

DE LA BIOENERGETICA MITOCONDRIAL A LA FOTOSINTESIS *

por *Rubén H. Vallejos* **

Palabras preliminares

Señor Presidente de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Señores Académicos, Señoras y Señores:

Dijo Sir James Barrie: "El científico parece ser un hombre que tiene algo que decir justamente ahora, y el único hombre que no sabe cómo decirlo":

Así es como me siento al querer expresar mi pensamiento y emociones por este acto en que me incorporo a esta prestigiosa Academia.

Si hoy estoy aquí creo que es oportuno mencionar que lo es debido al continuo apoyo recibido en toda mi carrera científica del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la institución que creara y orientara con tanta sabiduría el Profesor Bernardo Houssay;

A la dirección y aliento del Dr. Stoppani que me brindó un lugar en su laboratorio;

A la ayuda recibida de todos mis compañeros y colegas de esos primeros años, pero especialmente del Dr. Juan José Cazzulo, con quien, durante 10 años luchamos codo con codo, por organizar el Departamento de Bioquímica de la Universidad Nacional de Rosario;

Al entusiasmo, capacidad y empeño de todos mis colaboradores;

A la tolerancia y cooperación de mi familia, en particular de mi esposa;

A todos ellos mi más profundo reconocimiento.

¿Qué es la bioenergética mitocondrial?

En esta oportunidad quisiera referirme al pasado, presente y futuro de la Bioenergética, desde mi perspectiva personal como investigador en el tema.

En 1962, al aceptar el Dr. Stoppani dirigir mi iniciación en la investigación científica facilitada, en esa ocasión, por una beca del CONICET, me propuso dedicarme al estudio de la acción de los esteroides sobre los sistemas multienzimáticos de transporte de electrones. La elección del

* Conferencia pronunciada el 16 de Junio de 1984 en el acto de su incorporación como Académico Correspondiente en Rosario.

** Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Fundación Miguel Lillo - Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531 - 2000 Rosario, Argentina.

tema no podía ser más oportuna pues unos pocos años antes la introducción de la centrífuga refrigerada había permitido la preparación de mitocondrias aisladas de distintos órganos.

Por otra parte el Dr. Stoppani tenía una larga experiencia con una preparación submitocondrial clásica, la preparación de Keilin y Hartree, que databa desde su estadía en Cambridge junto al Profesor Keilin y estaba abocado al estudio de los esteroides por lo que contaba con una amplia colección no sólo de las hormonas conocidas sino de numerosos derivados de difícil obtención.

Fue así como en su laboratorio puede poner a punto las técnicas de preparación de mitocondrias intactas de hígado de rata y la determinación del control respiratorio e índice P/O que permiten su caracterización. Con esta metodología pude abocarme al estudio del efecto del estilbestrol, la progesterona y otros esteroides sobre el metabolismo mitocondrial lo que constituyó mi tesis doctoral.

Si me permiten quisiera recordar algunos de estos viejos experimentos. Ante de ello quisiera contestar la pregunta:

¿Qué es la bioenergética mitocondrial?

La bioenergética es la ciencia que estudia cómo la célula obtiene y gasta la energía necesaria para todo el trabajo biológico que realiza: crecer, interactuar con el medio ambiente y reproducirse.

La mitocondria es la organela subcelular donde ocurren los procesos metabólicos que en las células eucariotes heterótrofas, incluyendo la de los animales y el hombre mismo, se genera la mayor parte de la energía necesaria en forma de ATP o adenonina trifosfato. El proceso de síntesis de ATP o fosforilación oxidativa se realiza acoplado a la respiración celular (fig. 1). Tres tipos de sustancias interfieren este proceso: a) los

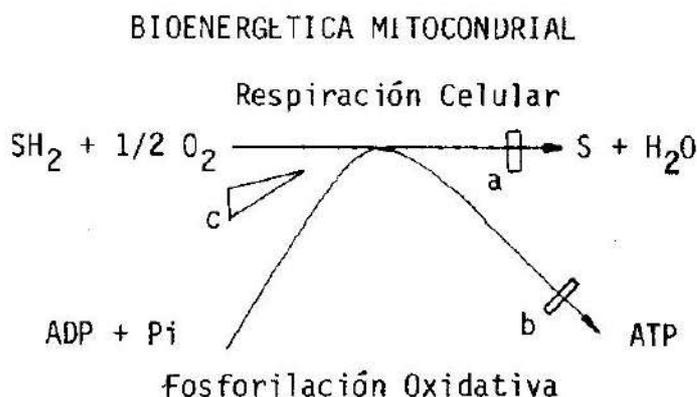


FIG. 1. — Esquema de la respiración celular y fosforilación oxidativa. SH_2 ; sustrato reducido; S, sustrato oxidado; a, acción de inhibidores del transporte de electrones; b, acción de inhibidores de la síntesis de ATP; c, desacoplantes.

inhibidores del transporte de electrones; b) los inhibidores de la síntesis de ATP; y c) los desacoplantes. El estudio de estas sustancias han contribuido marcadamente a entender el proceso bioenergético.

Así, por ejemplo, con el Dr. Stoppani confirmamos¹ que la proges-

terona inhibe preferentemente la oxidación de sustratos como el malato y glutamato pero además descubrimos que cuando succinato era el sustrato la progesterona actuaba como un inhibidor de la transferencia de energía (fig. 2).

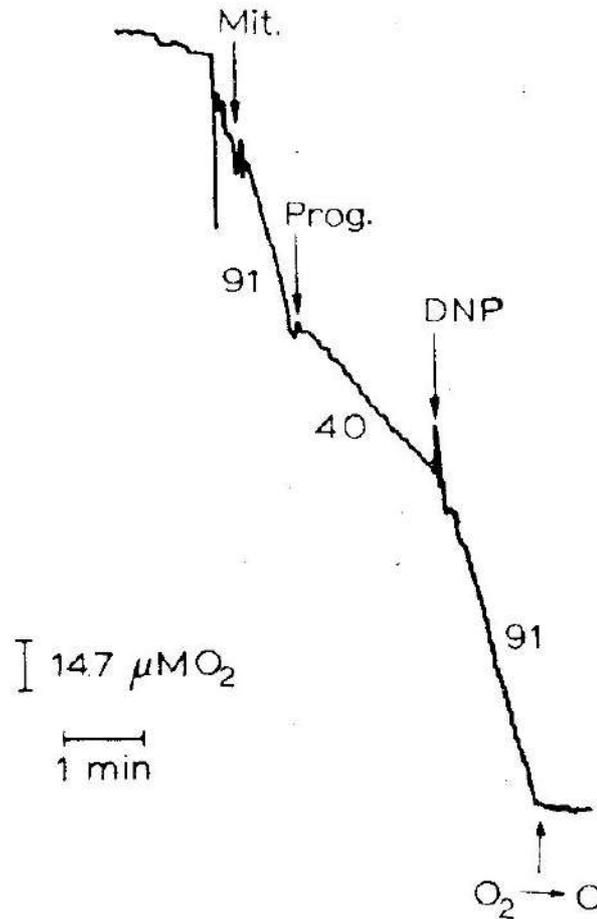


FIG. 2. — Efecto de progesterona sobre mitocondrias de hígado de rata. Mit., mitocondrias; Prog., progesterona 180 μ M; DNP, 2-4 dinitrofenol 61 μ M. Los números indican velocidad de respiración (m μ átomos O/mg por minuto) con succinato como sustrato.

Pese al tiempo transcurrido, y tal vez porque he dejado de trabajar con esteroides, todavía me sorprende ver que algunas de esas primeras observaciones que hice junto al Dr. Stoppani sean aún de utilidad para otros científicos^{2,3}.

Una consulta de un colaborador del Dr. Sivori me llevó a estudiar el efecto de alcaloides y antibióticos sobre el metabolismo mitocondrial. El Dr. Sivori había observado que en el bosque de La Plata, algunos árboles tenían su corteza cubierta por líquenes y hongos mientras que otras especies, en el mismo lugar, creo que el laurel en particular, tenía su corteza limpia y relacionó esta observación con la presencia de alcaloides en dicha corteza.

Efectivamente los alcaloides resultaron tener acciones muy definidas sobre la respiración celular y la fosforilación oxidativa. Así, por ejemplo,

con el Dr. Oscar Roveri pudimos demostrar que la spegazzinina (fig. 3), un alcaloide dihidroindólico, aislado por el Dr. Orazi y colaboradores⁴, de la corteza de *Aspidosperma chakensis*, el quebracho, es un potente inhibidor de la fosforilación oxidativa⁵.

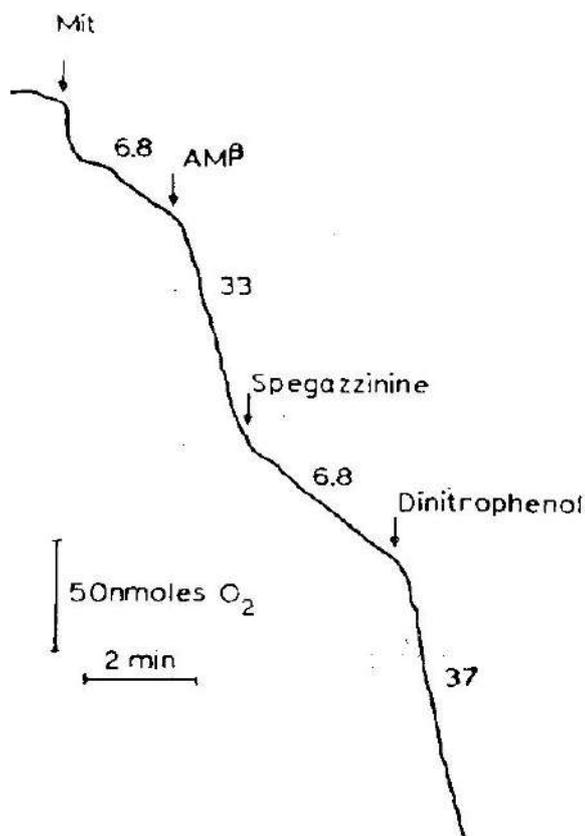


FIG. 3. — Efecto de spegazzinina sobre la respiración mitocondrial. AMP, 1mM y spegazzinina 315 μ M. El sustrato fue malato-glutamato.

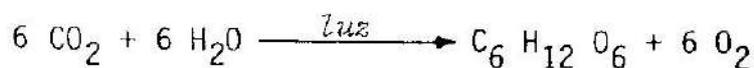
Los alcaloides son agentes aleloquímicos de las plantas o sea son armas con las que se defienden del ataque de depredadores sean estas bacterias, hongos, insectos o animales y también para combatir la competencia de otras especies vegetales⁶.

Esto nos llevó a preguntarnos qué efecto podrían tener los alcaloides sobre el metabolismo energético de las plantas y en particular en proceso fotosintético.

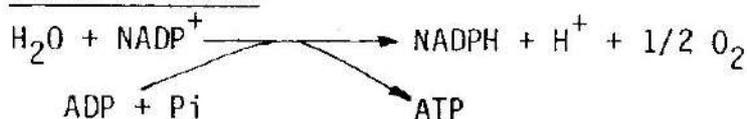
¿Qué es la fotosíntesis?

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas captan la luz solar y la utilizan para generar poder reductor en forma de NADPH y energía química en forma de ATP. En una segunda etapa, la etapa oscura, el poder reductor y el ATP son utilizados para la fijación de CO_2 y la síntesis de compuestos orgánicos (fig. 4). Como son estos compuestos orgánicos los que, tras numerosas transformaciones, sirven de sustrato

ECUACION GENERAL DE LA FOTOSINTESIS



ETAPA LUMINOSA



ETAPA OSCURA

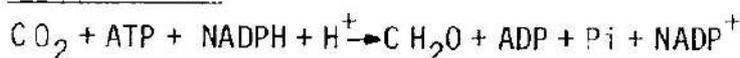


FIG. 4. — Ecuación general de la fotosíntesis.

a la respiración celular es posible considerar a este proceso como inverso de la fotosíntesis. En definitiva la energía para prácticamente toda la vida que existe sobre la Tierra proviene del sol. Se me ocurre que este hecho está profundamente relacionado con el culto que el hombre primitivo y las religiones antiguas brindaban a nuestro astro.

Entre las conclusiones de las Tesis doctorales de Carlos Andreo y Ricardo Ravizzini que tuve oportunidad de orientar^{7,8}, figura la constatación de que la mayoría de los distintos tipos de alcaloides que estudiamos influyen marcadamente la fotosíntesis. En particular nos interesaron los alcaloides peptídicos uno de los cuales, la Discarina B, aislado y caracterizado por Mascaretti y colegas⁹ resultó ser un potente inhibidor de la fotofosforilación¹⁰ (fig. 5).

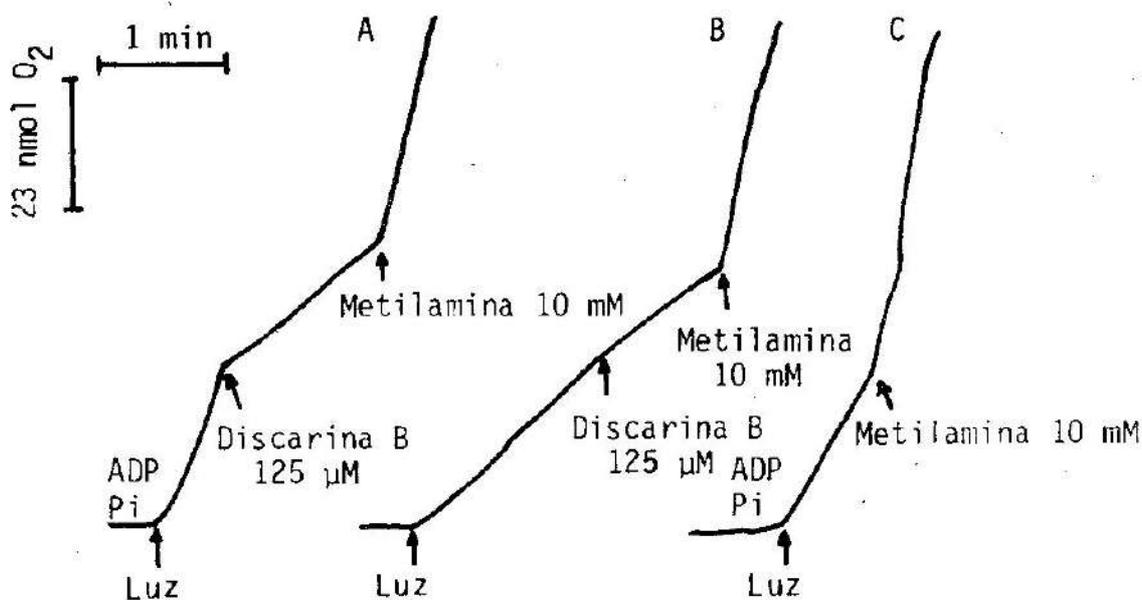


FIG. 5. — Efecto de discarina B sobre la generación de oxígeno de cloroplastos de espinaca medida en un Oxígrafo Gilson.

Desde 1973 en que realicé mis primeros experimentos con cloroplastos de espinaca, mi interés por la fotosíntesis fue creciendo y absorbiéndome.

1973 fue también el año de la crisis energética producida por el embargo petrolero, resuelto por los países de la OPEP, que inició una búsqueda mundial de fuentes alternativas, no convencionales, de energía.

Mi formación en bioenergética mitocondrial adquirida junto al Profesor Stoppani y mi reciente interés por la fotosíntesis, me llevaron a estudiar la posible explotación biológica de la energía solar. La energía radiante solar que recibe la Tierra es del orden de 3×10^{24} J/año. Sólo la milésima parte de esta energía es capturada por la fotosíntesis (3×10^{21} J/año). Por otra parte el consumo mundial de energía es de 3×10^{20} J/año o sea que bastaría, teóricamente, el 10 % de la energía fotosintética para satisfacer las necesidades actuales de energía de la Humanidad.

Una de las formas más inmediatas de explotar biológicamente la energía solar es por la digestión anaeróbica de la biomasa. Este método permite obtener 265 m³ de metano y 0.6 toneladas de mejorador de suelos por tonelada de biomasa.

De este estudio salió un proyecto de investigación aplicada actualmente en desarrollo por el que proponemos explotar las plantas acuáticas del Río Paraná como fuente de biogás y fertilizantes.

Por un convenio entre Agua y Energía Eléctrica y el CONICET construimos y estamos operando una Planta Piloto de Digestión Anaeróbica de Camalotes (fig. 6) y hemos estimado el recurso disponible según se detalla en la Tabla 1. Podría ser necesario cosechar entre 79 y 316 x 10⁶ toneladas/año para mantener el estado estacionario de las plantas acuáticas en los futuros embalses del Paraná Medio. Esta biomasa podría producir un porcentaje sustancial del gas que consume el país y una cantidad de residuo fertilizante superior al consumo actual de fertilizantes nitrogenados ¹¹.

TABLA I. — *Potencial de la biomasa de hidrofitas en los embalses del proyecto Parana medio.*

	Estimación Mínima	Estimación Máxima
Cosecha anual indispensable (10 ⁶ t/año)	79	316
Producción Potencial		
Metano (10 ⁹ m ³ /año)	1,1	4,3
Consumo Nacional (%)	14	59
Residuo (10 ³ t n/año)	55	225
Consumo Nacional (%)	203	820

La protón ATPasa de cloroplastos

Volviendo a la investigación básica y al cloroplasto, quisiera comentar sucintamente algunos resultados que hemos obtenido más recientemente con la enzima clave de la fotofosforilación que es la protón ATPasa y con la del transporte de electrones fotosintético que es la ferredoxina NADP⁺ reductasa.

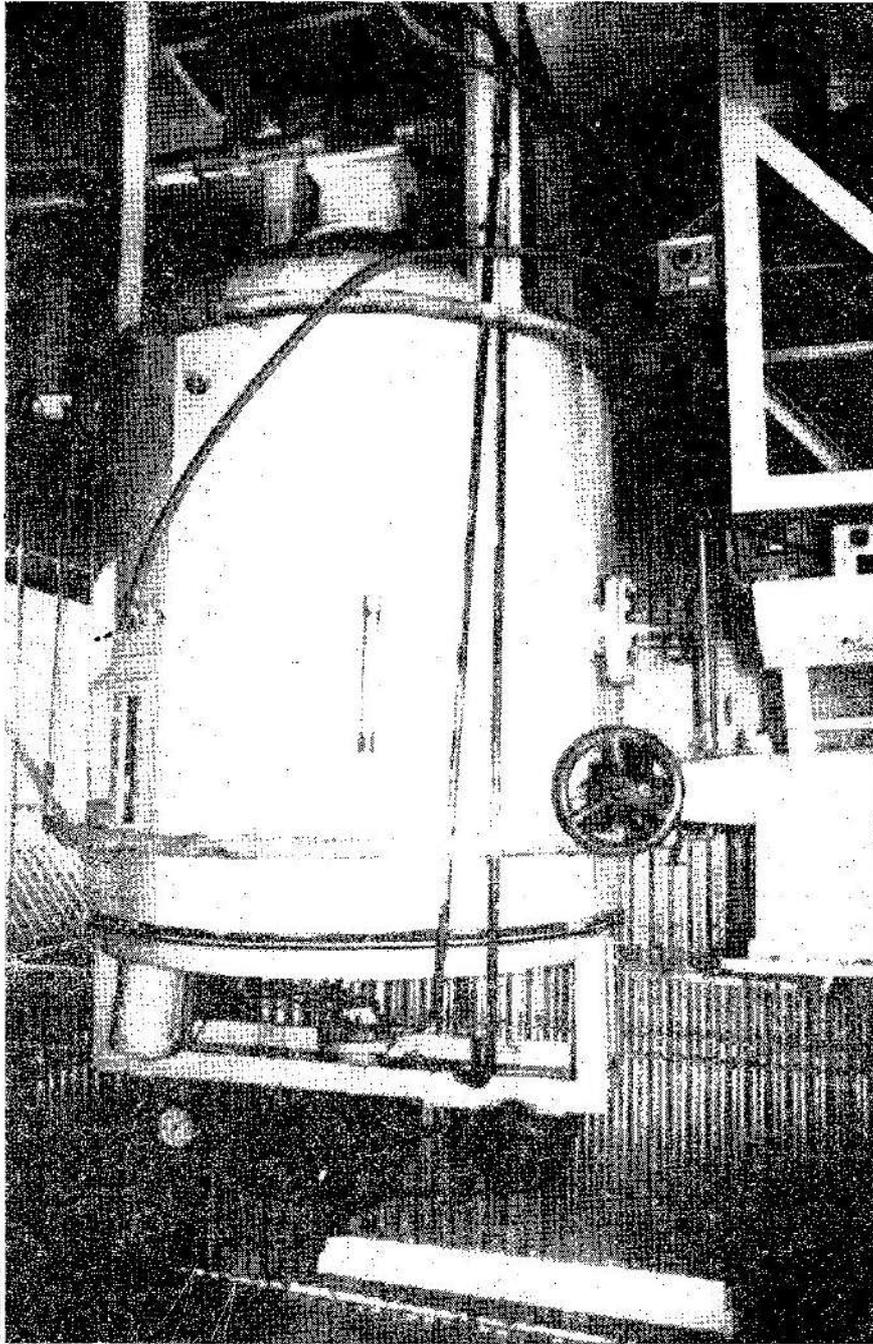


FIG. 6. — Vista de la Planta Piloto de Digestión Anaeróbica de Plantas Acuáticas construida y operada por el CEFOTI en terrenos de la Usina Sorrento de Agua y Energía Eléctrica.

Hemos estudiado en particular el componente extrínseco de la primera o factor acoplante. Esta enzima tiene una actividad ATPásica latente la que puede ser activada por 2 procedimientos distintos: incubación con agentes reductores a temperatura ambiente o por incubación a 63°. En esta activación participan grupos sulfhidrilos. El factor acoplante es una proteína oligomérica constituida por 5 subunidades distintas llamadas

α , β , γ , δ y ϵ . Hemos hecho la cuantificación y distribución de los grupos sulfhidrilos que tiene cada una de las subunidades y determinado su estado redox¹². La distribución de los grupos en las subunidades se muestran en la figura 7.

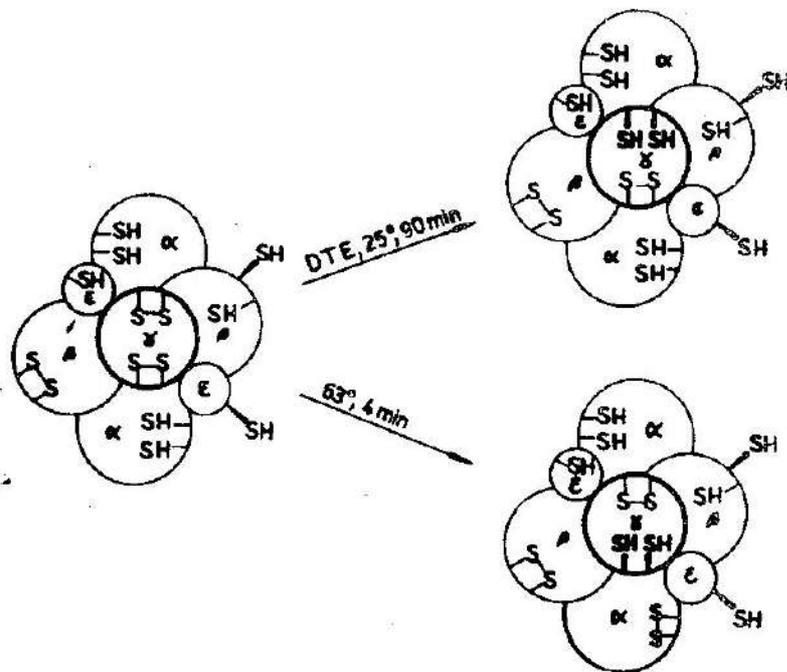


FIG. 7. — Correlación entre activación de la ATPasa de cloroplasto de espinaca y cambios en el estado redox de los grupos SH de la subunidad γ .

Como puede observarse, la activación tanto por agentes reductores como por tratamiento térmico, involucran la reducción de uno de los puentes disulfuro de la subunidad γ con la notable diferencia que en el tratamiento con agentes reductores se trata de una reducción neta de un puente disulfuro¹³, mientras que en el tratamiento térmico se trata de un intercambio de un ditiol por un puente disulfuro^{12, 14}. El ditiol pertenece a la subunidad α que es oxidado, reduciendo simultáneamente uno de los puentes disulfuro de la subunidad γ . Los resultados experimentales muestran que la activación por poder reductor es más fisiológica, dado que el factor acoplante conserva en esta forma su actividad acoplante¹⁵.

Más recientemente quisimos estudiar la activación de la proton ATPasa de tilacoides *in vivo*. Para ello se puso a punto un método rápido de preparación de cloroplastos partiendo de hojas de espinaca que podían estar en la oscuridad o iluminada de tal forma que 80 ó 90 segundos después se contaba con los cloroplastos listos para poder determinar las actividades que se querían medir (fig. 8). Con este método se comprobó que la luz *in vivo* activaba la proton ATPasa y que esta activación de la proton ATPasa se reflejaba también en la fotofosforilación (fig. 9) en una V_{max} mayor¹⁶. Es interesante observar que los tilacoides preparados rápidamente de hojas iluminadas y guardados a 0° C, conservaban

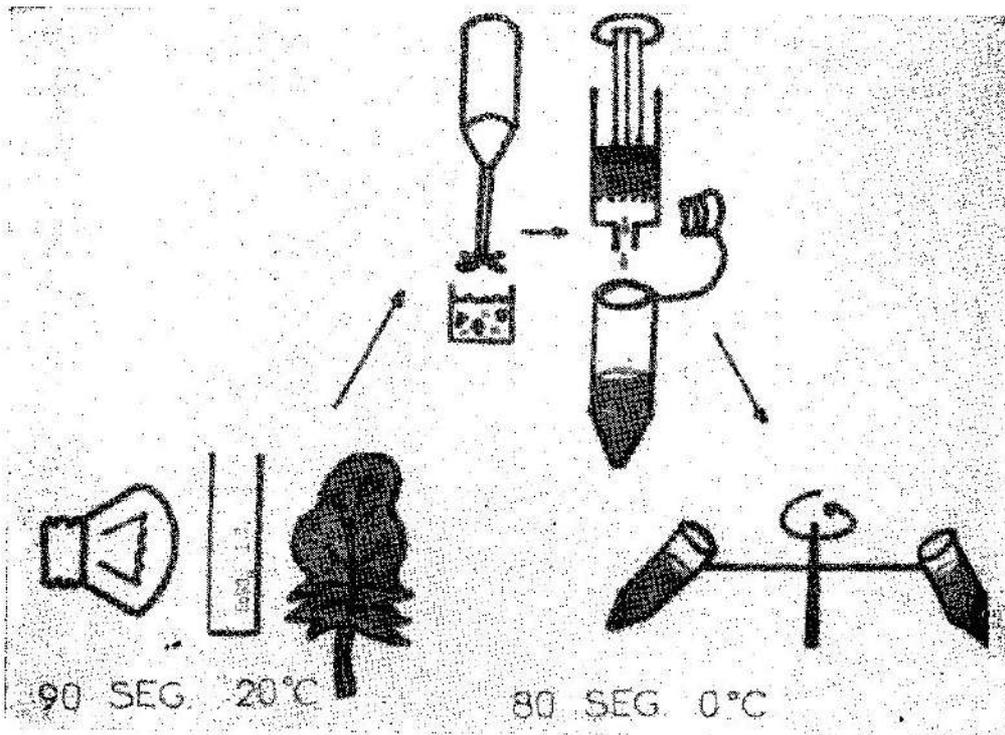


FIG. 8. — Esquema de la preparación rápida de cloroplastos de hojas de espinaca iluminadas.

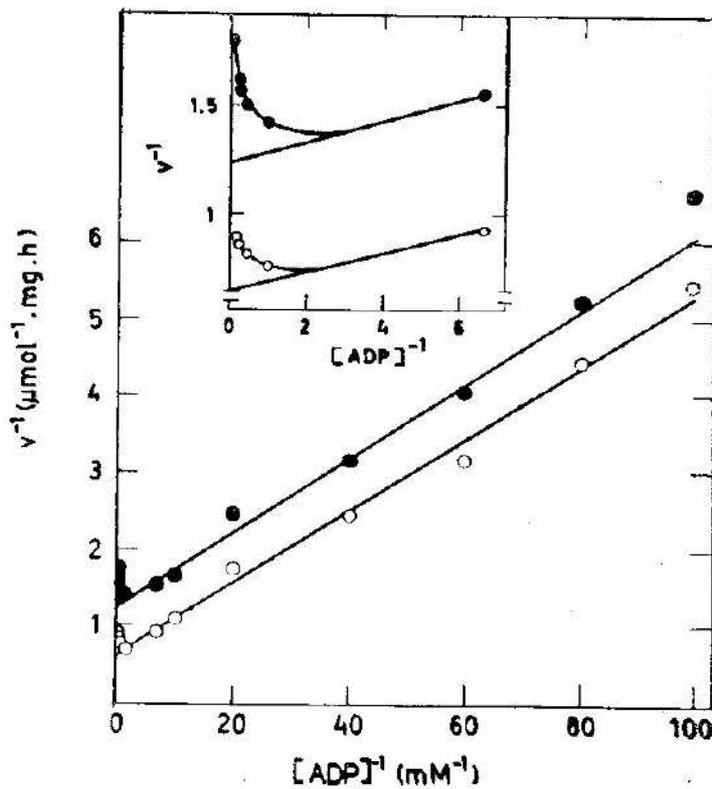


FIG. 9. — Efecto de la preiluminación de las hojas sobre los parámetros cinéticos de la fotofosforilación. Círculos blancos y negros, fotofosforilación en cloroplastos que provienen de hojas iluminadas y oscuras respectivamente.

el estado activo por varios minutos, lo que permitió estudiar el mecanismo de inactivación. Esta puede lograrse por 2 tratamientos: a) con desacoplantes, que como se ve en la Figura 10, colapsan rápidamente la acti-

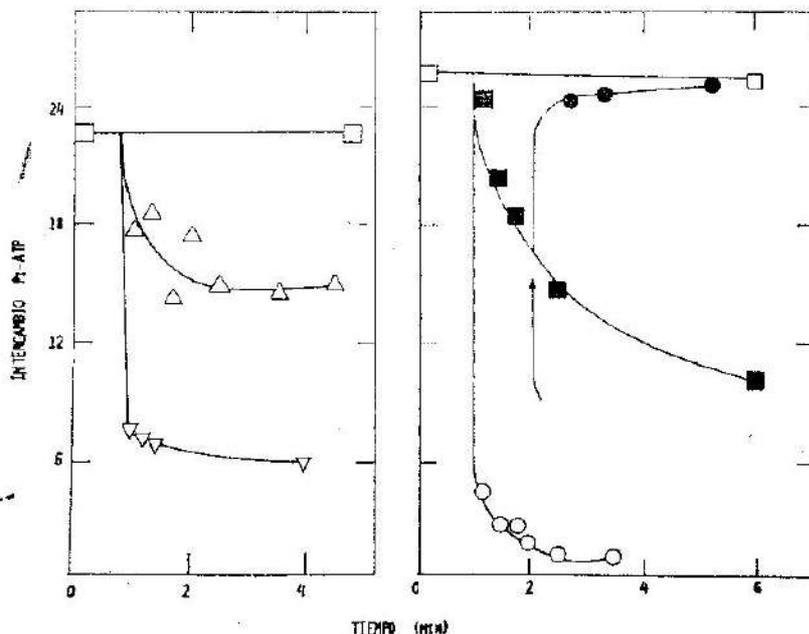


FIG. 10. — Inactivación de la reacción de intercambio Pi-ATP en cloroplastos provenientes de hojas iluminadas; (□), cloroplastos conservados a 0°; (Δ y ▽), agregado de gramicidina 10 nM; (○), agregado de iodoacetato 2 mM; (■), agregado de iodoacetato 0.5 mM; (●), en la flecha se agregó ditioneol 50 mM.

vación de la proton ATPasa, aquí medida como reacción de intercambio Pi-ATP; b) con oxidantes de grupos sulfhidrilos como el iodoacetato que también colapsa inmediatamente la activación. El efecto del iodoacetato puede ser revertido por agentes reductores¹⁷.

Regulación de la ferredoxina NADP⁺ reductasa

Quisiera referirme ahora a los estudios estructurales y de regulación de la ferredoxina NADP⁺ reductasa que es la enzima que cataliza la etapa final del transporte de electrones fotosintéticos¹². Los estudios estructurales por modificación química de la enzima llevaron a localizar varios residuos esenciales en su sitio activo. En particular quiero mencionar que en colaboración con el Dr. N. Carrillo¹⁹ hemos identificado la existencia de 2 residuos de histidina esenciales localizados, uno de ellos en el sitio de unión del NADP⁺ y el otro en el paso del flujo de electrones y protones que provienen de la ferredoxina y llegan hasta el FAD (fig. 11). Con Arana y Carrillo localizamos un grupo carboxilo esencial en la ferredoxina NADP⁺ reductasa localizada en el sitio de unión del NADP⁺²⁰. Habría además una arginina esencial^{21,23} y un residuo de lisina^{23,24} (fig.

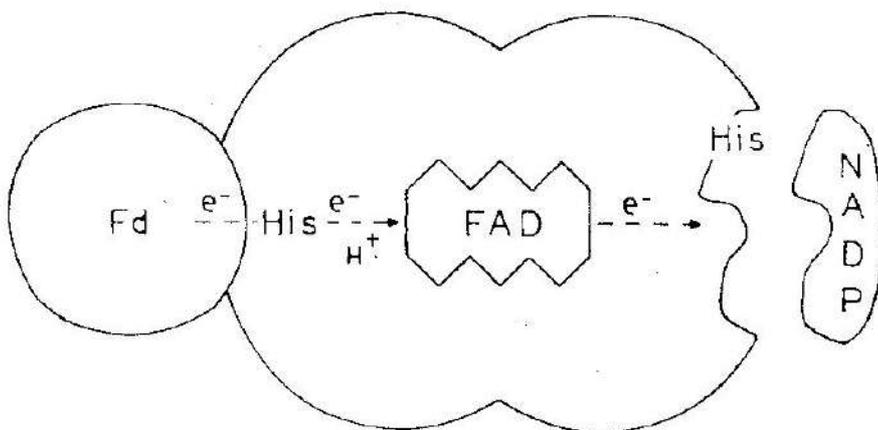


FIG. 11. — Modelo esquemático de la localización de los residuos esenciales de histidina en la ferredoxina-NADP⁺ reductasa.

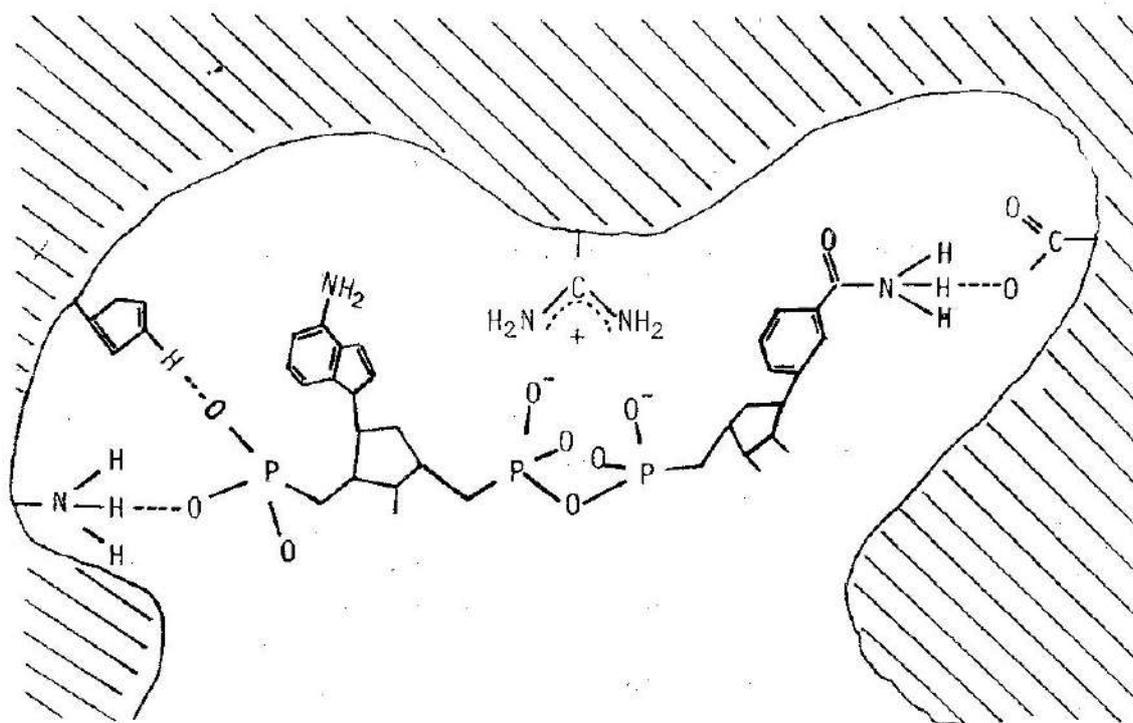


FIG. 12. — Modelo esquemático del sitio de unión del NADP⁺ en la ferredoxina-NADP⁺ reductasa indicando el rol tentativo de algunos residuos de aminoácidos esenciales (Tomado de la Tesis Doctoral de Néstor Carrillo, 1983).

12). Este último fue marcado e individualizado en un estudio realizado por Chan y Carrillo, usando el dial NADP⁺ 25

Una observación importante que resultó de los estudios de la modificación química de la reductasa, fué que en varias oportunidades, por ejemplo, en la modificación por fenilgloxal de residuos de arginina, se observó mayor velocidad de inactivación en la luz que en la oscuridad cuando se modificaba la enzima unida a membrana y además se observó

que el NADP⁺ era mejor protector en la luz que en la oscuridad²¹. Los K_d respectivos fueron 0.1 y 0.9 mM (fig. 13). Estos resultados sugirieron

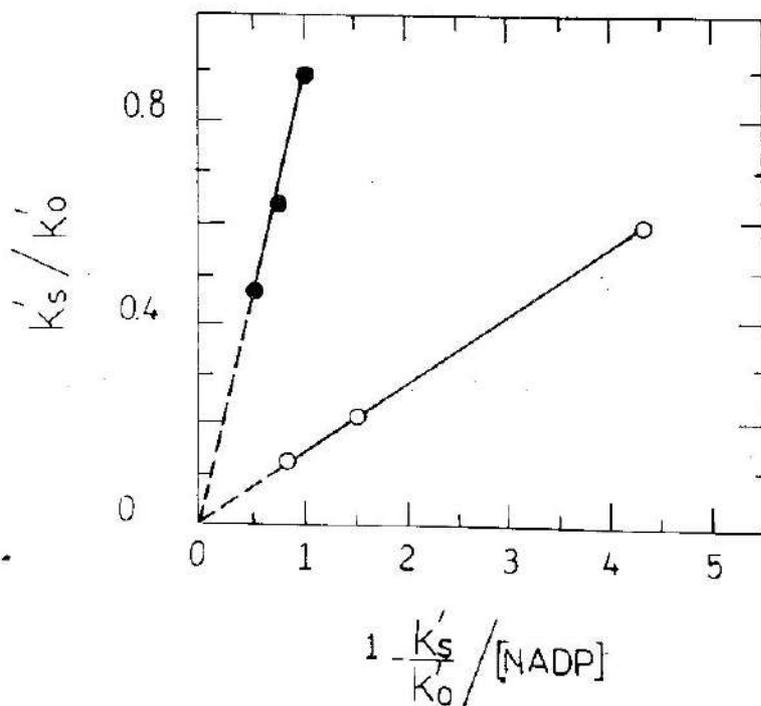


Fig. 13. — Cálculo del K_d para el efecto protector del NADP⁺ en la luz (O-O) y en la oscuridad (●-●) sobre la ferredoxina-NADP⁺ reductasa.

que la afinidad de la enzima podía estar regulada por la energización de la membrana. Efectivamente, eso es así, como se muestra en la figura 14, en la que se determina el K_m para el NADP⁺ de la reductasa unida a membrana²⁶. Cuando se aumenta la intensidad de la luz, el K_m para el NADP⁺ disminuye de un valor de 50 a 10 μM. Cuando la luz es saturante, se observó que el efecto de la luz era revertido por agentes desacoplantes, que elevaban el K_m a valores de oscuridad. La conclusión de estos experimentos es que la afinidad de la enzima por sus sustratos fisiológicos, el NADP⁺ y la ferredoxina, aumenta cuando la membrana tilacoide está energizada.

Dada la importancia que parecía tener, estudiamos con Carrillo la interacción de la reductasa con la membrana tilacoide²⁷, y observamos que la unión de la enzima a membranas depletadas se caracterizaba por un gráfico de Scatchard que daba una recta (fig. 15), lo que sugería que había un solo tipo de sitio de unión y un número definido de los mismos, estimado entre 3 y 4 nanomoles de enzima por μmol de clorofila. Estos resultados sugieren claramente que debiera existir en la membrana tilacoide sitios específicos de unión a la reductasa que no habían sido descritos previamente. Sobre este punto, volveremos más adelante.

En la Tabla II se muestran una serie interesante de observaciones realizadas en colaboración con el Dr. Wagner y Junge de la Universidad

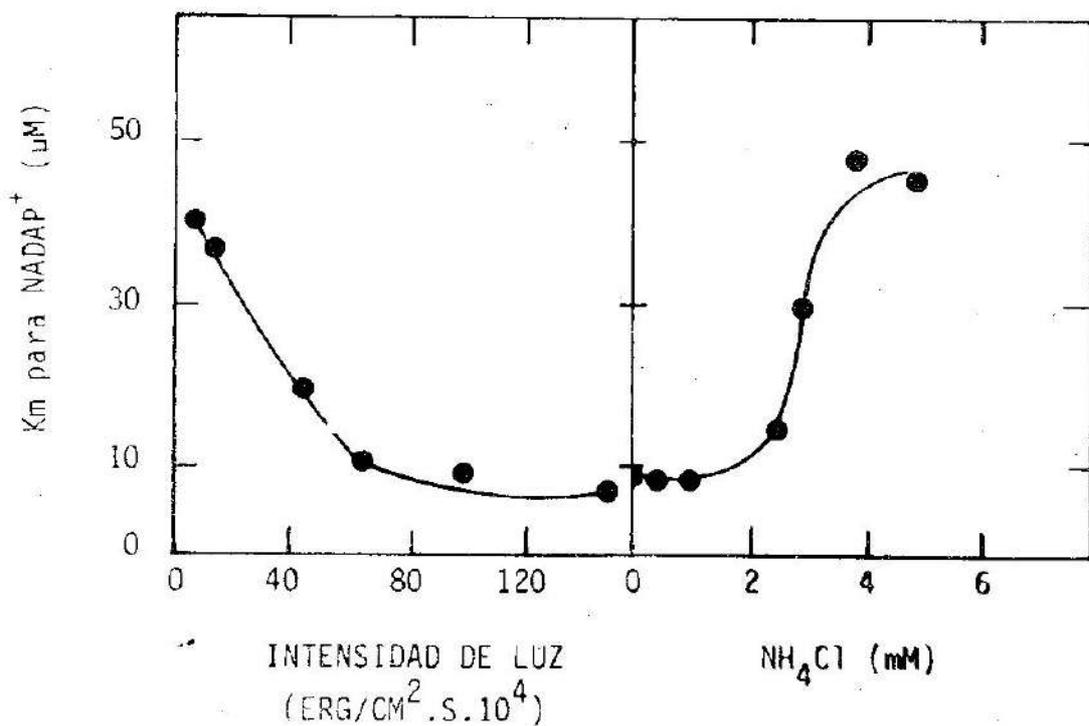


FIG. 14. — Modulación de la afinidad de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa por energización de la membrana.

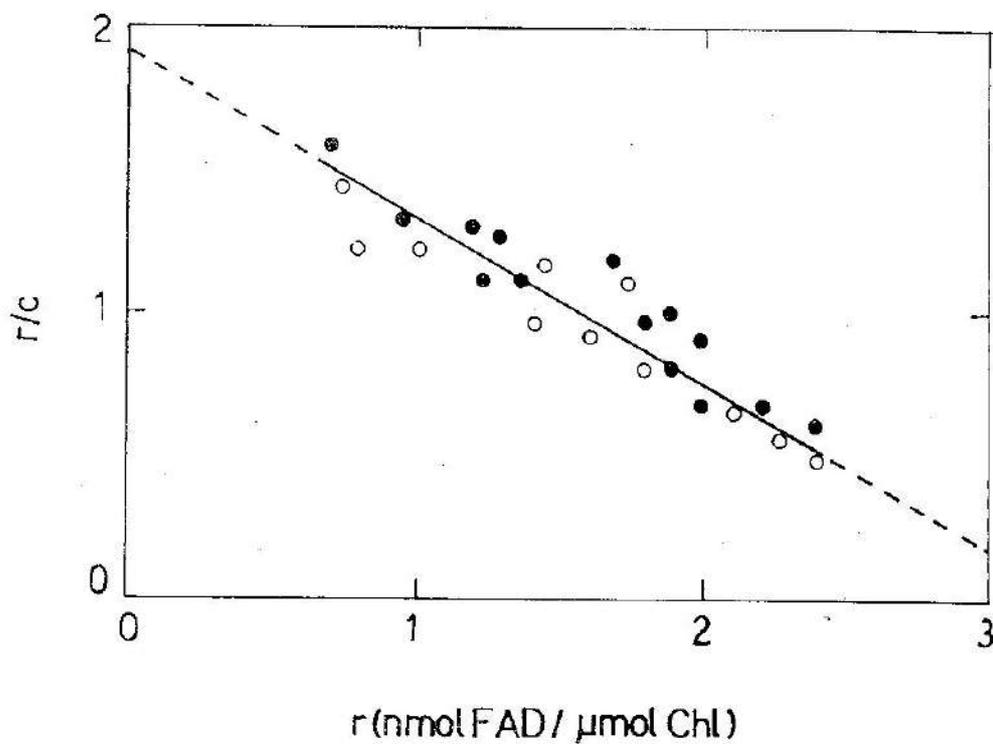


FIG. 15. — Gráfico de Scatchard de la isoterma de unión de ferredoxina-NADP⁺ reductasa a tilacoides depletados. r , enzima unida; c , enzima libre.

TABLA II. — Estudio de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa marcada con eosina isotiocianato.

Adiciones	Vida media del estado triplete de la enzima unida (μ s)	Difusión rotacional de la reductasa en la membrana (μ s)
Ninguna	100	< 1
Ferredoxina	200	40
Ferredoxina y luz	600	40
Fuerza protomotriz	250	40

Resumen de los resultados obtenidos por espectrofotometría de flash de laser según (28).

de Osnabruck, en Alemania Occidental²⁸. Con ellos aplicamos una técnica de espectroscopía de flash de laser para determinar cambios conformacionales en la reductasa. Para esto la enzima se marcaba con eosina tiocianato, actuando la eosina como fluoróforo. Así se pudo determinar la vida media del estado triplete de la eosina generado por un flash, cuando la enzima está reconstituida en membranas depletadas. Cuando la membrana tilacoide está energizada, aumentó dicha vida media lo que confirma que la enzima sufre un cambio conformacional. Por otra parte se pudo medir el tiempo de relajación para la difusión rotacional de la reductasa unida a membrana. La misma resultó ser muy rápida, menor de un microsegundo que era el límite de detección del equipo usado. Sin embargo, este tiempo de difusión rotacional aumentaba drásticamente, cuando había ferredoxina presente, a valores del orden de 40 microsegundos. La interpretación de estos resultados nos llevó a sugerir que la reductasa formaría un complejo trimérico con la ferredoxina y con un tercer componente que probablemente sea el fotosistema I (fig. 16).

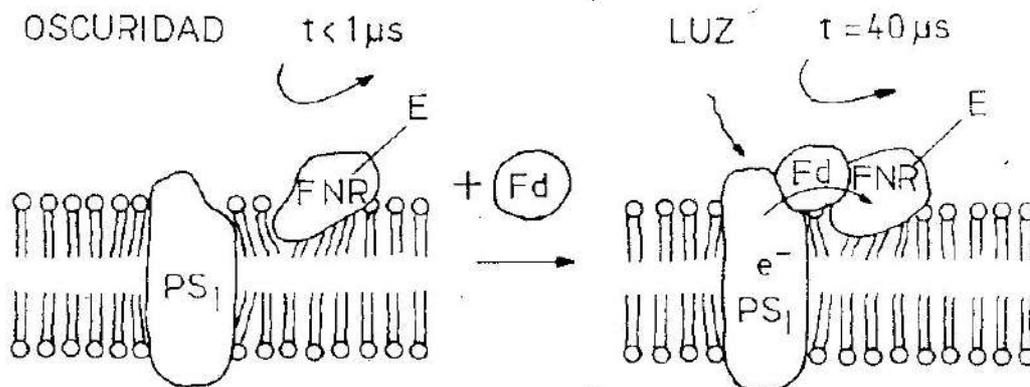


FIG. 16. — Efecto de ferredoxina (Fd) sobre la difusión rotacional de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) unida a membrana. PS_I, fotosistema I; E, enzima.

Algunos experimentos que describí anteriormente sugerían la presencia de un sitio específico de unión de reductasa en la tilacoide. Después de 2 años de búsqueda, recientemente pudimos aislar una proteína intrínseca de tilacoide que sirve como lugar de unión para la reductasa²⁹. El método de purificación consiste esencialmente en una extracción con

tritón, seguida de un fraccionamiento con sulfato de amonio y una cromatografía de afinidad en Affi Gel Blue. Se obtuvo una reductasa que eluye en un lugar distinto de la reductasa soluble y que al ser analizada por electroforesis demostró estar formada por 2 componentes: la reductasa propiamente dicha y un polipéptido de peso molecular de 17,500 (fig. 17).

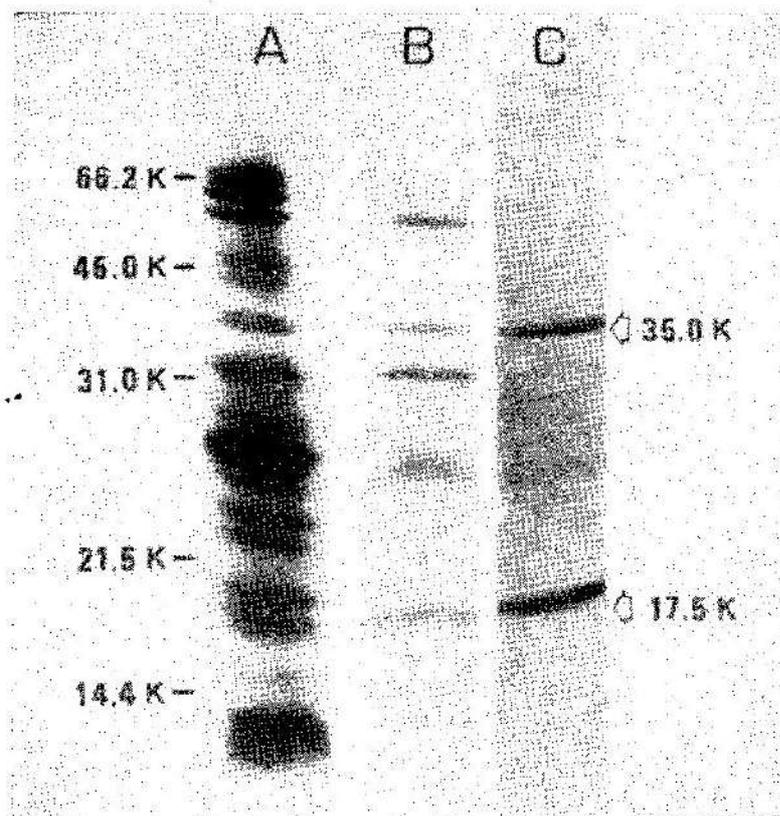


FIG. 17. — Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio de un extracto de tilacoides en Tritón X-100 (A), de la fracción de sulfato de amonio (B), y del eluato de la columna de Affi Gel Blue.

El complejo de reductasa con el polipéptido de 17,5 KDa conservaba una de las propiedades alotópicas de la reductasa unido a membrana. La figura 18 muestra la curva de titulación de la actividad en función de pH y se observa que el comportamiento es igual al de la enzima unida a membrana.

El complejo se pudo disociar en sus componentes por diálisis contra EDTA y separarlo posteriormente o sea aislar el polipéptido de 17,5 KDa en forma homogénea por una segunda columna de Affi Gel Blue. Lo que es más interesante es que el complejo puede ser reconstituido a partir de las fracciones purificadas de reductasa y del polipéptido de 17,5 KDa, recuperándose la curva de pH original (fig. 18).

Estos resultados sugieren que hemos aislado una proteína intrínseca que es el sitio de unión de la reductasa y que probablemente le confiere

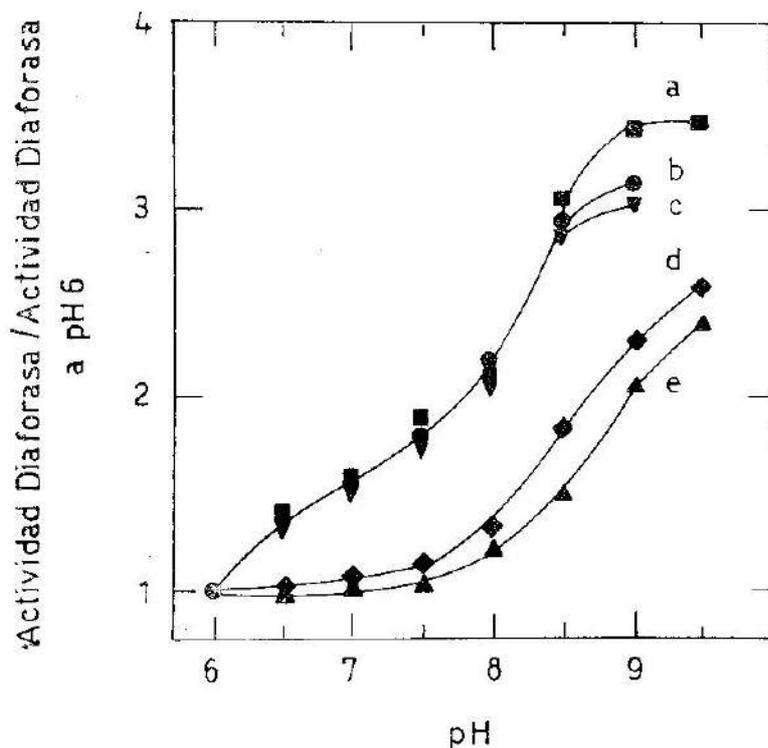


FIG. 18. — Titulación de la actividad diaforásica de distintas preparaciones de reductasa en función del pH.

a la misma una capacidad de detectar el gradiente protónico cuando la membrana está energizada, y por lo tanto sería instrumental en la regulación, no solamente de la actividad de la reductasa sino de todo el transporte de electrones fotosintético ²⁹.

El futuro de la bionenergética

Quisiera decir unas palabras con respecto a las investigaciones futuras en Bioenergética y en Fotosíntesis.

La Academia de Ciencias de América Latina y el PNUD/UNESCO (Proyecto RLA/78/024) me han solicitado recientemente que organice un Taller sobre: "Investigación en Fotosíntesis en América Latina: Estado Actual y Desarrollo Futuro". La razón de este pedido está en que la Academia estima, con justa razón, de que el tema está muy poco desarrollado en América Latina y que la investigación en fotosíntesis es relevante para la agricultura, que es una de las principales actividades de los pueblos de este continente.

En general el problema es el pobre desarrollo relativo de las ciencias agropecuarias en particular de la Biología y de la Bioquímica Vegetal en el continente, frente al hecho de que buena parte de la población está realizando actividades agrícolas y dependiendo de esas actividades.

En un futuro más mediato, pero que hay que empezar a preparar ya, es necesario desarrollar los temas de Ingeniería Genética aplicados a Plantas. Los temas vinculados con fotosíntesis ocupan un lugar preponderante, dado que uno de los objetivos prácticos, que se podría buscar con la manipulación genética, en el mediano plazo, es el del aumento de la eficiencia fotosintética³¹.

Recientemente se ha logrado la introducción del gen de la faseolina, que es una glicoproteína que constituye el 50 % de las proteínas presentes en el poroto, *Phaseolus vulgaris* L., en células de girasol³². Para ello se insertó el gen en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* que induce tumores en las plantas lográndose así la expresión del gen del poroto en las células del girasol.

Una de las aplicaciones más inmediatas que se visualizan con esta metodología es la de lograr modificar una proteína de 34 KDa componente del fotosistema II que es la que confiere sensibilidad a los herbicidas de manera de volver a los cultivos que le interesan al hombre insensibles a herbicidas. Si eso se lograra, se podría tener un control de las malezas sin perjudicar a los cultivos.

De manera que, una vez más, la investigación básica, en este caso la fotosíntesis, puede abrir la puerta a trascendentes investigaciones aplicadas, con considerables beneficios para la Humanidad.

REFERENCIAS

- ¹ VALLEJOS, R. H. y STOPPANI, A. O. M., 1967. *Biochim. Biophys. Acta*, 131: 295.
- ² LIMLOMVO, L., 1982. *Can. J. Physiol.*, 60: 680.
- ³ NAKASHIM, H., 1982. *Plant Physiol.*, 70: 982-986.
- ⁴ ORAZI, O. O., COWAL, R. A., HOLKER, J. S. E. y DJERASSI, C., 1956. *J. Org. Chem.* 21: 979-994.
- ⁵ ROVERI, O. A. y VALLEJOS, R. H., 1974. *Biochim. Biophys. Acta*, 333: 187-194.
- ⁶ WHITTAKER, R. H. y FEENY, P. P., 1971. *Science*, 171: 757-770.
- ⁷ ANDREO, C. S. Tesis "Estudios sobre los mecanismos biológicos de transferencia de energía" (1976). *Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*. pp. 132.
- ⁸ RAVIZZINI, R. A. Tesis "El proceso fotosintético en bacterias y plantas. Acción de antibióticos, alcaloides y otras drogas" (1979). *Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*. pp. 153.
- ⁹ MASCARETTI, O. A. MERJUZA, V. M., FERRARO, G. E., RÚVEDA, E. A., CHANG, C. I. y WERKET, E., 1972. *Phytochem.* 11: 1133.
- ¹⁰ ANDREO, C. S. y VALLEJOS, R. H., 1973. *FEBS Lett.* 33: 201-204.
- ¹¹ VALLEJOS, R. H., 1982. *Energy*. 7: 681-687.
- ¹² RAVIZZINI, R. A., ANDREO, C. S. y VALLEJOS, R. H., 1980. *Biochim. Biophys. Acta*. 591: 135-141.
- ¹³ ARANA, J. L. y VALLEJOS, R. H., 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 1125-1127
- ¹⁴ VALLEJOS, R. H., 1981. en "Energy Coupling in Photosynthesis" (Selman y Selman-Reimer, eds.). Elsevier/North Holland, New York, pp. 129-139.
- ¹⁵ ANDREO, C. S., PATRIE, W. J. y MCCARTY, R. E., 1982. *J. Biol. Chem.*, 257: 9968-9975.

- ¹⁶ VALLEJOS, R. H., ARANA, J. L. y RAVIZZINI, R. A., 1983. *J. Biol. Chem.*, 258: 7317-7322.
- ¹⁷ VALLEJOS, R. H. y RAVIZZINI, R. A., 1983. Proc. 6th. Internat. Congress on *Photosynthesis*. August 1-6, Bruselas, Bélgica (en prensa).
- ¹⁸ CARRILLO, N. J. y VALLEJOS, R. H., 1985. En "*Topics in Photosynthesis*" Vol. 8. *Electron transfer mechanism and oxygen evolution*" (en prensa).
- ¹⁹ CARRILLO, N. y VALLEJOS, R. H., 1983. *Biochemistry*. 22: 5889-5897.
- ²⁰ CARRILLO, N. J., ARANA, J. L. y VALLEJOS, R. H., 1981. *J. Biol. Chem.*, 256: 6823-6828.
- ²¹ CARRILLO, N. J., LUCERO, H. A., y VALLEJOS, R. H., 1980. *Plant Physiol.*, 65: 495-498.
- ²² ZANETTI, G., 1976. *Biochim. Biophys. Acta*. 445: 14-24.
- ²³ BOOKANS, G. y BOGER, P., 1978. *Arch. Biochem. Biophys.* 190: 459-465.
- ²⁴ ZANETTI, G., GOZZER, SACHIN, G. y CURTI, B., 1979. *Biochim. Biophys. Acta*. 569: 127.
- ²⁵ CHAN, R. y CARRILLO, N. J., 1984. *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 340-347.
- ²⁶ CARRILLO, N. J., LUCERO, H. A. y VALLEJOS, R. H., 1981. *J. Biol. Chem.* 256: 1058-1059.
- ²⁷ CARRILLO, N. J. y VALLEJOS, R. H., 1982. *Plant Physiol.* 69: 210-213.
- ²⁸ WAGNER, R., CARRILLO, N. J., JUNGE, W. y VALLEJOS, R. H., 1982. *Biochim. Biophys. Acta*. 689: 317-330.
- ²⁹ VALLEJOS, R. H., CECCARELLI, E. y CHAN, R. L., 1984. *Chem.* (en prensa).
- ³⁰ CARRILLO, N. J. y VALLEJOS, R. H., 1983. *Trends in Biochem. Sc.* 8: 52-56:
- ³¹ VALLEJOS, R. H., 1978. *Energía*. 2: 41-71.
- ³² MURAI, N., SUTTON, D. W., MURRAY, M. G. y SLIGHTOM, J. L., 1983: *Science*: 222: 4623.