ISNN 0187/294X

BEB 89

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOLUMEN 8 | No. 3 | SEPTIEMBRE 1989

EDITORIAL

LOS CURSOS CORTOS DE BIOQUIMICA ESPECIALIZADA

A principios de año se presentaron en mi laboratorio unos muchachos pertenecientes al grupo 1004 de esta Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, para solicitar un curso de Bioquímica del Hueso. Mi sorpresa fue grande al ver que alumnos recién entrados a la Facultad, procedentes de los planteles de Enseñanza Media Superior, tenían ya una inquietud tan grande por aprender, que deseaban estudiar material que no se incluye en el plan de estudios. Un poco temeroso de que todo fuera la ilusión de un momento y no una actitud responsable frente a su carrera y su porvenir, pero con el deseo de no defraudarles, acepté, e hicimos los trámites internos necesarios sobre el contenido, el horario, el aula, etc. Propuse que el curso fuera de aproximadamente veinte horas y comenzamos a trabajar. La primera sesión incluyó a todos los alumnos del grupo y yo hice una descripción somera de la estructutra y constitución del hueso para dar un panorama general del contenido que había de tener el curso. Aunque hubo una deserción importante en las siguientes sesiones, pronto se normalizó la asistencia, e incluso asistieron algunos alumnos de otras escuelas de la misma UNAM. El desarrollo de las clases fue sumamente provechoso, pues los alumnos participaban con todo su entusiasmo y hacían preguntas y observaciones de mucha valía. En esta forma transcurrieron tres meses de clase y preferí dar por terminado el curso cuando ya se habían cumplido la mayoría de los objetivos aunque los alumnos estaban dispuestos a continuar aunque fuera con otros temas.

Esta experiencia fue sumamente cálida y agradable y me llevó a pensar: si un cursillo organizado con un solo grupo de esta Facultad, ha producido resultados tan halagüeños, parece evidente que si este tipo de cursos se organiza haciendo los programas y la propaganda con la suficiente antelación, el éxito ha de ser mucho mayor.

Aprovechando mi calidad de Presidente del Colegio Académico de Bioquímica de esta Facultad de Medicina, llevé el proyecto a una de las reuniones y como es natural tuvo sus opositores y sus partidarios. Entre los últimos se cuenta, con el máximo de entusiasmo, la Dra. Marta Zentella, quien se ofreció de inmediato a dar el curso siguiente, sobre Bioquímica del

Pasa a la Pág. 43

COMITE EDITORIAL

ALFONSO CARABEZ TREJO
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

ALBERTO HAMABATA NISHIMUTA
Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN

ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

CARLOS LARRALDE RANGEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

JESUS MANUEL LEON CAZARES
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina, UNAM

SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COORDINADOR EDITORIAL
YOLANDA SALDAÑA DE DELGADILLO
Facultad de Medicina, UNAM

EDITOR ASOCIADO
ALICIA CEA BONILLA
Facultad de Medicina, UNAM

ASISTENTE EDITORIAL
ELISA MORA
Facultad de Medicina, UNAM



Facultad de Medicina

UNAM

I N D I C E

BEB 89 Vol. 8 Núm. 3 septiembre 1989

EDITORIAL

LOS CURSOS CORTOS DE BIOQUIMICA ESPECIALIZADA
Federico Fernández Gavarrón.....41

ARTICULOS

PRODUCCION MICROBIANA DE CAROTENOIDES Y PERSPECTIVAS DE SU UTILIZACION
Schwartz, R., Rosas, R., Farrés, A., Paredes, L. y Sánchez, S.....44

H^+ - ATPasa (CF_0 - CF_1) DE CLOROPLASTOS
Cecilia Beatriz-Peña Valdivia y Blas Lotina Hennsen....52

OTRAS COMUNICACIONES

ROMPIMIENTO DEL DNA, CATALIZADO POR LA RIBOZIMA DE *TETRAHYMENA*.
Guillermo Carvajal Sandoval, comentarista.....62

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA.....64

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB) es una publicación trimestral editada por su Comité Editorial, Correspondencia: Yolanda Saldaña de Delgadillo. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina UNAM. Apdo. Postal 70-281. Delegación Coyoacán. 04510, México, D. F.

Viene de la Pág. 41

LOS CURSOS CORTOS...

Hígado, el que se encuentra actualmente en desarrollo con una inscripción de 108 alumnos y buen porcentaje de asistencia. Hay en preparación un curso más para el presente año sobre Biología Molecular del Ejercicio, por el Dr. Gabriel Carrillo Santín, y cinco más para el año de 1990.

Es probable que si el Colegio Académico de Bioquímica hubiera ofrecido cursos adicionales de bioquímica clásica a nivel superior, a nivel de repaso, o de preparación para los exámenes departamentales, u otros, no hubiera tenido éxito.

¿Cuál es la diferencia entre la bioquímica especializada y la bioquímica clásica? Desde luego hay que saber bioquímica general para poder estudiar la bioquímica especializada de un órgano o tejido. Si queremos estudiar la estructura de la matriz orgánica del hueso tenemos que conocer la estructura de los proteoglicanos, de las glucoproteínas y de las proteínas, todos ellos desde un punto de vista general, y en la bioquímica especializada explicaremos cada uno en forma particular. Hablaremos de las proteínas no colágena, y de la colágena haremos una descripción detallada.

Al estudiar la fase mineral conoceremos las diferentes sales de calcio que se pueden encontrar en el hueso, las calcificaciones ectópicas y los estudios para acelerarlas o frenarlas. Finalmente, estudiaremos las hormonas y vitaminas que regulan los movimientos del calcio en el organismo y los segundos mensajeros dependientes de calcio.

Con respecto al hígado diremos que este órgano tiene un papel vital en el metabolismo de los carbohidratos y de las grasas, pero no explicaremos vías particulares como la glucogénesis, glucólisis etc. en el metabolismo de los carbohidratos, y de la lipogénesis y la lipólisis en el metabolismo de los lípidos; sino que haremos ver cómo el hígado regula estas vías metabólicas y las armoniza. Haremos ver que el hígado es fundamental en el envío de energía a otros tejidos a través de la formación de glucosa sanguínea y de cuerpos cetónicos, que se catabolizan en otros tejidos; que el hígado es importante productor de colesterol, cuya misión en la constitución de las membranas plasmáticas de las células es bien conocida, y que da origen a hormonas esteroidales y otras sustancias como el calcitriol que actúa fundamentalmente en el metabolismo del hueso. Las acciones del hígado en relación con la economía total del organismo son mucho más numerosas aún.

En cuanto a la organización de los cursos, podemos decir que no hemos tenido ninguna dificultad en encontrar a los profesores especialistas, dispuestos a hacer esta labor de difusión del conocimiento, y que hemos encontrado en la Jefatura del Departamento y la Coordinación de Enseñanza todo el apoyo requerido para hacer de esta ilusión una realidad.

Dr. Federico Fernández Gavarrón
Presidente del Colegio
Académico de Bioquímica
Facultad de Medicin, UNAM

PRODUCCION MICROBIANA DE CAROTENOIDES Y PERSPECTIVAS DE SU UTILIZACION

Schwartz, R., Rosas, R., Farrés, A., Paredes, L. y Sánchez, S.
Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-228, México D.F. C.P. 04510

RESUMEN

Los carotenoides son una familia de pigmentos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunas de las funciones que presentan los carotenoides en los organismos que los contienen son: absorción de la luz, fotoprotección y como precursores de la vitamina A. Los carotenoides poseen un gran interés práctico para diversas industrias como la alimentaria, por su empleo como antioxidantes y colorantes biológicos y para la farmacéutica por sus aplicaciones en medicina. A pesar de su importancia en la industria y de la creciente demanda que existe por ellos, en la actualidad es poco lo que se sabe acerca de su forma de síntesis y regulación. Este trabajo pretende resumir y actualizar la información disponible acerca de estos fenómenos en la formación de carotenoides, así como de presentar sus perspectivas de utilización.

INTRODUCCION

Se conoce con el nombre de carotenoides a una de las familias más importantes de pigmentos naturales. El nombre de caroteno le fue dado al pigmento amarillo aislado a partir de la zanahoria (*Daucus carota*) por primera vez en 1831. Los carotenoides son tetraterpenos liposolubles formados por la condensación de unidades isoprenilo, cuya gama de color va del amarillo al rojo. Se conocen más de 400 carotenoides diferentes, los cuales se dividen estructuralmente en dos grupos: los carotenos y las xantofilas. El grupo de los carotenos está formado por compuestos hidrocarbonados y el grupo de las xantofilas por derivados oxigenados de los compuestos hidrocarbonados. Las xantofilas son más solubles en agua que los carotenos. El principal caroteno es el beta-caroteno. Algunas de las xantofilas más conocidas son la cantaxantina y la luteína. Tanto los carotenos como las xantofilas están formados por 40 carbonos.

Como puede observarse en las Tablas I y II, los carotenoides se encuentran ampliamente distribuídos en la naturaleza. Su intervalo de distribución va desde los microorganismos hasta las plantas y las aves (1,2).

TABLA I.

DISTRIBUCION DE CAROTENOIDES EN MICROORGANISMOS

Microorganismos	Géneros
Bacterias fotosintéticas	*Clorobacteriaceae*
	Thiorhodaceae
Bacterias no fotosintéticas	*Mycobacterium*
	Corynebacterium
Levaduras	*Rhodotorula*
	Phaffia
Hongos filamentosos	*Neurospora*
	Phycomyces
	Dacrymyces
	Penicillium
	Blakeslea
Algas	*Cyanophyceae*
	Cryptophyceae
	Dinophyceae

Fuente: (1)

TABLA II.

DISTRIBUCION DE CAROTENOIDES EN ANIMALES, FRUTAS Y HORTALIZAS

Distribución	Ejemplo
Mariscos	Langosta
	Camarón
Peces	Salmón
Frutas	Durazno
	Cítricos
Verduras	Jitomate
	Pimiento
Aves	Flamenco
	Canario

Fuente: (2)

Además de dar color a los organismos que los contienen, los carotenoides presentan otras funciones como son la absorción de luz, la protección contra la tensión ambiental y atrapan radicales libres.

Los carotenoides han sido extraídos de una gran variedad de fuentes, tales como las frutas, las hortalizas y los mariscos.

En la Tabla III se presenta una lista detallada de las diversas fuentes naturales de las cuales se han extraído los carotenoides (3).

TABLA III.

FUENTES DE EXTRACCION DE CAROTENOIDES

Fuente	Carotenoide
Gardenia	Crocetina, crocina
Semilla de anato	Bixina
Cítricos	Cryptoxantina, licopeno
Jitomate	Licopeno
Zanahoria	Beta-caroteno
Pimiento	Paprika
Mariscos	Astaxantina
Maíz	Zeaxantina, Beta-caroteno
Levadura	Rhodotorulina
Huevo de Erizo	Equinona
Chlorella	Beta-caroteno, luteína

Fuente: (3)

APLICACIONES

Los carotenoides son ampliamente aplicados en la industria alimentaria, farmacéutica y recientemente en la medicina.

a) ALIMENTOS

Los carotenoides aprobados por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América (FDA) para su inclusión en los alimentos son: beta-caroteno, beta apo-8'-carotenal y cantaxantina. Las razones por las cuales se adicionan carotenoides a los alimentos son las siguientes:

—Restauración de la apariencia normal del alimento cuando el color original ha sido destruído por su procesamiento. Por ejemplo, en frutas enlatadas.

— Obtención de un color uniforme en frutas recolectadas en diferentes cosechas.

— Intensificación del color natural cuando éste es débil.

— Protección de agentes saborizantes y vitaminas fotosensibles durante el almacenamiento (4).

En la Tabla IV se presentan ejemplos de alimentos que son coloreados con carotenoides.

TABLA IV.

UTILIZACION DE CAROTENOS EN ALIMENTOS

BETA-CAROTENO	BETA-APO-8'-CAROTENAL	CANTAXANTINA
Bebidas	Bebidas	Bebidas
Repostería	Repostería	Confitería
Confitería	Confitería	Lácteos
Pastas	Pastas	Jugos
Salsas	Salsas	Productos con tomate
Lácteos	Lácteos	
Jugos	Jugos	
Aceites	Aceites	
Postres	Postres	
	Conservas	
	Botanas	
	Salchichas	

Existen ventajas y desventajas en la utilización de los carotenoides como colorantes. Las ventajas de su utilización son su alta capacidad tintorea, su gran intervalo de color al utilizarse en diferentes combinaciones y la actividad de vitamina A que presentan algunos de ellos. Las desventajas de su utilización son su baja solubilidad, su alta susceptibilidad a la oxidación durante el proceso de extracción, además de su alto costo en el mercado en comparación con los colorantes artificiales.

b) MEDICINA

1- Fotoprotección

Los carotenoides poseen funciones fotoprotectoras. Parece ser que dicha capacidad de fotoprotección ocurre a muchos niveles: desde moléculas y orgánulos hasta organismos completos. Los carotenoides se utilizan para aminorar los síntomas que presentan los pacientes hipersensibles a la luz, que sufren de porfiria eritropoyética (5).

2- Anticarcinógenos

Se ha observado que los carotenoides son capaces de suprimir los efectos mutagénicos y las aberraciones cromosomales causadas por agentes químicos o por la luz. Se han utilizado en tratamientos con radiaciones y contra el cáncer de mama, pulmón, piel, colon, recto y vejiga, entre otros (5).

3- Incremento de la Respuesta Inmune.

Los carotenoides son capaces de activar la respuesta inmune. Se ha observado que tanto la proliferación de linfocitos T y B, como la actividad de macrófagos y neutrófilos se aumenta al tratar a los pacientes con carotenoides. En los niños, los niveles altos de carotenoides han sido asociados con un incremento en la resistencia a la infección (5).

4- Longevidad.

Se ha encontrado una relación positiva entre la concentración de carotenoides y retinol (vitamina A) en suero y tejido cerebral, con un incremento en la longevidad de algunos mamíferos (6).

c) INDUSTRIA FARMACEUTICA

Los carotenoides son aplicados en la industria farmacéutica con el fin de colorear los productos y como indicadores de diferentes pastillas. Así también, se les utiliza en la fabricación de cápsulas, tabletas, supositorios, jarabes y suspensiones.

d) COSMETOLOGIA

Dentro de la industria cosmetológica los carotenoides son adicionados con el fin de dar color a jabones, talcos, lociones, lápices labiales y polvos, entre otros.

MERCADO

Actualmente, existe una marcada tendencia a nivel mundial por el uso de colorantes naturales en lugar de los colorantes sintéticos, ya que los colorantes naturales no causan problemas de salud al consumidor. El mercado actual del beta-caroteno se estima en 19 millones de dólares anuales. El 70% de la producción se destina a la industria alimentaria, el 21% a la industria médica, el 5.3% a la industria cosmetológica y el 3.7% restante a fines diversos. Se predice que de ser aceptadas las novedosas propiedades de los carotenoides como anticarcinógenos, fotoprotectores y como activadores del sistema inmune, la tasa de crecimiento de su mercado mundial se incrementará en un 50% anual (5).

México es un país productor y exportador de colorantes naturales de origen vegetal. Existen aproximadamente 30 empresas que los producen. De entre ellas, las más importantes son Bioquimex, Industrias Alcosa y Deshidratamex. La creciente exportación de colorantes mexicanos se destina principalmente a Estados Unidos, Francia y España. La demanda por colores en general se inclina por el amarillo, el naranja y el rojo.

BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES

La vía de carotenogénesis así como algunos aspectos de su regulación, han sido estudiados principalmente en los sistemas microbianos y en plantas. Los microorganismos en los cuales más se ha estudiado la regulación y la vía de síntesis de los carotenoides son *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora y Gibberella fujikuroi.*

Debido a que no ha sido posible aislar todas las enzimas que intervienen en la síntesis de los carotenoides, muchos de los pasos en dicha vía no están totalmente claros.

Los diferentes carotenoides comparten una misma vía biosintética. En los pasos finales ocurren modificaciones que dependen del carotenoide en cuestión. La ruta biosintética de los carotenoides se ilustra en la Figura 1 (2,7).

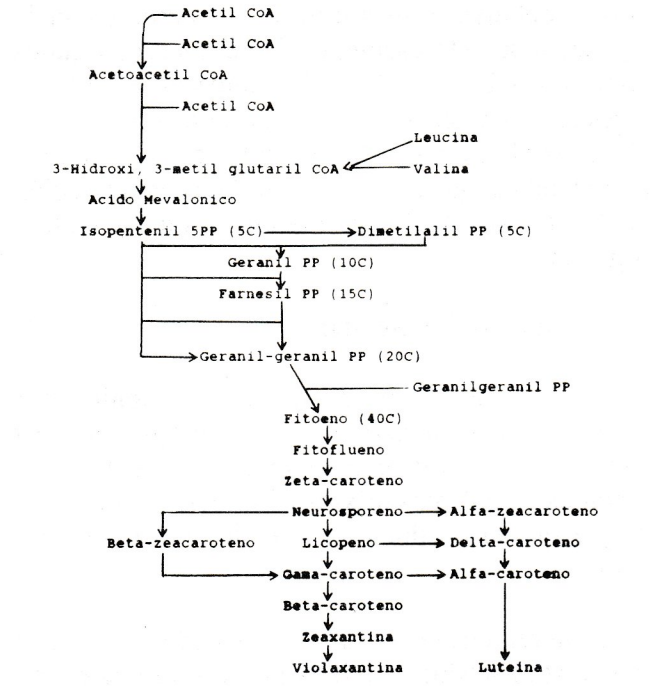


Figura 1. Ruta biosintética propuesta para la síntesis de carotenoides.

Se ha propuesto que la ruta biosintética se inicia con la unión de tres unidades de acetil-CoA, que forman el 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA). El HMG-CoA también puede ser sintetizado a partir de los aminoácidos leucina y valina. El HMG-CoA es convertido en ácido mevalónico (MVA), por medio de una reacción irreversible. El MVA es convertido a 5-fosfomevalonato y posteriormente a isopentenil pirofosfato (IPP). El IPP es considerado como el precursor fundamental de los carotenos y está formado por 5 átomos de carbono. El IPP es convertido a dimetil alil pirofosfato (DMAPP), por medio de una isomerasa que posee radicales SH. La formación del geranil pirofosfato (GPP), compuesto por 10 átomos de carbono, resulta de la unión de una molécula del IPP con una del DMAPP. La enzima que cataliza dicha unión es la isoprenil transferasa. Posteriormente, se transfiere otra molécula del IPP al GPP formado y esto resulta en la síntesis del farnesil pirofosfato (FPP), constituído por 15 átomos de carbono. La formación del geranil-geranil pirofosfato (GGPP), de 20 átomos de carbono, ocurre gracias a la adición de otra molécula de IPP al FPP. Finalmente, al condensarse dos moléculas de GGPP se forma el primer compuesto de 40 átomos de carbono, denominado fitoeno,que sujeto a cuatro deshidrogenaciones sucesivas, dan lugar en el orden mencionado al fitoflueno, zeta-caroteno, neurosporeno y licopeno. Estas deshidrogenaciones son catalizadas por la enzima fitoeno deshidrogenasa, la cual es codificada por el gen *car*B en *P. blakesleeanus*. Cuatro copias del producto del gen *car*B forman el complejo enzimático responsable de las cuatro deshidrogenaciones. Las mutantes *car*B son blancas y acumulan grandes cantidades de fitoeno (8).

La ciclización necesaria para obtener los carotenoides cíclicos puede ocurrir a partir del neurosporeno o del licopeno. La ciclización del primero da lugar al alfa y al beta-zeacaroteno, mientras que la ciclización del licopeno da lugar al delta y al gamma-caroteno, los cuales pueden también obtenerse por medio de la deshidrogenación del alfa y del beta-zeacaroteno, respectivamente. El beta-caroteno se obtiene a partir de la ciclización del gamma-caroteno. El licopeno se convierte a beta-caroteno por la enzima licopeno ciclasa, la cual es codificada por el gen *car*R en *P. blakesleeanus*. Dos copias del producto del gen *car*R forman un complejo que convierte al licopeno en el gamma-caroteno y en el beta-caroteno, secuencialmente. Las mutantes *car*R son rojas debido a la gran acumulación de licopeno que presentan. El gen *car*R forma parte del gen bifuncional *car*RA, el cual se localiza cerca del gen *car*B. El producto de *car*A parece estar encargado de la transferencia de sustrato durante la carotenogénesis. Las mutantes *car*A son blancas y se ponen amarillas en presencia de retinol. El gen *car*A tiene, además, funciones regulatorias (8).

Finalmente, el alfa y el beta-caroteno, pueden dar lugar a la síntesis de las xantofilas, luteína y violaxantina, respectivamente (2,7).

REGULACION DE LA CAROTENOGENESIS

La regulación de la síntesis de carotenoides puede ser ejercida por varios tipos de compuestos o

mecanismos. Los más importantes son los siguientes:

1- Retrorregulación
2- Activación o inhibición química
3- Estimulación sexual
4- Fotoinducción
5- Efecto de nutrientes en el medio de cultivo
6- Efecto de diversos iones y otros compuestos
7- Efecto del AMP cíclico
8- Efecto del pH
9- Variaciones regulatorias presentes en *Gibberella*

1. Retrorregulación

La vía de síntesis de los carotenoides está regulada por el beta-caroteno, producto final de la vía en *P. blakesleeanus.* La retrorregulación es ejercida por el gen *car*S. El mecanismo de retrorregulación parece operar a nivel de la síntesis de proteínas (8).

La hipótesis del mecanismo de retrorregulación por beta-caroteno, postula que el producto del gen *car*S (pS), forma un complejo con el beta-caroteno y este complejo elimina la síntesis del colorante. Con base en que los compuestos retinol, retinal y beta-ionona, tienen cierta similitud estructural con la molécula del beta-caroteno, Cerda-Olmedo (8) ha postulado que el retinol y sus análogos compiten con el beta-caroteno y en esta forma, previenen la retrorregulación. El gen *car*A también participa en la retrorregulación. Sin embargo, a pesar del gran esfuerzo dedicado al esclarecimiento del mecanismo por el cual opera la retrorregulación, se desconoce la forma en la cual los productos de los genes *car*S y *car*A en combinación con el beta-caroteno regulan la vía de la carotenogénesis.

2- Activación o inhibición química.

El compuesto beta-ionona activa la carotenogénesis en los hongos *Phycomyces blakesleeanus* y *Blakeslea trispora* pero la inhibe en el *Verticillium albo-atrum.*

El retinol también es un potente activador de la síntesis de carotenos en los *Mucorales.*

La acción de los compuestos antes mencionados, podría deberse a su similitud estructural con la molécula de beta-caroteno. Sin embargo, algunos compuestos como el dimetil-ftalato y el veratol, son capaces de activar la carotenogénesis en *Phycomyces* sin tener ninguna similitud con los carotenos. Esto podría indicar que existen varias vías en la activación de la síntesis de los carotenoides en un mismo organismo.

3- Estimulación Sexual

La cantidad de carotenoides producidos por *Choanoephora cucurbitarum, Blakeslea trispora* y *Phycomyces blakesleeanus* cuando estos son crecidos en cultivos mixtos de micelio (+) y (-), es mayor que la producida por cada tipo de micelio solo.

El incremento en producción se debe a que el micelio (+) produce metil trisporatos los cuales son convertidos a ácido trispórico por el micelio (-). El ácido trispórico es el compuesto responsable del incremento en la producción de los carotenoides como resultado de la mezcla sexual. Si se le agrega ácido trispórico a la cepa (-), el incremento en producción ocurre como si se hubieran mezclado los dos tipos de micelio.

El incremento en la producción de carotenoides debido a la acción del ácido trispórico, ha sido correlacionado con dos procesos biológicos:

a) A una desrrepresión de la(s) enzimas encargada(s) de la conversión del 5-fosfomevalonato a dimetilalil pirofosfato.

b) A un incremento en la actividad de una proteasa neutra que inactiva una proteína inhibidora de la síntesis de carotenos (9).

En resumen, el mecanismo exacto por el cual actúa el ácido trispórico se desconoce. Sin embargo, el hecho de que su efecto sea anulado por inhibidores en la síntesis de proteínas, indica que el efecto del ácido se debe a la desrrepresión de algún(os) gen(es) regulador(es) de la síntesis de carotenoides (10).

La estimulación sexual de la síntesis de carotenoides es aditiva con respecto a las

estimulaciones inducidas por la luz, retinol, dimetil-ftalato y mutaciones en el gen *car*S.

4- Fotoinducción

La síntesis de carotenoides en varias bacterias no fotosintéticas y hongos, ocurre después de una exposición corta a la luz.

La cinética de producción de carotenoides en *Neurospora crassa* muestra que, al iluminar los cultivos de dicho microorganismo por unos minutos, ocurre una fase *lag* en la producción y después de ésta, se dispara la producción del pigmento. Adicionalmente, al prolongar el período de iluminación, se produce más pigmento.

La fotoinducción en la producción de carotenoides es bloqueada totalmente por la cicloheximida, cuando ésta se aplica antes o inmediatamente después de la iluminación en este mismo organismo (11).

Como resultado de las observaciones antes mencionadas, se ha concluído que:

- hay poca cantidad de enzimas carotenogénicas en la oscuridad,

- las enzimas se sintetizan *de novo* como consecuencia de la fotoinducción y,

- las enzimas son activas solamente por unas horas.

Sin embargo, aún no está claro el mecanismo de la fotoinducción. Algunos de los genes que parecen participar en *P. blakesleeanus* son *car*C, *pic*A y *pic*B (8). Es posible que el AMPc regule dicho efecto ya que en *N. crassa* la fotoinducción reduce el nivel de este compuesto, lo cual se traduce en un incremento en la producción de carotenoides (12).

5- Efecto de nutrientes en el medio de cultivo.

Los estudios acerca del efecto que tienen diversas fuentes de carbono o nitrógeno sobre la producción de carotenoides, se han restringido a la observación del efecto de su adición sobre el nivel de producción. Sin embargo, casi no se han explorado a fondo los efectos regulatorios que esas fuentes de nutrientes pudieran tener sobre la producción de los carotenoides.

a- Efecto de la fuente de carbono.

A concentraciones de glicerol de 0.5%, se incrementa la producción de carotenoides en *Halobacterium cutirubrum*. Este efecto también se ha observado en otros microorganismos, tales como *Rhodotorula rubra* y *Mycobacterium phlei*.

En *P. blakesleeanus*, la maltosa y la glucosa son igualmente carotenogénicas. La xilosa y la fructosa por su parte, mantienen buen crecimiento pero son poco eficientes para lograr una buena producción de pigmento. Las bases bioquímicas de estos efectos, sin embargo, tampoco son conocidas.

b-Efecto de la fuente de nitrógeno.

En *P. blakesleeanus*, la leucina y la valina incrementan la producción de carotenos con respecto a la asparagina. Sin embargo, no se ha observado ningún efecto de la leucina en otros microorganismos.

En *P. blakesleeanus*, el nitrato de amonio reduce la síntesis de carotenoides (1).

En *B. trispora*, la glicina incrementa la producción de carotenoides.

En *G. fujikuroi*, una relación baja entre carbono y nitrógeno favorece la producción de carotenos sintetizados a partir del fitoeno. Si por el contrario, la relación carbono-nitrógeno es alta, se produce más fitoeno.

c- Efecto de la fuente de fosfatos.

Al adicionar 1% (p/v) de fosfato inorgánico al medio de cultivo de *B. trispora*, se produce cinco veces más caroteno que en presencia de concentraciones de 0.01% de fosfato inorgánico.

Se ha encontrado una relación inversa entre la carotenogénesis y la actividad de fosfatasas intracelulares. Por lo tanto, se ha sugerido que el fosfato inorgánico afecta la síntesis de carotenoides al regular los niveles de las fosfatasas intracelulares en el cultivo del microorganismo. Similarmente, en

P blakesleeanus también se ha observado un incremento en la producción de pigmento con una baja actividad de fosfatasas (13). Sin embargo, en ambos casos, la relación pudiera ser circunstancial y no haber relación alguna entre los niveles de fosfatasas y la síntesis de carotenoides.

6- Efecto de diversos iones y otros compuestos.

La presencia de iones cúpricos incrementa la producción de carotenoides además de adelantar su síntesis en *B. trispora.*

El cobre incrementa la síntesis de pigmento al parecer, desrreprimiendo la síntesis de ácido trispórico, que a su vez, desrreprime a la(s) enzima(s) encargada(s) de la formación de dimetilalil pirofosfato (14).

Otras sustancias también incrementan la producción de los carotenoides en diversos organismos como la *B. trispora.* De entre ellas cabe mencionar a los terpenos, lípidos, detergentes, isoniazida, 4-formilpiridina, amidas, compuestos aromáticos y beta-lactámicos. Las razones por las cuales dichas sustancias incrementan la producción de carotenoides son diversas. Algunas de ellas causan la desrrepresión de genes que intervienen en la biosíntesis y otras, incrementan la concentración de precursores.

7- Efecto del AMP cíclico.

El efecto del AMP cíclico sobre la síntesis de carotenoides varía en los diferentes tipos de microorganismos.

Como se mencionó anteriormente, en *N. crassa* se ha encontrado una relación negativa entre el nivel de AMP cíclico y la carotenogénesis. Es decir, en mutantes que producen bajas cantidades del nucleótido o al iluminar la cepa silvestre y causar así una disminución en el AMP cíclico, la producción de carotenoides es mayor (12).

Por otro lado, se ha sugerido que en *B. trispora,* la síntesis de ácido trispórico está regulado por un proceso similar a la represión catabólica. Esta represión puede prevenirse al adicionar AMP cíclico (15). El hecho de que un mismo compuesto tenga efectos contrarios en diferentes organismos, enfatiza cómo la regulación de la carotenogénesis varía de organismo a organismo y no permite hacer generalizaciones.

8- Efecto del pH.

Se han observado efectos interesantes ejercidos por el pH del medio de cultivo sobre la producción de carotenoides en *P. blakesleeanus.*

En un medio con glucosa y asparagina, el pH baja de 6.2 a 2.6; si esta bajada se previene, la carotenogénesis disminuye sin que el crecimiento del hongo sea afectado.

Al reemplazar asparagina por nitrato de amonio, tanto el crecimiento como la producción de los carotenos disminuyen. El crecimiento puede ser restaurado al agregarse intermediarios del ciclo de Krebs. Sin embargo, la estimulación de la carotenogénesis depende del ácido utilizado. La mayor estimulación se obtiene con acetato y succinato. El efecto de estos ácidos es debido a los cambios que ejercen sobre el pH del medio de cultivo (1).

Se ha postulado que el acetato es el precursor primario de la síntesis de carotenos en *Phycomyces blakesleeanus* y *Mucor hemalis.* La realización de experimentos con el fin de entender a fondo el efecto del pH sobre la producción de carotenoides sería de gran interés.

9- Variaciones Regulatorias Presentes en *Gibberella.*

El hongo *Gibberella fujikuroi* produce giberelinas. Dichas hormonas poseen una gran analogía estructural con los propios carotenoides. Al crecer a la *Gibberella* en presencia de luz, el microorganismo produce carotenoides y, como consecuencia, el micelio adquiere un color naranja.

La carotenogénesis en *Gibberella* no se ve afectada por muchos compuestos que estimulan o inhiben este proceso en otros microorganismos como por ejemplo el retinol, la alfa-ionona y la nicotina. Adicionalmente, *Gibberella* no presenta un mecanismo de retrorregulación como es el caso del *Phycomyces.*

Se ha postulado que la regulación de la carotenogénesis en *Gibberella* podría estar mediada por el producto de los genes R y L. Dicha hipótesis se basa en que las mutaciones en el gene R provocan sobreproducción de carotenoides. Por otra parte, se piensa que el gen L, al ser estimulado por la luz, podría inhibir al gen R y con ello estimular la carotenogénesis (16).

PERSPECTIVAS

El considerable interés mundial que se ha despertado en los últimos años por los colorantes naturales y, consecuentemente su creciente demanda en el mercado mundial, ha llevado a pensar en la Biotecnología como una alternativa de producciòn. Dicha alternativa posee la ventaja de poder asegurar el suministro y calidad uniforme de los colorantes.

La aplicación de la Biotecnología en la producción de colorantes podría darse a muchos niveles. Cabe mencionar los siguientes ejemplos:

- Extracción enzimática de los colorantes provenientes de flores o frutas.

- Cultivo de tejidos de vegetales a partir de células productoras.

- Producción fermentativa de colorantes. En este punto se podrían aplicar conocimientos de selección y mejoramiento genético de las cepas productoras.

La realización de estudios sobre el valor nutricional, así como el establecimiento de las bases genéticas y regulatorias en torno a la síntesis de los carotenoides podrá incidir positivamente en la producción fermentativa de dichos colorantes al permitir mejores rendimientos por medio del mejoramiento genético de cepas productoras y de la optimización de las condiciones de producción.

La finalidad de aplicar procesos biotecnológicos a la producción de colorantes es la de asegurar una producción que llene una demanda creciente de estos compuestos, a la vez que lograr abatir los costos de producción.

REFERENCIAS

1. Goodwin, T.W. (1959). Biosynthesis and function of carotenoid pigments. Adv. Enzymol. *21*: 295-336.

2. Ninet, L. y J. Renaut. (1979). Capítulo 17: Carotenoids. En: Microbial Technology. Segunda edición Vol. 1 Editores: H.S. Peppler y D. Perlman. Academic Press Inc. U.S.A.

3. Francis, F.D. (1986). Handbook of Food Colorant Patents. Food and Nutrition Press, Inc. Westpoint, Conn. USA.

4. Newsome, R.L. (1986). Food Colors. Food Technology *40* (julio) pp. 49-56.

5. Resúmenes del VIII Simposio Internacional Sobre Carotenoides. Boston, MA. USA (julio 27-31, 1987).

6. Cutler, R.G. (1984). Carotenoids and retinol: their possible importance in determining longevity in primate species. Proc. Natl. Acad. Sci. *81*: 7627-7631.

7. Goodwin, T.W. (1971). Carotenoid biosynthesis. En: Carotenoids. Editor Otto Isler. Birkhauser Verlag Basel. pp. 578-599.

8. Cerda-Olmedo, E. (1985). Carotene mutants of *Phycomyces*. Meth. Enzymol. *110*: 220-243.

9. Govind, N.S., Mehta B, Sharma M. y Modi V.V. (1981). Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. Phytochemistry *20*: 2483-2485.

10. Thomas, D.M., Harris R.C. y Kirk J.T.O. (1967). Studies on carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. Phytochemistry *6*: 361-366.

11. Rau, W. y Mitzka-Schnabel U. (1985). Carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. Meth. Enzymol. *110*: 253-267.

12. Kritsky, M.S., Sokolovsky, V.Y., Belozerskaya, T.A. y Chernysheva, E.K. (1982). Relationship between AMPc level and accumulation of carotenoid pigments in *Neurospora crassa*. Arch. Microbiol. *133*: 206-208.

13. Dholakia, J.N. y Modi, V.V. (1984). Regulation of carotenogenesis by inorganic phosphate in *Blakeslea trispora*. J. Gen. Microbiol. *130*: 2043-2049.

14. Govind, N.S., Amin, A.R. y Modi, V.V. (1982). Stimulation of carotenogenesis in *Blakeslea trispora* by cupric ions. Phytochemistry *21*: 1043-1044.

15. Dandekar, S. y Modi, V.V. (1980). Involvement of AMPc in carotenogenesis and cell differentiation in *Blakeslea trispora*. Biochim. Biophys. Acta *628*: 398-406

16. Avalos, J. y Cerda-Olmedo, E. (1987) Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. Curr. Genet. *11*: 505,511.

H^+ -ATPasa (CF_o-CF_1) DE CLOROPLASTOS

Cecilia Beatriz Peña-Valdivia[1] y Blas Lotina Hennsen[2]
(1) Laboratorio de Bioquímica, Centro de Botánica, Colegio de Posgraduados, 56237 Chapingo, Edo. de Méx. México. (2) Departamento de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 D.F., México.

En cloroplastos de algas, plantas superiores y en las membranas plasmáticas de bacterias fotosintéticas, los pigmentos secundarios o pigmentos accesorios, como la clorofila b, carotenos o xantofilas, etc, captan los cuantos de la energía luminosa del sol. Esa energía, conducida a los centros de reacción (P680, P700 o P840), los convierte a un estado excitado, y ceden sus electrones a un aceptor primario, que produce una separación de carga en algunos nanosegundos. La energía fluye así, durante el paso de electrones a través de la cadena óxidorreductora hasta la reducción del reactivo de Hill ($NADP^+$ en cloroplastos). Simultáneo al flujo de electrones, ocurre un transporte vectorial de protones (hacia el interior del tilacoide en cloroplastos), el cual está acoplado a la síntesis de ATP cuando los protones fluyen hacia el estroma, en el exterior del tilacoide (Fig. 1). Este proceso se conoce como fotofosforilación y es catalizado por la H^+-ATPasa o complejo CF_o-CF_1. Actualmente, es materia de estudio el mecanismo por el cual se acoplan la transferencia de electrones y la síntesis de ATP [(1)].

El complejo F_o-F_1 se ha definido ampliamente como una ATPsintetasa, que utiliza el gradiente electroquímico, generado por la cadena óxidorreductora, para efectuar la fotofosforilación, y como una ATPasa, cuando funciona en sentido inverso. El complejo CF_o-CF_1 de cloroplastos tiene una estructura análoga a la H^+-ATPasa de mitocondrias y bacterias [(2)].

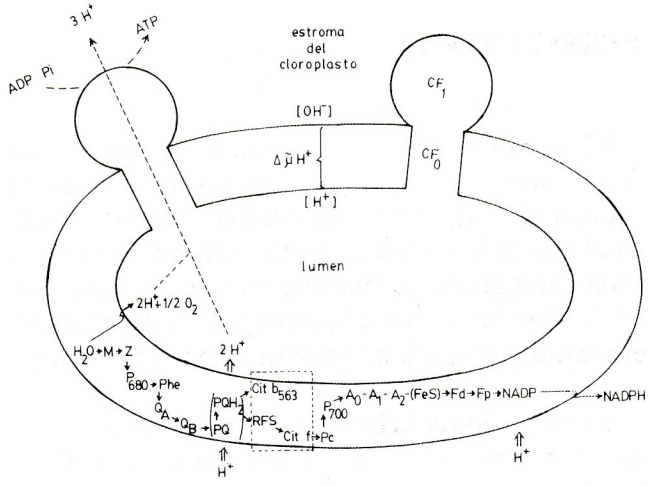


Figura 1. Representación bidimensional del complejo CF_o-CF_1, centros de reacción y partes adyacentes de la cadena transportadora de electrones en la membrana del tilacoide[(1,3)].

Para determinar la estructura y funcionamiento de la H^+-ATPasa de cloroplastos, se ha efectuado una intensa investigación, cuyos resultados más sobresalientes se describen en este trabajo.

COMPOSICION ESTRUCTURAL DE LA H^+-ATPasa

En cloroplastos de plantas superiores, en condiciones no fosforilantes, la ATPsintetasa se encuentra principalmente en la lamela estromal. Durante la energización del cloroplasto, se mueven lateralmente hacia el margen del tilacoide (Fig. 2) donde se localiza para efectuar la síntesis de ATP[(3)].

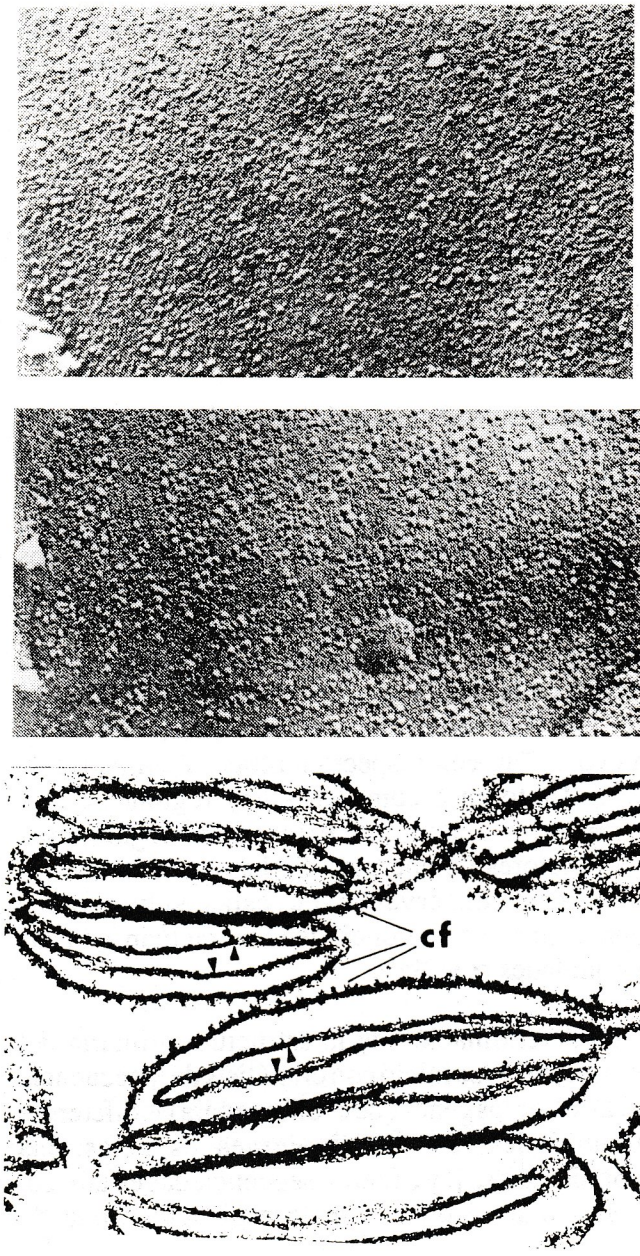


Figura 2. En cloroplastos no apilados la densidad aparente de la ATPasa (partículas mayores) es menor (a) que en los tilacoides apilados (b). En (a) las partículas parecen tener suficiente movilidad lateral en la membrana para dispersarse en las regiones que inicialmente estaban apiladas. (c) Partículas de CF_1 visibles principalmente en la superficie del tilacoide (regiones no apiladas).

La enzima está constituída por dos segmentos (Fig. 3); el "factor de acoplamiento" o CF_1 localizado en la parte externa de los tilacoides (estroma), y un "segmento hidrofóbico" o CF_o que está inmerso en la membrana. Al CF_1 lo forman cinco polipéptidos (Fig. 3) de diferente peso molecular (Tabla 1), denotados con las letras griegas: α, β, γ, δ, ε. Se ha sugerido que el CF_o consta de cuatro polipéptidos diferentes (Tabla 1). Tres de ellos han sido purificados y se denominan I, II y III. La cuarta subunidad se detectó y se confirmó su existencia por mapeo de genes del cromosoma del cloroplasto de chícharo [4, 5].

La H^+-ATPasa es el producto de dos sistemas genéticos. De los nueve polipéptidos que constituyen el complejo CF_o-CF_1, α, β, ε, I, III y IV son codificados en el DNA del cloroplasto, mientras que los genes del núcleo codifican las subunidades γ, δ y II [3, 4].

TABLA I.

CARACTERISTICAS DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO CF_o-CF_1 [10]

Subunidad	Peso Molecular (kD)	Estequiometría por complejo	Propiedades
a	59	3	Sitio de unión denucleótidos con distintas características de unión. -Estructura primaria conservada. -Algo de homología con ß. -CGC[a]
ß	52	3	-Contiene un grupo $-NH_2$ en un solo polipéptido -Sitio de unión de nucleótido(s). -Unión de DCCD y FSBA resultando en pérdida de actividad. -Una tirosina necesaria para la catálisis en cada polipéptido ß. -Sitio de unión de Mg^{+2} -Estructura primaria altamente -CGC[a].
	37	1	-Contiene un grupo-SH altamente reactivo a compuestos tiol en la luz. Contiene otro que se marca en la oscuridad. -CGN[b]. -Contiene un puente disulfuro.
	20	1-3	-Asociación inestable con CF_1 purificada. -CGN[b].
	16	1	-Produce inhibición a CF_1 purificada. -CGC[a].
I	18	1	-Contiene un solo grupo-SH. -Permite la unión CF_o y CF_1. -CGC[a].
II	16	1	-CGN[b]
III	8	5-10	-Asociadas con la translocación de H^+ -Sitio de unión del DCCD que inhibe la translocaciòn de H^+ -CGC[a]
IV	19	1	-Proteína altamente hidrofóbica. -CGC[a]

CGC[a]: cloroplasto.

CGN[b]: Codificada en el genoma del núcleo.

ESTEQUIOMETRIA DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO CF_0-CF_1

El peso molecular más aceptado del complejo CF_1 es de 400 KD, y una estequiometría de $\alpha_3\ \beta_3\ \gamma\ \delta\ \varepsilon$ (Fig. 3), confirmada por el análisis con ^{14}C CF_1 uniformemente marcado.

Se ha propuesto que la verdadera estequiometría es de tres subunidades δ por CF_1, y que su bajo rendimiento podría deberse a que se pierde fácilmente durante la purificación de CF_1. Las subunidades β de la F_1 de diferentes organismos son de menor peso molecular al correspondiente de las subunidades α [2].

La microscopía electrónica de tinciones negativas de CF_1 muestra una simetría de seis secciones, o una de tres, cuando las subunidades α se han unido a los anticuerpos monoclonales específicos anti α. Estos resultados están de acuerdo con una estequiometría α_3, β_3 [5].

Por otro lado, la estequiometría relativa de las subunidades de CF_0 aún es materia de debate, pero frecuentemente se supone que seis copias de la subunidad III constituyen un canal de forma hexagonal a través de la membrana, y que la subunidad II ayuda a mantener esta organización estructural (Fig. 3). Los papeles de las subunidades

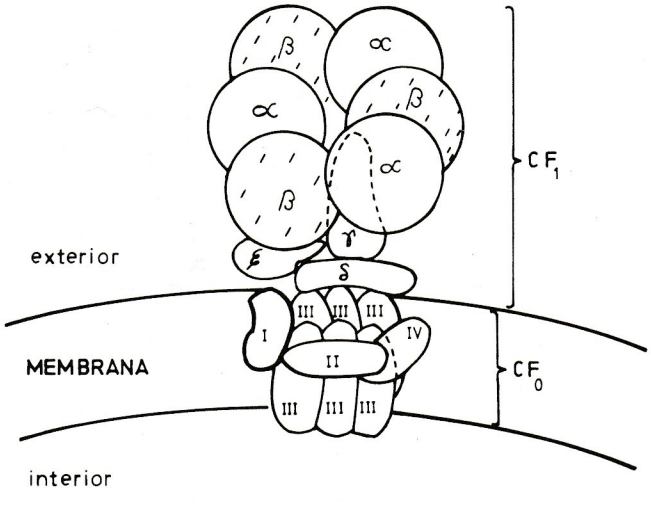


Figura 3. Organización de las subunidades de la H^+-ATPasa (CF_0-CF_1) de cloroplastos con la estequiometría $\alpha_3\ \beta_3\ \gamma\ \delta\ \varepsilon$. El sector CF_0 se encuentra embebido en la bicapa lipídica de la membrana.

I y IV no son claros, pero podrían funcionar haciendo más fuerte la asociación de CF_1 con el canal conductor de protones, formado por el hexámero de las subunidades III [3, 4].

ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO CF_0-CF_1 Y ORGANIZACION DEL FACTOR DE ACOPLAMIENTO.

La secuencia de aminoácidos de las subunidades α y β de cloroplastos indica alta homología entre ellas, especialmente en los sitios que pueden participar en la unión de los nucleótidos. Esta homología se manifiesta en cuatro regiones de los polipéptidos α y β de cloroplastos, mitocondrias y bacterias, las que constituyen, probablemente, las secuencias de aminoácidos relacionadas en la catálisis y la regulación. Los polipéptidos δ y ε de CF_1 han sido pobremente conservados, a través de la evolución, con respecto a otras subunidades de CF_1. Tanto en δ como en ε hay regiones cortas invariables entre los diferentes organismos transductores de energía. Se ha sugerido que las porciones conservadas de estas subunidades representan las regiones que interactúan con las subunidades α y β [4, 6].

La determinación de la estructura primaria del complejo CF_1 se inició con el análisis de la secuencia del DNA de los genes que codifican para las diferentes subunidades, en las siguientes especies: las subunidades α, β y ε fueron secuenciadas en tabaco, las subunidades β y ε, en maíz, espinaca y cebada [4].

Se han determinado los perfiles de hidropatía -método probabilístico, que en función de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, sugiere la estructura terciaria- de los polipéptidos de las subunidades I, III y IV de CF_0 obtenidos a partir de la secuenciación de los genes respectivos. Los resultados indican que las tres subunidades de CF_0 codificadas en el cloroplasto son proteínas membranales integrales. La subunidad I posee un segmento hidrofóbico anclado en la membrana, y otro hidrofílico que, formando un tallo, se proyecta hacia el estroma. Se cree que CF_1 se une a CF_0 por interacción con ese tallo hidrofílico. La naturaleza

altamente hidrofóbica de la subunidad III permite formar el canal de protones. La subunidad IV es una proteína hidrofóbica y presenta 5 α-hélices transmembranales -una de ellas probablemente interacciona con la subunidad III para formar el canal [3, 4].

La subunidad III es la más conservada de los polipéptidos de ATP sintetasa de cloroplastos, cianobacterias y *E. coli*, lo que indica que la secuencia de aminoácidos de esta subunidad ha sido mantenida fuertemente durante la evolución. La subunidad IV, aunque no tan conservada como la III, también posee un alto grado de similaridad de secuencias, con respecto a la correspondiente en bacterias. La secuencia de aminoácidos de la subunidad II, que en plantas se codifica en el núcleo, sugiere que la ATP sintetasa de cloroplastos y de cianobacterias puede contener una II y una II', más que dos subunidades II idénticas como en el caso de *E. coli*. Aunque la secuencia primaria de II y II' no es altamente conservada en el mismo organismo, la similaridad en los patrones del perfil de hidropatía sugieren que la conformación de estos polipéptidos es importante para la unión de CF_o a CF_1 [3, 4, 6].

ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LAS SUBUNIDADES DEL FACTOR CF_o

La estructura secundaria de cada subunidad del complejo CF_1 y la organización de las cadenas peptídicas en la membrana de *Escherichia coli* ha sido inferida de la secuencia de aminoácidos. Las subunidades α y β poseen una secuencia de sesenta y seis residuos de aminoácidos iguales, que participan en la unión de nucleótidos en la CF_1 de los organismos fotosintéticos. El porcentaje de homología de los aminoácidos de las subunidades β es de 90 por ciento y corresponde a la conservación de la estructura secundaria entre los diferentes organismos [4, 6].

La organización de las subunidades se ha investigado por entrecruzamiento químico y por la accesibilidad a los anticuerpos específicos. Las subunidades α y β arregladas alternativamente forman un hexámero (Fig. 3) y se propone que la subunidad γ, que constituye el centro del complejo, lo estabiliza. A su vez, las subunidades I y III están en contacto con δ y ε, lo que sugiere su papel en la unión de CF_1 a CF_o [2, 5].

La conformación de una proteína es la disposición de sus átomos en el espacio. Los cambios conformacionales son difíciles de determinar. Por medio de diferentes técnicas como dicroísmo circular, unión de sondas fluorescentes o compuestos radiactivos, se ha concluído que el complejo CF_1 sufre cambios conformacionales regulados por la unión de diversos ligandos.

Se han detectado (Tabla I): 1) tres sitios de unión de nucleótidos en CF_1 (por medio de sondas fluorescentes), localizados en los polipéptidos β. 2) un puente disulfuro en el polipéptido γ. 3) un grupo sulfhidrilo, muy reactivo, en el polipéptido γ, detectado con ayuda de reactivos sulfhidrilo, que se unen covalentemente a los grupos -SH, accesible tanto en la oscuridad como en la luz. 4) un grupo sulfhidrilo en el polipéptido γ accesible a varios compuestos como las maleimidas, cuando los tilacoides son incubados en la luz y en presencia de reactivos sulfhidrilo. 5) un grupo sulfhidrilo en el polipéptido ε. 6) una tirosina específica en cada uno de los polipéptidos β (Fig. 3).

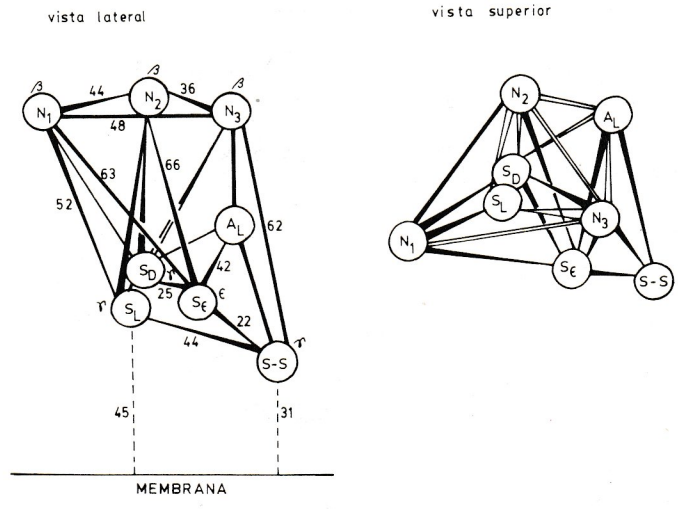


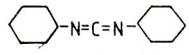
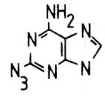
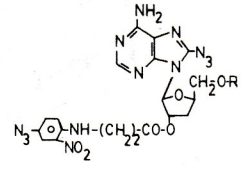
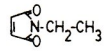
Figura 4. Arreglo espacial de algunos sitios específicos en CF_1. Las mediciones de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia postulan la localización espacial de los sitios de unión para nucleótidos (N_1, N_2, N_3) localizados en las subunidades β. En la subunidad γ se encuentran: un puente disulfuro (S-S), un grupo sulfhidrilo que se bloquea químicamente cuando se iluminan los tilacoides (S_L) y un grupo sulfhidrilo altamente reactivo (S_D). - contiene un grupo sulfhidrilo (S_ε) y un polipéptido α tiene un grupo amino. Los números indican las distancias máximas, en angstroms, a las que se encuentran los diferentes grupos funcionales.

Las mediciones de transferencia de energía fluorescente han servido para establecer, en forma general, un mapeo estructural del CF_1 de cloroplastos (Fig. 3); asimismo, se ha establecido que esta macromolécula es intrincadamente asimétrica, con los sitios de unión de nucleótidos lejos de la superficie de la membrana, y que una región regulatoria está localizada entre los sitios de unión de los nucleótidos y la membrana.

FUNCIONALIDAD DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO CF_0-CF_1

A partir del empleo de análogos de nucleótidos unidos covalentemente a la H^+-ATPasa, se ha determinado que las subunidades α y β fijan nucleótidos. Se sabe que α posee los sitios catalíticos donde se hidroliza el ATP. En F_1 de *E. coli* y de mitocondrias y en CF_1 de espinacas, el DCCD se une a los residuos ácido glutámico 204 y 215 de la subunidad ß, respectivamente (Tabla II).

TABLA II. NOMBRES Y ESTRUCTURAS DE ALGUNOS COMPUESTO QUIMICOS QUE INHIBEN LA SINTESIS E HIDROLISIS DEL ATP EN CLOROPLASTOS [3, 7, 8].

NOMBRE	ABREVIATURA	ESTRUCTURA
Diciclohexil-carbodiimida	DCCD	
2-azido-ATP	2-N ADP_3	
8-azido-3'-O-N-(4azido-2 nitrofenil)amino propil ATP	3'azido-8-N_3ATP	
N-etilmaleimida	NEM	
o-fenilendi-maleimida	OPDM	

La sonda de fotoafinidad 8-azido ATP se une a la lisina 317, isoleucina 321 y a la tirosina 328 de la subunidad β de F_1 de mitocondria y espinaca. Estos aminoácidos se localizan en una zona denominada "doblez Rossmann", que es esencial para la actividad catalítica. La utilización de los análogos de nucleótidos con fotoafinidad a F_1 de organismos fotosintéticos marcan las subunidades α y β o β únicamente, según la conformación "sin" o "anti" (Fig. 5) de la sonda. La conformación "anti" se requiere para que los nucleótidos sean un buen sustrato de la enzima [6, 7, 8].

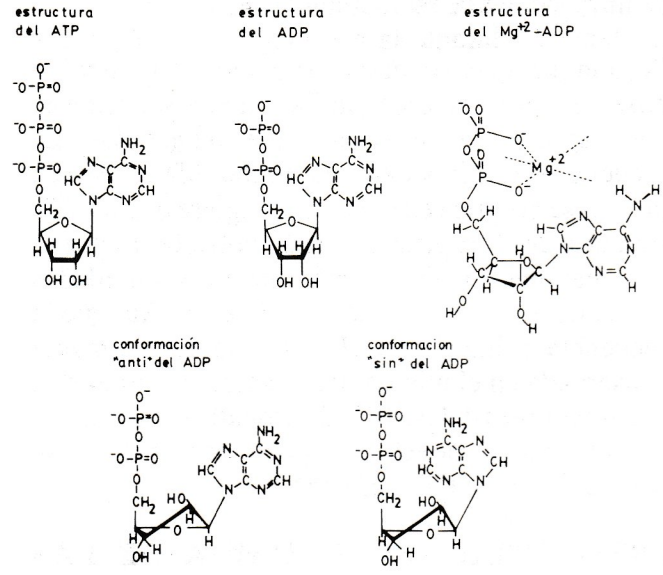


Figura 5. Estructuras del ATP, ADP, Mg^{+2}-ADP, "anti" y "sin" ADP.

Se ha demostrado que la subunidad γ es necesaria para que el complejo α–β reconstituído de *E. coli* desarrolle actividad máxima de ATPasa; en los organismos fotosintéticos esta reconstitución no se ha logrado. Sin embargo, las subunidades β aisladas de CF_1 de cloroplastos hidrolizan ATP con velocidades similares a las de CF_1 deficientes de alguna subunidad [6, 7].

La subunidad γ forma el centro del complejo α-β *in situ*, y regula la actividad de la ATPsintetasa correlacionada con cambios conformacionales de la subunidad γ [6, 7].

En CF_1 de *Rhodospirillum rubrum*, la subunidad γ es necesaria para la fotofosforilación. En espinacas, CF_1 tiene un puente disulfuro S_1-S_2 y dos residuos sulfhidrilo S_3 y S_4, los cuales pueden oxidarse para

formar un puente disulfuro, o pueden entrecruzarse con algunos compuestos químicos, que inducen una salida de protones a través de la membrana del cloroplasto, lo que indica que la subunidad γ funciona como una "compuerta" de protones [2, 7].

El grupo funcional sulfhidrilo S_3 es esencial para la actividad de ATPsintetasa y es el único grupo SH conservado en todas las subunidades γ de diferentes organismos. La reducción del puente disulfuro S_1-S_2 induce la actividad ATPasa en cloroplastos, sin embargo, ese puente no se encuentra en la subunidad γ de mitocondrias ni de *E. coli* [4, 7].

La subunidad δ es necesaria para prevenir la salida inespecífica de protones a través de CF_o y no se requiere para la fotofosforilación [3, 7].

La CF_1 aislada y desprovista de la subunidad ε posee actividad de ATPasa dependiente de Ca^{+2}, y no se reasocia nuevamente al tilacoide, excepto cuando se le adiciona la subunidad ε. Aunque se sabe que esta subunidad no se requiere para la unión de CF_1 a la membrana, sí es indispensable, al igual que la subunidad δ, para prevenir la salida inespecífica de protones a través de CF_o [3, 7].

PROPIEDADES CATALITICAS DE CF_1.

a) Activación de la ATPasa de CF_1.

La CF_1 es una ATPasa latente, la activación *in situ* de la enzima unida a la membrana ocurre por energización de la membrana, DTT y luz, o metanol. La activación de CF_1 latente-aislado se efectúa por tratamiento con tripsina, calor, DTT, detergentes o alcoholes [3].

En presencia de $MgCl_2$ la actividad hidrolítica de la ATPasa mitocondrial soluble (F_1) es activada por Pi a concentraciones mayores de 10mM. La activación también ha sido observada cuando parte del agua del medio de incubación es reemplazada por un solvente orgánico como el dimetilsulfóxido, etilenglicol, dimetilformamida, etc.

Es probable que la activación *in vitro* de la actividad ATPásica de CF_1 sea un resultado del cambio en la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de este complejo enzimático, lo que dependerá del método utilizado. Por ello, no puede plantearse un mecanismo general que participe en el proceso de activación.

Los tratamientos físicos con etanol o calor desplazan o liberan la subunidad ε del CF_1 aislado, sin cambiar el estado de oxidación de los puentes disulfuro de la enzima, así se induce la activación de la ATPasa. Se deduce entonces, que la subunidad ε actúa como inhibidor intrínseco de CF_1 [7].

Los tratamientos químicos con DTT modifican el estado redox de los puentes disulfuro e inducen la activación de la ATPasa del CF_1. Esta activación se correlaciona con la reducción del puente disulfuro (S_1 - S_2) en la subunidad γ. La proteólisis del CF_1 con tripsina, a nivel de la subunidad α, también induce activación de la ATPasa. Este tratamiento no libera a la subunidad ε [7, 8].

La activación con tripsina, calor o DTT del CF_1 aislado, induce actividad de ATPasa dependiente de Ca^{+2}; en cambio, el detergente neutro octilglucósido genera una ATPasa dependiente de Mg^{+2}. La especificidad al catión Ca^{+2} o Mg^{+2} también se manifiesta con la adición de malato a pH 6 o de bicarbonato a pH 8 respectivamente. La especificidad al ión Mg^{+2}, o Ca^{+2} depende de la interacción con el ATP. El complejo ATP-ión metálico es el sustrato de la enzima (Fig. 5). Por el contrario, el ATP libre y los iones metálicos libres, a concentraciones elevadas actúan como inhibidores competitivos potentes (Fig. 5). El mejor sustrato es el ATP-Mg^{+2}, aunque otros nucleótidos con el anillo purínico, como el GTP, también son hidrolizables, pero a menor velocidad. La especificidad de los sustratos para la actividad de la ATPasa y de la ATPsintetasa dan resultados semejantes [2].

Durante la activación (por energización del tilacoide) de la ATPasa del complejo CF_1-CF_o unido a membrana existen dos fenómenos: primero, la formación de un potencial protón motriz ($\Delta\bar{\mu}H^+$) a través de la membrana (Fig. 1). Segundo, la inducción de un cambio conformacional en el segmento CF_1 de la ATPasa, que expone el residuo

S_3 y hace accesible el puente disulfuro S_1-S_2 a la ruptura, por reducción, de dicho puente (Fig. 4). A la inversa, los grupos tiol S_1 se protegen de los agentes oxidantes en presencia del $\Delta\tilde{\mu}H^+$ y se exponen cuando el $\Delta\tilde{\mu}H^+$ se cancela [1, 3, 7].

En cloroplastos, el agente reductor disulfuro natural es una tiorredoxina. Aparentemente la activación de la ATPasa unida a la membrana del tilacoide es causada por la protonación y desprotonación de los residuos sulfhidrilo del complejo CF_o-CF_1. Pero en CF_o-CF_1 reconstituído en liposomas, las actividades de ATPasa y ATPsintetasa dependen de la naturaleza de los fosfolípidos utilizados. En bacterias fotosintéticas, la activación de la ATPasa membranal parece presentar diferentes mecanismos. Los aspectos en común son: que con la activación de la enzima se produce también una activación de la hidrólisis del ATP en la obscuridad, y que la síntesis de ATP es dependiente de la luz[3, 8].

b) Efecto del gradiente de protones sobre la actividad de la CF_1

Es claro que la síntesis de ATP está acoplada al flujo de protones de dentro hacia afuera del tilacoide y que depende del valor del $\Delta\tilde{\mu}H^+$ a través de la membrana (Fig. 1).

Se ha reportado una estequiometría de 3 H^+/ATP para la síntesis de ATP en cloroplastos y con CF_o-CF_1 reconstituído en liposomas, la cual parece depender de la naturaleza de los liposomas utilizados[3].

Respecto a los protones liberados por los fotosistemas se ha reportado: 1) Mayor eficacia en el fotosistema I que en el II, lo que significa que los H^+ liberados por el fotosistema I están mejor acoplados a la síntesis de ATP que los liberados por el fotosistema II y que se complementan. Resultan más eficientes los fotosistemas, cuando trabajan en serie; 2) No existe diferencia entre los protones generados por los dos fotosistemas; 3) Existen ciertos dominios de H^+ en la membrana de los tilacoides donde los protones no están equilibrados con la fase acuosa, principalmente los generados por el fotosistema II[1, 3, 7].

Como se ha mencionado, el complejo F_o-F_1 de mitocondrias, cloroplastos y bacterias cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi por medio de la energía del gradiente protón-electroquímico derivado del transporte de electrones (Fig. 1). El mecanismo por el cual ese complejo utiliza la energía derivada del gradiente, se desconoce.

Con el descubrimiento de la existencia de ADP y ATP fuertemente unidos a la ATPsintetasa, se formuló la hipótesis de que la fuerza protón-motriz se requiere principalmente para liberar el ATP sintetizado por la enzima. Efectivamente, diferentes grupos de investigadores encontraron que el CF_1 de plantas y el F_1 de otras fuentes, pueden sintetizar ATP, en ausencia de un gradiente electroquímico, el cual queda fuertemente unido a la enzima. El CF_1 libre de membrana efectúa la síntesis de ATP a partir del ADP que tiene fuertemente unido y del Pi del medio, en ausencia de una fuente externa de energía. Al utilizar reacciones de intercambio O^{18}-H_2O se obtuvieron evidencias de que, tanto la unión de los sustratos a la enzima como la liberación del ATP sintetizado, requieren de la fuerza protón-motriz[5, 8].

Recientemente, se ha demostrado que en F_1 soluble y en ausencia de un gradiente se sintetiza ATP a partir de ADP y Pi del medio, cuando parte del agua de éste ha sido reemplazada por diferentes solventes orgánicos; el nucleótido permanece fuertemente unido a la enzima. Por otro lado, de Meis observó que la actividad de ATPasa de la F_1 se inhibe en presencia de concentraciones altas de solventes orgánicos, que estimulan al máximo la síntesis de ATP.

SITIOS DE UNION DE NUCLEOTIDOS EN EL CF_1.

Los nucleótidos unidos a CF_1 aislado han sido objeto de estudio de varios investigadores. El número de nucleótidos incorporados por molécula de CF_1 así como las características de la unión dependen del nucleótido suplementado al medio y de la ausencia o presencia de iones metálicos. Se han observado tres sitios de unión de nucleótidos con características distintas en el CF_1 aislado: uno,

donde hay un ADP por molécula de enzima, que permanece unido a ésta aún después de diálisis prolongada o filtración en gel. Lo denominan "sitio 1" y al parecer es diferente al sitio catalítico,pues en la enzima activada con calor la velocidad de intercambio del ADP es 100 veces menor que la velocidad de hidrólisis del ATP[5, 7].

El CF_1 activado con calor, en presencia de Ca^{+2} se inactiva por la unión de ADP al "sitio 1", pero no por el ATP. En presencia de Mg^{+2}, el ATP se une al "sitio 2", del cual no es removido por diálisis, filtración en gel o durante el recambio catalítico de la enzima en presencia de Ca^{+2}-ATP[7]

Por diálisis forzada, se detecta la unión reversible de ADP y de ATP al "sitio 3" con una K_d de 4 μM para el CF_1 aislado, o de 2 μM para el complejo CF_o-CF_1 reconstituído en liposomas. Se cree que este tercer sitio es el sitio catalítico[7].

El contenido intrínseco de ADP reportado por el CF_1 purificado, aún después del tratamiento para remover el ADP residual, es de 0.5 a 1 mol de ADP por mol de CF_1, a diferencia del complejo CF_o-CF_1, que contiene por lo menos 1 ADP y 1 ATP por mol [5, 8].

Por otro lado, los tilacoides iluminados en presencia de C^{14}-ADP unen entre 0.85 y 1.3 moles de nucleótido por mol de CF_1, bajo condiciones de estado estacionario. Sin embargo, además de ese nucleótido radiactivo, deben estar presentes otros nucleótidos no radiactivos y no intercambiables[8].

Otros investigadores han detectado seis sitios de unión de nucleótidos en el CF_1 aislado, e indican la presencia de dos sitios de alta afinidad para el ADP o ATP (K_d=1 a 5 μM) un sitio con ADP endógeno, no intercambiable, y tres sitios de baja afinidad que unen ADP o ATP con una constante de disociación K_d=15 a 20 μM; la estabilidad de los nucleótidos en los sitios de baja afinidad se incrementa por la activación del CF_1 por calor,y la remoción de las subunidades δ o ε no afecta el número, ni los parámetros cinéticos de unión de los nucleótidos[6, 7, 8].

El CF_1 contiene dos categorías de sitios de unión de nucleótidos: los denominados de "unión fuerte" con K_d de 10^{-7} o menor y los de "unión débil" con una K_d mayor. Con el CF_1 unido a la membrana, las afinidades por los nucleótidos se modifican por la interacción de la enzima con la membrana del tilacoide, por energización luminosa y por la fuerza protón-motriz. Uno de los sitios de "unión fuerte" en el CF_1 aislado puede transformarse en sitio de "unión débil" cuando CF_1 se une a la membrana. La activación de la ATPsintetasa en tilacoides se caracteriza, por intercambiar sus nucleótidos unidos con los nucleótidos libres del medio. A concentraciones altas de ADP en el medio y luz, aproximadamente el 35 por ciento de los nucleótidos de la enzima está unido débilmente y el 65 por ciento restante está unido fuertemente, y queda el 100 por ciento de la enzima con ADP unido[6, 7, 8].

REGULACION DE LA H^+-ATPasa

Para que la fotofosforilación tenga lugar deben establecerse valores críticos de ΔpH y $\Delta\psi$. La fotofosforilación, como una función del ΔpH está limitada por la fracción de moléculas de ATPasa activadas. Cuando el potencial de fosfato es alto, la hidrólisis de ATP sucederá a bajos ΔpH antes de que se realice la síntesis de ATP, que ocurre a un ΔpH alrededor de 3 unidades. Sin embargo, la relación del proceso global parece incluir otros controles cinéticos, además del control termodinámico y de la activación de la enzima[6, 7, 8].

La fotofosforilación, por el CF_1 de cloroplastos rotos (tilacoides intactos), es lineal con el tiempo, hasta que la mayor parte del ADP es convertido en ATP. La velocidad de hidrólisis del ATP, en esas condiciones, es más lenta que la velocidad de hidrólisis en la obscuridad, cuando la ATPasa se activó previamente con luz, aún en la presencia de DTT más arsenato, o de fosfoenol piruvato/piruvato cinasa, que elimina la resíntesis de ATP. Bajo condiciones fosforilantes, la afinidad aparente para el ATP es menor, por un orden de magnitud, que la afinidad por el ADP. En el cambio a hidrólisis neta (obscuridad) en tilacoides, la afinidad por el ATP se incrementa notablemente. Estos resultados sugieren que existen, al menos, dos conformaciones activas diferentes de la enzima (Fig. 6). Una es específica para la unión de ADP y cataliza preferencialmente la formación neta de ATP y otra

es especializada para unir ATP y catalizar su hidrólisis[7].

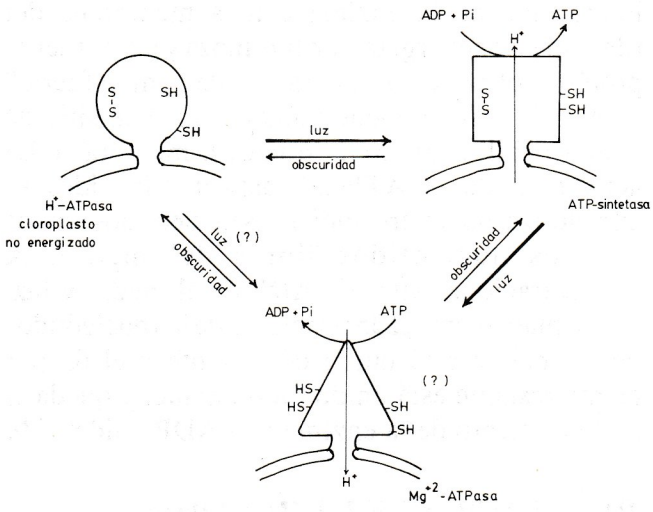


Figura 6. Representación esquemática del cambio conformacional que sufre el complejo H^+-ATPasa requerido para la síntesis y la hidrólisis del Mg^{+2}-ATP.

Otras evidencias indican que, en cloroplastos modificados covalentemente con glutaraldehido, se inhibe diferencialmente la síntesis de ATP, comparada con el intercambio Pi:ATP "disparado" con luz y la síntesis e hidrólisis del ATP, detectadas con anticuerpos dirigidos contra CF_1, en cloroplastos también se inhiben diferencialmente[7].

En el estudio de las reacciones de intercambio Pi-H_2O en cloroplastos, se ha observado que la inhibición de ATP por luz es inexplicable por un cambio en las constantes de velocidad que intervienen en la hidrólisis y la disociación del producto, pero puede producirse al suponer cambios en la proporción de dos especies enzimáticas activas[2, 7].

CAMBIOS CONFORMACIONALES DE CF^1-CF_o INDUCIDOS POR ENERGIZACION DE LA MEMBRANA O UNION DE LIGANDOS

La activación de la ATPasa dependiente de energía está relacionada, probablemente, con un cambio conformacional de la enzima. Las evidencias de dichos cambios conformacionales en condiciones energizadas son: a) la incorporación de agua tritiada en el CF_1, b) liberación de adenin nucleótidos, c) la fluorescencia del isotiocianato de eosina covalentemente unido a la enzima, y d) la incorporación de N-etilmaleimida (NEM) (Tabla II) a un -SH del CF_1 durante la energización del tilacoide, el cual no está expuesto a la obscuridad[2, 3, 7].

Además, se ha reportado que el reactivo para grupos sulfhidrilo NEM (Tabla II) y su análogo fluorescente N-(1-anilinonaftil-4)maleimida, se une a las subunidades γ y ε; por energización de la membrana, un grupo -SH adicional se modifica en γ. Estas reacciones se previenen por nucleótidos (ADP, ATP), nucleótidos y Pi o desacoplantes. La maleimida bifuncional o-fenilendimaleimida (OPDM) entrecruza los grupos -SH de γ: el accesible en la obscuridad y el accesible en la luz, e induce en la H^+-ATPasa, unida a membrana, un incremento en la permeabilidad a los protones. Por lo que se cree que el grupo -SH que se expone por energización de la membrana tiene un papel esencial en la regulación de la salida de protones a través del complejo CF_o-CF_1 en condiciones normales de fotofosforilación [2, 3, 7].

En nuestro laboratorio, a partir de maleimidas, bismaleimidas y dimetilformamida, se han obtenido evidencias[10] de que el complejo CF_o-CF_1 de cloroplastos de plantas de chícharo, unido a la membrana del tilacoide, adquiere, al menos, dos conformaciones diferentes durante la energización del cloroplasto con luz (Fig. 6). Aparentemente, se requiere una conformación para la síntesis del ATP en la luz y otra es necesaria para efectuar la hidrólisis. Adicionalmente, la conformación activa en la obscuridad es modificada diferencialmente con la presencia de ADP, ATP o Pi en el medio. Se sabe que el ADP y el ATP inducen cambios conformacionales. Estos cambios son distintos, ya que dan diferentes respuestas con algunas de la maleimidas ensayadas.

Los datos anteriores indican que los cambios conformacionales del CF_1 ocurren por energización de la membrana. Sin embargo, quedan por contestarse numerosas preguntas para elucidar la relación entre los diferentes cambios

conformacionales y la síntesis de ATP. Asimismo, se ignora el mecanismo exacto de catálisis acoplado al transporte de protones durante la fotofosforilación y falta mucho por conocer respecto de la complicada estructura del complejo CF_o-CF_1.

ABREVIATURAS

CF_o-CF_1	complejo de ATPsintetasa de cloroplasto;
SDS	dodecil sulfato de sodio;
KD	kilodalton;
DCCD	N,N'diciclohexilcarbodiimida;
DTT	ditiotreitol;
Pi	fosfato inorgánico;
ATP	adenosin trifosfato;
ADP	adenosin difosfato;
H^+	protón,
FSBA	5'-p-fluorosulfonil benzoil adenosina;
PEP	fosfoenol piruvato;
NEM	N-etilmaleimida.

BIBLIOGRAFIA

1. Avron, M. (1980): Photosynthetic electron transport and photophosphorylation. En The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Editores: Stumpf, P. K. y Conn, E. E. Academic Press. New York. *8*: 164-191.

2. Merchant, S. y Selman, B. R. (1985) : Photosynthetic ATPases: purification, properties, subunit isolation and function. Photosynthesis Research *6*: 3-31.

3. Barber,J. (1987): Composition organization and dynamics of the thylakoid membrane in relation to its function. En The Biochemistry of Plants. A Comprehensive treatise. Editores: Stump, P. K. y Conn, E. E. Academic Press. New York Vol. X: 75-130.

4. Hudson, B. y Mason, J. G. (1988): The cloroplast genes encoding subunits of the H^+-ATP synthase. Photosynthesis Research *18*: 205-222.

5. Tiedge,H. y Schäfer, G. (1989): Symmetry in F_1-type ATPases. Biochim Biophys Acta *977*: 1-9.

6. Futai, M., Noumi, T. y Maeda, M. (1989): ATP synthase (H^+-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. Ann Rev Biochem *58*: 111-136.

7. Strotmann, H. y Bickel-Sandkötter, S. (1984): Structure, function, and regulation of chloroplast ATPase. Ann Rev Plant Physiol *35*: 97-120.

8. Cross, R. L. (1981): The mechanisms and regulation of ATP synthesis by F_1-ATPases. Ann. Rev. Biochem. *50*: 681-714.

9. Root, R., Cidon, S. y Nelson, N. (1986): Properties of H^+-ATP synthases. En H^+-ATPase (ATPsynthase): structure, function, biogenesis of the F_oF_1 complex of coupling membranes. Editores: Papa S., Altendorf L., Ernster L. y Packer L. ICSU Italy. pp 247-257.

10. Peña-Valdivia, C. B. (1990): Cambios conformacionales de la H^+ATPasa de cloroplastos, evidenciados por maleimidas y N,N-dimetilformamida como inhibidor de la fotofosforilación. Tesis de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química, UNAM- México pp. 1-207.

ROMPIMIENTO DEL DNA, CATALIZADO POR LA RIBOZIMA DE *TETRAHYMENA*

(Herschlag, D. y Cech, T.R., DNA cleavage catalysed by the ribozyme from *Tetrahymena*., NATURE., *344*; (6265) 405-409 (1990); Robertson, D.L. y Joyce, G.F., Selection "in vitro" of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA., ibid. 467-468 (1990).

Una enzima RNA, derivada de la secuencia separadora de auto-empalme de *Tetrahymena thermophila* cataliza la ruptura secuencia-específica de un sustrato oligodesoxirribonucleotídico. Comparado con el RNA, el sustrato DNA se une muy débilmente y se rompe muy lentamente, revelando la importancia del grupo hidroxilo 2', tanto en las etapas de unión como en las químicas. El hallazgo de que la catálisis por RNA puede extenderse a sustratos DNA indica nuevas posibilidades para la transposición de secuencias separadoras y para el diseño de agentes que rompan al DNA con nuevas especificidades de secuencia.

En la segunda referencia, los autores describen técnicas para la mutación, selección y amplificación del RNA catalítico en un vaso de reacción simple. Trabajaron con la ribozima de *Tetrahymena* derivada de la misma secuencia del trabajo de Cech, que cataliza las reacciones de transferencia del fosfoéster secuencia-específico. Consiste de 413 nucleótidos y adopta una bien definida estructura secundaria y terciaria responsable de la actividad catalítica. Seleccionaron formas variantes de la enzima que pudieran reaccionar mejor con un sustrato DNA. Esto condujo a la recuperación de una mutante de la ribozima que rompe al DNA más eficientemente que la enzima tipo original.

Dr. Guillermo Carvajal Sandoval
Dep. de Bioquímica. ENCB-IPN
Subdirec. de Invest. INER-SSA
Comentarista

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 de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTICULOS DE REVISION

1) El artículo deberá enviarse en un disco flexible de 5 1/4 pulgadas de 365 KB de capacidad, escrito en el procesador de textos *"Word 5"*, sin ningún formato y con una extensión máxima de 18,000 caracteres. Este deberá ir acompañado de dos impresiones del artículo en el que se marcarán en color las palabras o líneas que deban ir en *cursivas* o **negritas**, así como todas las anotaciones necesarias. En el caso de no tener acceso a este procesador, el manuscrito podrá enviarse mecanografiado, con una extensión que no exceda de 12 cuartillas escritas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón).

2) Se deberá incluir un resumen de más o menos diez renglones, que deberá ir seguido por un conjunto de tres a seis palabras clave, que se usarán como código en el catálogo internacional.

3) Se sugiere un máximo de diez referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener: nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, número del volumen en *cursivas* y antecedido por dos puntos el número de la primera y última páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:.

   Miller, C. O. (1982) Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. Plan Physiol *69*: 1274-1277.

   Los libros deberán citarse de la siguiente forma:

   Larkins, B. A., Pearlmutter, N. L. y Hurman, 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, I.; Phillips, R. L.; Green, C. E. y Gengenbach, B. G. Academic Press. New York. pp. 49-55

4) Se aceptarán como máximo seis figuras o tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta, las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros.

5) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de página. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen 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, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, etc.

2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.

3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.

4) Se aceptarán un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto. En casos de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una 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 así como las pruebas de página se comunicarán al primer autor.

Los discos y las dos copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apdo. Postal 70-281, México 04510, D. F., o al Dr. Alberto Hamabata, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apdo. Postal 14-740, México 07000, D. F., o bien a través del corresponsal del BEB en su localidad.