

## Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos

Zahaed Evangelista-Martínez\* y Angélica Moreno-Enríquez.

*Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.*

*México D.F. 04510. E-mail: zahaedem@yahoo.com*

**Palabras clave:** Actinomicetos, metabolitos secundarios, productos bacterianos naturales.

### RESUMEN

El advenimiento de la moderna biotecnología abrió por completo nuevas perspectivas para el uso de microorganismos como generadores de productos farmacéuticos. A la vista de la inmensa variedad de grupos de genes biosintéticos de productos naturales que ahora son accesibles a través de la secuenciación de alto rendimiento, es deseable establecer tecnologías eficientes de modificación, transferencia y expresión. Los métodos que la ingeniería genética provee pueden ser utilizados para la producción de productos naturales derivados de microorganismos de lento crecimiento o incluso de aquellos que no se pueden cultivar. Estos métodos pueden modificar genes biosintéticos o insertar genes específicos dentro del ADN de una cepa productora de antibióticos para obtener metabolitos secundarios modificados. Aunado a lo anterior, nuevos metabolitos se pueden obtener por combinar al azar los genes de dos o más grupos de genes que tienen influencia en rutas biosintéticas similares. El presente artículo describe brevemente diferentes clases de sustancias médicamente útiles producidas por actinomicetos con aplicaciones farmacológicas. Además, se mencionan los efectos de algunos compuestos sobre diferentes organismos y la bacteria que lo produce.

**Key words:** Actinomycetes, secondary metabolites, bacterial natural products.

### ABSTRACT

The advent of modern biotechnology opened totally new perspectives for the use of microorganisms as producers of pharmaceutical products. In light of the immense variety of natural product biosynthetic gene clusters that are becoming accessible through high-throughput sequencing, it is highly desirable to establish efficient modification, transfer and expression technologies. The methods provided by the genetic engineering can be used for the production of natural products derived from slow-growing or even uncultured microorganisms. These methods could alter biosynthetic genes or insert selected genes into the DNA of an antibiotic-producing strain for obtaining modified secondary metabolites. Moreover, a number of new metabolites could be obtained by randomly combining the genes of two or more gene clusters governing similar biosynthetic pathways. The present article briefly describe the various classes of medically useful substances produced by actinomycetes with pharmacological applications. Furthermore, specifications are given on the effects of some compounds on different organisms and the bacteria producer.

### INTRODUCCIÓN

Los microorganismos viven en ambientes naturales, donde su crecimiento es afectado tanto por interacciones con otras poblaciones (sinérgicas, antagónicas, etc.) como por las características físicas y químicas de su entorno. Como consecuencia de esas interacciones, se producen metabolitos secundarios con actividades biológicas

variadas, que juegan un papel importante en su sobrevivencia.

En contraste a los metabolitos secundarios producidos por las plantas, cuyo uso contra enfermedades tiene sus raíces en la medicina tradicional, los compuestos de importancia farmacéutica obtenidos de microorganismos son el resultado de intensas investigaciones de la naturaleza como fuente de compuestos bioactivos llevados a cabo por un gran número de laboratorios en todo el mundo. La identificación y caracterización biológica y molecular de microorganismos útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, ha sido de gran interés para la medicina y la agricultura moderna. En este contexto se han evaluado microorganismos, se han aislado y caracterizado química y biológicamente sus metabolitos secundarios, y se ha estudiado el papel que estos juegan en el control de enfermedades y en las respuestas de defensa (Martín, 2003; National Research Council (NRC), 2003 [www.item.ba.crr.it/biopesti.htm](http://www.item.ba.crr.it/biopesti.htm).)

Originalmente la búsqueda de compuestos útiles se realizaba siguiendo varios pasos, entre los cuales se pueden mencionar los siguientes: 1) coleccionar sistemáticamente microorganismos del suelo, 2) crecerlos en cultivos axénicos, 3) probar la capacidad de los medios donde crecían los microorganismos para inhibir el crecimiento de organismos patógenos, y 4) recuperar las sustancias activas producidas por los microorganismos.

De esta búsqueda se obtuvo que los actinomicetos eran los organismos que con mayor frecuencia producían compuestos inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas, en particular cerca del 50% de las cepas aisladas de *Streptomyces* presentan algún compuesto activo principalmente contra bacterias Gram-positivas. De tal manera que al inicio de los años sesenta se descubrieron miembros de las principales familias de antibióticos clínicamente útiles. Con excepción

de las penicilinas, cefalosporinas y algunos productos menores, todos eran producidos por los actinomicetos. De manera colectiva su espectro de acción cubría prácticamente todos los patógenos bacterianos importantes ([www.bib.gbf.de/ergebnisbenisberech/1997/english/section-c/c3/c3english.htm](http://www.bib.gbf.de/ergebnisbenisberech/1997/english/section-c/c3/c3english.htm)). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de compuestos aislados, surgió la necesidad de una revisión a fondo de los objetivos y los métodos para buscar compuestos útiles. Esto se dio por el hecho de que el número de antibióticos aislados fue tal que la competencia por descubrir nuevos compuestos se volvió cada vez más frecuente. Sin embargo, considerando la dificultad y costos elevados de aislar nuevas estructuras y agentes antimicrobianos con formas novedosas de actuar, el descubrimiento de nuevos compuestos entró en una fase de decaimiento acelerado (DiMasi *et al.*, 1994), sobretodo si se toma en cuenta que la probabilidad de encontrar en los microorganismos compuestos bioactivos útiles es de 1 por cada 10,000 cultivos examinados por los métodos microbiológicos tradicionales (Clark, 1996).

En este sentido, la búsqueda de compuestos activos comenzó a dar un giro importante, principalmente teniendo como objetivo la búsqueda de compuestos contra hongos, virus o cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

Por lo tanto, la estrategia de búsqueda de metabolitos novedosos se cambió lentamente en muchos laboratorios, tomando en cuenta que menos del 1% de las especies bacterianas y menos del 5% de las especies de hongos son conocidas, y que millones de especies microbianas permanecen desconocidas, por lo que es grande el potencial de los microorganismos como proveedores de compuestos bioactivos útiles (Yung, 1997), algunos de ellos han optado por métodos de búsqueda masiva de microorganismos inusuales o raros (como algunos actinomicetos) u organismos que viven en ambientes marinos peculiares, principalmente en ambientes de temperatura

extrema o de elevadas presiones ([www.febras.ru/vpiboc/english/newpsoe1.htm](http://www.febras.ru/vpiboc/english/newpsoe1.htm); Carte, 1996). Otros grupos han enfocado su investigación a la búsqueda de nuevos sitios blanco de los compuestos ya conocidos, en vez de aislar nuevos organismos productores. El resultado de todo ello ha sido el descubrimiento de agentes antimicrobianos nuevos e importantes, sustancias con actividad antitumoral e inhibidores de enzimas de mamíferos de potencial interés farmacéutico, entre otros compuestos.

Sin embargo, a pesar de contar con un número importante de metabolitos, se requiere de nuevos productos que cubran diferentes necesidades en las áreas médica, agrícola y alimenticia. Por ejemplo, en la medicina se requiere de nuevos productos debido a: 1) el desarrollo de resistencia de microorganismos patógenos, 2) la aparición de nuevas enfermedades (SIDA, virus Hanta, virus del Ébola, enfermedad de Lyme, *Escherichia coli* 0157:H7, entre otras), 3) la existencia de bacterias resistentes naturalmente y 4) la toxicidad de algunos compuestos actualmente en uso (Demain, 1999); en la agricultura se requiere de compuestos útiles para combatir bacterias, virus, insectos y nematodos fitopatógenos; para la nutrición animal se requiere de compuestos que puedan utilizarse para la preservación de alimentos.

Los progresos de la biotecnología moderna han abierto nuevas perspectivas para el uso de microorganismos como productores de metabolitos con aplicaciones farmacéuticas, auxiliándose de la ingeniería genética como herramienta que provee de nuevos métodos para la obtención de metabolitos secundarios modificados que cubran las necesidades actuales.

### **METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS**

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el

crecimiento celular. De hecho, las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido su capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales. Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas. Esta gran variedad de compuestos producidos en la naturaleza se ve reflejada en cerca de los más de 23,000 metabolitos microbianos conocidos, de los cuales el 42% los producen hongos, 32% actinomicetos y el resto producidos por otros grupos de bacterias (Lazzarini *et al.*, 2000).

En el caso de los actinomicetos, es ampliamente reconocida la capacidad que tienen de producir una gama muy variada de metabolitos secundarios (Baltz & Hosted, 1996), algunos de los cuales se describen a continuación y que son relevantes por su uso como fármacos.

#### *1. Antibióticos*

Los metabolitos microbianos más importantes son los antibióticos, sustancias que a bajas concentraciones inhiben el crecimiento de diferentes especies de microorganismos y que ejercen su mayor efecto sobre la salud, nutrición y economía de la sociedad. Un aspecto importante es el gran número de antibióticos existentes, de los aproximadamente 8,000 reportados hasta 1999, 45.6% eran producidos por estreptomicetos, 16% por otros actinomicetos, 16.9% por otras bacterias y 21.5% por hongos (Lazzarini *et al.*, 2000). Otro aspecto importante de los antibióticos se refiere a la variedad de estructuras químicas que presentan, en donde todas las clases de moléculas de la química orgánica están representadas: cadenas alifáticas, anillos aromáticos aislados o condensados, anillos

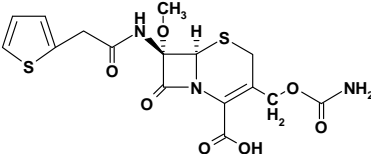
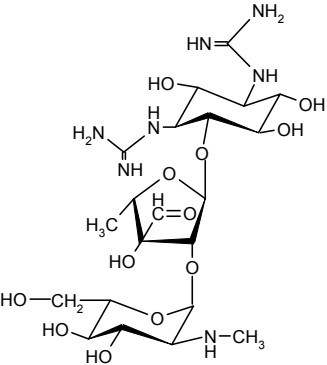
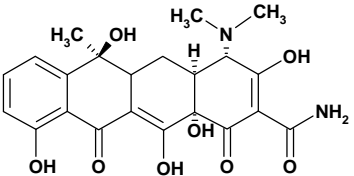
heterocíclicos, oligopéptidos y oligosacáridos entre otros muchos más.

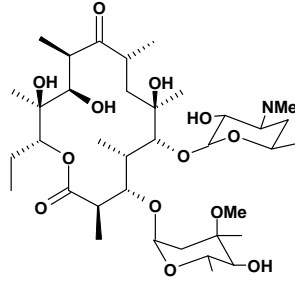
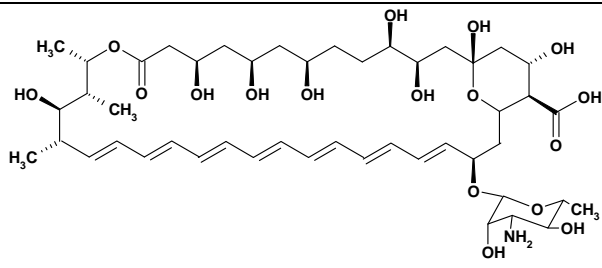
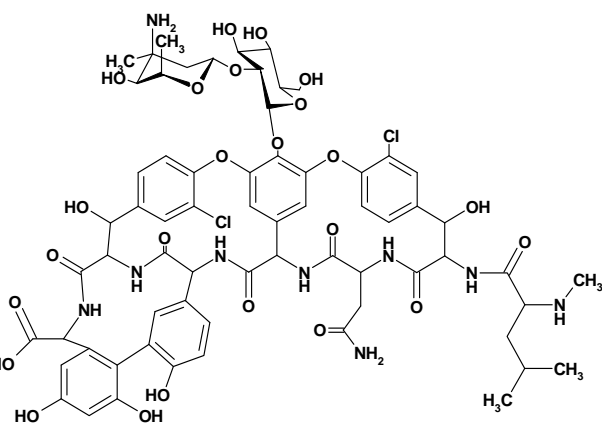
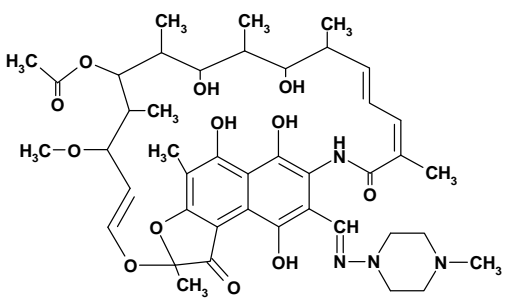
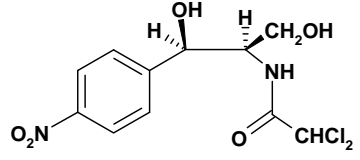
La propiedad que hace que los antibióticos sean considerados como “fármacos maravillosos”, es la selectividad de su mecanismo de acción, que los distingue de germicidas y desinfectantes sintéticos. Su toxicidad selectiva contra algunas clases de organismos, con pocas excepciones, los ha convertido en los compuestos más utilizados para la terapia contra microorganismos patógenos. Esto ha significado que las ventas de algunos de estos compuestos superen los 23 billones de dólares, ventas relacionadas a no más de 300 productos

naturales, semisintéticos o sintéticos, que incluyen cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, tetraciclinas y macrólidos (Strohl *et al.*, 1991).

Los antibióticos se agrupan en familias, caracterizadas porque agrupan compuestos que tienen una estructura química similar y comparten el mismo mecanismo de acción antimicrobiano (Lancini *et al.*, 1995). De manera breve se describen algunos de los antibióticos producidos por actinomicetos. La tabla 1 muestra los principales antibióticos, su estructura química y el sitio donde actúan.

**Tabla 1.** Clasificación de los principales antibióticos producidos por actinomicetos de acuerdo a su estructura química.

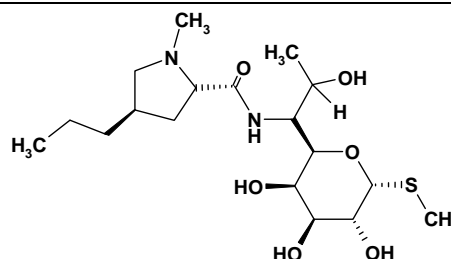
CLASIFICACION	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA
$\beta$ -Lactámicos	<b>Cefoxitina.</b> (Cefamicina semisintética).  Inhibe síntesis de pared celular.	
Aminoglucósidos	<b>Estreptomicina.</b>  Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	
Tetraciclinas	<b>Tetraciclina.</b>  Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	

<p>Macrólidos</p>	<p><b>Eritromicina.</b> Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 50S.</p>	
<p>Polienos</p>	<p><b>Amfotericina B.</b> Alteración de permeabilidad en la membrana.</p>	
<p>Glicopéptidos</p>	<p><b>Vancomicina.</b> Inhibe síntesis de pared celular.</p>	
<p>Rifamicinas</p>	<p><b>Rifampicina.</b> Inhibición de síntesis de RNA. Unión a la RNA polimerasa.</p>	
<p>Fenicoles</p>	<p><b>Cloranfenicol.</b> Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S.</p>	

**Lincomicina.**

Azúcares  
complejos

Inhibe síntesis de  
proteínas.  
Unión en la subunidad  
50S.



Las estructuras químicas de los metabolitos secundarios se diseñaron empleando el programa MDL ISIS DRAW versión 2.5 ([http://www.mdl.com/products/framework/isis\\_draw/index.jsp](http://www.mdl.com/products/framework/isis_draw/index.jsp)).

**Antibióticos  $\beta$ -Lactámicos.** La estructura química típica de estos antibióticos es la presencia de cuatro anillos unidos por un enlace amida, compuestos que son activos sobre un gran número de bacterias inhibiendo el ensamblaje de los componentes de peptidoglicano de la pared celular. Los hongos son los que producen los antibióticos clásicos (penicilina y cefalosporina); sin embargo, algunas bacterias pueden producir cefalosporinas modificadas como la cefamicina.

La tienamicina, producida por *Streptomyces cattleya* es de los últimos antibióticos comerciales que se usa y uno de los más potentes, con un amplio espectro de acción contra bacterias aerobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *Pseudomonas*. A pesar de que es un antibiótico beta lactámico, no es un miembro de las penicilinas o cefalosporinas, más bien es un carbapenemo (Demain, 1999), que difiere de los beta lactámicos convencionales por la presencia de un átomo de carbono en lugar de azufre en el anillo condensado al anillo lactámico y por la configuración *trans* de los átomos de hidrógeno del anillo lactámico (Kahan *et al*, 1979).

**Aminoglucósidos.** Químicamente estos compuestos son oligosacáridos que comprenden aminoazúcares y un residuo aminociclitol, que es un anillo de seis miembros alicíclico con sustituyentes hidroxilo y amino. Son activos

principalmente contra bacterias Gram-negativas, inhibiendo de manera irreversible la síntesis de proteínas. El producto principal de esta familia es la estreptomina producida por *Streptomyces griseus*, y la gentamicina producida por *Micromonospora purpurea*.

**Tetraciclinas.** Este grupo de antibióticos se componen de cuatro anillos de seis átomos arreglados linealmente. Estos compuestos de amplio espectro actúan inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, actuando sobre la subunidad ribosomal 30S. A nivel clínico se usa la oxitetraciclina producida por *Streptomyces rimosus* y la tetraciclina y clortetraciclina producidas por *S. aureofaciens*.

**Macrólidos.** Esta familia de antibióticos incluye un gran número de compuestos caracterizados por un anillo de lactona de 12 a 16 átomos de carbono y que contiene dos o más azúcares. El miembro representativo de este grupo y el más conocido es la eritromicina, compuesto que es producido por *Saccharopolyspora erythraea* y que inhibe la síntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad ribosomal 50S.

**Polienos.** Estos macrólidos antifúngicos difieren de los macrólidos antibacterianos en el tamaño del anillo de lactona, que varía de 26 a 38 átomos, y en

la presencia de una serie de dobles enlaces conjugados. El compuesto sistemáticamente utilizado es la amfotericina B producida por *Streptomyces nodosus*, cuya actividad antifúngica se debe a que interfiere con los esteroides de membrana alterando su permeabilidad.

**Glicopéptidos.** Entre el gran número de compuestos pertenecientes a esta familia de antibióticos, los más empleados son los antibióticos llamados "dalbaheptidos", denominación que se debe a su mecanismo de acción (**D**-alanina-D-alanina **binding**) y a su composición (**heptapeptidos**). Los antibióticos más conocidos de este grupo son vancomicina y teicoplanina, producidos por *Amycolatopsis orientalis* y *Actinoplanes teichomyceticus* respectivamente.

**Rifamicinas.** Esta familia de compuestos pertenece a la extensa clase de compuestos llamados ansamicinas, que son moléculas caracterizadas por presentar un núcleo aromático atravesada por una cadena alifática. Su mecanismo de acción se da a través de la inhibición de la síntesis de RNA al unirse a la RNA polimerasa. Industrialmente la rifamicina B y rifamicina SV son producidas por *Amycolaptosis mediterranei*, compuestos que son usados como materia prima para producir de manera semisintética rifampicina o rifapentina.

**Fenicoles.** En este grupo de compuestos se encuentra el cloranfenicol, antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosomal 50S, bloqueando la formación del enlace peptídico al inhibir la actividad de peptidil transferasa. Este compuesto se aisló de *Streptomyces venezuelae* aunque actualmente se produce por síntesis química.

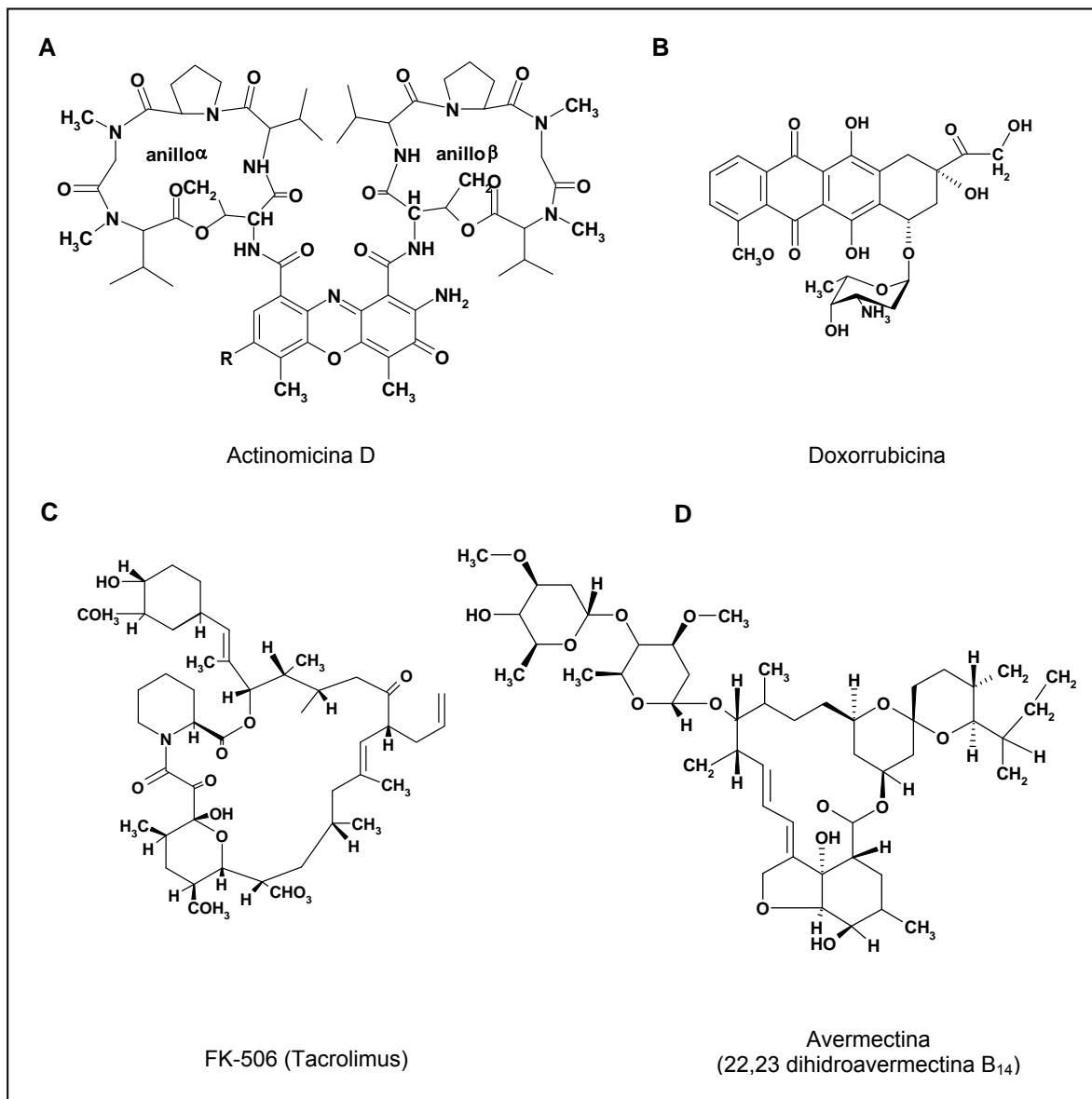
**Azúcares complejos.** En este grupo se encuentran los antibióticos lincomicina y su

derivado clindamicina. La lincomicina se aisló de *Streptomyces lincolnensis*, y al igual que el cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad ribosomal 50S afectando la actividad de peptidil transferasa.

Se ha visto que compuestos con actividad antibiótica también presentan otras actividades importantes (Demain, 1983), algunos de los cuales han sido discretamente explotados en el pasado, pero que deberían ser explotados en el futuro. En este sentido se ha llevado a cabo una amplia búsqueda de antibióticos activos contra organismos diferentes a microorganismos, así como compuestos con otras aplicaciones farmacológicas aplicadas a enfermedades que actualmente son tratadas sólo con compuestos sintéticos. Se han identificado compuestos bioactivos con diversas aplicaciones en el campo de la medicina, algunos de ellos se describen a continuación y se presentan en la Fig. 1.

### *II. Agentes antitumorales.*

La mayoría de los compuestos usados para quimioterapia de tumores son antibióticos producidos por actinomicetos (Tomasz, 1995), dentro de los que se encuentran actinomicina D, mitomicina, bleomicina, neomicina y las antraciclinas, daunorubicina y doxorubicina (Demain, 1999). Por ejemplo, en humanos la neomicina inhibe angiogénesis inducida por angiogenina en células endoteliales (Hu, 1998), mecanismo que al parecer actúa vía la capacidad de la neomicina para inhibir la fosfolipasa C. Sorprendentemente, otros aminoglucósidos como la gentamicina, estreptomycin, kanamicina, amikacina y paronomycin no tienen la propiedad antitumoral, a pesar de que entre algunos de estos compuestos exista una pequeña diferencia; por ejemplo, la paronomycin difiere de la neomicina solamente porque presenta un  $\text{OH}^-$  en la posición 6 de la



**Fig. 1.** Metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces* con actividades antitumoral (A,B), inmunosupresora (C) y contra parásitos (D).

glucosa en lugar de un grupo -NH<sub>2</sub>.

Por su parte, la actinomicina D es un antibiótico polipeptídico aislado de *Streptomyces*, al que se le reconoció actividad anticancerígena, aunque debido a su elevada toxicidad no es un compuesto muy usado. Sin embargo, es ampliamente utilizado en investigación de biología celular para inhibir la transcripción al unirse al DNA en el complejo de

inicio de la transcripción, evitando la elongación del RNA por la RNA polimerasa (Sobell, 1985).

### III. Agentes Inmunosupresores.

Durante muchos años la ciclosporina A, originalmente descubierta como un péptido antifúngico de espectro de acción limitado producido por un hongo (Pritchard, 2005), se

empleó como agente inmunosupresor en pacientes que recibían trasplantes de corazón, riñón e hígado (Demain, 1999). Sin embargo, dos productos producidos por actinomicetos han dado buenos resultados como inmunosupresores. Tal es el caso de los policétidos FK-506 (tacrolimus) (Kino *et al*, 1987), aislado de *Streptomyces tsukubaensis* y de la rapamicina (Sirolimus) (Vezina *et al*, 1975) aislado de *Streptomyces hygroscopicus*. El uso de FK-506, tracolimus o Prograf su nombre comercial, fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1994 para usarse en un principio en pacientes sometidos a trasplante de riñón y posteriormente para trasplantes de hígado, corazón, páncreas, tráquea, piel y córnea. La rapamicina originalmente se empleó como agente antifúngico, aunque se dejó de utilizar como tal una vez que se descubrió que tenía propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas.

El mecanismo de acción de estos inmunosupresores ha ayudado a incrementar el conocimiento acerca de la activación y proliferación de las células T (Demain, 1999). En el caso de FK-506, este antibiótico macrólido actúa interaccionando con una proteína intracelular (inmunofilina, FKBP-12), formando un complejo (FKBP-12-FK506) el cual interacciona e inhibe a la calcineurina inhibiendo los eventos de transducción de señales de los linfocitos T y la transcripción de IL-2 (Liu *et al*, 1991).

#### IV. Compuestos antiparásitos.

Una de las enfermedades con efectos económicamente importantes en la avicultura es la coccidiosis, enfermedad causada por el protozoario *Eimeria*. Por mucho tiempo esta enfermedad fue exclusivamente combatida con compuestos sintéticos; sin embargo, debido a que el parásito desarrollaba rápidamente resistencia al tratamiento se desarrollaron nuevos compuestos sintéticos con actividad coccidiostática. Sorprendentemente, se encontró un antibiótico tóxico parenteralmente y de espectro de acción estrecho, la monensina, que

presenta alta toxicidad contra los coccidios. A pesar de este descubrimiento, el proceso fermentativo para producir este poliéter debería ser mejorado a niveles en que producirlo resultara económicamente viable. Para ello, la genética y la ingeniería bioquímica jugaron un papel trascendental ya que se logró mejorar el proceso de fermentación, teniendo como resultado que hoy día los poliéteres monensina (producido por *Streptomyces cinnamonensis*), lasalócido (producido por *Streptomyces lasaliensis*) y salinomicina (producido por *Streptomyces albus*) dominan la producción de coccidiostáticos comerciales (Westley, 1977).

Otro problema importante en el campo veterinario han sido las enfermedades causadas por helmintos en los animales de granja. En un inicio la principal forma de obtener compuestos con actividad antihelmíntica se realizaba probando diferentes compuestos sintéticos contra nemátodos, de los cuales algunos presentaban dicha actividad. Por otra parte, se habían encontrado algunos antibióticos que poseían actividad antihelmíntica contra nematodos y cestodos, aunque resultaron menos eficientes que los compuestos sintéticos. Posteriores búsquedas de cultivos microbianos con actividad antihelmíntica, produjeron un cultivo fermentativo no tóxico que mataba al nemátodo (*Nematosporeoides dubius*), patógeno intestinal del ratón. El cultivo de *Streptomyces avermitilis*, el cual fue aislado por Omura y su equipo en el Instituto Kitasato de Japón (Ikeda & Omura, 1997), producía una familia de metabolitos secundarios que presentaba actividades antihelmínticas e insecticidas, los cuales se denominaron "avermectinas". Estos metabolitos son disacáridos derivados de lactonas macrocíclicas, con una excepcional actividad contra parásitos, siendo al menos diez veces más potente que cualquier agente antihelmíntico sintético conocido. A pesar de su estructura macrólida, las avermectinas no tienen actividad contra bacterias y hongos, no inhiben síntesis de proteínas ni son ionóforos; en lugar de

ello su actividad está relacionada con interferir con la neurotransmisión en muchos vertebrados, teniendo actividad contra nematodos y artrópodos parásitos de ovejas, vacas, perros, caballos y cerdos. Un derivado semisintético, 22,23-hidroavermectina B1 (Ivermectina) es unas cien veces más potente que el tiobenzol y es un producto veterinario comercial (Demain, 1999)

Diferentes derivados de las avermectinas han sido obtenidos, un ejemplo interesante de esto es la "Doramectina" (ciclohexil-avermectina B1) desarrollada por el método de biosíntesis mutacional (Stutzman-Engwall *et al*, 2001), siendo el primer ejemplo de un producto comercial desarrollado de esta manera. Naturalmente, la avermectina contiene cadenas laterales de 25 carbonos de 2-metil butiril o isobutiril, grupos que son adicionados por la 2-cetoácido deshidrogenasa a partir de isoleucina y valina, respectivamente (Chen *et al*, 1989). La eliminación del gen *bkd*, que codifica para la 2-cetoácido deshidrogenasa, evita que los cultivos produzcan avermectina a menos de que se le adicione al cultivo ácido isobutírico o ácido (S)-2-metilbutírico, o bien añadiendo otros ácidos grasos, lo que permite obtener nuevos derivados de avermectinas (Dutton *et al*, 1991). En este sentido, se han probado más de 800 ácidos grasos produciéndose 60 avermectinas incluyendo la ciclohexil-avermectina B1 (Doramectina).

### **INGENIERIA GENÉTICA DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE ACTINOMICETOS.**

Desde sus inicios la genética ha estado íntimamente relacionada con la producción de compuestos de origen bacteriano, lográndose incrementar la productividad de las fermentaciones, aunque también incrementando los costos de operación de las mismas, incrementos que tienen que ver con procesos de mutagénesis y de búsqueda de cepas de bacterias con una alta producción. Sin embargo, en años recientes la miniaturización, automatización de los procedimientos de búsqueda y el desarrollo de

métodos de selección para obtener cepas mejoradas, han auxiliado en gran medida al desarrollo de nuevos productos.

La mutación, como método elegido para obtener nuevos productos ha servido para: a) elevar la proporción de metabolitos producidos en el cultivo a una proporción más favorable, b) elucidar las rutas de biosíntesis del metabolismo secundario y c) producir nuevos compuestos.

El potencial de la tecnología de DNA recombinante utilizada en mejorar los antibióticos o descubrir nuevos se ha incrementado notablemente, sobretodo porque se ha venido encontrando que los genes de las rutas biosintéticas de los antibióticos se encuentran agrupados con los genes de resistencia para ese antibiótico. Este arreglo facilita la transferencia de una ruta completa en un solo paso y cuando se aplica a las fermentaciones se tiene una sobreproducción de las enzimas importantes de esa ruta biosintética, incrementando de esa manera la producción del compuesto final.

Muchos de estos compuestos pertenecen a productos que pertenecen a las familias de péptidos no ribosomales y de policétidos, sintetizados por sistemas enzimáticos conocidos como policétido sintasa (PKS) y sintasa de péptidos no-ribosomales (NRPSs) (Stauton & Weissman, 2001).

Tomando en cuenta que muchos de los compuestos conocidos han sido aislados de microorganismos difíciles de cultivar, que crecen muy lentamente o inclusive no se pueden cultivar (Fortman & Sherman, 2005), surge el interés de transferir la vía de biosíntesis de los compuestos a un hospedero fácil de crecer y manejar y que se considera una buena alternativa para producir altas cantidades del compuesto deseado, o bien, puede proveer de las bases para posteriores estudios de biosíntesis combinatoria.

Existen un gran número de ejemplos de la producción heteróloga de metabolitos secundarios específicos. Las estrategias empleadas varían desde la transformación directa de pequeños

clusters de antibióticos dentro de una bacteria relacionada a la ingeniería de DNA de grandes rutas biosintéticas.

En el caso de la expresión heteróloga de rutas biosintéticas de estreptomicetos en actinomicetos relacionados, se tiene el caso del sistema PKS tipo II de la producción de medermicina en *Streptomyces coelicolor* (Ichinose *et al.*, 2003). En este ejemplo, el cluster biosintético está contenido en un cósmido de aproximadamente 40 kb de los cuales 3 son propios del cluster, que es directamente transformado a una cepa apropiada (*S. lividans* y *S. coelicolor*), producción que depende del promotor original y sus elementos regulatorios.

Cuando la ruta de biosíntesis está contenida en clusters que son más grandes que lo que puede mantener un cósmido o los vectores BAC, la biosíntesis del compuesto se obtiene al coexpresar varios plásmidos, cada uno conteniendo una parte de la ruta de biosíntesis del compuesto (Kao *et al.*, 1994).

Pero, cuando lo que se busca es utilizar este conocimiento para modificar específicamente una ruta del producto final se realiza mutagénesis dirigida (targeted mutagenesis) en un cósmido o en un sistema de expresión BAC usando el sistema Red/ET, para producir compuestos relacionados entre sí que tengan la particularidad de que las pequeñas diferencias entre ellos les confiera una función diferente (Zhang *et al.*, 2000). La viabilidad de este método se demostró al generar un nuevo derivado de aureothina con una mejor actividad (Fig. 2) (Ziehl *et al.*, 2005). La inactivación de los genes biosintéticos implicados en la formación de la unidad inicial de la aureothina (*p*-nitro-benzoil-CoA) por medio del sistema de recombinación Red/ET y la expresión de la vía de biosíntesis en *Streptomyces lividans*, resultó en mutantes que no producían aureothina; la adición del sustrato *p*-ciano-benzoato a estas mutantes resultó en la producción de un nuevo nitrilo análogo a la

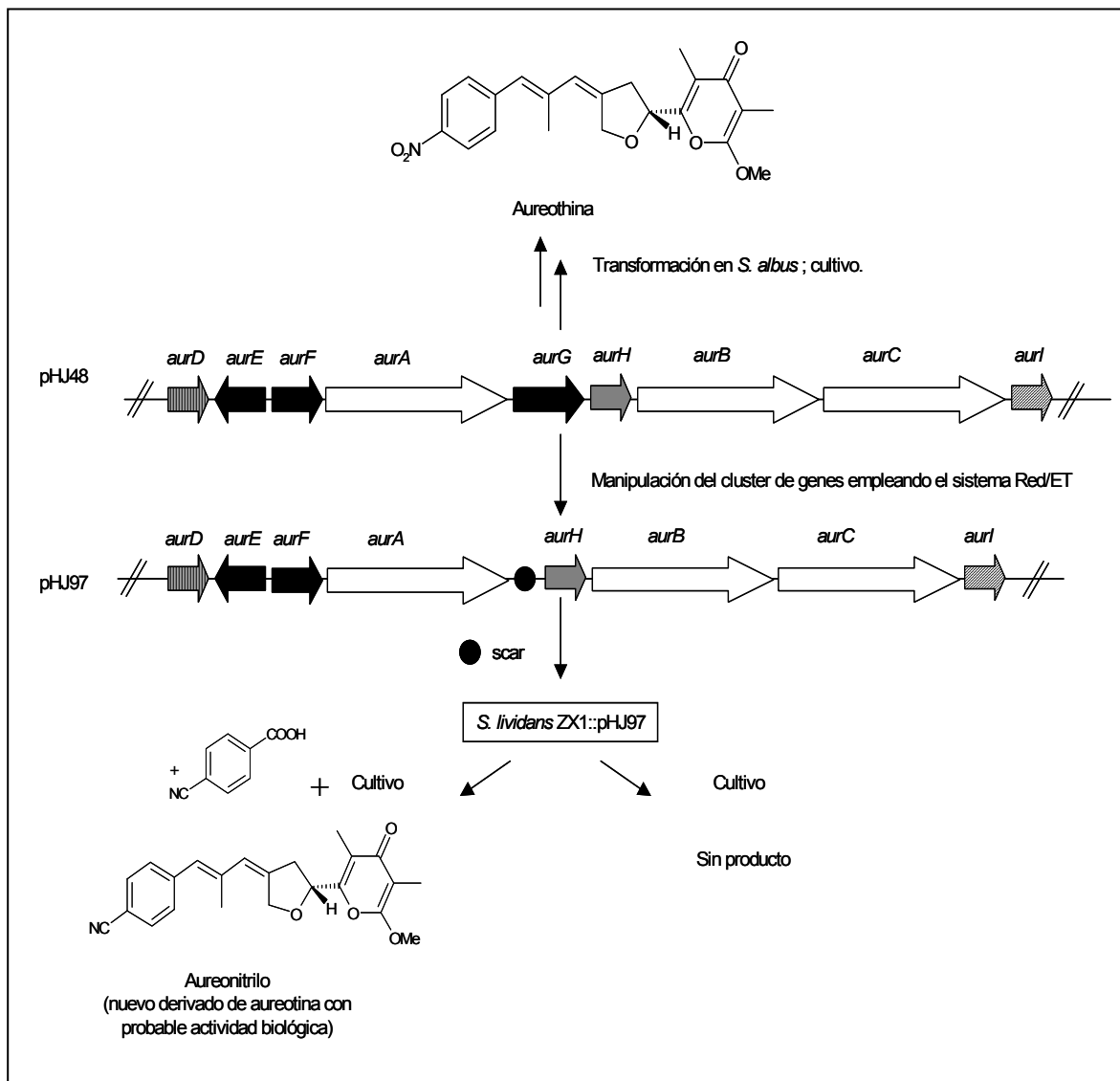
aureothina, el aureonitrilo, el cual presentó una mayor actividad citostática.

### CONSIDERACIONES FINALES

Los antibióticos producidos por las bacterias han sido empleados contra las infecciones producidas por bacterias y hongos, muchos de ellos son utilizados comercialmente y otros son potencialmente útiles en otras ramas de la medicina.

Muchos de los metabolitos secundarios producidos por los actinomicetos se emplean como agentes antitumorales, agentes inmunosupresores, inhibidores enzimáticos y agentes contra parásitos. Un buen número de estos fue descubierto inicialmente como un antibiótico que no tuvo un impacto a nivel comercial, muchos de los cuales aún están en espera de que se le encuentre una actividad más importante sobre alguna enfermedad. Esto significa que estos compuestos han ayudado a cambiar nuestras expectativas de vida, revolucionando la medicina al tener una actividad importante en el trasplante de órganos, considerando que más de la mitad de los mejores compuestos farmacéuticos son de origen natural o relacionados a ellos, frecuentemente la molécula por sí misma no tiene un uso como tal, sin embargo puede servir como una molécula a la cual se le puedan realizar modificaciones químicas o genéticas para encontrarle una función.

La biología molecular de las bacterias ha abierto el camino para el desarrollo de la industria biotecnológica, siendo la biología molecular la fuerza que impulsa la investigación farmacéutica. De tal manera que se pueden producir análogos de diversos polipéptidos, una segunda generación de polipéptidos recombinantes modificados para alterar su especificidad, para alterar la especificidad de los sitios blanco; o bien, la tercera generación de péptidos podría fusionar secuencias de diferentes genes para que la liberación de algún fármaco se realice de manera específica.



**Fig. 2.** Manipulación del cluster de genes de aureothina para producir su derivado aureonitrilo. El gen *aurG* de la *p*-aminobenzoato sintasa fue eliminado del cluster de aureothina contenido en el plásmido de expresión pHJ48 usando el sistema de recombinación Red/ET. El plásmido obtenido (pHJ97) se introdujo en el huésped heterólogo *S. lividans*. La mutante obtenida (*S. lividans* ZX1::pHJ97) no produce aureothina; con la adición al cultivo de *p*-ciano benzoato se produjo el derivado aureonitrilo.

Finalmente, a pesar de que la ingeniería genética de los actinomicetos muchas veces está limitada por barreras de restricción en cuanto a la introducción de DNA a una célula, se han realizado progresos importantes, tan es así que se desarrolló

un cromosoma artificial que tiene la capacidad de transferir hasta 100 kb de DNA.

#### AGRADECIMIENTOS

Z E-M recibió una beca de CONACYT, México, para realizar estudios de Doctorado (138467) y

parcialmente estuvo apoyado por el Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado de la UNAM (203318); A M-E recibió una beca de CONACYT, México, para estudios de Maestría (189676) y una beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

## REFERENCIAS

- Baltz RH & Hosted TJ (1996) Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes. *TibTech*. 14: 245-250.
- Carte BK (1996) The biomedical potential of marine products. *BioScience* 46: 271-286.
- Chen T, Arison B, Gullo V & Inamine E (1989) Further studies on the biosynthesis of the avermectins. *J. Ind. Microbiol.* 4: 231-238.
- Clark AM (1996) Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceut. Res.* 13:1133-1141.
- Demain AL (1983) New applications of microbial products. *Science* 219: 709-714.
- Demain AL (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 : 455-463.
- DiMasi J, Seibring M & Lasagna M (1994). New drug development in the United States from 1963 to 1992. *Clin. Pharmacol. Ther.* 55: 609-622.
- Dutton C, Gibson S, Goudie A, Holdom K, Pacey M & Ruddock J (1991) Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J. Antibiot.* 44: 357-365.
- Fortman JL & Sherman DH (2005) Utilizing the power of microbial genetics to bridge the gap between the promise and the application of marine natural products. *Chem. Bio. Chem.* 6: 960-978.
- Hu GF (1998) Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 9791-9795.
- Ichinose K, Ozawa M, Itou K, Kunieda K & Ebizuka Y (2003) Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanequinone gene clusters. *Microbiology.* 149: 1633-1645.
- Ikeda H & Omura S (1997). Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.* 97: 2591-2609.
- Kahan JS, Kahan FM, Geogelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, Miller TW, Hendlin D, Mochales S., Hernandez S, Woodruff HB & Birnbaum J (1979) Thienamycin, a new  $\beta$ -lactam antibiotic: Discovery, taxonomy, isolation, and physical properties. *J. Antibiot.* 32: 1-12.
- Kao CM, Katz L & Khosla C (1994) Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host. *Science.* 265: 509-512.
- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H & Imanaka H (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. 1: Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.* 40: 1249-1255.
- Lancini GC, Parenti F & Gallo GG (1995) Antibiotics: A Multidisciplinary Approach. Plenum Press New York, NY.
- Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G & Marinelli F (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78: 399-405.
- Liu J, Farmer J, Lane W, Friedman J, Weissman I & Schreiber S. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK-506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- Pritchard D (2005) Sourcing a chemical succession for cyclosporin from parasites and human pathogens. *Drug Discov Today* 10: 688-691.
- Sobell H (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5328-5331.i
- Stauton J & Weissman KJ (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* 18: 380-416.

- Strohl WR, Bartel PL, Li Y, Connor NC & Woodman RH (1991) Expression of polyketide biosynthesis and regulatory genes in heterologous streptomycetes. *J. Ind. Microbiol.* 7: 163-174.
- Stutzman-Engwall KJ, McArthur H & Katoh Y (2001) Streptomyces avermitilis gene directing the ratio of B2:B1 avermectins. USA Patent 6,511,841B2.
- Tomasz M (1995) Mitomycin C: Small, fast and deadly (but very selective). *Curr. Biol.* 2: 575-579.
- Vežina C, Kudelski A & N. Sehgal S (1975) Rapamycin (AY 22,989), a new antifungal antibiotic. 1: Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28: 721-726.
- Westley JW (1977) Polyether antibiotics: Versatile carboxylic acid ionophores produced by Streptomyces. *Adv. Appl. Microbiol.* 22: 177-223.
- Yung P (1997) The microbial world: Foundation of the world. *ASM News.* 63: 417-421.
- Zhang Y, Muyrers J, Testa G & Stewart A (2000) Functional expression of genes involved in the biosynthesis of the novel polyketide chain extension unit, methoxymalonyl-acyl carrier protein, and engineered biosynthesis of 2-desmethyl-2-methoxy-6-deoxyerythronolide B. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 5268-5269.
- Ziehl M, He J, Dahse HM & Hertweck C (2005) Mutasynthesis of aureonitrile: an aureothin derivative with significantly improved cytostatic effect. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44: 1202-1205.