientras que en las bacterias Gram positivas la pared celular tiene una neta delimitación con la membrana y no constituye una barrera de la permeabilidad, en las bacterias Gram negativas hay una complicada estratificación de los componentes de las envolturas celulares distinguiéndose una membrana externa y una membrana interna o membrana citoplásmica entre las cuales está ubicada una rígida capa de peptidoglicano. Por tanto, el término de pared celular en las bacterias Gram negativas consta de la llamada membrana externa y la capa de peptidoglicano. Esta membrana externa, aunque de aspecto similar a la membrana citoplásmica en el microscopio electrónico, contiene lipopolisacárido y proteínas en la parte externa y lipoproteínas, fosfolípidos y proteínas en su cara interior. En general la membrana externa es poco permeable a las moléculas hidrofóbicas e incluso a las hidrofílicas de peso molecular mayor de 600-1000.

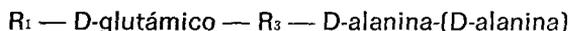
dependiendo de la especie (LUGTENBERG, 1981). Esto es debido a que la mayoría de las moléculas hidrofílicas pequeñas pasan a través de la membrana externa por unos poros o canales formados por unas proteínas denominadas porinas, que no seleccionan el paso de las moléculas por sus características físico-químicas, sino por su tamaño. El peptidoglicano está unido no covalentemente a estas porinas y covalentemente a la lipoproteína de la membrana externa (POSTE y NICOLSON, 1977; GHUYSEN, 1977, 1980; GALE y cols., 1981).

El peptidoglicano es el componente esencial de la pared celular de bacterias y algas azules para que estos microorganismos puedan sobrevivir en su habitat normal en medios hipotónicos. Así tiene lugar la lisis celular al tratar las bacterias con lisozima (que rompe las uniones β -1,4 entre el C-1 del ácido acetil murámico y el C-4 de la N-acetilglucosamina), a no ser que el tratamiento tenga lugar en condiciones isotónicas o hipertónicas que generalmente son artificiales. Si la bacteria es alargada, la observación microscópica de los cultivos tratados con lisozima nos permitirá observar la aparición gradual de los protoplastos (células que han perdido su pared celular). Sin embargo, el soporte mecánico proporcionado por la considerable rigidez del peptidoglicano puede ser reemplazado por el soporte osmótico en medios iso- o hipertónicos que compensarán así la elevada presión osmótica ejercida por los constituyentes de bajo peso molecular disueltos en el citoplasma. Una secuencia de efecto similar a la observada en el tratamiento con lisozima ocurre cuando las bacterias son o bien tratadas con un inhibidor de la síntesis del peptidoglicano o simplemente crecidas en ausencia de un aminoácido esencial específico de la cadena peptídica del peptidoglicano. Esto es indudablemente debido a la pérdida de integridad del peptidoglicano como resultado de la continua actividad de las enzimas líticas cuya actividad es necesaria a la bacteria o bien para el proceso de división celular o bien para proporcionar nuevos sitios para la inserción en la pared de nuevas subunidades de peptidoglicano en el proceso del crecimiento celular.

Estructura y síntesis del peptidoglicano

Como ya hemos indicado anteriormente, el peptidoglicano está formado por una cadena polisacáridica de poli β -1,4-N-acetil-murámico-N-acetil-glucosamina, que tiene unidos a los $-\text{COOH}$ de los radicales lactilo (3-carboxi-etil) de los ácidos N-acetilmurámico una cadena tetra

o pentapeptídica [R₁-R₂-R₃-R₄(R₅)] característica de cada especie, en la que suele haber una alternancia de aminoácidos de configuración D o de configuración L, obedeciendo a la fórmula general siguiente:



En la cual el residuo R₁ suele ser L-alanina, pero en el caso de algunas especies bacterianas es L-serina y en algunas otras glicina; el D-glutámico tiene su grupo α -COOH libre, mientras que su grupo γ -COOH está unido a un grupo —NH₂ del aminoácido R₃; el aminoácido R₃ puede ser L-lisina (*Staphylococcus aureus*) o mesodiaminopimélico (*Escherichia coli*) o LL-diaminopimélico o L-ornitina o L-diaminobutírico (en los casos de la lisina y la ornitina la unión es con el —NH₂ en posición α , mientras que en los casos de diaminopimélico, LL o meso, la unión es con el —NH₂ en posición — ϵ); el cuarto y el quinto aminoácidos son siempre D-alanina, pero por supuesto el quinto aminoácido solamente existe en los peptapéptidos, que en el caso de ocurrir están libres sin formar puentes mediante enlaces covalentes con otros péptidos. Sin embargo, en la mayoría de los casos son tetrapéptidos los que están unidos a los ácidos N-acetil-muránicos, y en este caso lo más frecuente es que estén formando enlaces covalentes entre el —NH₂ libre del aminoácido R₃ con el —COOH terminal de la D-alanina de otros tetrapéptidos de la misma cadena o de otra cadena de peptidoglicano, ya sea directamente o mediante un puente de uno o de varios aminoácidos. Formación de estos enlaces covalentes tiene lugar directamente en bacterias Gram-negativas (ejemplo, *E. coli*) y bacilos Gram-positivos, mientras que hay puentes de uno o varios aminoácidos en el caso de los cocos Gram-positivos. El caso mejor estudiado de éstos es el del peptidoglicano de la pared celular de *Staphylococcus aureus* Copenhague, cuya estructura se presenta en la Figura 1 mostrando los puentes de pentaglicina. Como ya se indica anteriormente, no todos los tetrapéptidos están formando puentes covalentes entre sí, pero hay hasta un 80 por 100 en el caso de *Staphylococcus aureus*, siendo quizá el límite más bajo conocido el de *Lactobacillus acidophilus*, donde solamente un 30 por 100 de los tetrapéptidos están formando puentes covalentes. La orga-

nización es más simple en el caso de formación de enlaces covalentes directos entre los tetrapéptidos como en *E. coli*, pero presenta una estructura más regular en el caso de haber puentes peptídicos como en *S. aureus* (Figura 1). De hecho la estructura tridimensional

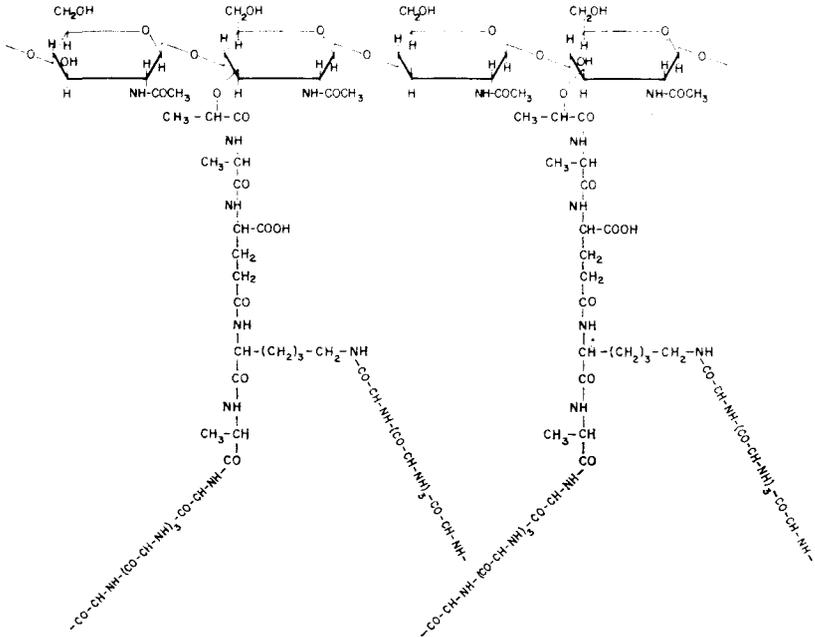


Figura 1: Unidad estructural del peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* Copenhagen.

es aún bastante más complicada, pues en el caso de las bacterias Gram-negativas puede haber de una a tres capas de peptidoglicano, pero hay muchas más en el caso de las bacterias Gram-positivas. Además las uniones pueden ser no solamente entre tetrapéptidos de la misma capa sino también entre tetrapéptidos de distintas capas de peptidoglicano (GHUYSEN, 1977).

La síntesis del peptidoglicano constituye un complicado proceso en el que podemos distinguir tres fases. En la primera de las fases se requieren sustratos pequeños y enzimas citoplásmicas llevándose a cabo una serie de reacciones a nivel del citoplasma que terminan

O-carbamil-D-serina, alafosfalín, anfomicina, tunicamicinas, vancomi-
cinas, ristocetinas, bacitracinas y sobre todo el amplio grupo de los
antibióticos β -lactámicos.

Fosfomicina. La fosfomicina (ácido 1-2-epoxipropilfosfónico), que
se descubrió en España en cultivos de *Streptomyces fradiae*, es un
antibiótico bactericida que actúa en bacterias Gram-positivas y en
muchas especies Gram-negativas (HENDLIN y colaboradores, 1969).
La fosfomicina inhibe el crecimiento bacteriano por bloquear la enzi-
ma UDP-N-acetil glucosamina enopiruvil transferasa impidiendo por
tanto la formación de UDP-N-acetil murámico (Figura 2). Esta inhibi-
ción es irreversible por reacción del antibiótico con un residuo de
cisteína del sitio activo, quedando ligado a la enzima covalentemente
el 2-tio-éter del ácido 1-hidroxipropil fosfónico (KAHAN y colaborado-
res, 1974). Sin embargo, esta interacción parece ser muy específica,
pues no se ha observado ninguna otra reacción del antibiótico con
proteínas de bacterias ni de células superiores. Se han descrito mu-
tantes resistentes a la fosfomicina debido a una baja afinidad de la
UDP-N-acetil glucosamina enopiruvil transferasa por el antibiótico.
Sin embargo, la mayor parte de los mutantes de laboratorio resisten-
tes a la fosfomicina son defectivos en la entrada del α -glicerofosfato
y de la glucosa-6-fosfato, lo cual no es sorprendente, pues el antibió-
tico entra en *E. coli* mediante sistemas de transporte inducibles para
estos compuestos (WU y VENKATESWARAN, 1974). Debido a este
doble sistema de transporte, este problema del desarrollo de resis-
tencia observado en el laboratorio parece ser que no es frecuente
en la clínica y el antibiótico es un valioso antibacteriano de amplio
espectro en terapéutica (WOODRUFF y colaboradores, 1977).

No actúa en arqueobacterias ni en células superiores y por ello
tiene un amplio uso en terapéutica como agente antibacteriano.

D-cicloserina y O-carbamil-D-serina

El antibiótico D-cicloserina es producido por diversas especies de
Streptomyces y tiene un amplísimo espectro antibacteriano poco co-
mún, siendo activo no solamente en bacterias Gram-positivas y Gram-
negativas, sino también en bacilos ácido-alcohol resistentes como
Mycobacterium tuberculosis. La D-cicloserina es un análogo de la
D-alanina, por lo cual a bajas concentraciones inhibe la alanina raze-
masa y, aun con mayor eficiencia, la D-alanil-D-alanina sintetasa. Poes-

to que la D-alanil-D-alanina sintetizada se une al UDP-N-acetil muramil-tripéptido en bacterias en crecimiento normal, en el caso de bacterias tratadas por el antibiótico hay una acumulación del nucleótido-tripeptídico intermediario que desaparece al revertir la inhibición por un amplio exceso de D-alanina. Como ya hemos indicado anteriormente, la D-cicloserina inhibe preferencialmente la D-alanil-D-alanina sintetasa. En esta enzima hay dos sitios de interacción para D-alanina, actuando el antibiótico preferencialmente en el sitio donador y a concentraciones algo mayores en el sitio aceptor. Sólo a concentraciones más elevadas la D-cicloserina bloquea también la alanina racemasa.

A la vista de lo anteriormente indicado, podría pensarse que la acción inhidora de la D-cicloserina es muy selectiva y por ello con amplio uso en terapéutica. Sin embargo, esto no es así y solamente se usa en ciertos casos, sobre todo en algunas incidencias de tuberculosis resistentes a otros tratamientos. El motivo de ello es que tanto la L- como la D-cicloserina, aunque a concentraciones relativamente elevadas, inhiben la transaminación en todo tipo de células, pues estos compuestos, al igual que los aminácidos, reaccionan con el fosfato de piridoxal de las transaminasas formando las correspondientes bases de Schiff. Ahora bien, en el caso de los distintos aminoácidos, las bases de Schiff formadas inicialmente son inestables, dando lugar a la formación del ácido cetónico correspondiente y al fosfato de piridoxamina; sin embargo, en el caso de la D-cicloserina, el compuesto formado inicialmente es estable y no tiene lugar la segunda reacción y de ahí su posible efecto tóxico en las células superiores, a concentraciones elevadas o en tratamientos prolongados.

La O-carbamil-D-serina también es un antibiótico producido por diversas especies de *Streptomyces* y en algunos casos simultáneamente con la D-cicloserina. Al igual que este antibiótico la O-carbamil-D-serina es un análogo estructural de la D-alanina que bloquea la síntesis de peptidoglicano en bacterias causando la acumulación del UDP-N-acetil-muramil tripéptido. Sin embargo, la O-carbamil-D-serina no inhibe la D-alanil-D-alanina sintetasa, pero su modo de acción primario es la inhibición competitiva de la alanina racemasa con respecto a D-alanina (GALE y cols., 1981).

Alafosfalin. Este compuesto sintetizado recientemente (alafosfín o L-alanil-L-1-ácido aminoetil-fosfónico) es el más importante del

grupo de los denominados fosfonopéptidos sintéticos, preparados deliberadamente como inhibidores de la síntesis del N-acetil-muramil-pentapéptido (ATHERTON y cols., 1980). Efectivamente, alafosfalín es activo principalmente en bacterias Gram negativas, aunque también actúa con menor intensidad en bacterias Gram positivas (ALLEN y colaboradores, 1977), causando una acumulación en las mismas de N-acetil-muramil-tripéptido por inhibir específicamente la alanina racemasa. Por su composición química el alafosfalín entra en las bacterias por la misma vía que los dipéptidos (configuración L,L), pero una vez dentro de las bacterias se hidroliza por la acción de las aminopeptidasas, formándose L-alanina y el ácido L-1-amino-etil fosfónico, que es el que bloquea competitivamente la alanina racemasa, siendo preferencialmente activo en la enzima de las bacterias Gram-negativas. El alafosfalín tiene una gran selectividad en su acción inhibidora y no se destruye al administrarlo por vía oral, por lo cual parece tener enormes posibilidades en su uso en terapéutica sobre todo en infecciones de las vías urinarias producidas por bacterias Gram-negativas (ATHERTON y cols., 1979).

Antibióticos del grupo de la anfomicina

La anfomicina (sinónimo glumamicina) tiene una cadena peptídica unida a un ácido graso y actúa preferencialmente en bacterias Gram-positivas, pues debido a su elevado peso molecular no puede pasar a través del tamiz de permeabilidad de las porinas de las bacterias Gram-negativas. La anfomicina interacciona de una manera específica y selectiva con el portador de undecaprenol a nivel de la membrana bacteriana y como consecuencia de ello bloquea la primera reacción en la síntesis del peptidoglicano que tiene lugar a nivel de la membrana (TANAKA y colaboradores, 1977, 1979). Sin embargo, la selectividad como antibacteriano de la anfomicina no es muy buena, puesto que el antibiótico también inhibe la incorporación de manosa y N-acetilglucosamina en los complejos lípido-sacáridos en extractos de aorta de cerdo (KANG y cols., 1978). Estos resultados muestran que el antibiótico interacciona no sólo con el portador lipídico fosfato de undecaprenol de la membrana de las bacterias, sino también con el portador fosfato de dolicol (también un polímero de isopreno) de las membranas de células eucarióticas. La tsusimicina y la aspartocina son muy similares a la anfomicina, de la cual difieren solamente

en el ácido graso (AOKI y cols., 1977), siendo su modo de acción muy similar.

Aunque no está aún descrito, parece probable que anfomicina inhiba también la síntesis de glicoproteínas en arqueobacterias, pues hay evidencia indirecta de que se requiere también un fosfato de poliisoprenol en estos microorganismos (MESCHER y STROMINGER, 1975; HAMMES y cols., 1979).

Tunicamicina. Las tunicamicinas constituyen una familia de antibióticos nucleosídicos producidos en cultivos de *Streptomyces lyso-superificus*. Estos antibióticos interaccionan con el fosfato de bactoprenol similarmente a lo que ocurre con la anfomicina y como consecuencia de ello inhiben la misma reacción en la síntesis del peptidoglicano (WARD, 1977; TANAKA y cols., 1977). Al igual que la anfomicina, la tunicamicina tiene una acción antibacteriana, siendo muy poco selectiva, puesto que interacciona también con el dolicol (16-18 unidades de isopreno), equivalente en cierto modo al bactoprenol, y que existe en todas las membranas de todas las células eucarióticas y que interviene como portador en la membrana en la síntesis de las glicoproteínas (ELBEIN, 1981). Por este motivo, tunicamicina no tiene uso en terapéutica, pues es muy tóxico para las células superiores, pero constituye un instrumento importantísimo en el estudio de la síntesis de las glicoproteínas de hongos, plantas y animales superiores. Por las mismas razones indicadas al hablar de la anfomicina las tunicamicinas también inhiben la síntesis de las glicoproteínas en arqueobacterias.

Antibióticos del grupo de las vancomicinas y las ristocetinas

Constituye un amplio grupo de antibióticos complejos (vancomicinas, ristocetinas, ristomicinas, avoparcinas y actinoidinas) producidos por diversas especies del género *Streptomyces*. La parte de las estructuras más relevante para su modo de acción es una aglicona bastante similar en todos estos antibióticos (SHELDRIK y cols., 1978). Sin embargo, estos compuestos difieren ampliamente entre sí en sus hidratos de carbono, que por otra parte son poco relevantes para su actividad (WILLIAMS y cols., 1980). Todos estos antibióticos actúan de una manera específica como inhibidores de la síntesis del peptidoglicano, pero por su elevado peso molecular (en todos los casos mayor de 1.400) solamente son activos en bacterias Gram-positivas.

Los estudios pioneros de PERKINS y NIETO (1972) mostraron inequívocamente la importancia del residuo acil-D-alanil-D-alanina del N-acetil-muramil-pentapéptido para su interacción con vancomicinas y ristocetinas. La especificidad y selectividad de estas interacciones ha sido demostrada más recientemente, usando técnicas distintas, por WILLIAMS y colaboradores (1980), que pusieron en evidencia la importancia de la aglicona de los antibióticos en la interacción y propusieron unos modelos según los cuales hay tres y seis puentes de hidrógeno implicados en las uniones con vancomicina y ristocetina respectivamente (WILLIAMS y cols., 1980). Como consecuencia de estas interacciones los antibióticos de este grupo bloquean la peptidoglicano polimerasa (Figura 3), con lo cual no hay formación *de novo* de peptidoglicano, ni incorporación de cadenas nuevas al polímero ya preformado en la pared celular. El sitio exacto de interacción de estos antibióticos no está aún esclarecido, pero todo parece indicar que está ubicado en un ambiente no hidrofóbico en la parte externa de la membrana citoplásmica.

Bacitracinas

Las bacitracinas constituyen un grupo de péptidos cíclicos muy similares entre sí, producidos por *Bacillus licheniformes*, de los cuales el mejor conocido y estudiado es la bacitracina A. Por su elevado peso molecular las bacitracinas solamente tienen uso tópico local en terapéutica en infecciones de bacterias Gram positivas. La bacitracina A no afecta la reacción catalizada por la peptidopirofosfato de bactoprenol (Figura 3). Este lípido no es sin embargo utilizable por la bacteria, teniendo que actuar una pirofosfatasa específica integrada en la membrana que cataliza la reacción: pirofosfato de undecaprenol

pirofosfatasa

undecaprenol > —————> fosfato de undecaprenol + fosfato.

La inhibición de esta enzima por la bacitracina A es debida a la formación de un complejo entre el antibiótico y el lípido-pirofosfato en una reacción que requiere un catión divalente y cuyo efecto preferencial sigue el orden $Zn^{++} > Cd^{++} > Mg^{++}$. Por este motivo la bacitracina A no inhibe inicialmente la síntesis del peptidoglicano, pero cuando ya todo el portador lipídico bactoprenil-fosfato se encuentra como pirofosfato de undecaprenol no puede proseguir la síntesis del polímero.

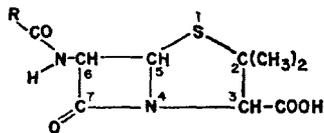
La bacitracina tiene una relativa selectividad, siendo activa principalmente en bacterias Gram positivas, pues tiene dificultades de

permeabilidad en las bacterias Gram negativas. Aunque en la síntesis de las glicoproteínas también se forma en las células eucarióticas el pirofosfato de dolicol, la bacitracina no inhibe, a concentraciones medias, la desfosforilación de este compuesto y por ello el antibiótico no es activo en las células superiores. Sin embargo, la bacitracina es activa en arqueobacterias y aún es objeto de polémica si en estos microorganismos actúa sobre un pirofosfato de poliisoprenol bloqueando su desfosforilación (MESCHER y STROMINGER, 1975; HAMMES y cols., 1979) o bien inhibe la síntesis de los lípidos característicos de arqueobacterias que tienen enlaces éter (BASINGER y OLIVER, 1979).

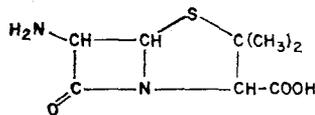
Antibióticos β -lactámicos

No me extenderé en la presentación de los aspectos históricos de este grupo de antibióticos, el más importante en terapéutica por su especificidad y selectividad, puesto que las personas interesadas en dichos aspectos pueden acudir a los trabajos magistrales y exhaustivos del Profesor Bustinza, que tuvo la ocasión de conocer directamente dichas facetas y tuvo asimismo el prestigio de convivir con las figuras más relevantes de este capítulo histórico, que con todo lujo de detalles nos cuenta en un volumen publicado (BUSTINZA, 1961) y en otros trabajos que espero vean la luz en un futuro muy próximo (BUSTINZA, 1982).

Los primeros antibióticos β -lactámicos conocidos que se produjeron industrialmente en los años 1940-1950 pertenecían al grupo de las penicilinas (Figura 4), cuyo desarrollo estuvo basado, como es bien sabido, en las observaciones iniciales de FLEMING (1929), describiendo la inhibición del crecimiento de los estafilococos por filtrados de algunos caldos de cultivo de *Penicillium notatum* que eran inocuos a las células superiores. Efectivamente, se observó muy pronto que las penicilinas podrían tener aplicación terapéutica antibacteriana a pesar de que las obtenidas inicialmente: a) sólo actuaban en bacterias Gram positivas; (b) no podían administrarse oralmente puesto que el anillo β -lactámico requerido para su actividad se destruía fácilmente en medio ácido, y (c) algunas bacterias producen una enzima (β -lactamasa) que rompe el anillo β -lactámico determinando la resistencia al antibiótico (ABRAHAM y CHAIN, 1940). Otro tipo de antibióticos β -lactámicos descritos posteriormente está



Penicilinas



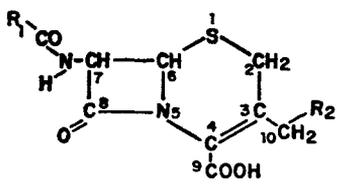
Acido 6-aminopenicilánico

Penicilinas activas en bacterias Gram-positivas	(R)	Penicilinas activas en bacterias Gram-negativas
<p>Penicilina G (Bencilpenicilina)</p>		<p>Penicilina N</p>
<p>Penicilina V (Fenoximetilpenicilina)</p>		<p>Ampicilina</p>
<p>Meticilina</p>		<p>Amoxicilina</p>
<p>Nafcilina</p>		<p>Carbenicilina</p>

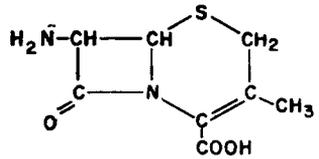
Figura 4: Estructura química de las penicilinas y del ácido penicilánico.

constituido por las cefalosporinas (Figura 5), cuyo primer miembro conocido (cefalosporina c) producido por el hongo *Cephalosporium acremonium* fue descrito inicialmente por NEWTON y ABRAHAM (1956).

En los primeros años del desarrollo de las penicilinas se obtuvieron ya nuevos compuestos a partir de cultivos de *Penicillium chryso-*



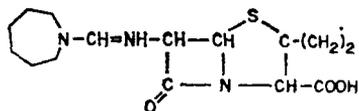
Cefalosporinas



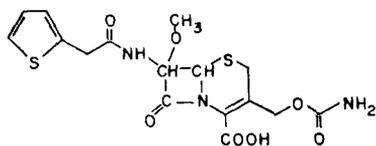
Acido 7-aminocefalosporánico

R ₁	R ₂	
		Cefalosporina C
		Cefaloridina
		Cefalotina
		Cefalexina
		Cefradina
		Cefazolina
		Cefamandol
		Cefuroxima

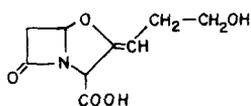
Figura 5: Estructura química de las cefalosporinas y del ácido cefalosporánico.



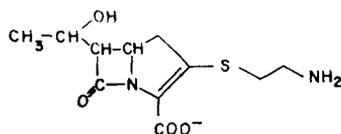
Mecililnam



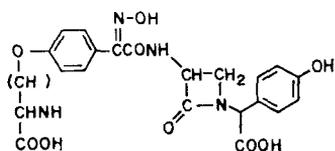
Cefoxitin



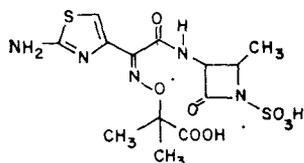
Ácido clavulánico



Tienamicina



Nocardicina A



Aztreonam

Figura 6: Mecililnam, cefoxitin, ácido clavulánico, tienamicina, nocardicina A y aztreonam.

genum crecidos en presencia de las cadenas laterales adecuadas (BEHRENS y cols., 1948). Sin embargo, casi ninguna de estas penicilinas tenía ventajas sobre la penicilina G o bencilpenicilina, establecida ya entonces como la de mayor interés, con la excepción importante de la fenoximetil-penicilina, que es relativamente estable en medio ácido y se absorbe bien por vía oral (BRANDL y MARGREITER, 1954). Por ello el mayor desarrollo de penicilinas y cefalosporinas

no tuvo este origen sino que evolucionó posteriormente por la vía semisintética. Efectivamente, la obtención primeramente del ácido 6-amino penicilánico (Figura 4) a partir de la bencilpenicilina (ROLINSON y cols., 1960) por métodos químicos o enzimáticos, y posteriormente del ácido 7-amino cefalosporánico (Figura 5) a partir de la cefalosporina C (MORIN y cols., 1962) permitió el rápido desarrollo de todo tipo de β -lactámicos semisintéticos. De esta manera se han obtenido muchos miles de penicilinas y cefalosporinas en los últimos veinte años. Un número relativamente reducido de antibióticos β -lactámicos se viene usando en terapéutica. Estos antibióticos han sido seleccionados por sus buenas propiedades, ya sea: (a) por su amplio espectro, o (b) por su mayor actividad, concretamente frente a ciertas especies, o (c) por su mayor actividad o tolerancia por vía intramuscular u oral, o (d) por su mayor resistencia a las β -lactamasas. Aunque la mayoría de los antibióticos semisintéticos tenían en común la estructura general de penicilinas y cefalosporinas, también se sintetizaron otros β -lactámicos con diversos cambios en el anillo condensado con el β -lactámico e incluso con diferencias en la unión de la cadena lateral. Entre estos últimos compuestos es de resaltar por su especificidad y selectividad el mecilnam (considerado como una «amidino-penicilina») (Figura 6) (LUND y TYBRING, 1972), en el cual no hay un R-CO- unido al grupo —NH_2 del ácido 6-amino-penicilánico, puesto que hay en dicha posición un enlace amidino R —CH=N— , en vez del enlace amida R-CO-NH- característico de las penicilinas.

Los antibióticos β -lactámicos naturales a que nos hemos referido anteriormente (penicilinas y cefalosporinas) eran producidos por hongos y ello no es sorprendente, puesto que estos microorganismos no tienen peptidoglicano en su pared celular. Es, sin embargo, interesante que se han descubierto en los últimos doce años varios grupos distintos de antibióticos β -lactámicos producidos precisamente por bacterias. Uno de estos grupos es el de las cefamicinas (7- α -metoxicefalosporinas) producidas por diversas especies de *Streptomyces* (NAGARAJAN y cols., 1971; STAPLEY y cols., 1972), obteniéndose por hemisíntesis el cefoxitín (Figura 6), que es el antibiótico mejor conocido del grupo de las cefamicinas. A otro grupo distinto pertenece el ácido clavulánico (Figura 6), caracterizado por su baja actividad antibiótica y su potente efecto como inactivador de las β -lactamasas, que se aisló de cultivos de *Streptomyces clavuligerus* (BROWN y colaboradores, 1976). Otra familia de nuevos β -lactámicos producidos por *Streptomyces* está constituida por el grupo de los derivados del

ácido olivánico (BROWN y cols., 1977), dentro de los cuales tenemos la tienamicina (Figura 12) (KAHAN y cols., 1976), cuya importancia radica en que al mismo tiempo tienen actividad antibiótica y son inactivadores de las β -lactamasas. Es de resaltar que en todos los β -lactámicos que hemos mencionado hasta ahora el anillo β -lactámico está condensado con otro anillo de diversas características y hasta se llegó a pensar que esta fusión de los dos anillos podría ser esencial para el carácter antibiótico. Sin embargo, en 1976 se describió la nocardicina A (Figura 6), un antibiótico β -lactámico producido por la bacteria *Nocardia uniformis* (AOKI y cols., 1976), que no tiene este anillo condensado con otro. Actualmente son muy numerosos los antibióticos conocidos de este tipo denominados β -lactámicos monocíclicos, que son producidos por diversas especies de bacterias de los géneros *Pseudomonas* (IMADA y cols., 1981), *Gluconobacter*, *Chromobacterium* y *Agrobacterium* (SYKES y cols., 1981). Se ha propuesto el nombre genérico de «monobactamas» para estos antibióticos monocíclicos β -lactámicos, algunos de los cuales parecen reunir las dos propiedades importantes de ser muy activos como antibióticos y ser unos excelentes inactivadores de las β -lactamasas (SYKES y colaboradores, 1981). El aztreonam (Figura 6) es el compuesto mejor estudiado del grupo de las monobactamas.

Como ya se indica en la Figura 3, los antibióticos β -lactámicos inhiben, en general, las reacciones catalizadas por las D,D-carboxipeptidasas y las transpeptidasas en la síntesis del peptidoglicano. Asimismo, diversos antibióticos β -lactámicos se han propuesto como inhibidores de las endopeptidasas, que son enzimas que se han postulado que actúan como hidrolizantes del peptidoglicano en las fases de elongación y división celular por romper precisamente el puente covalente formado por las transpeptidasas. Por otra parte, todos o casi todos los antibióticos β -lactámicos también interactúan con las β -lactamasas. En todos estos casos la interacción del compuesto β -lactámico con la enzima correspondiente (transpeptidasa, carboxipeptidasa, endopeptidasa y β -lactamasas) tiene lugar por la formación de un puente covalente entre el —OH de una serina de la enzima correspondiente y el $>C=O$ del anillo β -lactámico, rompiéndose con ello este anillo (BLUMBERG y STROMINGER, 1974; STROMINGER, 1977) (Figura 7). Por ello, aunque como vemos, podría parecer muy simple «a priori» el modo de acción de los antibióticos β -lactámicos, realmente es extraordinariamente complejo el conocimiento de la especificidad y selectividad de estos antibióticos, pues en realidad hay

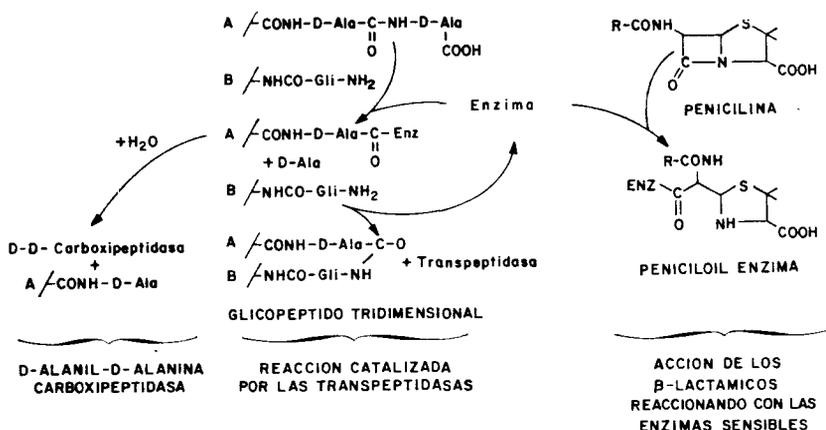


Figura 7: Formación de peniciloil-enzima por reacción de las penicilinas con D,D-carboxipeptidasas y transpeptidasas.

al menos cuatro grupos de enzimas (transpeptidasas, D-D-carboxipeptidasas, endopeptidasas y β -lactamasas), en las cuales pueden actuar estos antibióticos dependiendo esta interacción: (a) del compuesto β -lactámicos están basados en el estudio de su interacción con las cada caso (BLUMBERG y STROMINGER, 1974; SPRATT, 1977a, 1977b; GHUYSEN, 1980). Por este motivo los métodos que más información han aportado en los últimos años sobre el modo de acción de los β -lactámicos está basado en el estudio de su interacción con las membranas bacterianas y posterior identificación de las proteínas que se unen covalentemente a los antibióticos. Estas proteínas se denominan genéricamente PBPs (del inglés «penicillin binding proteins»), independientemente de cuál sea su actividad enzimática. Las transpeptidasas son de importancia definitiva en la formación del peptidoglicano y por ello la acción de los antibióticos en estas enzimas está muy estrechamente relacionada con el efecto inhibitor de los mismos. Actúa más de un tipo de PBP en cada bacteria con actividad transpeptidasa y toda la evidencia bioquímica y genética sugiere que hay al menos dos tipos de transpeptidasas implicadas en la síntesis de peptidoglicano. En unos casos estas enzimas están implicadas en el proceso de la división celular y en otros casos dichas enzimas tienen una importancia más relevante en la morfología y en la elongación de la bacteria (SPRATT, 1975; DE LA ROSA y cols., 1982).

La metodología que hizo avanzar más drásticamente los estudios sobre el modo de acción de los β -lactámicos en los últimos años está basada en la detección y la purificación de las proteínas de la membrana que interaccionan con dichos antibióticos. La interacción covalente de las PBP's con bencil- ^{14}C -penicilina es lo suficientemente firme para mantenerse después de la electroforesis en geles de poliacrilamida pudiendo detectarse las bencil- ^{14}C -peniciloilproteínas mediante la técnica denominada fluorografía o autoradiografía de centelleo (SPRATT, 1977a). Así ha podido establecerse que todas las bacterias que tienen peptidoglicano (como es bien sabido hay dos géneros bacterianos, *Acholeplasma* y *Mycoplasma*, que carecen de pared celular y por tanto de peptidoglicano), presentan invariablemente al menos de cinco a nueve PBP's, siguiendo el método indicado. Parece ser, por otra parte, que todas las PBP's, al menos las estudiadas hasta ahora detalladamente, tienen alguna actividad enzimática en síntesis de peptidoglicano, aunque en algunos casos dicha actividad no está aún bien definida. No obstante, algunas PBP's (generalmente las D,D-carboxipeptidasas, que son aquellas de peso molecular menor) no parecen ser absolutamente necesarias para el crecimiento y la división de las bacterias, al menos en el caso de *E. coli*. Se han publicado numerosos trabajos en los últimos años cuyo objeto es investigar las razones para el efecto bactericida de los antibióticos β -lactámicos y para esclarecer las actividades enzimáticas de las PBP's, que son realmente esenciales para la síntesis del peptidoglicano. La saturación de estas PBP's con los antibióticos β -lactámicos produce un desacople irreversible en la biosíntesis del peptidoglicano, con los consiguientes efectos irreparables para la célula. Estos estudios de interacción de los antibióticos β -lactámicos se han llevado a cabo en la mayoría de los casos con bencil- ^{14}C -penicilina, puesto que es prácticamente el único altamente marcado disponible comercialmente. Por ello, la mayoría de los datos disponibles sobre la interacción de los diversos β -lactámicos con las PBP's han sido obtenidos indirectamente por estudios de competición con bencil- ^{14}C -penicilina (SPRATT, 1977b). Estos estudios han mostrado que: (a) hay importantes diferencias entre las PBP's de distintas bacterias y muy principalmente entre las procedentes de microorganismos Gram positivos comparados con los Gram negativos en su afinidad por los antibióticos β -lactámicos; (b) no todos los antibióticos β -lactámicos interaccionan con todas las PBP's descritas; (c) en general las cefalosporinas interaccionan con menos PBP's que las penicilinas, y (d) hay un grupo reducido de antibióticos

β -lactámicos que solamente actúan en una PBP. El conocimiento de esta diferencia en las PBPs en que actúan los distintos antibióticos β -lactámicos permitió esclarecer en ciertos casos las bases moleculares de acción de algunos de estos antibióticos. Así es bien conocido que el mecilinam interacciona de una manera específica y selectiva con la PBP2 de bacterias Gram negativas (SPRATT, 1977b) y por eso en estos microorganismos tiene una acción sinérgica con otros β -lactámicos que se unen a otras PBPs con actividad transpeptidasa (BERENGUER y cols., 1982).

Teniendo en cuenta estos antecedentes en los estudios sobre la interacción de los antibióticos β -lactámicos con las PBPs, nosotros hemos llevado a cabo estudios para el conocimiento de las mismas, siguiendo diversas directrices tales como: (a) usando no sólo bencil- ^{14}C penicilina sino también un derivado de ampicilina marcado con ^{125}I ; (b) trabajando con bacterias Gram positivas y Gram negativas; (c) estudiando en el caso de bacterias Gram negativas tales como *Pseudomonas aeruginosa*, no sólo cepas silvestres sensibles a los antibióticos β -lactámicos sino también cepas hospitalarias resistentes a los mismos, y (d) estudiando asimismo las bases moleculares del efecto sinérgico entre algunos antibióticos β -lactámicos.

El uso del nuevo β -lactámico radiactivo, que nosotros denominamos para mayor brevedad ^{125}I -ampicilina, ofrece la enorme ventaja de evitar la laboriosa metodología implicada en la fluorografía, pues se pueden reconocer las PBPs simplemente por autoradiografía, con lo cual no se requieren los largos tiempos de exposición necesarios cuando se usa la bencil- ^{14}C -penicilina. Sin embargo, el compuesto que denominaremos ^{125}I -ampicilina es realmente un derivado de este antibiótico (la N(3-(4-hidroxil, 5- ^{125}I iodofenil)propionil)ampicilina), aunque con una actividad inhibitoria similar a la ampicilina (SCHWARZ y colaboradores, 1981). Por este motivo consideramos de gran importancia el correlacionar los resultados obtenidos con los dos β -lactámicos radiactivos disponibles. Así, hemos podido observar que con la excepción de la PBP4, la ^{125}I -ampicilina se une a las mismas proteínas de las membranas de *E. coli* que la bencil- ^{14}C -penicilina, aunque naturalmente con distintas afinidades, pero además la ^{125}I -ampicilina interacciona con varias bandas menores no detectables con bencil- ^{14}C -penicilina. También se observan algunas diferencias en el caso de *B. megaterium*, puesto que en presencia de la ^{125}I -ampicilina se detecta una banda entre la PBP1 y la PBP2 (banda PBP1b) y otra entre la PBP3 y

la PBP4 (banda PBP3') no descritas previamente. Por el contrario, el número de PBPs en *P. aeruginosa* es prácticamente el mismo cuando se estudian con bencil-¹⁴C-penicilina o ¹²⁵I-ampicilina (RODRIGUEZ-TEBAR y cols., 1982a, 1982c; BERENQUER y cols., 1982b).

Aunque como ya indicamos, hay ligeras diferencias cuantitativas en los resultados obtenidos en la interacción de bencil-¹⁴C-penicilina y ¹²⁵I-ampicilina a las PBPs de los distintos microorganismos, esto no es sorprendente, pues no todos los β -lactámicos se unen a las mismas proteínas. En todo caso, estos resultados y los obtenidos por nosotros mismos en células intactas sugieren que las interacciones observadas son específicas y directamente relacionadas con el modo de acción de los antibióticos.

Para tratar de ampliar nuestros conocimientos sobre el papel que cada una de las PBPs juega en la respuesta de la célula frente a los antibióticos β -lactámicos, hemos estudiado el espectro de unión de un amplio grupo de β -lactámicos a las PBPs de *E. coli*, con la idea principal de buscar antibióticos que se unan específicamente a una PBP (VAZQUEZ y cols., 1982a). El disponer de antibióticos que cumplan esta condición facilita enormemente el estudio de los procesos en que la PBP implicada interviene, ya que nos permite bloquear su función selectivamente en el momento que se desee. Además, la utilización de combinaciones de antibióticos altamente selectivos para una PBP nos proporcionará un buen sistema para establecer cuál es la contribución de cada PBP a la respuesta total de la célula frente a los antibióticos β -lactámicos en general. De los resultados obtenidos se han mostrado como particularmente interesantes por la especificidad de su interacción los antibióticos MCH₃K que interacciona con las PBP3 y 1A cefonicid que interacciona con la PBP 1A, confirmando la interacción específica del mecilinam con la PBP2 previamente descrita por SPRATT (1975).

Aunque *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, al igual que *E. coli*, hay abundante evidencia experimental que demuestra una considerable diferencia entre estas dos bacterias en su sensibilidad y permeabilidad a los antibióticos β -lactámicos. Por este motivo hemos estudiado la interacción de diversos β -lactámicos con las PBPs de *P. aeruginosa* en seis a diez concentraciones distintas desde 0,01 hasta 200 μ g/ml., seleccionando algunos por su novedad y otros por su conocida actividad en *Pseudomonas* (RODRIGUEZ-TE-

BAR y cols., 1982a). Así hemos determinado la concentración de los distintos antibióticos que inhibe en un 50 por 100 la interacción de bencil-¹⁴C-penicilina que se considera como la cifra patrón en la medida de la afinidad de un determinado β -lactámico por las PBPs. Asimismo hemos observado que el tiempo de incubación seleccionado para la reacción (10-15 minutos) en general es suficiente para alcanzarse un estado de equilibrio en el complejo antibiótico-PBP, aunque es evidente que nuestros experimentos excluyen la posibilidad de interacciones que podrían ocurrir posteriormente. Nuestros resultados muestran que, en general, los antibióticos β -lactámicos interaccionan con las PBPs de *P. aeruginosa* con menor afinidad que en el caso de *E. coli*. Es de especial interés la baja afinidad de la mayoría de los antibióticos por las PBPs 1a y 1b, puesto que ambas proteínas han sido propuestas como transpeptidasas, precisamente la actividad enzimática más relevante en la síntesis del peptidoglicano que es inhibida por los β -lactámicos; por ello, a la vista de estos resultados, no es sorprendente la poca actividad inhibidora de los β -lactámicos en *P. aeruginosa*. Una excepción importante es la carbenicilina, precisamente el β -lactámico más ampliamente difundido en infecciones de *Pseudomonas*, que tiene gran afinidad por casi todas las PBPs y muy principalmente PBP 1a y PBP 1b. Asimismo, de todos los β -lactámicos ensayados, solamente la carbenicilina y el mecilinam muestran una buena afinidad por la PBP2 de acuerdo con observaciones realizadas previamente por otros científicos (NOGUCHI y cols., 1979).

Nuestros resultados obtenidos en los estudios de fijación de β -lactámicos a las PBPs de *B. megaterium*, un bacilo Gram positivo, difieren ampliamente de los datos obtenidos con las dos especies de bacterias Gram negativas (RODRIGUEZ-TEBAR y cols., 1982c).

Nuestros resultados muestran que, en general, los β -lactámicos tienen mayor afinidad por las PBPs de Gram positivos que de Gram negativos. Ambos tipos de bacterias parecen tener en común una baja afinidad de sus PBPs de bajo peso molecular por los β -lactámicos; así, la PBP5 del *B. megaterium*, al igual que las PBPs 5 y 6 de *E. coli* y las PBPs 4 y 5 de *P. aeruginosa* son bastante resistentes a los β -lactámicos. Entre todos los antibióticos ensayados en el presente estudio, solamente el cefmetazol mostró una alta afinidad y una cierta selectividad por la PBP5 del *B. megaterium*. Sólo unos pocos antibióticos (por ejemplo amoxicilina, clavulanato y BL-P1908) también interaccionan con la PBP5 pero con menor afinidad. Por el con-

trario, casi todos los β -lactámicos tienen una alta afinidad por la PBP4, excepto la cefradina y el mecilinam, siendo realmente insensibles a este último antibiótico las cinco PBPs del *B. megaterium*, por lo cual no es sorprendente la conocida insensibilidad al mismo de las bacterias Gram positivas (RODRIGUEZ-TEBAR y cols., 1982c).

La carbenicilina es el β -lactámico de los estudiados con mayor afinidad por las PBPs de *P. aeruginosa*, siendo asimismo el usado más ampliamente en las infecciones hospitalarias causadas por este microorganismo. Esto muestra la buena correlación existente entre la afinidad del antibiótico por las PBPs y su actividad inhibidora, lo cual es aún más patente cuando en vez de trabajar con preparaciones de membrana estudiamos la fijación del antibiótico usando células de *P. aeruginosa* intactas. Por este motivo y dado su interés, hemos estudiado comparativamente la interacción de la carbenicilina con las PBPs de membranas de *P. aeruginosa* sensibles (cepa NCTC 10662) y resistentes (cepas PH 20610, PH 20815, PH 4011 y PH 4301) a dicho antibiótico. Para estos estudios se usó ^{125}I -ampicilina en vez de bencil- ^{14}C -penicilina, teniendo en cuenta la baja afinidad de la bencilpenicilina por las PBPs de *Pseudomonas*. Una observación interesante es que en ninguna de nuestras cepas resistentes a carbenicilina pudo detectarse la PBP2 y en algunas tampoco la PBP5. Los datos cuantitativos obtenidos por densitometría que se obtuvieron, mostraron que la afinidad de la carbenicilina por las PBPs de las cepas clínicas PH 4011 y PH 4301 estaba altamente disminuida comparada con la cepa silvestre NCTC 10662. Por el contrario, en estos experimentos la afinidad de la carbenicilina por las PBPs de las cepas PH 20610 y PH 20815 es similar a las de la cepa silvestre. Ciertamente, en el caso de estas dos cepas la resistencia a la carbenicilina parece ser debida a una barrera de permeabilidad para el antibiótico; efectivamente, la carbenicilina sólo a muy elevadas concentraciones (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) interfiere con la interacción de la ^{125}I -ampicilina con las PBPs 1a, 1b, 3 y 4 de las cepas resistentes PH 20610 y PH 20815, mientras que a concentraciones mucho más bajas (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) es efectiva bloqueando dichas interacciones en la cepa silvestre. Las interacciones con las PBPs 5 y 6 seguramente son menos relevantes en todos los casos para la resistencia al antibiótico, puesto que como es sabido estas proteínas están implicadas solamente en la actividad D,D-carboxipeptidasa. Es interesante, por otra parte, la observación de que la resistencia a la carbenicilina de la cepa PH4011 parece ser

manifiestamente debida al uso selectivo de dicho antibiótico en la clínica, puesto que la afinidad de las PBP's 1a, 1b y 4 por la carbenicilina hemos visto que está manifiestamente disminuida en dicha cepa, pero sin estar afectada en absoluto la afinidad de dichas PBP's por los antibióticos cefonicid, cefuroxima, cefaclor, cefotaxima y cefoperazona, que son bien conocidos por su buena actividad como inhibidores de *P. aeruginosa* (RODRIGUEZ-TEBAR y cols., 1982b).

Como ya hemos indicado anteriormente, la nocardicina A tiene un interés especial por ser el primer antibiótico conocido de la familia de compuestos denominados β -lactámicos monocíclicos, puesto que no presentan en su estructura ningún anillo condensado con el β -lactámico. La nocardicina A, al contrario que el mecilinam, tiene un efecto inhibitor muy reducido en *E. coli*, puesto que su concentración mínima inhibitora en esta bacteria es de 40 μ M, mientras que la del mecilinam es de 0,15 μ M. De hecho solamente se pone de manifiesto mediante turbidometría el efecto inhibitor de la nocardicina A en cultivos de *E. coli* a más elevadas concentraciones del antibiótico (BERENGUER y cols., 1982a). Por otra parte, la nocardicina A a concentraciones más bien elevadas tiene un marcado efecto bactericida similarmente a lo ya descrito con el mecilinam (NEU, 1976). Sin embargo, cuando se añade nocardicina A a concentraciones más bien bajas (40 μ M) a un cultivo de *E. coli* al que se le ha añadido una concentración moderada de mecilinam (3 μ M) hay un drástico efecto sinérgico en la acción de los antibióticos que se pone de manifiesto tanto mediante estimaciones turbidométricas como por recuento de células vivas, pues la mezcla sinérgica tiene un marcado efecto bactericida. Todos estos efectos nos resultaron inicialmente muy sorprendentes, puesto que la nocardicina A habíamos observado que tiene muy poca afinidad por las PBP's de las membranas de *E. coli* en sistemas acelulares; de hecho la nocardicina A a una concentración 600 μ M, prácticamente no afecta la interacción de la bencil-¹⁴C-penicilina con las membranas de *E. coli*. Sin embargo, se obtuvieron resultados drásticamente diferentes cuando los estudios de interacción de la nocardicina A se llevaron a cabo con células intactas, pues en estas condiciones el antibiótico se une a diversas PBP's. Estos estudios se llevaron a cabo por competición de nocardicina A separadamente con bencil-¹⁴C-penicilina (BERENGUER y cols., 1982b) y ¹²⁵I-ampicilina. La razón de estudiar la competición de nocardicina A con ambos antibióticos radiactivos es que en las células intactas la

PBPs 1b (CHASE y cols., 1981) y la PBP2 no se detectaban con bencil-¹⁴C-penicilina y la intensidad de la PBP5 era mucho más débil que en membranas purificadas, mientras que el espectro de PBPs con ¹²⁵I-ampicilina era muy similar con membranas y con células intactas. Los resultados obtenidos mostraron que en células intactas de *E. coli* la nocardicina A interacciona con las PBPs 1B, 1A, 2 y 4 y ello permite explicar el muy interesante efecto sinérgico con el mecilnam que hemos observado.

En todos los casos los resultados presentados anteriormente fueron obtenidos con cultivos de bacterias en crecimiento exponencial durante el cual hay un espectro bien estudiado de las distintas PBPs; es bien conocido, sin embargo, que hay un cambio drástico en el espectro de las PBPs cuando no hay crecimiento de las bacterias, llegando incluso a desaparecer algunas PBPs (DE LA ROSA y colaboradores, 1982).

Antibióticos inhibidores de la biosíntesis de las proteínas

Un efecto inhibitor específico en biosíntesis de proteínas de cloranfenicol y clortetraciclina, a sus concentraciones inhibitoras mínimas, fue descrito ya por GALE y PANE en 1950, cuando observaron que dichos antibióticos causaban un bloqueo inmediato de la síntesis de proteínas en bacterias y un aumento en la cantidad de RNA sin afectar la respiración, ni la fermentación, ni la acumulación de aminoácidos. Trabajos que revelaron efectos similares en células superiores tardaron en ser conocidos hasta que David Kerridge describió, en 1958, el efecto inhibitor de la cicloheximida en la biosíntesis de proteínas en levaduras. A partir de 1961 se desarrollaron los sistemas acelulares para estudiar la biosíntesis de las proteínas, así como los métodos adecuados para investigar las distintas reacciones que tienen lugar en el proceso de la traducción. Desde entonces se han ido elucidando los pasos específicos bloqueados por los distintos inhibidores al conocerse sistemas adecuados para el estudio de los mismos.

La mayoría de los inhibidores de la biosíntesis de proteínas, y ciertamente los de mayor interés en biología y en medicina, son antibióticos que actúan bloqueando específicamente el proceso de la traducción del mRNA a nivel del ribosoma. Como es bien sabido, se llama traducción a la conversión de la secuencia de nucleótidos de una molécula en mRNA en una secuencia correspondiente de aminoácidos

de una cadena polipeptídica. En el estudio de la traducción podemos considerar al menos tres tipos de sistemas: sistemas procarióticos tipo eubacterias (bacterias y algas azules, así como mitocondrias y cloroplastos), sistemas del tipo arqueobacterias, y sistemas de tipo eucariótico (los del citoplasma de las células superiores). Para una mayor simplificación en algunos casos, hablaremos de sistemas procarióticos refiriéndonos concretamente a los de tipo eubacterias; aunque las arqueobacterias son también células procarióticas hablaremos siempre de sistemas arqueobacterianos al referirnos a los de este tipo de procariotes. En la mayoría de los casos, los distintos componentes de distintas células de cada uno de los tipos de sistemas son intercambiables entre sí, considerando cada tipo de sistema separadamente.

Los ribosomas mejor estudiados de los sistemas procarióticos son los del tipo eubacterias. Al igual que los ribosomas de algas azules (RODRIGUEZ LOPEZ y VAZQUEZ, 1968) y de cloroplastos, tienen un coeficiente de sedimentación 70S y están formados por dos subunidades de coeficientes de sedimentación 30S y 50S, que se unen en la fase de iniciación del proceso de la traducción. Por ello, al referirnos a los ribosomas de sistemas de eubacterias o procarióticos, los mencionaremos también como ribosomas de tipo procariótico o 70S, aun a sabiendas de que su coeficiente de sedimentación puede ser en algunos casos muy diferente, como ocurre con los ribosomas de mitocondrias, que varían desde 55S hasta 80S, según su procedencia (CHAMBLISS y cols., 1980). Por el contrario, los ribosomas del citoplasma de las células superiores tienen un coeficiente de sedimentación 80S, o muy próximo a este valor, en todos los casos estudiados; están formados por dos subunidades, cuyo coeficiente de sedimentación es 40S y 60S, respectivamente (Tabla 2). Al referirnos a los ribosomas de sistemas eucarióticos frecuentemente los mencionaremos, pues, como ribosomas de tipo 80S o eucariótico. Interesa destacar que la subunidad mayor de los ribosomas de mitocondrias de hongos, protozos y animales superiores carece del RNA 5S presente en la subunidad mayor de los demás tipos de ribosomas procarióticos y eucarióticos (CHAMBLISS y cols., 1980). Los ribosomas de bacterias poseen 54 proteínas; de las cuales, 33 están en la subunidad mayor (proteínas L) y 21 en la subunidad menor (proteínas S). Los ribosomas del citoplasma de células superiores tienen 70 proteínas; 40 de ellas se hallan en la subunidad mayor (proteínas L) y 30, en la

subunidad menor (proteínas S). (CHAMBLISS y cols., 1980; OSAWA y cols., 1979). Aunque observando los datos presentados en la Tabla 2 podría pensarse que los ribosomas de bacterias, algas azules y cloroplastos son enteramente similares a los de arqueobacterias, estudiando los componentes de dichas partículas se observa que hay unas diferencias muy importantes. En primer lugar hay que resaltar que las proteínas de los ribosomas de las arqueobacterias son en su mayoría de naturaleza ácida, al contrario de lo que ocurre con las proteínas de eucariotes, de eubacterias y de orgánulos celulares procarióticos que son básicas en su mayoría. Sin embargo, hay dos proteínas ácidas del ribosoma bacteriano (L7 y L12) que con unas modificaciones mayores o menores parecen estar universalmente representadas en todo tipo de ribosomas. El estudio de estas proteínas A (proteínas ácidas equivalentes a L7 y L12) de los ribosomas de eucariotes y arqueobacterias están mucho más próximas entre sí que cualquiera de ellos con las L7 y L12 de bacterias. Asimismo los estudios del RNA 5S de la subunidad mayor del ribosoma de arqueobacterias está tan distante del RNA 5S de bacterias como del equivalente del ribosoma eucariótico. Finalmente, los estudios detallados y exhaustivos del RNA de la subunidad ribosómica menor de los ribosomas de bacterias, arqueobacterias y células eucarióticas muestran de nuevo la gran diferencia entre el RNA 16S de arqueobacterias y de bacterias (OSAWA y cols., 1979; CHAMBLISS y cols., 1980). Hay desacuerdo acerca de si las arqueobacterias emergieron aproximadamente al mismo tiempo que bacterias y células eucarióticas (DOOLITTLE, 1980) o posteriormente a las bacterias y anteriormente a las células eucarióticas (HORI y OSAWA, 1979), pero en todo caso parece evidente que las arqueobacterias están tan distantes evolutivamente de las unas como de las otras. Conclusiones similares se obtienen al estudiar el tRNA de los tres tipos de células (OSAWA y cols., 1979) y los factores de elongación en biosíntesis de proteínas, mostrándose que el factor de arqueobacterias equivalente al EF-2 de eucariotes tiene como éste el aminoácido básico diftamina que no se ha encontrado en el factor equivalente de bacterias ni en ningún otro material biológico (KESSEL y KLINK, 1980).

Nuestros estudios iniciales sobre la localización del ^{14}C -cloranfenicol, en las bacterias mostraron que el antibiótico se unía a los ribosomas de todos los tipos de ribosomas de sistemas procarióticos estudiados, y en ningún caso a los ribosomas eucarióticos (VAZQUEZ,

TABLA 2

Características generales de los distintos tipos de ribosomas

Tipo de ribosomas	Ribosomas		Subunidad menor		Subunidad mayor	
	Completa	RNA	Proteínas	Completa	RNA	Proteínas
Ribosomas de tipo procarlótico:						
Bacterias	70S	16S	Básicas	50S	5S y 23 S	Básicas y A
Algas azules	70S	16S	Básicas	50S	5S y 23S	Básicas y A
Cloroplastos	70S	16S	Básicas	50S	5S y 23S	Básicas y A
Mitocondrias de hongos	70-75S	16S	Básicas	50S	23S	Básicas y A
Mitocondrias de protozoos	80S	16S	Básicas	50S	23S	Básicas y A
Mitocondrias de animales superiores	55-60S	12S	Básicas	40-45S	16S	Básicas y A
Mitocondrias de vegetales superiores	77-80S	16S	Básicas	50S	5S y 23S	Básicas y A
Ribosomas de tipo arqueobacterias:						
Arqueobacterias	70S	16S	Acidicas	50S	5S y 23S	Acidicas y A
Ribosomas de tipo eucariótico:						
Citoplasma de células eucarióticas	80S	18S	Básicas	60S	5S, 5,8S y 28S	Básicas y A

1964a). Una selectividad similar se observó posteriormente con una serie de antibióticos, mientras que otros ofrecían un espectro más amplio. Y puesto que hemos partido de la existencia de tres tipos de sistemas de biosíntesis de proteínas, procarióticos, arqueobacterias y eucarióticos, que participan de múltiples características comunes, aunque difieren en muchos aspectos y componentes, sus inhibidores podrán clasificarse, de una manera global, en razón de su selectividad: los que actúan en sistemas procarióticos, los inhibidores de sistemas eucarióticos y los que actúan en sistemas de arqueobacterias. Puesto que los sistemas tienen una serie de características y funciones similares no es sorprendente que se conoce un grupo de inhibidores que interfieren tanto en sistemas procarióticos como en sistemas eucarióticos (Tabla 3). Asimismo se han descrito ya algunos inhibidores que actúan en sistemas de arqueobacterias y de eubacterias y otros que actúan en sistemas eucarióticos y de arqueobacterias (Tabla 3). Sin embargo, aún no se ha descrito ningún inhibidor que actúe: (a) en los tres tipos de sistemas, o (b) solamente en arqueobacterias. Es, sin embargo, muy posible que existan tales inhibidores pero que aún no se han descrito porque el estudio de la traducción en arqueobacterias está aún en sus comienzos.

El conocimiento del modo de acción de los inhibidores de la traducción es de gran interés para el esclarecimiento del proceso y para la mejor comprensión de la estructura del ribosoma. El proceso de la traducción ocurre con precisa exactitud; se estima que hay menos de un aminoácido incorporado erróneamente por cada diez mil unidos a través de enlaces peptídicos, en la reacción catalizada por el ribosoma de acuerdo con la secuencia de bases del mRNA. Resulta de gran importancia, además, estudiar los inhibidores que actúan en sistemas procarióticos, puesto que la mayoría de ellos son antibióticos que tienen interés médico y biológico por su selectividad.

En el proceso de la traducción podemos distinguir la fase de iniciación, los ciclos repetidos de elongación y la fase de terminación (Figuras 8 y 9). En la fase de iniciación se requieren las dos subunidades ribosómicas, el sustrato iniciador (formilmetionil-ácido ribonucleico de transferencia (f-Met-tRNA_f) en sistemas tipo eubacterias y Met-tRNA_f en sistemas eucarióticos y de arqueobacterias) GTP, mRNA y diversas proteínas conocidas con el nombre de factores de iniciación (en bacterias: IF 1, IF 2 y IF 3; en sistemas eucarióticos: ESP, eIF 1, eIF 2, eIF 3, eIF 4A, eIF 4B, eIF 4C, eIF 5, la proteína requerida

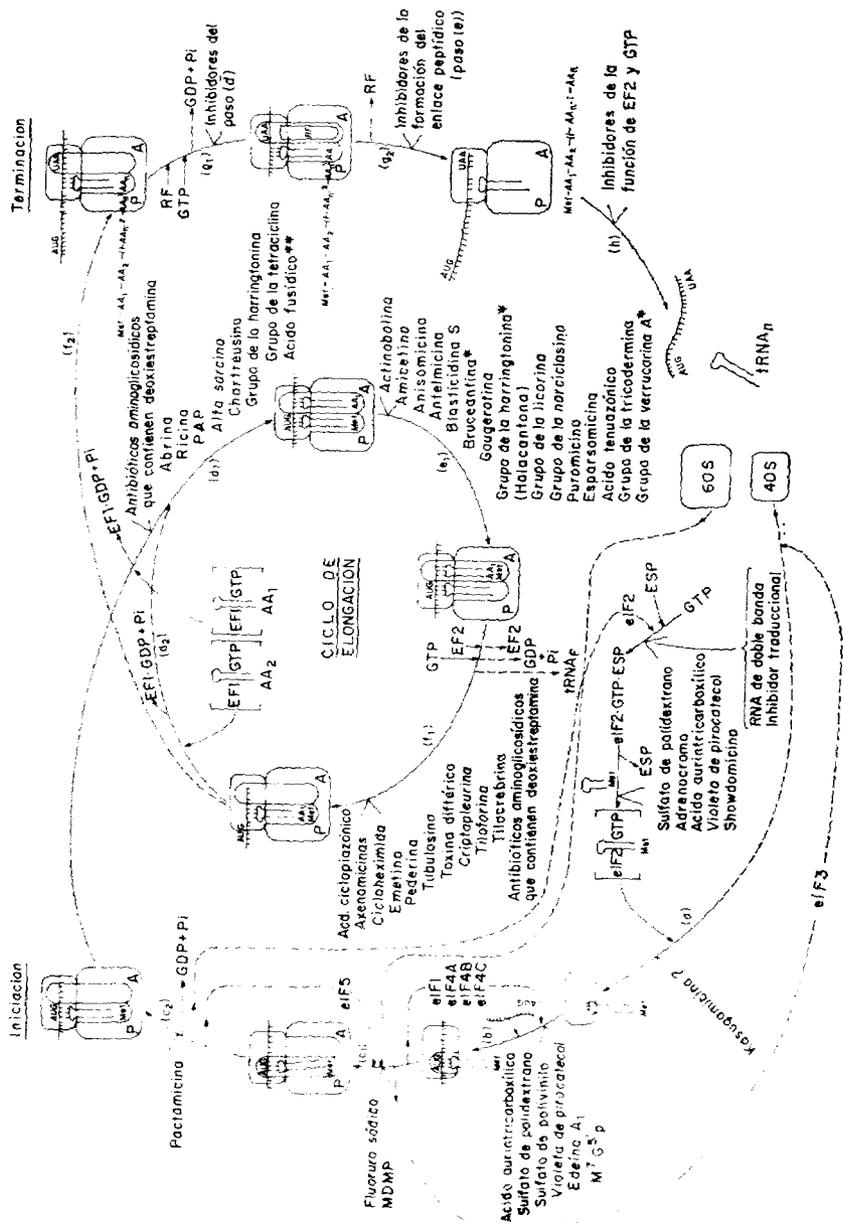


Figura 9: Proceso de la traducción en eucariotes: sitio de acción de los inhibidores.

TABLA 3 (1.ª parte)

Selectividad de los inhibidores de biosíntesis de proteínas

INHIBIDORES DE LA TRADUCCION QUE ACTUAN EN SISTEMAS PROCARIOTICOS

Altiomicina	Antibióticos macrólidos:
Antibióticos aminoglucosídicos:	Grupo de la carbomicina:
Dihidroestreptomicina	Carbomicinas
Estreptomicina	Josamicina
Avilamicina	Leucomicinas
Berninamicina	Nidamicinas
Botromicina A₂	Grupo de la eritromicina:
Grupo del cloranfenicol:	Eritromicinas
Cloranfenicol	Neospiramicinas
D-AMP-3	Oleandomicina
Hígromicina A	Angolamicina
D-Tiomicitina	Angolamicina
D-Win-5094	Espiramicinas
Cloacina DF13	Relomicina
Colicina E3	Tilosina
Espectinomicina	Grupo de la lancamicina:
Grupo de la estreptogramina A:	Chalcomicina
Estreptogramina A	Kujimicina A
Griseoviridina	Lancamicina
Ostreogricina G	Grupo de la metimicina:
Grupo de la estreptogramina B:	Forocidinas
Estafilomicina S	Metimicina
Estreptogramina B	Narbomicina
Viridogriseina	Neometimicina
Estreptotricinas	Picromicina
Grupo de la lincomicina:	Micrococina
Celesticetina	Negamicina
Clindamicina	Rubradirinas
Lincomicina	Termorrubina
	Grupo del tiostrepton:
	Esporangiomicina
	Siomicina
	Tiopeptina
	Tiostrepton
	Grupo de la viomicina:
	Capreomicinas
	Viomicina

TABLA 3 (2.ª parte)

Selectividad de los inhibidores de biosíntesis de proteínas

INHIBIDORES DE LA TRADUCCION QUE ACTUAN EN SISTEMAS EUCARIOTICOS

Abrina	Grupo de la licorina:
Acido ciclopiazónico	Licorina
Acido tenuazónico	Pseudolicorina
Alfa sarcina	MDMP
Anisomicina	Grupo de la narciclasina:
Antiamebina	Hemantamina
Axenomicina	Narciclasina
Grupo de la bruceantina:	Pretazetina
Bruceantina	PAP
Holacantona	Pederina
Grandilactona A	Ricina
Grandilactona B	Antibióticos tricotecénicos:
Crotinas	Grupo de la tricodermina:
Curcinas	Fusarenón X
Grupo de la emetina:	Tricodermina
Emetina	Tricodermol
Tubulosina	Tricotecina
Enomicina	Grupo de la verrucarina A:
Fenomicina	Desacetoxiescirpenol
Fluoruro sódico	Nivalenol
Grupo de la glutarimida:	Toxina T-2
Actifenol	Verrucarina A
Cicloheximida	Alcaloides de Tylophora:
Estreptimidona	Criptopleurina
Estreptovitacina A	Tilocrebrina
Grupo de la harringtonina:	Tiloforina
Harringtonina	Toxina diftérica
Homoharringtonina	
Isoharringtonina	

TABLA 3 (3.ª parte)

Selectividad de los inhibidores de biosíntesis de proteínas

INHIBIDORES DE LA TRADUCCION QUE ACTUAN EN SISTEMAS PROCARIOTICOS
Y EUCARIOTICOS

Acido aurintricarboxílico	Guanilil-metilen-difosfato
Acido fusídico	Guanilil-imido-difosfato
Actinobolina	Higromicina B
Adrenocromo	Nucleocidina
Grupo de la ampicetina:	Pactamicina
Ampicetina	Puromicina
Bamicetina	Showdomicina
Plicacetina	
Antelmicina	Sulfato de polidextrano
Blasticidina S	Sulfato de polivinilo
Chartreusina	Grupo de la tetraciclina:
Edeína A ₁	Clortetraciclina
Esparsomicina	Doxiciclina
Gougerotina	Oxitetraciclina
	Tetraciclina
	Tosilfenilalanilclorometano

INHIBIDORES DE LA TRADUCCION QUE ACTUAN EN SISTEMAS
DE ARQUEBACTERIAS

- Anisomicina (activo también en eucariotes).
- * Cloranfenicol (activo también en bacterias).
- Toxina diftérica (activa también en eucariotes).
- * Aunque el cloranfenicol inhibe el crecimiento de las Arquebacterias no ha podido demostrarse su interacción con los ribosomas y se ha postulado que su efecto inhibitor no es a nivel de la biosíntesis de las proteínas, sino por bloquear las hidrogenasas (G. Schmid, Th. Pecher y A. Bock (1982), *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C* 3, 209).

específicamente para la interacción del terminal 5' del mRNA y quizá algunos otros descritos recientemente).

Inhibidores de la fase de iniciación en el proceso de la traducción

Hay una sola fase de iniciación por cada cadena proteica que se sintetiza. En ella distinguimos tres pasos, al menos (Figuras 8 y 9): *consiste el paso (a) en el reconocimiento de los factores de iniciación y fijación del sustrato iniciador (f-Met-tRNA en sistemas procarióticos y Met-tRNA en eucarióticos y arqueobacterias) a la subunidad ribosómica menor (30S en bacterias y arqueobacterias y 40S en sistemas eucarióticos); el paso (b) consiste en el reconocimiento del triplete nucleotídico iniciador del mRNA; el paso (c) está constituido por las reacciones finales de la iniciación que determinan la formación del complejo de iniciación en el ribosoma de tipo 80S o 70S. En algunos sistemas eucarióticos, el paso (b) consiste en el reconocimiento del triplete nucleotídico iniciador del mRNA; el paso (c) está constituido por las reacciones finales de la iniciación que determinan la formación del complejo de iniciación en el ribosoma de tipo 80S o 70S. En algunos sistemas eucarióticos, el paso (b) abarca dos reacciones; en la reacción (b₁) hay una interacción, con la subunidad ribosómica menor, de las secuencias nucleotídicas de mRNA anteriores al triplete de bases iniciador (AUG), mientras que en la reacción (b₂) tiene lugar el reconocimiento del AUG iniciador del mRNA. El paso (c) implica las reacciones (c₁), en que la subunidad ribosómica mayor (50S en bacterias y 60S en sistemas eucarióticos) se une al complejo de iniciación formado en la subunidad ribosómica menor y (c₂) en que el terminal 3' del sustrato iniciador se une al sitio donador del centro peptidil transferasa de la subunidad ribosómica mayor. De acuerdo con la hipótesis más ampliamente aceptada, las interacciones codón-anticodón del mRNA y del sustrato iniciador, no sólo se dan a nivel del sitio A (aceptor), sino también a nivel del sitio P (donador) de la subunidad menor del ribosoma (HUNT, 1980).*

En los últimos siete años se ha descrito una importante característica en el extremo terminal 5' de los mRNA de algunos sistemas eucarióticos: se trata de la secuencia 5' terminal metilada m⁷ G (5')ppp..., denominada «cap», no detectada nunca en los mRNA de bacterias, aunque sí descrita en algunos mRNA, que se traduce en distintas células humanas, en células de mono y de ratón y en virus vacunal, SV 40, reovirus y virus de la estomatitis vesicular. En los

mRNA provistos del $m^7 G^5'p$ en el extremo terminal 5', éste es esencial para una mayor eficacia de la traducción y participa en el paso (b₁) anteriormente reseñado. Por ello, la presencia de dicho terminal 5' estimula la eficacia, pero no la especificidad de la traducción.

Se ha demostrado que un ribosoma puede cubrir, por su tamaño, unos doce tripletes de mRNA, aunque en el proceso de su lectura solamente hay interacciones codón-anticodón de los tripletes. De ahí que un ribosoma implicado en la traducción, lea unos doce tripletes nucleótidos del mRNA antes de unirse al mRNA a otro ribosoma y así sucesivamente hasta formar un polisoma, en el que diversos ribosomas están leyendo un mismo mRNA con un desfase de unos doce tripletes con los ribosomas más próximos.

Las reacciones iniciales del paso (a) (que consiste en el reconocimiento de los factores de iniciación y fijación del sustrato iniciador a la subunidad tribosómica menor) no se han podido estudiar aisladamente en sistemas de bacterias. En sistemas de eucariotes, por contra, se ha esclarecido la existencia de al menos dos reacciones en dicho paso: en la primera tiene lugar la formación del complejo eIF-2-Met-tRNA_F-GTP y, en la segunda, este complejo se une al ribosoma. En sistemas eucarióticos se conocen diversos inhibidores de la primera reacción (VAZQUEZ, 1974, 1978, 1979a, 1981a; VAZQUEZ y JIMENEZ, 1980): showdomicina, ácido aurintricarboxílico, violeta de pirocatecol, adrenocromo y sulfato de polidextrano. Estos inhibidores sirven para esclarecer los distintos pasos de la traducción, aunque muestren poca especificidad. Así, la showdomicina, por ser un análogo de maleimida, no sólo bloquea el factor eucariote eIF-2, sino las distintas enzimas en las que los grupos —SH tienen un papel esencial. Los colorantes trifenil-metánicos (ácido aurintricarboxílico y violeta de pirocatecol), el adrenocromo y el sulfato de polidextrano inhiben la formación del complejo eIF-2-Met-tRNA_F-GTP en eucariotes y, además, el paso (b) en sistemas tanto de bacterias como de células superiores. Su uso está prácticamente restringido a sistemas acelulares debido a su difícil permeabilidad en células intactas.

Se conocen, por otra parte, varios inhibidores de la formación del complejo EIF-2-Met-tRNA_F-GTP, de gran importancia fisiológica, como son el inhibidor traduccional (conocido también con el nombre de represor controlado por la hemina), el RNA de doble banda y el interferón (VAZQUEZ, 1974, 1978, 1979; VAZQUEZ y JIMENEZ, 1980; VAZQUEZ y cols., 1982b). El inhibidor traduccional se comenzó estudiando

en reticulocitos de conejo y se denominó represor controlado por la hemina, al poseer estas características. Se demostró que un inhibidor traduccional similar estaba ampliamente representado en los distintos tipos de células eucarióticas. Se caracteriza por poseer una actividad kinasa (activadora) independiente del AMP cíclico y que opera fosforilando el factor eucariote eIF 2. El RNA de doble banda interfiere con la función del factor eucariote eIF 2 e inhibe así la formación del complejo eIF-2-Met-tRNA_F-FTP en células tanto normales como infectadas por virus. A su vez, el RNA de doble banda induce la formación de unas proteínas o glicoproteínas específicas, conocidas genéricamente con el nombre de interferón, y aumenta los efectos de éste en las células infectadas por virus. El interferón inhibe la multiplicación de virus sensibles bloqueando el proceso de la traducción. Sin embargo, la potenciación de efectos entre el RNA de doble banda y el interferón es un fenómeno muy complejo, en el que se hallan implicadas una serie de reacciones, cuya relación entre sí no se conoce del todo: inducción de fosforilación de algunas proteínas, inducción de actividad nucleasa que degrada al mRNA, inactivación de ciertos tRNA y producción de un inhibidor de la traducción cuya estructura en ciertas células se ha identificado como ppp A2'p5'A2'p5'A.

El antibiótico kasugamicina es, realmente, el único inhibidor específico del paso (a) que bloquea la interacción del sustrato iniciador, en bacterias y en células eucariotes (VAZQUEZ, 1978, 1979a) (Figuras 8 y 9). Aunque este antibiótico se usa como antifúngico en agricultura, su modo de acción se ha estudiado principalmente en sistemas bacterianos. Interacciona con la subunidad ribosómica 30S bloqueando la unión del f-Met-tRNA_F a esta subunidad. En mutantes de *E. coli* resistentes al antibiótico, la resistencia se debe a una deficiencia en la metilación de dos residuos adyacentes de adenina, que no se presentan en el RNA de 16S de la subunidad ribosómica 30S de la cepa resistente.

Decíamos anteriormente que el paso (b) de la única fase de iniciación existente por cada cadena proteica que se sintetiza, consistía en el reconocimiento del triplete nucleotídico iniciador del mRNA. Mas dicho paso (b) no implica sólo la interacción codón del mRNA-anticodón del tRNA_F a nivel de la subunidad menor del ribosoma, sino también la interacción de ciertas secuencias nucleotídicas del RNA anteriores al triplete iniciador. Se requiere también el factor IF 3 en bacterias o diversos otros factores en eucariotes.

Los compuestos $m^7G^{5'}$ ppp (7-metilguanósín-5'-trifosfato), $m^7G^{5'}$ pp, $m^7G^{5'}$ pppAm, $m^7G^{5'}$ pppCm, $m^7G^{5'}$ pppUm se han descrito como inhibidores específicos del paso (b) que actúan en sistemas eucarióticos, traduciendo un mRNA provisto de $m^7G^{5'}$ («cap») en su parte terminal 5', por interferir con la interacción de los nucleótidos del mRNA anteriores al triplete iniciador. Trabajos recientes han mostrado que estos análogos del «cap» también interfieren en la fase de iniciación en la traducción de los mRNA que no poseen «cap» en el terminal 5' aunque su efecto inhibitor parece ser menor (VAZQUEZ, 1979a; FRESNO y VAZQUEZ, 1980; VAZQUEZ y JIMENEZ, 1980; VAQUEZ y colaboradores, 1982b).

El antibiótico edeína A_1 resulta muy apto para el estudio de la fase de iniciación en sistemas acelulares de bacterias o células superiores, pero no en bacterias intactas, puesto que, en este caso, constituye un inhibidor muy eficaz de la replicación del DNA; su actividad en biosíntesis de proteínas sólo se manifiesta a concentraciones más elevadas. Sin embargo, en sistemas acelulares la edeína interacciona preferentemente con la subunidad ribosómica menor y actúa en el paso (b) de la base de iniciación, pues no permite la formación del correspondiente complejo de iniciación. En el caso de la traducción de los mRNA que tienen el terminal 5' $m^7G(5')p$, la edeína A_1 no interfiere con la interacción de este terminal aunque sí bloquea específicamente el reconocimiento del AUG iniciador (reacción b) (FRESNO y cols., 1976; CARRASCO y cols.; FRESNO y VAQUEZ, 1978; VAZQUEZ, 1979a; KOZAK, 1979 y 1980).

El paso (c) (Figuras 8 y 9) recordamos, está constituido por las reacciones finales de la iniciación que determinan la formación del complejo de iniciación en el ribosoma de tipo 80S (eucariotes) o de tipo 70S (procariotes). Consta de dos reacciones: (c_1) y (c_2). En lo referente al paso (c_1), en el que tiene lugar la interacción de la subunidad ribosómica mayor con el complejo de iniciación formado en la subunidad ribosómica menor, no se ha descrito ningún inhibidor activo en sistemas bacterianos. Por el contrario, los fluoruros (sódico y potásico) y el herbicida 2-(4-metil-2,6-dinitro-anilino)-N-metil-propionamida (MDMP) se han propuesto como inhibidores específicos del paso (c_1), actuando de un modo selectivo en sistemas eucarióticos.

El antibiótico pactamicina actúa a bajas concentraciones en la subunidad menor de los ribosomas, tanto proarióticos como eucarió-

ticos, impidiendo la iniciación de la cadena peptídica en ambos tipos de sistemas: bloquea la colocación del sustrato iniciador en la posición correcta en el sitio donador en la subunidad mayor del ribosoma (paso c₂). A concentraciones más elevadas, el antibiótico interfiere también con la subunidad mayor del ribosoma, y por ello tiene un efecto secundario en los ciclos de la elongación de la cadena peptídica (FRESNO y cols., 1976; VAZQUEZ, 1974, 1978, 1979a; VAZQUEZ y JIMENEZ, 1980).

Inhibidores del ciclo de elongación en el proceso de la traducción

El alargamiento de la cadena peptídica tiene lugar por medio de ciclos repetidos compuestos de tres pasos secuenciales (Figuras 8 y 9). El paso (d) consiste en la fijación de aminoacil-tRNA, dependiente de GTP y del factor EF-Tu (o EF-1); el paso (e), en la formación del enlace peptídico catalizada por el centro peptidil transferasa, integrado en la subunidad mayor del ribosoma, y, el paso (f) en la translocación del sustrato dependiente del factor EF-G (o EF-2). Además del complejo de iniciación formado en el paso (c₂), se requieren, en el primer ciclo de elongación, dos moléculas de GTP, el aminoacil-tRNA codificado por el triplete nucleotídico correspondiente del mRNA y los factores de elongación EF-Ts, EF-Tu y EF-G en bacterias y los factores EF-1 y EF-2 en eucariotes. Hay un solo sitio de entrada del complejo aminoacil-tRNA-GTP-EF-Tu (o EF-1) en el sitio A del ribosoma; se precisa la hidrólisis del GTP para la separación ulterior del factor EF-Tu del ribosoma. Esta fijación fisiológica se denomina enzimática en contraposición con la fijación no enzimática, que puede llevarse a cabo en sistemas acelulares en presencia de altas concentraciones de Mg⁺⁺ no fisiológicas. La translocación (paso f) requiere uno de los factores de elongación (EF-G en bacterias y EF-2 en eucariotes) e implica el movimiento del peptidil-tRNA del sitio A al sitio P acoplado al movimiento de un triplete del mRNA en el ribosoma; se exige la hidrólisis de una molécula de GTP para la separación posterior del factor EF-G (o EF-2). En sistemas acelulares, y en ausencia de los factores de elongación y de GTP, tiene lugar una lenta translocación espontánea no enzimática. Esta translocación no enzimática se acelera considerablemente en sistemas eucarióticos en presencia en elevadas concentraciones de K⁺ o NH₄⁺. Los dos factores de elongación que forman complejo con GTP (y ya sea EF-Tu o EF-G en bacterias o bien EF-1 o EF-2 en eucariotes) parecen interactuar con

un sitio común o superpuesto de la subunidad ribosómica mayor; por tanto, no se unen de una manera simultánea, sino alternativamente, al ribosoma. Así, la interacción de cada uno de los factores de elongación tiene lugar después de la separación del otro del ribosoma (CLARK, 1980).

Dentro de los compuestos que interfieren con el reconocimiento del aminoacil-tRNA podemos distinguir al menos dos grupos. Abarca el primero los inhibidores de la fijación de los aminoacil-tRNA dependientes del GTP y del factor EF-Tu (o EF-1); el otro agrupa los compuestos que, por causar errores en la lectura del mRNA, bloquean la síntesis de las proteínas, pues favorecen la interacción errónea de los aminoacil-tRNA en el sitio aceptor del ribosoma. Los antibióticos del grupo de la tetraciclina son potentes inhibidores de la fijación enzimática de aminoacil-tRNA. Estos antibióticos ofrecen numerosos sitios de interacción con ambas subunidades ribosómicas, al menos en bacterias, pero su unión con la subunidad ribosómica menor parece ser más acorde con su modo de acción. Aunque de acuerdo con lo indicado en la Tabla 3 y en las Figuras 8 y 9 las tetraciclinas actúan en procariotes y eucariotes, las actividades de las tetraciclinas en células eucarióticas es muy pequeña, comparada con sus actividades en bacterias y en contra de lo que pudiera parecer tiene un amplio uso de terapéutica. Ello obedece a que sólo las bacterias tienen un transporte activo para estos antibióticos; se concentran, por tanto, en el citoplasma de las cepas sensibles, mientras que los mutantes resistentes a las tetraciclinas tienen una modificación en una de las proteínas de la membrana externa que impide la concentración de antibiótico en el citoplasma bacteriano (VAZQUEZ y JIMENEZ, 1980; VAZQUEZ, 1974, 1978, 1979a, 1981a, 1981b, 1981c).

El ácido fusídico puede inhibir el paso de la translocación en sistemas acelulares, cuando se añade en gran exceso o cuando, alternativamente, sólo se incorpora una pequeña concentración de EF-G (o EF-2) en el sistema. Esto ocurre porque se forma el complejo GTP-ribosoma-ácido fusídico-EF-G (o EF-2) y, por tanto, el antibiótico puede secuestrar todo el EF-G (o EF-2) disponible. Ahora bien, el efecto del ácido fusídico en tales sistemas es abolido por concentraciones saturantes de EF-G (o EF-2). No obstante, en células intactas y en sistemas de traducción integrados, el ácido fusídico se presenta como un verdadero inhibidor de la fijación enzimática del aminoacil-tRNA, que no puede tener lugar al formarse el complejo ribosoma-ácido fusídi-

co·EF-G (o EF-2)·GTP. Por ser estable, este complejo no permite que GTP·EF-TU- (o EF-1) aminoacil-tRNA interaccione con su sitio ribosómico que está superpuesto con el del complejo EF-G·GTP. De acuerdo con este modo de acción, se han aislado mutantes de bacterias resistentes al ácido fusídico en los que el factor EF-G está alterado y, en consecuencia, es resistente a la acción del antibiótico. Conviene destacar que, aunque el ácido fusídico tiene un espectro de acción muy amplio, se ha descrito una resistencia al antibiótico en dos tipos de sistemas: mitocondrias de hongos y bacilos en la fase específica de la formación del septum (CABRER y cols., 1972; CELMA y colaboradores, 1972; MODELELL y cols., 1973a, 1973a; CARRASCO y VAZQUEZ, 1973a; SAN MILLAN y cols., 1975; VAZQUEZ, 1974, 1979a).

Los antibióticos del grupo del tiostreptón (tiostreptón, siomicina, esporangiomicina y tiopeptina) actúan en la subunidad mayor del ribosoma bacteriano en una localización superpuesta en el sitio A de dicha subunidad. Por ello, en sistemas acelulares tiostreptón bloquea la fijación (enzimática y no enzimática) de aminoacil-tRNA y la translocación. En bacterias intactas, sin embargo, al producirse la inhibición por el antibiótico, el peptidil-tRNA queda unido al sitio P, demostrándose así que tiostreptón permite la translocación en estas condiciones, pero inhibe la fijación de aminoacil-tRNA. Se requiere la presencia de la proteína L11 de la subunidad ribosómica 50S para la interacción del antibiótico con esta subunidad; el antibiótico se une de una manera específica al complejo de la proteína L11 con el RNA 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Por otra parte, los ribosomas de bacterias resistentes al tiostreptón carecen de la proteína L11 y por ello el antibiótico no puede actuar en su normal sitio de acción (BALLESTA y VAZQUEZ, 1972a, 1972b; MODELELL y cols., 1971a, 1973; VAZQUEZ, 1974, 1978, 1979a, 1981a, 1981b, 1981c; GALE y cols., 1981).

Podemos incluir los antibióticos del grupo de la kirromicina en este apartado; actúan selectivamente en sistemas procarióticos, ya que interaccionan con el factor EF-Tu formando el complejo kirromicina. EF-Tu, que facilita la interacción del aminoacil-tRNA con el ribosoma. Este complejo, muy estable, no se separa del ribosoma; no puede ocurrir, pues, el paso siguiente, que es la formación del enlace peptídico (VAZQUEZ, 1979a, 1981a, 1981b, 1981c). Por este motivo podemos incluir también la kirromicina entre los inhibidores de la formación del enlace peptídico, si bien el antibiótico no ejerce una acción directa sobre el centro peptidil transferasa.

Abundan las toxinas conocidas de naturaleza proteica (*alfa sarcina*, *mitogilina*, *restrictocina*, *enomicina* y *PAP*) o glicoproteica (*abrina*, *ricina*) que bloquean el ciclo de elongación de la cadena peptídica selectivamente en sistemas eucarióticos por inactivar catalíticamente la subunidad mayor del ribosoma. En el caso de *alfa sarcina*, *mitogilina* y *restrictocina*, sabemos que esta inactivación de la subunidad 60S por las toxinas se debe al hecho de cortar enzimáticamente 320 nucleótidos del extremo terminal 3' del RNA de 28S de la subunidad mayor del ribosoma. Estas toxinas de naturaleza proteica son muy activas en sistemas acelulares, pero no en células intactas; no les es fácil atravesar la barrera celular de la permeabilidad.

Las toxinas de naturaleza glicoproteica (*ricina* y *abrina*) están compuestas de dos cadenas glicoproteínas: la cadena B facilita la entrada de la cadena A, que es la que actúa enzimáticamente en la subunidad 60S del ribosoma; por este motivo *ricina* y *abrina* se manifiestan muy activas en células intactas, a pesar de su elevado peso molecular (65.000). Los ribosomas tratados con estas toxinas de naturaleza proteica o glicoproteica resultan inactivados en su interacción con el complejo EF1-GTP; ellas bloquean la fijación enzimática de aminoacil-tRNA. Y los ribosomas en cuestión resultan inactivados en la interacción del complejo EF-2-GTP, lo que explica que las toxinas puedan bloquear también la translocación. Merece la pena señalarse una reciente observación: las toxinas de naturaleza proteica (*alfa sarcina*, *mitogilina*, *restrictocina*), aunque entran difícilmente en las células intactas, penetran, y son por tanto activas, en células infectadas con picornavirus (CARRASCO y cols., 1975, 1976, 1981; CARRASCO y VAZQUEZ, 1982; FERNANDEZ PUENTE y cols., 1976; FERNANDEZ PUENTES y VAZQUEZ, 1977; CONDE y cols., 1978; FERNANDEZ PUENTES y CARRASCO, 1980; OLSNES y cols., 1975; VAZQUEZ, 1979a, 1979b; VAZQUEZ y cols., 1982).

Todos los compuestos que causan errores en la lectura del mRNA actúan a nivel de la subunidad ribosómica menor. En este amplio grupo de compuestos se incluyen los antibióticos aminoglicosídicos, que participan de los siguientes rasgos: presencia de estreptamina o desoxiestreptamina en su estructura, naturaleza catiónica, amplio espectro de actividad antibacteriana (puesto que muchos de ellos son activos en bacterias gram positivas, gram negativas y ácido-alcohol resistentes), producir errores en la lectura de los distintos mRNA (debido a la incorporación de aminoácidos en algunas posiciones que

no corresponden a las características codificadoras de los tripletes nucleotídicos pertinentes) y un efecto bactericida, que no tiene fácil explicación, pues la mayoría de los otros agentes antibacterianos que inhiben biosíntesis de proteínas son bacteriostáticos. Debido a su efecto inductor de errores de lectura, algunos auxotrofos sensibles a antibióticos aminoglicosídicos llegan a desarrollarse en concentraciones subletales de los mismos en ausencia de algunos aminoácidos esenciales. Este fenómeno, característico de tales antibióticos, recibe el nombre de reparación o supresión fenotípica, por alterarse el fenotipo.

De acuerdo con el azúcar que poseen podemos distinguir dentro del grupo de los antibióticos aminoglicosídicos que causen errores de lectura, los compuestos que contienen estreptamina (estreptomina, dihidroestreptomina, hibrimicina A₁, hibrimicina A₂, hibrimicina A₃), epistreptamina (hibrimicina B₁, hibrimicina B₂, hibrimicina B₃) y desoxiestreptomina o un derivado de la misma (neamina, neomicina B, neomicina C, kanamicina A, kanamicina B, kanamicina C, tobramicina, gentamicina A, gentamicina C_{1a}, sisomicina, gentamicina C₁, gentamicina C₂, paromomicina I, paromomicina II, ribostamicina, butirosina A, butirosina B, higromicina B, lividomicina A, lividomicina B y amikacina).

Algunos de estos antibióticos contienen desoxiparomamina o paromamina (D-glucosamina unida a 2-desoxiestreptamina) (como son lividomicina B, paromomicinas, gentamicina A y kanamicina C) o hiosamina B (N-metil-2-desoxiestreptamina) (como es la higromicina B). Difieren de otros antibióticos que causan errores de lectura en ser activos no solamente en bacterias, sino también en células eucarióticas. El interés de este efecto en células eucarióticas, poco frecuente, por otro lado, radica en que sus ribosomas son mucho más resistentes que los de bacterias a los diversos agentes y condiciones que determinan la inducción de errores de lectura.

Todos los antibióticos aminoglicosídicos anteriormente citados que se han ensayado en sistemas acelulares inhiben la síntesis de polipéptidos dirigida por ácidos ribonucleicos mensajeros sintéticos o naturales y dan lugar a inducción de errores de lectura. A pesar de ello, estos antibióticos no tienen todos el mismo sitio de interacción en el ribosoma. Se ha llegado a proponer que la estreptomina tiene un solo sitio de acción en el ribosoma, en tanto que se conceden muchos para otros antibióticos aminoglicosídicos. Ello explicaría la dificultad de obtener mutantes resistentes a los antibióticos aminoglicosídicos (excepto la estreptomina) en los que se hayan modi-

ficado las proteínas alteradas. Además, en los pocos casos en que se ha conseguido, la proteína alterada no era la misma que en el caso de la resistencia a la estreptomina.

Efectivamente, la resistencia ribosómica a la estreptomina se debe siempre a una mutación de la proteína S12 de la subunidad menor del ribosoma, mientras que hay dos sitios distintos e implicados en la resistencia a la neamina; de los cuales, uno no está localizado y el otro es en la proteína S17 de la subunidad ribosómica 30S. Por otra parte, la proteína L6 de la subunidad ribosómica 50S está alterada en un mutante bacteriano resistente a las gentamicinas. Esto que podría parecer sorprendente no lo es, puesto que la mayoría de los antibióticos aminoglicosídicos que contienen desoxiestreptamina o sus derivados no afectan sólo al reconocimiento del aminoacil-tRNA (paso d), sino también a la translocación (paso f), en el ciclo de elongación. Esta inhibición de translocación por los antibióticos aminoglicosídicos que contienen desoxiestreptamina parece estar relacionada, al menos parcialmente, con su interacción con la subunidad ribosómica mayor, tanto en sistemas bacterianos como en células eucarióticas. El efecto inhibitorio de translocación se patentiza sobre todo en el caso de la higromicina B, las neomicinas y la paromomicina. Estudios de fijación con antibióticos marcados sugieren también que hay diferencias importantes entre el sitio de acción de las estreptominas en el ribosoma y los de otros antibióticos aminoglicosídicos. Así, la fijación de dihidroestreptomina al ribosoma se inhibe en presencia de estreptomina y se estimula por neomicina, paromomicina y lividomicina, pero no la inhibe las kanamicinas, butirosinas y gentamicinas. La fijación de paromomicina al ribosoma es estimulada por la estreptomina y la dihidroestreptomina, inhibida por las neomicinas, lividomicinas y butirosinas y no es afectada por la kanamicina (CABAÑAS y cols., 1978a, 1978b; MARTINEZ y cols., 1978; GONZALEZ y cols., 1978; VAZQUEZ, 1979a; VAZQUEZ y JIMENEZ, 1980; VAZQUEZ y cols., 1982).

El centro peptidiltransferasa de la subunidad mayor del ribosoma, que cataliza la formación del enlace peptídico (MONRO y cols., 1969; VAZQUEZ y cols., 1969) (paso e) (Figuras 8 y 9) es similar, en muchos aspectos, en ribosomas bacterianos y de células eucarióticas, pero difiere en otros. De un modo muy general, podremos clasificar, pues, los inhibidores de la formación del enlace peptídico de acuerdo con su sitio de acción: los que bloquean a nivel del sitio donador y los

que bloquean a nivel del sitio aceptor. Mientras que ninguno de los antibióticos que actúan en el sitio donador del centro peptidil transferasa de los ribosomas bacterianos es activo en los ribosomas eucarióticos y viceversa, casi todos los inhibidores de formación de enlace peptídico que actúan en el sitio aceptor son comunes a ribosomas de bacterias y de células eucarióticas. Estos hechos sugieren con toda claridad, que existen unas marcadas diferencias estructurales en el sitio donador del centro peptidil transferasa de ribosomas procarióticos y eucarióticos, que determinan las diferencias de selectividad de los inhibidores. Por contra, parece haber una gran similitud estructural en el sitio aceptor de dicho centro activo, que se refleja en que casi todos los antibióticos que actúan ahí inhiben la formación del enlace peptídico en todo tipo de ribosomas.

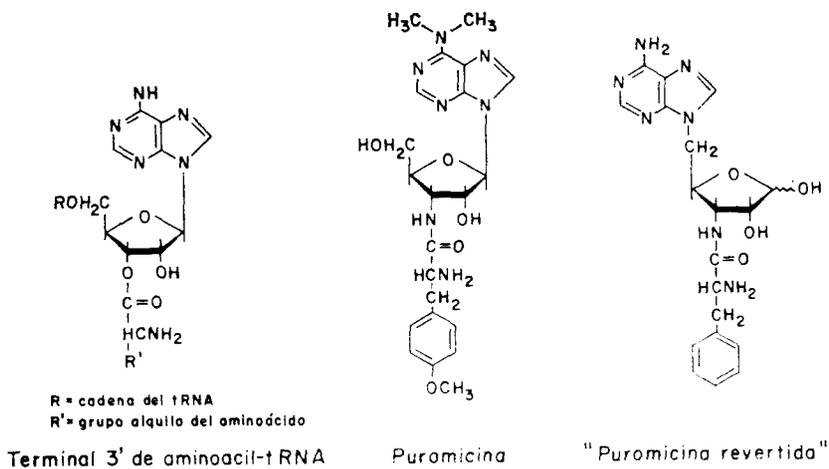


Figura 10: Estructura química de la puromicina, la «puromicina revertida» y el terminal 3' del aminoacil-tRNA.

La puromicina es el inhibidor de la formación del enlace peptídico de uso más universal y mejor conocido. Este antibiótico (Figura 10) actúa como un análogo del terminal 3' de los aminoacil-tRNA (aminoacil-adenosina) en el sitio aceptor del centro peptidil transferasa, en la subunidad ribosómica mayor de todo tipo de ribosomas tanto procarióticos como eucarióticos.

Por ello, el uso de la puromicina proporciona un método simplificado para el estudio de la formación del enlace peptídico en una

reacción en la que el grupo —NH_2 de la puromicina se une al —COOH del aminoácido terminal del peptidil unido al tRNA en el sitio donador del centro peptidil transferasa («reacción de la puromicina»). Este aminoácido será el último incorporado al peptidil-tRNA en una cadena peptídica en crecimiento; podrá ser, concretamente, la metionina si los sustratos donadores son f-Met-tRNA_F o Met-tRNA_F los iniciadores en sistemas procarióticos y eucariótidos respectivamente. El producto de la reacción (f-Met- o Met- o peptidil-puromicina) no puede tomar parte en el paso siguiente de la síntesis de proteínas. Esta reacción de formación de enlace peptídico, en la que la puromicina actúa de sustrato aceptor, puede desarrollarse con sustratos simplificados que interaccionen con el sitio donador, verbigracia, f-Met- o Ac-Fen- o Ac-Leu-oligonucleótidos, e incluso f-Met- o Ac-Fen- o Ac-Leu-adenosina («reacción del fragmento»). De los estudios referentes a la estructura de la puromicina y su actividad se desprende lo siguiente: para la actividad de la puromicina se requieren el aminoácido y el diamino-nucleósido de la puromicina unido en la posición correcta al azúcar puesto que la puromicina revertida (Figura 10) es inactiva; el grupo —NH— extra de la parte nucleosídica del antibiótico debe ocupar la posición 3' y, por último, se obtienen actividades más altas siempre con aminoácidos de configuración L que con aminoácidos de configuración D. En la mayoría de los casos, se requiere, además, que el aminoácido sea de carácter hidrofóbico, pero se han sintetizado también algunos análogos de la puromicina activos y portadores de aminoácidos hidrofílicos.

Los grupos dimetilo, el grupo metoxilo, el oxígeno furanosílico y el grupo hidroxílico 5' de la puromicina no son necesarios para la actividad biológica del antibiótico, y se ha demostrado que diversos análogos del terminal 3' de aminoacil-tRNA_F, como L-Fen-, L-Tir y L-Leu-adenosina, poseen una actividad similar a la puromicina, como sustratos aceptores en la reacción de la formación del enlace peptídico. De acuerdo con estos resultados, ha quedado probado que la Fen-adenosina inhibe la interacción de (³H) puromicina con el sitio aceptor del centro peptidil transferasa (MONRO y VAZQUEZ, 1967; MONRO y cols., 1969a; VAZQUEZ y cols., 1969; FERNANDEZ MUÑOZ y VAZQUEZ, 1974, 1979a, 1981d).

Al igual que la puromicina, todos los demás inhibidores de la formación del enlace peptídico actúan en la subunidad ribosómica mayor (50S o 60S). El amplio grupo de los antibióticos 4-aminohexosil cito-

sínicos (amicetina, gougerotina, blasticidina S y antelmicina), así como la esparsomicina y la actinobolina, bloquean también la formación del enlace peptídico, por actuar en el sitio aceptor del centro peptidil transferasa en un lugar superpuesto con el de la puromicina. Todos estos antibióticos se excluyen mutuamente en su sitio de unión con el ribosoma e impiden la interacción de la puromicina (BATTANER y VAZQUEZ, 1971; CARRASCO y VAZQUEZ, 1972; CELMA y cols., 1971; MONRO y cols., 1969a, 1979b; JIMENEZ y cols., 1970a, 1970b; BARBACID y VAZQUEZ, 1974c; GONZALEZ y cols., 1979, 1981; VAZQUEZ, 1979a, 1981d).

Al igual que la puromicina, esos antibióticos ofrecen un amplio espectro inhibitor; actúan en ribosomas de bacterias, mitocondrias, cloroplastos y células superiores. Pero no lo hacen como sustratos aceptores en la reacción de formación del enlace peptídico, como ocurre en el caso de la puromicina, sino que simplemente bloquean la interacción del terminal 3' del aminoacil-tRNA (aminoacil-adenosina) en el sitio aceptor del centro peptidil transferasa. Del cloranfenicol podemos decir que tiene un modo de acción similar, si bien opera selectivamente en ribosomas de tipo procariótico. Por otra parte, el sitio de interacción del cloranfenicol en el ribosoma no está superpuesto con el de los otros antibióticos citados que actúan en el sitio aceptor, excepto la puromicina, cuya unión al ribosoma se ve obstruida también por el cloranfenicol (VAZQUEZ, 1964a, 1966a, 1966b, 1966d; MONRO y VAZQUEZ, 1967; FERNANDEZ MUÑOZ y cols., 1971; CELMA y cols., 1970, 1971; FERNANDEZ MUÑOZ y VAZQUEZ, 1973a, 1973b; BERNABEU y cols., 1976, 1977; CONTRERAS y cols., 1974; CONTRERAS y VAZQUEZ, 1977a; VAZQUEZ, 1979a).

Entre los antibióticos que inhiben el paso (e) (que, recordamos, consiste en la formación del enlace peptídico catalizada por el centro peptidil transferasa) de un modo selectivo en ribosomas procarióticos por actuar en el sitio donador del centro peptidil transferasa los más conocidos son la lincomicina, la griseoviridina, los antibióticos del grupo de la estreptogramina A y los macrólidos de los grupos de la espiramicina y de la carbomicina. Todos estos antibióticos se excluyen mutuamente en su sitio de acción con el ribosoma y operan de una manera similar por bloquear la interacción del terminal 3' del peptidil-tRNA con el sitio donador del centro peptidil transferasa. Sin embargo, su lugar de interacción parece ser más amplio o causar una distorsión, en la estructura del ribosoma, mayor que en el caso de

los inhibidores que actúan en el sitio aceptor. Así ocurre que lincomicina, griseoviridina, estreptogramina A, espiramicina y carbomicina no sólo inhiben la fijación del terminal 3' del sustrato donador, sino que, en menor escala, inhiben también la fijación del sustrato aceptor; asimismo, bloquean la interacción del cloranfenicol con el sitio aceptor. Estos antibióticos que actúan en el sitio donador no pueden interaccionar con ribosomas que tienen unido peptidil-tRNA al sitio donador o al sitio aceptor. Como consecuencia de ello, sólo pueden inhibir la elongación de la cadena peptídica cuando se han unido a los ribosomas libres antes de comenzar la traducción, pues una vez iniciada la misma, no pueden actuar en los polisomas ya formados (VAZQUEZ, 1963, 1966a, 1966b, 1966c, 1967a, 1967b, 1967c, 1967d, 1975a, 1975b, 1979a; MONRO y VAZQUEZ, 1967; CELMA y cols., 1970, 1971; MONRO y col., 1971; FERNANDEZ MUÑOZ y cols., 1971; FERNANDEZ MUÑOZ y VAZQUEZ, 1973a, 1973b; BARBACID y VAZQUEZ, 1977a, 1977b; CONTRERAS y VAZQUEZ, 1977a, 1977b).

La bruceantina y los compuestos de los grupos de la verrucarina A y de la harringtonina actúan selectivamente en ribosomas de células eucarióticas bloqueando la interacción del terminal 3' con el sitio donador del centro peptidil transferasa; en este sistema, equivalen, en su modo de acción, a los antibióticos anteriormente citados que actuaban en dicho sitio en ribosomas procarióticos. Sin embargo, la anisomicina, la tricodermina y la narciclasina, que tienen un sitio de acción similar y se excluyen mutuamente con aquéllos en su interacción con el ribosoma, difieren de ellos por razón de su capacidad de unirse a ribosomas que poseen sustratos unidos al sitio donador o aceptor. Lo que explica que anisomicina, tricodermina y narciclasina lleguen a unirse a los ribosomas de los polisomas ya formados y bloqueen la elongación de la cadena peptídica siempre en ribosomas eucarióticos. El ácido tenuazónico, que actúa de un modo similar a la anisomicina, se distingue por su selectividad de acción no observada en los otros inhibidores: es activo en los ribosomas de células de mamíferos, pero no en ribosomas de levadura (FRESNO y cols., 1977, 1978; VAZQUEZ y cols., 1969; BATTANER y VAZQUEZ, 1971; CARRASCO y VAZQUEZ, 1972; NETH y cols., 1970; BARBACID y VAZQUEZ, 1973, 1974a, 1974b, 1974c, 1975; BARBACID y cols., 1975; JIMENEZ y VAZQUEZ, 1975, 1978, 1982; JIMENEZ y cols., 1975a, 1975b, 1975c; CARRASCO y cols., 1973, 1975a, 1975b; CANNON y cols., 1976; BAEZ y cols., 1977; BAEZ y VAZQUEZ, 1978, 1979a; REYES y cols., 1976a, 1976b, 1977).

Hay dos características importantes concernientes a los inhibidores de la translocación (paso f) (Figuras 8 y 9). Una de ellas es que se conocen muy pocos inhibidores de este paso que actúen en sistemas modelo de ribosomas procarióticos, mientras que existe una abundante representación de los inhibidores que intervienen en las distintas reacciones del complejo paso de la translocación en ribosomas eucarióticos. La otra característica de la translocación que merece una mención especial es que sólo los antibióticos aminoglicosídicos que contienen desoxiestreptamina, o un aminoazúcar derivado de éste, son inhibidores comunes de dicho paso en ambos tipos de ribosomas: procarióticos y eucarióticos (VAZQUEZ, 1979, 1981a; ZAERA y cols., 1980).

Como ya hemos indicado antes, los antibióticos aminoglicosídicos que portan el aminoazúcar desoxiestreptamina o sus derivados y muy principalmente higromicina B, neomicina y paromomicina, además de inducir errores de lectura en ribosomas bacterianos y eucarióticos, inhiben la translocación en ambos tipos de sistemas; esta acción de los antibióticos se halla relacionada, parcialmente al menos, con su efecto estabilizador del peptidil-tRNA en el sitio A del ribosoma. Por disponer estos antibióticos de muchos sitios de interacción con el ribosoma, no está bien definido cuales de entre ellos sean los más relevantes para esta acción inhibitoria. A pesar de lo cual, ciertas interacciones con ambas subunidades, mayor y menor, del ribosoma parecen tener importancia en sus efectos estabilizantes del peptidil-tRNA en el sitio A y con su efecto inhibitorio de la translocación. También el antibiótico viomicina inhibe la translocación en eubacterias (CABAÑAS y cols., 1978a, 1978b; MARTINEZ y cols., 1978; GONZALEZ y cols., 1978; VAZQUEZ, 1979a; VAZQUEZ y JIMENEZ, 1980; VAZQUEZ y cols., 1982; CAMPUZANO y cols., 1979; MODOLELL y VAZQUEZ, 1977; ZAERA y cols., 1980).

Los antibióticos macrolidos de los grupos de la eritromicina, la metimicina y la lancamicina, así como la espectinomicina y los antibióticos del grupo de la estreptogramina B, actúan selectivamente en células procarióticas; en bacterias intactas se comportan como inhibidores de la translocación, ya que por mor de su efecto inhibitorio el peptidil-tRNA queda bloqueado en el sitio A. Pero todos esos antibióticos son muy pobres inhibidores de la mayoría de los sistemas modelo de translocación en sistemas acelulares; su efecto se manifiesta exclusivamente cuando se usa peptidil-tRNA con un polipéptido

mayor que cierta longitud. Estas características y el hecho de que tales antibióticos no actúen en polisomas, porque no interactúan con ribosomas que tengan peptidil-tRNA unido al sitio P o al sitio A, hace suponer que su acción inhibitoria se manifiesta porque, cuando el residuo peptídico del peptidil-tRNA alcanza cierta longitud y el antibiótico está unido previamente al ribosoma, hay un impedimento estérico que no permite el movimiento de dicho peptidil-tRNA fuera del sitio A (VAZQUEZ, 1963, 1966a, 1966b, 1966d, 1967a, 1967b, 1975, 1979a; MONRO y VAZQUEZ, 1967; CELMA y cols., 1970, 1971; MONRO y cols., 1971; FERNANDEZ MUÑOZ y cols., 1971; FERNANDEZ MUÑOZ y VAZQUEZ, 1973a, 1973b, 1973c; CONTRERAS y VAZQUEZ, 1977a).

Más no todos esos antibióticos poseen el mismo sitio de interacción. Espectinomicina se une a la subunidad ribosómica 30S y las mutaciones que dan lugar a una resistencia al antibiótico se manifiestan por una alteración en la proteína S5 de dicha subunidad. Por el contrario, los antibióticos del grupo de la estreptogramina B y los macrólidos se unen a la subunidad ribosómica 50S, requiriéndose para dicha interacción la proteína L16 de esta subunidad. Se han descrito, no obstante, tres tipos de mutaciones que determinan resistencia a la eritromicina y, en ninguno de estos casos, está afectada la proteína L16; así, alteraciones en la proteína L4 o en el RNA 23S de la subunidad 50S causan una menor afinidad del antibiótico por dicha subunidad, mientras que mutantes en la proteína L22 inducen resistencia al antibiótico, sin afectar su afinidad por el ribosoma (VAZQUEZ, 1974, 1975a, 1979a).

Interesa destacar la existencia de dos grupos de antibióticos macrólidos (espiramicina y carbomicina) que inhiben la formación del enlace peptídico, y de otros tres (eritromicina, metimicina y lancomicina) que no afectan a dicho paso, a pesar de que toda la prueba experimental muestra que el sitio de acción de los agliconas de estos macrólidos en el ribosoma se halla superpuesto. Parece ser que los disacáridos unidos a las agliconas de los antibióticos de los grupos de la espiramicina y la carbomicina constituyen los determinantes de su acción inhibitoria en la formación del enlace peptídico; en efecto, al perder dicho disacárido, los antibióticos resultantes se comportan como la eritromicina (MONRO y cols., 1971; VAZQUEZ, 1975a, 1979a).

Además de los antibióticos aminoglicosídicos que contienen desoxiestreptamina, se conocen tres tipos de inhibidores que bloquean la translocación en células eucarióticas; unos actúan a nivel del factor de elongación EF-2, modificándolo; otros interactúan con la sub-

unidad ribosómica 40S y, finalmente, hay un tercer grupo de inhibidores que operan en la subunidad 60S. La toxina diftérica y la toxina PA, producidas por *Corynebacterium diphtheriae* (β)^{tox+} y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, inactivan enzimáticamente, y de una manera selectiva, el factor de elongación EF-2 de células eucarióticas de acuerdo con la reacción:



en presencia de toxina diftérica o toxina PA (VAZQUEZ, 1974, 1979a).

La reacción está muy desplazada hacia la derecha. El ADP-ribosil-EF-2 forma un complejo con el GTP que interacciona con el ribosoma de un modo similar a como lo hace el factor EF-2. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis del GTP es muy pequeña; por cuya razón el complejo ADP-ribosil-EF-2-GTP-ribosoma es muy estable y, mínima, la eficacia del ADP-ribosil-EF-2 como catalizador de la translocación. La toxina diftérica (con un peso molecular, PM, 60.000) se muestra activa en numerosas células eucarióticas intactas, puesto que una parte de su molécula denominada fragmento B (PM 39.000) es responsable de la interacción con la membrana y entrada posterior en la célula del fragmento A (PM 22.000), necesario en forma libre para catalizar la ADP-ribosilación del factor EF-2 en un aminoácido básico denominado diftamina. La toxina PA (PM 60.000) parece tener un modo de acción similar, su fragmento A tiene un peso molecular de 36.000 (VAZQUEZ, 1979a, 1981a, 1981b).

Hay múltiples pruebas genéticas y bioquímicas que demuestran la actividad de los alcaloides criptopleurina, tiloforina, tilocrebrina, emetina y tubulosina a nivel de la subunidad ribosómica 40S en sitios idénticos o superpuestos. Todos estos compuestos inhiben la translocación enzimática como consecuencia de dicha interacción. Por otra parte, la pederina y los antibióticos del grupo de la cicloheximida interaccionan con la subunidad ribosómica 60S; estos compuestos bloquean el proceso fisiológico de la translocación enzimática que requiere el factor EF-2 e inhiben la translocación no enzimática que tiene lugar en sistemas acelulares en ausencia de EF-2, al elevar la concentración de K^+ o de NH_4^+ . La pederina, sin embargo, es igualmente activa como inhibidor en ribosomas resistentes a la cicloheximida; ello sugiere que ambos compuestos actúan en distinto sitio de la subunidad 60S (BARBACID y cols., 1975; CARRASCO y cols.,

1976; DOLZ y cols., 1980, 1982; JIMENEZ y cols., 1977; SANCHEZ y cols., 1977; SOLLHUBER y cols., 1980; VAZQUEZ, 1979a, 1981a, 1981b).

Las bacteriocinas colicina E3 y cloacina DF13 merecen una mención especial dentro de los inhibidores de biosíntesis de proteínas. Su espectro inhibidor es muy selectivo, según hallamos en muchas bacteriocinas, y se concreta a los géneros más próximos al de las bacterias productoras. Por ello, los espectros inhibidores de la colicina E3 (producida por algunas cepas colicinogénicas de *Escherichia coli*) y de la cloacina DF13 (producida por algunas cepas cloacinogénicas de *Enterobacter cloacae*) se distinguen en razón de la permeabilidad, aunque su modo de acción en sistemas acelulares viene a coincidir prácticamente. Así, se ha desvelado que tanto la colicina E3 como la cloacina DF13 son proteínas con una actividad ribonucleasa muy específica, la de inactivar catalíticamente el RNA 16S de la subunidad ribosómica 30S cuando está integrado en dicha estructura, por romper los 49 nucleótidos finales del terminal 3' de dicho RNA 16S. En virtud de esta lesión estructural, los ribosomas afectados no resultan bloqueados específicamente en su función en un paso concreto de la traducción. Sin embargo, estos ribosomas rinden mucho menos que los normales en diversas reacciones de las fases de iniciación y de la elongación. Sumados estos efectos parciales, resulta prácticamente una inactivación de los ribosomas dañados (VAZQUEZ, 1979a, 1981a, 1981b, 1981c).

Inhibidores de la fase de terminación en el proceso de la traducción

La fase de terminación en el proceso de la traducción comienza cuando se reconoce un triplete terminador del ácido ribonucleico mensajero (código sin sentido que puede ser alguno de los tripletes de bases UAA o UAG o UGA), determinando así la interacción de los factores de terminación con el ribosoma (Figuras 8 y 9). Se ha aislado un solo factor de terminación (factor FR) de sistemas eucarióticos, que se requiere en el paso (g_1) junto con una molécula de GTP, que debe hidrolizarse. Se conocen tres factores de terminación (RF-1, RF-2 y RF-3) que pueden intervenir en el paso equivalente en sistemas bacterianos. La eficacia del factor RF-2 se potencia en presencia del factor RF-3; el factor RF-1 no requiere el concurso de los otros factores. De modo parecido a lo que ocurre en sistemas eucarióticos, es muy probable que también se requiera GTP en el paso (g_1) en bacterias, aunque aún no ha podido demostrarse concluyentemente. Des-

pués del reconocimiento de los factores de terminación, el centro peptidil transferasa de la subunidad ribosómica mayor ejerce su actividad peptidil hidrolasa rompiendo el enlace entre el péptido y el RNA del peptidil-tRNA, de suerte que se libera la cadena peptídica (paso g_2). Para completar la terminación, se requiere todavía una reacción posterior (paso h), a lo largo de cuya fase se libera el tRNA descargado. Este paso espera una mayor clarificación en sistemas eucarióticos, pero los estudios en sistemas de bacterias han mostrado que se requiere otro nuevo factor (factor RR) y el factor de elongación EF-G, que interviene en este paso (h) final, donde debe haber, además, la hidrólisis de una nueva molécula de GTP (CASKEY, 1980).

Aunque se han estudiado diversos compuestos que inhiben los pasos (g_1), (g_2) y (h) no se conocen inhibidores específicos de la terminación. Ocurre, sin embargo, que hay diversos inhibidores del ciclo de elongación que lo son también de la terminación; los sitios ribosómicos implicados en los pasos (g_1), (g_2) y (h) parecen hallarse en estrecha relación, sino superpuestos, con los responsables de los pasos (d), (e) y (f) respectivamente. Así, estreptomycin, tetraciclina y tiostreptón se han descrito como inhibidores del paso (g_1) y es muy probable que otros inhibidores del paso (d) bloqueen, además, la terminación de un modo selectivo. Por otra parte, el centro peptidil transferasa de la subunidad ribosómica mayor está en la formación del enlace peptídico (paso e) y en la actividad peptidil hidrolasa (paso g_2). Por ello, el paso (g_2) de terminación es bloqueado por todos los inhibidores del paso (e) ensayados en sistemas bacterianos y de células superiores, con la misma selectividad que muestran en su función inhibidora de la formación del enlace peptídico (VAZQUEZ, 1974, 1979a, 1981a, 1981b).

Indicamos antes que se necesitaba la presencia del factor EF-G y de GTP en el paso (h) en sistemas bacterianos. De ahí que lo más probable quizá sea que inhibidores que interfieren con la actividad del factor EF-G impidan, a su vez, el paso (h) en bacterias. Además, si este paso se registra en eucariotes por un mecanismo similar en la terminación de la cadena peptídica, debería esperarse que, no sólo el ácido fusídico, sino también muchos otros compuestos que interfieren con las funciones del EF-2 en la hidrólisis del GTP (tales como abrina, ricina, alfa sarcina, toxina diftérica y cicloheximida) bloquearán el paso (h) en sistemas eucarióticos (VAZQUEZ, 1974, 1979a, 1979b, 1981a, 1981b).

Análogos del GTP

Los análogos del GTP merecen capítulo aparte como inhibidores de biosíntesis de proteínas. De ellos, el mejor conocido es el guanilil-metilen-difosfonato (GMP-PCP o GDPCP o GMP-P-CH₂-P), portador de un grupo —CH₂— en sustitución del oxígeno entre los átomos de fósforo y, bloqueando la rotura enzimática en esta posición. Se diseñó la estructura de este análogo con la precisa intención de estudiar la naturaleza de las reacciones que implican la hidrólisis del GTP en la síntesis de proteínas. Desde que se mostró el efecto inhibitorio de este análogo del GTP en la biosíntesis proteica, se ha venido usando con asiduidad en varias reacciones modelo de los pasos de la iniciación, elongación y terminación que implican la hidrólisis del GTP. Se ha sintetizado otro análogo del GTP, el guanililimido-difosfato (GMP-PNP o GDPNP o GMP-P-NH-P), a fin de investigar el papel del GTP en la translocación.

Los estudios con dichos análogos del GTP han permitido deducir la existencia de un sitio ribosómico superpuesto e implicado en la interacción de los distintos factores proteicos que exige la hidrólisis del GTP en la traducción. Guanilil-metilén-difosfonato y guanilil-imido-difosfato pueden reemplazar al GTP en la interacción con los diferentes factores y en la interacción de los complejos correspondientes con el ribosoma.

Sin embargo, en todos los casos en los que se han llevado a cabo estudios detallados (sobre todo de elongación) se ha podido mostrar que los análogos de GTP bloquean o disminuyen considerablemente las reacciones que siguen, sin solución de continuidad, los pasos donde ocurre la hidrólisis del GTP. Se dispone de abundantes pruebas experimentales que sugieren que, durante la elongación de la cadena peptídica, se liberan lentamente del ribosoma los análogos del GTP y, por tanto, también los factores EF-Tu, EF-1, EF-G y EF-2, unidos a ellos. Por cuyo motivo, los pasos siguientes a la fijación de aminoacil-tRNA y la translocación (formación del enlace peptídico y fijación de aminoacil-tRNA, respectivamente) se retrasan bastante en presencia de dichos análogos del GTP. Todos los datos experimentales apoyan la suposición de que la hidrólisis del GTP en el ciclo de elongación resulte

esencial para la liberación rápida de los factores unidos al ribosoma. Es muy probable que se asista a una situación similar en el bloqueo de la iniciación y de la terminación por los análogos del GTP (CABRER y cols., 1972, 1976; GIRBES y cols., 1976; MODOLELL y cols., 1971a, 1971b, 1973, 1975; MODOLELL y VAZQUEZ, 1973, 1975; VAZQUEZ, 1974, 1979a).

Consideraciones sobre el espectro inhibitor de los antibióticos

A pesar de la amplia clasificación de los inhibidores de biosíntesis de proteínas de acuerdo con su selectividad, hay casos en que su espectro de acción es mucho más limitado, debido a la barrera impuesta por la permeabilidad celular. Es bien sabido que muchos antibióticos que actúan en ribosomas de tipo 70S se muestran activos en bacterias gram positivas, pero no en bacterias gram negativas ni ácido alcohol resistentes; como también pertenece al dominio público que numerosos antibióticos que actúan en ribosomas 80S no son activos en levaduras. Siguiendo en esta línea, varios antibióticos, que actúan en ribosomas de tipo 80S, no operan en cultivos celulares (gougerotina, edeína A, antelmicina, blasticidina S, higromicina B); y es justo poner de relieve que la barrera de la permeabilidad se altera en dichos cultivos infectados con picornavirus, resultando así un efecto inhibitor de los citados antibióticos en las células infectadas (VAZQUEZ, 1979a, 1981a, 1981b, 1981c; CARRASCO y cols., 1981; CARRASCO y VAZQUEZ, 1982; CONTRERAS y cols., 1978; LACAL y cols., 1980). Hay otros casos, sin embargo, en que un espectro inhibitor más limitado obedece a diferencias estructurales dentro de los ribosomas que adscribimos al tipo procariótico o eucariótico. Así, por ejemplo, ocurre que el ácido tenuazónico actúa en ribosomas de mamíferos, pero no en ribosomas de levadura (CARRASCO y VAZQUEZ, 1973b); la cicloheximida, que en general es activa en todo tipo de ribosomas 80S, no interviene en ribosomas de ciertas cepas silvestres de *Saccharomyces fragilis* y *Saccharomyces lactis*; el ácido fusídico no actúa en los sistemas de traducción de las mitocondrias de *Neurospora crassa* y de *Bacillus subtilis* en su fase de formación del septum. Por el contrario, los ribosomas de mitocondrias de cerebro parecen sensibles a la emetina, considerada normalmente un inhibitor selectivo de ribosomas eucarióticos (VAZQUEZ, 1979a).

El hecho conocido de que todas las células eucarióticas posean mitocondrias y que, además, vegetales y algas superiores contengan también cloroplastos, con sistemas de síntesis de proteínas de tipo procariótico, determina que los resultados obtenidos cuando se usan los inhibidores de la traducción en células intactas deben interpretarse con sumo cuidado. Efectivamente, la selectividad de los inhibidores que bloquean la traducción en sistemas de eubacterias no puede considerarse nunca absoluta; como hemos visto, los antibióticos que bloquean síntesis de proteínas en bacterias también actúan en mitocondrias y cloroplastos y, por tanto, a elevadas concentraciones o en tratamientos continuados también actuarán en células superiores animales y vegetales a pesar de que no sean activos en sus sistemas citoplásmicos (VAZQUEZ, 1964a, 1979a).

Inhibidores del proceso de la traducción en las arquebacterias

El trabajo con los ribosomas de arquebacterias se ha iniciado muy recientemente y por ello apenas tenemos datos sobre el efecto selectivo de inhibidores que actúen en los mismos. De hecho, podemos decir que aún no se conoce ningún inhibidor que actúe selectivamente en los sistemas de arquebacterias y no tenga actividad en los sistemas de eubacterias ni de células eucarióticas. Sin embargo, se conocen ya tres importantes inhibidores de la biosíntesis de proteínas que son activos en arquebacterias: cloranfenicol (JONES y cols., 1977; HAMMES y cols., 1979; PECHER y BOCK, 1981), la toxina diftérica (KESSEL y LINK, 1980, 1981) y la anisomicina (PECHER y BOCK, 1981; KESSEL y LINK, 1981) (Tabla 3). La selectividad de acción de estos inhibidores es realmente interesante y sorprendente, puesto que el cloranfenicol además de actuar en arquebacterias es activo en ribosomas de procarióticos, pero nunca en ribosomas eucarióticos (VAZQUEZ, 1964a; RODRIGUEZ LOPEZ y VAZQUEZ, 1968), la anisomicina no interacciona con los ribosomas de bacterias pero es activa en ribosomas tanto de células eucarióticas (VAZQUEZ, 1979a) como de arquebacterias y la toxina diftérica bloquea el proceso de la traducción por afectar el factor de elongación EF-2 tanto en células eucarióticas (VAZQUEZ, 1979a) como en arquebacterias. Aunque los datos de que disponemos son aún muy escasos, estos resultados claramente muestran que efectivamente las arquebacterias están tan distintas evolutivamente de las bacterias como de las células eucarióticas (Ver Tabla 3).

CONSIDERACIONES FINALES

Para concluir queremos resaltar que desde que FLEMING (1929) describió las observaciones iniciales que condujeron al descubrimiento de la penicilina, han transcurrido ya más de cincuenta años y aún en muchos casos el conocimiento del sitio de acción de algunos antibióticos es muy superficial. Ello es debido a que nuestros conocimientos sobre el modo de acción de los antibióticos avanza paralelamente con el conocimiento de las rutas bioquímicas que son bloqueadas por dichos inhibidores, como hemos visto en las páginas anteriores que muestran la importancia de los inhibidores de síntesis de peptidoglucano y de proteínas para elucidar las reacciones implicadas en la biosíntesis de estos polímeros. Como bien indica KREBS en su trabajo póstumo (KREBS, 1982), «la solución de un problema en cualquier tiempo sólo puede avanzar hasta un cierto límite; pronto, muros aparentemente impenetrantes, obstruyen el progreso; no obstante, después de cierto tiempo, los avances en los campos colaterales permiten sobrepasar las barreras».

**DISCURSO DE CONTESTACION
POR EL ACADEMICO NUMERARIO
EXCMO. SR. D. ANGEL MARTIN MUNICIO**

Excmo. Sr. Presidente,
Excmos. Srs. Académicos,
Señoras y señores.

Cada ceremonia de recepción y de bienvenida a esta Academia tiene, en lo personal y en lo científico, sus connotaciones singulares. Una de las de este acto —quizá la que le es más propia— es la necesidad de echar una ojeada, al menos, al texto del discurso que acabamos de escuchar para cerciorarnos de la intensa relación del tema con la aportación personal a su desarrollo de Vázquez y de su escuela. Es, precisamente, este hecho y su entorno lo que yo deseo resaltar ahora, en primer término, ante ustedes.

El hecho es así de sencillo y así de importante. Hoy llega Vázquez a esta Academia en creador de una dirección de investigación y de una escuela, nacidas y desarrolladas en España y proyectadas hacia la comunidad científica internacional como una de las más destacadas en el estudio de los *mecanismos de acción de los antibióticos*.

Vázquez representa en España un modo de hacer y de impulsar la Ciencia, la Biología en particular, durante nuestro último cuarto de siglo, que merecen reseñarse. Pertenece Vázquez a lo que podríamos llamar segunda generación de miembros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el que ingresó como becario en 1955. En aquella época, la primera generación de científicos del Consejo ya había regresado de los centros extranjeros en los que, de forma habitual, se complementaba la formación investigadora previa para su ejercicio, realmente difícil en aquellos tiempos. A su lado, en el Departamento de Fermentaciones Industriales, se inicia Vázquez en técnicas microbiológicas y, durante el período 1955-1959, alcanza los Grados de Doctor en Farmacia y Doctor en Ciencias Químicas. Con este adiestramiento comienza en 1960 una especialización en varios centros extranjeros, principalmente en el National Institute for Research in Dairying (Shinfield, Inglaterra) y en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge (Inglaterra). Su conocimiento microbiológico va a verse magnificado

al estudiar la fenomenología bioquímica del metabolismo bacteriano; de esta manera investiga la biosíntesis de proteínas por diferentes bacterias y la acción que sobre ella ejerce la presencia de algunos antibióticos, cloranfenicol de manera preferente; estudia y describe el modo de acción de este antibiótico y su unión a los ribosomas bacterianos como localización fundamental para la biosíntesis de proteínas.

Durante esta permanencia en el extranjero, Vázquez accede a Colaborador Científico del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán» y cuando, mediado 1966, se reintegra al C.S.I.C. lo hace al Instituto de Biología Celular del Centro de Investigaciones Biológicas, en el que había de recomenzar su trayectoria científica. El Centro de Investigaciones Biológicas, creado en 1956, integró una serie de Institutos con solera muy diferente, es cierto, pero supuso de forma inequívoca una notable y primera ascensión de nuestra más bien pobre investigación biológica de aquel momento. Y a esta ascensión habría de contribuir muy destacadamente la obra científica de nuestro nuevo académico, que, durante los años 1968-75, fue Director del Instituto de Biología Celular.

Por encima de toda una colección de cargos directivos en el Consejo y en Sociedades científicas, la extraordinaria obra de Vázquez durante los últimos quince años, en su intensidad, en su finura metodológica, en la solidez del trabajo, en su proyección mundial, ha conseguido —aparte de la celebración de este acto— una doble desmitificación que, quizá, conviene airear en alguna ocasión. Al hacerlo en esta oportunidad, bajo el rigor testimonial de la obra de Vázquez, quisiera contribuir a desarraigar tanto el mito primario de la falta de recursos como el otro mito, el del nacimiento necesario fuera de nuestras fronteras de toda notable y trascendente labor científica. Y no se entienda que no deban incrementarse los recursos económicos destinados a la investigación española, sino que la infraestructura para su rentabilidad y su eficacia debe irse asegurando previamente. Es necesario para ello seleccionar más y mejor la calidad de nuestros proyectos de investigación; necesitamos dejar de lado temáticas obsoletas e intrascendentes; se impone anular, también, al gran número de aficionados de ocasión para dejar paso a un nivel y una competitividad internacionales; y, con ello, reordenar el mejor aprovechamiento de nuestros ya no escasos medios. Nos falta, eso sí, promover la liberalización de la inteligencia por

encima de los marcos cuadrados de las titulaciones académicas; hay que estructurar y tener a punto fuerzas investigadoras de respuesta ante las demandas sociales de bienestar, y la salud como su ingrediente fundamental; hay que prever, aun modestamente, la evolución de las corrientes científicas para estar presentes en las élites que han de gobernar la marcha del mundo; hay que acudir en potenciación de las fructíferas áreas de solapamiento y de tratamiento multifactorial por donde hoy discurren los grandes enfoques del progreso científico.

Las características de la obra científica de Vázquez —de las que han nacido estas consideraciones— son uno de nuestros mejores ejemplos de que cuando las ideas sobresalen, las posibilidades y los medios no faltan y ni siquiera son cortos. Y, con ideas, medios y trabajo, con lucha y dificultades, el discurso de esta recepción es fruto y reflejo de la creación de una escuela, desde dentro de España, con la que se han alcanzado cotas científicas de rango internacional. Y quiero hacer énfasis en la escuela, en su mayor permanencia, en la difusión no de una temática —que sería menos importante—, sino de un rigor, un estilo de bien hacer, una formación en el estudio y todo embebido de entusiasmo. Mas la capacidad de hacer estriba tanto en la magnitud del objeto como en el modo de realizarlo; y en esta manera de hacer, la actitud de Vázquez rezuma sencillez, constitutiva naturalidad, como índole de su persona.

Sucede, además, que lo que ocurre dentro, la ciencia nuestra, no suele encontrar el pábilo debido que la saque a relucir. Y esto no es justo. Por ello, al mostrar la obra del nuevo académico como testimonio singular de la creación de una de nuestras mejores escuelas de Biología, iniciada y desarrollada en España, es buen momento éste —que no debe perderse— para ensalzar con justicia y dignidad el esfuerzo colectivo de los que estrujaron sus entusiasmos y empeñaron toda su dedicación a la tarea de enraizar en nuestra modesta Ciencia plantones que llegan hoy a mostrar el vigor y la altura de las trayectorias mundiales.

Un aspecto del quehacer profesional de Vázquez se ha venido desarrollando, sobre todo durante los últimos años, en el campo docente. A poco que se conozcan las interioridades de la cuestión hay que venir a reconocer que ello ha significado una de nuestras —tal vez escasas— muestras honestas de agilidad política en el te-

rrero científico-educativo, pero demostración, a fin de cuentas, de las soluciones que deben existir para la función docente del investigador distinguido y notable, dispuesto a transmitir su saber y su experiencia. De esta manera, y comenzando por la nada fácil tarea de la alta divulgación científica oral y escrita, Vázquez ha ido dejando en Colegios profesionales y en los más variados organismos culturales y docentes, la constatación del interés y finura de su investigación; estuvo siempre abierto a la participación, como lo hizo, en múltiples cursos nacionales e internacionales enseñando al máximo nivel los mecanismos biológico-moleculares del modo de acción de los antibióticos; llega a ser director, en 1975, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Es así, en efecto, que Vázquez viene a ocupar no una vacante en esta Academia, sino un sitio de nueva creación en la Sección de Ciencias Naturales. Circunstancia feliz que si —y de un lado— nos ahorra la proclamación y el sentimiento de una ausencia, por otro nos obliga a considerar que una corta expansión de las plazas numerarias de esta Academia ha motivado este ingreso, en el que yo quiero ver la representación del brillante impulso de nuestra biología molecular y celular durante el último cuarto de siglo. Pienso, aseguro mejor, que nuestro nuevo académico ha ido a la cabeza de este auge y, así, él y todo lo que ha conformado su bagaje científico, sencillo e ilusionado, sin mitos y con rango, todo ese entorno de la Biología que Vázquez representa van a tomar hoy asiento en esta Casa y yo, con ella, nos alegramos en la bienvenida.

* * *

Es práctica habitual en estas ceremonias una glosa del discurso de recepción. No creo, evidentemente, en la contestación crítica, hoy sobre todo en que la especialización hace muy difícil la múltiple penetración erudita en campos diversos. Pero, sí creo que el encargado por la Academia para dar esta bienvenida debe poder penetrar en la esencia del tema con el simple cometido de mostrar a los académicos y a los amigos que en este acto entrañable nos acompañan algo más que los discursos científicos de los discursos científicos de los recipiendarios no suelen poder decir; algo que llame la atención sobre la importancia, el significado o la trascendencia de lo

expuesto, de forma principal en aquello que el pudor personal haya hecho que se calle lo que, de hecho, debe pregonarse.

Bajo estas ideas, deseo comentar el discurso del profesor Vázquez que, como acabamos de escuchar, gira alrededor de la especificidad y selectividad de acción de los antibióticos, fundadas en las peculiaridades estructurales y funcionales de los distintos tipos de células. De esta forma, el discurso se ha esquematizado en dependencia del proceso bioquímico que, de modo principal, resulta afectado por la presencia de los distintos tipos de antibióticos. Yo quisiera, en primer lugar, hacer algún hincapié sobre la existencia y características singulares del grupo de microorganismos procarióticos, conocido como *arqueobacterias*; tan singulares, que la biología molecular de las *arqueobacterias* —sobre todo en lo que se refiere al detalle de los RNA ribosomales y de transferencia— ha sometido a intensa crítica la clásica división de los organismos celulares en procariotes y eucariotes y obliga a introducir un tercer grupo al que pertenecen esta clase de bacterias.

La presencia de este grupo de *arqueobacterias* obliga a establecer criterios estructurales y metabólicos comparativos con los otros dos grupos de células, de los que pueda resultar un esquema lógico de divergencia evolutiva.

Los procariotes son notablemente de menor tamaño y de mayor diversidad metabólica que las células y microorganismos eucarióticos, si bien éstos exhiben una treintena de características metabólicas que no han sido detectadas en los procariotes. A la inversa, los procariotes son capaces de una serie de actividades metabólicas desconocidas en los eucariotes, por ejemplo utilización de N_2 , la producción de energía por oxidación de compuestos inorgánicos, la utilización de aceptores de electrones diferentes del O_2 , etc. Entre las características propias de los eucariotes se encuentran las concernientes a su mucho más compleja organización ultraestructural, por ejemplo la existencia de microtúbulos de tubulina y microfilamentos de actina.

La clase de *arqueobacterias* tiene como miembros de mayor interés las bacterias generadoras de metano, un grupo de bacterias halófilas con un fotometabolismo singular y algunas termófilas tolerantes de medios ácidos. No cabe duda que se trata de organismos que reúnen propiedades del todo extrañas a las habituales de la mayoría

de las células como la tolerancia a la temperatura y a los medios salinos y a los ácidos. Han sido, precisamente, estas propiedades extremas de su entorno en el descubrimiento de la arqueobacteria *Thermoplasma acidophilum* en una mina de carbón abandonada, que se cultiva óptimamente a 59° C y pH 1-2 y cuya morfología es dependiente de la temperatura, motivado por un lábil citoesqueleto elaborado a base de filamentos homólogos, posiblemente, a los de actina eucariótica y por la ausencia de pared celular. Pero, solamente los *Thermoplasma* son las bacterias que no han desarrollado tipo alguno de cubierta celular. En las *Methanobacteriales* se ha descrito un peptidoglicano con estructura completamente diferente de la clásica mureína; es la llamada pseudomureína que contiene ácido talosaminurónico en lugar de ácido murámico y no posee D-aminoácidos. El género *Halococcus* posee un saculus rígido a base de un heteropolisacárido altamente sulfonado que contiene gulosaminurónico, mientras que el saculus de las *Methanosarcina* posee un heteropolisacárido sin sulfato y sin residuos de ácido gulosaminurónico. Los demás grupos de arqueobacterias no poseen un saculus rígido sino una cubierta glicoproteica.

Esta ausencia de pared obliga a la célula a sobrevivir en balance osmótico con su medio y a depender, por tanto, de la osmolalidad del entorno. Hecho que va a ser trascendente con relación a la estabilidad del DNA y a la funcionalidad del genoma de las arqueobacterias. Resulta lógico que el efecto desestabilizante del DNA que debe producir la pequeña concentración salina, fuera compensado por la presencia de factores estabilizantes; efectivamente, se ha descrito la presencia en *Thermoplasma acidophilum* de una pequeña proteína cromosomal con misión estabilizadora del DNA frente a la desnaturación térmica. Esta proteína guarda una relación estructural con otra proteína similar, tipo histona, encontrada en todas las eubacterias, así como con un fragmento terminal de las histonas nucleosomales eucarióticas. Con este planteamiento, resultaría de gran interés el estudio de las interacciones de estas proteínas de arqueobacterias, eubacterias y eucariotes con el correspondiente DNA y de la protección que la condensación originase sobre la digestión con nucleasas a diferente fuerza iónica. A este respecto, cabe señalar la aparición de transiciones cooperativas a estructuras moleculares compactas cuando el DNA eucariótico interacciona con polímeros neutros a cierta fuerza iónica. Son las denominadas estructuras PSI (Polymer-

Salt-Induced) del DNA. Estos complejos han sido estudiados mediante rayos X, ultracentrifugación, microscopía electrónica, espectroscopía de fluorescencia, ultravioleta y de dicroísmo circular, haciendo uso de los distintos tipos de histonas. Parece bastante clara la existencia de diferencias entre la interacción del DNA con la histona H1 y el resto de las histonas, así como del distinto comportamiento de las fracciones de H1 y de su modificación covalente en la inducción de este tipo de estructuras. Debido a la elevada proporción de lisina en la molécula de H1 se pensó que el estudio con polipéptidos sintéticos sería capaz de orientar sobre la influencia de este aminoácido en la modificación conformacional del DNA; en efecto, la mayor capacidad de inducción de estructura PSI tiene lugar con (lisina⁸⁴, leucina¹⁶) a condición que la leucina se encuentre intercalada entre lisinas. La modificación covalente de H1 por fosforilación o maleilación disminuye dicha capacidad. La histona H1 y la longitud de la región internucleosomal parecen, asimismo, ser responsables de la presencia de estructura PSI en los mononucleosomas y, por tanto, de la conformación final de la cromatina. Los anticuerpos frente a la proteína tipo histona de *E. coli* forma precipitados con extractos de toda una serie de eubacterias, algunas de ellas muy distantes filogenéticamente de *E. coli*, pero, sin embargo, no precipitan ni con extractos de arqueobacterias ni con histonas de timo de ternera.

En conexión con estas observaciones hay que considerar la proteína cromosómica aislada de *Thermoplasma acidophilum*, que estabiliza al DNA frente a la desnaturalización térmica; se trata de una proteína pequeña, rica en aminoácidos básicos preferentemente lisina y pobre en aminoácidos aromáticos. Su interacción con el DNA da lugar a partículas globulares constituidas por un lazo de cuarenta pares de bases de DNA y cuatro moléculas de la proteína. Se trata, pues, de una especie de partícula cromosomal nucleosómica que, de un lado, se asemeja a los nucleosomas eucarióticos, pero, de otro, ofrece notables diferencias en relación a la estructura sugerida por las partículas de eubacterias. Si hubiera que decidirse, por tanto, hacia eubacterias o eucariotes en virtud de la semejanza estructural, reflejo de la funcionalidad del genoma, habría que hacerlo hacia el lado de las células eucarióticas.

Las bacterias metanogénicas constituyen un subgrupo de las arqueobacterias que juegan un papel fundamental en la digestión anaeróbica de la materia orgánica y llevan a cabo la etapa terminal que,

desde los productos finales del metabolismo —como acético, CO₂, H₂, metilamina, etc.—, conducen al metano. Estas propiedades metanogénicas del *Methanobrevibacter arboriphilus* se han transferido a eubacterias mediante el aislamiento del DNA por tratamiento de aquél con bacitracina, rotura específica mediante nucleasas de restricción e inserción en un plásmido vector. Los nuevos plásmidos, así contruidos, fueron introducidos en *E. coli* que da lugar, de esta manera, a la síntesis de polipéptidos codificados por el DNA de la arquebacteria. Hay que señalar que las diferencias fundamentales existentes en cuanto a los esquemas de síntesis de proteínas entre arquebacterias y eubacterias no son suficientes para impedir la expresión del material genómico de metanobacterias en *E. coli*, ya que el material genómico de *Methanobrevibacter* clonado en *E. coli* se transcribe y traduce en el huésped. Creo que no es necesario insistir en la importancia y trascendencia de este hecho en cuanto a sus posibles repercusiones tecnológicas y en la producción de energía.

Esta inclinación hacia el lado eucariótico de la relación estructura-función del DNA de las arquebacterias, se pone, asimismo, de manifiesto en toda su biología molecular conducente a la expresión del material genético. Son ejemplo de esta tendencia de las arquebacterias, la estructura de la RNA polimerasa con 7 subunidades y resistente a rifampicina, estreptolidigina y α -amantina; la semejanza en la estructura primaria del 5S rRNA; la homología de varias proteínas ribosómicas, equivalentes a las L7 y L12; la ADP-ribosilación del factor de elongación por la toxina diftérica y la no-inhibición por el cloranfenicol de la biosíntesis de proteínas.

De todas maneras, entre las macromoléculas más adecuadas para el estudio de las relaciones filogenéticas, por su permanente presencia y porque sus variaciones lentas con el tiempo permiten averiguar las más profundas conexiones, figuran los RNA ribosomales. Estas macromoléculas son de fácil aislamiento, de distribución universal, de secuencia muy conservativa y de función constante a lo largo de los agrupamientos filogenéticos. De los tres tipos de RNA ribosomales, 16 S, 23 S y 5 S, el primero presenta las mejores características para este tipo de estudios, entre otras razones porque fragmentos helicoidales individuales de unas 30 bases, y por razones desconocidas, se redistribuyen produciendo cambios adicionales no cronométricos; el efecto de cambios de este tipo ha de afectar, ló-

gicamente, en mayor medida, a macromoléculas de menor tamaño como el 5S rRNA. No obstante, las secuencias nucleotídicas de ambos, 5S y 16S rRNA, se han definido y se ha elaborado un árbol filogenético con 95 especies de organismos, incluidas arqueobacterias, que apoya la mayor relación de estos organismos con eucariotes que con eubacterias.

Abundando en alguno más de los extremos anteriores, subrayemos cómo la actividad de la toxina diftérica se utiliza para discriminar entre los factores de elongación eucarióticos y eubacterianos implicados en la translocación en el seno del ribosoma. El fragmento A de la toxina cataliza la unión covalente de la fracción de adenosina difosfato ribosa del NAD^+ a todos los factores EF-2 eucarióticos examinados, mientras que la correspondiente contraparte, EF-G, mitocondrial o eubacteriano, no es ADP-ribosilado en caso alguno. Esta diferencia entre la síntesis de proteínas eucarióticas y procarióticas está obviamente ocasionada por notorias discrepancias en la estructura primaria de ambos factores. En el caso de las arqueobacterias, todas las ensayadas, que cubren la totalidad del espectro de subgrupos conocidos, resultan modificadas por la toxina diftérica. Es evidente, pues, que estamos en presencia de un método fácil y riguroso para distinguir arqueobacterias de procarióticos.

El aparente o real contrasentido entre carencia de pared celular y la adaptación ambiental de las arqueobacterias a vivir en condiciones extremas, se obvia por la naturaleza especial de su membrana celular bajo la forma de una monocapa lipídica extraordinariamente estable. Ello resulta de la singular estructura molecular de los ingredientes lipídicos constituyentes que se reconocen hoy como auténticos fósiles moleculares; tales son las estructuras de los centenar y medio de hopanoides (hidrocarburos pentacíclicos presentes en algunas bacterias, helechos, líquenes y plantas superiores) del isoarborinol (análogo pentacíclico del lanosterol procedente de algunas estirpes bacterianas y plantas tropicales) y de los gliceril-éteres del fitanol y del α, ω -bis-fitanol presentes en arqueobacterias. Los hidrocarburos de los gliceril-éteres mencionados se han encontrado en algunos petróleos y proceden, con toda probabilidad, de los lípidos de membrana de arqueobacterias estrictamente anaerobias, productoras de metano. En *Thermoplasma acidophilum* se encuentra un lípido poliisoprenoide, $\text{C}_{40}\text{H}_{82}$, unido en ambos extremos a glicerol mediante enlaces éter, que ocupa por completo la membrana celular

a la que otorga su gran estabilidad frente a las condiciones de elevada acidez y temperatura. Esta membrana posee hidratos de carbono superficiales, glicosídicamente unidos a proteínas; característica ésta que continúa siendo propia de células eucarióticas.

Así, pues, toda la biología molecular de las arqueobacterias hace de estas células con una mayor vinculación hacia las células eucarióticas que hacia las eubacterias y que los posibles esquemas de divergencia evolutiva contemplen este hecho y puedan plantear la hipotética existencia de un antecesor común hace del orden de 4.000 millones de años; de esta forma, las arqueobacterias conectarían filogenéticamente procariones y eucariotes.

Continuando aún con esta idea hay que señalar un hecho del todo sugestivo. El pasado año, Eigen y Kinkler-Oswatitisch publicaron la supuesta secuencia ancestral de todas las moléculas conocidas de tRNA, que gozaría hipotéticamente de propiedades auto-replicas en una visión precursora de la actual síntesis de proteínas. Pues bien, la secuencia nucleotídica experimentalmente encontrada en el metionil-tRNA de la arqueobacteria *Thermoplasma acidophilum* coincide, de forma casi exacta, con la teóricamente reconstruida y conocida como «secuencia magistral». Hecho este final que subraya la singular posición filogenética de este organismo y de las arqueobacterias, en general. Todo este conjunto de características estructurales y funcionales hace de las arqueobacterias unos organismos sorprendentemente extraños que han de prestarse sobremanera al estudio de la especificidad y selectividad en el modo de acción de los antibióticos.

Un segundo tipo de comentarios que deseo no dejar de hacer lo es con referencia a los antibióticos β -lactámicos. Y ello, sobre todo, o quizá tan sólo, para recoger la elegante mención del profesor Vázquez a la vinculación con el tema de nuestro añorado Bustinza. Es este, además, el primer acto de recepción de un académico a la Sección de Naturales de esta Real Academia que transcurre en su definitiva ausencia; por ambos motivos, y a su noble bondad, sea dedicado este recuerdo.

En este campo debe subrayarse la producción por bacterias de antibióticos β -lactámicos, como las nocardinas (producidas por *Nocardia uniformis*) y las monobactamas (producidas por *Pseudomonas* y *Chromobacterium*, entre otros tipos de bacterias), y el conocimiento

del mecanismo de su actividad a través de interacciones con ciertos tipos de proteínas que sirven de blanco de la acción. Así, pues, mientras los clásicos antibióticos β -lactámicos se unen covalentemente con gran afinidad a los sistemas enzimáticos responsables de la producción de entrecruzamientos de los peptidoglicanos, la nocardicina A inhibe el entrecruzamiento sin interacción covalente alguna con dichas enzimas cuando se usan sistemas acelulares. Por otro lado, las monobactamas (antibióticos β -lactámicos monocíclicos), descubiertas como consecuencia del ensayo de un millón de estirpes bacterianas, unen a sus propiedades antibióticas, su comportamiento inactivador de las β -lactamasas. Ello no tiene nada de extraño dada la semejanza formal del mecanismo catalítico por parte de transpeptidasas, endopeptidasas, carboxipeptidasas y β -lactamasas.

Las β -lactamasas de origen cromosómico o plasmídico se encuentran en gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas y de las de una serie de especies se conoce su estructura primaria que exhibe una gran homología entre sí y con varias carboxipeptidasas.

Sin embargo, las β -lactamasas de enterobacterias Gram negativas son proteínas básicas con especificidad de sustrato hacia las cefalosporinas. Dichas cefalosporinasas, con 377 residuos de aminoácidos, se codifican por el gen *ampC* de *E. coli* K-12 y no muestran homología significativa alguna con las β -lactamasas específicas para penicilinas ni para las carboxipeptidasas. La clonación del gen *ampC* ha permitido la determinación de su completa secuencia nucleotídica, incluyendo la región reguladora que le precede.

Estos hechos ponen de manifiesto la existencia de dos grupos de serina β -lactamasas (penicilinasas y cefalosporinasas) con origen evolutivo diferente. Asimismo, la región del gen *ampC* decrece por la presencia de un terminador que ocasiona una profunda atenuación de la transcripción, de forma que mutaciones en las regiones del promotor y del atenuador para *ampC* pueden modificar la producción de la correspondiente β -lactamasa. Observaciones éstas que sirven de ejemplo a los conceptos y a la tecnología biológica molecular implicados en el tratamiento de estos problemas.

Pero es, sin duda, el comportamiento de los antibióticos frente al complejo sistema de biosíntesis de proteínas el tema al que el profesor Vázquez ha dedicado la mayor parte de su investigación y

que se refleja en el discurso que acabamos de escuchar. Al hablar hace unos momentos de las arqueobacterias, se ha dejado ya evidencia de la existencia de esquemas diferentes de síntesis de proteínas por parte de eubacterias y eucariotes, basada, al menos en parte, en la existencia de distintos tipos de ribosomas en ambas células. Una gran parte de los estudios originales realizados por Vázquez gira, precisamente, sobre la capacidad de los antibióticos para interaccionar o no con ribosomas en dependencia del origen de éstos, así como en su disposición para distinguir diferentes estructuras ribosomales. Entre las estructuras ribosomales mejor estudiadas se encuentran la localización peptidiltransferasa y los factores de elongación e iniciación.

La gran extensión de los trabajos de Vázquez y sus colaboradores se aprecia sólo con echar una ojeada a la amplia colección de antibióticos ensayados y a la serie de finos mecanismos de actuación examinados, descritos con sencillez y claridad en este discurso de recepción. Muchas docenas de publicaciones del máximo prestigio internacional avalan el interés y la difusión de la amplia obra investigadora de la escuela de Vázquez, que no dudo en calificar de única en la literatura científica internacional. Interés de estos trabajos que no se ciñe exclusivamente a la adquisición de detalles biológicos moleculares de tipo academicista, sino que se expande hacia trayectorias de otra diversa utilidad. Por un lado, la adquisición de este tipo de datos *in vitro* sobre los distintos tipos de células, bacterianas y del huésped, permite prever, en buena medida, el comportamiento del antibiótico en orden a la presentación de reacciones laterales indeseables en su utilización clínica. De otro lado, la actividad de estos compuestos químicos y su capacidad de unión como ligandos a diferentes macromoléculas biológicas sirve como útil herramienta en la investigación biológica. Así, y a modo de ejemplo, los estudios cuantitativos de unión de anisomicina y gougerotina al centro peptidiltransferasa de ribosomas eucarióticos demostraron la heterogeneidad estructural y funcional del ribosoma, únicamente observable con la entidad subcelular completa y no con la subunidad mayor en la que reside la localización blanco de la acción de estos antibióticos; en otras palabras, estos antibióticos distinguen las diferentes estructuras ribosomales. Haciendo uso de este hecho, se han podido descubrir los cambios conformacionales que tienen lugar en el ribosoma durante su ciclo participativo en la biosíntesis de proteínas e interpretado las razones de la heterogeneidad.

Con toda esta tarea, abnegada sin relumbrón e intensa con sencillez, merece el profesor Vázquez ocupar un sillón en esta Academia. Premio éste de singulares deleites, pero no para la gloria y el descanso, sino para que su juventud madura y su experiencia creen e impulsen los trabajos nuevos y en marcha a esta Academia. Estoy convencido que ella se enriquece hoy con un nuevo miembro y, al felicitarse, le desea una larga y provechosa permanencia.

Muchas gracias.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham, E. P., y Chain, E. (1940): *Nature* 146, 837.
- Allen, J. G.; Atherton, F. R.; Hall, M. J.; Hasall, C. H.; Holmes, S. W.; Lambert, R. W.; Nisbet, L. J., y Ringrose, P. S. (1977): *Nature* 272, 56.
- Aoki, H.; Sakai, H.; Hohsaka, M.; Konomi, T.; Hosoda, J.; Kubochi, Y.; Iguchi, E., e Imanaka, H. (1976): *J. Antibiotics* 29, 492.
- Aoki, H.; Kunugita, K.; Hosoda, J., e Imanaka, H. (1977): *J. Antibiotics* 30, Suppl. S-207.
- Atherton, F. R.; Hall, M. J.; Hasall, C. H.; Lambert, R. W.; Lloyd, W. J., y Ringrose, P. S. (1979): *Antimicrob. Agents Chemother* 15, 696.
- Atherton, F. R.; Hall, M. b.; Hasall, C. H.; Holmes, S. W.; Lambert, R. W.; Lloyd, W. J., y Ringrose, P. S. (1980): *Antimicrob. Agents Chemother.* 18, 897.
- Báez, A.; Angoso, M.; Alonso, G., y Vázquez, D. (1977): *Biochemie* 59, 751.
- Báez, A., y Vázquez, D. (1978): *Biochim. Biophys. Acta* 518, 95.
- Ballesta, J. P. G., y Vázquez, D. (1972a): *FEBS Letters* 28, 337.
- Ballesta, J. P. G., y Vázquez, D. (1972b): *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 3058.
- Barbacid, M., y Vázquez, D. (1973): *Anal. Biochem.* 56, 16.
- Barbacid, M., y Vázquez, D. (1974a): *J. Mol. Biol.* 84, 603.
- Barbacid, M., y Vázquez, D. (1974b): *Eur. J. Biochem.* 44, 437.
- Barbacid, M., y Vázquez, D. (1974c): *Eur. J. Biochem.* 44, 445.
- Barbacid, M.; Contreras, A., y Vázquez, D. (1975): *Biochim. Biophys. Acta* 395, 347.
- Barbacid, M.; Fresno, M., y Vázquez, D. (1975): *J. Antibiotics* 28, 453.
- Barbacid, M., y Vázquez, D. (1975): *J. Mol. Biol.* 93, 449.
- Battaner, E., y Vázquez, D. (1971): *Biochim. Biophys. Acta* 154, 316.
- Basinger, G. W., y Oliver, J. D. (1979): *J. Gen. Microbiol.* 111, 423.
- Behrens, O. K.; Corse, J.; Edwards, J. P.; Garrison, L.; Jones, R. G.; Soper, Q. F.; Van Abeela, F. R.; y Whitehead, C. W. (1948): *J. Biol. Chem.* 175, 793.
- Berenguer, J.; de Pedro, M. A.; y Vázquez, D. (1982a): *Antimicrob. Agents Chemother.* 21, 195.
- Berenguer, J.; de Pedro, M. A., y Vázquez, D. (1982b): *Eur. J. Biochem.* 126, 155.
- Bernabéu, C.; Vázquez, D., y Ballesta, J. P. G. (1976): *Eur. J. Biochem.* 79, 469.
- Blumberg, P. M., y Strominger, J. L. (1974): *Bacteriol. Rev.* 38, 291.
- Brandl, E., y Margreiter, H. (1954): *Oster. Chem. Ztg.* 55, 11.
- Brown, A. G.; Butterworth, D.; Cole, M.; Hanscomb, G.; Hood, J. D., y Reading, C. (1976): *J. Antibiotics* 29, 668.
- Brown, A. G.; Corbett, D. F.; Eglinton, A. J., y Howarth, T. T. (1977): *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, p. 523.

- Bustinza, F. (1961): «Diez años de amistad con Sir Alexander Fleming». Editorial M. A. S. Madrid.
- Bustinza, F. (1982): «Sir Alexander Fleming y el descubrimiento de la penicilina» (Editor, «Consejo General de Colegios Farmacéuticos»; director editorial, A. M. Municio). (En preparación.)
- Cabañas, M. J.; Vázquez, D., y Modolell, J. (1978a): *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 83, 991.
- Cabañas, M. J.; Vázquez, D., y Modolell, J. (1978b): *Eur. J. Biochem.* 87, 21.
- Cabrer, B.; Vázquez, D., y Modolell, J. (1972): *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 733.
- Cabrer, B.; San Millán, M. J.; Vázquez, D., y Modolell, J. (1976): *J. Biol. Chem.* 251, 1718.
- Campuzano, S.; Vázquez, D., y Modolell, J. (1979): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 960.
- Cannon, M.; Jiménez, A., y Vázquez, D. (1976): *Biochem. J.* 160, 137.
- Carlile, M. (1982): *TIBS* 7, 128.
- Carrasco, L., y Vázquez, D. (1972): *J. Antibiotics* 25, 732.
- Carrasco, L.; Barbacid, M., y Vázquez, D. (1973): *Biochim. Biophys. Acta* 312, 368.
- Carrasco, L., y Vázquez, D. (1973a): *FEBS Letters* 32, 152.
- Carrasco, L., y Vázquez, D. (1973b): *Biochim. Biophys. Acta* 319, 209.
- Carrasco, L.; Fernández Puentes, C., y Vázquez, D. (1975a): *Eur. J. Biochem.* 54, 499.
- Carrasco, L.; Fresno, M., y Vázquez, D. (1975b): *FEBS Letters* 52, 236.
- Carrasco, L.; Fernández Puentes, C., y Vázquez, D. (1976a): *Mol. Cell. Biochem.* 10, 97.
- Carrasco, L.; Jiménez, A., y Vázquez, D. (1976b): *Eur. J. Biochem.* 64, 1.
- Carrasco, L.; Fernández Puentes, C.; Alonso, M. A.; Lacal, J. C.; Muñoz, A.; Fernández-Sousa, J. M., y Vázquez, D. (1981): *New approaches to antiviral agents*. En «Medicinal chemistry advances», p. 211 (F. G. de las Heras y S. Vega, Eds.). Pergamon Press, Oxford-Nueva York-Toronto-Sydney-Paris-Frankfurt.
- Carrasco, L., y Vázquez, D. (1982): *Viral translation inhibitors*. En «Antibiotics VI» (E. F. Hahn, Ed.). Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg-Nueva York.
- Caskey, C. Th. (1980): *TIBS* 5, 234.
- Celma, M. L.; Monro, R. E., y Vázquez, D. (1970): *FEBS Letters* 6, 275.
- Celma, M. L.; Monro, R. E., y Vázquez, D. (1971): *FEBS Letters* 13, 247.
- Celma, M. L.; Vázquez, D. y Modolell, J. (1972): *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48, 1240.
- Chambliss, G.; Craven, G. R.; Davies, J.; Davis, K.; Kahan, L., y Nomura, M. (Eds.) (1980): «Ribosomes: structure, function and genetics. University Park Press». Baltimore.
- Clark, B. (1980): *TIBS* 5, 207.
- Conde, F. P.; Fernández-Puentes, C.; Montero, M. T. V., y Vázquez, D. (1978): *FEMS*

Microbiol. 4, 349.

- Contreras, A.; Barbacid, M., y Vázquez, D. (1974): *Biochim. Biophys. Acta* 349, 376.
- Contreras, A., y Vázquez, D. (1977a): *Eur. J. Biochem.* 74, 539.
- Contreras, A., y Vázquez, D. (1977b): *Eur. J. Biochem.* 74, 549.
- Contreras, A.; Vázquez, D., y Carrasco, L. (1978): *J. Antibiotics* 6, 151.
- Dolz, H.; Sollhuber, M.; Trigo, G. G.; Vázquez, D., y Jiménez, A. (1980): *Analytical Biochemistry* 108, 215.
- Dolz, H.; Vázquez, D., y Jiménez, A. (1982): *Biochemistry* 21, 3181.
- Doolittle, W. F. (1980): *TIBS* 5, 146.
- Elbein, A. D. (1981): *TIBS* 6, 219.
- Fernández Muñoz, R.; Monro, R. E.; Torres Pinedo, R., y Vázquez, D. (1971): *Eur. J. Biochem.* 23, 185.
- Fernández Muñoz, R., y Vázquez, D. (1973a): *Mol. Biol. Reports* 1, 27.
- Fernández Muñoz, R., y Vázquez, D. (1973c): *J. Antibiotics* 26, 107.
- Fernández Puentes, C.; Carrasco, L., y Vázquez, D. (1976): *Biochemistry* 15, 4364.
- Fernández Puentes, C., y Vázquez, D. (1977): *FEBS Letters* 78, 143.
- Fernández Puentes, C., y Carrasco, L. (1980): *Cell* 30, 769.
- Fleming, A. (1929): *Br. J. Exp. Path.* 10, 226.
- Fox, G. E.; Stackebrandt, E.; Hespell, R. B.; Gibson, J.; Maniloff, J.; Dyer, T. A.; Wolfe, R. S.; Balch, W. E.; Tanner, R. S.; Magrum, L. J.; Zablen, L. B.; Blake-more, R.; Grupta, R.; Bonen, L.; Lewis, B. J.; Stahl, D. A.; Luehrsen, K. B.; Chen, K. N., y Woese, C. R. (1980): *Science* 209, 457.
- Fresno, M.; Carrasco, L., y Vázquez, D. (1976): *Eur. J. Biochem.* 68, 355.
- Fresno, M.; González, A.; Vázquez, D., y Jiménez, A. (1978): *Biochim. Biophys. Acta* 518, 104.
- Fresno, M.; Jiménez, A., y Vázquez, D. (1977): *Eur. J. Biochem.* 72, 323.
- Fresno, M., y Vázquez, D. (1980): *Eur. J. Biochem.* 83, 169.
- Gale, E. F.; Cundliffe, E.; Reynolds, P. E.; Richmond, M. H., y Waring, M. J. (1981): «The molecular basis of antibiotic action». Segunda edición. John Wiley Sons. Londres-Nueva York-Sidney-Toronto.
- Gale, E. F., y Paine, T. F. (1950): *Biochem. J.* 48, 298.
- Ghuysen, J. M. (1977): *Biosynthesis and assembly of bacterial cell walls*. En «The synthesis, assembly and turnover of cell surface components», p. 463 (G. Poste y G. L. Nicolson), North Holland. Amsterdam-Nueva York-Oxford.
- Ghuysen, J. M. (1980): «Antibiotics and peptidoglycan metabolism». En «Topics in antibiotic Chemistry», vol. 5, p. 9 (P. G. Sammes, Ed.). Ellis Horwood Ltd. Chichester.
- Girbés, T.; Vázquez, D., y Modolell, J. (1976): *Eur. J. Biochem.* 67, 257.
- González, A.; Jiménez, A.; Vázquez, D.; Davies, J. E., y Shindler, D. (1978): *Biochim. Biophys. Acta* 521, 459.

- González, A.; Vázquez, D., y Jiménez, A. (1979): *Biochim. Biophys. Acta* 561, 403.
- González, A.; Santamaría, F.; Vázquez, D., y Jiménez, A. (1981): *Molec. Gen. Genetics* 181, 140.
- Hammes, W. P.; Winter, J., y Kondler, O. (1979): *Arch. Microbiol.* 123, 275.
- Hendlin, D.; Stapley, E. O.; Jackson, M.; Wallick, H.; Miller, A. K.; Wolf, F. J.; Miller, T. W.; Chalet, L.; Kahan, F. M.; Foltz, E. L.; Woodruff, H. B.; Mata, J. M.; Hernández, S., y Mochales, S. (1969): *Science* 166, 122.
- Himmelweit, F. (1960): «The collected papers of Paul Ehrlich». Vol. 3, p. 505. Pergamon Press. Londres.
- Hori, H., y Osawa, S. (1979): *Recent studies on the evolution of 5S RNA*. En «Genetics and evolution of RNA polymerase, tRNA and ribosomes», p. 539 (S. Osawa, H. Oseki, H. Uchida y T. Yura, Eds.), University of Tokyo Press. Elsevier-North Holland Biomedical Press. Amsterdam-Nueva York-Oxford.
- Hunt, T. (1980): *TIBS* 5, 178.
- Hunter, M. I. S., y Millar, S. J. W. (1980): *J. Gen. Microbiol.* 120, 255.
- Imada, A.; Kitano, K.; Kintaka, K.; Muroi, M., y Asai, M. (1981): *Nature* 289, 590.
- Jiménez, A.; Monro, R. E., y Vázquez, D. (1970a): *FEBS Letters* 7, 103.
- Jiménez, A.; Monro, R. E., y Vázquez, D. (1970b): *FEBS Letters* 7, 109.
- Jiménez, A., y Vázquez, D. (1975): *Eur. J. Biochem.* 53, 483.
- Jiménez, A.; Sánchez, L., y Vázquez, D. (1975a): *Biochim. Biophys. Acta* 383, 427.
- Jiménez, A.; Sánchez, L., y Vázquez, D. (1975b): *FEBS Letters* 60, 66.
- Jiménez, A.; Sánchez, L., y Vázquez, D. (1975c): *FEBS Letters* 55, 53.
- Jiménez, A.; Santos, A.; Alonso, G. y Vázquez, D. (1976): *Biochim. Biophys. Acta* 425, 342.
- Jiménez, A.; Carrasco, L., y Vázquez, D. (1977): *Biochemistry* 16, 4727.
- Jiménez, A., y Vázquez, D. (1979): *Anisomycin and related antibiotics*. En «Antibiotics», Vol V-2, p. 1 (E. F. Hahn, Ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Jiménez, A., y Vázquez, D. (1982): *Novel inhibitors of translation in eukaryotic system*. En «Antibiotics», Vol VI (E. F. Hahn, Ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Kahan, F. M.; Kahan, J. S.; Cassidy, P. J., y Kropp, H. (1974): *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235, 364.
- Kahan, J. S.; Kahan, F. M.; Geogelman, R.; Currie, S. A.; Jackson, M.; Stapley, E. O.; Miller, T. W.; Miller, A. K.; Hendlin, D.; Mochales, S.; Hernández, S., y Woodruff, H. B. (1976): *16th Interscience Conf. Antimicrob. Agents. Chemother* (Chicago), Abstract 227.
- Kang, M.; Spencer, J. P., y Elbein, A. D. (1978): *J. Biol. Chem.* 253, 8860.
- Kerridge, D. (1958): *J. Gen. Microbiol.* 19, 497.
- Kessel, M., y Klink, F. (1980): *Nature* 287, 250.
- Kessel, M., y Klink, F. (1981): *Eur. J. Biochem.* 114, 481.

- Kozak, M. (1979): *J. Biol. Chem.* 254, 4731.
- Kozak, M. (1980): *Cell* 22, 459.
- Krebs, H. A. (1982): *TIBS* 7, 216.
- Lacaf, J. C.; Vázquez, D.; Fernández-Sousa, J. M., y Carrasco, L. (1980): *J. Antibiotics* 33, 441.
- Lugtenberg, B. (1981): *TIBS* 6, 262.
- Lund, F., y Tybring, L. (1972): *Nature New Biol.* 236, 135.
- Martínez, O.; Vázquez, D., y Modolell, J. (1978): *FEBS Letters* 87, 21.
- Mescher, M. F., y Strominger, J. L. (1975): *J. Gen. Microbiol.* 89, 375.
- Mescher, M. F. (1981): *TIBS* 6, 97.
- Modolell, J.; Cabrer, B.; Parmeggiani, A., y Vázquez, D. (1971a): *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68, 1796.
- Modolell, J.; Vázquez, D., y Monro, R. E. (1971b): *Nature New Biol.* 230, 109.
- Modolell, J.; Cabrer, B., y Vázquez, D. (1973): *J. Biol. Chem.* 248, 8356.
- Modolell, J., y Vázquez, D. (1973): *J. Biol. Chem.* 248, 488.
- Modolell, J.; Girbés, T., y Vázquez, D. (1975): *FEBS Letters* 60, 109.
- Modolell, J., y Vázquez, D. (1977): *Eur. J. Biochem.* 81, 491.
- Monro, R. E.; Staehelin, T.; Celma, M. L., y Vázquez, D. (1969a): *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 34, 357.
- Monro, R. E.; Celma, M. L., y Vázquez, D. (1969b): *Nature* 222, 356.
- Monro, R. E., y Vázquez, D. (1967): *J. Mol. Biol.* 28, 161.
- Monro, R. E.; Fernández Muñoz, R.; Celma, M. L., y Vázquez, D. (1971): *Mode of action of lincosamin and related antibiotics*. En «Drug action and drug resistance in bacteria. 1. Macrolide antibiotics and lincosamin», p. 305 (S. Mitsuhashi, Ed.), University of Tokyo Press. Tokio.
- Morin, R. B.; Jackson, B. G.; Flynn, E. H., y Roeske, R. W. (1962): *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3400.
- Nagarajan, R.; Boeck, L. D.; Gorman, M.; Hamill, R. L.; Higgens, C. E.; Hoehn, M. M.; Stark, W. M., y Whitney, J. G. (1971): *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2308.
- Nagarajan, R. (1972): *Cephalosporins and penicillins. Chemistry and Biology*, p. 636 (E. H. Flynn, Ed.), Academic Press, Nueva York-Londres.
- Neth, R.; Monro, R. E.; Heller, C.; Battaner, E., y Vázquez, D. (1970): *FEBS Letters* 6, 198.
- Neu, H. C. (1976): *Antimicrob. Agents. Chemother.* 9, 793.
- Newton, G. G. F., y Abraham, E. P. (1956): *Biochem. J.* 62, 651.
- Noguchi, H.; Matsuhashi, M., y Matsuhashi, S. (1979): *Eur. J. Biochem.* 100, 41.
- Olsnes, S.; Fernández-Puentes, C.; Carrasco, L., y Vázquez, D. (1975): *Eur. J. Biochem.* 60, 281.
- Osawa, S.; Ozeki, H.; Uchida, H., y Yura, T. (Eds.) (1979): «Genetics and evolution

- of RNA polymerase, tRNA and ribosomes». University of Tokyo Press. Elsevier-North Holland Biomedical Press. Amsterdam-Nueva York-Oxford.
- Pecher, T., y Böck, A. (1981): *FEMS Microbiol. Letters* 10, 295.
- Poste, G., y Nicolson, G. L. (Eds.) (1977): The synthesis, assembly and turnover of cell surface components». North Holland. Amsterdam-Nueva York-Oxford.
- Reyes, R.; Vázquez, D., y Ballesta, J. P. G. (1976a): *Biochim. Biophys. Acta* 435, 317.
- Reyes, R.; Vázquez, D., y Ballesta, J. P. G. (1976b): *Biochim. Biophys. Acta. Eur. J. Biochem.* 67, 267.
- Reyes, R.; Vázquez, D., y Ballesta, J. P. G. (1977): *Eur. J. Biochem.* 73, 25.
- Rodríguez-López, M., y Vázquez, D. (1968): *Life. Sci.* 7, 327.
- Rodríguez-Tébar, A.; Rojo, F.; Montilla, J. C., y Vázquez, D. (1982a): *FEMS Microbiol. Letters* 14, 295.
- Rodríguez-Tébar, A.; Rojo, F., y Vázquez, D. (1982b): *Antimicrob. Agents. Chemother.* 22, 255.
- Rodríguez-Tébar, A.; Rojo, R., y Vázquez, D. (1982c): *Eur. J. Biochem.* 126, 160.
- Rolinson, G. N.; Batchelor, F. R.; Butterworth, D.; Cameronwood, J.; Cole, M.; Eustace, G. C.; Hart, M. V.; Richards, M., y Chain, E. B. (1960): *Nature* 187, 236.
- Rosa, E. de la; de Pedro, M. A., y Vázquez, D. (1982): *FEMS Microbiol. Letters* 14, 91.
- San Millán, M. J.; Vázquez, D., y Modolell, J. (1975): *Eur. J. Biochem.* 57, 431.
- Sánchez, L.; Vázquez, D., y Jiménez, A. (1977): *Mol. Gen. Genetics* 156, 319.
- Schwarz, U.; Seeger, K.; Wengenmayer, F., y Strecker, M. (1981): *FEMS Microbiology Letters* 10, 107.
- Sheldrick, G. M.; Jones, P. G.; Kennard, O.; Williams, D. H., y Smith, G. A. (1978): *Nature* 271, 223.
- Sollhuber, M.; Grande, M. T.; Trigo, G. G.; Vázquez, D., y Jiménez, A. (1980): *Current Microbiol.* 4, 81.
- Spratt, B. G. (1975): *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 2999.
- Spratt, B. G. (1977a): *Penicillin-binding proteins of Escherichia coli: general properties and characterization of mutants.* En «Microbiology 1977», p. 182 (D. Schlessinger, Ed.), American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- Spratt, B. G. (1977b): *Eur. J. Biochem.* 72, 341.
- Spratt, B. G. (1977c): *Antimicrob. Agents. Chemother.* 11, 161.
- Stapley, E. P.; Jackson, M.; Hernández, S.; Zimmerman, S. B.; Currie, S. A.; Mochales, S.; Mata, J. M.; Woodruff, H. B., y Hendlin, D. (1972): *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2, 122.
- Strominger, J. L. (1977): *How penicillin kills bacteria: a short history.* En «Microbiology-1977», p. 177 (D. Schlessinger, Ed.), American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- Sykes, R. B.; Cimarusti, C. M.; Bonner, D. P.; Bush, K.; Floyd, D. M. Georgopadakou, N. H.; Koster, W. H.; Liu, W. C.; Parker, W. L.; Principe, P. A.; Rathnun, M. L.; Slusarchyk, W. A.; Trejo, W. H., y Wells, J. S. (1981): *Nature* 191, 489.

- Tanaka, H.; Iwai, Y.; Oiwa, R.; Shinohara, S.; Shimizu, S.; Oka, T., y Omura, S. (1977): *Biochim. Biophys. Acta* 497, 633.
- Tanaka, H.; Oiwa, R.; Matsukura, S., y Omura, S. (1979): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 902.
- Vázquez, D. (1963): *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 12, 409.
- Vázquez, D. (1964a): *Nature* 203, 257.
- Vázquez, D. (1964b): *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 15, 464.
- Vázquez, D. (1966a): *Biochim. Biophys. Acta* 114, 289.
- Vázquez, D. (1966b): *Biochim. Biophys. Acta* 114, 277.
- Vázquez, D. (1966c): *J. Gen. Microbiol.* 42, 93.
- Vázquez, D. (1966d): *Mode of action of chloramphenicol and related antibiotics*. En *Biochemical studies of antimicrobial drugs*, p. 169 (Sixteenth Symposium of the Society for General Microbiology) (B. A. Newton y P. E. Reynolds, Eds.). Cambridge University Press.
- Vázquez, D. (1967a): *Life Sciences* 6, 381.
- Vázquez, D. (1967b): *Life Sciences* 6, 845.
- Vázquez, D. (1967c): *Macrolide antibiotics spiramycin, carbomycin, angolamycin, methymycin and lancamycin*. En «Antibiotics. I. Mechanism of action», p. 366 (D. Gottlieb y P. D. Shaw, Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Vázquez, D. (1967d): *The streptogramin family of antibiotics*. En «Antibiotics. I. Mechanism of action», p. 387 (D. Gottlieb y P. W. Shaw, Eds.), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Vázquez, D. (1974): *FEBS Letters* 40, Supp., S63.
- Vázquez, D. (1975a): *The macrolide antibiotics*. En «Antibiotics Vol. III», p. 459 (J. W. Corcoran y F. E. Hahn, Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Vázquez, D. (1975b): *The streptogramin family of antibiotics*. En «Antibiotics Vol. III», p. 521 (J. W. Corcoran y F. E. Hahn, Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Vázquez, D. (1978): *Translation inhibitors*. En «Amino acid and protein biosynthesis II. International Review of Biochemistry», Vol. 18, p. 166 (Arntein, H. R. V., Ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Vázquez, D. (1979a): *Inhibitors of protein biosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Vázquez, D. (1979b): *Protein and glycoprotein toxins that inactivate the eukaryotic ribosome*. En «Antibiotics Vol. V-2», p. 341 (F. E. Hahn, Ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Vázquez, D. (1981a): *Bases moleculares de la acción de los inhibidores de la síntesis de proteínas*. En «Genética molecular bacteriana», p. 367 (A. Jiménez-Sánchez y R. Guerrero, Eds.), Ed. Reverté, Barcelona.
- Vázquez, D. (1981b): *Investigación y Ciencia* 62, 130.
- Vázquez, D. (1981c): *Screening of inhibitors or protein biosynthesis*. En «The future of antibiotherapy and antibiotic research», p. 273 (L. Ninet, P. E. Bost, D. H. Bouanchand y J. Florent, Eds.), Academic Press, Londres-Nueva York-Toronto-Sydney-San Francisco.

- Vázquez, D. (1981d): *Nucleoside Antibiotics. Mode of action*. En «Medicinal chemistry advances», p. 41 (F. G. de las Heras y S. Vega, Eds.), Pergamon Press. Oxford-Nueva York-Toronto-Sydney-Paris-Franfurt.
- Vázquez, D.; Battaner, E.; Neth, R.; Heller, G., y Monro, R. E. (1969): *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 34, 369.
- Vázquez, D., y Jiménez, A. (1980): En «Ribosomes: structure, function and genetics», p. 847 (G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davies, L. Kahan y M. Nomura), University Park Press. Baltimore.
- Vázquez, D., y Monro, R. E. (1967): *Biochim. Biophys. Acta* 145, 155.
- Vázquez, D.; de Pedro, M. A.; Berenguer, J.; Rojo, F. de la Rosa, E., y Rodríguez-Tébar, A. (1982a): *Bases moleculares de la acción y sinergismo de antibióticos β -lactámicos y de la resistencia bacteriana a los mismos*. En el libro de homenaje a Bustinza (C. Vicente-Córdoba y A. M. Municio, Eds.) (en preparación).
- Vázquez, D.; Zaera, E.; Döhl, H., y Jiménez, A. (1982b): *Action of inhibitors of protein biosynthesis*. En «Protein biosynthesis in eukaryotics», p. 311 (R. Pérez-Bercof, Ed.), Plenum Publishing Corp. Nueva York.
- Ward, J. B. (1977): *FEBS Letters* 78, 151.
- Williams, D. H.; Rajananda, V.; Williamson, M. P., y Bojesen, G. (1980): En «Topics en antibiotic chemistry», Vol. 5, p. 119 (P. G. Sammes, Ed.), Ellis Horwood Ltd. Chichester.
- Woese, C. R. (1981): *Scientific American* 244, Nro. 6, 94.
- Woodruff, H. B.; Mata, J. M.; Hernández, S.; Mochales, S.; Rodríguez, A.; Stapley, E. O.; Wallick, H.; Miller, A. K., y Hendlin, D. 1977): *Chemotherapy* 23 (suppl. 1), e.
- Wu, H. C., y Venkateswaran, P. S. (1974): *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235, 587.
- Zaera, E.; Jiménez, A., y Vázquez, D. (1980): *Rev. Real Acad. Ciencias Exactas Físicas Naturales. Madrid* 74, 733.