

# TRABAJOS ORIGINALES

## PAPEL BIOLÓGICO DE LAS VITAMINAS

OBSERVACIONES GENERALES SOBRE ALGUNAS VITAMINAS  
CONSIDERADAS COMO COENZIMAS

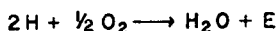
CONFERENCIA DICTADA ANTE LA ASOCIACION VENEZOLANA  
PARA EL AVANCE DE LA CIENCIA, JUNIO DE 1953

*Alfredo Planchart*  
Instituto Nacional de Nutrición

El hecho de que haya sido demostrado que la mayor parte de las vitaminas son coenzimas de diversas reacciones del metabolismo general, nos obliga, al hacer una revisión de su papel biológico, a estudiar, aunque sea de una manera sucinta, la evolución del metabolismo y su significado biológico.

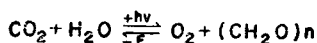
El metabolismo general es la serie de reacciones bioquímicas y biofísicas que permiten la distribución de la energía necesaria para la vida y funcionamiento de cada uno de los elementos que componen el organismo vivo.

Aun cuando es verdad que esta energía se obtiene de la descomposición, por oxidación, de las moléculas que componen los alimentos, la energía que éstos encierran proviene en último término de la liberación de la energía liberada en la formación de  $H_2O$ , de acuerdo con la reacción.



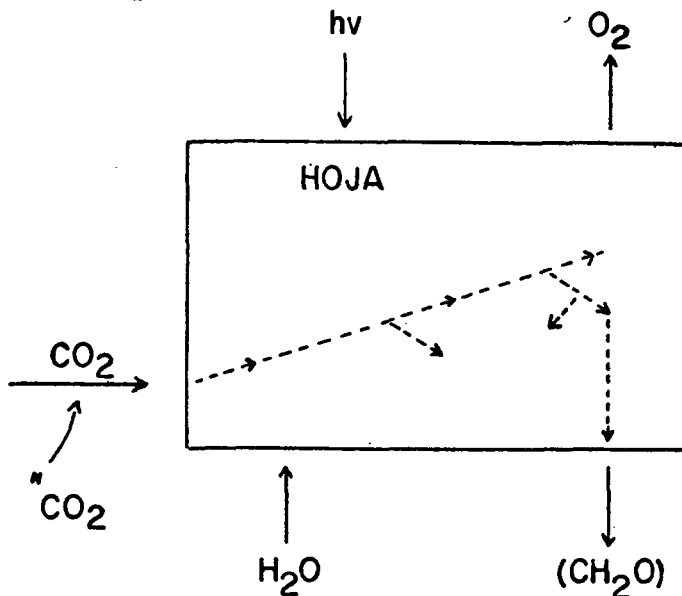
Ahora bien, el estudio del metabolismo general implica no solamente el proceso de liberación de esta energía, sino también la serie de reacciones bioquímicas que permiten su distribución, por pequeñas cantidades, en reacciones biológicas tanto de síntesis como de desintegración.

Por estas razones nos ha parecido necesario iniciar el estudio del metabolismo general con el proceso fundamental de síntesis biológica, que es la fotosíntesis, comenzando su estudio con el análisis de las reacciones que conducen a la fórmula.



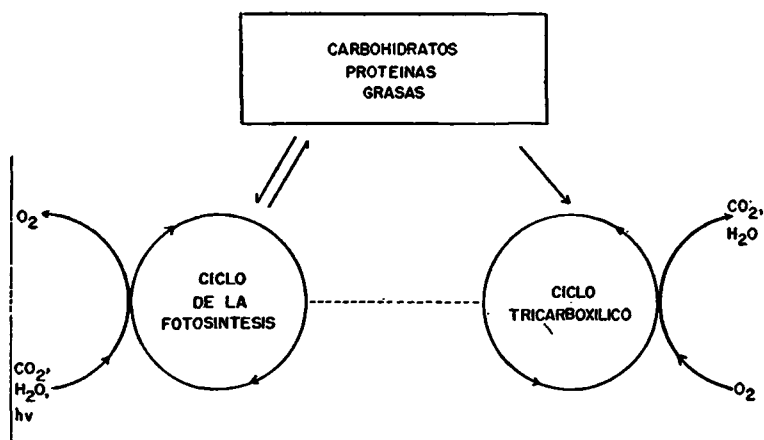
Con la cual puede resumirse todo el proceso tanto anabólico como catabólico del metabolismo general, ya que, leída de derecha a izquierda, expresa la fotosíntesis, mientras que en el sentido inverso es la reacción fundamental de la respiración.

Sin detenernos a analizar en detalle toda la concepción moderna de la fotosíntesis, podemos decir, siguiendo a Calvin (1), que el resultado final de la absorción de los fotones —demostrada por Warburg (2), por la molécula de clorofila— sirve para dividir la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  en dos partes: una que termina siendo oxígeno molecular y otra que tiene la capacidad de reducir el anhídrido carbónico en la ausencia de la luz, iniciándose así la vía a través de la cual el C. del anhídrido carbónico permite la síntesis de todas las materias primas de la planta.



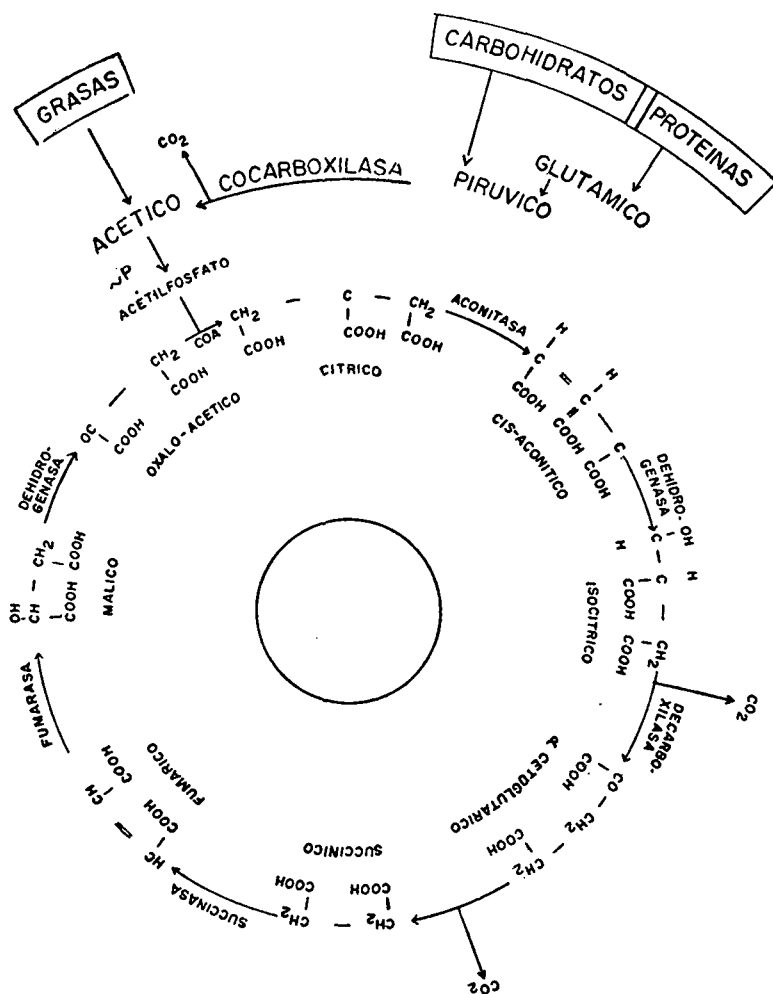
El mismo Calvin y sus colaboradores, utilizando el isótopo 14 del C., ha logrado aislar toda una serie de sustancias producidas durante la fotosíntesis llevada a cabo por algas del tipo *Chlorella* o *Scenedesmus*. Calvin enfoca el problema como si la hoja verde fuera un depósito opaco donde entran las diversas materias primas de la fotosíntesis, es decir, el agua, la luz y el  $\text{CO}_2$ , y de donde salen sus productos, el  $\text{O}_2$  y los compuestos reducidos del C., que constituyen la planta y sus reservas. Utilizando el método de cromatografía de papel con el líquido de cultivo del *Scenedesmus* expuesto a una corriente de  $\text{CO}_2$  marcado, estos mismos autores lograron demostrar que el ácido fosfoglicérico es de los primeros compuestos en aparecer y también que muy rápidamente aparecen los hexosafosfatos, lo que hizo pensar a los autores que estos hexosafosfatos se formaban de la combinación de dos moléculas de fosfoglicérico, en proceso similar, si no idéntico, al de la glicolisis, pero invertida. Una prueba más de esta afirmación es el hecho de que el primero de los hexosafosfatos que aparecen en la fotosíntesis es el éster fructosa 1-6 difosfato, que es precisamente el último que aparece antes de la división de la hexosa en la glicolisis.

Es un hecho ya demostrado que el principal mecanismo bioquímico de la respiración es el ciclo tricarbólico de Krebs. La fotosíntesis y la respiración están relacionadas entre sí según el siguiente esquema, tomado de Calvin (3):

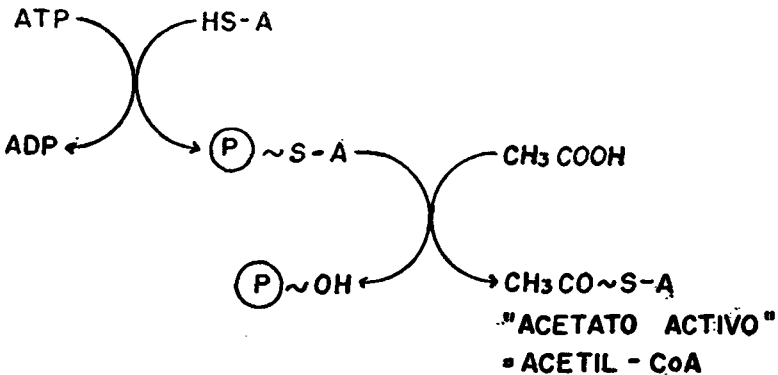
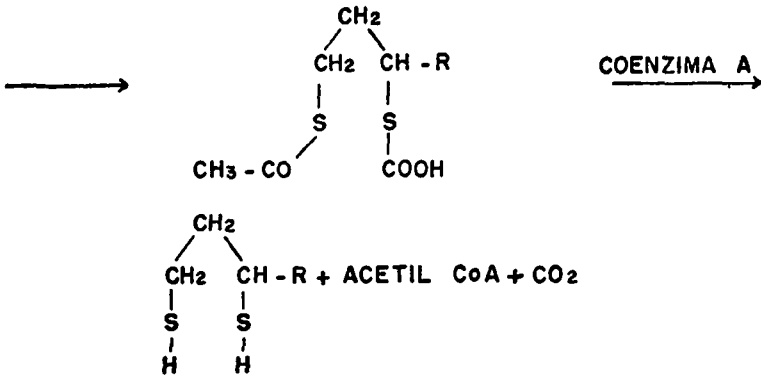
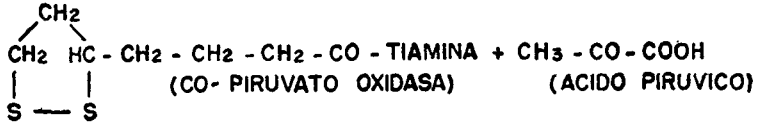


Pero, ¿cómo es utilizada la energía luminosa absorbida por la molécula de clorofila? Esta pregunta nos lleva inmediata-

mente al encuentro de dos de los más importantes descubrimientos recientes y nos da una idea más clara de las relaciones entre la respiración y la fotosíntesis. En el curso de esta última, junto con el ácido fosfoglicérico, uno de los productos que más intensa y rápidamente aparecen es el ácido málico; éste pasa por reacciones de óxido-reducción perfectamente demostradas desde los trabajos iniciales de Szent Györgyi (4), a oxaloacético, el cual, al unirse con una unidad de dos carbonos proveniente del pirúvico, sintetiza el ácido cítrico, iniciándose así el ciclo de Krebs.



Esta reacción, que es la que ha sido demostrada como "alimentadora" del ciclo respiratorio (5), se lleva a efecto en la siguiente forma:



Así entramos por primera vez en contacto con una de las coenzimas del metabolismo, formado por dos de las vitaminas. La primera de estas dos vitaminas ha sido recientemente sintetizada por Jukes y col. (6, 7, 8, 9), quienes le han dado el nombre de "ácido tióctico", ya que contiene azufre y ocho carbonos. Esta misma vitamina corresponde a las anteriores denominaciones de "protógeno A", de Kidder y Dewey en 1944

(10); "ácido lipoico", de Reed (11), y aun de "ácido leucoico" (12). Es de un interés muy grande el hecho de que, aun cuando ejerce una función tan importante en las reacciones de la fotosíntesis, fué extraído, por Jukes y sus colaboradores, del hígado (100 toneladas de hígado produjeron 50 mgr. de ácido tióctico); lo cual podría ser una nueva prueba indirecta de la universalidad del ciclo de Krebs como ciclo respiratorio celular (13). En estas reacciones propuestas por Calvin, la acción de la mezcla "ácido tióctico" - tiamina sería muy similar a la de la "enzima condensadora" de Ochoa (12), que permite la activación de la coenzima A.

Existen pruebas de que el ácido tióctico es una verdadera vitamina, ya que su descubrimiento fué debido a que George y Cain (14) habían observado que existía una substancia necesaria para que el *St. faecalis* produjera la decarboxilación del pirúvico y para el crecimiento de la *tetrahymena gelei* (10). Esta substancia favorece el crecimiento de los microorganismos utilizados para el ensayo de la B<sub>12</sub>.

Resumiendo, la energía lumínica adquirida por la clorofila de la planta sirve para activar el enlace -S-S- del ácido tióctico, el cual, en conjunción con la tiamina, descompone el ácido pirúvico en CH<sub>3</sub>CO y COOH, los cuales se unen como está indicado en la fig. 6. El acetil pasa a la coenzima A, quedando ésta acetilada, para luego pasar su acetilo al oxaloacético, iniciando así el ciclo de Krebs (Calvin).

En esta forma queda así estudiado el papel biológico de la primera vitamina que nos hemos encontrado en el curso del metabolismo general: el ácido tióctico.

En este ligero resumen de la fotosíntesis hemos visto aparecer una coenzima, la coenzima A, que desempeña un papel de enorme importancia en el metabolismo aeróbico.

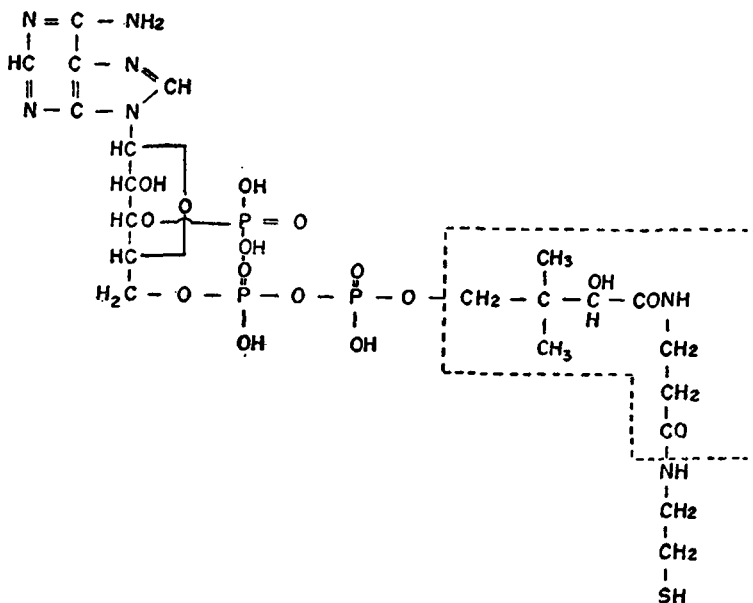
Como hemos venido observando, la reacción que inicia el ciclo tricarbóxico es la condensación del ácido oxaloacético con una unidad dicarbóxica denominada "acetil", la cual proviene del ácido pirúvico decarboxilado. Se había pensado que el ácido acético podría formarse en el curso del metabolismo, a partir del pirúvico, y que, una vez formado, podría reaccionar directamente con el oxaloacético, pero no se pudo obtener ninguna prueba de esta reacción y más bien aparecieron muchas demostraciones de que el ácido acético no aparecía como tal.

Por tanto, debía aparecer esta unidad de dos carbonos, a la cual se llamó acetilo, en forma activa para poder ser transportada hacia el oxaloacético. A esta unidad se le llama ahora acetilfosfato. Ya existía evidencia de que esta forma activa de acetil podía aparecer, derivándose del metabolismo glucídico vía ácido pirúvico, y del graso vía ácido acetoacético.

Nachmanson y Machado, en 1943 (15), habían hecho la observación de que para la formación de la acetilcolina, a partir de la colina, el acetil se activaba por combinación con el P del ATP. Posteriormente se vió que este mismo modo de activación con ATP era necesario para la acetilación de algunas aminas aromáticas (16) y para la formación del ácido acetoacético (17). Lipmann (18) encontró una coenzima necesaria para las acetilaciones biológicas. Sus primeros estudios demostraron la necesidad de esta coenzima para la acetilación de las sulfonamidas y posteriormente se ha ido viendo la casi universalidad de su presencia, ya que se ha demostrado ser la primera alimentadora del ciclo de Krebs. El mismo Lipmann le dió el nombre de coenzima A. El hecho de que esta coenzima estuviera relacionada con la síntesis del ácido cítrico fué demostrada por Novelli y Lipmann (19) y posteriormente por Stern y Ochoa (20) al lograr la síntesis del ácido cítrico a partir del oxaloacético, acetato y ATP. También vieron que la presencia de la CoA era necesaria para que se llevara a efecto la reacción.

Los estudios sobre la estructura de la coenzima A han aclarado mucho el conocimiento de su mecanismo de acción. Ya desde el descubrimiento de esta coenzima, Lipmann se había dado cuenta de que el ácido pantoténico entraba en su composición, junto con radicales fosfóricos (18). Posteriormente, Lipmann y sus colaboradores (21) observaron que, además de estos dos radicales, existía otro que contenía un compuesto de azufre, el cual debía estar unido al pantotenato.

Más tarde, Snell y col. (22) demostraron que este compuesto era la beta mercaptoetil-amina. Lynen y sus colaboradores (23), en Alemania, han logrado aislar la coenzima A cristalizada, demostrando que su grupo activo es el sulfhidrilo. Es decir que la CoA actuaría como un transportador de acetil debido a la presencia en su molécula del grupo -SH.

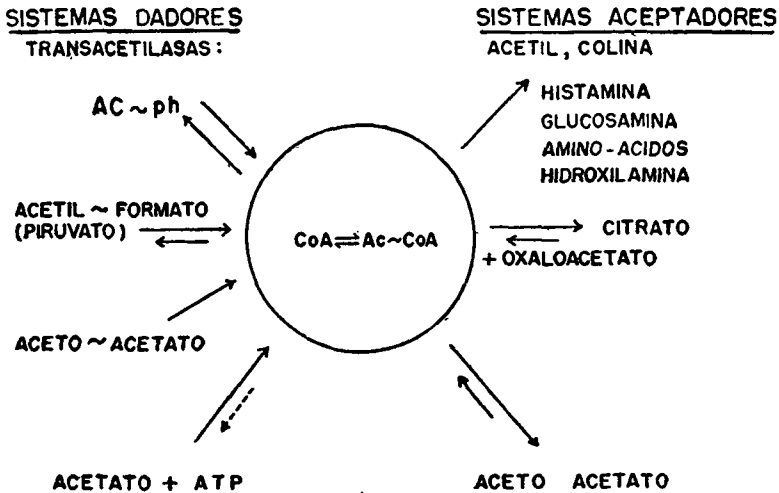


Como se ve, el potencial óxido-reductor del SH permite su unión con el radical acetil. La presencia del fosfato confirma la opinión, primeramente emitida por Nachmanson y Machado, de la necesidad de un radical acetilfosfato para la síntesis de la acetilcolina e indica la importancia de este radical, del CoA, en el metabolismo.

Aun cuando el principal papel de la CoA es el de alimentar el ciclo tricarbóxico de Krebs, ella no es más que una coenzima de dos sistemas enzimáticos colocados entre el pirúvico y el ácido oxaloacético. El primero de estos sistemas es el de las transacetilasas, un ejemplo del cual es el propuesto por Calvin, que ya hemos estudiado con cierto detalle al hablar de la fotosíntesis, y en el cual desempeñan papel funcional los SH del ácido tióctico.

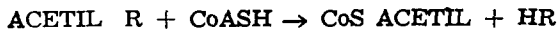
El otro es el de las acetocinasas, que permiten el paso del acetil hacia sustanciasceptoras como el oxaloacético (para formar cítrico), la colina, etc.

Lipmann y col. (24) proponen el siguiente esquema para explicar las funciones de la CoA.

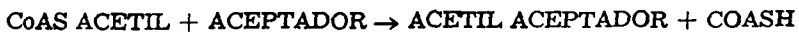


Las funciones de esta coenzima son resumidas por estos mismos autores (24) en la siguiente forma:

- 1) La carga de los grupos SH de la coenzima A con los grupos acetil provenientes de numerosos sistemas dadores de acetil, a los cuales se llama transacetilasas y que catalizan la reacción reversible.



- 2) La función transportadora de la CoA, moviéndose entre la transacetilasa y la acetokinasa, aceptando y dando grupos acetil respectivamente.
- 3) El traspaso de los grupos acetil a enzimas específicas aceptadoras llamadas acetocinasas, que catalizan la reacción.



Recientemente se ha demostrado la necesidad de la presencia del ATP para que se produzca la reacción, lo cual se explica por la necesidad de la presencia de P. rico en energía de la molécula de CoA.

Así vemos cómo el ácido pantoténico, una de las vitaminas del complejo B, forma parte de una de las coenzimas de mayor importancia biológica.

Después de los históricos trabajos de Pasteur (27), en los cuales demostró la necesidad de la presencia de la levadura

y del fósforo para la fermentación, es necesario recordar también los célebres trabajos de los Buchner (28) al demostrar la acción fermentativa del jugo prensado de levadura, y posteriormente los de Harden y Young en 1904 al demostrar que este mismo jugo se podía dividir en: "apozimasa" (no dializable) y "cozimasa" (dializable), que después se llamaron coenzimas y apoenzimas, respectivamente, ninguna de las cuales tiene acción por separado. Abre un gran capítulo de la bioquímica el célebre descubrimiento de O. Meyerhoff (29) al demostrar que extractos tisulares, tales como los obtenidos de músculos de rana, riñón, cerebro y aun otros tejidos de mamíferos, pueden provocar la fermentación cuando se mezclan con la apoenzima de la levadura; lo cual quiere decir, con toda probabilidad, que estos extractos tisulares contienen una sustancia idéntica a la coenzima de levadura.

Von Euler y Myrbäck (30) fueron los que le dieron el nombre de cosimasa, que luego se transformó en "coenzima", puesto que actúa en conjunto con la zimasa fermentativa productora del alcohol.

En 1911, Neuberg y col. (25) encontraron en la levadura una enzima capaz de provocar la decarboxilación del ácido pirúvico; poco tiempo después observaron que era capaz de provocar el mismo efecto ante diversos cetoácidos, por lo cual le dieron el nombre de carboxilasa.

Fué sólo en 1937 que Lohman y Shuster (25) encontraron que la porción termoestable (coenzima) de esta misma era el pirofosfato de tiamina. Ya Pi Suñer (26) había observado un aumento de ácido pirúvico en la sangre de animales con carencia de tiamina.

Sin embargo, la carboxilasa sólo se ha encontrado en el reino vegetal, pues nunca se ha logrado aislar de tejidos animales. El descubrimiento del ácido tióctico en el hígado y la sugerencia de Calvin de que este ácido actúe conjuntamente con la tiamina parece aclarar, hasta cierto punto, el mecanismo de acción de esta última, que tan oscuro ha estado en el metabolismo general; aun cuando ya se sabía que en los animales privados de tiamina el metabolismo de la glucosa no puede pasar del estadio de ácido pirúvico.

A pesar de todo, este mecanismo de decarboxilación oxidativa del ácido pirúvico y también de otros cetoácidos no se ha aclarado del todo. Se pensó que se trataba de un meca-

nismo de transporte de hidrógeno, ya que sería lógico pensar que la tiamina actuaría en esta forma, por una reducción reversible del N. cuaternario del anillo tiazólico o por su transformación en un derivado de función tiólica, abriéndose el anillo tiazólico. Ambas eventualidades son imposibles de efectuar *in vivo*, ya que dan lugar a compuestos totalmente inactivos o bien porque se efectúan en forma demasiado lenta para actuar en cadena enzimática.

Que esta cocarboxilasa actúa también en la recarboxilación del pirúvico ha sido discutido. Sin embargo, en el animal carente de tiamina, el tejido nervioso necesita a la vez de pirofosfato de tiamina y de un ácido carboxílico de cuatro carbonos.

Dada la importancia del ciclo de Krebs, podemos decir que quizás el papel principal de la tiamina, además del de producir una molécula de  $\text{CO}_2$  procedente del pirúvico, consiste en la producción de radicales de dos carbonos que permiten la formación del ácido oxaloacético y, por tanto, alimentan el ciclo de Krebs. Ya hemos visto algo de esto cuando estudiamos la hipótesis de Calvin.

Por todas estas razones, la acción decarboxilante de la tiamina tiene influencia en casi todo el metabolismo intermedio, ya que muchas reacciones están acopladas con esta reacción (entre otras, el ciclo de Krebs).

La energía liberada por la separación del  $\text{CO}_2$  del ácido pirúvico puede ser utilizada en la síntesis del ATP, de cuyo papel en los transportes de energía no podemos ocuparnos aquí, pero que puede considerarse como uno de los grandes descubrimientos de la bioquímica del cuarto decenio del siglo veinte. Por tanto, la tiamina, como coenzima, tiene una acción indirecta en todas las reacciones energéticas de fosforilización (paso de glúcidos a lípidos, síntesis de acetilcolina, síntesis del glucógeno, contracción muscular, etc.).

De enorme interés también, y al mismo tiempo bastante bien estudiadas, son las coenzimas que contienen ácido nicotínico.

Son tan conocidos los trabajos sobre estas coenzimas que no nos detendremos mucho en su estudio. La coenzima I (CoI) fué aislada por Warburg y Christian (31) de los glóbulos rojos, encontrando que estaba compuesta por una molécula de ácido adenílico y una molécula de un ribonucleótido de la

nicotinamida; puede formarse por la acción de una enzima que une el ribonucleótido de la nicotinamida con el ATP (ácido adenil trifosfórico). La coenzima II (CoII) se forma por la adición a la CoI de una molécula de fosfato proveniente del ATP.

El mecanismo íntimo de acción de estas coenzimas (como miembros de la cadena de óxido-reducción biológica) se debe a la capacidad de reducirse y oxidarse (por pérdida de 2H) que tiene el anillo piridínico.

En términos generales, estas coenzimas actúan como transportadores de H., recibiendo sus 2H del sistema ácido láctico  $\rightleftharpoons$  dehidrogenasa del ácido láctico.

Estos 2H pasan luego al citocromo c, si se añade al sistema una citocromo-oxidasa; es decir que las coenzimas del ácido nicotínico están situadas (en la cadena de óxido-reducción) antes de las flavoproteínas. Todo esto nos indica que estos nucleótidos de la piridina actúan como transportadores de H. entre diversas dehidrogenasas.

Estas dehidrogenasas son sumamente específicas, es decir, que aquellas en cuya reacción interviene una de las coenzimas no puede intervenir la otra por más que su similitud de composición sea muy estrecha. Por esta razón es que las diversas dehidrogenasas que reaccionan con ellas pueden ser divididas en "CoI y CoII específicas".

Sin embargo, la gran cantidad de reacciones en las cuales intervienen estas dos coenzimas indica la gran importancia que tienen estos "nucleótidos de la piridina" en el metabolismo. Nos limitaremos a señalar algunas de las más importantes, indicando su especificidad para cada una de las dos coenzimas, sin entrar en detalles que nos obligarían a estudiar detenidamente casi todo el metabolismo general.

ACIDO LACTICO $\rightleftharpoons$ ACIDO PIRUVICO	LACTICODEHIDRASA - CODEHIDRASA I
ACIDO MALICO $\rightleftharpoons$ ACIDO OXALACETICO	MALICODEHIDRASA - CODEHIDRASA I
FOSFOGLICERALDEHIDO $\rightleftharpoons$ ACIDO DIFOSFOGLICERICO	TRIOSAFOSFATO DEHIDRASA - CODEHIDRASA I
GLUCOSA $\rightleftharpoons$ ACIDO GLUCONICO	GLUCOSA DEHIDRASA - CODEHIDRASA I o II
ACIDO ISOCITRICO $\rightleftharpoons$ ACIDO OXALOSUCCINICO	ISOCITRICODEHIDRASA -
(DECARBOXILADO EN EL ACIDO $\alpha$ CETOGLUTARICO)	CODEHIDRASA II
ACIDO GLUTAMICO $\rightleftharpoons$ ACIDO $\alpha$ - CETOGLUTARICO (+ NH <sub>3</sub> )	GLUTAMODEHIDRASA - CODEHIDRASA I o II
ACIDO $\beta$ - HIDROXIBUTIRICO $\rightleftharpoons$ ACIDO ACETILACETICO	HIDROXIBUTIRICODEHIDRASA - CODEHIDRASA I

Esta pequeña enumeración nos indica la influencia de estos derivados del ácido nicotínico sobre las diversas fases del metabolismo. Probablemente, los otros efectos encontrados, sobre los cuales ejercen acción, son solamente secundarios a éstos,

que deben ser considerados como principales. De las relaciones entre el triptófano y el ácido nicotínico no podemos ocuparnos aquí debido a la amplitud del tema que estamos tratando; sin embargo, diremos que es posible que las acciones de esta vitamina en la hematopoyesis y en el tratamiento de cierto tipo de anemias podrían ser explicadas por sus relaciones íntimas con el triptófano (32). Es sabido que la transformación del triptófano en ácido nicotínico es controlada por la piridoxina, pero de este efecto nos ocuparemos más adelante y sólo hemos querido hacer mención de este hecho para resaltar la íntima relación de todas estas coenzimas de orden vitamínico, tanto en la bioquímica pura como en la terapéutica clínica.

Ya hace algún tiempo publicamos algunas observaciones con respecto a este tema (33), de tal manera que tampoco nos detendremos mucho en la revisión de los derivados de la riboflavina, que con el nombre de flavoproteínas desempeñan un importantísimo papel como coenzimas de diversos mecanismos metabólicos de óxido-reducción. Nos limitaremos a señalar que se debe a los estudios de Warburg (34) el aislamiento del llamado, por el mismo autor, "fermento amarillo". Kuhn y colaboradores (35) y Karrer y colaboradores (36), casi simultáneamente, lograron demostrar la presencia de derivados de la aloxazina en su constitución; se demostró posteriormente que esto se debía a la presencia de la riboflavina que había sido aislada por el mismo Kuhn de lo que para aquella época se pensaba que era el complejo B<sub>2</sub> (37).

En general, las flavoproteínas son de dos tipos: en el primero de ellas la coenzima consiste solamente de un mononucleótido de la flavina, mientras que en el otro es un dinucleótido de la adenina y de la flavina.

El mononucleótido se forma por la acción de una enzima recientemente descubierta, denominada "flavokinasa", que actúa sobre el ATP y la riboflavina; mientras que los otros flavonucleótidos son formados por la unión de este mononucleótido con el ATP, con pérdida de un radical fosfórico.

Estas flavoproteínas actúan por la facilidad que tiene el núcleo de la aloxazina de oxidarse y reducirse.

En general, estas coenzimas sirven de transportadores del H. entre el substrato y una oxidasa, la cual, a su vez, trae el O. molecular "activado" que va a servir como aceptador del H. Quizás las más importantes de las flavoproteínas sirven como

transportadoras de H. entre los substratos reducidos y el citocromo *c*. Sin embargo, hay que hacer notar que solamente una de estas flavoproteínas se sabe exactamente que puede reaccionar directamente con el citocromo *c* y, por tanto, como dice Baldwin (38), nuestro conocimiento de los mecanismos de respiración celular no está todavía completo.

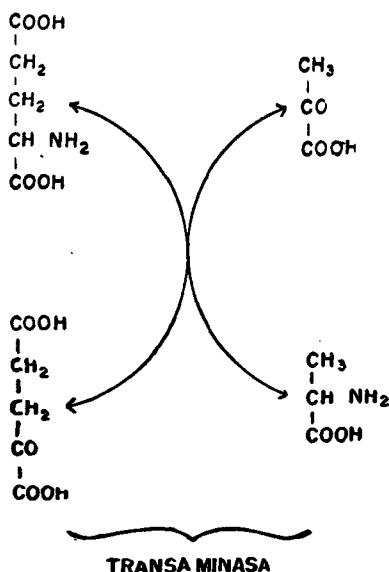
Los principales substratos reducidos, con los cuales van a reaccionar estas flavoproteínas para servir de transportadores de H. entre ellos y los citocromos, son las CoI y CoII; por eso pueden clasificarse como CoI y CoII específicas. En este grupo entran las llamadas diaforasas: la diaforasa I, que sirve de intermedio entre la CoI y los citocromos *a* y *b*, cuyo sistema se ha encontrado principalmente en las células del pulmón, bazo, nervios, testículos, glándulas salivares, tejidos embrionarios y tumorales; y la diaforasa II, que sirve de intermedio entre la CoII y el citocromo *c*. Sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en que estas diaforasas actúan directamente entre las coenzimas I y II y los citocromos, ya que Slater ha encontrado un "factor" que permite la reacción entre la diaforasa I y el citocromo *c* directamente (38).

Otras de las flavoproteínas intervienen en el catabolismo de los aminoácidos; así, la D-aminoácidoxidasas, que cataliza la desaminación de los D-aminoácidos, cuyo papel biológico no está muy claro, y la L-aminooxidasas, que cataliza la desaminación de los L-aminoácidos. La xantonooxidasas es sumamente específica aun entre las bases púricas, y sirve para catalizar el paso de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico.

Todo este corto resumen nos da una idea general de la importancia de la riboflavina y sus derivados en el metabolismo general.

En orden de ideas nos corresponde estudiar el papel de la piridoxina en el metabolismo. Hemos visto que varias de las flavoproteínas provocan la desaminación de algunos aminoácidos. Recientemente se ha estudiado, con mucha intensidad, un mecanismo de transferencia de NH<sub>2</sub>, que es de una importancia capital en el metabolismo proteico, pues parece permitir la interconversión y la síntesis de casi todos los aminoácidos. Hasta el momento actual, se han estudiado alrededor de 22 aminoácidos en este sentido. Estos aminoácidos sufren primero desaminación (como la producida por las de-

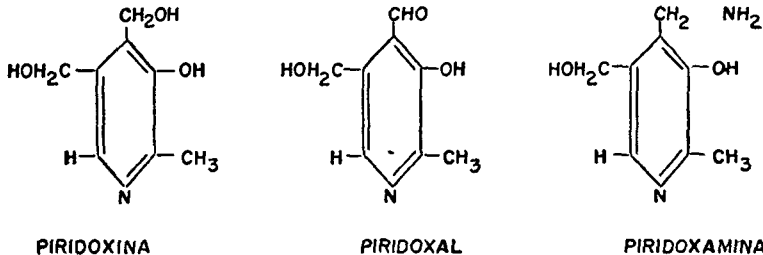
aminasas del tipo de las flavoproteínas) y su  $\text{NH}_2$  pasa a otro resto metabólico, tal como los producidos en el curso del metabolismo glúcido, formándose un nuevo aminoácido. Los principales agentes en esta serie de reacciones son: el ácido alfa-ceto-glutárico, un aminoácido cualquiera y una enzima (a la cual se denomina actualmente transaminasa y no aminoforasa como anteriormente); la coenzima de esta transaminasa es el fosfato de piridoxal, que parece ser una de las formas activas de la piridoxina. La figura muestra el tipo de esta reacción de transaminación, la cual fué sugerida por primera vez por Braunstein.



La sospecha de que la piridoxina no era el solo agente natural capaz de tener acción de vitamina  $\text{B}_6$  se debió a que ensayos microbiológicos para determinar esta acción vitamínica con *St. faecalis* mostraron valores demasiado altos, lo cual quería decir que debía existir otra substancia o substancias que tenían acción vitamínica.

Posteriormente se vió que estas substancias aparecían en la orina, así como también se observó que la piridoxina, en sí, no era el factor limitante del crecimiento bacteriano. Se observó que estos factores aparecían cuando se autoclavizaba la piridoxina con el cultivo, lo cual llevó a los autores a uti-

lizar otros métodos para transformar la piridoxina en compuestos más activos. Se obtuvieron dos sustancias, una con un radical aldehído, al cual se le dió el nombre de piridoxal, y otra con radical amina, al cual se denominó piridoxamina (39), los cuales eran muy activos para el crecimiento de bacterias y animales.



Posteriormente se demostró que tanto la forma amina como la forma aldehídica podían formar parte de las coenzimas de las decarboxilasas; asimismo se vió que sólo podían actuar cuando estaban fosforiladas en la posición 5. De tal manera que estas dos formas de la piridoxina son coenzimas de decarboxilación de diversos aminoácidos (40, 41).

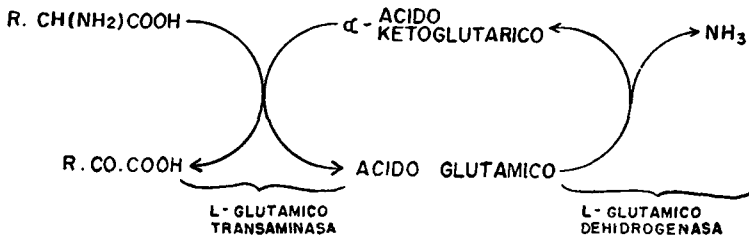
Al mismo tiempo, estas mismas sustancias sirven como factores de crecimiento de muchas bacterias productoras de ácido láctico, en cuyo caso son más activas que la piridoxina sola, como hemos visto anteriormente.

El hecho de que las bacterias productoras de ácido láctico que se utilizaron para el aislamiento de las formas activas de la piridoxina podían crecer en presencia de D-alanina hizo pensar que este aminoácido podía servir como precursor de la vitamina (42). Sin embargo, estas bacterias no producían decarboxilación de la tirosina ni provocaban transaminación a menos que se les añadiera pequeñas cantidades de fosfato de piridoxal (43), lo que hacía imposible esa afirmación. Posteriormente se demostró que la D-alanina era un metabolito esencial para el crecimiento de este tipo de bacterias y que la B<sub>6</sub> era necesaria para su síntesis, ya que esta coenzima permitía el paso de la L-alanina a D-alanina, la cual era necesaria para el crecimiento bacteriano (39), es decir, provocaba un fenómeno de racemización.

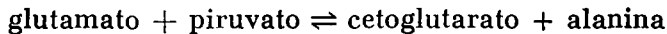
La presencia del fosfato de piridoxal como coenzima es necesaria para la decarboxilación de: arginina, ornitina, lisina,

histidina, fenilalanina, dehidroxifenilalanina y del ácido glutámico. Este mecanismo es de una importancia metabólica capital, ya que al provocar estas decarboxilaciones aparecen aminas de una gran acción farmacodinámica, las "biogenen amine" de Guggenheim.

Al mezclar en autoclave el piridoxal con un medio que contenía aminoácidos se vió que se transformaba en una sustancia idéntica a la piridoxamina (44), especialmente con el ácido glutámico, de tal manera que:



- A) piridoxal + glutamato  $\rightleftharpoons$  piridoxamina + cetoglutarato, y que el pirúvico, mezclado con la piridoxamina, regeneraba el piridoxal + alanina.
- B) piridoxamina + piruvato  $\rightleftharpoons$  piridoxal + alanina, de tal manera que si se suman las dos reacciones se obtiene una verdadera transdeaminación, pudiendo escribirse la reacción:



la cual es una verdadera transdeaminación catalizada con la  $B_6$  como coenzima.

Estas experiencias quedan perfectamente demostradas con los cultivos bacterianos. Si a estos cultivos se les administran todos los L-aminoácidos y la D-alanina, crecen bien sin necesidad de  $B_6$ . Si a este tipo de cultivo se le suprime uno de los aminoácidos y se le sustituye por el cetoácido correspondiente, no hay crecimiento sino cuando se suplementa con  $B_6$ . Lo cual demuestra que esta vitamina es necesaria para la transformación del cetoácido en el aminoácido correspondiente y que esta transformación se hace por transaminación (39). Los únicos aminoácidos que no sufren transaminación por adición de  $B_6$  son la serina y la cisteína. La primera libera  $NH_3$  y ácido

pirúvico, mientras que la segunda libera  $H_2S$ ,  $NH_3$  y ácido pirúvico. Posteriormente se demostró que en la constitución de la dehidrasa de una mutante del *E. coli* entra el fosfato de piridoxal (46) y que la desulfurasa de la cisteína tiene al fosfato de piridoxal como coenzima (47).

Por tanto, las funciones de la  $B_6$  como coenzima pueden resumirse en: decarboxilación, transaminación, racemización, deshidratación de la serina, desulfidrización de la cisteína y probablemente entra en los mecanismos de síntesis de aminoácidos no esenciales.

Otra de las vitaminas que desempeñan un papel importante en la enzimología es el ácido paraaminobenzoico.

La importancia biológica del ácido para-aminobenzoico proviene de las investigaciones de Woods (48) al demostrar la inhibición ejercida por esta sustancia sobre la acción bacteriostática de las sulfonamidas. Estos trabajos de Woods son de una importancia capital no solamente para la bioquímica, sino también para la farmacología general, ya que de ellos se desprende toda la teoría moderna del mecanismo de acción de las drogas por inhibición por competencia, ya que la acción de numerosísimas drogas, y aun de metabolitos, se debe a la sustitución, en las cadenas metabólicas, de estas sustancias por metabolitos de constitución química similar, pero que no pueden ejercer el mismo efecto, impidiendo, por tanto, la acción de aquéllos.

Estos trabajos tuvieron como consecuencia directa el atribuir al APB una función en el metabolismo bacteriano, función que ha sido confirmada para gran número de microbios.

Es muy probable que la principal, si no la única, acción del ácido paraaminobenzoico sea la de formar parte en la constitución química del ácido fólico y de sustancias relacionadas con él, las cuales son eminentemente metabolitos esenciales no sólo para los microorganismos, sino que su necesidad es probablemente universal para las células. Por tanto, por lo menos para gran número de microorganismos, es casi seguro que esta síntesis del ácido fólico por el APB sea la función más importante de esta vitamina. Así, trabajos recientes han demostrado que la inhibición del crecimiento bacteriano, producido por las sulfonamidas, se debe a una inhibición del ácido fólico. Las cepas bacterianas incapaces de sintetizar ácido fólico y que, por tanto, lo necesitan prefer-

mado, son insensibles a las sulfonamidas; mientras que las que necesitan de él y pueden sintetizarlo son sensibles, pero esta sensibilidad desaparece cuando se les administra el ácido fólico o el para-aminobenzoico.

Sin embargo, estas relaciones entre las dos vitaminas no son tan sencillas y claras como parecen; por ejemplo, los síndromes de carencia de ambos son diferentes en los mamíferos; es muy posible que esto se deba a ciertas diferencias entre ambas sustancias en su acción formadora de coenzimas, ya que, como afirma Woods (49), no está del todo claro el conocimiento de las coenzimas que contienen ácido fólico.

Hemos visto durante el estudio de la coenzima A que esta substancia permite el movimiento metabólico del acetyl, es decir, de una molécula orgánica que posee dos carbonos. El ácido fólico y, por tanto, también el PAB tienen como función primordial el movimiento metabólico de residuos que contienen un solo C.; así, Shive y sus colaboradores (50) fueron los primeros en lanzar esta hipótesis, en conexión con el posible papel enzimático del ácido fólico en la síntesis de las purinas.

Actualmente se admite, después de estos trabajos de Shive, que el ácido fólico actúa como coenzima en la síntesis de la timina, que es una base pirimídica constituyente esencial de los ácidos nucleicos y que, según Aschkenazy (51), permitiría, por tanto, la síntesis de constituyentes esenciales del eritrocito. Asimismo, el ácido folínico, que veremos inmediatamente, participa también en la interconversión de la timina en timidina y de los desoxiribósidos de muchas otras bases nucleicas, tales como la citosina, guanina, adenina e hipoxantina (52), que son constituyentes esenciales de los desoxinucleótidos.

Siempre que el ácido fólico actúa como coenzima en una reacción bioquímica, se encuentra como transportador de una unidad de monocarbono. Así, se ha demostrado su papel como catalizador en el paso de glicina a serina, de homocisteína a metionina, y en la misma formación de las bases púricas. Sin embargo, existen otras reacciones en las cuales no se conoce muy bien su papel. Hay evidencia cierta de que este ácido fólico no solamente es un transportador pasivo de las unidades de carbono, sino que también debe ser un activador del sustrato. Es posible que active el grupo metilo tanto de la colina como de la metionina en las reacciones de transmeti-

lación. Sin embargo, hay que hacer notar que la constitución química de la coenzima de la cual forma parte el ácido fólico no está clara todavía.

Por otra parte, desde 1948, Sauberlich y Baumann (53) encontraron que el *leuconostoc citrovorum* no crecía en un medio en el cual existían todos los aminoácidos necesarios y vitaminas conocidas, pero que la adición al medio de pequeñas cantidades de extracto hepático o de levadura permitía un crecimiento perfecto. Posteriormente vieron que este mismo microorganismo podía crecer bien si se le administraban grandes dosis de ácido fólico o cantidades normales de timidina. Este hecho trajo como consecuencia la definición de un nuevo agente de crecimiento, al cual se le dió el nombre, por los mismos autores, de "*factor citrovorum*". Evidentemente, este nuevo agente no era el ácido fólico, debido a que solamente podía ser sustituido por éste cuando se administraban cantidades sumamente elevadas de él.

Sin embargo, el mismo Sauberlich (54) observó que las ratas alimentadas con una dieta carente en ácido fólico excretaban muy pequeñas cantidades de *F. citrovorum* en la orina, pero que cuando se suplementaba la dieta con ácido fólico la excreción de *F. citrovorum* aumentaba enormemente. Esta observación y la de Stockstad y Jukes (55) señalaron que químicamente debían ser muy parecidos.

Por otra parte, Shive y col. (56) habían observado que existía una forma natural del ácido fólico que era mucho más activa que éste para la inhibición contra los antifólicos. A esta sustancia se le dió el nombre de "ácido folínico". La identidad de la acción sobre el crecimiento del *F. citrovorum* indicó que probablemente sería idéntico al CF, lo cual fué demostrado posteriormente.

Asimismo, Gordon y col. (57) habían preparado una forma de ácido fólico con un grupo formil en la posición 10, el cual poseía las mismas propiedades, tanto del folínico como del *citrovorum*. Posteriormente, fué demostrado que esos productos eran idénticos al sintético, es decir, que eran el ácido formilpteroil-glutámico, o sea el formil - ácido fólico.

Todas estas relaciones tanto químicas como microbiológicas indican la íntima relación entre esta sustancia y el ácido fólico. Desde el punto de vista bioquímico se piensa actualmente que antes de que el ácido fólico pueda ejercer sus fun-

ciones catalíticas, las células deben transformarlo en CF, y que este CF es la forma activa del fólico o está relacionada muy íntimamente con él. Welch y Nichol (58) han presentado evidencia de una enzima existente en el hígado que transforma el fólico en CF; parece ser que la presencia de ácido ascórbico es necesaria para este paso metabólico, lo cual aclararía una de las funciones de esta vitamina C que tan oscuras están aún.

Según Jukes (58), el ácido ascórbico serviría para catalizar el paso de ácido fólico a su forma 5, 6, 7, 8 tetrahidro fólica, la cual pasaría a factor citrovorum por la adición de un grupo formil que provendría del ácido fórmico o de la serina.

El reconocimiento de que el CF es una forma activa del fólico con un radical formil es de un enorme interés para la bioquímica, ya que sirve de apoyo a la idea de que el mecanismo de acción de estos derivados del ácido pteroil-glutámico es en el traspaso de radicales de un solo C.

Con respecto a la vitamina B<sub>12</sub>, la observación de Jukes (58) de que desde los trabajos iniciales de Minot y Murphy sobre el principio anti-anemia perniciosa, de que uno (el hígado crudo) era efectivo por boca y otro (el extracto inyectable) era efectivo por vía parenteral, se estaba trabajando ya con ácido fólico (efectivo por vía oral) y con B<sub>12</sub> (efectivo por vía parenteral), hace pensar que estos dos principios están íntimamente relacionados.

Asimismo, toda la evidencia actual permite afirmar que con toda probabilidad esta vitamina tiene relación directa con el metabolismo de la unidad de monocarbono. Tanto la vitamina B<sub>12</sub> como el ácido fólico son necesarios para el crecimiento animal con dietas carentes en metionina. Según Jukes (58), las gallinas sometidas a dietas carentes en B<sub>12</sub> muestran aumento del crecimiento cuando se les administra metionina, pero no cuando se les administra homocisteína, lo que quiere decir que la vitamina B<sub>12</sub> debe desempeñar cierto papel de importancia en el traspaso del grupo metilo de la metionina.

Por otra parte, Shive (59) afirma que la vitamina B<sub>12</sub> desempeña probablemente un papel en la formación de coenzimas del ácido paraaminobenzoico, o quizás su función más importante sea la de introducir unidades de monocarbono en la biosíntesis de la metionina, en la biosíntesis de las purinas, en la interconversión de la glicina en serina y en la biosíntesis de la timina.

Según el mismo autor, la B<sub>12</sub> está relacionada más bien con la biosíntesis de la porción del desoxirribósido de la timidina y el ácido fólico con la del de la timina.

Como podemos ver, parece estar claro que tanto el ácido paraaminobenzoico, el pteroilglutámico y las cobalaminas (B<sub>12</sub>), y, por tanto, sus coenzimas intervienen en el intercambio metabólico de las unidades de un solo carbono, pero de ninguna manera se ha dicho todavía la última palabra. Este problema del intercambio de unidades de un solo carbono es de un gran interés y uno de los problemas de mayor importancia de la bioquímica actual.

### RESUMEN

El autor estudia el papel de una serie de vitaminas en el curso del metabolismo general. Observa que numerosas vitaminas deben considerarse como partes de coenzimas de reacciones cadenas enzimáticas del metabolismo general (prótido, lípido y glúcido). Pasa revista a la acción como coenzima de nuevos factores recientemente aislados.

### SUMMARY

The author reviews the role of several of the vitamins during the course of general metabolism. Pays attention to the fact that many of the vitamins should be considered as part of coenzymes in enzymatic chains of general metabolism (proteic, lipid and glucidic). Reviews the action as coenzymes of new factors recently isolated.

### ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser gibt eine Übersicht über die Bedeutung einiger Vitamine im allgemeinen Stoffwechsel. Es wird besonders auf die Rolle einiger Vitamine in der Bildung von Coenzymen eingegangen die in Reaktionen des Zwischenstoffwechsels (Eiweiss, Fett, Kohlehydrate) wichtig sind. Auch wird die auf die Beziehungen zwischen einigen neueren Faktoren und Coenzymen eingegangen.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Calvin, M., y A. Benson.—*Science* 107, 476 (1948).
- (2) Burk, D.; S. Hendricks, M. Korzenovsky, V. Schocken y O. Warburg.—*Science* 110, 225 (1949).
- (3) Calvin, M., y P. Massini.—*Experientia* 8, 445 (1952).
- (4) Szent György A.—*On Oxidation, Fermentation, Vitamins Health and Disease*.—Williams and Wilkins Co., Baltimore (1939).
- (5) Calvin, M., y P. Massini.—*Loc. cit.*
- (6) Jukes, T. H.—*Conferencia dictada en el I. N. de N. Caracas, febrero 1953.*
- (7) Patterson, E. L.; J. A. Brockman, F. P. Day, J. V. Pierce, M. E. Macchi, C. I. D. Fong, E. I. R. Stockstad y T. H. Jukes.—*Jour. Chem. Soc.* 73, 5.919 (1951).
- (8) Bullock, M. W.; J. A. Brockman, E. L. Patterson, J. V. Pierce y E. L. R. Stockstad.—*Jour. Am. Chem. Soc.* 74, 3.455 (1952).
- (9) Brockman, J. A.; E. L. Stockstad, E. L. Patterson, J. V. Pierce, M. Macchi y F. P. Day.—*Jour. Am. Chem. Soc.* 74, 1.868 (1952).
- (10) Kidder, W., y V. Dewey.—*Biol Bull.* 87, 121 (1944).
- (11) Reed, L. J., y col.—*Science* 114, 93 (1951).
- (12) Ochoa, S.—*Enzymatic Synthesis of citric acid and another reactions of the tricarboxylic acid cycle*.—II Congrès International de Biochimie, Paris (1952).
- (13) Krebs, H. A.—*Place of Tricarboxylic Acid in cell Metabolism*.—II Congrès International de Biochimie, Paris (1952).
- (14) George y Cain, citado por Jukes (6).
- (15) Nachmanson, K., y L. Machado.—*J. Neurophysiol.* 6, 397 (1943).
- (16) Lipmann, F.—*J. Biol. Chem.* 160, 173 (1945).
- (17) Soodak, M., y F. Lipmann.—*J. Biol. Chem.* 191, 377 (1951).
- (18) Lipmann, F.—*Harvey Lectures*, 44, 99 (1950).
- (19) Novelli, G. D., y F. Lipmann.—*Jour. Biol. Chem.* 171, 833 (1947).
- (20) Stern, J. R., y Ochoa, S.—*Jour. Biol. Chem.* 179, 491 (1949).
- (21) Lipmann, F.; A. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle y P. M. Guirard.—*J. Biol. Chem.* 186, 235 (1950).
- (22) Snell, E. G.; G. M. Brown, V. J. Peters, J. A. Craig, E. L. Wittle, J. E. Moore, V. M. Mc. Glohon y O. D. Bird.—*J. Am. Chem. Soc.* 72, 7.349 (1950).
- (23) Lynen, F.; E. Rischert y L. Rueff.—*Liebig Ann.* 547, 1 (1951).
- (24) Lipmann, F.; M. E. Jours y G. Black.—II Congrès International de Biochimie.—*Symposio sobre el ciclo tricarboxilico*. Paris, 1952.

- (25) Lohman y Shuster.—*Biochem. Z.* 294, 188 (1937).
- (26) Pi Suñer, A.—Las anomalías del metabolismo glúcido.
- (27) Valeri Radot, R.—*La vie de Pasteur.*
- (28) Buchner.—*Ber. Chem. Ges.* 35, 2.376 (1902).
- (29) Meyerhof, O.—*Phys. Chem.* 101, 165 (1917).
- (30) Von Euler y Myrbäck. — *Z. Physiol. Chem.* 177, 237 (1928).
- (31) Warburg y Christian.—*Biochem. Z.* 254, 438 (1932).
- (32) Aschkenazy, A.—Donnés actuelles sur le role des proteines dans la formation de cellules sanguines en symposium sur l'hématopoïèse. II Congrès International de Biochimie, Paris (1952).
- (33) Planchart, A.—*Acta Cient. Ven.* 2, 189 (1951).
- (34) Warburg, O., y Christian.—*Naturwis* 20, 688 (1932).
- (35) Kuhn, R., y col.—*Ber. Chem. Ges.* 66, 1.765 (1932).
- (36) Karrer, P., y col.—*Helv. Chem. Acta* 18, 426 (1935).
- (37) Kuhn, P.—*Ber. Chem. Ges.* 68, 1.765 (1953).
- (38) Baldwin, E.—*Dynamic Aspects of Bioch.*, Cambridge Univ. Press, 2nd. Ed. 1952.
- (39) Snell, E. E.—Congrès de Biochimie, Paris (1952).
- (40) Gales, E. F.—*Advances in Enzymology* 6, 1 (1946).
- (41) Bellamy, W. D., y col.—*J. Biol. Chem.* 160, 461 (1945).
- (42) Snell, E. E., y Guirard, B. M.—*Proc. Natl. Acad. Sc. U. S.* 29, 66, (1943).
- (43) Lichstein, H. C.; I. C. Gunsalus y W. W. Umbreit.—*J. Biol. Chem.* 161, 311 (1945).
- (44) Snell, E. E.—*J. Am. Chem. Soc.* 67, 194 (1945), 559 (1951).
- (45) Holden, J. T.; Wildman, R. B., y Snell, E. E.—*J. Biol. Chem.* 191, 559 (1951).
- (46) Metzler, D. E., y E. Snell.—*Fed. Proc.* 11, 258 (1952).
- (47) Kallio, R. E.—*Bact. Proc.*, citado por Snell E. E., Congrès Biochimie. Paris, 1952.
- (48) Woods, D. D.—*Ann. N. Y. Acad. Sc.* 52, 1.199 (1950).
- (49) Woods, D. D.—The functions of folic acid and related growth factors in the metabolism of microorganisms. II Congrès International de Biochimie, Paris (1952).
- (50) Shive, W.—*Ann. N. Y. Acad. Sc.* 52, 1.212 (1950).
- (51) Aschkenazy, A.—II Congrès International Biochimie, Paris (1952).
- (53) Sauberlich, H. E., y C. A. Bauman M.—*J. Biol. Chem.* 176, 165 (1948).
- (54) Sauberlich, H. E.—*J. Biol. Chem.* 181, 467 (1949).
- (55) Broquist, H. P.; Stockstad, E. L. R., y Jukes, T. H.—*J. Biol. Chem.* 185, 399 (1950).
- (56) Bond, T. J., y col.—*J. Am. Chem. Soc.* 61, 3.852 (1949).
- (57) Gordon, M., y col.—*J. Am. Chem. Soc.* 70, 878 (1949).
- (58) Jukes, T. H.—*Fed. Proc.* 12, 626 (1953).
- (59) Shive, W.—*Fed. Proc.* 12, 639 (1953).