VOL. IV No. 1 MARZO 1985

EDITORIAL

EL CONOCIMIENTO CIENTIFICO Y EL DESARROLLO ECONOMICO SOCIAL

La actividad del ser humano ha procurado desde siempre la satisfacción de sus necesidades. Si bien el hombre estuvo por muchos siglos sometido a la naturaleza sin poder influir sobre ella, sus capacidades específicamente humanas le permiten cada día más actuar sobre la naturaleza, transformándola de acuerdo a sus conveniencias. Su misma situación lo obligó a adentrarse en el conocimiento de la realidad, incluído él mismo en ésta. Este proceso de conocimiento ha variado desde las primeras edades del ser humano hasta nuestros días; en virtud de que la mente del hombre se desarrolla en concordancia con el modo en que modifica la naturaleza para satisfacer sus necesidades.

El conocimiento es, entonces, producto de la actividad humana y, en la medida que ésta se ha ido diversificando y desarrollando, también el conocimiento se ha ido ampliando, diversificando, desarrollando y actualizando. Es fácil comprobar que el conocimiento sobre los procesos de la naturaleza y la sociedad ha sido resultado de los cambios que ocurren a causa de la satisfacción de las necesidades humanas y que, a la vez, ha tenido influencia sobre dichos cambios; es decir, sobre el progreso social.

En el largo proceso del conocimiento se puede identificar el uso del sentido común, el recurso de lo sobrenatural y el pensamiento mágico en el hombre primitivo; así como el

desarrollo de diversas técnicas en las primeras sociedades humanas hasta la edad de hierro.

En la época clásica destaca la observación minuciosa de la naturaleza v el uso de la razón nara explicarla; así como la introducción de la lógica. Con el Renacimiento, bajo la influencia de las necesidades de la naciente sociedad capitalista, se inició un intenso desarrollo de las ciencias naturales, gracias al cual recibió un poderoso impulso la metodología. Ya a fines del siglo XVI y en el siglo XVII se puede hablar de una revolución científica, al introducirse la experimentación como base del conocimiento científico: el conocimiento verificado y comprobado. Durante los siglos XVIII y XIX, que constituyen el periodo formativo del mundo moderno, los nuevos métodos de la ciencia experimental inspiraron la gran transformación de los medios de producción y se habla va de la revolución industrial.

Es necesario hacer un paréntesis para señalar que no es accidental que las formulaciones intelectuales de la ciencia se havan desarrollado v florecido al mismo tiempo v en los mismos sitios en que se produjeron los cambios técnicos de la industria y que se estableció el dominio económico y político del capitalismo. Asimismo es importante aclarar que, si bien se destaca la gran trascendencia del conocimiento científico en el desarrollo social, no se puede subestimar el papel histórico del proceso de conocimiento empírico-espontáneo. Dentro de los marcos de dicho proceso fueron asimilados y conocidos gran cantidad de objetos del mundo circundante. Los conocimientos acumulados a través de muchas generaciones fueron utilizados en las grandes obras de la humanidad; por ejemplo: el riego, la domesticación y cría de animales, la construcción. De hecho, se puede aceptar que la tradición acu-

COMITE EDITORIAL

GUILLERMO ALVAREZ LLERA Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

ALFONSO CARABEZ TREJO Centro de Investigaciones en Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional

ALBERTO HAMABATA
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

JOSE ANTONIO HOLGUIN HUESO Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JESUS MANUEL LEON CAZARES Centro de Investigaciones en Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

ENRIQUE PIÑA GARZA Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México

COORDINADOR EDITORIAL YOLANDA SALDAÑA DE DELGADILLO Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

Serafín Aguado (Morelia, Mich.), Ma. Dolores Alvarez Bruneliere (León, Gto.), Humberto Avila Rodríguez (Durango, Dgo.), Alberto Boveris (Buenos Aires, Argentina), Carlos Corredor (Cali, Colombia), Alfredo Delgado (Monterrey, N.L.), Manuel Escobar L. (Zacatecas Zac.), Jesús R. Garcilaso (Hermosillo Son.), Ma. Cristina González de Mac Swiney, (Mérida, Yuc.), Luis Rogelio Hernández Montenegro (Saltillo, Coah.), Ma. Guadalupe Oliva Ruiz (Tampico, Tamps.), Ma. Guadalupe Puga (Querétaro, Qro.), Héctor Reyes Leal (Ciudad Juárez, Chih.), José Alberto Rivera Brechu (México, D.F.), Jesús M. Rodríguez (San Luis Potosí, S.L.P.), Alba Marina Valdez de García (Guatemala, Guatemala, C.A.), Manuel Vázquez T. (Santo Domingo República Dominicana).



FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

DR. FERNANDO CANO VALLE Director

DR. ULISES AGUILAR BATURONI Secretario General

C.P. EDUARDO MUÑOZ GONZALEZ Secretario Administrativo

INDICE

BEB 83 Vol. IV. Núm. 1 de marzo 1985

EDITORIAL

El Conocimiento Científico y el Desarrollo Económico Social. María G. Rodríguez Ramos y Henriette D. Ríos Orlandi

ARTICULOS

El Ciclo de la Urea: II Enzimas Mitocondriales del Ciclo de la Urea. Alfredo Saavedra Molina

Regulación de la Fosforilación Oxidativa Mitocondrial. Rafael Moreno Sánchez . . 8

20

28

29

OTRAS COMUNICACIONES

El Manual de Reactivos en Bioquímica como material de apoyo para la Enseñanza. Ma. Eugenia García Salazar, Aída Hernández Tobías y Silvia Jiménez Thomas.

Versión de la Biología Molecular acerca del Origen de la Vida. Efraín Racker

Instrucciones para los colaboradores del Boletín de Educación Bioquímica 32



CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA.

DR. HECTOR MAYAGOITIA DOMINGUEZ Director General

DR. GONZALO HALFFTER Director Adjunto de Desarrollo Científico

DONATIVO PCSACNA - 430640

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB) es una publicación trimestral editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Registro en Trámite Correspondencia Y. Saldaña de Delgadillo. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina UNAM. Apdo. Postal 70159. Delegación Coyoacán. 04510 México, D.F.

mulativa del conocimiento —que existe desde las edades tempranas del hombre— constituye la raíz de la ciencia.

La civilización actual no puede entenderse al margen del largo proceso de desarrollo que ha tenido la ciencia, no obstante que es a partir del surgimiento del capitalismo cuando se da el gran avance. Ya en el siglo XIX la ciencia se convierte en el agente principal del desarrollo técnico. Teniendo un papel auxiliar en el desarrollo industrial, en el siglo XX se incorpora completamente al proceso de producción.

Ciencia y técnica aparecen cada vez más interrelacionadas, en virtud de que los cambios en los procesos de producción se requieren con tal rapidez que las nuevas técnicas no pueden ser ya generadas a través de la experiencia práctica, sino que se crean a través de la aplicación de los conocimientos científicos; es decir, a través de la tecnología.

La época actual se distingue, entonces, por el impacto del conocimiento científico y el desarrollo tecnológico en las actividades económicas. La ciencia y la tecnología constituyen, sin duda, elementos sustanciales de la cultura moderna; propician actitudes objetivas ante el mundo, confianza en que las leyes de la naturaleza y la sociedad puede comprenderse y convicción de que su conocimiento es parte de la dotación de recursos del hombre.

Hoy se considera a la ciencia y a la tecnología como los principales instrumentos para proyectar y aprovechar el potencial económico de la nación: más aún, se afirma que propician el ritmo y estilo de desarrollo de los pueblos. De hecho, son el actor fundamental de dependencia de los países subdesarrollados; en virtud de que los resultados de la aplicación de la ciencia y la tecnología no se han distribuido equitativamente entre todas las naciones, habiéndose ampliado aceleradamente la brecha entre los países desarrollados y los subdesarrollados en las últimas tres décadas. En consecuencia, la ciencia y la tecnología tienen un papel primordial en el mantenimiento y reforzamiento de la independencia de una nación

En tiempo de crisis económica se incrementa el interés por generar y aplicar el conocimiento científico y tecnológico, ya que éste posibilita las transformaciones sociales y económicas y señala las estrategias para encarar las dificultades de superar la crisis. Ciencia y tecnología son las rutas más convenientes para enfrentarse con mayor decisión y éxito a los retos del desarrollo económico-social que se plantea una nación para alcanzar estadíos mayores de bienestar social.

En México, se han definido las funciones sociales de la ciencia y la tecnología, en el marco del Programa Nacional de Desarrollo Tecnológico y Científico 1984-1988:

- Contribuir a la definición de objetivos sociales y de medios para alcanzarlos y actuar como uno de los puntales de la conciencia crítica de la sociedad;
- Promover el desarrollo de la cultura científica y tecnológica y de los hábitos del pensamiento racional crítico e inquisitivo en amplias capas de la sociedad;
- Contribuir a la educación en general y, en particular, a la formación de recursos humanos de alto nivel;
- Contribuir al avance del conocimiento de la naturaleza y la sociedad;
- Ampliar el dominio del hombre sobre la naturaleza e incrementar su capacidad de dirigir concientemente las fuerzas de la sociedad; y
- Fomentar la interacción entre ciencia y tecnología: la ciencia apoyando al desarrollo tecnológico y las necesidades tecnológicas estimulando la creación científica.

Dentro de este marco, se reconoce que la investigación científica y tecnológica tiene un papel orientador en el desarrollo del país y, en consecuencia, que es necesario orientar la creación científica y tecnológica para ofrecer soluciones a los problemas económicos y sociales; sobre todo aquellos ligados a cuestiones de interres estratégico y a necesidades básicas de la población, entre ellas la salud.

Dra. María G. Rodríguez Ramos y Lic. Henriette D. Ríos Orlandi Dirección General de Investigación en Salud S.S.A.

EL CICLO DE LA UREA: II. ENZIMAS MITOCONDRIALES DEL CICLO DE LA UREA

Alfredo Saavedra Molina. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apartado Postal 70-159. México, 04510, D. F.

I. ASPECTOS HISTORICOS

La urea fue descubierta en 1773 por Rouelle (1) al evaporar cuidadosamente en presencia de etanol una muestra de orina. El material extraído fue descrito como "una sustancia jabonosa, atrapadora de agua, que era capaz de cristalizar y que además contenía más de la mitad de su peso como álcali volátil, rica en nitrógeno y que mediante fermentación fornaba ácido carbónico y amoniaco". Sin embargo, Fourcroy y Vauquelin en 1798, utilizaron por primera vez el término urea en "ese material especial de la orina, que origina ácido carbónico y amoniaco en orina en descomposición" (2).

Prévost y Dumas en 1823 demostraron por primera vez la présencia de urea en la sangre (1) a partir de un extracto etanólico caliente de sangre de perros y gatos nefrectomizados; un análisis elemental del material cristalino les permitió concluir que la urea de sangre era idéntica a la urea de orina (3). Posteriormente y mediante experimentos adicionales llegaron a las siguientes conclusiones: a) la cantidad de urea excretada por la vía renal era una medida cuantitativa de su formación. b) cuando se lleva a cabo una nefrectomía total, se acumula la urea en la sangre. c) debido a que se encuentra urea en la orina en casos de hepatitis crónica, el hígado debe estar involucrado en la formación de urea (3).

El primer análisis de la urea con su correspondiente y correcta fórmula empírica fué logrado por Prout en 1824 (1, 2). En 1828 se demostró la formación de la urea a partir del calentamiento del cianato de amonio por el químico alemán Wöhler (1); ésta observación tuvo un fuerte impacto no sólo en la teoría del vitalismo y el concepto del isomerismo, sino en el por qué de la formación de urea en el organismo humano; durante este periodo fueron publicados numerosos reportes en los cuales se trataba de observar la formación de cianato o caroamato de amonio frente a una amplia variedad de sistemas de dentro de los cuales se podía incluir el calentamiento de aminoácidos y proteínas con agentes oxidantes como permanganato, peróxido de hidrógeno y carbón activado (1, 2).

La hipótesis de que el carbamato de amonio o algunos compuestos relacionados estarían involucrados en la biosíntesis de urea persistió por más de 100 años (1, 2). Hay que hacer notar que en el artículo de Krebs y Henseleit (4), se cuestionó sobre si el cianato de amonio en un sistema de rebanadas de hígado podría ser un precursor de la urea, pero no se obtuvo nada, por lo tanto, el cianato de amonio no puede ser intermediario ni precursor en la biosíntesis de la urea en el organismo humano.

Para 1939 el Dr. Krebs estaba plenamente convencido de que se requerían las células hepáticas íntegras para llevar a cabo la síntesis de urea a partir de amoniaco y bióxido de carbono, debido a experimentos fallidos de querer sintetizar urea en preparaciones libres de células. En 1944, Hayano en el laboratorio del Dr. Cohen logró sintetizar urea en un "sistema libre de células", demostrando: 1) la síntesis de citrulina a partir de amoniaco y bióxido de carbono en una fracción cruda de hígado, posteriormente reconocida como mitocondrias, y 2) la conversión de citrulina en urea en la fracción del sobrenadante (5).

Grisolía y Cohen (6), al utilizar la fracción cruda de hígado, descubrieron la existencia de dos pasos enzimáticos en la biosíntesis de citrulina a partir de amoniaco y CO2, además del requerimiento de un compuesto N-acil, derivado del ácido glutámico, al que llamaron compuesto X. Posteriormente Jones, Spector y Lipmann en 1955 (7), identificaron al carbamil fosfato como el donador de grupo carbamilo en la síntesis enzimática de citrulina y descubrieron que correspondía al compuesto X de Grisolía y Cohen (6). El 1958 se tenían plenamente identificadas las enzimas mitocondriales relacionadas con la biosíntesis de la citrulina: la carbamil fosfato sintetasa I (CPS I), denominada así para distinguirla de la CPS II implicada en la biosíntesis de pirimidinas, y la ornitina transcarbamilasa (OTC), que representan el primero y segundo pasos respectivamente en la biosíntesis de la urea a partir de amoniaco y bióxido de carbono (fig. 1).

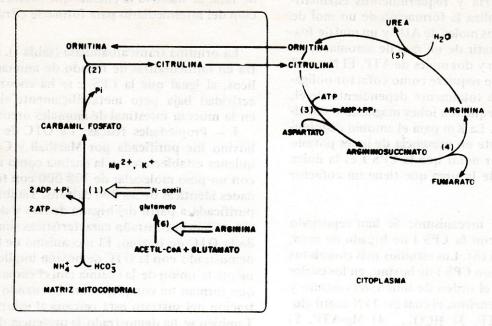


Figura 1: El ciclo de la urea en hígado de mamífero. Enzimas participantes con número: (1) caramil fosfato sintetasa I, (2) ornitina-transcarbamilasa, (3) argininosuccinato sintetasa, (4) argininosuccinasa, (5) arginasa.

II. ENZIMAS MITOCONDRIALES EN LA BIO-SINTESIS DE LA UREA

c) Ccrbamil Fosfato Sintetasa I

1 — Propiedades físicas: la carbamil fosfato sintetasa I (CPS I) está presente en la matriz mitocondrial de hígado de animales ureotélicos, representa un 20% del total de la proteína, cifra que resulta alta para una proteína no encargada de la función bioenergética de la mitocondria. A manera de comparación, el 30% del total de la proteína presente en la membrana interna mitocondrial es ATPasa. La CPS I se ha encontrado además en cantidades bajas pero metabólicamente activas en la mucosa intestinal de animales ureotélicos (8). También ha sido purificado un anticuerpo monovalente contra la CPS I de hígado de rana, el cual se ha visto que tiene reacción cruzada con la CPS I de algunas especies de animales ureotélicos, lo que sugiere que las enzimas de todas estas especies tienen determinantes antigénicos comunes, así como estructuras similares. Las enzimas purificadas de hígado de rana, bovino y rata existen como un sistema monómero-dímero con peso molecular de 160 000 la forma monomérica (tabla I).

TABLA I. ALGUNAS PROPIEDADES DE LA CARBAMIL FOSFATOSINTETASA I Y LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA.

na Carbinario, ob -2 -) A.A.	CPS 1	orc orc
a) » de proteínas de la matriz.	20	0.5-0.6
b) Peso molecular del polímero.	300,000 daltons	112,000 daltons
c) Número de subunidades.	2 (idénticas)	3 (idénticas)
d) Peso molecular de la subunidad.	160,000 daltons	36,000 deltons
e) Peso molecular del precursor de la subunidad.	165,00 daltons	39,500 daltons
 f) Concentración de la subunidad en mitocondrias (mmol/1). 	1-1.5	0.15
g) pH úptimo.	6. 8-7.6	7.9
h) Actividad específica (unid/mg prot.)	35	900
i) Km (mmol/l):		endizevaco el n
STATUSTICAL STATE SECURISE	2.0 9m öxnes	a se milarib a
bicarbonato.	5.0	de Limerra Sarr
Mg-ATP.	1.0	Society of the second
N-acetil glutamato.	0.1	MANAGOR NO MENDA
nado ver "ballen i succession	0.17	enticipio on sibe
ornitine.		67 04 militaria 19
carbamil fusfato.		0.026

- 2— Estequiometría y requerimientos enzimáticos: La CPS I cataliza la formación de un mol de carbamil fosfato, dos moles de ADP y un mol de fosfato inorgánico a patir de un mol de amoniaco, un mol de bicarbonato y dos moles de ATP. El N-acetil glutamato (NAG) se requiere como cofactor obligatorio, la enzima es totalmente dependiente de él, además de que se requieren iones magnesio o covalto (Mn² + o Co² +). La Km para el amonio disminuye significativamente en presencia de iones potasio (8). Hay que hacer notar que la CPS 1 es la única enzima del ciclo de la urea que tiene un cofactor regulador.
- 3 Cinética y mecanismo: Se han reportado estudio cinéticos con la CPS I de hígado de rana, de bovino y de rata (8). Los estudios más completos son los realizados con CPS I de bovino, en los cuales se indica inclusive el orden de unión del sustrato y el cofactor con la enzima, el cual es: 1) N-acetil glutamato, 2) Mg-ATP, 3) HCO₃, 4) Mg-ATP, 5) NH₄⁺. El orden de liberación del producto es: 1) carbamil fosfato, 2) Mg-ADP, 3) Mg-ADP, 4) fosfato inorgánico. Se ha presentado evidencia de la formación de un compuesto enzima-carboxifosfato, el cual requiere dos moles de Mg-ATP (8).
- 4 Papel de N-acetil glutamato: Inicialmente en las preparaciones crudas de hígado, se observó la necesidadd de un cofactor derivado del glutamato para la activación de la CPS I (5). Después de diferentes ensavos con derivados y análogos del glutamato se encontró que el NAG es el más activo. Esto es de vital importancia, en vista del alto contenido (20%) de la CPS I intramitocondrial en su forma inactiva y de que depende en forma obligatoria del cofactor, así la enzima es totalmente dependiente del N-acetil glutamato. El sistema enzimático que cataliza la síntesis de NAG a partir de L-glutamato y acetil-CoA ha sido descrito por Tatibana y col. (9); de esta manera, el NAG actúa como un efector alostérico que influye en la asociación-disociación del complejo monómero-dímero de la CPS I (8) y ha sido considerado como el primer regulador alostérico que se haya descrito.

b) Ornitina Transcarbamilasa.

El descubrimiento de la existencia de una segunda enzima participante en la conversión de bióxido de carbono y amoniaco en citrulina, se alcanzó mediante las siguientes observaciones: 1) el residuo de hígado de rata que incubado en ausencia de ornitina, dió lugar a un intermediario inicialmente llamado compuesto X (6) y posteriormente carbamil fosfato (7): 2) cuando se calienta el residuo de hígado

de rata, se inactiva la enzima que cataliza la formación del intermediario para formarse citrulina (6).

La ornitina transcarbamilasa (tabla I), se encuentra en mitocondrias de hígado de animales ureotélicos, al igual que la CPS I; se ha encontrado una actividad baja pero metabólicamente significativa en la mucosa intestinal de animales ureotélicos (8).

1 - Propiedades físicas: La OTC de hígado de bovino fue purificada por Marshall y Cohen (10), quienes establecieron a la enzima como un trímero con un peso molecular de 108 000 con tres subunidades idénticas de 36 000 daltons. También ha sido purificada a partir del hígado de rata y del humano (8), se han encontrado características similares a las de la OTC de bovino. El mecanismo de la reacción demostrado con la OTC de bovino implica primeramente la unión de la enzima con el carbamil fosfato que forman un complejo binario cuando la concentración del sustrato está cercana al valor de su Km. También se ha demostrado la presencia de un grupo sulfhidrilo, así como un residuo de arginina en el sitio de unión del carbamil fosfato con la enzima (8).

III. EFECTOS DE METABOLITOS MITOCON-DRIALES SOBRE LA CPS I Y LA OTC

El sistema de la CPS I puede ser afectado por la concentración mitocondrial de ATP, el amoniaco, el bicarbonato, el Mg²⁺ y el N-acetil glutamato. Para el caso de la acetil-CoA y el glutamato, ambos sustratos para la síntesis de N-acetil glutamato, esta reacción se hace dependiente de la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos para generar la acetil-CoA, mientras que la deshidrogenasa glutámica y las transaminasas deben mantener los niveles del Lglutamato. La reacción de síntesis de NAG sucede dentro de la mitocondria, mientras que su degradación es fuera de ella. Debido a ello, la síntesis de NAG es de primordial importancia porque este cofactor de la enzima CPS I debe estar presente para activarla. Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de arginina intramitocondrial es indispensable, ya que funciona como un efector positivo de la N-acetil glutamato sintetasa (8).

IV. EFECTOS HORMONALES EN LA BIOSIN-TESIS DE UREA Y CITRULINA

Algunas de las hormonas que afectan los niveles de las enzimas de la biosíntesis de la urea son: corticosteroides, glucagon, hormona del crecimiento, hormona tiroidea, así como el AMPc, compuesto considerado como segundo mensajero intracelular (8). Los sistemas que han sido utilizados en estos

estudios son: hígado fetal de rata, hígado fetal humano, mitocondrias y células de hígado, animales intactos (ratas y ranas), así como preparaciones de hígado de rana (8). En el caso de la rana, el primer efecto detectado despues de la adición de tiroxina es la inducción de la enzima CPS I, además de un aumento coordinado en las otras enzimas de la biosíntesis de la urea (8).

Debido a que la metamorfosis en los anfibios incluye la transición entre el renacuajo acuático que es amonotélico y la rana terrestre que es ureotélico y que además el amonotelismo es incompatible con la vida terrestre, debido a los efectos tóxicos del amoniaco, es necesario e indispensable desarrollar cierta capacidad metabólica denominada ureotelismo, para detoxificar de amoniaco al anfibio en su metamorfosis temprana, antes de que el renacuajo deje su medio ambiente acuático.

V. EFECTOS DE LA DIETA PROTEICA EN LA BIOSINTESIS DE LA UREA

Schimke (citado en 8), encontró que el contenido total de las enzimas participantes en la biosíntesis de la urea aumentan coordinadamente al aumentar la ingesta en la dieta protéica. Concluyó además que "todas las condiciones estudiadas dan lugar a la degradación de proteínas y como consecuencia a un aumento en la excresión de urea, no importando si se trata de una dieta rica en proteínas, ayuno o administración de corticosteroides, todo lo cual está asociado con aumentos en las cinco enzimas del ciclo de la urea". Tales experimentos se efectuaron en ratas, pero se ha reportado esta forma de adaptación en primates, incluso el hombre (8).

El efecto de la ingesta protéica sobre todas las enzimas responsables de la biosíntesis de la urea es relativamente a largo plazo, del orden de días; sin embargo, uno de los mecanismos en donde se observa que la biosíntesis de la urea se regula a corto plazo, es decir, casi inmediatamente, es el que ocurre con la CPS I, debido a ciertos eventos metabólicos que influyen en el nivel intramitocondrial de N-acetil glutamato. Tatibana y col. (citado en 8), demostraron que una dieta rica en proteínas hace aumentar los niveles de arginina en el hígado, la cual es un efector positivo de la CPS I; por otro lado, también aumenta el L-glutamato, el cual es sustrato de la N-acetil glutamato sintetasa.

VI. SINTESIS Y DEGRADACION DE CPS I Y OTC

Los niveles intramitocondriales de CPS I y de

OTC dependen, como en otros casos, del grado de síntesis y degradación de estas enzimas. Nicoletti y col. (11), por medio de la técnica de doble marcaje, calcularon la vida media de la CPS I en ratas, que fué del orden de 7.7 días cuando se administró una dieta normal, de 3.3 días con una dieta alta de proteíans, 4.6 días con una dieta libre de proteínas y 8.7 días en animales tiroidectomizados. Los estudios realizados con preparaciones de hígado de Rana catesbeiana indicaron una vida media de 3.5 días para la CPS I, la cual se acorta a 2.3 días mediante un tratamiento con tiroxina. En este sistema anfibio la OTC tuvo una vida media de 4.0 días. No se conocen los factores que regulan la degradación de estas enzimas intramitocondriales.

Con el desarrollo de técnicas de traducción de RNAm en sistemas libres de células, ha sido posible estudiar algunos de los factores que regulan la síntesis de RNAm, así como los eventos que operan en la traducción, transporte y procesamiento de los polipéptidos sintetizados para pasar a las formas maduras presentes en la mitocondria. Este es el caso de la CPS I y la OTC, que son sintetizadas en el citoplasma y deben ser transportadas y procesadas a sus formas maduras que se encuentran en la mitocondria.

Los experimentos realizados con RNAm para CPS I en hígado de rata, indican que su producto de traducción es 5 000 daltons más grande que la forma madura presente en la mitocondria. El procesamiento de este precursor de la CPS I es por proteólisis en la membrana mitocondrial (8); por otro lado, la traducción del RNAm de OTC, también ha sido estudiada y se ha observado la presencia de un precursor de 4 000 daltons que funciona como un "péptido señal" que debe atravesar la membrana mitocondrial para convertirse en la forma madura de la enzima mediante la acción de una proteasa, la cual está presente en la matriz mitocondrial de hígado de rata (8).

Incidentalmente es de interés señalar la existencia de una tercera carbamil fosfato sintetasa, llamada CPS III, la cual requiere de glutamina y de acetil glutamato (8); esta enzima es activa en el hígado de algunas especies de peces, los cuales retienen altas concentraciones de urea con el propósito de regular su ósmosis.

BIBLIOGRAFIA:

1.—Werner, E.A. (1923), in: "The Chemistry of Urea", (R.H.A. Plimmer and F.G. Hopkins, eds.), P 1-3 Longmans, Green, New York.

- 2.—Fearon, W.R. (1926), The Biochemistry of Urea. Physiol. Rev. 6, 399-439.
- 3.—Mani, M. (1963), La Découverte de l'urémie experimentale par Jean-Lovis Prévost et Jean-Baptiste Dumas, Genéve, 1821. Med. Hyg., 21, 408-409.
- 4.—Krebs, H.A. y Henseleit, K. (1932), Hoppe-Seyler's Z. Physiol., 210, 33-66.
 - 5.—Cohen, P.P. y Hayano, M. (1946), The conversión of citrulline to arginine (Transimination) by tissue slices and homogenates. J. Biol. Chem., 166, 239-250.
 - 6.—Grisolía, S. y Cohen, P.P. (1952), The catalytic role of carbamyl glutamate in citrulline biosynthesis. J. Biol. Chem., 198, 561-571.
- 7.—Jones, M.E., Spector, E. y Lipmann, F.J. (1955), Carbamyl phosphate, the carbamyl donor in enzimatic citrulline synthesis Am. Chem. Soc., 77, 819-820.

- 8.—Cohen, P.P. (1981), The Ornithine-Urea Cycle: Biosynthesis and regulation of carbamyl phosphate synthesise I and ornithine transcarbamylase. Curr. Top. Cell Reg., 18, 1-19.
- 9.—Shigesada, K. y Tatibana, M. (1978), Role of acetylglutamate in ureotelism. Variations in acetylglutamate level and its possible significance in control of urea synthesis in mammalian liver. Eur. J. Biochem., 85, 385-391.
- 10.—Marshall, M. (1976), Ornithine Transcarbamylase from bovine liver. in: "The Urea Cycle", (S. Grisolía, R. Baguena, and F. Mayor, eds.) p. 169-179, Wiley and Saus N.Y.
- 11.—Nicolleti, M., Guerri, C. y Grisolía, S., (1977), Turnover of carbamyl phosphate synthase, of other mitochondrial enzymes and of rat tissues. Eur. J. Biochem., 75, 583-592.

ENZIMAS CLAVE EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL Y SU REGULACION

M.A. Juárez Oropeza y J.C. Díaz Zagoya. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apartado Postal 70-159. 04510, México, D.F.

INTRODUCCION

El colesterol es una molécula lipídica que poseen casi todos los organismos eucariontes (las plantas contienen otros esteroles en lugar del colesterol, como son el β-sitosterol y el estigmasterol). En un humano varón adulto sano, de 70 Kg, cerca del 0.2% de su peso corporal corresponde a colesterol, es decir, dicho individuo puede contener 140 g de colesterol, que se encuentran distribuidos principalmente en el sistema nervioso, tejido adiposo, músculo y piel (22% , 22% , 21% y 11% del colesterol corporal total, respectivamente). Cualquier célula de este organismo además de tener acceso a las fuentes extracelulares de colesterol, es también

capaz de sintetizarlo; sin embargo, el hígado y el intestino son los sitios principales para ello.

El colesterol es tanto el producto final de una vía biosintética, como el precursor de otras vías metabólicas (por ejemplo la síntesis de ácidos biliares y síntesis de hormonas esteroides), siendo la principal cuantitativamente, la formación de ácidos biliares.

Químicamente, el colesterol se puede encontrar en los tejidos en forma de colesterol no esterificado (CNE) y de colesterol esterificado (CE). El papel predominante del CNE parece ser como componen-

TABLA I. SUMA DE REACCIONES PARCIALES EN LA BIOSINTESIS DE COLESTEROL

REACCION CATALIZADA

EQUIVALENTES DE ATP INVERTIDOS.

* 1	18 Acetato + 18 ATP + 18 CoA-SH	+	18 Acetil-CoA + 18 AMP + 18 PPi	36
* 2	Citrato + 18 ATP + 18 CoA-SH	→	18 Acetil-CoA + 18 ADP + 18 Pi + 18 OAA	18
3	6 Acetil-CoA + 6 Acetil-CoA	→	6 Acetoacetil-CoA + CoA-SH	
4	6 Acetil-CoA +6 Acetoacetil-CoA	→	6 HMG-CoA + 6 CoA-SH	
5	6 HMG-CoA + 12 NADPH + 12 H ⁺ -	→	6 Mevalonato + 6 CoA-SH + 12 NADP ⁺	36
6	6 Mevalonato + 6 ATP	→	6 (5-fosfomevalonato) + 6 ADP	6
7	6 (5-fosfomevalonato) + 6 ATP	→	6 (5-pirofosfomevalonato) + 6 ADP	6
8	6 (5-pirofosfomevalonato) + 6 ATP -	→	6 isopentenil-PP + 6 CO ₂ + 6 ADP + Pi	6
9	3 isopentenil-PP	→	3 dimetilalil-PP	
10	2 isopentenil-PP + 2 dimetilalil-PP -	→	2 geranil-PP + 2 PPi	
11	2 geranil-PP + 2 isopentenil-PP -	→	2 farnesil-PP + 2 PPi	
12	2 farnesil-PP + NADPH + H ⁺	+	escualeno + NADP ⁺ 2 + 2 PPi	3
13	escualeno + 0 ₂ + NADPH + H ⁺ -	+	epóxido de escualeno + NADP ⁺ н + H ₂ 0	3
14	epóxido de escualeno + H ⁺	→	lanosterol	
15	lanosterol + 3 NADPH + 3 H ⁺ -	→	colesterol + 3 NADP ⁺ + 3 CO ₂	9

^{*} Cuando el acetato es la fuente de carbonos para la síntesis de colesterol, se invierten 105 equivalentes mol de ATP por mol de colesterol. Si el citrato es la fuente de carbonos entonces se invierten 87 equivalentes mol de ATP por mol de colesterol. El acetato es la mayor fuente de carbonos para la síntesis de colesterol mientras que el citrato es la mayor fuente de carbonos para la síntesis de ácidos grasos.

te estructural de membranas, actuando a manera de un "amortiguador de la fluidez membranal", en esta forma se encuentra en todas las membranas celulares. La concentración intracelular de CNE es regulada cuidadosamente, debido a que los cambios en el contenido del colesterol membranal, por el hecho de alterar la fluidez, que se supone afectarán la permeabilidad, así como las propiedades de enzimas membranales y los sistemas de transporte. Por otro lado, el CE casi no se encuentra en las membranas, más bien se le localiza en el citoplasma asociado a otros lípidos en forma de gotas lipídicas y su función parece ser la de reserva, en esta forma se encuentra principalmente en tejido adiposo, tejido hepático, gónadas y corteza suprarrenal.

Debido a que la síntesis de colesterol es un proceso que requiere de un elevado gasto energético de más de 80 equivalentes molares de ATP por mol de colesterol (tabla I), es de esperarse que su metabolismo sea cuidadosamente regulado. Las enzimas clave en el metabolismo del colesterol se representan en la figura 1 y son:

- a) en la síntesis de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa [mevalonato: NADP+ óxido-reductasa (CoA acilante). EC 1.1.1.34], (HMGR).
- b) en la formación intracelular de esteres de colesterol, la acil-CoA: colesterol C-aciltransferasa. EC 2.3.1.26, (ACAT).
- c) en la hidrólisis intracelular de esteres de colesterol, la colesterol ester hidrolasa. EC 3.1.1.13, (CEH).

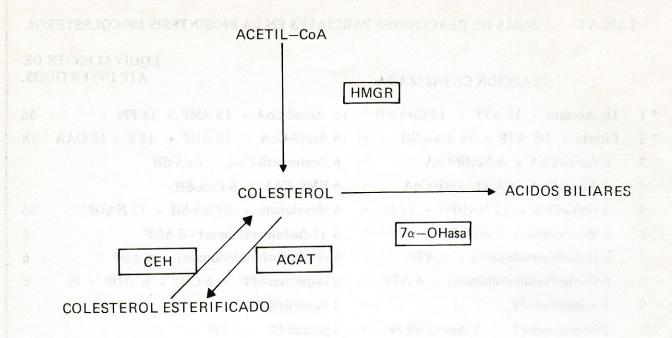


Figura 1. Esquema de las enzimas clave en el metabolismo del colesterol y su ubicación metabólica. HMGR= 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. ACAT = Acil-CoA: colesterol O-aciltransferasa. CEH = Colesterol ester hidrolasa, 70c-OHasa = Colesterol 70c-monooxigenasa.

d) en la síntesis de ácidos biliares, la colesterol 7α-monooxigenasa [colesterol, NADPH: oxígeno óxido-reductasa (7α-hidroxilante). EC 1.14. 13.7], (7α-OHasa).

Una característica común de las enzimas clave en el metabolismo del colesterol es que pueden ser reguladas por fosforilación reversible, por lo que puede hacerse la pregunta ¿El metabolismo del colesterol es regulado coordinadamente con las demás vías del metabolismo intermedio?. En un primer intento de responder a esta pregunta, describiremos a continuación las características de las enzimas clave en el metabolismo del colesterol y su regulación.

ACIL-CoA: COLESTEROL O-ACILTRANSFERASA (ACAT).

Aislamiento y caracterización.

La ACAT es un enzima microsomal que se encuentra en el retículo endoplásmico, preferentemente el rugoso, la actividad está localizada en la superficie citoplásmica. Además de la ACAT, existen otras colesterol esterasas solubles que son capaces de catalizar la síntesis de CE a partir de CNE y ácidos grasos libres, en lugar de acil-CoA. La actividad de la ACAT existe en muchos tipos celulares y se ha dicho que puede jugar un papel importante en la acumulación de CE en las células musculares lisas de la pared arterial durante el proceso de aterogénesis y en la síntesis de CE durante la formación y secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

El peso molecular de la ACAT no se ha determinado de ninguna fuente. La enzima de hígado de rata tiene actividad en un amplio rango de pH, con un valor máximo a 7.1. La ACAT posee una fuerte preferencia por oleil-CoA como substrato y las velocidades relativas de esterificación con varios substratos son: oleil-> palmitil-> estearil-> linoleil-CoA. La velocidad de reacción con palmitil-CoA es 50% menor que con oleil-CoA. La Km aparente para oleil-CoA es de 4 µmoles/1.

La especificidad de la ACAT del hígado de rata por esteroles revela que se requiere un grupo 3β -hidroxilo; los esteroles de plantas como el β -sitosterol y el campesterol son pobres substratos (<5% con respecto al colesterol), indicando que la cadena lateral alquílica juega un papel importante en la reacción enzimática. El colestanol (sin doble ligadura en posición 5) es esterificado casi a la misma velocidad que el colesterol, lo que sugiere que la doble

ligadura no es importante en el reconocimiento del substrato por la enzima.

Diversos compuestos con estructura esteroidal, causan inhibición de la ACAT in vitro e in vivo. Esteroles vegetales como la diosgenina, inhiben la absorción intestinal del colesterol posiblemente por inhibición competitiva de la ACAT, sin absorberse ellos mismos en forma importante (1).

Regulación.

Con respecto a la regulación de la ACAT, se ha observado que su actividad en los fibroblastos es muy elevada después de la administración de colesterol exógeno incorporado a lipoproteínas de baja densidad (LDL). El 25-hidroxicolesterol (25-OHC) también estimula la actividad de la ACAT y al parecer, tanto la estimulación por LDL como por el 25-OHC son independientes de la síntesis de proteínas, sugiriendo que actúan modulando la actividad de la enzima preexistente.

Algunos investigadores han mostrado que la ACAT es susceptible de ser activada por la proteína acarreadora de esteroles (SCP₂). Recientemente se ha encontrado que la ACAT es regulada por fosforilación reversible, siendo la forma activa fosforilada, al parecer por proteína quinasas microsomales independientes de la concentración de AMPc.

La regulación tardía, por cambios en la concentración de enzimas, de la ACAT en el intestino de la rata es modulada por las lipoproteínas plasmáticas, independientemente del colesterol dietético, es decir, su actividad se incrementa en respuesta a la endocitosis de las lipoproteínas mediada por un receptor.

COLESTEROL ESTER HIDROLASA. (CEH)

Aislamiento y caracterización.

En las arterias existen cuando menos dos enzimas que hidrolizan al CE: una localizada en microsomas, colesterol ester hidrolasa ácida (ACEH) y otra ubicada en el citosil y asociada con gotas lipídicas ricas en CE la colesterol ester hidrolasa neutra (NCEH).

En el tejido adiposo se han reportado igualmente dos actividades, una de origen lisosomal a pH óptimo de 4.5, que es más activa y otra de origen citoplásmico a pH óptimo de 7.0, con menor actividad. La última no se ha logrado disociar de la lipasa sensible a hormonas. Hasta la fecha solamente se ha lo-

grado purificar la ACEH por electroenfoque preparativo.

Regulación.

En la aterosclerosis, las placas de ateroma se desarrollan inicialmente con proliferación celular de la capa muscular de las arterias y éstas células acumulan CNE y CE, este depósito se asocia a una producción disminuida de prostaciclina (PGI₂) (un intermediario en el metabolismo de las prostaglandinas, que estimula la actividad de CEH; además, es un antiagregante plaquetario potente), con la consecuente aceleración del proceso aterosclerótico.

Se ha demostrado que la regulación a corto tiempo de estas enzimas procede al menos, por fosforilación reversible, siendo catalizada la fosforilación por proteína quinasas dependientes de AMPc, bajo los modelos señalados en la figura 2.

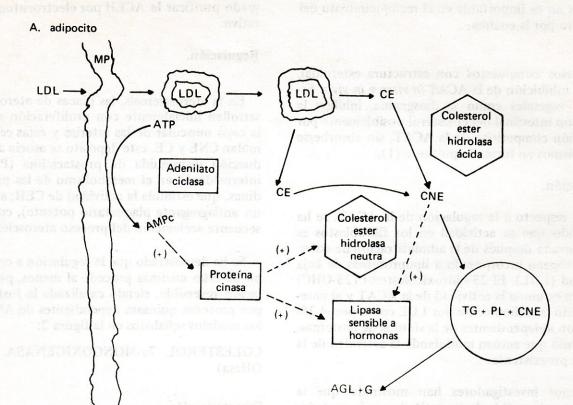
COLESTEROL 7α -MONOOXIGENASA. (7α -OHasa)

Caracterización.

El primero y el más importante paso limitante de la velocidad de síntesis de los ácidos biliares es la 7α -hidroxilación del colesterol en la fracción microsomal del hígado. La 7α -hidroxilación del colesterol es catalizada por un sistema del tipo monooxigenasa que incluye un citocromo P-450 y NADPH citocromo P-450 reductasa. Este sistema ha sido solubilizado, purificado y reconstituído a partir de microsomas de hígado de rata, conejo y humano.

Regulación.

Se ha reportado que in vivo la actividad de 7α -OHasa es disminuida por los ácidos biliares y es incrementada por el 17β-estradiol. La regulación a corto tiempo de este sistema enzimático puede ser mediada por fosforilación reversible, siendo la forma activa la fosforilada. Bajo condiciones que favorecen la fosforilación in vitro (tanto con proteína quinasas dependientes o independientes de AMPc), la colesterol 7α-OHasa puede ser activada por Mg²⁺ /ATP en concentraciones hasta de 4.0 mmol/l y 0.5 mmol/l respectivamente. Es posible que concentraciones mayores de Mg²⁺ por sí mismas regulen la actividad de 7α-OHasa ya sea activando una fosfatasa microsomal que desfosforile la 7α-OHasa o actuando directamente sobre la 7α-OHasa para hacerla más susceptible a la acción de fosfatasas. El pH óptimo para la fosforilación es de 7.4.





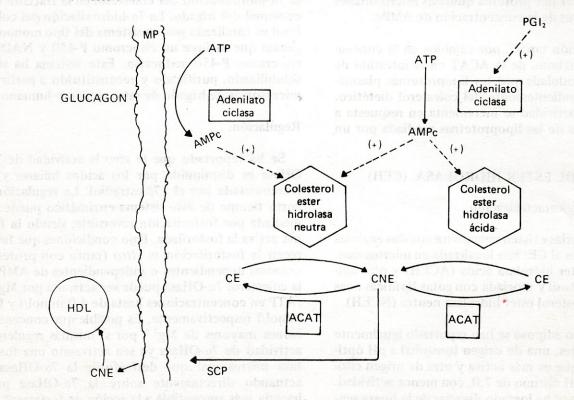


Figura 2. Regulación a corto tiempo de la actividad de CEH. A. en adipocito. B. en célula muscular lisa, MP = membrana plasmática, TG + Pl. + CNE = gota lipídica central que contiene triglicéridos, fosfolípidos y colesterol libre; AGL + G = ácidos grasos libres y glicerol.

Recientemente se ha reportado el aislamiento de una proteína citosólica del hígado de rata que estimula la 7α -hidroxilación del colesterol microsomal. Dicha proteína tiene una masa molecular relativa (Mr) de 25 000 con un pH isoeléctrico entre 6.6 y 6.9. La proteína estimuladora posee actividad de glutación-S-transferasa y es específica para 7α -OHasa. La función más probable de la proteína es facilitar la reducción de uniones disulfuro proteicas (fig. 3) en la molécula del citocromo P-450 por glutation y/o tiorredoxina (2).

3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL-CoA REDUC-TASA. (HMGR)

Aislamiento y caracterización.

La HMGR cataliza la reducción por NADPH, en dos pasos, de la D-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA al ácido mevalónico (fig. 4). Está presente en varios organismos capaces de biosintetizar compuestos poliisoprenoides como en bacterias, levaduras, plantas, insectos y mamíferos. En esta sección restringiremos nuestro análisis a la enzima derivada de mamíferos.

La HMGR de hígado es una enzima membranal, localizada en el retículo endoplásmico. Su purificación hasta homogeneidad resultó muy difícil, ya que fisiológicamente la enzima se encuentra en bajas concentraciones (< 0.01% de la proteína celular total) (3). Los procedimientos de purificación incluyen su previa solubilización, ya sea con detergentes o con ciclos repetidos de congelamiento y descongelamiento, seguidos de cromatografía de afinidad. La actividad específica de la enzima obtenida depende del diseño experimental utilizado para purificarla y varía desde 3 000 hasta 13 500 nmol de mevalonato/min/mg de proteína.

El peso molecular de la enzima solubilizada por ciclos repetidos de congelamiento y descongelamiento, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis), reveló estar entre 50 000 y 57 000. Sin embargo, posteriormente se demostró que el procedimiento de solubilización por ciclos repetidos de congelamiento y descongelamiento activa proteasas lisosomales (específicamente tiol-proteasas y proteasas dependientes de Ca²⁺), las cuales liberan péptidos de la HMGR microsomal

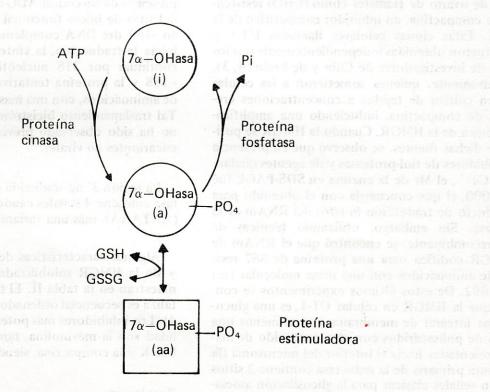


Figura 3. Regulación a corto tiempo de la 70cOHasa. 70cOHasa = sistema de colesterol 70cmonooxigenasa; (i) = forma inactiva de la 70cOHasa; (a) = forma octiva de la 70cOHasa; (aa) = forma muy activa de la 70cOHasa, GSH, GSSG = glutatión y/o tiorredoxina formas reducida y oxidada respectivamente. La proteína cinasa puede ser tanto dependiente o independiente de AMPc.

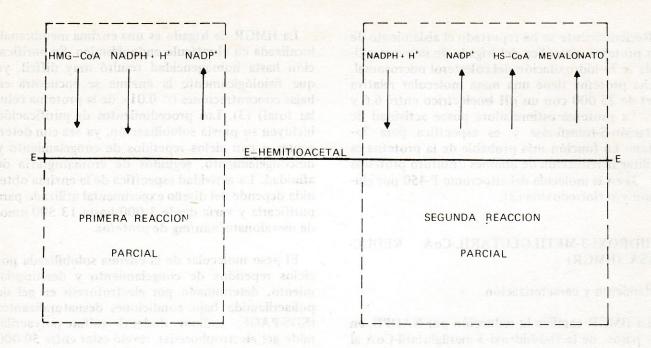


Figura 4. Reacciones parciales propuestas para la HMGR de hígado de rata E = enzima Adaptado de (7)

v el resto de la enzima conserva su actividad catalítica. Recientemente se ha logrado la purificación hasta homogeneidad de la HMGR a partir de dos clonas de ovario de Hamster chino (CHO) resistentes a la compactina, un inhibidor competitivo de la HMGR. Estas clonas celulares llamadas UT-1 y C-100 fueron obtenidas independientemente por los grupos de investigadores de Chin y de Endo (4, 3), respectivamente, quienes sometieron a las células CHO en cultivo de tejidos a concentraciones crecientes de compactina, induciendo una amplificación génica de la HMGR. Cuando la HMGR se purificó de dichas fuentes, se observó que en presencia de inhibidores de tiol-proteasas y de agentes quelantes de Ca2+, el Mr de la enzima en SDS-PAGE fué de 94 000, el que concuerda con el obtenido para el producto de traducción in vitro del RNAm de la reductasa. Sin embargo, utilizando técnicas de DNA recombinante, se encontró que el RNAm de la HMGR codifica para una proteína de 887 resíduos de aminoácidos con una masa molecular (m) de 97 092. De estos últimos experimentos se concluvó que la HMGR en células UT-1, es una glucoproteína integral de membrana, con al menos una cadena de polisacáridos con alto contenido de manosas orientadas hacia el interior del microsoma (la estructura primaria de la reductasa contiene 3 sitios que son señales clásicas para la glicosilación asociada a asparagina a saber, Asn-X-Ser (donde X puede ser cualquier α-aminoácido excepto prolina); el sitio catalítico está situado sobre el lado citoplásmico.

El RNAm de la reductasa posee una región 5' no traducida, que contiene al menos 163 nucleótidos. Una característica sobresaliente de esta región es la presencia de un codón AUG a 160 nucleótidos antes del sitio de inicio funcional de la traducción (ATG en -160 del DNA complementario). Si este codón inicia la traducción, la síntesis de proteínas puede continuar por 318 nucleótidos hasta la posición + 158 y la proteína tentativa tendría 106 resíduos de aminoácidos, con una masa molecular de 12 212. Tal traslapamiento bicistrónico de RNA mensajero no ha sido observado previamente en mensajes de eucariontes no virales.

La región 3' no traducida del RNAm de la reductasa contiene 4 señales canónicas de poliadenilación (AATAAA), más una variante (AAATTAT) (4).

Algunas características de la HMGR microsomal y de la HMGR solubilizada de hígado de rata se muestran en la tabla II. El tipo de reacción que cataliza es secuencial ordenado para dos sustratos (fig. 4). Los inhibidores más potentes usados en la actualidad son la mevinolina, también llamada monacolina K y la compactina, siendo mejor la mevinolina.

Regulación.

La regulación de la HMGR involucra dos mecanismos:

TABLA II.	CARACTERISTICAS DE LA HMGR	
PARAMETRO	HMGR microsomal	HMGR solubilizada
Km para D-HMG-CoA	$1 - 3 \mu \text{ moles/l}$	$1 - 3 \mu \text{ moles/l}$
Km para NADPH	$30 - 70 \mu \text{ moles/l}$	$30 - 70 \mu \text{ moles/l}$
pH óptimo	6.3-7.3	6.3-7.3
Ki para mevinolina	0.6 n moles/1	0.6 n moles/1
Ki para compactina	1.4-10.0 n moles/l	1.4-10.0 n moles/I
Activación alostérica		#
por NAD [†] y NADH	SI	NO
Mr	97 092	50 000-57 00C

- a) Regulación a corto tiempo (fig. 5)
 - 1.- Efecto alostérico e isostérico.
 - 2.—Modificación covalente por fosforilación reversible de la HMGR y de las reductasa cinasas (HMGR cinasas).
- b) Regulación a largo tiempo
 - 1.— Cambios en la concentración de enzimas por síntesis y/o degradación.
- a.1. Regulación por efecto alostérico e isostérico.

La actividad de HMGR en la levadura así como en el hígado de la rata, es modulada por agentes con grupos sulfhidrilo y es probable que también sea modulada por cambios en la fluidez de la membrana.

Los efectores isostéricos negativos conocidos son el NADP⁺ y la mevalonolactona, y los mecanismos básicos de dichas modulaciones no se conocen en detalle.

La HMGR microsomal (no la solubilizada) se activa alostéricamente por el NAD⁺ y el NADH y al parecer, las interacciones entre el sitio catalítico y el o los sitios reguladores requiere de la presencia de puentes disulfuro, ya que los agentes con grupos sulfhidrilo tales como el glutatión activan completa-

mente a la HMGR microsomal y la hacen independiente del efector alostérico.

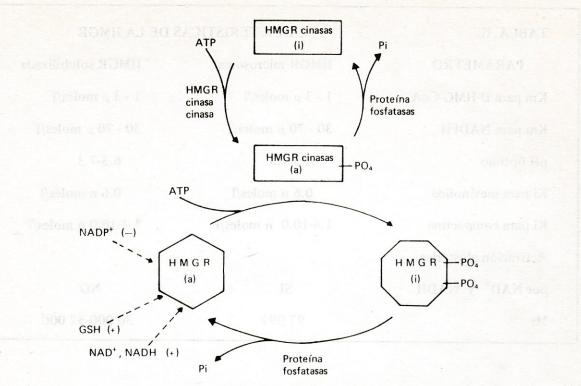
a.2. Modificación covalente por fosforilación reversible de la HMGR y de las HMGR cinasas.

El mecanismo de regulación a corto tiempo que se conoce mejor es el de la fosforilación reversible, conocido inicialmente como el sistema bicíclico de regulación y es debido a la actividad de reductasa cinasas y de proteína fosfatasas.

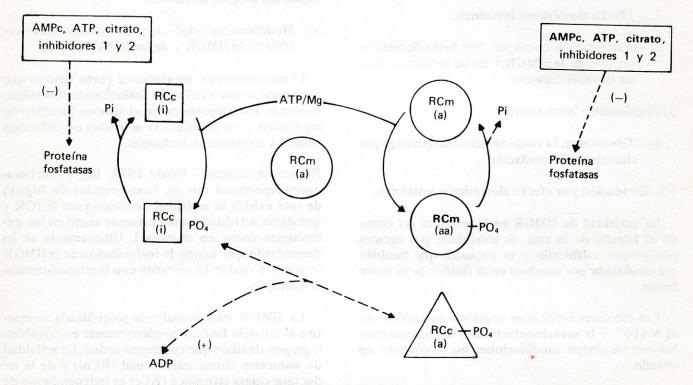
Reductasa cinasas.— Desde 1973, Beg y colaboradores reportaron que en homogenados de hígado de rata existía la actividad de cinasa para HMGR y que dicha actividad estaba presente tanto en los microsomas como en el citosol. Ultimamente se ha demostrado que ocurre la fosforilación de la HMGR in vivo, la cual se incrementa con la administración de glucagon.

La HMGR microsomal o la solubilizada se inactiva al unírsele fosfato covalentemente en dos sitios o grupos de sitios que contienen serina. La actividad de reductasa cinasa microsomal (RCm) y de la reductasa cinasa citosólica (RCc) es independiente de los cambios en las concentraciones de AMPc.

La RCm ha sido purificada hasta aparente homogeneidad y tambien posee actividad de reductasa cinasa cinasa, es decir, cataliza su autofosforilación, incrementando su actividad hacia HMGR por un



A. Esquema de regulación de la HMGR.



B. Esquema de regulación de las HMGR cinasas (RCc y RCm).

Figura 5. Regulación a corto tiempo de la HMGR. A regulación de la HMGR; B. regulación de las HMGR cinasas. HMGR (a) = forma activa de la HMGR; HMGR (i) = forma inactiva de la HMGR; RCc (i) = forma inactiva de la reductasa cinasa citosólica; RCc (a) = forma activa de la reductasa cinasa citosólica; RCm (a) = forma poco activa de la reductasa cinasa microsomal; RCm (aa) = forma muy activa de la reductasa cinasa microsomal. Las líneas contínuas indican modulación por modificación covalente y las líneas discontínuas indican modulación por modificación no covalente. (+) = aumenta la actividad enzimática; (-) = disminuye la actividad enzimática. GSH = glutatión y/o tiorredoxina (forma reducida).

factor de dos y la fosforila en solamente uno de los dos sitios anteriormente descritos, con una inactivación de la HMGR hasta del 64%.

La RCc solamente ha sido parcialmente purificada y para expresar su actividad requiere de nucleósidos difosfato y trifosfato. El requerimiento de nucleósidos difosfato por la RCc es único entre las ATP-fosfotransferasas, a excepción de las nucleósido difosfato cinasas. La actividad de la RCc no se afecta por las concentraciones de AMPc, GMPc, Ca²⁺, calmodulina o alguna combinación de estos factores, los cuales tampoco impiden su requerimiento por ADP. La constante de activación ka de la RCc por ADP a concentraciones saturantes de ATP, es de 1.4 moles/l, una concentración aproximadamente el doble de la reportada para la concentración intracelular de ADP en hepatocitos (cerca

de 0.8 m moles/l). A una concentración de ADP de 0.8 m moles/l, la RCc puede activarse a un tercio de la velocidad máxima. En presencia de 2.0 m moles/l de ADP, la Km para el ATP es de 140 μ moles/moles/l,

De manera interesante, la RCc también posee actividad de cinasa para la glucógeno fosforilasa cinasa, sugiriendo su posible participación en la integración metabólica (5).

Proteína Fosfatasas (PF).— Ingebritsen reportó que las actividades de PF (sólo las serín-fosfatasas) involucradas en la regulación de las vías principales del metabolismo intermedio pueden ser explicadas por cuatro actividades enzimáticas, convenientemente divididas en dos clases, tipo 1 (PF-1) y tipo 2 (PF-2) (tabla III).

		SENSIBILIDAD A	NUMERO DE	REQUERIMIENTOS Y
TIPO	LOCALIZACION	INHIBIDOR 1 y 2	SUBSTRATOS	SUBSTRATO CARACTERISTICO
1	MICROSOMAL	SI	VARIOS	SUBUNIDAD β DE GLUCOGENO
	e bi at morsen a di a			FOSFORILASA CINASA
2A	CITOSOLICA	NO	VARIOS	CADENA LIGERA DE MIOSINA
				Y ATP-CITRATO LIASA
2B	CITOSOLICA	NO	no officerone is	SUBUNIDAD α DE GLUCOGENO
				FOSFORILASA CINASA, INHI -
				BIDOR-1 y CADENA LIGERA
				DE MIOSINA. (enzima dependien-
	la actividad de 14MC K este unida con el cicli			te de calmodulina-Ca ²⁺)
2C	CITOSOLICA	NO	VARIOS	HMGR y RC. (enzima dependiente

Tipo 1.— Se caracterizan por desfosforilar la subunidad β de la glucógeno fosforilasa cinasa y por ser inhibidas potentemente por dos proteínas termoestables, inhibidor-1 e inhibidor-2.

Tipo 2.— En este grupo se encuentran las actividades de proteína fosfatasa que desfosforilan preferencialmente la subunidad α de la glucógeno fosforilasa cinasa y por ser insensibles a los inhibidores 1 y 2.

El inhibidor-1 sólo es activo cuando se fosforila por una proteína cinasa dependiente de AMPc.

Hegardt y colaboradores publicaron que la actividad de fosfatasa para HMGR podía ser inhibida por fosfato y por pirofosfato y que dicho efecto se revirtió por cationes divalentes. La activación por cationes y la inactivación por sus agentes quelantes, sugiere que las reductasa fosfatasas pueden ser metaloenzimas con metal unido en el sitio catalítico;

también han mostrado que varios ácidos policarboxílicos inhiben a las reductasa fosfatasas de Lígado de rata, siendo más potente el citrato (I_{50} 0.1-0.4 mmoles/1) para todas las HMGR fosfatasas aisladas por ellos, presentando evidencia de la estrecha correlación entre la capacidad quelante de los ácidos policarboxílicos sobre los cationes divalentes y la inhibición de las reductasa fosfatasas.

La cantidad total de tipos de enzimas con actividad de proteína fosfatasa para HMGR no se ha determinado y aún se desconoce cual de todas las actividades podría ser la más importante *in vivo*.

b.1. Regulación a largo tiempo de la HMGR por cambios en la concentración de enzima ya sea por síntesis y/o degradación.

Diversos estudios indican que la cantidad de HMGR es cuidadosamente regulada por cambios en las velocidades de su síntesis y/o de su degradación. La transcripción del RNAm de la reductasa es susceptible a regulación por retroalimentación negativa mediada por colesterol y otros productos isoprenoides, una acción reguladora que controla los niveles de colesterol en las células y el plasma.

Se ha demostrado que tanto la endocitosis de lipoproteínas de baja densidad (LDL) mediada por receptor, el 25-hidroxicolesterol (25-OHC) y otros esteroles oxigenados; reducen la actividad de HMGR por disminuir su síntesis y aumentar su degradación. Por el contrario, la compactina, un inhibidor competitivo de la HMGR, induce un incremento en la velocidad de síntesis de la HMGR al aumentar la velocidad de síntesis de su RNAm y su traducción, así como también disminuye la velocidad de degradación de la reductasa (3), causando su acúmulo. La vida media de la HMGR es de 2 horas, mientras que la vida media aparente de su RNAm es de 5 horas; tanto la HMGR como su RNAm muestran ritmos circadianos.

Los fibroblastos humanos de pacientes con hipercolesterolemia familiar carecen de receptores funcionales para LDL y la actividad de reductasa de estas células no es inhibida por LDL, pero si es regulada por el 25-OHC, evidentemente, ambos mecanismos son independientes.

Estudios realizados en células mutantes CHO, resistentes a 25-OHC, mostraron que la HMGR es resistente a la inhibición por esteroles. El fenotipo de estas células, determinado por análisis de hibridización celular, reveló que pueden ser clasificadas como dominantes o recesivas. Las mutantes recesivas caen dentro de dos grupos de complementación

(un grupo de complementación indica una unidad génica como mínimo), en el primer grupo (CrA) hubo una clona (Cr6) que fué defectuosa en la degradación de la reductasa, sugiriendo que al menos tres genes están involucrados en el mecanismo de regulación de la reductasa.

REGULACION COORDINADA DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL

En las células eucariontes, muchos de los efectos debidos a la estimulación extracelular, son mediados intracelularmente por segundos mensajeros tales como: AMPc, GMPc, inositol trifosfato y diacilglicerol. Existe un acuerdo general de que en los eucariontes, el AMPc actúa exclusivamente a través de proteína quinasas dependientes de AMPc, mientras que las funciones del GMPc aún no están definidas, sin embargo, se piensa que puede actuar a nivel de proteína quinasas dependientes de GMPc y/o que su velocidad de recambio, por generar pirofosfato y protones sea la responsable de su efecto. El diacilglicerol y el inositol trifosfato funcionan como segundos mensajeros activando dos vías independientes, pero paralelas, que pueden ser responsables de la liberación de el ácido araquidónico (precursor de eicosanoides) y de la activación de la guanilato ciclasa. Diacilgliceral funciona en el plano de la membrana, incrementando la fosforilación de proteínas al activar a la proteína quinasa C. El inositol trifosfato se libera al citosol para movilizar el Ca²⁺ de los almacenes intracelulares. Este sistema de señales bifurcadas genera un repertorio diverso de mensajes intracelulares proporcionando la versatilidad necesaria para controlar un amplio rango de procesos celulares, incluyendo la proliferación celular. Recientemente, la actividad de HMGR ha mostrado estar íntimamente unida con el ciclo celular de células sincronizadas en cultivo. La inhibición de esta enzima, resulta en una inhibición de la síntesis de DNA y/o la mitosis, en diversos tipos de células.

Se ha sugerido que *in vivo* la relación tiol/disulfuro puede servir como tercer mensajero en respuesta a cambios en la concentración intracelular de AMPc (la relación tiol/disulfuro disminuye al incrementar el AMPc) y que la actividad en las enzimas clave en la glucólisis/gluconeogénesis puede ser regulada ya sea directa o indirectamente por los cambios en la relación tiol/disulfuro (la disminución en la relación trae como consecuencia una estimulación de la gluconeogésis y una inhibición de la glucólisis); es interesante recordar que los cambios en la actividad de 7α-OHasa ocurren en paralelo con cambios en la actividad de HMGR y que ambas enzimas pueden ser moduladas por agentes con grupos sulfhidrilo (2) como se muestra en las figuras 3, 4 y 5.

Las enzimas clave en el metabolismo del colesterol tienen características en común, como son: su localización microsomal y el que pueden ser reguladas por fosforilación reversible (fig. 6).

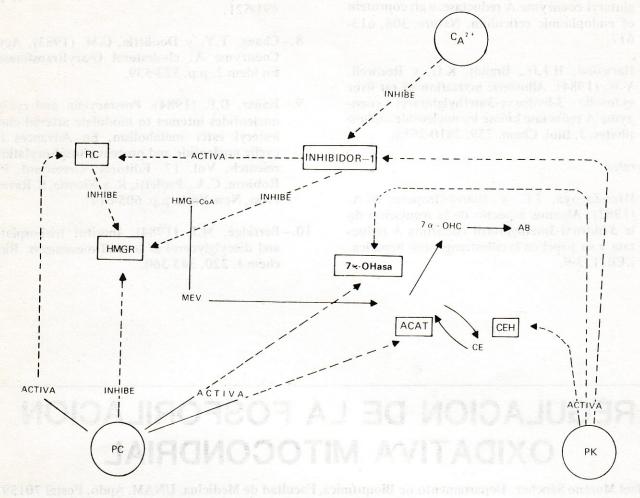


Figura 6. Regulación por fosforilación reversible de las enzimas clave en el metabolismo del colesterol. PC=Fosforilación independiente de AMPc PK=Fosforilación dependiente de AMPc, CE=Colesterol esterificado MEV=Mevalonato AB=Acidos biliares.

No hay duda de que las vías de síntesis y utilización del colesterol son reguladas coordinadamente con las demás vías del metabolismo intermedio y que la investigación básica de dicha regulación arrojará datos que permitan conocer mejor el metabolismo en situaciones fisiológicas y patológicas.

REFERENCIAS

Específicas

1.— Juárez-Oropeza, M.A., Briones-Niño, R. y Díaz-Zagoya, J.C.(1983). Distribución tisular de diosgenina tritiada administrada por vía oral, en la rata. Memorias de la XXIII reunión de la Soc. Mex. Nutr. y Endocrinol. p. 12.

- 2.—Danielsson, H., Kalles, I. y Wikwall, K. (1984).
 Regulation of hydroxylations in biosynthesis of bile acids. J. Biol Chem. 259, 4258-4262.
- Hardeman, E.C., Endo, A. y Simoni, R.D. (1984). Effects of compactin on the levels of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase in compactin-resistant C100 and wild-type cells. Arch. Biochem. Biophys. 232, 549-561.

- 4.—Chin, D.J., Gil, G., Russell, D.W., Liscum, L., Luskey, K.L., Basu, S.K., Okayama, H., Berg, P., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1984). Nucleotide sequence of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of endoplasmic reticulum. Nature. 308, 613-617.
- Harwood, H.J.Jr., Brandt, K.G. y Rodwell, V.W. (1984). Allosteric activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by nucleoside diphosphates. J. Biol. Chem. 259, 2810-2815.

Generales

6.—Díaz-Zagoya, J.C. y Juárez-Oropeza, M.A. (1982). Algunos aspectos de la regulación de la 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A reductasa y su papel en la colesterogénesis hepática. DEB. 1, 3-9.

- 7.—Chang, T.Y. (1983). Mammalian HMG-CoA reductase and its regulation. En The enzymes. 3rd edition, Vol. XVI. Lipid enzymology. Editor: Boyer, P.B. Academic Press, Orlando. p.p. 491-521.
- 8.—Chang. T.Y. y Doolittle, G.M. (1983). Acyl Coenzyme A: cholesterol O-acyltransferase. En idem 2. p.p. 523-539.
- 9.—Hajjar, D.P. (1984). Prostacyclin and cyclic nucleotides interact to modulate arterial cholesteryl ester metabolism. En Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research, Vol. 17. Editores: Greengard, P., Robison, C.A., Paoletti, R. y Nicosia, S. Raven Press, New York, p.p. 605-614.
- 10.—Berridge, M.J. (1984). Inositol trishosplate and diacylglycerol as second messengers. Biochem J. 220, 343-360.

REGULACION DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA MITOCONDRIAL

Rafael Moreno Sánchez. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. Postal 70159, 04510 México, D. F.

En los mamíferos, el ATP proveniente de la glicólisis y de la fosforilación oxidativa es la fuente de energía utilizada para realizar las diversas funciones celulares. En particular, las actividades del cerebro y corazón dependen prácticamente en un 100% del ATP suministrado por la mitocondria. Entender cómo se regula la síntesis de ATP en las mitocondrias es uno de los problemas centrales de la bioenergética que en la actualidad se estudian intensamente. La fosforilación oxidativa mitocondrial es la síntesis de ATP acoplada a la actividad de la cadena respiratoria. De acuerdo con la teoría quimiosmótica, la oxidación del NADH y FADH₂ (formados en el ciclo de Krebs y la β-oxidación) a través de la cadena de transportadores de electrones genera un gradiente electroquímico de H⁺, el cual es aprovechado por la ATP sintetasa (FoF₁-ATPasa) para catalizar la formación de ATP a partir de ADP y Pi intramitocondriales (Fig. 1).

ABREVIATURAS

 $[\]triangle G_{ATP}$ ex = Potencial de fosforilación extramitocondrial (cantidad de energía almacenada en forma de ATP externo); $\triangle G_{redox\ 1+2}$ = Potencial de óxido-reducción de los sitios 1 y 2 de la cadena respiratoria; C^{2+} , C^{3+} = Citocromo C reducido y oxidado respectivamente; Vm = Velocidad máxima de una enzima a concentración saturante de sustrato; Complejo b- c_1 = Segmento de la cadena respiratoria que contiene los eritrocitos b y c.

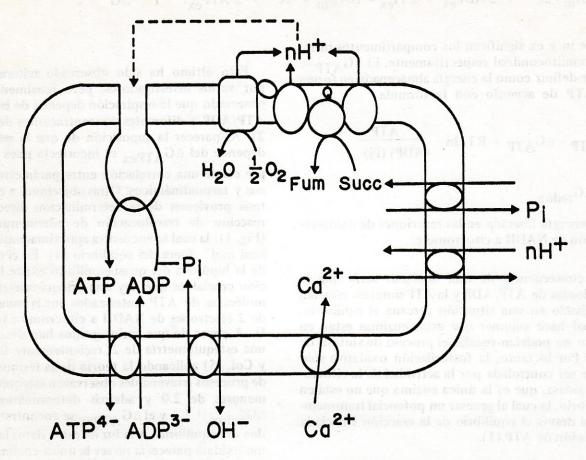


Figura 1. FOSFORILACION OXIDATIVA Y TRANSPORTE DE Ca²⁺ EN MITOCONDIRAS. El succinato entra a la mitocondria en intercambio electroneutro con Pi a través del acarreador de dicarboxilatos. La succinato deshidrogenasa convierte al succinato en fumarato y dona los electrones a la cadena respiratoria. La cadena respiratoria genera un gradiente electroquímico de H⁺ interior negativo, utilizancio la energía libre c'e las reacciones de óxido-rreducción Este gradiente es empleado por la ATP sintetasa para formar ATP a partir de ADP y Pi. El Pi ingresa a la mitocondria por medio del acarreador de fosfatos que realiza un intercambio electroneutro con OH. El ADP^{3*} se intercambia electrogénicamente con ATP^{4*} interno a través del translocador de adenin-nucleótidos. El Ca^{2*} entra por medio de un acarreador electroforético sensible a rojo de rutenio y sale en intercambio con H⁺ en mitocondrias de hígado o con Na⁺ en mitocondrias de corazón.

En el análisis del control de la síntesis mitocondrial de ATP deben considerarse dos aspectos: (a) el termodinámico, que se refiere al suministro de energía proveniente de la cadena respiratoria y (b) el cinético, que indica la rapidez con que se realiza el proceso. Si el gradiente electroquímico de H⁺ se mantuviera siempre constante y de una magnitud suficientemente grande para mantener la síntesis de ATP, podría esperarse que la regulación de la fosforilación fuera estrictamente cinética. Por otro lado, si la velocidad y la magnitud con que se genera el gradiente no fueran elevadas, podría suponerse una contribución importante de los factores termodinámicos en el control de la síntesis de ATP.

Existen en este momento 3 hipótesis que tratan de explicar la forma como se regula la fosforilación

oxidativa. La hipótesis del quasi-equilibrio o de la citocromo oxidasa que considera el aspecto termodinámico (1, 3) la hipótesis de la etapa limitante atribuída a la translocasa de ATP/ADP que analiza el aspecto cinético (1, 4, 6, 7) y la hipótesis del control múltiple que involucra los dos aspectos cinético y termodinámico (2, 8).

HIPOTESIS DEL CUASI-EQUILIBRIO

En esta hipótesis se propone que los 2 primeros sitios de conservación de energía de la cadena respiratoria (NADH deshidrogenasa y complejo b- c_1) se encuentran en equilibrio termodinámico con el potencial extramitocondrial de fosforilación $\Delta G_{A\,T\,P\,e\,x}$ de acuerdo con la siguiente reacción:

$$NADH_{m} + 2c^{3+} + 2 ADP_{ex} + 2 Pi_{ex} = NAD_{in}^{+} + 2c^{2+} + 2 ATP_{ex}$$
. I $\triangle G \stackrel{\sim}{=}$

donde in y ex significan los compartimentos intray extramitocondrial respectivamente. El $\triangle G_{ATP}$ se puede definir como la energía almacenada en forma de ATP de acuerdo con la fórmula

$$\triangle G_{ATP} = \triangle G_{ATP} + RT \text{ In } \frac{ATP}{(ADP) (Pi)}$$

y el $\triangle G_{redox}^{1+2}$

es la energía liberada en las reacciones de óxido-reducción de NADH a citocromo c.

Una consecuencia de esta hipótesis sería que la translocasa de ATP/ADP y la ATP sintetasa estarían trabajando en una situación cercana al equilibrio, lo cual hace suponer que estas enzimas están en exceso no podrían regular el proceso de síntesis de ATP. Por lo tanto, la fosforilación oxidativa sólo puede ser controlada por la actividad de la citocromo oxidasa, que es la única enzima que no está en equilibrio, la cual al generar un potencial transmembranal desvía el equilibrio de la reacción I hacia la formación de ATP (1).

El apoyo experimental a esta hipótesis ha provenido principalmente del grupo de Wilson (1, 3). Estos investigadores han empleado 3 diferentes protocolos para demostrar que el $\triangle G_{redox}^{1+2}$ es igual al $\triangle G_{ATPex}$ en mitocondrias aisladas: (a) midiendo el segmento de la cadena respiratoria NADH > cit c utilizando ferricianuro como aceptor final de electrones e inhibiendo la citocromo oxidasa con cianuro; (b) midiendo polarográficamente la actividad de toda la cadena respiratoria en el sentido NADH \rightarrow O₂ y (c) usando la reversa de electrones desde citocromo c → NADH mediante la hidrolisis de ATP. En todos estos casos se determina la concentración de los componentes de la reacción I cuando cesa la fosforilación y se ha alcanzado el equilibrio termodinámico y entonces se calculan los valores de $\triangle G_{redox}$ 1 + 1 y ex. ATP ex. De acuerdo con la hipótesis del cuasi-equilibrio los valores obtenidos para ambos potenciales fueron casi idénticos y oscilaron entre 25 a 30 kcal mol⁻¹ (1, 3).

En la hipótesis del cuasi-equilibrio también se postula que la velocidad de respiración depende de la relación ATP/(ADP) (Pi) y no de la relación ATP/ADP (1, 3).

Esto último ha sido observado reiteradamente por varios investigadores, pero igualmente se ha observado que la respiración depende de la relación ATP/ADP a diferentes concentraciones de Pi (Fig. 2). Al parecer la suposición de que la respiración depende del \(\Delta G_{ATPex} \) es incorrecta pues no siempre existe una correlación entre parámetros cinéticos y termodinámicos: Otras objeciones a esta hipótesis provienen de la determinación directa de la reacción de translocación de adenin-nucleótidos (Fig. 1), la cual se encuentra aproximadamente 2.08 kcal mol⁻¹ fuera del equilibrio (4). En el concepto de la hipótesis del quasi-equilibrio existe la suposición crucial de que hay una estequiometría de 2.0 moléculas de ATP sintetizados por la transferencia de 2 electrones de NADH a citocromo c (ecuación I). A pesar de que varios grupos han determinado una estequiometría de 2, recientemente Lamasters y Col. (5) aplicando la teoría de la termodinámica de procesos irreversibles observaron estequiometrías menores de 2.0 y además determinaron que el $\triangle G_{redox}$ 1 + 2 y el $\triangle G_{ATPex}$ se encontraban alejados del equilibrio. A la luz de estos datos la citocromo oxidasa parecería no ser la única enzima responsable de la regulación de la fosforilación oxidativa, pues ya no sería la única enzima trabajando fuera del equilibrio.

HIPOTESIS DE LA ETAPA LIMITANTE

Esta hipótesis supone que en una vía metabólica la enzima que tiene la Vmax mas baja es la que determina el flujo total.

En el caso de la fosforilación oxidativa, el translocador de ATP/ADP parece ser el componente que tiene la más baja capacidad catalítica (aprox. 300 nmol min⁻¹ mg⁻¹ a 30°C en mitocondrias de hígado). Sin embargo, la ATP sintetasa, el acarreador de fosfato y el acarreador de dicarboxilatos tienen una Vmax que no es muy diferente, en un rango entre los 300-400 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Durante la fosforilación oxidativa se requiere que el translocador introduzca ADP externo y saque ATP interno (Fig. 1), pero el ATP que se acumula en el exterior puede competir con el ADP por los sitios de translocación, por lo cual esta hipótesis postula que la velocidad es dependiente de la relación extramitocondrial de ATP/ADP, sin importar la concentración de Pi (1, 6.7) sincism of surer as amore armor of molinice

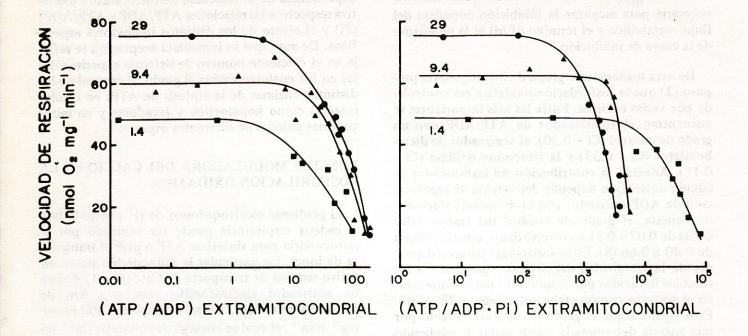


Figura 2! VARIACION DE LA VELOCIDAD DE RESPIRACION EN FUNCION DE LAS RELACIONES EXTRAMITOCONDRIALES DE ATP/ADP y ATP/(ADP) (Pi). Se incubaron mitocondrias con ATP y succinato y diferentes concentraciones de Pi. La fosforilación oxidativa se inició añadiendo diferentes cantidades de hexocinasa. Durante el estado estacionario se paró la reacción y se determinaron los niveles externos de ATP, ADP y Pi Los números en las gráficas indican la concentración de Pi. De Kunz y cols. (6)

Esta predicción ha sido corroborada por varios grupos (Fig. 2); sin embargo existe controversia sobre si la velocidad de fosforilación sólo depende de la relación externa de ATP/ADP o también de la intramitocondrial (6). En cualquiera de los casos el translocador de adenin-nucleótidos sería la etapa limitante de la velocidad pues este transportador requiere de sustratos internos y externos para su funcionamiento.

Otras evidencias que favorecen esta hipótesis provienen de experimentos con inhibidores específicos del translocador de ATP/ADP: el atractilósido y el carboxiatractilósido. Estos inhibidores actúan del lado citosólico de manera competitiva y no-competitiva, respectivamente. En estos experimentos se supone que si el inbibidor disminuye la actividad del translocador y paralelamente también reduce la velocidad de síntesis de ATP, entonces el proceso de fosforilación oxidativa depende exclusivamente del funcionamiento del acarreador de ATP/ADP. Esta predicción se cumple sólo si se utiliza atractilósido pero no con carboxiatractilósido (fig. 3). Además, la misma curva hiperbólica se observa cuando se emplea inhibidores de otras enzimas que participan en la fosforilación por ejemplo: cianuro, inhibidor no competitivo de la citocromo oxidasa; con n-butilmalonato, inhibidor competitivo del acarreador de dicarboxilatos. Por tanto, el translocador de ATP/ADP parecería no ser la única etapa limitante de la velocidad de síntesis de ATP, al menos considerando los criterios hasta ahora empleados de la relación ATP/ADP y la titulación con inhibidores.

HIPOTESIS DEL CONTROL MULTIPLE

Recientemente, Groen (2) y Wanders (8) con sus respectivos colaboradores desarrollaron una teoría para el control metabólico la cual permite cuantificar el grado de control ejercido por una enzima sobre el flujo total en estado estacionario sin necesidad de alterar las condiciones experimentales. Este grado de control (Ci) se define como el cambio fraccional del flujo metabólico en estado estacionario (F) inducido por un cambio fraccional en alguna enzima (E;):

$$Ci = \frac{dF/F}{dE_i/E_i}$$

Si se utiliza un inhibidor irreversible para modificar específicamente la actividad de alguna enzima, la ecuación II se puede expresar como:

$$Ci = -\frac{I_{max}}{F} \frac{dF}{dI} III$$

Donde I_{max} es la cantidad de inhibidor mínima necesaria para alcanzar la inhibición completa del flujo metabólico y el término dF/dI es la pendiente de la curva de inhibición.

De esta manera, este grupo de investigadores propuso (2) que la fosforilación oxidativa era controlada por varias enzimas. Entre las más importantes se encuentran el translocador de ATP/ADP con un grado de control (Ci = 0.30), el acarreador de dicarboxilatos (Ci = 0.33) y la citocromo oxidasa (Ci = 0.17). Además, la contribución del translocador de adenin-nucleótido depende del sistema de regeneración de ADP utilizado: con el sistema de glucosa + hexocinasa, el grado de control del translocador oscila de 0.07 a 0.31 y con creatina + creatina cinasa de 0.40 a 0.66 (8). Estas variaciones parecen depender de la reactividad del sistema regenerante a los cambios inducidos por el inhibidor del translocador en el sustrato común (relación externa ATP/ADP). Esto significa que el grado de control ejercido por una enzima determinada puede variar dependiendo de la velocidad de flujo que mantenga una vía metabólica, de tal manera que la suma de todas las etapas involucradas sea siempre igual a la unidad. Para el caso de la síntesis mitocondrial de ATP, el nivel de estado estacionario será establecido por la vía consumidora de energía, sea en el citosol o en la matriz mitocondrial.

Este nuevo concepto en regulación metabólica parece sintetizar todas las observaciones sobre la

dependencia de la velocidad de fosforilación oxidativa respecto a las relaciones ATP/ADP y ATP/ADP) (Pi) y el efecto de los distintos inhibidores específicos. De aquí que su inmediata aceptación se refleje en el creciente número de sistemas experimentales en los cuales se evalúa el grado de control de las distintas enzimas de la síntesis de ATP: en células intactas como hepatocitos y levaduras y en mitocondrias aisladas de diferentes órganos.

FUNCION MODULADORA DEL CALCIO EN LA FOSFORILACION OXIDATIVA

El gradiente electroquímico de H⁺ generado por la cadena respiratoria puede ser utilizado por la mitocondria para sintetizar ATP o para el transporte de iones. En particular la mitocondria posee un activo sistema de transporte de Ca²⁺ (Fig. 1). Existe un acarreador electroforético con una Km de 5-20µM y una V_{Max} de aproxidamente 400 nmo1 mg⁻¹ min⁻¹, el cual se encarga de acumular Ca²⁺ en el interior de la mitocondria y también se encuentra un intercambiador Ca²⁺/nH⁺ con una estequiometría aún no bien definida y que se ocupa de expulsar Ca2+. Cuando la mitocondria acumula cantidades masivas de Ca2+ (más de 100 nmol mg-1) ocurren dos tipos de inhibición en la síntesis de ATP: si el transporte de Ca2+ y la fosforilación ocurren simultáneamente, se establece una competencia por la energía disponible; si la fosforilación se realiza en mitocondrias que ya contienen grandes cantida-

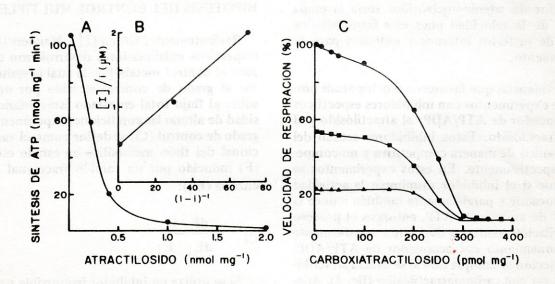


Figura 3. EFECTO DE INHIBIDORES ESPECIFICOS DEL TRANSLOCADOR DE ATP/ADP SOBRE LA FOSFORILACION OXIDA-TIVA. A La síntesis de ATP se midió por la luminiscencia producida en la reacción de la luciferasa. En B se muestra una gráfica de conservación de ligando siendo la viarable independiente la inhibición porcentual y la variable dependiente la fijación del inhibidor. La linearidad de la gráfica sugiere que la inhibición fraccional de la fosforilación es igual a la fracción de atractilósido unido al translocador de ATP/ADP. De Lemasters y Sowers(7) C. Las diferentes velocidades de síntesis de ATP se ajustaron con hexocinasa. De Groen y cols.

des de Ca²⁺, la inhibición parece estar asociada a una disminución de la actividad del translocador de ATP/ADP inducida por un eflujo de los adenín-nucleótidos intramitocondriales (9).

Sin embargo, las concentraciones de Ca²⁺ determinadas en el citosol de varios tipos de células están en el rango de 10⁻⁷ M a 10⁻⁵ M. En este rango de concentraciones recientemente se describió que el Ca²⁺ tenía un efecto estimulador de la velocidad de síntesis de ATP en mitocondrias de hígado (10). En la tabla la se muestran las variaciones en la velocidad de fosforilación cuando las mitocondrias se incuban en medios con diferentes concentraciones externas de Ca2+. Como puede observarse la velocidad de síntesis de ATP cae abruptamente en un medio con 10⁻⁹ M de Ca²⁺ mientras que con 10⁻⁶ M. la velocidad de síntesis de ATP disminuye ligeramente. Esto correlaciona bien con los niveles intenos de Ca²⁺ a lo largo del tiempo (tabla Ib). Con Ca2 + externo a una concentración de 10-9 M, el Ca²⁺ intramitocondrial disminuye progresivamente mientras que con 10⁻⁶ M, de Ca²⁺ el Ca²⁺ interno permanece constante y alto. En los experimentos, con 5x10⁻⁶ M de Ca²⁺ puede observarse que la velocidad de fosforilación se inhibe fuertemente y ésto parece deberse a la acumulación masiva de Ca2 +.

Tabla Ia. EFECTO DEL Ca²⁺ EXTERNO SOBRE LA SINTESIS DE ATP

Se incubaron mitocondrias con las concentraciones de Ca²⁺ y los tiempos mostrados. Se transfirieron alicuotas a tubos con ADP. Después de 1 min se paró la reacción y se determinó la cantidad de ³² P-ATP formado. De ref. 10.

Tabla Ib. VARIACION DEL Ca²⁺ INTRAMITO-CONDRIAL A DIFERENTES CONCENTRACIO-NES DE Ca²⁺ EXTERNO.

El Ca²⁺ interno se determinó por absorción atómica después de incubar mitocondrias en las concentraciones de Ca²⁺ y tiempos mostrados. A los 5 min se añadió ADP

tiempo	$[Ca^{2+}]$	10 ⁻⁹ M	10-6	5x10 ⁻⁶ M
1 min		20.4±1.8	19.4±1.5	27.2±7.3
5		10.8±1.1	22.2±3.3	31.1±8
10		5.9±2.4	29.2±2	85.9±8.3

RESPIRACION DE ESTADO 3 (natomos O mg⁻¹ min⁻¹)

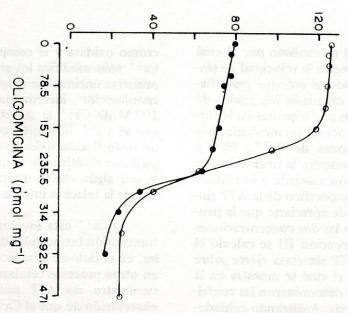


Figura 4. EFECTO DEL INHIBIDOR ESPECIFICO DE LA ATP SINTETASA, OLIGOMICINA SOBRE LA FOSFORILACION OXIDATIVA. La síntesis de ATP medida por consumo de oxígeno se inició añadiendo ADP a una suspensión de mitocondrias incubadas con Ca²⁺ externo 10⁻⁹ M (• - •) o con Ca²⁺ externo 10⁻⁶ M (o-o) por 5 min en presencia de diferentes cantidades de oligomicina. De Moreno-Sánchez (10)

TABLA II. FUERZAS DE CONTROL DE VARIAS ETAPAS DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA.

Las fuerzas de control (Ci) se calcularon de acuerdo con la ref. 2 usando los datos de la figura 4 y otras curvas de titulación con los inhibidores indicados. Se utilizaron los siguientes valores de Ki para los cálculos: Azida, 250 μ M; cianuro, 10 μ M; HQNO 64 nM; NEM, 60 μ M; malato 0.23 mM; mersail 5 μ M; fenilsuccinato 0.7/mM; y n-butilmalonato 0.35 mM. Se utilizaron los siguientes valores de Km: Pi 1.6 mM; succinato 1.17mM; Asi, 0.34 mM. Carboxiatractilosilido, oligomicina y antimicina se consideraron como inhibidores irreversibles.

ENZIMA	[Ca ²⁺] 1	$\frac{\text{Ci}}{0^{-9} \text{M}} = 10^{-6} \text{M}$	INHIBIDOR
- CO		6 40	al commence of the commence of
Acarreador de	0.32	0.48	Carboxiatractilosido
ATP/ADP	AV dist	Mark Hall	one con in the sector and control of
ATP sintetasa	0.21	0.05	Oligomicina /
Citocromo oxidasa	0.16	0.20	Azida Azida Azida
	0.27	0.23	Cianuro
Complejo B-C ₁	0.30	0.27	HQNO
ns zelnikossiki sasuk Alamanan zamani	0.50	0.43	Antimicina
Acarreador de Pi	0.08	0.12	Asi a said a suspenio acomen escuer
	0.03	0.05	NEM SELO M. de Car de MAN
Acarreador de Dicar-	0.03	0.05	Malato Malato Della Maria della Maria
boxilatos	1.18.74 (8		notockimista i la acumidación
	0.09	0.14	Mersalil
	0.08		Butilmalonato
	0.00	44 -	Fenilsuccinato

Con objeto de definir el mecanismo por el cual el Ca2 + intramitocondrial regula la velocidad de síntesis de ATP, hemos aplicado el enfoque cuantitativo mencionado arriba y calculado los grados de control de todas las enzimas participantes en la fosforilación oxidativa en mitocondrias incubadas por 5 min a dos concentraciones de Ca2+: 10-9 y 10⁻⁶ M. En la figura 4 se muestra la titulación con oligomicina de la respiración asociada a la síntesis de ATP. Este inhibidor es específico de la ATP sintetasa y es irreversible. Puede apreciarse que la pendiente inicial es diferente a las dos concentraciones de Ca2+. Empleando la ecuación III se calculó el grado de control que la ATP sintetasa ejerce sobre la fosforilación oxidativa, el cual se muestra en la tabla II. De esta manera se determinaron las contribuciones de las otras enzimas. Analizando cuidadosamente la tabla II se observa que existen 4 etapas importantes en el control de la síntesis de ATP: el translocador de ATP/ADP, la ATP sintetasa, la citocromo oxidasa y el complejo b-c₁. Sin embargo, el Ca²⁺ sólo modifica los grados de control de las dos primeras enzimas de manera recíproca: mientras el translocador incrementa su contribución con 10⁻⁶ M de Ca²⁺ la sintetasa la reduce. Esto indica que el Ca²⁺ intramitocondrial regula la velocidad de fosforilación oxidativa porque modifica las propiedades cinéticas de estas dos enzimas posiblemente por algún efecto directo sobre ellas o a través de alterar la relación interna ATP/ADP.

al men

El Ca²⁺ está involucrado en el mecanismo de transmisión intracelular de ciertas señales hormonales, en el ciclo de contracción-relajación muscular o en otros procesos celulares, los cuales requieren del suministro de ATP mitocondrial. Por tanto, la observación de que el Ca²⁺ controla la fosforilación oxidativa abre interesantes perspectivas sobre los posibles mecanismos moleculares involucrados en la coordinación de la actividad celular.

REFERENCIAS

- 1.—Erecinska, M. y Wilson, D.F. (1982). Regulation of Cellular Energy Metabolism. J. Memb. Biol. 70, 1-14.
- 2.—Groen, A.K., Wanders, R.J.A., Westerhoff, H.V., Van der Meer, R. y Tager, J.M. (1982). Quantification of the Contribution of Various Steps to the Control of Mitochondrial Respiration. J. Biol. Chem. 257, 2754-57.
- 3.—Forman, N.G. y Wilson, D.F. (1983). Dependence of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation on Activity of the Adenine Nucleotide Translocase J. Biol. Chem. 258, 8649-55.
- 4.—Wanders, R.J.A., Groen, A.K., Meijer, A.J. y Tager, J.M. (1981). Determination of △G of the Adenine Nucleotide Translocase. FEBS Lett. 132, 201-206.
- 5.—Lemasters, J.J., Grunwald, R. y Emaus, R.K. (1984). Thermodynamic Limits to the ATP/ Site Stoichiometries of Oxidative Phosphorylation. J. Biol. Chem 259, 3058-63.

- 6.—Kunz, W., Bohnensack, R., Böhme, G., Kuster, U. Letko, G. y Schönfeld, P. (1981). Relations between Extramitochondrial and Intramitochondrial Adenine Nucleotide Systems. Arch. Biochem. Biophys. 209, 219-229.
- 7.—Lemasters, J.J. y Sowers, A.E. (1979). Phosphate Dependence and Atractyloside Inhibition of Mitochondrial Oxidative Phosprorylation J. Biol. Chem. 254, 1248-51.
- 8.—Wanders, R.J.A., Groen, A.K., Van Roermund, C.W.T. y Tager, J.M. (1984). Factors determining the relative contribution of the adenine Nucleotide translocator and the ADP-regenerating system to the control of oxidative phosphorylation. Eur. J. Biochem. 142, 417-424.
- 9.—Moreno-Sánchez, R. (1983). Inhibition of Oxidative Phosphorylation by a Ca²⁺ Induced Diminution of the Adenine Nucleotide Translocator. Biochim. Biophys. Acta 724, 278-285.
- 10.—Moreno-Sánchez, R. (1985). Regulation of Oxidative Phosphorilation in Mitochondria by External Free Ca²⁺ Concentrations. J. Biol. Chem. 260, 4028-34.

EL MANUAL DE REACTIVOS EN BIOQUIMICA COMO MATERIAL DE APOYO PARA LA ENSEÑANZA

Entre las asignturas de las carreras del área Biomédica se conocen materias que se consideran difíciles en base a su bajo índice de aprobación, entre éstas siempre ha estado la Bioquímica debido tanto a sus requerimientos como a sus contenidos de asignatura teórico-práctica.

Debido al gran número de nuevos conocimientos que ha aportado la investigación en los últimos años, la información se ha hecho cada vez más extensa lo cual dificulta la selección de tópicos y la evaluación de la materia.

Una de las obligaciones del área de enseñanza del Departamento de Bioquímica es el mantener la calidad docente y el facilitar al alumno el aprendizaje de la materia. Por lo tanto se ha estructurado un manual de reactivos que constituye un punto de apoyo en el proceso enseñanza-aprendizaje. Uno de los objetivos de este manual ha sido el reforzar el aprendizaje de la materia y favorecer al mismo tiempo la interrelación maestro-alumno. Para ello se sugiere al alumno, ya sea que esté cursando la materia o preparándose para presentar un examen, que revise el tema en clase y/o en un libro de consulta y posteriormente proceda a contestar las preguntas sobre el tema que aparecen en el Manual de Reactivos. Este cuenta con aproximadamente 2300 preguntas, organizadas por temas de acuerdo a los objetivos del Departamento.

Las preguntas se presentan, con diferentes grados de dificultad, de opción múltiple o de correlación; con fórmulas, gráficas y esquemas de integración que permiten al alumno revisar un mismo tópico desde diferentes puntos de vista. Si el alumno llegara a tener dudas las intentará resolver en su libro de texto o con su profesor; las respuestas no se dan en el manual con el propósito de que el alumno rectifique sus respuestas en su fuente de información.

Se espera que lo anterior redunde en el fortalecimiento del aprendizaje del tema.

En la introducción del mismo manual el Dr. Enrique Piña cita "De ninguna manera se pretende que el manual de reactivos sustituya el uso adecuado de los libros de texto ni las buenas prácticas del proceso enseñanza-aprendizaje derivadas de clases estimulantes. La bioquímica la aprenderá el estudiante en función del tiempo que dedique a entender su libro de texto y del interés que sus maestros le hayan podido despertar".

Otro de los objetivos del manual es el de facilitar al profesor la selección del material para evaluaciones parciales, delimitando además el terreno de evaluación del Departamento o bien su utilización como material para ejercicios o revisión en clase con los alumnos.

Dada la importancia que este manual tiene, los reactivos existentes en el acervo del Departamento fueron revisados, algunos de ellos reestructurados para facilitar su comprensión y por último para aquellos temas en que no se contaba con suficiente material fueron elaborados nuevos reactivos. Del total de reactivos de nuestra colección se seleccionaron aproximadamente un 40% que corresponde al material del manual.

Se ha puesto el manual a disposición de profesores y alumnos a precio de costo en la Facultad de Medicina, U.N.A.M. y por este medio se ofrece a los profesores y alumnos interesados en su adquisición mediante el envío de giro postal por la cantidad de \$250.00 M.N. más el costo de envío (aproximadamente \$1,000.00 pesos) cobrable en la Oficina Postal No. 70 al Apartado Postal 70159 a nombre de cualquiera de las abajo firmantes.

Ma. Eugenia García Salazar
Aída Hernández Tobías
Silvia Jiménez Thomas
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM

VERSION DE LA BIOLOGIA MOLECULAR ACERCA DEL ORIGEN DE LA VIDA

El primer día dijo Dios: "Hágase la Luz" y la luz fue hecha.

El segundo día dijo Dios: "Hágase el agua" y el agua fue hecha.

El tercer día dijo Dios: "Háganse las membranas que contengan clorofila y puedan utilizar la Energía Radiante". Y así fue.

El cuarto día, las vesículas que contenían clorofila hicieron la viborita (~) y ésta generó ATP, GTP, UTP y CTP.

El quinto día, Dios polimerizó ATP, GTP, UTP, y CTP y creó el ácido Ribonucleico y vió Dios que era bueno.

El sexto día dijo Dios: No es bueno que el RNA esté solo y provocó un profundo sueño en el RNA (lo incubó a O°) y tomando una costilla del (rib) onucleico, hizo al DNA de él (a la costilla se le llamó después oxígeno), y el RNA y el DNA estaban desnudos pero no se avergonzaban el uno del otro.

El séptimo día, descansó Dios y fue cuando todos los problemas comenzaron.

La viborita (~) con su mala influencia persuadió al DNA a hacer lo que se suponía indebido. DNA y RNA formaron híbridos y en seguida se avergonzaron porque estaban desnudos. Por tanto se cubrieron haciendo una proteína. Así se creó el primer virus.

Viéndolo Dios se enojó y maldijo al RNA y el RNA maldijo al DNA y el DNA maldijo a la (~).

A Dios no le agradó tener virus flotando en el Edén y expulsó a RNA y a DNA a la tierra, donde viven felices desde entonces.

Efraín Racker,
Traducción de
Carlos Gómez Lojero

INDICES DE REVISTAS

SCIENTIFIC Established 1845 AMERICAN

January 1985 Volume 252 Number 1

- THE COMMAND AND CONTROL OF NUCLEAR WAR, by Ashton B. Carter 20 Deterrence and the prevention of escalation depend on this neglected facet of strategic planning
- COLLAPSE AND FORMATION OF STARS, by Alan P. Boss Computer modeling penetrates the clouds of matter that conceal stellar birth and early evolution
- THE PERCEPTION OF SPEECH IN EARLY INFANCY, by Peter D. Eiman Infants appear to be born with cerebral structures that enable them to recognize basic speech sounds.
- ALZHEIMER'S DISEASE, by Richard J. Wurtme HEIMER'S DISEASE, by Richard J. Wurtman

 t causes this invariably progressive and fatal dementia? Investigators pursue six lines of inquiry.
- HOT NUCLEAR MATTER, by Walter Greiner and Horst Stöcker When heavy nuclei collide at high speeds, density and temperature rise, producing exotic conditions.
- THE RELIABILITY OF COMPUTER MEMORIES, by Robert J. McEliece A simple algorithm protects large memories from chip failures that would render a machine useless.
- JET-PROPELLED SWIMMING IN SQUIDS, by John M. Gosline and M. Edwin DeMont It enables these muscular mollusks to match for short distances the high speeds of vertebrate fishes.
- THE CROSSBOW, by Vernard Foley, George Palmer and Werner Soedel A triumph of empirical engineering, it prevailed for 500 years, until reliable firearms displaced it.

SCIENTIFIC

PHASED-ARRAY RADARS, by Eli Brookner

AMERICAN. February 1985 Volume 232 Number 2 PREDICTING THE NEXT GREAT EARTHQUAKE IN CALIFORNIA, by Robert L. Wesson and Robert E. Wallace The probability in the next 30 years exceeds 50 per HOW THE TRYPANOSOME CHANGES ITS COAT, by John E. Doselson and Mervyn J. Furner By shedding its protein coat this parasite successfully evades the host's immune system GAMMA-RAY BURSTERS, by Bradley E. Schaefer They may be observed at any time in any part of the sky; several possible mechanisms are proposed. BROWNIAN MOTION, by Bernard It, Lavenda REPRODUCTIVE SUCCESS IN RED DEER, by T. H. Clutton-Brock

THE FUNCTIONAL REPLACEMENT OF THE EAR, by Gerald E. Loss An implanted prosthesis promises to bring useful hearing to patients with sensorineural deafns DAMASCUS STEELS, by Olog D. Sherby and Jeffrey Wadsworth

They can track hundreds of objects, switching from one to another in a few millionths of a sec

Medieval forging methods may make possible the modern mass production of ultrahish-carbon steels

SCIENTIFIC Established 1845 AMERICAN March 1985 Volume 252 Number 3

- THE VERIFICATION OF COMPLIANCE WITH ARMS-CONTROL AGREEMENTS, by David Hafemeister, Joseph J. Romm and Kosta Tsipis Unitateral monitoring is effective.
- THE VOLCANOES AND CLOUDS OF VENUS, by Ronald G. Prina Eruptions of active volcanoes on Venus maintain a permanent cover of thick sulfuric acid clouds
- CHROMOSOME TRANSLOCATIONS AND HUMAN CANCER, by Carlo M. Croce and George Klein Genes that cause cancer can be activated when chromos
- THE HIDDEN DIMENSIONS OF SPACETIME, by Daniel Z. Freedman and Peter van 62 Seven additional dimensions may complement the four that are familiar to us
- WHY WHALES LEAP, by Hal Whitehead The leap, or breach, seems to serve as a form of communication, particularly among rotund species.
- A NEOLITHIC FORTRESS AND FUNERAL CENTER, by R. J. Mercer At Hambledon Hill in England energy liberated by agriculture went into massive construction.
- ION IMPLANTATION OF SURFACES, by S. Thomas Picraux and Paul S. Peercy The properties of a surface can be precisely tailored by implanting ions of one material into another.
- THE CHEMISTRY OF GARLIC AND ONIONS, by Eric Block Sulfur compounds account for both the odor and the medicinal effects attributed to these bulbs.

From the most distant galaxy yet found to a nearly complete hominid specimen more than a million and a half years old, it was the pace and diversity of new revelations that made 1984 so astionishing. DISCOVER's 14-page annual review concludes that biology and genetic generated the most dramatic news, as techniques for manipulating the basic stuff of life moved out of the lab to become commonthe lab to become common-place. Some found the prospect of made-to-order babies dehumanizing, but others wel-comed it as presaging a brave new world. p. 60

SCIENTIST OF

In 1982 Paul Crutzen predicted that life could end in a nuclear winter. Now a succession of studies shows that the grim message of this prophet of the cold and dark may be true. p. 24

ARTICLES

MEDICINE THE HEART THAT FAILED

The attempt to save Baby Fae by implanting a baboon's heart was daring, historic,

VIEWPOINT

OF SPECIOUS CRITICS
Stephen Jay Could, the
Harvard biologist, contends
that a book by the most vocal
opponent of genetic engineering is a cleverly constructed
tract of anti-intellectual propaganda masquerading as
acholarship. Gould thinks this
is a shame, because he shares
the author's humane conclusion that the integrity of
evolutionary lineages must be
respected. p. 34.

DEATH BY DEGREES

A scientist-eleuth traces the demise of coral roefs round the world in 1983 to the unusu-ally warm waters of El Niño, which caused coral polyps to expel the tiny algoe that supply them with essential nutrients. p. 44

MATHEMATICS SLICING TT INTO MILLIONS

An intellectual game that goes back to the ancients has mathematicians going in circles. Martin Gardner reports the developments, and offers seven tasty tidbits about 17. p. 56

DENTISTRY THE BETTER TO BITE WITH

Implants in the jawbone that provide firm anchors for false teeth have become a popular alternative to conventional dentures. p. 54

MEDICINE AIDS: THE QUEST FOR A CURE

American researchers who isolated nearly identical virus es that almost certainly cause AIDS vied bitterly over who

INSTRUCCIONES PARA LOS

COLABORADORES DEL BOLETIN DE

EDUCACION BIOQUIMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la bioquímica y en áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes no especializados, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea simple explícita y didáctica. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Solicitamos a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial.

I. ARTICULOS DE REVISION

1) El manuscrito no debe exceder de 12 cuartillas escritas a máquina a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón).

2) Se aceptarán como máximo 6 figuras o tablas. La limitación en el número de figuras, tablas y referencias obliga a los autores a que seleccionen aquellas realmente importantes e informativas. Numere las figuras con números arábigos y las tablas con números romanos. Adicione las leyendas y pies de figuras en una hoja aparte. Considere que las figuras y tablas serán reducidas de ta-

maño, aproximadamente a 1/2 o 1/4 de la hoja carta, las letras o números más pequeños, una vez hecha la reducción no deben ser menores a los 2 mm.

3) Sugerimos un máximo de 10 referencias tanto específicas como lecturas recomendadas. Cada referencia debe contener: nombre(s) del autor(es), año entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, volumen a cursiva y el número de la primera y última páginas. Ejemplos:

a) Miller, C.O. (1982). Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. Plan Physiol, 69,

1274-1277.

b) Larkins, B.A., Pearlmutter, N.L. y Hurkman, W.J. (1979). The mechanism of zein synthesis and deposition in protein bodies of maize

endosperm. En The Plant Seed. Development, Preservation, and Germination. Editores: Rubenstein, L., Phillips. R.L., Green, C.E. y Gengenbach, B.G. Academic Press. New York. pp. 49-55.

4) Evite hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes utilizadas en el texto deberán, enlistarse en la primera página.

II. OTRAS COMUNICACIONES

1) El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, bolsa de trabajo, etc.

2) El contenido deberá ser desarrollado en forma re-

sumida y de una manera muy explícita.

3) El manuscrito debe ser de una a cuatro cuartillas de longitud, escritas en máquina a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por línea).

4) Se aceptarán un máximo de dos referencias incluídas entre paréntesis en el texto. En casos en que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o tabla.

Los manuscritos serán leídos por dos revisores, uno de ellos familiarizado con el tema y el otro ajeno al mismo. Las correcciones y sugerencias se comunicarán al primer autor.

Envié el original y dos copias de los manuscritos a la Dra. Yolanda Saldaña de Delgadillo. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Apdo. Postal 70-159, Delegación Coyoacán, 04510 México, D.F., o al Dr. Alberto Hamabata, Depto. de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D.F. o bien a través del corresponsal BEB.