

Libros de **Cátedra**

# Catálisis enzimática

Fundamentos químicos de la vida

Aníbal R. Lodeiro (coordinador)

FACULTAD DE  
CIENCIAS EXACTAS

e  
exactas



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

# CATÁLISIS ENZIMÁTICA

FUNDAMENTOS QUÍMICOS DE LA VIDA

Aníbal R. Lodeiro  
(coordinador)

Facultad de Ciencias Exactas



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA



*A nuestros maestros, que nos enseñaron  
a caminar.*

*A nuestros alumnos, sin quienes no  
podríamos seguir el camino.*

# Agradecimientos

A los organismos de Ciencia y Técnica que hacen posible nuestro trabajo: CONICET, CICBA y ANPCyT.

A todos los colegas con quienes nos nutrimos diariamente en nuestro trabajo.

A los docentes de Biotecnología y Biología Molecular (presentes y pasados), quienes siempre colaboraron desinteresadamente para hacer que la docencia en el Área mejorara permanentemente. En particular, a las Dras. Delia Sorgentini, Sara Molina-Ortiz y Nora Martínez, quienes aportaron para la confección de las guías de problemas de Química Biológica (Farmacia) y Química Biológica I, de las cuales se han extraído algunos de los problemas que se incluyen en este libro.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por darnos el trabajo y la infraestructura.

A todos y todas quienes consideraron que la Ciencia, la Tecnología y la Educación son importantes para el desarrollo del país, y lo plasmaron en los hechos y no se quedaron solo en las palabras.

*Son cosas chiquitas.  
No acaban con la pobreza,  
no nos sacan del subdesarrollo,  
no socializan los medios de producción y  
de cambio,  
no expropian las cuevas de Alí Babá.  
Pero quizá desencadenen la alegría del  
hacer,  
y la traduzcan en actos.  
Y al fin y al cabo, actuar sobre la realidad  
y cambiarla,  
aunque sea un poquito,  
es la única manera de probar  
que la realidad es transformable.*

EDUARDO GALEANO

# Índice

## **Prefacio**

*Aníbal R. Lodeiro* \_\_\_\_\_ 8

**Introducción** \_\_\_\_\_ 9-13

*Aníbal R. Lodeiro*

## **Capítulo 1**

Conceptos generales de cinética enzimática \_\_\_\_\_ 14-47

*Alberto Capparelli y Antonio Lagares*

## **Capítulo 2**

Relación estructura-función en la unión de ligando a enzimas \_\_\_\_\_ 48-64

*Gustavo Parisi*

## **Capítulo 3**

Fundamentos de cinética enzimática \_\_\_\_\_ 65-96

*Anibal R. Lodeiro*

## **Capítulo 4**

Inhibición y activación reversible \_\_\_\_\_ 97-118

*Anibal R. Lodeiro*

## **Capítulo 5**

Reacciones con más de un sustrato \_\_\_\_\_ 119-136

*Anibal R. Lodeiro*

## **Capítulo 6**

Efectos del pH y la temperatura \_\_\_\_\_ 137-147

*Daniela Hozbor y Anibal R. Lodeiro*

## **Capítulo 7**

Alosterismo y cooperativismo \_\_\_\_\_ 148-162

*Gustavo Parisi*

## **Capítulo 8**

Análisis del control metabólico \_\_\_\_\_ 163-178

*Augusto A. Melgarejo*

## **Capítulo 9**

Métodos empleados en la purificación de enzimas \_\_\_\_\_ 179-199

*Daniela Bottero y Daniela Hozbor*

## **Capítulo 10**

Protocolos de ensayos de activación enzimática \_\_\_\_\_ 200-212

*Daniela Hozbor y Daniela Bottero*

## **Capítulo 11**

Búsqueda de nuevas enzimas con actividades de interés (¿por qué?, ¿para qué?,  
¿cómo?): minería de nuevas actividades naturales. Ingeniería de proteínas  
hacia la creación de enzimas de diseño \_\_\_\_\_ 213-228

*M. J. Lozano y A. Lagares*

**Los autores** \_\_\_\_\_ 229-231

# Prefacio

Este libro tiene dos objetivos principales. Por un lado, llenar un vacío existente en libros sobre Catálisis Enzimática en lengua castellana, y por el otro lado, volcar por escrito nuestras experiencias con alumnos de las carreras de Bioquímica, Biotecnología, Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Farmacia, Física Médica, Óptica Ocular y Optometría, Química y Química y Tecnología Ambiental, en las que nos venimos desempeñando desde hace muchos años en la Facultad de Ciencias Exactas. Esa experiencia nos señaló cuáles son los conceptos que debemos reforzar, cuáles son los temas más difíciles de comprender, y cuál es la mejor forma de encararlos. Asimismo, hemos intentado actualizar los conocimientos de catálisis enzimática con los desarrollos más recientes. Esperamos que este texto sea de ayuda a todos los que se inician en el estudio de la Bioquímica y la Biología Molecular y brinde la base para un aprendizaje autónomo y con sentido crítico al futuro profesional de estas áreas.

El libro es fruto de un trabajo colaborativo con un equipo de docentes de primer nivel, que han contribuido con total dedicación y entrega a la preparación de los capítulos que lo conforman, a quienes por ello estoy profundamente agradecido.

*Aníbal R. Lodeiro*

La Plata, 16 de Diciembre de 2015



# Introducción

*Aníbal R. Lodeiro*

*Pienso, por lo tanto soy*

RENÉ DESCARTES, DISCURSO DEL MÉTODO

No estarías leyendo este libro si no existieran las enzimas. Claro... es un libro sobre enzimas, y si no existieran las enzimas, no podría existir un libro que habla de las enzimas. Pero el problema es que tampoco existirías vos. La vida en este planeta es fundamentalmente un complejo metabolismo que ocurre dentro de las células y también entre las células que forman los tejidos, entre los tejidos que forman los órganos, entre los órganos que forman los cuerpos, y finalmente entre los cuerpos no sólo de la misma especie, sino también, y muy fundamentalmente, entre los cuerpos de especies distintas. Por ejemplo, el oxígeno que respiramos es producido por plantas, algas y bacterias en el proceso de la fotosíntesis; nuestro intestino está lleno de bacterias que metabolizan parte de lo que comemos y digerimos, y como producto nos devuelven nutrientes que no podríamos producir por nosotros mismos; el nitrógeno que forma parte de nuestras proteínas y nuestro ADN proviene del aire, para lo cual primero debe ser transformado por bacterias que trabajan solas o asociadas a algas o a plantas y luego ingresar en un ciclo biogeoquímico que lo usa para producir los aminoácidos que ingerimos en nuestro alimento. Todos estos niveles metabólicos (célula, tejido, órgano, cuerpo, comunidad) son intrincadas redes de reacciones químicas catalizadas por *enzimas*. Por lo tanto, una característica sobresaliente de las enzimas es que son **catalizadores**.

Como veremos en el Cap. 1, los catalizadores son sustancias que aceleran la velocidad de las reacciones químicas, sin transformarse ellos mismos en el proceso. Decir que **aceleran** la velocidad de las reacciones no quiere decir de ninguna manera que alteren la **termodinámica** de las reacciones. Pese a que en su nombre se incluye el sufijo “-dinámica” en las leyes de la termodinámica clásica, o de los sistemas cerrados, no interviene el tiempo. Un proceso es termodinámicamente espontáneo si su variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) entre el estado final y el estado inicial es menor que cero. ¿Qué significa esto? ¿Por qué le decimos energía “libre”? ¿Quiere decir que no está presa?

El término *energía libre* se emplea para señalar la parte de la energía de un proceso que puede ser utilizada para generar trabajo. Por ejemplo, si alzo una piedra y la coloco arriba de la puerta, evidentemente estoy usando energía, porque tengo que “hacer fuerza”. Si después alguien entra y abre la puerta, la piedra le puede caer en la cabeza. Pero puedo hacer otra

cosa: atar la piedra que está sobre la puerta al picaporte haciendo pasar la soga por una roldana, de modo que la puerta se pueda cerrar sola, nada más tocándola. El trabajo de empujar la puerta ahora lo va a hacer la piedra que cuelga de la soga una vez que yo toque la puerta y libere la piedra. Pero la piedra no va a subir sola otra vez a su posición sobre la puerta. Esto es así porque la energía libre de la piedra después que la puerta se cerró es *menor* que antes de cerrarla; es decir que la energía libre del estado final es menor que la del inicial y por lo tanto, la *variación* de energía libre entre el estado final y el inicial tiene signo negativo. Ahora fijate bien en esto: no importa cuánto tiempo pase desde que toquemos la puerta hasta que la misma se cierre. Nadie habló de eso. No dijimos que el movimiento de la puerta tiene que ser rápido o lento. Lo único que dijimos es que la variación de energía libre entre dos estados tiene que tener signo negativo. Así, una reacción química puede ser muy lenta en ausencia de enzima, pero eso no significa que no sea espontánea. Un catalizador solo la acelera, pero no le cambia las variables termodinámicas. Dicho al revés: si una reacción no es espontánea termodinámicamente, el agregado de un catalizador no la vuelve espontánea.

Las enzimas son pues catalizadores, y además son *catalizadores biológicos*. Son muy versátiles y adaptables porque en la mayoría de los casos son proteínas con estructuras muy complejas y flexibles. Por su parte, la *intrincada red de reacciones químicas* a que hicimos referencia, y que constituyen los seres vivos, no es un desorden total, sino que se trata de miles de reacciones ocurriendo simultáneamente en forma ordenada y eficiente. Por ejemplo: date una mirada mientras seguís leyendo. ¿Dónde estás? ¿en una silla? ¿en el asiento de un micro? ¿en un parque? ¿Y con qué estás sosteniendo el libro? ¿con una mano? ¿lo tenés sobre tus piernas? Ahora fijate un poco en tus músculos. Está claro que no están haciendo ejercicio, pero sin embargo están trabajando a pleno; si no lo hicieran, te caerías como una bolsa de papas. Los músculos de tu espalda están trabajando, lo mismo que los de tus brazos y piernas para mantener tu posición y eso requiere que allí se esté produciendo energía mediante el catabolismo de la glucosa, que involucra varias decenas de reacciones en las células musculares. Pero además estás leyendo, lo cual quiere decir que la luz está incidiendo en tus ojos en una variedad de colores que son captados por millones de células de tu retina. Allí adentro hay células denominadas *bastones* y *conos*, que reciben la intensidad y el color de la luz y mediante otras decenas de reacciones químicas las transforman en señales que son decodificadas en tu cerebro para transformarlas en la imagen del libro y de todo lo que hay alrededor. Podría seguir preguntándote: ¿estás comiendo una galletita mientras lees? ¿estás tomando mate? Si es así, estás digiriendo ese alimento y esa bebida, transformándolos en moléculas orgánicas más pequeñas que al mismo tiempo estás usando para otros procesos metabólicos. Mientras todo esto ocurre, tu ADN se está replicando en millones de células de tu cuerpo, todas tus proteínas y lípidos se están reciclando a diferentes velocidades, y otras células de tu cuerpo –aquellas que no se necesitan más– están siendo conducidas a un proceso de *muerte celular programada* y en su reemplazo están reproduciéndose nuevas células con un balance tal que tu cuerpo no aumenta ni disminuye de tamaño en todo este proceso.

Ahora imaginemos que podemos mirar lo que pasa en una sola célula, pongamos por caso una célula muscular de tu espalda. La glucosa que está allí adentro está siendo usada para suministrar la energía necesaria para que no te caigas, pero también se necesita para producir la ribosa que va a formar parte de los ácidos nucleicos (ARN y ADN), los aminoácidos que van a formar parte de las proteínas y el glicerol que va a formar parte de los triglicéridos que esa célula está sintetizando sin parar. Pero la glucosa también podría oxidarse a ácido glucárico y sin embargo, y pese a que en el músculo hay una gran cantidad de oxidantes, esa reacción no está teniendo lugar. Quiere decir que pese a que todas estas reacciones son *espontáneas* termodinámicamente (tienen un  $\Delta G^{\circ} < 0$ ) no todas ellas tienen lugar a una *velocidad* apreciable. ¿Por qué entonces se cataliza la oxidación de la glucosa a piruvato y no la oxidación de la glucosa a ácido glucárico? ¿Por qué el piruvato puede ser usado al mismo tiempo para producir energía y para producir alanina siendo que ambos procesos tienen demandas diferentes? Esto es así porque las enzimas no solo son catalizadores, sino que fundamentalmente son **catalizadores altamente específicos**. En el ejemplo que acabamos de mencionar, la descarboxilación del piruvato para transformarse en acetil-coenzima A (paso fundamental para la obtención de energía en la fosforilación oxidativa) es catalizada por una enzima llamada *piruvato deshidrogenasa*, mientras que la transaminación del piruvato para convertirse en alanina es catalizada por otra enzima, completamente diferente, llamada *alanina aminotransferasa*. Por otra parte, la oxidación de la glucosa a piruvato se inicia con la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato en una reacción catalizada por una enzima llamada *hexoquinasa*, la cual es absolutamente incapaz de catalizar la oxidación de la glucosa a ácido glucárico. En el Cap. 2 veremos cómo es que las enzimas pueden discriminar tan eficientemente entre los reactivos cuyas reacciones van a catalizar (a esos reactivos los llamaremos *sustratos*) y en los Cap. 3 y 5 veremos cómo esa especificidad se manifiesta en una *cinética de reacción* muy particular, que nos ayudará a entender el rol de las enzimas en el metabolismo. Luego, en el Cap. 6 veremos cómo ciertas condiciones, en particular el pH del medio y la temperatura, afectan la cinética de las reacciones catalizadas por enzimas, y cómo los efectos de la temperatura pueden ser usados para calcular la energía de activación de la reacción catalizada.

Ahora supongamos lo siguiente: estás leyendo este libro en un parque, levantas la vista y ves que se está nublando mal... al rato, comienzan a sonar los truenos y poco después empieza a diluviar. ¡A correr para ponerse a resguardo!... esto también requiere la producción de energía en los músculos, pero ahora a una tasa mucho mayor que cuando estabas en reposo. Las reacciones de oxidación de la glucosa para proveer esta energía son las mismas, pero su *velocidad* se va a ver incrementada conforme aumenta la demanda energética. Esto significa que las enzimas (por ejemplo, la hexoquinasa) van a estar **reguladas** para modificar su actividad catalítica rápidamente en respuesta a la demanda metabólica. La regulación de la actividad enzimática tiene varios niveles y no solo explica por qué la velocidad de las reacciones catalizadas puede cambiar en respuesta a estímulos, sino también por qué cada órgano de nuestro cuerpo cumple una función específica pese a que todos los órganos están

hechos de células genéticamente idénticas, y aún por qué cada órgano tiene una forma especial, adaptada a esa función específica. En los Cap. 4 y 7 veremos algunos principios de cómo puede regularse la actividad de las enzimas, y también cómo podemos aprovechar este conocimiento para producir medicamentos o caracterizar procesos metabólicos.

Pese a que la célula contiene una “intrincada red de reacciones químicas”, que las mismas están catalizadas específicamente por las enzimas y que las propias enzimas están altamente reguladas, el metabolismo aún sería un caos si no hubiera un control global del mismo. El control metabólico no es ejercido por alguna especie de “programa” que esté de alguna manera por encima de la red metabólica, sino que es una *característica* de la red metabólica. Esto es difícil de entender si uno mira la red metabólica como un “mecanismo” que pueda explicarse solamente conociendo las propiedades de los componentes individuales. En vez de ello, la red metabólica es un *sistema*, es decir un conjunto de componentes y sus *interacciones*. De esas interacciones surgen a menudo *propiedades emergentes*, es decir, comportamientos o *performances*, para usar la terminología de J. Monod, que no son explicables a partir de los comportamientos o *performances* de los componentes aislados, sino que son la consecuencia directa de la forma particular en la cual se establecen las interacciones entre los componentes. Por lo tanto, las interacciones solo pueden conocerse y analizarse cuando se mira el sistema en su conjunto. Por más caracterizada que tengamos una enzima purificada y estudiada en el tubo de ensayo, no podremos saber cómo participa del control del metabolismo a menos que la estudiamos inmersa en la red metabólica de la que forma parte. Estas redes, como así también las células y nosotros mismos, son *sistemas abiertos fuera del equilibrio*. Por lo tanto, para entender cómo es el control metabólico debemos primero entender cómo es el sistema, en este caso el sistema abierto fuera del equilibrio. Estas cuestiones se encararán a modo introductorios en el Cap. 8.

Siendo claves en la estructura de la vida, las enzimas deben ser cuidadosa y tenazmente estudiadas, y para ello existen una variedad de métodos tanto bioquímicos como genéticos. La manera de usar estos métodos se expone en los Cap. 9-11, con lo cual concluye el libro.

En síntesis, lo que caracteriza a las enzimas es que **no modifican el  $\Delta G^\circ$  de la reacción pero sí aceleran su velocidad, en forma altamente específica y regulable**. El estudio de sus propiedades estructurales, cinéticas y metabólicas es clave para entender la vida y para ello debemos ser capaces de purificarlas, caracterizarlas y manipularlas genéticamente. Hay preguntas fundamentales que luego podremos responder, como por ejemplo ¿cómo evolucionaron las enzimas? ¿cuál es su origen? Si esto nos ayuda a entender la vida en el planeta Tierra, ¿nos permitirá también entender la vida extraterrestre, el día (seguramente no muy lejano) en que se descubra? Sobre la base de nuestra comprensión de las redes metabólicas ¿podremos estar seguros de que una suerte de moco o de gelatina descubierta en un planeta lejano sea efectivamente un ser viviente? ¿Podremos proyectar la evolución, es decir, predecir hacia dónde se encaminará en el futuro lejano?

Obviamente, con estas preguntas nos estamos asomando a un abismo más allá de la frontera del conocimiento. Un abismo que no sabemos dónde termina, y que probablemente

nunca sabremos dónde termina, ya que a cada poquito que avanzamos en nuestra tarea de entender la Naturaleza el abismo se hace más grande. Y eso, abrir las puertas a cada vez mayores ignorancias, es lo excitante del camino que llamamos ciencia.

## **Bibliografía**

Monod, J. (1970) *El Azar y la Necesidad. Ensayo Sobre la Filosofía Natural de la Biología Moderna*. Barcelona: Tusquets.

# CAPÍTULO 1

## Conceptos Generales de Cinética Química

*Alberto Capparelli y Antonio Lagares*

*“¿Qué es, pues, el tiempo? Si nadie me lo pregunta, lo sé; pero si quiero explicárselo al que me lo pregunta, no lo sé. Lo que sí digo sin vacilación es que sé que si nada pasase no habría tiempo pasado; y si nada sucediese, no habría tiempo futuro; y si nada existiese, no habría tiempo presente.”*

SAN AGUSTÍN DE HIPONA. CFR. CONFESIONES XI,14,17.

### **Procesos de cambio, composición e identidad celular. Problemas antiguos, ciencias nuevas**

Entender el devenir de las cosas ha sido desde hace mucho tiempo para el hombre motivo de análisis profundo ante la necesidad natural que ha sentido de explicar las observaciones cotidianas del mundo que lo rodeaba. Aun desconociendo la estructura íntima de la materia, los cambios en las “cosas” (entes) materiales han sido foco de estudio en la antigua Grecia del siglo VI a.C. con el propósito de describir e identificar primariamente aquello que perdura de aquellos que fenece. La íntima relación de los procesos de cambio, y su relación con el tiempo, continúa siendo hoy centro del pensamiento de físicos (Hawking, 1989), químicos (Prigogine, 2005) y filósofos contemporáneos (Mahner y Bunge, 2000).

La revolución que ha operado en el siglo XVIII en las ciencias químicas a partir de la identificación de los primeros elementos y las mediciones que sustentaron el principio de conservación de la masa (A. Lavoisier, 1743-1794), sentaron las primeras bases elementales para -por primera vez- pensar en un análisis numérico formal de la dinámica de los procesos de cambio químico (cinética química). Los avances extraordinarios en la química orgánica del siglo XIX dieron marco general y acompañaron a los experimentos pioneros de medidas del progreso temporal de la hidrólisis ácida de la sacarosa que realizara L. Wilhelmy (1812-1864), y poco más tarde a las primeras bases formales de la cinética química en manos de J. H. Van't Hoff (1852-1911) (“Estudios de dinámica química”, 1884) y S. Arrhenius (1859-1927). Tales hallazgos fueron además contemporáneos del primer planteo formal del equilibrio químico hacia 1864 por parte de Waage (1833-1900) y C. Guldberg (1836-1902) como un fenómeno

resultante de reacciones opuestas a través de la ley de acción de masas. La aparición de la mecánica cuántica a comienzos del siglo XX y el uso de la termodinámica estadística, sentaron finalmente las bases para el desarrollo de las teorías centrales de la cinética química moderna, hoy acompañadas por técnicas experimentales que permiten resoluciones temporales del orden de los femtosegundos ( $10^{-15}$  s).

En el contexto de la visión actual aun en desarrollo de la historia y evolución de la vida en la superficie terrestre, la variable temporal es un componente decisivo a la hora de interpretar la dinámica tanto de los procesos químicos más elementales (entre moléculas celulares), como la de los procesos más complejos de la biósfera (ambientales atmosféricos y terrestres, y entre organismos y ecosistemas). Entender las prioridades temporales que el diseño de la vida asigna a cada evento, y cómo los mismos son modulados por el ambiente en relación al transcurso del tiempo, está entre los objetivos centrales de todo estudio de un sistema biológico (J. A. Wheeler ha expresado que *“el tiempo es el modo que tiene la naturaleza de evitar que todo ocurra a la vez”*). Afirmar en términos bioquímicos que un proceso determinado no tiene lugar en una instancia particular (lugar y tiempo), equivale en términos formales a decir que dicho proceso es lento, sin significancia para la vida celular en esas circunstancias. Por el contrario, cuando referimos a procesos de cambio apreciables necesitamos expresar la intensidad relativa de cada uno de los cambios, que serán además los que en cada condición a lo largo de la vida definirán “lo que la célula “es” en acto (lo que se observa) y también en potencia (lo que “puede ser” a partir de nuevos estímulos a su condición actual). En otros términos, la condición química de no equilibrio que caracteriza a cualquier célula viva es consecuencia directa de una historia inmediata que la ha conformado (reacciones), y también sustento físico para aquellas nuevas posibilidades de cambio a las que podrá acceder. Resulta de suyo entonces que la condición química que alcanza una célula en un instante determinado (de todos sus componentes) define su identidad, incluyendo sus posibilidades de cambio. La biología de sistemas, cuyo nombre formaliza con modernismo una rama histórica de la bioquímica, no hace más que buscar la descripción más acabada del mapa composicional de los diferentes estados celulares, y el modo en que la célula transita entre unos y otros a través de cinéticas coordinadas (flujos) que han sido moldeadas a lo largo de la evolución (regulación).

### **¿Química para químicos? ¿química para biólogos?, o simplemente: química**

Las ideas presentadas en la sección precedente muestran a la comprensión temporal de los diferentes procesos que tienen lugar en la célula como eslabones esenciales para la construcción de una imagen integrada de su composición y de sus dinámicas de cambio (esto es, de su metabolismo). La inclusión del presente capítulo en un libro de enzimas tiene como principal objetivo disuadir al lector de cualquier idea que pretenda diferenciar las bases cinéticas de los procesos celulares de aquellas que rigen la generalidad de los procesos químicos que siempre ha estudiado.

En segundo lugar, las páginas que siguen están orientadas a revisar conceptos que seguramente ha visto, con el propósito de consolidar algunas ideas y términos (velocidad de reacción, ley de velocidad, orden de reacción, molecularidad, mecanismo de reacción, energía de activación) que son importantes a la hora de caracterizar y describir, sobre base formal, el cambio temporal de procesos químicos. Cada uno de estos conceptos podrá ser revisado y complementado en la literatura corriente de cinética química [Atkins (2008), Castellan (1987), Dickerson & cols. (1999), Levine (2004)].

Finalmente, haremos breve mención a la catálisis química como expresión real de vías alternativas de reacción, para la consecución de productos en tiempos menores respecto a la reacción no catalizada; teniendo especialmente en cuenta que la estrategia celular a lo largo de toda la escala evolutiva es la de contar con reacciones lentas que pueden ser aceleradas por la presencia de catalizadores específicos (-> las reacciones celulares directrices son lentas, pudiendo ser acelerarlas en momentos precisos por vía catalítica). Dejaremos para los capítulos siguientes de este libro la descripción y tratamiento de la estructura, función, y características cinéticas asociadas a los catalizadores celulares centrales: las enzimas.

## **Cinética química**

El estudio de las reacciones químicas puede encararse desde el punto de vista termodinámico con el fin de establecer las condiciones en las cuáles estas pueden ocurrir en forma espontánea. Con este enfoque, no interesa conocer la evolución temporal de los mismos, ni tampoco saber cómo es el o la suma de procesos que acompañan a la transformación cuando esta tiene lugar.

La cinética química, por el contrario, estudia la velocidad de las transformaciones y se preocupa por conocer sus mecanismos; es decir, como son las etapas que llevan a los reactivos desde la condición de reactivos a la de productos, incluyendo un conocimiento tan detallado como sea posible sobre los posibles intermediarios que pueden formarse durante la reacción, así como también conocer los factores que son relevantes y controlan la velocidad del proceso (el medio, por ejemplo). A modo de ejemplo, la reacción de Friedel-Crafts, que normalmente requiere 8 horas a 80°C, con un rendimiento de 80% y con formación de isómeros diferentes, cuando se realiza en líquidos iónicos requiere 30 segundos a 0 °C, con un rendimiento de 98 % de un único isómero. El impacto positivo sobre el ambiente es evidente.

Para el estudio detallado de los distintos aspectos de la cinética química y de los principios fundamentales sobre la que se sustenta la interpretación teórica de este campo de la fisicoquímica, se requieren conocimientos de estructura molecular y termodinámica estadística. Esto no implica que puedan desarrollarse las nociones fundamentales en diferentes niveles, y a medida que se progresa en el estudio del tema incorporar conceptos más avanzados.



## Los estudios cinéticos y los termodinámicos atienden a diferentes aspectos de los procesos de cambio

En los procesos termodinámicos para el cálculo de funciones de estado no es necesario conocer cómo el sistema evoluciona desde un estado a otro, pero sí es relevante para estudios de cinética química. En la Tabla 1.1 se compararán algunas de las diferencias más importantes entre ambos enfoques. La información termodinámica es fundamental para el análisis cinético de numerosos procesos.

**Tabla 1.1.** Comparación entre objetivos generales de la termodinámica y la cinética química.

Termodinámica	Cinética química
Los resultados termodinámicos son independientes del camino, y no se requiere del conocimiento del mecanismo de reacción ni de la velocidad a la cuál ocurre el proceso	La determinación de la velocidad de reacción y el conocimiento del camino o de los canales de reacción son objetivos centrales en cinética química.
La determinación de la constante de equilibrio constituye un aspecto importante de la aplicación de la termodinámica a reacciones químicas. Es posible predecir constantes de equilibrio a partir del conocimiento de la estructura molecular, fundamentalmente la que proviene de las medidas e interpretación de espectros moleculares (microondas, infrarrojo, visible-ultravioleta).	En cinética química, la medida de la velocidad de reacción conduce al conocimiento de la constante de velocidad. Sin embargo, existen dificultades teóricas en la predicción de las constantes de velocidad a partir de la estructura molecular. Esta situación es compleja cuando la reacción es también compleja.

## Conceptos básicos y aspectos formales de la cinética química

En cinética química es necesario definir los conceptos de velocidad de una reacción, ley de velocidad, y orden de reacción cuando corresponda. Asimismo, para reacciones particulares es necesario establecer su mecanismo, identificando las etapas (y su molecularidad) a través de las cuales evoluciona temporalmente el sistema durante el proceso. Las tres primeras definiciones son magnitudes experimentales que se determinan sobre la base de cambios macroscópicos, mientras que el mecanismo es normalmente una hipótesis que debe ser objeto de verificación experimental.

### Velocidad de reacción

La velocidad de una reacción química está relacionada con la medida del cambio de la concentración de las especies (reactivos o productos) por unidad de tiempo.

La medida de la velocidad requiere de la determinación de la concentración instantánea de las distintas especies. Se habla que es necesario determinar el perfil de concentraciones de reactivos o productos a medida que la reacción progresa en el tiempo. La concentración de las especies participantes puede evaluarse por métodos químicos o físicos. En el primer caso, se hace necesaria la medida de la concentración deteniendo el proceso para su posterior tratamiento con técnicas analíticas convencionales (titulación, gravimetría, etc). En el segundo tipo de análisis, se requiere que la concentración de alguna o todas las especies presentes en el sistema sean proporcionales a alguna propiedad física, básicamente que sea fácil de medir, una función lineal y sencilla de la concentración. En el conjunto técnicas que reúnen estas características pueden mencionarse:

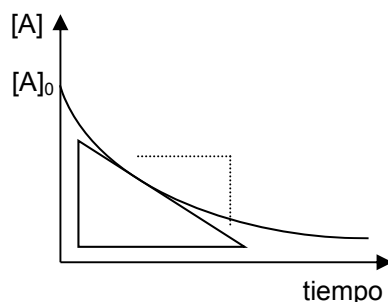
- # Espectrofotometría IR, UV-visible, UV
- # Espectrometría de resonancia magnética nuclear, resonancia paramagnética electrónica, espectrometría de masa, etc.
- # Polarimetría, conductimetría, potenciometría, etc
- # HPLC, cromatografías de gases o combinadas, etc

### Extensión o grado de avance de reacción ( $\xi$ )

Dada una reacción:



se entiende por grado de avance a la medida del número de moles de reacción que tienen lugar cada vez que los reactivos reaccionan estequiométricamente para dar productos. La velocidad de la reacción química indicada por la ecuación (1.1) puede evaluarse a partir de la medida con que A o B desaparecen o por la formación de C. Si la concentración de A se expresa como  $[A]$  y esta se mide en función del tiempo, puede llegar a obtenerse un perfil de su evolución temporal como la que se indica en la Figura 1.1. La velocidad con que A desaparece puede evaluarse directamente midiendo la pendiente en cualquier punto de la curva que describe la evolución temporal de la concentración de A. La pendiente de la recta tangente a la curva,  $d[A]/dt$  al tiempo  $t$  da cuenta del cambio temporal por unidad de tiempo de la concentración de la especie A.



**Fig.1.1.** Perfil de concentración de uno de los reactivos en función del tiempo, y definición de la velocidad instantánea como la medida de la pendiente de la curva en un tiempo dado.

Por ejemplo, para una cinética  $A + 2B \rightarrow C$ , la velocidad a la que desaparece A es igual a la que aparece el producto C. A su vez cada vez que un mol de A reacciona, se consumen dos moles de B. Esto determina que debe cumplirse que:

$$-d[A]/dt = -\frac{1}{2} d[B]/dt = d[C]/dt$$

En consecuencia, **en la medida de los cambios de concentración debe prestarse atención a la estequiometría de la reacción**. Si en lugar de evaluar la evolución temporal de A, como en la Figura 1.1, se mide la de B o C, se observará que los valores de las pendientes serán diferentes si también lo son los coeficientes estequiométricos.

La definición de velocidad de una reacción química se realiza en forma general sobre la base del grado de avance  $\xi$ . Así, la ecuación (1.1) puede representarse algebraicamente como:

$$cC - (aA + bB) = 0, \text{ es decir, } \sum_k \nu_k \cdot A_k = 0$$

siendo  $\nu_k$  el coeficiente estequiométrico de la especie  $A_k$  que interviene en la reacción. En esta ecuación,  $\nu_k$  es positivo si  $A_k$  es producto, mientras que toma valores negativos si  $A_k$  es reactivo.

Para hallar la expresión de la velocidad en términos de  $\xi$ , debe considerarse que el número de moles de la especie k-ésima en un instante de tiempo se expresa

$$n_k = n_k^0 + \nu_k \xi \quad (1.2)$$

Luego,

$$\frac{dn_k}{dt} = \nu_k \frac{d\xi}{dt} \quad (1.3)$$

La velocidad de la reacción se define como el número de moles de reacción que ocurren en la unidad de tiempo. Luego,

$$v = \frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{\nu_k} \frac{dn_k}{dt} \quad (1.4)$$

Por ejemplo, para la reacción  $A + 2B \rightarrow C$

$$n_A = n_{A0} - \xi(t) \quad n_B = n_{B0} - 2 \cdot \xi(t) \quad n_C = n_{C0} + \xi(t)$$

La expresión de la velocidad de esta reacción queda definida (independientemente de la especie cuya concentración se monitorea en el experimento)

$$v = \frac{d\xi}{dt} = -\frac{dn_A}{dt} = -\frac{1}{2} \frac{dn_B}{dt} = \frac{dn_C}{dt} \quad (1.5)$$

y para una reacción genérica,  $aA + bB \rightarrow cC + dD$

$$v = \frac{d\xi}{dt} = -\frac{1}{a} \frac{dn_A}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{dn_B}{dt} = \frac{1}{c} \frac{dn_C}{dt} = \frac{1}{d} \frac{dn_D}{dt} \quad (1.6)$$

## Medida de la velocidad de una reacción

La velocidad de las reacciones químicas abarca un amplio intervalo de órdenes de tiempo. Existen reacciones muy lentas que pueden estudiarse siguiendo el cambio de concentraciones en el tiempo con un cronómetro estándar como método convencional para monitorear la evolución temporal del proceso. Estas son reacciones que ocurren en tiempos superiores a las decenas de minutos hasta horas, días o en escalas de tiempo superiores. Por otro lado, existen otras reacciones que son suficientemente rápidas y para las cuales los métodos convencionales no son aplicables y debe recurrirse al registro digital de los cambios de concentración como función del tiempo. En estos casos, las reacciones pueden iniciarse y completarse en tiempos muy breves, por ejemplo en segundos, milisegundos, microsegundos, o aún en escala de tiempos inferiores. Los desarrollos que se introdujeron en los últimos años permiten acceder a estudios en el campo de la fotoquímica a escalas de tiempo del orden del femtosegundo ( $10^{-15}$ ). Los tipos de procesos que pueden estudiarse en los distintos intervalos de tiempo menores a los pocos milisegundos se resumen en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Tipos de procesos en distintas escalas de tiempo menores a los 10 milisegundos y hasta el atosegundo ( $10^{-18}$  s). La división temporal es cualitativa (adaptada de A. Zewail, en *Femtochemistry*, F.C.De Schryver et al. (Ed.), Wiley (2001).

-log t/s	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16-18	
Tipos de procesos					Decaimiento radiativo (fluorescencia - fosforescencia)				Movimientos rotacionales		Movimientos vibracionales -				Movimientos entre estados electrónicos	Aspectos básicos
								Cruce entre estados sistemas (o estados electrónicos de la misma o distinta multiplicidad)- conversión interna		estado de transición y reacciones de intermedarios	Resolución atómica - Procesos de una moléculas - Colisiones en líquidos				Aspectos de interés en física y en química	
	Reacciones de radicales.							Reacciones de fotodisociación			Reacciones de disociación				Procesos de interés químico	
	Reacciones de complejación							Procesos de transferencia de protones	Procesos de abstracción, recombinación y eliminación		Reacciones de Diels-Adler					
								Movimientos de proteínas		Fotosíntesis					Procesos de interés biológico	
									Visión							

En relación a los sistemas biológicos en particular, los cambios que experimentan a diferente nivel abarcan intervalos de tiempo que exceden a los presentados en el diagrama anterior, con una correlación cualitativa entre las dimensiones de la porción de sistema analizada y la escala de tiempo en que tienen lugar los cambios asociados a la misma. Puede decirse en términos genéricos que los cambios a nivel de órganos ocurren en general en escalas de tiempo de los segundos o mayores, con los cambios celulares en escala de los milisegundos ( $10^{-3}$  s), y los macromoleculares y de moléculas pequeñas en escala de los

nanosegundos ( $10^{-9}$  s) y femtosegundos ( $10^{-15}$  s), respectivamente. Tal correlación de los tiempos de cambio respecto de los tamaños de las entidades participantes, es consecuencia de vínculos subyacentes entre las energías puestas en juego en cada una de las escalas y las masas de los sistemas considerados.

## Ley de velocidad

La velocidad de una reacción química es afectada por cambios en las concentraciones de reactivos y productos, por la temperatura, la presión, la fuerza iónica del medio si en la misma participan especies polares o iónicas en fase líquida, y a esto debe sumarse la posibilidad del efecto de superficies.

Los procesos cinéticos pueden ocurrir en sistemas homogéneos o heterogéneos, aunque pueden existir contribuciones de procesos homogéneos y heterogéneos.

La ley de velocidad debe describir en forma precisa como estos factores influyen la velocidad del proceso. En general esta ley es una función del tipo  $F(c, T, P, I, V, A)$ , donde  $c$  representa todas las concentraciones que realmente afectan el proceso,  $T$  y  $P$  corresponden a la temperatura y presión,  $I$  a la fuerza iónica en caso de corresponder,  $V$  y  $A$  indican como el volumen del reactor y la superficie intervienen en esta ley. En general,

$$v = F((c, T, P, I, V, A) = v_{\text{homogéneo}} + v_{\text{heterogéneo}} \quad (1.7)$$

La influencia del volumen del sistema y de la superficie siempre resultan ser aditivas, de manera que:

$$v = V \cdot f_1(T, P, c, I) + A \cdot f_2(T, P, C) \quad (1.8)$$

Con  $f_1$  y  $f_2$  se describen las contribuciones de procesos en fase homogénea y heterogénea. En el caso de no existir ninguna influencia de la superficie del reactor, la ecuación de velocidad puede llevarse a formas más familiares para los químicos:

$$v = \frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt} = -\frac{1}{a} \frac{dn_A}{V dt} = -\frac{1}{b} \frac{dn_B}{V dt} = \frac{1}{c} \frac{dn_C}{V dt} = \frac{1}{d} \frac{dn_D}{V dt} = f_1(T, P, c, I) \quad (1.9)$$

Si el volumen de reacción no se modifica en el tiempo, entonces la ecuación 1.9 toma la forma:

$$v = \frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{v_k} \frac{d(n_k/V)}{dt} = \frac{1}{v_k} \frac{dc_k}{dt} = f_1(T, P, c, I) \quad (1.10)$$

donde ahora  $c_k$  es la concentración en moles por unidad de volumen (normalmente molaridad,  $M = \text{moles} \cdot \text{L}^{-1}$ ). El problema consiste en conocer la función  $f_1$  que en definitiva expresará la ley de velocidad.

No existe una manera *a priori* que permita, a partir de la estequiometría de la reacción, conocer la ley de velocidad en reacciones complejas (ver más adelante la descripción de este tipo de reacciones). Sólo es posible describir la ley de velocidad a partir de la estequiometría de la reacción en caso de reacciones que transcurren en una sola etapa (reacciones simples) como se discutirá en el siguiente punto. Esta consideración implica que para cualquier proceso general, la ley de velocidad debe obtenerse de un estudio sistemático y experimental de la cinética en estudio. En la ley de velocidad pueden intervenir las concentraciones o presiones de reactivos, y a veces las de reactivos y productos. En los casos en que en la ley de velocidad intervengan en el denominador de la misma la concentración de un reactivo y/o producto, se dirá que estas especies inhiben la reacción.

## Orden de reacción

Considere una reacción genérica  $aA + bB \rightarrow cC$  por ejemplo. Si la ley de velocidad puede escribirse en la forma:

$$v = k.[A]^{\alpha}.[B]^{\beta}.[C]^{\gamma} \quad (1.11)$$

donde los exponentes  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta), y  $\gamma$  (gama), pueden ser mayores, menores que cero y aún fraccionarios. **A los exponentes a los cuáles están elevadas las concentraciones cuando la ley de velocidad adopta la forma indicada por la ecuación (1.11), se denominan órdenes parciales de la reacción y a su suma se la define como el orden global de la reacción química.** Es importante señalar que el orden de reacción no siempre está definido y no puede conocerse de la estequiometría de una reacción compleja.

## Mecanismo de reacción y molecularidad

Las reacciones químicas evolucionan a través de una serie de etapas o canales de reacción desde la condición de reactivos a la de producto o productos. Se define como mecanismo a la sucesión de procesos asociados a esta transformación. Si la reacción ocurre en una única etapa, se dirá que el mecanismo es simple. Esto implica que los reactivos pueden convertirse en productos en un único encuentro entre las moléculas de (los) reactivo(s).

**Se define como molecularidad al número de moléculas y/o átomos que participa en una reacción elemental.** Así, para una reacción simple o elemental,  $A + B \rightarrow C$ , la ley de velocidad puede hallarse directamente a partir del conocimiento de los coeficientes estequiométricos. En este caso:

$$v = k.[A][B]$$

Si la reacción tiene lugar en varios pasos, la misma no es ya elemental, aunque cada uno de estos pasos así lo sean. El mecanismo es complejo. En estos sistemas, la ley de velocidad

no puede evaluarse a partir de la lectura de los coeficientes estequiométricos asociados con la reacción en estudio. Supongamos por otra parte una situación en la que una reacción de la forma  $A_2 + B_2 \rightarrow 2AB$  sigue una ley de velocidad con la siguiente forma:

$$v = k [A_2][B_2]$$

donde los órdenes parciales coinciden con los coeficientes estequiométricos. **Debe señalarse que esto no garantiza que el proceso en cuestión corresponda a una reacción elemental.**

Puede resumirse que:

- En una reacción elemental el orden de reacción u órdenes de reacción parciales coincide con la suma de sus coeficientes estequiométricos o con los coeficientes estequiométricos individuales respectivamente.
- Si el orden de reacción global coincide con la suma de los coeficientes estequiométricos y simultáneamente los órdenes parciales con los coeficientes estequiométricos individuales, no puede asegurarse que la reacción sea elemental.
- Si los órdenes parciales y los coeficientes estequiométricos difieren, entonces la cinética tiene un mecanismo complejo.
- Cuando el mecanismo es complejo, y en la reacción se generan intermediarios o se proponen intermediarios que no están ni al principio ni al final de la reacción (aunque en algunos casos estos puedan aislarse), el estudio cinético requiere que:
  - Se caractericen todas las etapas de la reacción.
  - Se identifiquen y caractericen todos los intermediarios.

Debe tenerse en cuenta, que mientras la ley de velocidad es una formulación experimental, el mecanismo es siempre sólo la mejor interpretación que se dispone con las herramientas accesibles de análisis. En otras palabras, la ley de velocidad es un hecho fáctico, que surge de la experiencia. El mecanismo es la mejor hipótesis para explicar el comportamiento experimental. Puede existir más de un mecanismo que puedan conducir a la misma ley experimental. La elección de la hipótesis del mecanismo debe apoyarse en la identificación y caracterización de todos los intermediarios posibles que se generan o producen en una reacción compleja. La hipótesis sobre un mecanismo puede ser rebatida o abandonada, si mejora la calidad de la información experimental y/o teórica.

## Unidades de la constante de velocidad

Considere que la velocidad de una reacción puede escribirse en la siguiente forma:

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k c^\alpha \quad (1.12)$$

Las unidades de la constante de velocidad dependen del orden de reacción, tal como se indica a continuación, donde la concentración se expresa, por ejemplo, en unidades de molaridad M y el tiempo en segundos. La unidad de velocidad siempre queda expresada en M/s.

orden	1	2	n
[k]	1/s	1/M .1/s	1/M <sup>(n-1)</sup> . 1/s

## Determinación experimental del orden de una reacción química

Varios son los métodos para determinar el orden de reacción. Pueden citarse los siguientes:

**# Determinación del orden de reacción por prueba y error.** En este método, se supone *a priori* un orden de reacción, se integra luego la ecuación de velocidad y se compara el resultado de la predicción con el comportamiento experimental.

### Cinética de primer orden

Considere que el orden  $\alpha = 1$ . La ecuación de velocidad (1.12) en términos de evolución temporal del reactivo (A) se reordena y se integra entre  $t=0$  y el tiempo  $t$ , dando lugar a:

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k c_A \Rightarrow \frac{dc_A}{c_A} = d \ln c_A = -k dt \Rightarrow \ln c_A = C - kt \quad (1.13)$$

Si la hipótesis es válida, entonces debería observarse una dependencia lineal de los valores del logaritmo de las concentraciones del reactivo como función del tiempo. La constante de integración es el valor de la función cuando  $t = 0$ , es decir,  $C = \ln c_A^0$

Luego:

$$\ln c_A = \ln c_A^0 - kt \Rightarrow c_A = c_A^0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (1.14)$$

La pendiente de la recta en la ecuación (1.13) o (1.14) (Figura 1.2) es la constante de velocidad  $k$  con signo negativo:

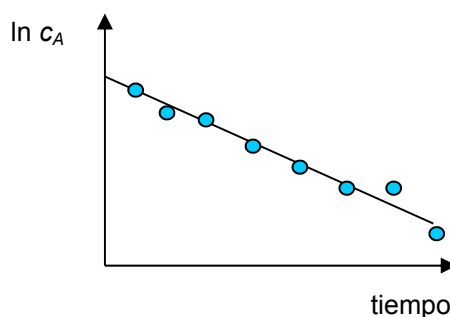


Fig. 1.2. Comportamiento esperable del  $\ln c_A$  vs  $t$  bajo la hipótesis de una cinética de primer orden.



Se define tiempo medio de reacción  $t_{1/2}$  al tiempo requerido para que la concentración inicial del reactivo se reduzca a la mitad de la inicial. Luego:

$$\ln \frac{c_A}{c_A^0} = -kt \Rightarrow c_A = \frac{c_A^0}{2} \Rightarrow \ln \frac{1}{2} = -kt_{1/2} \Rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (1.15)$$

En una cinética de primer orden, el tiempo medio es independiente de la concentración inicial. Si se dispone de una traza del perfil de concentración de un reactivo en función del tiempo (Figura 1.3), es posible inducir en una primera aproximación si la cinética es de orden 1.

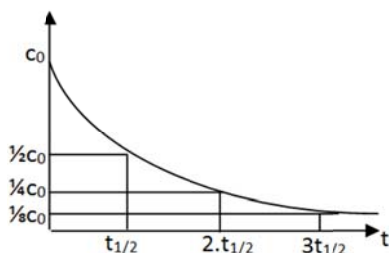


Fig. 1.3. Estimación del orden de reacción a partir de la traza de la evolución temporal de la concentración.

Si de la traza se evalúa el tiempo necesario para que la concentración se reduzca a  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ , etc. de la concentración inicial, los tiempos requeridos para alcanzar estos valores son  $t_{1/2}$ ,  $2.t_{1/2}$ ,  $3.t_{1/2}$  etc. Si el análisis no coincide con el comportamiento experimental, deben ensayarse otros órdenes de reacción. Este comportamiento es típico de procesos de primer orden. En general, para garantizar el orden de una reacción dada es conveniente estudiarla en una escala de tiempo superior al menos tres tiempos medios.

#### Cinética de segundo orden.

Si el análisis previo no se ajusta a una cinética de orden 1, puede proponerse otro orden, por ejemplo  $\alpha = 2$ . En este caso, si A es el reactivo:

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k c_A^2 \Rightarrow \frac{dc_A}{c_A^2} = -k dt \Rightarrow \frac{1}{c_A} = C + kt$$

La constante de integración se evalúa a  $t=0$ , donde  $c_A=c_A^0$ , la concentración inicial.

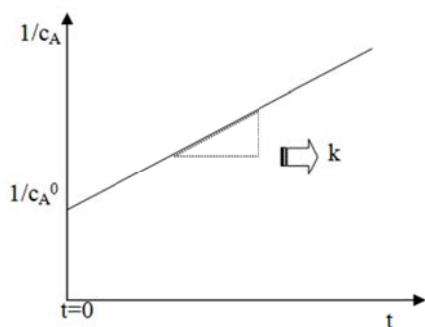


Fig. 1.4. Comportamiento de la concentración que se ajusta a la ecuación siguiente:

$$\frac{1}{c_A} = \frac{1}{c_A^0} + kt \quad (1.16)$$

Al tiempo medio de reacción,  $t_{1/2}$ , la concentración del reactivo debe ser la mitad de la inicial. Luego:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k c_A^0}$$

A diferencia de los procesos de primer orden, en estos casos, el tiempo medio depende de la concentración inicial. Si el sistema cumple con esta consideración, entonces, la representación de  $1/c_A$  versus el tiempo debe dar una recta de pendiente positiva e igual a la constante de velocidad  $k$ , tal como se esquematiza en la Figura 1.4.

Al igual que lo indicado para las cinéticas de primer orden, las medidas de cambios de concentración en función del tiempo deben realizarse durante más allá de tres o cuatro tiempos medios.

En general, el análisis por prueba y error tiene inconvenientes en casos de mayor complejidad. Se pueden proponer otros métodos más adecuados para evaluar el orden de reacción. Si bien el manejo en forma de gráficos de la información experimental suele ser conveniente, la aplicación de herramientas del análisis de regresión es aconsejable.

### Determinación del orden de reacción a partir del tiempo medio de reacción

Considere una cinética con  $\alpha > 1$  cuya ley de velocidad sea la indicada en la ecuación (1.12.)

$v = -\frac{dc_A}{dt} = k c_A^\alpha$  . Su integración entre  $t=0$  (con  $c_A=c_A^0$ ) y el tiempo  $t$  permite obtener:

$$\frac{1}{c_A^{\alpha-1}} = \frac{1}{(c_A^0)^{\alpha-1}} + (\alpha-1)k t \quad (1.17)$$

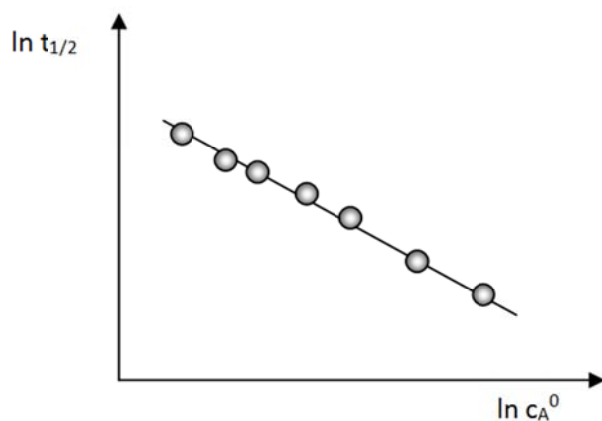
Cuando el orden de reacción no es conocido, este puede evaluarse a partir de medidas del tiempo medio de reacción. Luego, a partir de la ecuación (1.17) se obtiene:

$$\frac{2^{\alpha-1} - 1}{(\alpha-1)(c_A^0)^{\alpha-1}} = k t_{1/2} \quad (1.18)$$

Tomando logaritmo en ambos miembros de la igualdad en la ecuación (1.18):

$$\ln t_{1/2} = \ln \left[ \frac{2^{\alpha-1} - 1}{(\alpha-1)(c_A^0)^{\alpha-1}} \right] - \ln k - (\alpha-1) \ln c_A^0 \quad (1.19)$$

Midiendo tiempos medios de reacción para distintas concentraciones iniciales y representando  $\ln t_{1/2}$  versus  $\ln c_A^0$ , debería obtenerse una dependencia lineal como la que se muestra en la Figura 1.5:



**Fig. 1.5.** Determinación del orden de reacción a partir del análisis de tiempos medios en función de la concentración.

El valor de la pendiente  $m$  coincide con  $m = \alpha - 1$ . Así se obtiene  $\alpha = m + 1$

Para una cinética de primer orden se verifica que el tiempo medio es independiente de la concentración inicial.

### Determinación del orden de reacción a partir de medidas de la velocidad inicial

Considere la reacción  $aA + bB \rightarrow \text{Productos}$ . Si la velocidad de esta reacción puede escribirse como:

$$v = k \cdot c_A^\alpha \cdot c_B^\beta \quad (1.20)$$

la determinación del orden de reacción puede realizarse midiendo las velocidades iniciales  $v_0$ .

*Este método es adecuado si no existe un período de inducción en la reacción.* Se entiende por período de inducción al tiempo que transcurre desde el momento de la mezcla de reactivos hasta el tiempo en que se inicia la reacción. Este período depende de varios factores y puede variar de sistema a sistema.

Si se conocen las concentraciones iniciales de reactivos (y/o productos, hecho que es de particular importancia cuando la ley experimental depende de sus concentraciones), la velocidad inicial para el caso indicado previamente será:

$$v_0 = k \cdot (c_A^0)^\alpha \cdot (c_B^0)^\beta \quad (1.21)$$

Es importante evaluar con precisión la tangente al origen para determinar  $v_0$ . Este método permite determinar los órdenes parciales. Si se fija la concentración inicial de uno de los componentes (por ejemplo,  $c_B^0 = \text{constante}$ ) y se mide la velocidad inicial para distintas concentraciones iniciales del otro componente ( $c_A^0$  variable), la ley de velocidad puede reescribirse como:

$$v_0 = k_{ap} \cdot (c_A^0)^\alpha \quad (1.22)$$

donde  $k_{ap}$  es una constante de velocidad aparente, definida en este caso como  $k \cdot (c_B^0)^\beta$ . La representación doble logarítmica siguiente:

$$\ln v_0 = \ln k_{ap} + \alpha \cdot \ln c_A^0$$

debería ajustarse a una dependencia lineal de cuya pendiente se obtiene el orden parcial  $\alpha$ . La inversión del procedimiento, variando la concentración  $c_B^0$  a  $c_A^0$  constante, permite obtener  $\beta$ . El análisis de la ordenada al origen permite obtener la constante de velocidad.

Las ventajas y desventajas de este método de medida del orden de reacción pueden resumirse de la siguiente manera:

- Es conveniente en cinéticas complejas debido a la presencia de reacciones laterales o varias etapas.
- Al no ser necesario la integración de la ley de velocidad se evita trabajar con expresiones de complejidad variable
- Puede estudiarse el efecto de productos o potenciales intermediarios en la velocidad del proceso, incorporándolos en el sistema al comienzo de la reacción.
- El mayor inconveniente es el número de experimentos que deben llevarse a cabo para hallar la ley de velocidad, y a la vez se requiere un experimento muy controlado para obtener perfiles de concentración para un nivel bajo de conversión de reactivos en productos.

Aunque con un objetivo diferente al de determinar el orden de reacción, la medida de velocidades iniciales es la forma más frecuente de estimar velocidades en reacciones catalizadas por enzimas (ver Capítulos 3 y 5 de este libro).

### **Reducción del orden de reacción global. Cinéticas de pseudo-primer orden**

De manera similar a situaciones previas, considere una cinética cuya ley de velocidad tenga la forma:

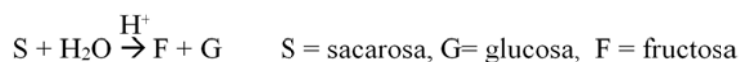
$$v = k \cdot c_A^\alpha \cdot c_B^\beta$$

Si se trabaja en exceso de uno de los reactivos de manera tal que su consumo no implique cambios significativos en su concentración, entonces esta puede tomarse constante y el orden global se reduce al de la otra especie en defecto. Si el sistema se prepara de manera tal que  $c_A^0 \ll c_B^0$ , y para la concentración del compuesto B al tiempo  $t$  se observa que  $c_B^t \approx c_B^0$ , entonces, la ley experimental adopta la forma:

$$v = k_{ap} \cdot c_A^\alpha \quad \text{con} \quad k_{ap} = k \cdot c_B^\beta$$

El análisis del cambio en el tiempo de la concentración de la especie en defecto permitirá obtener el orden parcial de reacción respecto de la misma. Cuando  $\alpha=1$ , en las condiciones anteriores la cinética es de pseudoprimer orden.

Un ejemplo clásico en cinética química de una cinética de pseudoprimer orden es la inversión de la sacarosa catalizada por ácidos. La reacción en soluciones acuosas es la siguiente:



La ley experimental es  $v = k_{ap} \cdot [S]$ . Ahora,  $k_{ap}$  depende tanto de la concentración de protones (catalizador, que no se consume en la reacción) como de la de agua. El tiempo medio se modificará con la concentración del catalizar y con la concentración de agua, efecto que se podrá observar en el caso que la reacción se lleve a cabo en mezclas de agua y etanol o agua y acetona, donde se pueda regular la  $[H_2O]$ .

El estudio detallado de  $k_{ap}$  con la concentración de protones muestra que a concentraciones no muy elevadas de sacarosa en soluciones acuosas, la cinética es de orden 1 en protones en soluciones diluidas de ácido. La determinación del orden de reacción parcial en agua requiere trabajar con medios no acuosos donde, sin cambio en el mecanismo de la reacción, la concentración de agua pueda ser regulada externamente. La constante de velocidad experimental resulta  $k_{ap} = k \cdot [H^+] \cdot [H_2O]^n$ , con  $n \geq 4$ . La constante  $k$  no es la constante de velocidad de un proceso único, sino que es combinación de varias constantes de velocidad por tratarse de una cinética compleja.

Otro ejemplo clásico se presenta en el estudio de varias reacciones catalizadas por enzimas. En estos sistemas, se realizan medidas de velocidades iniciales. En estas condiciones, la concentración de sustrato  $S$  es su concentración inicial  $[S]_0$ . El sustrato se pone en contacto con un enzima cuya concentración total es  $[E]_0$ , y se mide la evolución de  $[S]$  en el tiempo, evaluándose la pendiente a la curva en el origen. Así, se observa que la ley de velocidad obedece a la expresión conocida como ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{k[S_0][E_0]}{K_M + [S_0]}$$

La que en concentraciones de sustrato  $[S] \ll K_M$  se reduce a:

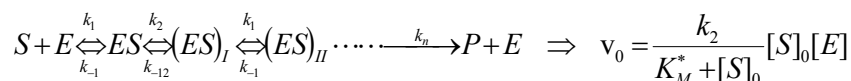
$$v_0 \approx \frac{k[S_0][E_0]}{K_M}$$

que indica un orden parcial 1 en el sustrato y 1 en el enzima. Por otro lado, cuando  $[S_0] > K_M$ , se verifica que:

$$v_0 = k [E_0] = v_{m\acute{a}x}$$

siendo entonces la cinética de orden cero en el sustrato y de orden 1 en el enzima.

El detalle de la deducción de la ley de Michaelis-Menten y las diferentes características de la misma en relación a su uso práctico en estudios de enzimas que obedecen a la misma, será abordado en el Capítulo 3 del presente libro. Es importante señalar, que reacciones consecutivas del tipo:



conducen a la misma ley de velocidad que la planteada previamente, por lo que dicha ley no aporta información sobre el mecanismo real de una cinética enzimática. La constante  $K_M^*$  involucra una combinación de las distintas constantes de velocidades específicas asociadas con los distintos intermediarios.

## Integración de ecuaciones de velocidad de segundo orden

Considere nuevamente la reacción  $aA + bB \rightarrow \text{Productos}$ , que obedece a una ley cinética de segundo orden:

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k c_A c_B$$

Según lo que hemos discutido en las secciones precedentes, debe considerarse que si  $a$  y  $b$  fuesen unitarios y coincidentes con el orden parcial en cada especie en esta ley no es una condición suficiente para afirmar que la reacción es elemental. Por el contrario, si la reacción es elemental, puede afirmarse que los órdenes parciales deben coincidir con los coeficientes estequiométricos.

La integración de este tipo de ley puede realizarse siempre. Sin embargo, desde el punto de vista práctico puede diagramarse el experimento para que el manejo de la información medida sea siempre la más sencilla. Dependiendo del mecanismo de la reacción, pueden presentarse las siguientes situaciones:

CASO 1. Para la reacción indicada, correspondiente a una situación menos frecuente, la ley puede tomar la forma:

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k c_A^2$$

Si este es el comportamiento observado, independientemente del diseño del experimento, puede afirmarse que la cinética no es elemental. Como se discutió previamente, la integración conduce a las formas vistas en la ecuación (1.16), esto es:

$$\frac{1}{c_A} = \frac{1}{c_A^0} + kt$$

CASO 2. Para la reacción indicada:  $v = -\frac{dc_A}{dt} = k c_A c_B$

si alguno de los coeficientes estequiométricos es distinto de la unidad, ya puede afirmarse que la cinética es compleja. Si ambos fuesen unitarios, no puede afirmarse que la reacción sea elemental.

En general, si  $x$  es el grado de avance de la reacción, las concentraciones de A y B al tiempo  $t$  serán:

$$c_A = c_A^0 - a.x \quad \text{y} \quad c_B = c_B^0 - b.x$$

Luego,  $-dc_A/dt = a dx/dt$

La integración de esta ecuación puede realizarse considerando las siguientes situaciones relacionadas con el diseño de la experiencia:

**a.- A partir de la mezcla de cantidades estequiométricas de A y B**

Analicemos la estequiometría  $A+2B \rightarrow \text{Productos}$ . Por cada mol de A que reaccione deben reaccionar 2 moles de B. Si la concentración inicial de la especie A es  $c_A^0$ , la cantidad estequiométrica de B debe ser  $c_B^0 = 2c_A^0$ . Si la estequiometría es  $A+bB \rightarrow P$ , la relación será  $c_B^0 = bc_A^0$ . Para la estequiometría general  $aA+bB \rightarrow \text{Productos}$ , se debe verificar que  $c_A^0 = (a/b).c_B^0$  o  $c_B^0 = (b/a)c_A^0$ .

En este caso, por integración la ley es la que sigue:

$$v = -\frac{1}{a} \frac{dc_A}{dt} = \frac{dx}{dt} = k(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx) = k(c_A^0 - ax) \left( \frac{b}{a} c_A^0 - bx \right) \quad (1.23)$$

$$v = \frac{dx}{dt} = k \frac{b}{a} (c_A^0 - ax)(c_A^0 - ax) = k \frac{b}{a} (c_A^0 - ax)^2 = k'(c_A^0 - ax)^2$$

Reordenando:

$$(1.24)$$

En la ecuación (1.24),  $k' = k.(b/a)$ . Luego, integrando esta ecuación se obtiene:

$$\frac{1}{(c_A^0 - ax)} = \frac{1}{c_A^0} + kt$$

que es idéntica a la ecuación (1.16) discutida previamente al analizar cinéticas de segundo orden sencillas y coincide con el CASO 1 ya estudiado para este tipo de reacciones.

**b.- trabajando en exceso de un reactivo, por ejemplo  $c_B^0 \gg c_A^0$ . Luego:**

$$v = -\frac{1}{a} \frac{dc_A}{dt} = \frac{dx}{dt} = k(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx) \approx k''(c_A^0 - ax) \quad \text{con } k'' = k c_B^0 \quad (1.25)$$

Esta ley se ha llevado a condiciones de pseudoprimer orden y la solución es del tipo que se muestra en la ecuación (1.15), con la diferencia que ahora el tiempo medio dependerá de la concentración inicial de la especie en exceso ( $c_B^0$  en este caso).

**c.- trabajando en condiciones tales que  $c_A^0 \neq (a/b)c_B^0$ .**

La ecuación:  $v = -\frac{1}{a} \frac{dc_A}{dt} = \frac{dx}{dt} = k(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx)$  se reordena separando variables:

$$\frac{dx}{(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx)} = k dt$$

Luego debe integrarse por el método de fracciones simples, tal como se indica a continuación:

$$\frac{1}{(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx)} = \frac{M}{(c_A^0 - ax)} + \frac{N}{(c_B^0 - bx)} = \frac{M(c_B^0 - bx) + N(c_A^0 - ax)}{(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx)} = \frac{Mc_B^0 + Nc_A^0 - (Mb + Na)x}{(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx)}$$

Los coeficientes M y N se obtienen a partir de la condición del numerador en la ecuación previa:

$$Mc_B^0 + Nc_A^0 - (Mb + Na)x = 1$$

Por lo tanto, como en el miembro de la izquierda no hay término en el grado de avance (x), se debe cumplir:

$$Mc_B^0 + Nc_A^0 = 1 \quad \text{y} \quad Mb + Na = 0 \quad \Rightarrow \quad N = -\frac{b}{a}M \quad \text{y} \quad M = \frac{1}{c_B^0 - \frac{b}{a}c_A^0} = \frac{a}{ac_B^0 - bc_A^0} \quad \text{y} \quad N = -\frac{b}{ac_B^0 - bc_A^0}$$

La integral a resolver tiene la forma:

$$\int \frac{dx}{(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx)} = M \int \frac{dx}{(c_A^0 - ax)} + N \int \frac{dx}{(c_B^0 - bx)} = -\frac{M}{a} \ln \frac{(c_A^0 - ax)}{(c_A^0)} - \frac{N}{b} \ln \frac{(c_B^0 - bx)}{(c_B^0)} = kt$$

Reemplazando M y N por sus expresiones, se obtiene:

$$\int \frac{dx}{(c_A^0 - ax)(c_B^0 - bx)} = \frac{1}{bc_A^0 - ac_B^0} \ln \frac{(c_A^0 - ax)}{c_A^0} - \frac{1}{bc_A^0 - ac_B^0} \ln \frac{(c_B^0 - bx)}{c_B^0} = kt$$

Finalmente:

$$\ln \frac{(c_A^0 - ax)}{(c_B^0 - bx)} = \ln \frac{c_A}{c_B} = \ln \frac{c_A^0}{c_B^0} + (bc_A^0 - ac_B^0)kt \quad (1.26)$$



Representado  $\ln(c_A/c_B)$  en función del tiempo debe obtenerse una dependencia lineal, cuya pendiente contiene la constante de velocidad  $k$ .

## Reacciones de orden cero y fraccionarios

Las reacciones de orden cero deben ser independientes de la concentración. En el caso de reacciones enzimáticas, a concentraciones iniciales del sustrato muy superiores a la constante de Michaelis-Menten, la cinética se vuelve de orden cero en esa especie, aunque tiene orden 1 respecto de la concentración total del enzima que es constante durante el proceso.

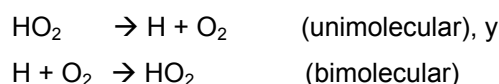
## Tipos de reacciones: Reacciones simples y complejas.

### Mecanismo de reacción

#### a. Reacciones simples (o elementales).

Las reacciones elementales ocurren en un único paso. Las etapas de una reacción química, que definirán el mecanismo de la misma, se plantearán sobre la base de reacciones simples.

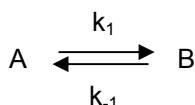
Ejemplos de reacciones consideradas simples son:



#### b. Reacciones complejas

Son aquellas que ocurren en más de una etapa elemental. En general, las reacciones complejas pueden agruparse en:

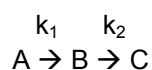
##### • Reversibles



Estas pueden ser de primer orden, segundo, etc.

##### • Consecutivas

En estas reacciones, se genera al menos un intermediario que no está presente ni al comienzo ni al final del proceso.

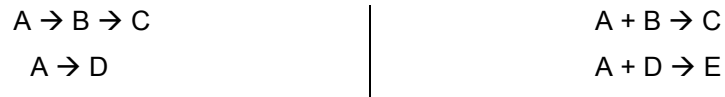


En este caso, la sustancia B es el intermediario de reacción, cuya naturaleza (caracterización e identificación) debe ser determinada con el fin de establecer que efectivamente existen

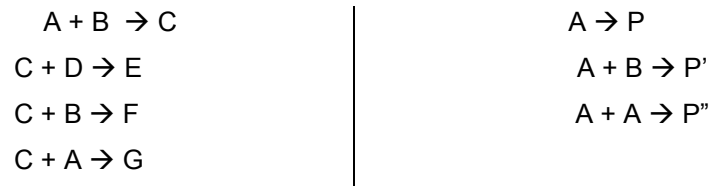
reacciones consecutivas. Las reacciones enzimáticas Michaelianas son un ejemplo de este tipo de reacciones (pueden verse en más detalle en el Capítulo 3 de este libro).

• **Paralelas**

En este grupo de reacciones, un reactivo puede reaccionar por dos vías independientes para generar distintos productos. Ejemplos genéricos de este tipo de reacciones se detallan a continuación



• **Concurrentes o competitivas**



## Integración de reacciones complejas

No todos los sistemas admiten la integración de las ecuaciones diferenciales que surgen de un mecanismo de reacción. Cuando esto no es posible existen procedimientos numéricos que permiten resolver este problema.

En esta sección se tratarán algunos ejemplos de integración para los sistemas cinéticos presentados anteriormente.

• **Reversibles**

Atento a lo discutido previamente, considere el siguiente ejemplo



El perfil de concentración de una reacción reversible como la indicada, comparada con una reacción irreversible se presenta en la Figura 1.6 siguiente:

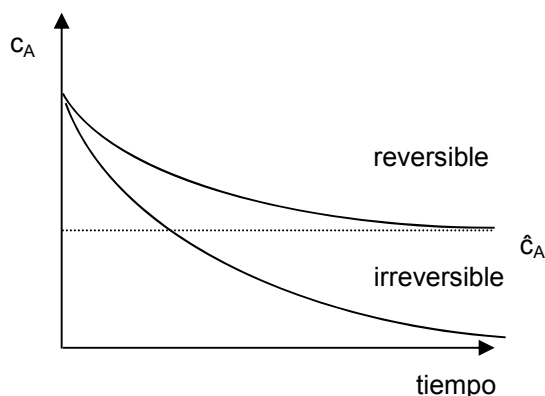


Fig. 1.6. Comparación de una reacción reversible con otra irreversible.

En el equilibrio,  $dc_A/dt = 0$ . Luego,  $\hat{c}_A/\hat{c}_B = k_1/k_{-1} = K_e$ , donde  $\hat{c}_B$  es la concentración de equilibrio de B. La integración de la ecuación de velocidad es posible, introduciendo en ella el balance de materia:

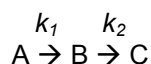
$$d(\xi/V)/dt = -d[A]/dt = d[B]/dt = k_1 \cdot [A] - k_{-1} \cdot [B] = k_1 \cdot [A] - k_{-1} \cdot ([A]_0 - [A])$$

Luego, en términos de las concentraciones de equilibrio, se obtiene

$$\ln(\hat{c}_B / (\hat{c}_B - c_B)) = (k_1 + k_{-1}) \cdot t = k_1 \cdot (1 + K_e) \cdot t$$

Obsérvese que la evaluación de los parámetros cinéticos de esta reacción se requiere de información termodinámica completa, incluyendo las medidas de los cambios de entalpía correspondientes como se discutirá más adelante al estudiar el efecto de la temperatura en la velocidad de los procesos.

• **Consecutivas**



Las ecuaciones de velocidad para cada especie involucrada en cada etapa pueden deducirse directamente, pues se trata de reacciones elementales:

$$\begin{aligned} d[A]/dt &= -k_1 \cdot [A] \\ d[B]/dt &= k_1 \cdot [A] - k_2 \cdot [B] \\ d[C]/dt &= k_2 \cdot [B] \end{aligned}$$

Vale la siguiente condición sobre la concentración analítica de la especie A:  $c_A^0 = c_A + c_B + c_C$

Esta relación muestra que la tercera ecuación diferencial es suma algebraica de las dos primeras:

$$d[C]/dt = -d[A]/dt - d[B]/dt.$$

Esto implica que evaluando la evolución temporal de A y de B, permite el conocimiento de la evolución temporal de la tercera especie. La integración de la primera ecuación es directa:

$$c_A = c_A^0 e^{-k_1 t}$$

Si esta expresión se introduce en la segunda ecuación:

$$\frac{dc_B}{dt} = k_1 c_A^0 e^{-k_1 t} - k_2 c_B$$

Siempre debe trabajarse con una o varias condiciones de contorno. En este caso a  $t=0$ ,  $c_B^0 = 0$  y a  $t \rightarrow \infty$ ,  $c_B = 0$ . La solución de esta ecuación diferencial conduce a la siguiente expresión para la evolución temporal de B:

$$c_B = \frac{k_1}{k_2 - k_1} c_A^0 (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

y para la concentración de C, se tendrá:

$$c_C = c_A^0 \left[ 1 + \frac{k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}}{k_1 - k_2} \right]$$

En la Figura 1.7 se muestra la evolución temporal de las concentraciones de las especies A, B y C en una cinética de reacciones consecutivas. Puede apreciarse que la concentración de A disminuye exponencialmente, el intermediario B, aumenta su concentración, pasa por un máximo para luego decaer, mientras que C se incrementa de manera regular hasta que su concentración final coincide con la inicial del reactivo A.

Existe para el intermediario un tiempo para el cual su concentración es máxima. Dicho tiempo puede obtenerse derivando la concentración de la especie B ( $c_B$ ) respecto del tiempo, lo que conduce a la siguiente ecuación:

$$t_{m\acute{a}x} = \frac{1}{k_2 - k_1} \ln \frac{k_2}{k_1}$$

Observe que la evolución temporal del intermediario depende de los valores de las constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$ .

## Hipótesis del estado estacionario. Hipótesis del preequilibrio

Un mecanismo es una hipótesis de trabajo. De esta hipótesis debe surgir la expresión de una ley de velocidad. La sola coincidencia entre el resultado de estas consideraciones con la ley experimental puede ser una buena coincidencia. Más aún, distintos mecanismos pueden conducir al mismo tipo de expresión que la ley experimental y esto no significa que todos son válidos.

La confirmación del mecanismo depende de la calidad de la información, pero sobre todo de la caracterización e identificación del o de los intermediarios de reacción.

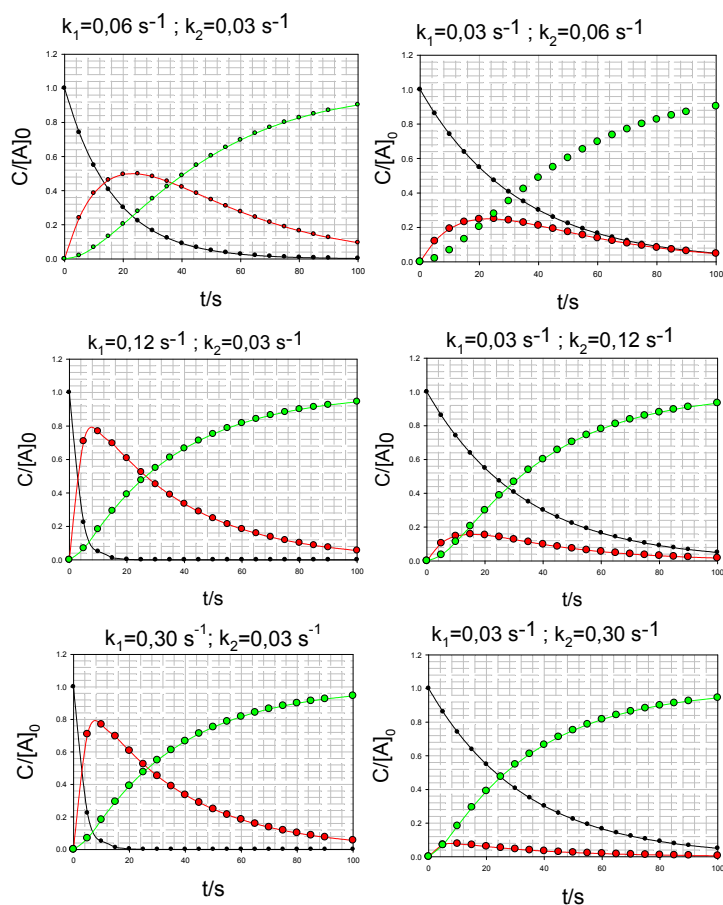


Fig. 1.7. Perfiles de concentración de reactivo (A), intermediario (B) y producto (C) para una reacción consecutiva.

- reactivo
- intermediario
- producto

Considere el mecanismo  $A \rightarrow B \rightarrow C$ . Puede ocurrir que el intermediario B sea muy reactivo, de manera que el mismo no se acumula en concentraciones considerables comparadas con A o con C. Si la velocidad a la que se forma B debe ser comparable a la que desaparece, entonces su concentración neta puede ser lo suficientemente pequeña y relativamente constante. Esta consideración es base para enunciar la **hipótesis del estado estacionario**.

Esta hipótesis establece que la velocidad de neta del o de los intermediarios de reacción es aproximadamente cero y por lo tanto la concentración estacionaria o en estado estacionario de B es prácticamente constante. Es importante tener presente que esta hipótesis no puede aplicarse a reactivos y productos de la reacción, pero puede aplicarse a todos los intermediarios reactivos que se postulan en el mecanismo.

Si se considera el mecanismo propuesto, entonces  $dc_B/dt \approx 0$ . La concentración estacionaria de este intermediario se indicará como  $[B]_{ss}$  (**steady state approximation**). Luego:

$$\frac{dc_B}{dt} \approx 0 = v_1 - v_2 = k_1 c_A - k_2 [B]_{ss} \Rightarrow [B]_{ss} = \frac{k_1}{k_2} c_A$$

Introduciendo esta expresión en la velocidad del proceso:

$$-\frac{dc_A}{dt} = \frac{dc_C}{dt} = k_2[B]_{ss} = k_1c_A = k_1c_A^0 e^{-k_1 t}$$

De la solución exacta, puede obtenerse la concentración estacionaria de B si se supone que  $k_2 \gg k_1$  (en general, esta condición se cumple si  $k_2/k_1 \geq 10$ , como puede inducirse de la Figura 1.7 para el ejemplo donde  $k_1=0,03 \text{ s}^{-1}$  y  $k_2=0.03 \text{ s}^{-1}$ ).

Si el mecanismo involucra una etapa reversible, como es el caso de las reacciones y el equilibrio se alcanza en condiciones que B se descompone para formar A con mayor velocidad que la que conduce a C (por ser este ejemplo una cinética de primer orden en cada etapa entonces debe esperarse que  $k_{-1} > k_2$ , si no fuese así, conviene hablar de velocidades, luego  $v_{-1} > v_2$ ).

En estas condiciones, la velocidad de formación de C, que servirá de base para expresar la velocidad del proceso depende de la concentración de equilibrio de B durante la reacción. Esta consideración es base para la **hipótesis del preequilibrio** (a veces llamada del equilibrio rápido, en el sentido que este se establece en una escala de tiempo menor que la requerida para que B se descomponga en productos). Luego, se puede deducir la ley de velocidad.

En estas condiciones, la constante de equilibrio  $K_e$  se expresa como

$$K_e = \frac{c_B}{c_A} \Rightarrow c_B = K_e c_A$$

y la ley de velocidad:

$$\frac{dc_C}{dt} = k_2 c_B = k_2 K_e c_A = k' c_A \quad \text{con } k' = k_2 \cdot K_e$$

La hipótesis del estado estacionario puede aplicarse a este sistema. Ahora, la concentración estacionaria de B se expresa como:

$$[B]_{ss} = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} c_A = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} c_A^0 e^{-k_1 t}$$

y la velocidad:

$$\frac{dc_C}{dt} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} c_A^0 e^{-k_1 t} = k'' c_A \quad \text{con } k'' = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

Si  $k_{-1} \gg k_2$ , la concentración estacionaria y la ley se reducen a la discutida en la hipótesis de preequilibrio.

Por el contrario si  $k_2 \gg k_{-1}$ , entonces  $d[C]/dt = -d[A]/dt = k_1 \cdot [A]$ . Esta consideración permite plantear que la velocidad de formación B es la etapa determinante del proceso. El orden de la reacción está gobernado por esta etapa únicamente. En este caso el orden es 1. Sin embargo,

en casos más generales, dependiendo de las condiciones experimentales, puede modificarse cuál es la etapa determinante o lenta de la reacción y con ello modificar el orden de la reacción.

## Efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones químicas. Ecuación de Arrhenius

La temperatura afecta de manera significativa a la mayoría de las reacciones químicas. En general es posible observar comportamientos que dependen del tipo de sistema particular que se estudie. En la Figura 1,8 se esquematizan distintos casos.

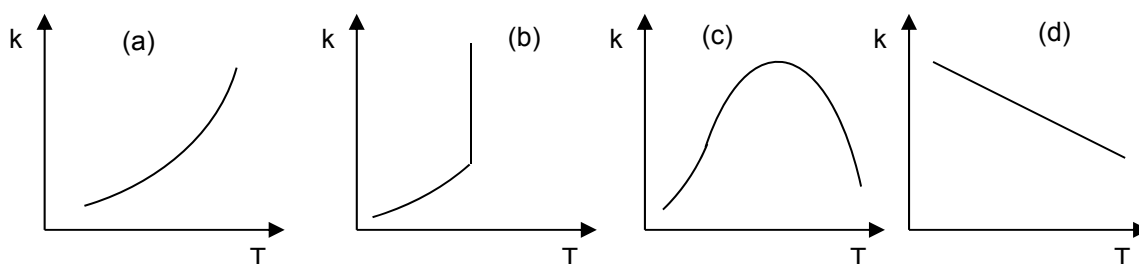


Fig. 1.8. Diferentes dependencias de la constante específica de velocidad con la temperatura.

En general, estos ejemplos se clasifican según el tipo de ley empírica que describe el comportamiento de la constante de velocidad ( $k$ ) con la temperatura o con el tipo de cinética a la que estas constantes están asociadas. A continuación se describen los diferentes casos de la Figura 1.8:

CASO a. En este tipo de comportamiento, el crecimiento de la constante es de carácter exponencial. La ley empírica que lo describe es conocida como *ecuación de Arrhenius*

$$\frac{\partial \ln k}{\partial T} = \frac{E_a}{RT^2} \quad (1.27)$$

En esta ecuación,  $E_a$  es la energía de activación. Esta es la energía mínima promedio que deben alcanzar los reactivos para convertirse en productos. Si  $E_a$  es independiente de la temperatura, su integración conduce a:

$$\ln k = C - \frac{E_a}{RT} \Rightarrow k = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1.28)$$

La ecuación anterior se aplica a intervalos no muy amplios de temperatura dado que en general  $E_a$  depende de la temperatura. En muchos sistemas la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura puede expresarse como:

$$k = B T^n e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{con } n \text{ entero o fraccionario} \quad (1.29)$$

En general existe una energía  $E_0$  característica de la naturaleza de las moléculas por encima de la cual habrá moléculas con chances para descomponerse. En esta situación:

$$\frac{\partial \ln k}{\partial T} = \frac{E_0}{RT^2} \quad (1.30)$$

Si la ecuación (1.28) describe la constante de velocidad de un proceso global, es posible hallar una relación entre  $E_0$  y  $E_a$  en dicha ecuación. Si se deriva la forma logarítmica de la ecuación (1.29) respecto de  $T$ , se obtiene:

$$\ln k = \ln B + n \ln T - \frac{E_a}{RT} \Rightarrow \frac{\partial \ln k}{\partial T} = \frac{n}{T} + \frac{E_a}{RT^2} = \frac{E_a + nRT}{RT^2} \quad (1.31)$$

Las ecuaciones (1.30) y (1.31) pueden compararse en la forma de una ecuación diferencial, y esta comparación conduce a la relación buscada entre energía crítica y la energía de activación. Esta comparación conduce a  $E_0 - E_a = n.RT$ . La importancia de esta relación radica en que pone en evidencia que la energía de activación experimental debe tener una suave dependencia con la temperatura.

Si en el intervalo de trabajo se observa que es aplicable la ecuación (1.28), representado el  $\ln k$  versus  $1/T$  debe obtenerse una dependencia lineal de cuya pendiente puede evaluarse la energía de activación. Sin embargo existen situaciones donde esto no se verifica. En la Figura 1.9a se presenta una dependencia típica de Arrhenius. La Figura 1.9b muestra un comportamiento que aparentemente no cumple aparentemente con una dependencia del tipo Arrhenius. Estas “desviaciones” son características de procesos en los que están presentes reacciones competitivas con energías de activación diferentes (al menos dos en esta representación), o transiciones de reacciones homogéneas a heterogéneas.

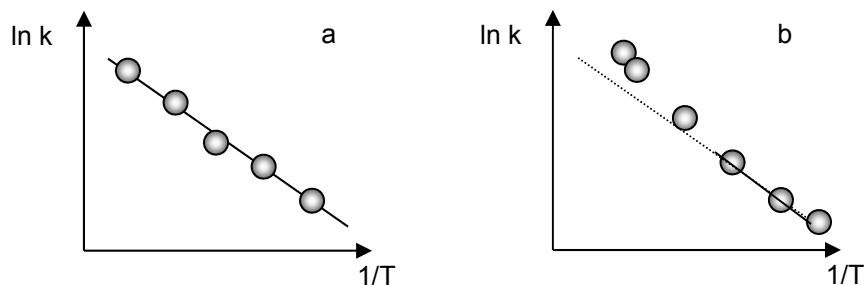


Fig. 1.9. Diferentes dependencias del  $\ln k$  en función de la inversa de la temperatura.

CASO b. Son típicas en explosiones.

CASO c. Se presentan en reacciones enzimáticas, hidrogenaciones catalíticas, etc.

CASO d. Se presentan en reacciones termoleculares, por ejemplo  $2NO + O_2$ , y en estos casos las energías de activación son pequeñas o negativas.



## Energía de activación de reacciones reversibles y complejas. Concepto de coordenada de reacción

Para cualquier reacción, es posible analizar qué se entiende por energía de activación sobre un diagrama cualitativo de energía versus la coordenada de reacción. A medida que la reacción progresa, se producen cambios energéticos como consecuencia de modificaciones en las coordenadas de los núcleos dentro de una molécula de reactivo, y en los núcleos de la molécula con la que esta entra en reacción. Estos cambios energéticos implican variaciones en la energía potencial de las partículas durante el curso de la reacción.

Las variaciones en la configuración geométrica de las partículas implican modificaciones tanto en distancias internucleares como en los ángulos de enlace.

Para representar las variaciones en la energía que experimentan las partículas que reaccionan en función de los cambios de estas coordenadas, se requiere trabajar en un espacio de varias dimensiones.

Sin embargo, conviene muchas veces introducir un diagrama simplificado en el los cambios energéticos o de energía potencial se representan en función de lo que se designa *coordenada de reacción*. En la mayoría de los sistemas, esta coordenada es en realidad una coordenada muy compleja, y contiene tanto cambios de distancias como ángulos de enlace en el proceso que lleva desde la configuración de reactivos a la de productos.

En la Figura 1.10 se esquematiza *de modo somero* un cambio que tiene lugar en un proceso elemental (reacción simple, en un único paso).

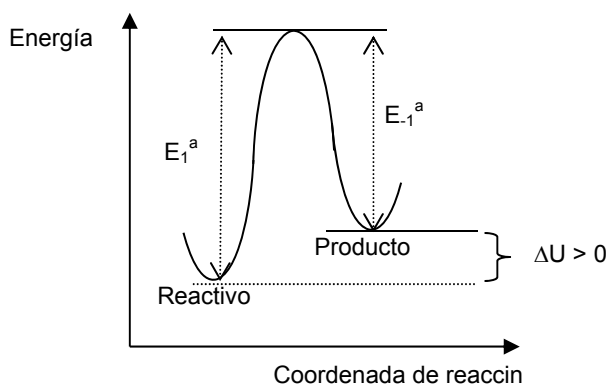


Fig. 1.10. Variaciones de energía de las moléculas a lo largo de la coordenada de reacción.

El máximo que se esquematiza en la Figura 1.10 corresponde a una situación donde los reactivos adquieren una configuración (**no es un intermediario**) que tiene la energía mínima requerida para que se produzca la reacción. Esta energía es la que se asocia con la energía de activación para la reacción directa ( $E_1^a$ ), mientras que  $E_{-1}^a$  corresponde a la energía de activación de la reacción opuesta. **La diferencia de energía entre estas energías es el cambio de energía interna que tiene lugar en el proceso ( $\Delta U$ ):**

Reactivo(s) → Producto(s)

Para una reacción reversible de primer orden,  $K_e = k_1/k_{-1}$ . Si se toma el logaritmo y se deriva respecto de la temperatura, se obtiene

$$\ln K_e = \ln k_1 - \ln k_{-1} \Rightarrow \frac{\partial \ln K_e}{\partial T} = \frac{\partial \ln k_1}{\partial T} - \frac{\partial \ln k_{-1}}{\partial T} \quad (1.32)$$

Recurriendo a las ecuaciones de van't Hoff por un lado ( $\partial \ln K_e / \partial T = \Delta U / RT^2$ ) y de Arrhenius ( $\partial \ln k_i / \partial T = E_i^a / RT^2$ ) por el otro, se obtiene:

$$\Delta U = E_1^a - E_2^a \quad (1.33)$$

La diferencia de energías de activación mide el cambio de energía interna de productos y reactivos tal como se esquematiza en la Figura 1.10.

En la Figura 1.11 se muestran sobre una ley general de velocidad de reacción los diferentes términos de la misma y el significado físico de los mismos.

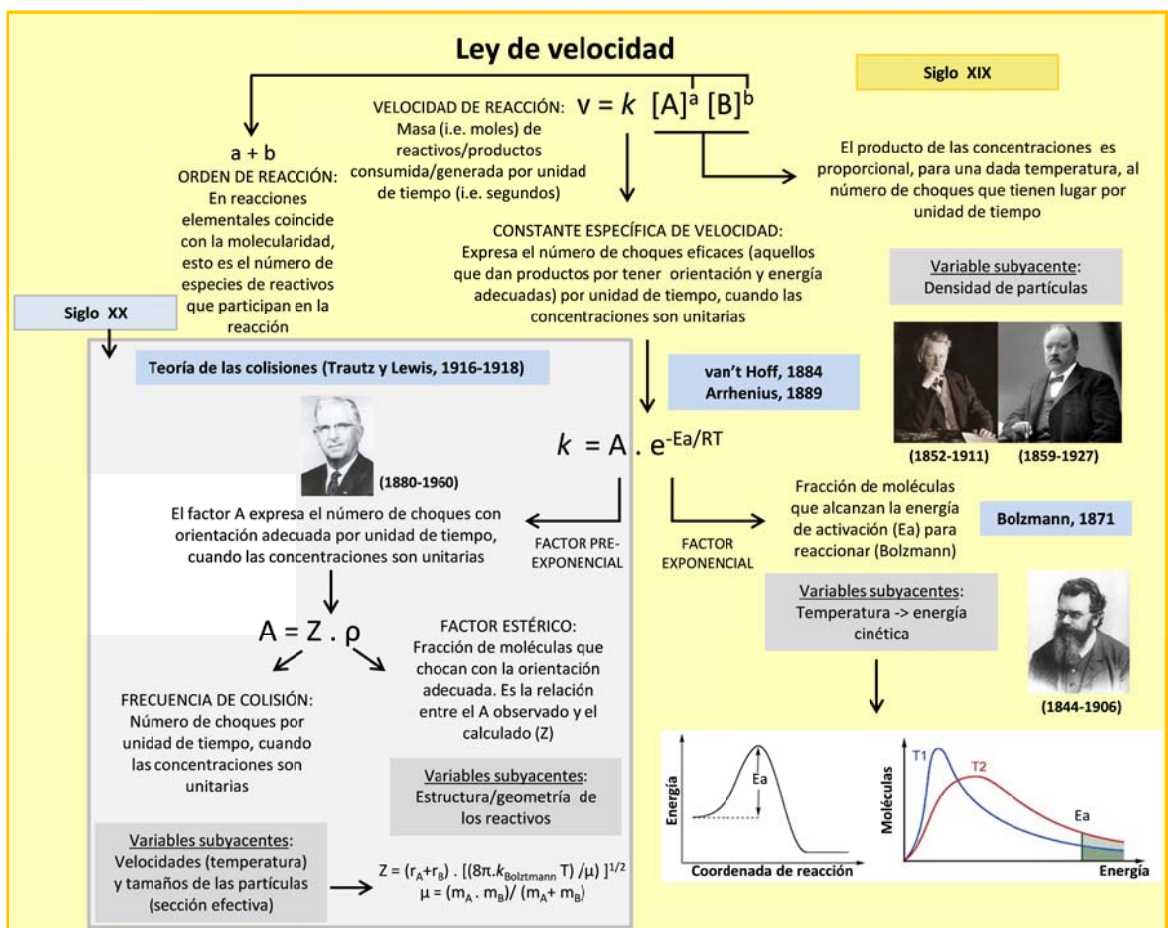


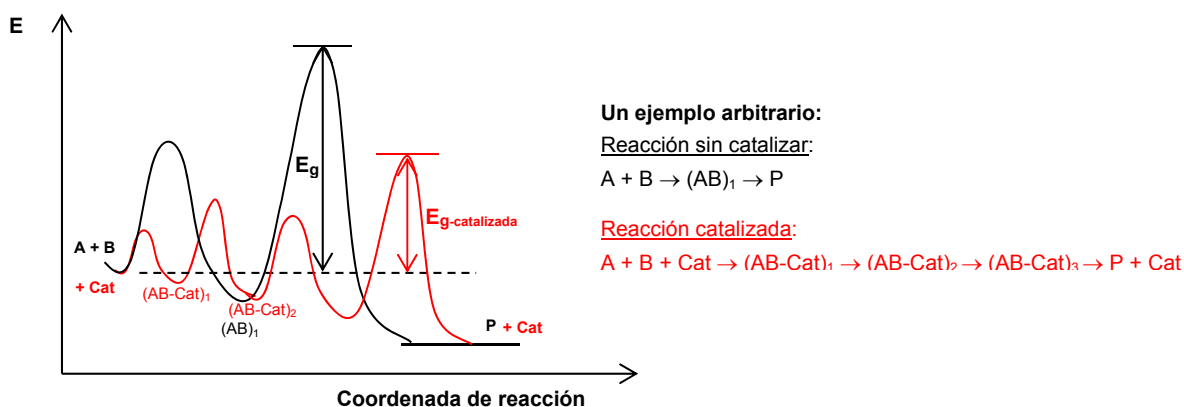
Fig 1.11. Ley de velocidad, sus términos y significado.

## Catálisis química. Conceptos generales.

### Catalizadores biológicos

Los procesos catalíticos, mediados por **catalizadores**, proveen vías alternativas en una reacción química y aumentan su velocidad. Dicho efecto tiene lugar porque en el nuevo camino de reacción la energía de activación (de la etapa limitante) es más baja que la del proceso no catalizado (Fig. 1.12).

El catalizador estabiliza el estado de transición más que a los propios reactivos. La denominación de procesos catalizados fue acuñada por primera vez J. J. Berzelius (1779-1848) en el siglo XIX. El catalizador, no se consume ni afecta las características termodinámicas del proceso global (calor puesto en juego, trabajo asociado al mismo, funciones de estado, rendimiento-equilibrio químico). Cuando una sustancia incrementa la actividad del catalizador se denomina **promotor**; a diferencia de otras sustancias que la inhiben, en cuyo caso, si la interacción es irreversible, se denominan **venenos**.



**Fig 1.12.** Perfiles de energía a lo largo de la coordenada de reacción para una reacción genérica arbitraria no catalizada (curva y notas en **negro**) y para la misma reacción catalizada (curva y notas en **rojo**). En el ejemplo las reacciones transcurren con uno y tres intermediario de reacción, respectivamente. Se observa que el proceso catalizado tiene lugar por un camino diferente y con menor energía de activación.

En los sistemas biológicos los procesos catalíticos centrales tienen lugar tanto en **fase homogénea** (reactivos y catalizador en la misma fase) como **heterogénea** (con participación, por ejemplo, de componentes de membrana); y son mediados por **enzimas**, componentes de naturaleza proteica que se analizan desde diferentes ángulos en el presente libro; y también por **ribozimas** en las que el elemento catalítico es un ARN. Para cualquier catalizador se denomina sitio activo a la disposición de átomos, o grupos de átomos, en el catalizador donde se llevará a cabo la transformación catalítica.

En los sistemas biológicos cuando existen compuestos que disminuyen la actividad catalítica de las enzimas, se los suele denominar **inhibidores** (en general cuando el complejo con el catalizador es completamente inactivo, y donde la unión puede ser reversible o irreversible), o **moduladores negativos** (cuando el complejo con el catalizador disminuye pero no anula la actividad catalítica). Existen asimismo compuestos que son promotores de la

actividad catalítica, y en ese caso se los denomina **moduladores positivos**. Véanse los Capítulos 4 y 7 de este libro. Esta característica de las enzimas como catalizadores biológicos las hace particularmente interesantes dado que la capacidad catalítica del sistema puede ser modificada no sólo aumentando la cantidad de catalizador, sino modificando su actividad catalítica específica (en más o en menos). Tal característica es importante dado que: a) la célula requiere en muchos casos responder de modo inmediato a necesidades metabólicas que no pueden condicionarse a la síntesis *de novo* de moléculas del catalizador, o a la destrucción de las mismas; y b) los catalizadores funcionan como sensores que al percibir la composición del medio celular acomodan su actividad específica (concertadamente con el resto de los catalizadores) de modo de conducir a la célula hacia respuestas que han sido moldeadas a lo largo de todo el proceso evolutivo. Cabe destacar, de todos modos, que no todos los catalizadores biológicos responden al efecto de compuestos moduladores. En los capítulos 3, 4, 5, 6 y 7 de este libro pueden consultarse las características cinéticas más representativas de las reacciones catalizadas por diferentes clases de enzimas, incluyendo las denominadas enzimas Michaelianas (cuya capacidad catalítica no es afectada por moduladores) y las que presentan efectos cooperativos y alostéricos (cuya actividad catalítica es modulada).

## Problemas

### Problema 1

a) En *Escherichia coli* muchas proteínas están presentes en relación de dos moléculas por célula. ¿Cuál es la concentración Molar de estas proteínas? (Asuma que una célula de *E. coli* es un cilindro de 2  $\mu\text{m}$  de longitud por un 1  $\mu\text{m}$  de diámetro). Por otro lado ¿cuántas moléculas de glucosa contiene esta célula si la concentración interna es 1 mM?

b). Bajo condiciones óptimas para el crecimiento, una célula de *E. coli* se divide cada 20 minutos, aproximadamente. Si ninguna célula se muriera en estas condiciones ¿cuánto tiempo le tomaría a una célula de *E. coli* en un frasco de cultivo de 10 litros llegar a una densidad de células máxima de  $10^{10}$  células por ml (cultivo saturado)?

c). El ADN del cromosoma de *E. coli* mide 1.6 mm de longitud cuando está extendido y 20 Å de diámetro. ¿Qué fracción de una célula de *E. coli* ocupa este DNA?

Una célula humana tiene unas 600 veces más de ADN que una célula de *E. coli*. Si asume una célula de tipo esférica como algunas de la sangre, con un diámetro de 20  $\mu\text{m}$  ¿Qué fracción de la célula humana ocupa su ADN?

### Problema 2

Una proteína represora interactúa con ADN de doble hebra a través de dos sitios idénticos.

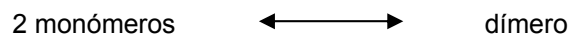
a) qué tipos de interacciones predominan en las interacciones ADN-proteína?

b) Si la proteína se corta de modo de separar los dos dominios de unión sin afectar la interacción de cada uno de ellos con el ADN, discuta en términos de entropía, entalpía y energía libre como se verá afectada la unión entre las macromoléculas.

c) Discuta en los mismos términos cómo se afectará la unión ADN-proteína en el caso que uno de los sitios del DNA sea eliminado por un cambio de secuencia?

**Problema 3**

Considere el equilibrio entre una proteína dimérica y sus dos subunidades hidrofóbicas (considerar  $\Delta H \ll T \cdot \Delta S$ )



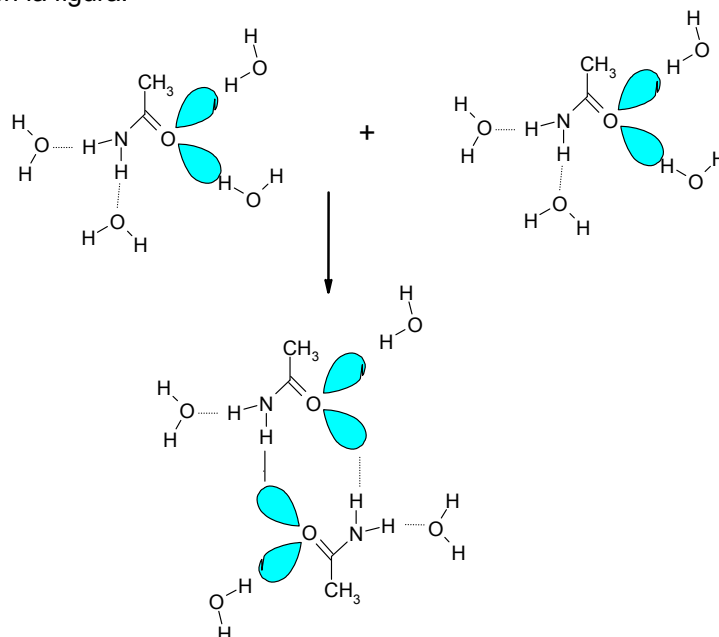
El cambio de entropía  $\Delta S$  para la reacción de asociación varía con la temperatura de la siguiente forma:

Temperatura (°C)	$\Delta S$ (kJ/mol °C)
0	0,041
25	0,043
37	0,045

¿Cuál será el efecto de la temperatura sobre el estado de asociación de esta proteína? ¿Por qué existe aumento de entropía a pesar de que existe una dimerización?

**Problema 4**

La N-metil acetamida (NMA) se dimeriza en solución formando dos puentes de hidrógeno como se muestra en la figura:



Klotz y Franzen estudiaron la capacidad de formación del dímero en dos solventes distintos: agua y tetracloruro de carbono. Ellos obtuvieron los siguientes datos para la reacción de dimerización:

Solvente	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta S^\circ$ (J/mol K $^\circ$ )	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)
Cl <sub>4</sub> C	-17	-45	-3.8
H <sub>2</sub> O	0.0	-41	12.8

- ¿Es favorable la formación del dímero en ambos solventes?
- Comente la diferencia de  $\Delta H^\circ$  en ambos solventes.

### Problema 5

En el metabolismo celular el oxalacetato se forma por la oxidación del malato en la reacción



¿Cómo puede explicar el hecho de que, en la célula, la reacción proceda en la dirección de la producción de oxalacetato?

### Problema 6

El estudio *in vivo* en condiciones definidas de una reacción celular termodinámicamente reversible mostró que la concentración de los reactivos y productos es constante. ¿Ud esperaría que la concentración de los metabolitos implicados sea la concentración de equilibrio? ¿Qué importancia tiene su respuesta anterior para la ruta metabólica desde un punto de vista cinético?

## Bibliografía

- Atkins, P. W. (2008) *Química Física* (octava edición). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Mahner, M. y Bunge, M. (2000) "El espacio y el tiempo no son objetos que existen por sí mismos (o recipientes de cosas.) En lugar de esto, el espaciotiempo es una red de relaciones entre distintas cosas cambiantes. En resumen, sin cosas distintas ni cambiantes no hay espaciotiempo". p. 39. En *Fundamentos de biofilosofía*. México: Siglo XXI Editores.
- Castellan, G. W. (1987) *Fisicoquímica* (segunda edición en español de la tercera edición en inglés). México: Addison Wesley Longman de México.
- Dickerson, R. E., Gray, H. B., Darensburg, M. Y., Darensburg, D. J. (1999) *Principios de Química* (sexta edición). Barcelona: Editorial Reverté.
- Engel, T., Reid, P. (2006) *Química Física* Addison-Wesley.

- Hawking, S. W. (1989) *Historia del tiempo. Del Big Bang a los agujeros negros*. Barcelona: Crítica.
- Laidler, K. (1987) *Chemical Kinetics*. Harper Collins Publisher.
- Levine, I. N. (2004) *Fisicoquímica*, Volumen 2. 5ta. Ed. Madrid: McGraw-Hill.
- Prigogine, I. (2005) *El Nacimiento del Tiempo*. Barcelona: Tusquets.
- Silbey, R. J. , Alberty, R., Bawendi, M. G. (2004) *Physical Chemistry*, 4th Edition.
- Van't Hoff, J. H. (1884) *Études de Dynamique chimique* (Estudios de dinámica química).
- Waage, P. y Gulberg, C. M. (1864) *Forhøndsinger: Videnskabs.Selskabet i Christiania (Studies concerning affinity)*. Pag 35.

## CAPÍTULO 2

# Relación estructura-función en la unión de ligandos a enzimas

*The secret of life is molecular recognition; the ability of one molecule to "recognize" another through weak bonding interactions*

LINUS PAULING, AT THE 25TH ANNIVERSARY OF THE INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AT THE UNIVERSITY OF OREGON

La relación estructura-función es un tema central en biología. Dentro del contexto evolutivo, la estructura o forma de un organismo, de alguno de sus órganos o de alguna estructura particular del mismo es en general aquella que mejor llevará a cabo una o varias funciones. Si pensamos en la forma hidrodinámica de un delfín, diremos que es la mejor para vivir en el agua. De la misma forma, sus ojos presentan globos oculares ligeramente achatados con pupilas grandes que son adaptaciones para corregir la visión en el agua y para captar una mayor cantidad de luz en las profundidades del océano. Al igual que en otros mamíferos, cuando observamos la estructura del corazón podemos comprender la función de las aurículas y ventrículos y su acción coordinada para impulsar la sangre y generar la circulación periférica. Siempre dentro del paradigma evolutivo (no cabría otra posibilidad para comprender a los sistemas biológicos como dejó claramente asentado T Dobzhansky: "Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la teoría de la evolución") la relación estructura-función (también muchas veces aparece como la relación forma-función) actúa como una poderosa herramienta para estudiar o predecir la función de estructuras en distintos organismos. En general podemos decir que en organismos evolutivamente relacionados (que comparten un ancestro en común) estructuras u órganos con forma similar podrían tener función similar. De la misma forma podríamos inferir que la observación de estructuras similares en organismos distintos podría evidenciar un parentesco evolutivo entre los mismos. Sin embargo, esto último no siempre funciona de esta forma, pensemos en la forma que tienen las alas de los pájaros y las alas de los murciélagos. Sus formas son similares (ya que son adaptaciones para volar), pero los pájaros y los murciélagos son animales que no comparten un ancestro común cercano y de ahí que la similitud en la forma de sus alas se deba a que estructuras distintas terminaron pareciéndose ya que cumplen funciones similares.

Esta relación entre estructura y función se cumple para todos los niveles de organización que encontramos en los seres vivos, desde un organismo completo hasta el nivel molecular, y

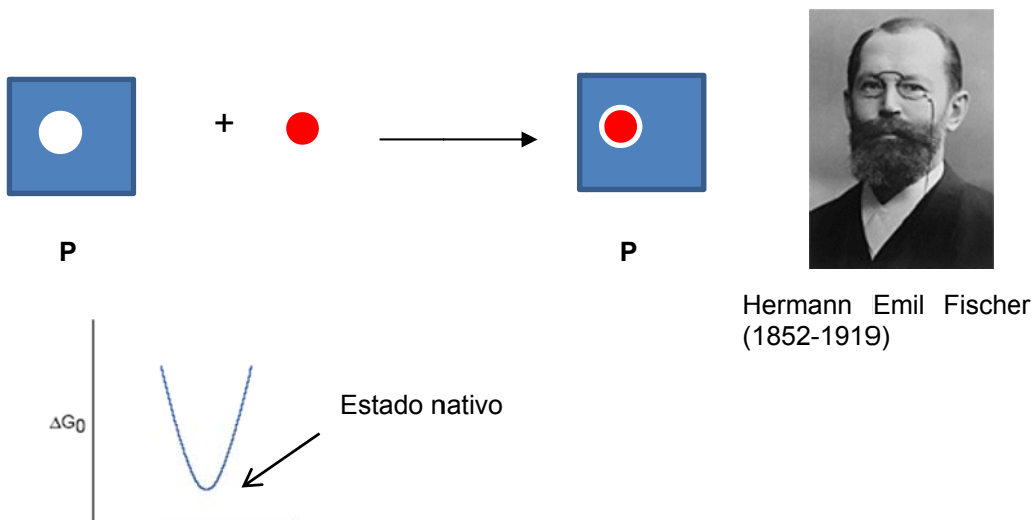


este último es el nivel que nos ocupa en este capítulo. Si bien destacamos la importancia de la relación estructura-función, es importante tener presente que a nivel molecular la relación estructura-función puede ser una propiedad degenerada: estructuras completamente distintas puedan sustentar la misma función e incluso, la “misma” estructura puede sustentar distintas funciones. Pensemos que un martillo puede servir (función) para martillar un clavo o aplastar una cucaracha. O a la inversa podemos usar un zapato tanto para clavar un clavo o aplastar a la famosa cucaracha. Si bien esto parece relajar excesivamente la relación estructura-función en una macromolécula no quiere decir que para cada caso particular no existan adaptaciones estructurales a cada función en particular. Todo depende del detalle con el que se mire, como veremos más adelante en el capítulo.

El estudio de la relación entre la estructura y la función de las macromoléculas en general, es un tema central en la bioquímica estructural. En este nivel tenemos ejemplos conocidos como es el caso de la estructura bicatenaria de un DNA y su relación funcional en la replicación o ejemplos más crípticos como la adaptación de la estructura del glucógeno a la rápida liberación de glucosa en una situación de estrés. Sin bien distintas macromoléculas pueden presentar una determinada relación entre su estructura y función, fundamentalmente en este capítulo nos ocuparemos del estudio de proteínas.

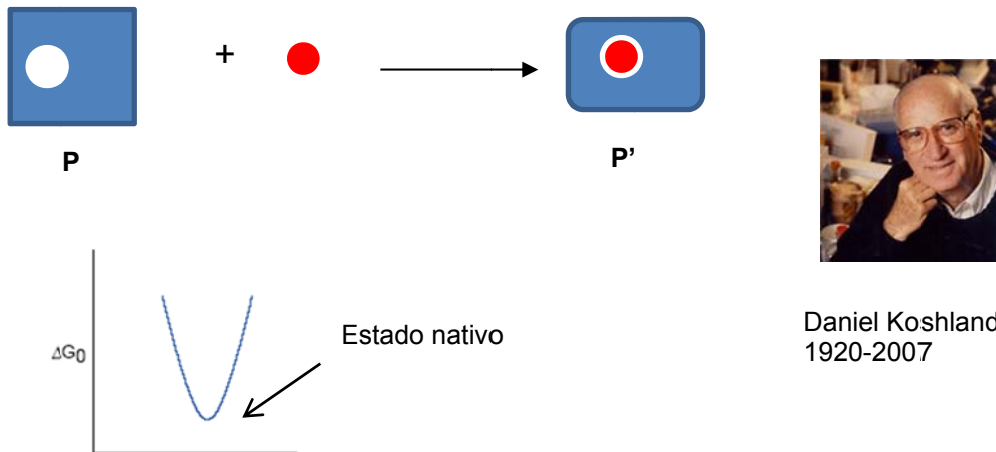
## Hipótesis sobre la relación estructura-función en proteínas

Una de las primeras hipótesis sobre la relación estructura-función en proteínas fue desarrollada por Emil Fischer en 1894. Fischer estudiaba enzimas que actuaban sobre distintos glucósidos. Al notar la alta especificidad de las enzimas sugirió que la enzima debería contener una **región complementaria al sustrato de la forma en la que una llave es complementaria con una cerradura**, de ahí el nombre de su modelo: **llave-cerradura** (Figura 2.1).



**Fig. 2.1.** El **modelo llave-cerradura** de Emil Fischer postulaba que el estado nativo de la proteína es único y que posee un sitio de unión al sustrato que es complementario al mismo. En la figura representamos a la proteína (P) con un cuadrado azul que no cambia su conformación al unir el sustrato (esfera roja). El círculo blanco alrededor de la esfera roja representaría el sitio activo.

Los aspectos más importantes de esta hipótesis es que se plantea la existencia de **un solo estado o estructura para representar la estructura nativa de la proteína** y el sustrato es perfectamente complementario al sitio de unión en la proteína que producirá la transformación química. En principio este modelo parecería explicar la alta afinidad que tienen las enzimas por sus sustratos, justamente ofreciendo una región perfectamente complementaria a la forma o geometría del sustrato. Como veremos más adelante, el modelo de Fischer no puede ser utilizado para explicar el funcionamiento de las enzimas, ya que resultaría en una enzima altamente ineficiente desde el punto de vista catalítico.



**Fig. 2.2.** El **modelo de Koshland** propone que la proteína existe en un estado único, pero que en presencia de un ligando este le induce un cambio conformacional (la proteína pasa del estado P a P')

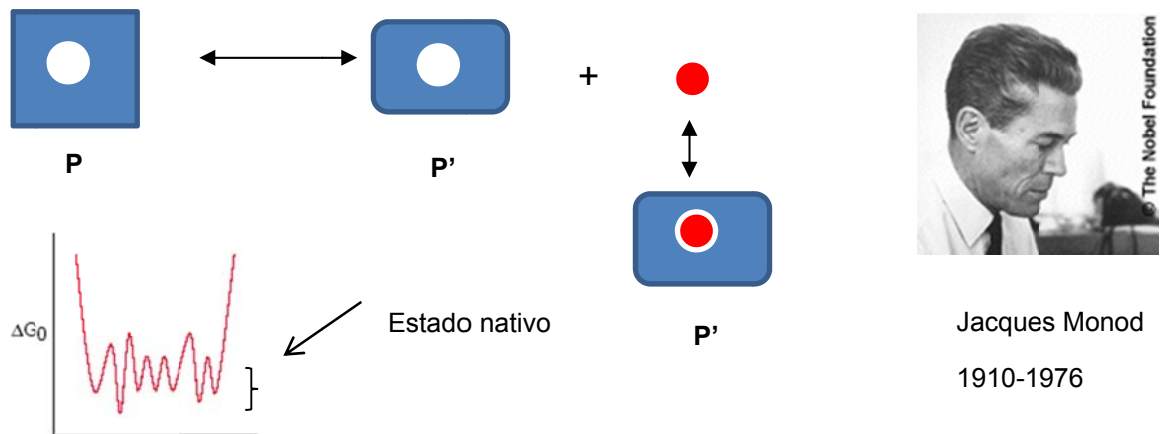
Un modelo posterior de relación estructura-función lo propuso Daniel Koshland en 1958. Para esta época era conocido que gran parte de las enzimas eran **promiscuas**, esto es pueden procesar más de un sustrato (aunque con distintas capacidades de unión y/o catalíticas). Detengámonos un momento en esta definición de promiscuidad. Esto significa que los sustratos que puede utilizar una enzima promiscua pueden ser **artificiales o no tener importancia biológica para el organismo que tenga dicha enzima**. Esto es la enzima no evolucionó para procesar esos otros sustratos, simplemente los puede procesar por similitud química, conformacional, etc. Otra cosa muy distinta es una enzima **multi-sustrato**. La gran diferencia **es que estas enzimas evolucionaron para procesar varios sustratos** y esto encaja en la lógica metabólica del organismo.

Si las enzimas pueden entonces procesar sustratos más grandes o más chicos que el sustrato "natural" (o el que mayormente procesa en condiciones biológicas) según Koshland las enzimas no funcionarían como el modelo de llave-cerradura de Fischer, ya que deberían adaptar su estructura para acomodar a distintos sustratos (Fig 2.2).

Al igual que Fischer, el modelo de Koshland propone nuevamente **que la estructura nativa de la proteína era única**. Este concepto estaba fuertemente arraigado ya que Linus Pauling en 1936 había caracterizado al estado nativo de una proteína como la estructura que confería las propiedades funcionales. Cualquier estado que no fuera el nativo, por definición, se convertía en "desnaturalizado". Sin embargo, el estado nativo en el modelo de Koshland podía **sufrir**

**cambios conformacionales** para adaptarse a la presencia de un sustrato u otros ligandos. Como vemos en la Fig 2.2, **la presencia del sustrato induce un cambio conformacional**. Si nos ubicamos en la época cuando Koshland realizó su experimento veremos que fue en el mismo año que se obtuvo la primera estructura de una proteína (mioglobina de cachalote en 1958). De esta forma Koshland no contaba con métodos como difracción de rayos X para detectar los cambios que proponía. Por el contrario, Koshland utilizó ensayos bioquímicos. Detectó que en ausencia y en presencia de sustrato, la enzima en estudio mostraba una diferencia significativa en el número de tioles titulables (provenientes de cisteínas libres) evidenciando de esta forma los cambios conformacionales. Como el estado nativo era único y la presencia de sustrato **inducía el cambio conformacional**, el modelo de Koshland se denominó **modelo de ajuste-inducido**.

Hacia 1965, Monod y colaboradores ofrecieron un nuevo modelo basado en nuevas evidencias experimentales. En 1965 propusieron que el **estado nativo de una proteína no era único, sino que estaba formado por distintos conformeros en equilibrio** (Fig 2.3).



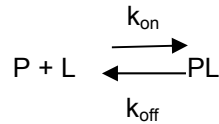
**Fig. 2.3.** El modelo de Monod propone la existencia de un pre-equilibrio en donde 2 o más conformeros (en la figura los conformeros P y P') coexisten en equilibrio previo al agregado de un ligando (en rojo). El rol del sustrato es simplemente seleccionar el conformero con mayor afinidad y desplazar el equilibrio favoreciendo la ocurrencia de ese conformero. El estado nativo que propone Monod es complejo como se ve en los múltiples pozos en el gráfico de energía libre.

Monod basó su hipótesis tanto en evidencias bioquímicas como en estructurales (concretamente la cristalización de la hemoglobina llevada a cabo por Perutz en 1963). Perutz había cristalizado a la hemoglobina en **dos conformaciones distintas**, la conformación desoxigenada o T (del inglés "tense" o tensa, debido a su alto número de contactos intermoleculares) y la forma oxigenada o R (del inglés "relaxed" o relajada por su bajo contenido de contactos intermoleculares comparadas con la forma T). Según el modelo de Monod, el estado nativo de las proteínas estaba formado por al menos dos conformeros T y R **en ausencia de ligando** (al igual que en la hemoglobina). De ahí que su modelo se denomine de **pre-equilibrio** ya que las distintas formas (conformeros) de la proteína los tenemos en forma **previa (pre-equilibrio)** al agregado de sustrato u otros ligandos. Al agregar sustrato a una enzima que se encuentra en solución, el rol del sustrato es **seleccionar** la forma de la proteína que muestra mayor afinidad, es por esto que esta hipótesis se conoce en la actualidad como modelo de **selección conformacional (conformational selection)**. Una vez que el sustrato se une a la forma con mayor afinidad, desplaza el equilibrio conformacional hacia esa

forma. Es muy importante destacar que las formas T y R pre-existen al agregado de ligandos y que el rol del ligando no es inducir un cambio conformacional como proponía el modelo de Koshland.

## Conceptos básicos de la unión de un ligando a una proteína

La unión de un ligando a una proteína se puede describir como un proceso bimolecular:

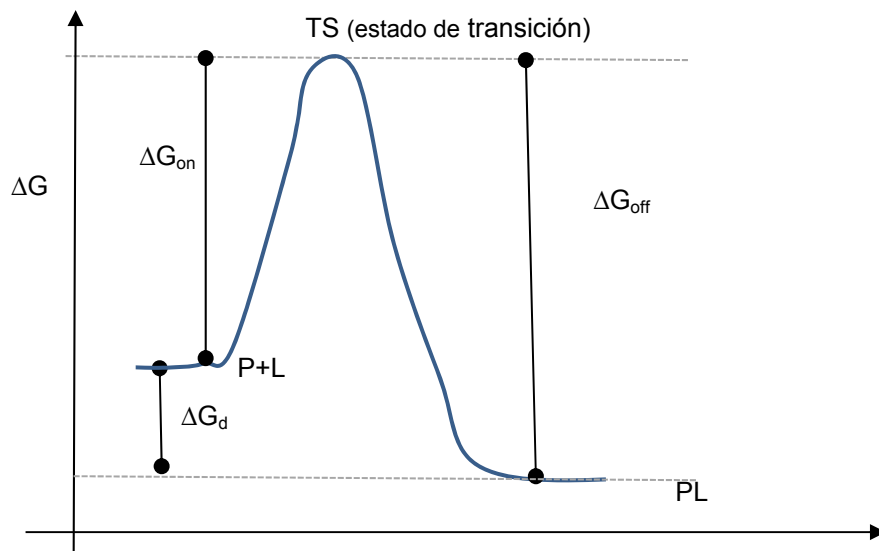


Lo que representa un paso elemental de reacción, sin la formación de intermediarios de reacción entre P, L y PL.  $k_{\text{on}}$  y  $k_{\text{off}}$  son las constantes cinéticas que caracterizan cada paso. La afinidad de P por L se puede describir por la constante de equilibrio  $K_d$  (de disociación) expresada como:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

Esta constante está relacionada con la variación de energía libre de formación del complejo PL ( $\Delta G_d$ ). Esta constante de equilibrio, a temperatura constante, depende fundamentalmente de **las interacciones de P y L con el solvente y de P y L entre sí para formar el complejo PL**. Por el contrario,  **$k_{\text{on}}$  y  $k_{\text{off}}$  dependen de la trayectoria que siga L en su unión o desunión de P**. De todas las trayectorias posibles, la de mínima energía caracterizará a la energía del estado de transición, como la máxima energía para esa trayectoria.

La relación entre estas constantes,  $K_d$ ,  $k_{\text{on}}$  y  $k_{\text{off}}$  es fácil de apreciar en un gráfico de  $\Delta G$  como el que presentamos en la figura 2.4.

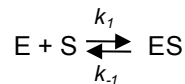


**Fig. 2.4.** Representación gráfica de la variación de energía libre cuando una proteína P une un ligando L. Se destacan las distintas energías libres involucradas en el proceso

En principio cualquiera de las tres energías libres (P, PL y de los estados de transición) pueden ser modificadas en forma independiente del resto. Sin embargo, esto es bastante difícil de realizar a nivel experimental, en particular si queremos diseñar determinados ligandos para una dada proteína. Según la fig 2.4 vemos que estabilizar o desestabilizar P y PL afectarán la constante de afinidad  $K_d$ , pero no afectará ni a  $k_{on}$  ni a  $k_{off}$ . Por el contrario, modificar la energía del estado de transición tanto para  $k_{on}$  como para  $k_{off}$  modificará la cinética de entrada y/o salida de L pero no modificará la constante de afinidad. A pesar de no afectar la afinidad,  $k_{on}$  y  $k_{off}$  definen **la cinética de entrada y salida de L de la proteína**, así como el **tiempo de residencia del sustrato o ligando en la proteína**. El tiempo de residencia de L en la proteína se calcula como:

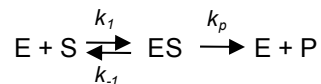
$$tr = \frac{1}{k_{off}}$$

Esta descripción general para P y L se cumple exactamente de la misma forma cuando estudiamos cinética de enzimas, según la ecuación:

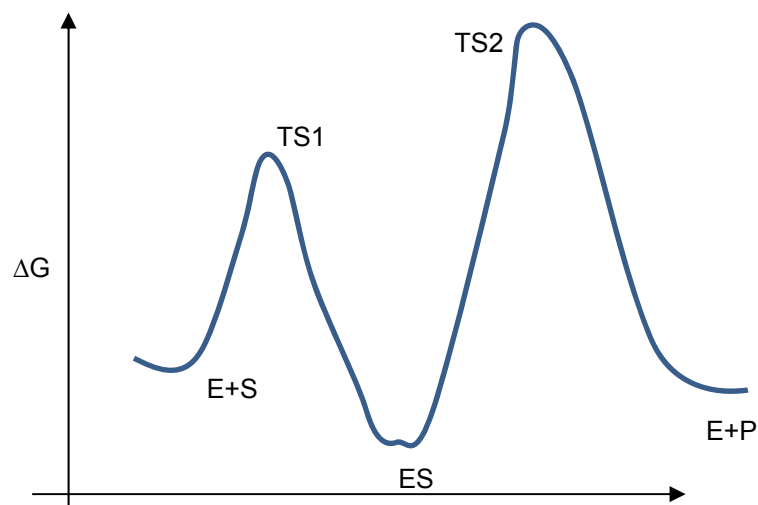


Donde  $k_1$  y  $k_{-1}$  serían  $k_{on}$  y  $k_{off}$ . Si bien por simplicidad modelamos la entrada/salida de L en solo 1 paso elemental, este podría tener varios pasos elementales haciendo más complejo el gráfico de la figura 2.4.

Recordemos que para la reacción catalizada por una enzima



El gráfico para la variación de energía libre en función de la coordenada de reacción posee dos estados de transición ya que la reacción está compuesta por dos pasos fundamentales



**Fig. 2.5.** Variación de la energía libre en el proceso bimolecular de reacción de una enzima según  $E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P$

## Consecuencias de los modelos estructura-función

Hasta este punto tenemos tres hipótesis para explicar la relación estructura-función en proteínas: el modelo o hipótesis de Fischer, de Koshland y finalmente el de Monod. Son modelos muy útiles que en ciencia llamamos modelos de “**grano-grueso**” ya que por lo que se desprende de los mismos lo único que sabemos es que los confórmers que unen al ligando pueden ser estructuralmente distintos (Koshland y Monod) o iguales (Fischer) sin mucho más detalle. Sin embargo, el hecho que existan distintos confórmers para unir el sustrato implicaría que existen **distintas constantes de afinidad y/o distintos tipos de cinéticas de unión del ligando**, lo cual tendría consecuencias importantes en cuanto a cómo funcionan las enzimas y cuál sería la relación estructura-función en las mismas.

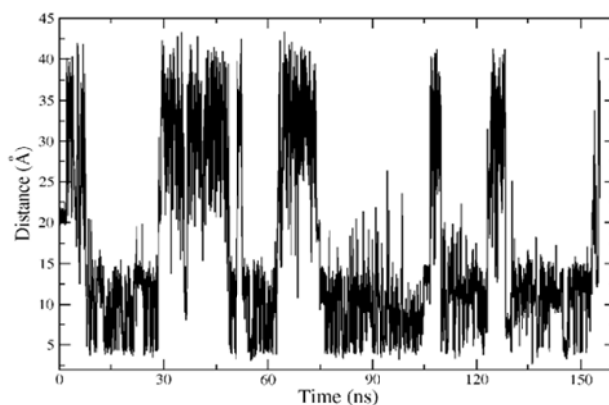
Según el modelo de Fischer existe una sola constante de afinidad por el ligando ya que el estado nativo de la proteína es único y el sitio activo o lugar de unión es perfectamente complementario a dicho ligando. Pensemos que, si una enzima evolucionara para cumplir con este modelo, optimizaría más y más su interacción con el sustrato para lograr una “complementariedad” óptima. Al hacer esto lograría estabilizar más y más el complejo ES (ver figura 2.5) y de esta forma podría aumentar cada vez más la energía de activación del paso lento de la reacción haciéndola aún más lenta. Esta interpretación del modelo de Fischer nos sirve para comprender que las **enzimas no evolucionaron para unir “exactamente” el sustrato, sino que evolucionaron para unir fuertemente al estado de transición que participa en la reacción química que catalizan**. Vimos que la estabilización del estado de transición del segundo paso es el que proporciona el poder catalítico a la enzima. Sabemos también que los inhibidores competitivos que se parecen al estado de transición tienen constantes de unión mucho más grandes (mayor afinidad) que los sustratos naturales de la enzima, de alguna forma mostrando que cuando una enzima alcanza un cierto nivel de afinidad sobre su sustrato deja entonces de ser un parámetro a optimizar. Por otra parte, el modelo de Fischer no podría explicar la **promiscuidad** que muestran la mayoría de las enzimas ni tampoco explicar las **enzimas multisustratos**, ya que sus sitios activos son altamente complementarios a un determinado sustrato.

Por otra parte, según el modelo de Koshland podríamos decir que el cambio conformacional que induce el ligando serviría para mejorar su constante de afinidad, observaríamos que una proteína que funcione según el modelo de Koshland podría unir a un ligando con al menos dos constantes de afinidad (una antes al cambio conformacional y la otra después del cambio conformacional). Además, este modelo permite unir distintos ligandos ya que la misma proteína podría sufrir cambios conformacionales más o menos pronunciados dependiendo del tipo de ligando que procese. Finalmente, el modelo de Monod también permite unir un ligando con al menos dos constantes de afinidad distintas correspondientes a los confórmers T y R y también permite que la proteína una distintos ligandos (podríamos suponer la existencia de un confórmero T y varios R: R', R'', R''' para unir distintos ligandos).

A partir de este punto trataremos de dilucidar dos cosas: por una parte, exploraremos la importancia de que **una proteína una a un determinado ligando con más de una constante de afinidad**. Y por otro lado comenzaremos a explorar en más detalle la relación estructura-función, ya que hasta ahora sólo sabemos que las proteínas pueden tener una o dos constantes de unión, pero no sabemos **estructuralmente el significado de dicha afirmación**.

## Análisis estructural de la unión de ligandos

El análisis estructural que veremos en adelante se aplica tanto a proteínas en general (por ej. la hemoglobina) como a enzimas. Mayormente usaremos la hemoglobina ya que ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista estructural y dinámico. Como sabemos, la hemoglobina une cuatro moléculas de oxígeno, una por cada subunidad (2 alfa y 2 beta globinas). Cada una de estas globinas contiene un grupo hemo, que a su vez contiene un átomo de hierro al que se une el oxígeno. Querríamos en esta sección comprender el tema central del capítulo, la relación entre la estructura y la función en una proteína. En la figura 2.6 mostramos un gráfico de la distancia entre una molécula de oxígeno y el hierro del grupo hemo

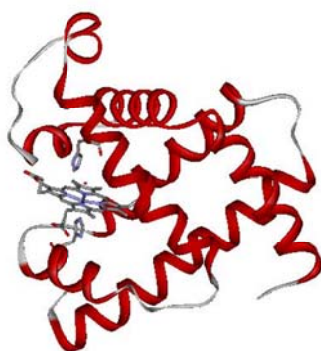


**Fig. 2.6.** Distancia entre una molécula de oxígeno y el hierro perteneciente al hemo extraída de una dinámica molecular. Se observa que en determinados momentos el oxígeno se encuentra a una distancia muy corta del hemo (entre 5 y 10 angstroms) distancia compatible con la existencia de interacciones débiles entre el hierro y el oxígeno (fuente Leonardo Boechi, UBA).

Lo que vemos en el gráfico es el resultado de una simulación computacional que se denomina **dinámica molecular**. En una dinámica molecular se entrega energía a una molécula (en este caso un tipo especial de hemoglobina que se denominan hemoglobinas truncadas, y al oxígeno). El sistema así formado se mueve para disipar esa energía entregada, haciendo de esta forma posible observar cómo se mueven los distintos átomos del sistema en estudio. Si prestamos atención en el gráfico, la distancia entre el oxígeno y el hierro del grupo hemo (representada en el eje y en angstroms) nos da una idea de cómo se mueve la molécula de oxígeno en torno a la hemoglobina. Por otra parte, en el eje x graficamos el tiempo (en nanosegundos). Se puede observar que el oxígeno por momentos está lejos del hemo y por otros momentos está a una distancia muy corta (**del orden de las distancias de**

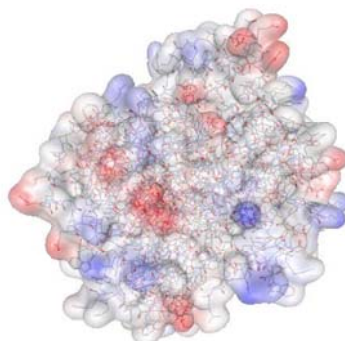
**interacciones débiles o sea podríamos decir interaccionando con el hierro**). Podríamos decir entonces que el oxígeno entra en la hemoglobina, permanece un tiempo interaccionando con el hemo y luego sale repitiendo el ciclo. Este tiempo de permanencia y las energías derivadas de dichas interacciones (no se muestran en el gráfico 2.6) ayudan a conceptualizar las constantes de afinidad ( $K_d$ ) y las constantes cinéticas ( $k_{on}$  y  $k_{off}$ ) mencionadas anteriormente.

Como explicaríamos este gráfico de la figura 2.6 en términos estructurales? Como entra el oxígeno en la hemoglobina? Cómo sale? Comencemos con la figura 2.7 que representa la estructura de la alfa globina, una de las cadenas que forma la hemoglobina. Como podemos observar en la figura, el hemo se puede ver fácilmente con lo cual el oxígeno no tendría problemas en unirse a él!



**Fig. 2.7.** Representación esquemática de la alfa globina de la hemoglobina humana. En rojo se destacan las alfa hélices. La molécula orgánica representada como *sticks* corresponde con al grupo hemo.

Si esta representación de la globina fuera acertada, nos podríamos preguntar sobre el rol del resto de la proteína. Solo se une el hemo? Por qué no simplemente tenemos “hemos” en la sangre, si en definitiva el oxígeno se une a él y no a la proteína? Para qué está el resto de la estructura terciaria? Estas preguntas se pueden contestar con una representación de la globina más realista. En la figura 2.8 representamos la misma molécula, pero ahora utilizando una representación que incluye la superficie de Van de Waals de todos los átomos de la molécula, con lo cual vemos que la proteína contiene una **superficie**.



**Fig. 2.8.** La misma molécula de la figura 2.7 pero ahora con el agregado de los volúmenes de Van de Waals para cada átomo. Se observa que la molécula posee una superficie dada por estos volúmenes de Van de Waals. Los colores corresponden a las cargas parciales de los distintos átomos (azul para los positivos y rojo para los negativos)

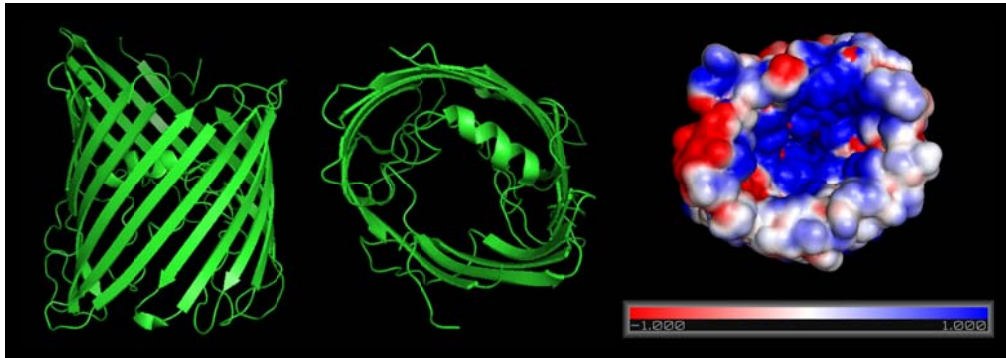


Utilizando esta representación de la globina se complica ahora saber cómo hace el oxígeno para entrar en la molécula y unirse al hemo. De hecho, en las primeras cristalografías de la década del 60 llevadas a cabo por Max Perutz utilizando la hemoglobina, no se pudo dilucidar como ocurría la entrada y salida del oxígeno de la molécula. La respuesta a esta pregunta necesitó al menos una década más para contestarlo.

La figura 2.8 no sólo nos da una visión más realista de lo que es una proteína, sino que también nos obliga a pensar que los ligandos en general (sustratos de una enzima en particular) entran por algún lado (canal? túnel? conducto?) a la proteína y que por algún otro lado salen (quizás utilizando el mismo camino). Esta visión nos  **fuerza a re-pensar lo que sabemos sobre la estructura de las proteínas.**

## **Estructuras funcionales en proteínas**

Si bien en todos los cursos de bioquímica básica se enseña estructura de proteínas, necesitamos obtener una idea más realista de la estructura de una proteína. Como vimos en la figura 2.7 la simple representación de la estructura terciaria de una proteína por sí sola no nos ayuda a comprender su relación con la función. Sin embargo, como muestra la figura 2.8, las proteínas tienen una determinada **superficie**. Esta superficie obviamente está en contacto con su entorno inmediato, y de ser una proteína soluble por ejemplo citoplasmática, acertaríamos en decir que mayormente los aminoácidos en la superficie serían hidrofílicos lo cual no impide que encontremos aminoácidos no-polares en contacto con el agua. Esta relación entre aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos en la superficie de una proteína resulta de la **estabilización relativa que tenga cada proteína**. Sin embargo, el tipo y número de aminoácidos superficiales no está solamente determinado por cuestiones energéticas durante el plegado de la proteína. En la superficie de la proteína es usual encontrar **aminoácidos que funcionan como señales para distintas interacciones que la proteína pueda mantener**, por ejemplo, la interacción con un ligando, o con otra proteína, o con una enzima que introducirá una modificación postraducciona, etc. **Así, la superficie de una proteína contiene información funcional**. De hecho, varios métodos utilizan dicha información superficial para anotar funcionalmente a una proteína. En la figura 2.9 representamos la estructura de una porina, una proteína transmembrana que transporta ligandos. En la figura 2.9 (panel izquierdo y medio) representamos la estructura terciaria formada por un barril de hélices beta que forman un canal. En la figura 2.9 (panel derecho) estimamos la superficie de la proteína la cual se coloreo utilizando la carga de los aminoácidos. Así, vemos que la superficie de entrada del canal es azul (carga positiva, ver la escala debajo de la estructura) lo que se corresponde con el hecho que este tipo de proteínas transporta sustancias cargadas negativamente.



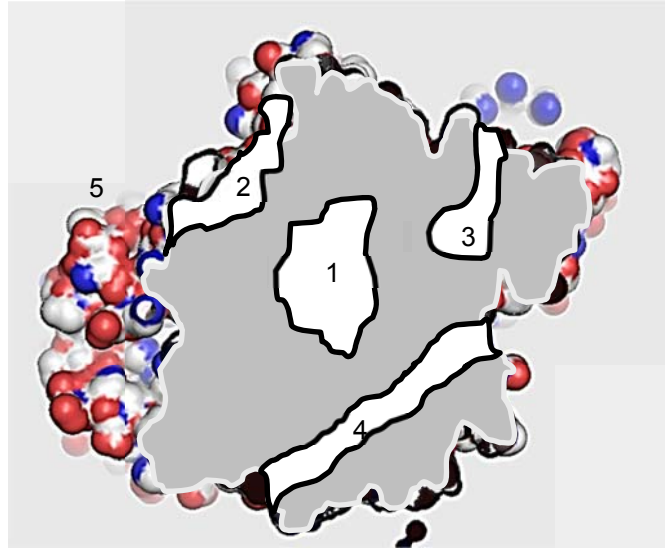
**Fig. 2.9.** Distintas representaciones de la proteína porina proveniente del organismo *Comamonas acidovorans*. En el panel izquierdo se muestra la parte lateral de la molécula mientras que en el panel central se muestra una visión desde el eje mayor. La porina es una proteína transmembrana que posee un gran canal para el transporte de distintas sustancias. En el panel en el extremo derecho representamos la misma visión del panel central pero ahora representando la superficie de la molécula. Se observa claramente que la superficie del canal de entrada es positiva.

Así es pues que la superficie de una proteína es la primera componente con la que un ligando se encuentra con una proteína. Este primer reconocimiento puede facilitar la interacción e internalización de un ligando en la proteína correspondiente y como vimos anteriormente **podría influir en las constantes  $k_{on}$  y  $k_{off}$** . Si mutáramos alguno de estos aminoácidos superficiales, la proteína podría perder su capacidad de reconocer a un ligando, o ser incapaz de interactuar con otra proteína, una membrana, etc y de esta forma perder su función biológica. De esta forma, las superficies de las proteínas se pueden considerar como un ejemplo de una “estructura funcional”. Como veremos inmediatamente, la información funcional sobre la superficie de la proteína **se encuentra en forma dispersa** en otras “estructuras funcionales” o regiones que por su importancia funcional se denominan “hotspots” o puntos o regiones “calientes” de una proteína. Lo de “calientes” no está relacionada para nada con la energética sino con el hecho que al mutar aminoácidos dentro de esos hotspots se pierde o altera la función biológica. Debido a su importancia biológica estos hotspots en general están muy conservados evolutivamente.

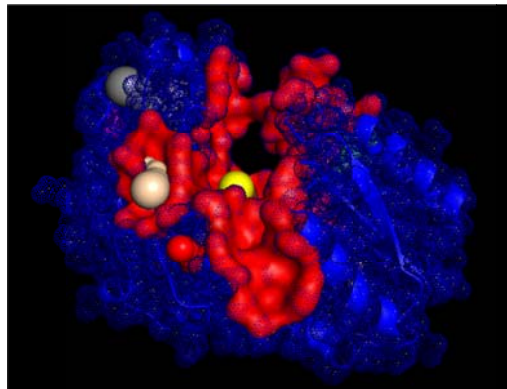
Dentro de la superficie podemos encontrar un segundo tipo de “estructura funcional” que se denominan **pockets** (bolsillos). **Los pockets son como hendiduras que posee la superficie de una proteína y en general están asociadas con la entrada del ligando a la proteína** (ver figura 2.10 y 2.11). En los *pockets* es frecuente encontrar aminoácidos conservados (*hot-spots*) que sirven **para reconocer y favorecer la internalización de los ligandos en la proteína**. Otro tipo de estructuras funcionales son los **túneles y los canales**. **Los primeros son segmentos que conectan la superficie con cavidades y los últimos conectan dos regiones superficiales** (ver figura 2.10 y 2.12). En la figura 2.11 podemos ver en rojo una gran *pocket* (parte diferencial de la superficie de la proteína que aparece representada como una maya en azul) en donde emergen 2 túneles. Estos túneles conectan la superficie con la cavidad que posiblemente contiene al sitio activo. Los túneles pueden unir una o más cavidades. En enzimas que contienen más de un sitio activo o varias cavidades donde se alojan por ejemplo el sustrato y cofactores, los túneles sirven para que los sustratos o productos intermedarios migren entre las distintas cavidades y/o alcancen la superficie (figura 2.13). En general los túneles contienen determinados aminoácidos que abren o cierran los túneles regulando de esta

forma la entrada o salida de productos y sustratos. Estos aminoácidos que regulan la migración de ligandos desde la superficie hasta las cavidades se denominan **gatekeepers** (figura 2.13).

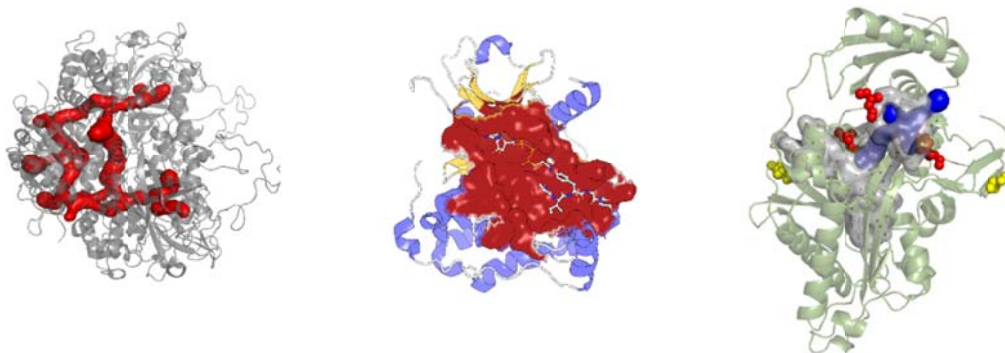
Finalmente, las **cavidades son huecos en el interior de la proteína que se pueden conectar con la superficie por túneles o que pueden no tener ninguna conexión con la superficie de la proteína**. Estas últimas cavidades se llaman **cavidades void**.



**Fig. 2.10.** Corte esquemático de una proteína. Se observan los cinco tipos de estructuras funcionales a saber: 1 cavidad, 2 *pocket*, 3 túnel, 4 canal y 5 superficie de la proteína.



**Fig. 2.11.** En esta figura observamos la superficie de la proteína representada como una maya en color azul transparente. La parte de la superficie que aparece en color rojo corresponde con un *pocket*. Las esferas rosa y amarilla corresponden a la entrada de túneles que conducen los ligandos que interaccionan con el *pocket* hacia la cavidad principal de la proteína.



**Fig. 2.12.** Ejemplo de estructuras funcionales en distintas proteínas. Panel izquierdo red de túneles (en rojo), panel central *pocket* principal (rojo) con sustrato unido (en representación *stick*), panel derecho cavidad (en celeste claro) y túneles asociados a la misma.

Las cavidades *void* son cavidades que en general contienen moléculas de agua oclusas. Estas moléculas quedan atrapadas durante el plegamiento de la proteína y/o podrían migrar desde túneles o *pockets* cercanos.

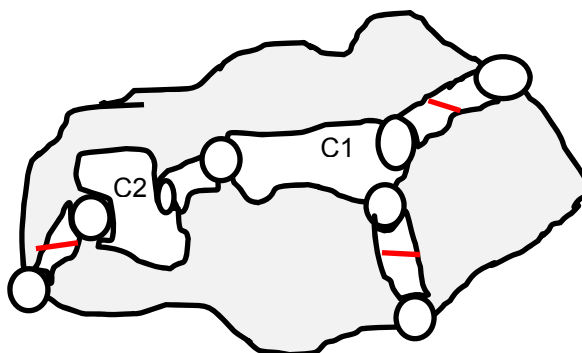


Fig. 2.11. Representación esquemática de una proteína que en su interior posee dos cavidades (C1 y C2) conectadas por túneles entre sí y con la superficie. Las barras rojas simbolizan residuos gatekeepers.

Se sabe que la cantidad de moléculas de agua oclusas podría condicionar los movimientos de la proteína (ver próxima sección).

En resumen, hasta ahora tenemos **que la estructura de las proteínas contiene lo que podemos llamar “estructuras funcionales” a saber la superficie, *pockets*, túneles y cavidades** que de alguna forma participan en el **tránsito del ligando hasta la cavidad donde se unirá** (para ser transportado en el caso de una proteína transportadora como la hemoglobina con el oxígeno) o se procesará químicamente (en el caso de una enzima). En el caso de las enzimas, tenemos que tener presente que tanto la **entrada del sustrato** (como la de posibles cofactores) es tan importante como la **salida de los productos**. Este pasaje desde la superficie hasta el sitio activo describe la trayectoria del ligando y como vimos antes define la energía del estado de transición de las constantes  $k_{on}$  y  $k_{off}$ .

Debe quedar claro entonces que cualquier alteración (mutación, por ejemplo) de algún aminoácido en alguna de estas estructuras funcionales podría modificar la entrada o salida de los ligandos con los que interacciona una proteína. En general en bioquímica prestamos demasiada atención al sitio activo (ver más adelante). **Pero el sitio activo es una mínima porción de una enzima comparada con el resto de las estructuras funcionales que posee!**

## El sitio activo

El sitio activo de una enzima es el lugar físico donde se lleva a cabo **la transformación química**. En general el sitio activo de la mayoría de las enzimas **se encuentra en el interior de las mismas**. Esto está relacionado con el hecho que el agua podría competir con los reactivos de varias reacciones químicas catalizadas por las enzimas de ahí que se haya favorecido el proceso catalítico lejos del solvente acuoso. El **sitio activo en general está ubicado en una cavidad** a la que como vimos se accede por túneles, canales o *pockets*. El **tamaño de la cavidad depende del tamaño del sustrato**, pero en general dicha cavidad es

pequeña considerando el volumen total de la proteína. Dentro de esta cavidad vamos a encontrar aminoácidos que **sirven para llevar a cabo la reacción química** (aminoácidos catalíticos) y por otro lado aminoácidos que **participan en la unión del sustrato** (aminoácidos de unión o de *binding*). Los aminoácidos catalíticos son aquellos que pueden llevar a cabo reacciones químicas, por ejemplo participando de reacciones redox o interviniendo en procesos catalizados por ácidos o bases. En general estos aminoácidos interactúan con otros aminoácidos de la cavidad para “activarse”, por ejemplo aquellos aminoácidos ácidos pueden ser más ácidos o más básicos al interactuar con determinados aminoácidos de la cavidad. Es común, por citar un ejemplo, encontrar díadas de interacción entre aminoácidos. Una de las díadas más comunes es encontrar pares de aminoácidos dicarboxílicos interactuando uno con el otro. Estos pares de aminoácidos dicarboxílicos al estar muy próximos aumentan considerablemente sus pKa pudiendo ser protonados (por el sustrato y por el agua por ejemplo como ocurre en las aspártico proteasas). De ahí que las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos catalíticos no son corrientes, en el sentido que un aspártico que forme parte del sitio activo en una enzima no tendrá la misma reactividad, pK, etc que otro aspártico ubicado fuera de la cavidad del sitio activo.

Los aminoácidos de la cavidad no sólo sirven para activar aminoácidos catalíticos, sino también que participan de la unión del sustrato formando numerosas interacciones débiles. Como vimos anteriormente, el número de interacciones débiles define la energía libre del complejo ES y así la afinidad de la enzima por su sustrato. Adicionalmente, **existen aminoácidos que regulan el tránsito del sustrato en la cavidad favoreciendo la especificidad por un determinado sustrato contra otro**. Por ejemplo, una determinada familia de almejas contiene un tipo de hemoglobina que no une oxígeno sino SH<sub>2</sub>. La estructura de la hemoglobina humana y de la hemoglobina de la almeja son muy similares, pero los mayores cambios se dan en la cavidad que contiene el hemo para desfavorecer la unión de oxígeno y favorecer la unión del SH<sub>2</sub> en la hemoglobina de las almejas.

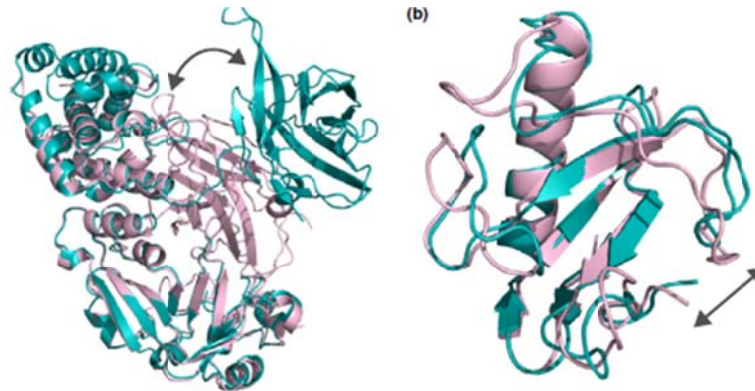
De esta forma, el “sitio activo” está constituido por un conjunto de aminoácidos mayormente ubicados en una cavidad de la enzima. **Si bien los aminoácidos catalíticos son frecuentemente pocos (dos o tres aminoácidos) el conjunto de estos aminoácidos más los de la cavidad son los que definen la especificidad y propiedades catalíticas de la enzima.**

## **Importancia de los cambios conformacionales y la función de las proteínas**

Cuando hablamos de la relación estructura-función, en realidad para ser estrictos deberíamos hablar de la relación entre la **dinámica-función** en una proteína. Ya vimos que una proteína “rígida” como la que postula el modelo de Fischer, no podría funcionar. Vimos también que el modelo de Koshland y el modelo de Monod plantean cambios estructurales para

unir en forma más adecuada al sustrato. Para poner de manifiesto la importancia de la dinámica (o cambios conformacionales que debe sufrir una proteína en orden de ser funcional) pongamos como ejemplo el caso de una proteína perteneciente a un organismo hipertemófilo. Estos organismos en general viven a más de 80 grados centígrados y han desarrollado adaptaciones para que las estructuras de sus proteínas sean estables a esas temperaturas y no se desnaturalicen. Una de las adaptaciones más comunes es el incremento de interacciones entre los residuos, particularmente las interacciones de carácter coulombico, o sea carga-carga. De esta forma estas proteínas tienen gran cantidad de interacciones para compensar la gran energía cinética a tales temperaturas. Que pasaría si le midiéramos la actividad a una enzima de un organismo hipertermófilo a 30-40 °C? Lo que se observa es que la enzima a esa temperatura no funciona. Siguiendo con la clásica definición de Linus Pauling de 1937 de lo que es el estado desnaturalizado de una proteína (el estado nativo es la estructura funcional de una proteína y por contraposición los estados desnaturalizados serían cualquier otra estructura distinta a la del estado nativo) diríamos que, **si la enzima no funciona esta desnaturalizada, o sea cambió su estructura**. Pero en realidad, la estructura de la enzima a 30 °C es exactamente la misma que a más de 80 °C ya que si es estable a altas temperaturas probablemente lo sea a bajas! Entonces porque no funciona la enzima a bajas temperaturas? Simplemente es debido a que la proteína no se mueve. Es tal la cantidad de interacciones débiles que contiene para compensar la alta energía térmica a más de 80 °C, que la energía a 30 °C no le alcanza para que la enzima pueda moverse. **Sin embargo, la estructura es la misma!** Con este simple ejemplo comprendemos la importancia de los cambios conformacionales para el mantenimiento de la función biológica. Si bien mayormente hablamos de la relación estructura-función, lo correcto sería hablar de **dinámica-función** o al menos de una terna **estructura-dinámica-función**.

Actualmente el estado nativo de una proteína se define como un **conjunto de confórmers**, concretamente estructuras alternativas de la misma proteína que se pueden obtener por rotación de enlaces simples. Las estructuras que describen el modelo de Koshland y el modelo de Monod son justamente confórmers. En que pueden diferir estructuralmente los confórmers? En general en bastantes cosas, por ejemplo, un dominio puede rotar en torno a otro dominio (ver figura 2.12 panel izquierdo), o puede haber una reacomodación de la estructura terciaria (figura 2.12 panel derecho), o puede moverse un loop o incluso puede existir una pérdida parcial de la estructura de una región de la proteína. Evidentemente todos estos cambios conllevan a cambios conformacionales en las estructuras funcionales que vimos más arriba, la superficie de la proteína, *pockets*, túneles y cavidades. De esta forma, los confórmers que define Monod como T y R (inactivo y activo respectivamente) quizás puedan ser interpretados en términos superficiales: el confórmero T no muestra en su superficie los aminoácidos necesarios para que el ligando reconozca a la proteína y de ahí que no pueda internalizarse. O quizás la explicación este a nivel de los túneles, el confórmero T tiene un túnel cerrado que impide el pasaje del sustrato al sitio activo. Evidentemente estas explicaciones pueden ser muy variadas e involucrar una serie de estructuras funcionales y cambios conformacionales.



**Fig. 2.11.** Pares de confórmers para dos proteínas (panel derecho e izquierdo). Los confórmers se colorearon en rosa y celeste. Las flechas indican los movimientos relativos entre cada par de confórmers, por ej. en el panel izquierdo la flecha indica el movimiento relativo de todo un dominio, mientras que en el panel derecho existe un desplazamiento de todo un confórmer con respecto al otro.

Pensemos ahora porque son importantes los cambios conformacionales. Conocemos sus bases estructurales, mencionamos los cambios en loops, dominios, superficies, tamaños de cavidades etc. Qué relación tiene esto con la función de una proteína en general y en particular con una enzima? Evidentemente estos cambios conformacionales están adaptados para ocurrir en determinadas condiciones. Tomemos como ejemplo una proteína transportadora de oxígeno que funcione como el modelo de Fischer. Quizás esta proteína se adaptó tan bien a la unión complementaria del oxígeno, que lo estabiliza enormemente. Pero si la proteína es transportadora de oxígeno, lo deseable sería que en algún momento esta proteína tomara el oxígeno y en otro (dependiendo de la fisiología, metabolismo u otras condiciones) lo devolviera para ser utilizado por los tejidos. Esto se ve claramente en el gráfico de la figura 2.6 donde vemos que el oxígeno entra y sale de la hemoglobina a determinados tiempos. Quizás la estabilización es tan fuerte en nuestro ejemplo, que la proteína que sigue a rajatablas el modelo de Fischer no devolvería tan fácilmente el oxígeno, de ahí que no cumpliría su función de transportar el mismo de una región a otra. Por el contrario, el tener varios confórmers con distintas afinidades por un ligando o sustrato, permite que este equilibrio conformacional se desplace favoreciendo uno u otro confórmer dependiendo de la necesidad funcional (otra vez, fisiológica, metabólica, etc) que tenga el organismo. Obviamente, para un dado organismo y un determinado ambiente celular, una determinada enzima posee un determinado equilibrio entre sus confórmers (mayormente se observa que el confórmer que predomina en ausencia de sustrato es el confórmer sin actividad o con baja afinidad). Es importante destacar que este equilibrio conformacional y su adaptación a los requerimientos funcionales del organismo, se debe al proceso evolutivo que ha quedado codificado en la estructura primaria de la proteína. Mínimos cambios secuenciales (mutaciones) puede desplazar este equilibrio produciendo nuevas adaptaciones funcionales o incluso enfermedades. En este último caso, existen enzimas que al sufrir determinadas mutaciones (mutaciones que por su efecto se llaman “activantes”) permanecen mayormente en su conformación activa, de ahí que funcionen en forma desregulada del resto del metabolismo. Estas mutaciones estabilizan preferencialmente al confórmer activo sobre

el inactivo, de ahí que cambia la constante de equilibrio conformacional favoreciendo enormemente al conformero activo. Varias enzimas kinasas (por ejemplo, el EGFR de *epidermal growth factor receptor*) con este tipo de mutaciones se encuentra frecuentemente asociadas con enfermedades como el cáncer pulmón, páncreas, riñon, etc.

## **Bibliografía**

Cornish-Bowden A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Londres: Wiley-Blackwell.

Dixon, M., Webb, E.C. (1980) *Enzymes* New York: Academic Press.

James, L. C., Tawfik, D. S. (2003) *Conformational diversity and protein evolution- a 60-year-old hypothesis revisited*. *Tibs*. Vol28, 7

Gutteridge, A, Thornton, J. (2005). *Understanding nature's catalytic toolkit*. *Tibs*. Vol20, 11.

Gora, A, Brezovsky, J, Damborsky, J. (2013). *Gates of enzymes*. *Chemical reviews*. Vol113.



# CAPÍTULO 3

## Fundamentos de Cinética Enzimática

*Aníbal R. Lodeiro*

*El ser es; el no-ser no es*

PARMÉNIDES. SOBRE LA NATURALEZA. (SIGLO V A.C.)

Uno de los pilares del paradigma de la Biología actual sostiene que **es posible describir todo lo que ocurre en los seres vivos usando solamente principios fisicoquímicos**. Sí, también el amor, la alegría, el entusiasmo y el gol del Diego a los ingleses. Lo que pasa es que describir los detalles fisicoquímicos de esos fenómenos sería un poco largo, pero eso no significa que no se pueda. Hace no tanto tiempo –150 años, más o menos– los biólogos pensaban que **no se podía**. Que existía una *fuera vital* propia de los seres vivos, ausente en la materia inanimada, que era responsable por los fenómenos biológicos. Esa hipótesis fue descartada por varias evidencias, entre las cuales la más importante fue la constatación de que ciertos procesos biológicos que se consideraba que dependían de la fuerza vital, como por ejemplo la fermentación, podían ser observados **fuera de las células**. Esto condujo al descubrimiento y posterior aislamiento de los *fermentos* responsables de llevar a cabo estos procesos, los cuales luego se reconoció que eran proteínas a las que se llamó enzimas<sup>1</sup>.

El estudio de las enzimas prácticamente inauguró la ciencia que hoy conocemos como Bioquímica: la química de los seres vivos. Pero una cosa es pensar la química de los seres vivos como una caracterización de los compuestos orgánicos llevados por los seres vivos y las reacciones entre dichos compuestos, y otra muy distinta es pensar a los seres vivos como una organización compleja de reacciones químicas muy bien articuladas y reguladas. La Bioquímica actual, como así también la Biología Molecular y la más reciente disciplina llamada Biología de Sistemas asumen esta posición y tratan de entender cómo un conjunto de reacciones químicas puede reproducirse a sí misma usando componentes simples del entorno, y hasta tener sentimientos, memoria y razonamiento, e incluso terminar preguntándose cómo es posible que un conjunto de reacciones químicas pueda reproducirse, etc...

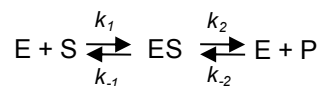
---

<sup>1</sup> Uno de los primeros químicos que estudió las enzimas fue Richard Willstätter. El sostenía que no podían ser proteínas porque en sus procedimientos para purificarlas podía observar actividad enzimática en muestras donde no detectaba ni trazas de proteínas. Como era un químico muy prestigioso –premio Nobel en 1915– la comunidad científica de su época acompañó esta creencia por casi 20 años. El problema era que en esa época los métodos de cuantificación de proteínas eran muy poco sensibles, mucho menos que los que se usaban para determinar la actividad. Deberían haberle hecho caso a Konstantin Tsiolkovski, autor de la *Filosofía Cósmica*, quien para esa misma época acuñó la frase “*la ausencia de evidencia no es evidencia de ausencia*”.

Las herramientas experimentales que se desarrollaron para entender estas cuestiones abarcan muchos campos del conocimiento, incluyendo la Biología, la Física, la Química, la Matemática y la Informática. Estas herramientas dieron origen a la Biotecnología y son tan poderosas, que si no las usamos criteriosamente podemos provocar un desastre de dimensiones planetarias. Por lo tanto, es imprescindible la comprensión de los fenómenos biológicos desde el punto de vista molecular, y en ese sentido, la cinética enzimática juega un rol fundamental. A continuación iniciaremos la exploración de este campo del conocimiento.

## El Complejo Enzima-Sustrato

Muy poco tiempo después de que se conocieron las enzimas, muchos químicos comenzaron a preguntarse cómo sería su interacción con los reactivos. En una serie de estudios de la reacción de hidrólisis de la sacarosa para dar glucosa y fructosa, catalizada por una enzima a la que en esa época llamaron *invertasa* (hoy también conocida como  $\beta$ -*fructofuranosidasa*), ciertos autores encontraron que la velocidad de reacción, además de depender linealmente de la concentración de invertasa, también dependía de la concentración de sacarosa. En cambio, otros autores sostenían que la velocidad de reacción era independiente de la concentración de sacarosa. Además, se había observado que la estabilidad térmica de la invertasa cambiaba en presencia de sacarosa, lo cual llevó a sospechar que había una asociación física entre la invertasa y la sacarosa. Estas observaciones condujeron a A.J. Brown a plantear en 1902 la idea de que se formaría un complejo entre la invertasa y la sacarosa, de tal manera que a bajas concentraciones de sacarosa el complejo se formaría rápidamente, rompiéndose luego para dar lugar a la aparición de los productos glucosa y fructosa, pero que a altas concentraciones de sacarosa la existencia del complejo pondría un límite a la velocidad de reacción alcanzable con el aumento la concentración de sacarosa. Extendiendo la idea a cualquier enzima (E) y sustrato (S) que se transforma en producto (P), la formación y descomposición del complejo enzima-sustrato puede esquematizarse como sigue:



donde las  $k_i$  representan las constantes cinéticas de velocidad para las reacciones 1 y 2, con signo positivo en dirección a la formación de producto y con signo negativo en dirección a la formación de sustrato. Como puede verse, si la concentración de E es constante, el aumento en la concentración de S puede hacer aumentar la velocidad de formación de P siempre que dicha concentración de S no sea tan alta como para que toda la E se encuentre formando el complejo ES. Llegado ese punto, ulteriores aumentos de la concentración de S no podrán provocar aumentos en la velocidad de formación de P ya que no habrá más E libre para formar más complejo ES. Estas ideas fueron recogidas por L. Michaelis y M. Menten, quienes en 1913

llevaron a cabo una serie de experimentos que les permitió desarrollar la primera expresión matemática de la velocidad de reacciones catalizadas por enzimas.

## La Aproximación del Equilibrio Rápido

Hace unos años, los lidios y los medos se estaban matando en una batalla campal a pleno sol en lo que hoy es Turquía. Ya hacía seis años que se venían dando porque los medos querían avanzar sobre el territorio de los lidios y parece que aquel día la batalla era feroz. De repente, el Sol se puso negro, el día se hizo noche y solo se veía un tenue resplandor. Presas del pánico, los ejércitos dejaron de pelear y pronto se selló la paz entre ambas naciones. Gracias a los relatos de la época y los cálculos astronómicos, hoy sabemos que lo que sucedió aquel día fue un eclipse total de Sol, que el día en cuestión fue el 28 de Mayo del año 585 a.C. y que el suceso tuvo lugar a las cuatro y cuarto de la tarde, extendiéndose durante 6 minutos y cinco segundos. Impresionante. Casi como viajar en el tiempo (aunque no habría sido lindo estar allí con una lanza en la mano).

Este grado de precisión en la caracterización de un suceso puntual ocurrido hace 2.600 años es posible gracias a la existencia de leyes astronómicas que permiten predecir la posición exacta de un cuerpo celeste de nuestro Sistema Solar en cualquier momento del pasado o del futuro. En Biología, en cambio, **no existen leyes de este tipo**. La Biología es una ciencia experimental y empírica en la cual el conocimiento se basa en la realización e interpretación de experimentos, que no son más que preguntas que le hacemos a la Naturaleza. Si las preguntas están bien hechas, ella tiene la amabilidad de responderlas, permitiéndonos empujar un cachito más la frontera de nuestra ignorancia. Ello no quita que en un momento dado una pregunta tenga una respuesta inesperada, que nos obligue a replantear y reconsiderar nuestro conocimiento, siendo precisamente en esos momentos cuando se producen los avances más significativos y a veces, hasta revolucionarios. Como sea, tenemos que asumir la conducta de que “la Naturaleza siempre tiene razón” y jamás intentar forzar la interpretación de un fenómeno para que encaje en nuestras creencias y preconcepciones. Esa conducta es la que mantuvieron L. Michaelis y M. Menten en 1913 y por ello debe tenerse mucho cuidado al leer lo que sigue, evitando creer que impusieron condiciones a la interpretación de los hechos. Simplemente, él y ella buscaron el camino más simple para desarrollar un modelo que permitiera el estudio de la cinética enzimática pero siempre **ajustándose estrictamente a interpretar lo que los resultados experimentales decían**.

La evidencia clave que recogieron de sus cuidadosos experimentos con la invertasa era que, a bajas concentraciones de sacarosa y controlando el pH y la temperatura de la mezcla de reacción, la velocidad de producción de glucosa y fructosa (productos) era directamente proporcional a la concentración inicial de sacarosa. Además, si bajo estas condiciones medían la aparición de productos a lo largo del tiempo, observaban que a tiempos cortos la relación era lineal: si al tiempo  $t = x$  la concentración de productos era  $y$ , al tiempo  $t = 2x$  la concentración

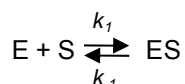
de productos era 2y, al tiempo  $t = 3x$  la concentración de productos era 3y, etc. (Fig. 3.1). Sin embargo, sabían que si dejaban transcurrir la reacción hasta un tiempo lo suficientemente largo, al cual podríamos llamar  $t_{\infty}$ , en ese momento la velocidad de reacción sería cero ya que se habría alcanzado el equilibrio, y en todo el transcurso entre el inicio y la llegada al equilibrio la velocidad de reacción iría **decreciendo**. ¿Por qué, entonces, la velocidad de reacción al **inicio** de los experimentos era constante? Ellos razonaron que, si se forma el complejo ES y éste es el intermediario que da origen a los productos, la velocidad de la reacción estaría determinada por la concentración de ES:

$$v = k_p [ES] \quad (3.1)$$

donde  $k_p$  representa una constante cinética de la velocidad de formación de productos. Ahora bien, en cualquier mezcla de reacción la concentración de sustrato es mucho mayor que la de enzima:

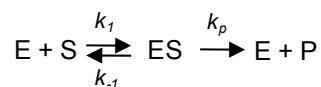
$$[S] \gg [E] \quad (3.2)$$

Esta suposición es válida ya que la enzima se encuentra en concentraciones “catalíticas” y no se destruye en el curso de la reacción (teóricamente, una sola molécula de enzima bastaría para catalizar muchos ciclos de transformación de sustrato en producto, ya que se recicla cada vez). Siendo así, y suponiendo que el paso limitante es la velocidad con la que ES se descompone en E y P, el equilibrio



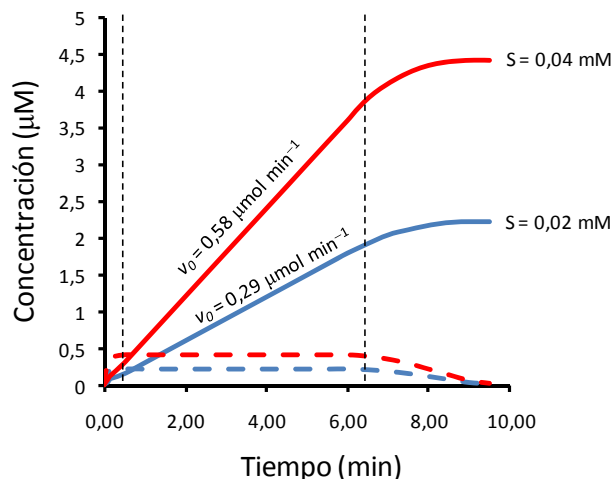
se debería establecer muy rápidamente. Con estos elementos, podría explicarse por qué durante el **inicio** de la reacción la velocidad de aparición de productos es constante.

Durante ese tiempo inicial la concentración de productos [P] es cercana a cero, con lo cual la reacción de formación de sustrato a partir de productos puede considerarse insignificante. Ello reduce la reacción total a lo siguiente:



donde la constante  $k_{-2}$  ha desaparecido y la constante  $k_2$  se ha transformado en la  $k_p$ . Como estamos al inicio de la reacción ( $t \rightarrow 0$ ) nos vamos a referir a esta velocidad de reacción como velocidad inicial,  $v_0$  y por lo tanto, la ecuación de la velocidad (3.1) quedará expresada como:

$$v_0 = k_p [ES] \quad (3.3)$$



**Fig. 3.1.** Representación esquemática de la producción de P (líneas llenas) y la formación de complejo ES (líneas discontinuas). Entre las líneas de puntos la tasa de producción de P es constante debido a que se mantiene constante la [ES]. Las velocidades iniciales ( $v_0$ ) se calcularon como las pendientes en el tramo lineal con las concentraciones de sustrato 0,04 mM (rojo) o 0,02 mM (azul) considerando una  $K_M = 1$  mM y una  $V_{max} = 15$   $\mu\text{moles min}^{-1}$ .

Es muy importante notar que esta situación representa el **inicio** de la reacción y que si se ha despreciado  $k_{-2}$  es solamente porque [P] en este momento es casi cero; **no importa cuál es el valor de  $k_{-2}$ .**

Ahora podemos explicarnos por qué la  $v_0$  es constante. Para que  $v_0$  sea constante tiene que cumplirse que [ES] también lo sea. En efecto, esto parece ser una condición necesaria y suficiente, ya que mientras no varíen el pH y la temperatura durante el ensayo,  $k_p$  se mantendrá constante.

Uniendo la condición de estado inicial de la reacción con la idea de que la enzima y el sustrato se equilibran rápidamente podemos llegar a darnos cuenta de que a medida que S se va consumiendo la concentración de complejo ES se va a mantener casi constante durante los primeros tiempos luego del inicio de la reacción. Sin embargo, las magnitudes involucradas en la ecuación planteada arriba ( $k_p$ , [ES]) son muy difíciles de medir y por lo tanto, sería necesario poder expresar  $v_0$  en términos de otros valores.

Una primera cuestión es tratar de expresar [ES] en términos de la concentración de sustrato inicial [S], que nosotros conocemos porque es lo que agregamos en la mezcla de reacción<sup>2</sup>, y de la concentración total de enzima,  $[E_T]$ , que podríamos llegar a medir, aunque no sepamos cuánta de ella está libre (E) y cuánta complejada con sustrato (ES). Para eso, podemos partir de la idea de que  $[E_T] = [E] + [ES]$  y dividir la ecuación 3.3 por estos valores:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES]} \quad (3.4)$$

<sup>2</sup> La concentración total de sustrato  $[S_T]$  es en realidad la suma de la concentración de sustrato libre [S] más la concentración de sustrato unido a la enzima en el complejo enzima-sustrato, [ES]. Sin embargo, al ser  $[S_T] \gg [E_T]$  puede considerarse que la proporción de  $S_T$  que se encuentra en ES es despreciable y por lo tanto, puede hacerse la aproximación  $[S_T] \cong [S]$ .

Dado que supusimos que la enzima libre y el sustrato se equilibran rápidamente con el complejo enzima-sustrato, podemos plantear la existencia de una constante de equilibrio, a la que llamaremos  $K_S$ :

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (3.5)$$

Por lo tanto, podemos expresar  $[ES]$  en términos de  $[E]$  y  $K_S$ :

$$[ES] = \frac{[S]}{K_S}[E] \quad (3.6)$$

En la ecuación 3.4 podemos reemplazar  $[ES]$  por la expresión que acabamos de encontrar:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_S}[E]}{[E] + \frac{[S]}{K_S}[E]} \quad (3.7)$$

Ahora la concentración de enzima libre puede ser simplificada y la ecuación de la velocidad (3.3) queda en función de variables más fáciles de determinar experimentalmente: la concentración total de sustrato, la concentración total de enzima y la constante de equilibrio  $K_S$ . De todos modos, podemos dar un paso más, pasando la concentración total de enzima al otro miembro:

$$v_0 = k_p[E_T] \frac{\frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S}} \quad (3.8)$$

y reordenando, podemos expresar la ecuación 3.8 como:

$$v_0 = k_p[E_T] \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad (3.9)$$

Ahora bien: recordemos que la primera ecuación de la velocidad que escribimos (3.3) era  $v_0 = k_p [ES]$ , pero también habíamos dicho que si la concentración de sustrato  $[S]$  supera cierto límite, el equilibrio se va a desplazar hacia la formación de complejo ES de modo tal que prácticamente toda la enzima va a estar complejada con sustrato. En esas condiciones,  $[ES] \cong [E_T]$  y la velocidad inicial  $v_0$  no podrá aumentar cuando se aumente la concentración de sustrato por sobre el valor límite ya que no habrá más enzima disponible para formar más complejo ES. En otras palabras, la enzima estará **saturada** de sustrato, y por encima de la concentración de sustrato *saturante* no habrá más incrementos de la  $v_0$ . A esa  $v_0$ , que se alcanza con la concentración de sustrato saturante, se le llama velocidad máxima ( $V_{max}$ ), y como se acaba de

ver, **es una velocidad inicial**. En síntesis, es la **máxima velocidad inicial alcanzable con aumentos de la concentración de sustrato**. De este modo:

$$V_{max} = k_p [E_T] \quad (3.10)$$

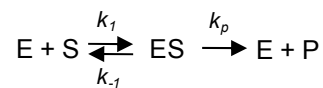
Reemplazando  $V_{max}$  en la ecuación 3.9, nos queda:

$$v_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad (3.11)$$

la cual expresa la velocidad inicial en términos de la concentración total de sustrato, la velocidad inicial máxima y la constante de equilibrio  $K_S$ . Al ser esta última la relación de las constantes cinéticas de formación y ruptura del complejo ES (ver arriba), también representa la *afinidad* de la enzima por el sustrato. Puede observarse que cuanto mayor sea la tendencia a la formación del complejo ES en relación con la tendencia a su ruptura, menor será el valor de  $K_S$  ( $= k_{-1}/k_1$ ) y a menor  $K_S$  mayor será la  $v_0$  si todos los otros componentes de la ecuación de la velocidad no cambian. Visto desde el otro punto de vista, cuanto menor sea  $K_S$ , menor será la concentración de sustrato  $[S]$  necesaria para alcanzar la misma  $v_0$ , es decir, la enzima será más *afin* por el sustrato.

## La Aproximación del Estado Estacionario

Retomando el esquema básico del estado inicial de la reacción catalizada enzimáticamente:



podemos preguntarnos si es necesario que haya un equilibrio rápido entre la enzima libre, el sustrato y el complejo enzima-sustrato para que la velocidad inicial sea constante. En realidad, existe otra condición donde la  $[ES]$  puede mantenerse constante, la cual fue descrita por Briggs y Haldane en 1925. A esta condición la conocemos como *estado estacionario*.

Un estado estacionario con respecto a alguna variable del sistema se alcanza cuando, para esa variable, la velocidad de entrada al sistema es igual a la velocidad de salida del sistema, de modo tal que dentro del sistema el valor de la variable permanece constante, aun cuando el sistema no esté en equilibrio. En nuestro caso, el sistema se halla claramente fuera del equilibrio porque estamos considerando la *velocidad inicial*. El sistema es pues el complejo ES y la variable que tomaremos en cuenta es la materia, medida como concentración. La velocidad de entrada de materia sería la velocidad con la cual se forma el complejo ES a partir de E y S. Por su parte, la velocidad de salida sería aquella con la cual se descompone el complejo ES. El

complejo ES puede descomponerse de dos maneras: disociarse a E + S o reaccionar para dar E + P. Por lo tanto, la suma de las dos velocidades de reacción  $ES \rightarrow E + S$  y  $ES \rightarrow E + P$  debería ser igual a la velocidad de la reacción  $E + S \rightarrow ES$  para que se alcance el estado estacionario y la concentración de ES se mantenga constante:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_p [ES] = 0 \quad (3.12)$$

Si recordamos que  $[E] = [E_T] - [ES]$  y reordenamos:

$$k_1 ([E_T] - [ES])[S] - [ES](k_{-1} + k_p) = 0 \quad (3.13)$$

Agrupando los términos en [ES]:

$$k_1 [E_T][S] = [ES](k_{-1} + k_p + k_1[S]) \quad \therefore$$

$$[ES] = \frac{k_1 [E_T][S]}{(k_{-1} + k_p + k_1[S])} \quad (3.14)$$

De este modo, podemos calcular la  $v_0$ , reemplazando en 3.3 el valor de [ES]:

$$v_0 = k_p [ES] = \frac{k_p k_1 [E_T][S]}{(k_{-1} + k_p + k_1[S])} \quad (3.15)$$

Dividiendo numerador y denominador por  $k_1$  y simplificando:

$$v_0 = \frac{k_p [E_T][S]}{\frac{(k_{-1} + k_p)}{k_1} + [S]} \quad (3.16)$$

Observemos que en el denominador ha quedado una relación de constantes cinéticas muy similar a  $K_S$ , excepto que esta vez también se agrega la constante  $k_p$ . Esto es razonable ya que no hicimos ninguna suposición acerca del valor de  $k_p$ . Por lo tanto, Briggs y Haldane llamaron a esa relación de constantes “constante de Michaelis-Menten” o  $K_M$ , en honor a quienes fueron los primeros en proponer la ecuación para la cinética de la reacción catalizada por una enzima. Reemplazando y recordando que  $k_p [ET] = V_{max}$ , queda:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (3.17)$$



la cual es muy similar a la que habíamos deducido anteriormente (con  $K_M$  en vez de  $K_S$ ) y se la conoce como la **ecuación de Michaelis-Menten**. Esta ecuación es la ecuación fundamental de la cinética enzimática, y más allá de que haya sido deducida a partir de un mecanismo particular y simplificado, puede aplicarse a muchos mecanismos incluso más complejos.

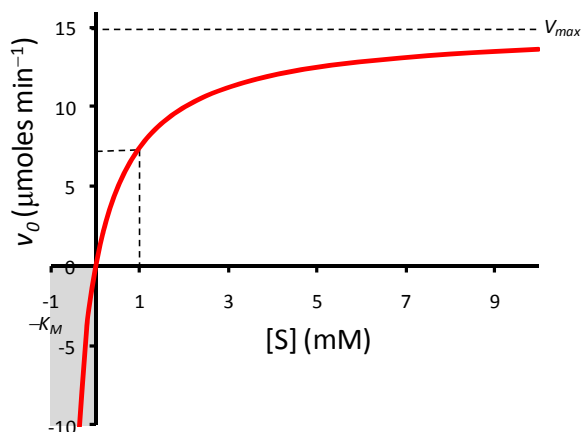
## Significado de los Parámetros de la Ecuación de Michaelis-Menten

Si observamos de nuevo la ecuación de Michaelis-Menten (3.17), veremos que tiene dos variables:  $v_0$  y  $[S]$ , de las cuales  $[S]$  es la variable independiente (o sea, aquella cuyo valor es arbitrariamente elegido por el experimentador) y  $v_0$  es la variable dependiente (cuyo valor depende del valor que asuma  $[S]$ ). Pero además hay otras dos cantidades, a veces mal llamadas “constantes”, pero que en realidad son *parámetros*:  $V_{max}$  y  $K_M$ . Ninguna de ellas depende de  $[S]$  pero sí son quienes definen la forma que adopta la función. Para entender su significado tenemos que pensar en términos matemáticos pero también bioquímicos y fisiológicos. Es por ello que aquí hay uno de los puntos centrales donde se manifiesta la multidisciplinariedad de este enfoque: en la confluencia de distintas ciencias para obtener un resultado que emerge como algo superador de todas ellas y no como mero agregado de aportes diversos.

Como primer paso, veamos qué aspecto tiene la representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten. En la Fig. 3.2 mostramos cómo varía  $v_0$  en función de  $[S]$ , representando, como es usual, a la variable independiente en el eje de las abscisas y a la variable dependiente en el eje de las ordenadas. El resultado es una gráfica que sigue una función hiperbólica que pasa por el punto (0; 0) donde las asíntotas son  $V_{max}$  y  $-K_M$ . Aquí vemos una de las razones por las cuales  $V_{max}$  y  $K_M$  deben llamarse *parámetros*: al ser las asíntotas son los parámetros que definen los límites y la curvatura de la hipérbola.

Ahora intentemos ver qué significado tienen estos parámetros desde el punto de vista bioquímico. Por un lado, es fácil ver por qué  $V_{max}$  es una asíntota: si aumentamos la  $[S]$ ,  $K_M$  se vuelve despreciable y el cociente  $[S]/(K_M + [S])$  de la ecuación 3.17 se aproxima a 1, con lo cual  $v_0$  se aproxima a  $V_{max}$ , pero **nunca** dicho cociente se iguala a 1, con lo cual **nunca** la  $v_0$  alcanza a la  $V_{max}$ , por más alta que sea la  $[S]$ . En realidad, cuando anteriormente dijimos que a la  $[S]$  saturante toda la enzima está complejada con S, cometimos un exceso de lenguaje, ya que si se mira bien la Fig. 3.2 veremos que la  $v_0$  aumenta siempre, aunque la tasa de aumento de  $v_0$  a  $[S]$  muy grandes se vuelve imperceptible. ¿Cuál es, entonces, la explicación bioquímica de que la  $V_{max}$  no pueda alcanzarse nunca, por más alta que sea la  $[S]$ ? Recordemos que la combinación de la enzima libre (E) y el sustrato (S) conduce a la formación del complejo enzima-sustrato (ES), que es donde se produce la reacción. Por ley de acción de masas, al aumentar la  $[S]$  el equilibrio se desplaza hacia la formación de ES, pero al ser una reacción reversible, nunca se llega a la situación donde la  $[E]$  sea 0. Por lo tanto, decir que a  $[S]$

saturante “toda” la enzima está presente como complejo ES es, como dijimos, un exceso de lenguaje.



**Fig. 3.2.** Representación gráfica de la relación entre la  $v_0$  y la  $[S]$  para una enzima que sigue la cinética de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos son los mismos que en la Fig. 3.1. La línea de puntos trazada en el valor  $v_0 = 15 \mu\text{moles min}^{-1}$  indica la  $V_{max}$ . Las líneas que marcan el punto de coordenadas  $(1; 5)$  indican los valores de  $[S] = K_M$  y  $0,5V_{max}$  respectivamente. El recuadro gris indica una zona que no tiene sentido físico, pero permite visualizar que  $-K_M$  es la otra asíntota de esta hipérbola.

Vale la pena aquí recalcar que, como estamos viendo, la  $V_{max}$  es una  $v_0$ , es decir, se trata de la **máxima velocidad inicial**. No nos cansamos de repetir esto ya que la forma de las gráficas de las Fig. 3.1 y 3.2 (en el cuadrante positivo) es similar y puede conducir fácilmente a una interpretación errónea. La costumbre indica que una “velocidad máxima” se alcanza un cierto tiempo después de iniciado el proceso, y la idea misma de “velocidad máxima” entraña una idea de “aceleración”, es decir, de un proceso que se inicia a velocidad igual a cero, procede a lo largo del tiempo con una aceleración que va decreciendo, y finalmente alcanza la velocidad máxima cuando la aceleración se hace igual a cero. Por lo tanto, muchos estudiantes tienden a confundir estas gráficas y a creer que la velocidad máxima se alcanza luego de transcurrido un tiempo de reacción. Es por ello que debe tenerse mucho cuidado al mirar las Fig. 3.1 y 3.2: en ninguno de los ejes de la Fig. 3.1 está explícitamente indicada la velocidad, sino que ésta resulta ser la pendiente de la curva  $[P]$  vs tiempo. Como puede verse, **la mayor pendiente de cada curva se encuentra al tiempo cero**, mientras que **a tiempos largos dicha pendiente tiende a cero** (es decir, se alcanza el equilibrio químico). En los ejes de la Fig. 3.2 está representada la  $v_0$  en función de la  $[S]$ , no del tiempo. Por lo tanto, **cada punto del eje  $v_0$  de la Fig. 3.2 es la pendiente a tiempo cero de cada una de las curvas de la Fig. 3.1**.

Finalmente, podemos considerar a la  $V_{max}$  desde el punto de vista fisiológico. Con las salvedades mencionadas arriba, este parámetro puede representar a la cantidad de enzima presente, ya que a los fines prácticos  $V_{max} = k_p [E_T]$ . Por lo tanto, en condiciones de saturación de sustrato, y manteniendo todos los otros parámetros sin cambios, la velocidad de catálisis no depende de la concentración de sustrato sino sólo de la concentración de enzima. Por lo tanto, si en un tejido una enzima que cataliza cierta reacción de una vía metabólica se encuentra operando cerca de su  $V_{max}$ , la velocidad de catálisis de esta

reacción podrá modificarse solo modificando la cantidad de enzima, independientemente de la concentración de sustrato presente. Esto realmente ocurre con muchas enzimas que se regulan al nivel de la expresión de los genes que las codifican. Volveremos sobre este punto en capítulos posteriores cuando analicemos el rol de la regulación de la actividad enzimática sobre el control de las rutas metabólicas.

Con respecto al  $K_M$ , si bien desde el punto de vista matemático se encuentra en el cuadrante negativo (Fig. 3.2), no tiene sentido bioquímico hablar de  $[S]$  negativas, y aunque una velocidad de reacción negativa podría estar indicando que prevalece la formación de sustrato a partir del producto, tampoco tiene sentido considerar una velocidad **inicial** negativa ya que al tiempo cero no hay producto a partir del cual pueda formarse sustrato. Es decir, el valor de  $-K_M$  solo tiene sentido para indicar que es uno de los parámetros de la hipérbola.

Si buscamos el valor *positivo* del  $K_M$  sobre el eje de  $[S]$  nos encontramos con que coincide con la  $[S]$  a la cual se alcanza la mitad de la  $V_{max}$ . En efecto, si en la ecuación 3.17 reemplazamos el valor de  $K_M$  por  $[S]$  cuando numéricamente  $K_M = [S]$  nos queda que:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{max} [S]}{2[S]} = \frac{1}{2} V_{max} \quad (3.18)$$

Ahora bien: debemos recordar que, por la ecuación 3.16:

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_p)}{k_1} \quad (3.19)$$

y por lo tanto,  $K_M$  **no es una concentración de sustrato, sino una relación de constantes cinéticas**. ¿Por qué entonces  $K_M$  se encuentra sobre el eje de  $[S]$  y tiene unidades de concentración? Se encuentra en el eje de  $[S]$  precisamente por ser uno de los parámetros de la hipérbola –el que corresponde al eje de las abscisas– y tiene unidades de concentración porque las constantes cinéticas que están en el numerador de 3.19 son de primer orden y por tanto tienen unidades de  $(\text{tiempo}^{-1})$  mientras que la constante cinética  $k_1$  del denominador es de segundo orden y entonces tiene unidades de  $(\text{concentración}^{-1} \text{ tiempo}^{-1})$ . Simplificando, se puede ver que la unidad de  $K_M$  queda expresada en unidades de concentración. En resumen,  $K_M$  es una relación de constantes cinéticas que **coincide** con la  $[S]$  a la cual  $v_0$  es la mitad de la  $V_{max}$ , pero **no es una concentración de sustrato** (yo que vos, le pasaría un resaltador a la última oración).

Por otro lado, es obvio que, al estar en el mismo eje,  $K_M$  no depende de  $[S]$  ya que equivale a un único valor de  $[S]$ . Tampoco  $K_M$  depende de la concentración de enzima, ya que es un parámetro independiente de  $v_0$  y por lo tanto, independiente de  $V_{max}$ . Esto significa que  $K_M$  es equivalente a la  $[S]$  a la cual se alcanza la mitad de la  $V_{max}$  siendo esa  $[S]$  siempre la misma, **independientemente de la concentración de enzima**.

Al ser una relación de constantes cinéticas,  $K_M$  depende del pH y de la temperatura. Sin embargo, es imposible predecir la tendencia del  $K_M$  con el incremento del pH o de la

temperatura, ya que  $K_M$  depende de tres constantes cinéticas y por lo tanto, su valor cambiará de acuerdo a cómo el pH y la temperatura afecten a cada una de esas tres constantes.

Como ya dijimos,  $K_M$  (y más propiamente,  $K_S$ ) representa la afinidad de la enzima por el sustrato. Cuanto mayor sea la suma ( $k_{-1} + k_p$ ) con relación a  $k_1$  más tendencia tendrá el complejo ES a disociarse que a asociarse y por lo tanto, un valor alto de  $K_M$  representa una menor afinidad. Asimismo, cuanto más alto sea el  $K_M$  mayor será la [S] necesaria para alcanzar la mitad de la  $V_{max}$ , lo cual puede extenderse a cualquier fracción de la velocidad. Así, el  $K_M$  es una propiedad del par enzima-sustrato considerado: dos enzimas que catalizan reacciones distintas con el mismo sustrato tendrán  $K_M$  distintos, y una enzima que cataliza una dada reacción con dos sustratos alternativos tendrá un valor de  $K_M$  para cada uno de ellos.

Dado que el valor de  $K_M$  no depende de la concentración de enzima, una mayor producción de enzima en un tejido dado no modificará el valor de  $K_M$  de esa enzima por su sustrato en ese tejido. Sin embargo, el valor de  $K_M$  depende de la estructura de la enzima, y en particular, de la estructura de su sitio activo, ya que éste es el que determina los valores de  $k_{-1}$ ,  $k_p$  y  $k_1$ . Por lo tanto, cualquier molécula que sea capaz de unirse a la enzima y provocarle un cambio conformacional tal que modifique la estructura o el estado de ionización del sitio activo provocará un cambio en el  $K_M$ . Este tipo de moléculas se conocen como *efectores* y también tienen un papel de gran importancia en la regulación de las vías metabólicas. Regresaremos a ellos cuando analicemos el fenómeno del *alosterismo*, pero por el momento podemos ver que incluso los  $H^+$  podrían ser considerados como efectores si es que el cambio de pH produce cambios en el estado de ionización del sitio activo tales que afecten alguna de las constantes cinéticas  $k_{-1}$ ,  $k_p$  o  $k_1$ .

Entre estas constantes cinéticas hay una a la que debemos prestar especial atención. Se trata de  $k_p$ , ya que es la constante de primer orden de la reacción de producción de P a partir del complejo ES. Por lo tanto, esta constante, que como dijimos tiene unidades de tiempo<sup>-1</sup>, representa el número de ciclos catalíticos por unidad de tiempo que la enzima es capaz de producir. Por ello, esta constante también es conocida como **constante catalítica ( $k_{cat}$ )** o como **número de recambio**. Esta constante puede determinarse experimentalmente si se conocen la concentración de enzima y la  $V_{max}$ , ya que de acuerdo con la ecuación 3.10,  $k_p = V_{max}/[ET]$ .

Debe hacerse notar que si bien  $k_p$  y  $K_M$  son independientes entre sí, cada una de ellas hace referencia en cierto modo a la "eficiencia catalítica" de la enzima. Por ejemplo, consideremos la fumarasa, que cataliza la hidratación del fumarato para dar malato en una vía metabólica de suma importancia para la generación de energía, poder reductor y esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos, etc. El sustrato "natural" de esta enzima es el fumarato, pero también puede catalizar la hidratación del fluorofumarato. La  $k_p$  (o  $k_{cat}$ ) es considerablemente mayor para el fluorofumarato ( $2.700 \text{ s}^{-1}$ ) que para el fumarato ( $800 \text{ s}^{-1}$ ), lo que significa que puede catalizar más del triple de ciclos por segundo con fluorofumarato que con fumarato. Sin embargo, su afinidad por el fumarato parece ser mucho mayor, dado que el  $K_M$  por el fluorofumarato es  $27 \text{ } \mu\text{M}$  mientras que por el fumarato es  $5 \text{ } \mu\text{M}$ . Por lo tanto, podría decirse que esta enzima funciona mejor con fluorofumarato a altas concentraciones de

sustrato, donde  $[S]/(K_M + [S]) \cong 1$  y por lo tanto la ecuación de Michaelis-Menten puede considerarse como una cinética de orden cero en la cual  $v_0 \cong V_{max}$ , es decir que  $v_0$  no depende de  $[S]$  y sí depende de  $k_p$ . Por otro lado, a  $[S] \ll K_M$  el denominador de la ecuación 3.17 resulta  $K_M + [S] \cong K_M$  y la ecuación de Michaelis-Menten se aproxima a una cinética de primer orden, donde  $v_0 \cong [S](V_{max}/K_M)$ . En esta situación la  $v_0$  depende directamente de la  $[S]$ , con lo cual la afinidad de la enzima por el sustrato debería jugar un papel. Si observamos la “constante” que ha quedado en la ecuación de primer orden y apartamos de ella la concentración de enzima, observamos que dicha ecuación podría también escribirse como:

$$v_0 = [S][E_T] \frac{k_p}{K_M} \quad (3.20)$$

La relación  $k_p/K_M$  se conoce como **constante de especificidad**, o  $k_A$ . Por lo tanto, la ecuación anterior puede escribirse como:

$$v_0 = [S][E_T]k_A \quad (3.21)$$

Para el caso de la fumarasa, la  $k_A$  por el fumarato es  $800 \text{ s}^{-1}/5 \text{ } \mu\text{M} = 160 \text{ s}^{-1} \text{ } \mu\text{M}^{-1}$  mientras que para el fluorofumarato es  $2.700 \text{ s}^{-1}/27 \text{ } \mu\text{M} = 100 \text{ s}^{-1} \text{ } \mu\text{M}^{-1}$ , es decir que la  $k_A$  es un 60% mayor para el fumarato. Esto indica que a bajas concentraciones de sustrato, la fumarasa debería funcionar mejor con fumarato que con fluorofumarato. Sin embargo, ¿esto se aplica solo a la situación de bajas  $[S]$ ? ¿La  $k_A$  no tiene validez fuera de este rango? ¿Es más fundamental la  $K_M$  que la  $k_A$ ? ¿Esta situación es una rareza de la fumarasa o se repite con otras enzimas?

La realidad es que esta situación es general y el parámetro  $k_A$  es igualmente fundamental que  $K_M$ . De hecho, se ha propuesto que la ecuación de Michaelis-Menten puede escribirse igualmente bien empleando  $k_A$  y  $K_M$  en vez de  $k_p$  y  $K_M$ :

$$v_0 = \frac{k_A[E_T][S]}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (3.22)$$

o bien empleando  $k_A$  y  $k_p$  sin usar  $K_M$ :

$$v_0 = \frac{k_A k_p [E_T][S]}{k_p + k_A [S]} \quad (3.23)$$

Por lo tanto, vemos que cualquiera de los tres parámetros:  $k_A$ ,  $k_p$  y  $K_M$  son igualmente fundamentales y la misma ecuación puede expresarse en términos de dos cualquiera de ellos. De todos modos, la costumbre hace que la expresión 3.17, en términos de  $k_p$  y  $K_M$ , sea más familiar y es por ello que continuaremos utilizándola en el resto de este libro.

## Cálculo de los Parámetros Cinéticos

La ecuación de Michaelis-Menten nos permite expresar la  $v_0$  en relación con la  $[S]$  y dos parámetros cinéticos que, en principio, parecen fáciles de determinar experimentalmente. Por ejemplo, si podemos utilizar en nuestros experimentos una  $[S]$  lo suficientemente alta como para acercarnos a la saturación, podemos entonces determinar experimentalmente la  $V_{max}$ . Luego, utilizando una serie de  $[S]$  menores (no de saturación) podríamos reordenar la ecuación de Michaelis-Menten para determinar el  $K_M$ . Para este tipo de experimentos es cómodo expresar  $[S]$  en términos de  $K_M$ :  $0,1K_M$ ;  $0,5K_M$ ;  $2K_M$ ;  $10K_M$ ; etc. Puede verse que cada una de estas expresiones es una concentración; si por ejemplo el valor de  $K_M$  es 4 mM, las concentraciones referidas anteriormente serán 0,4 mM, 2,0 mM, 8,0 mM y 40,0 mM respectivamente. Al expresar  $[S]$  en términos de  $K_M$  podemos ver en la ecuación de Michaelis-Menten cuánto nos acercamos a la  $V_{max}$ . Por ejemplo, si la  $[S] = 2K_M$ , reemplazando  $[S]$  en 3.17 vemos que  $v_0$  será  $2/3$  de la  $V_{max}$ ; si  $[S] = 10K_M$ ,  $v_0$  será  $10/11$  de la  $V_{max}$ , y así sucesivamente. Podríamos decir que  $2/3$  no es lo suficientemente cerca de la  $V_{max}$ , pero  $10/11$  sí lo es. Siguiendo con el razonamiento, una  $[S]$  de  $100K_M$  llevaría la  $v_0$  a  $100/101 V_{max}$ , y bueno... ahí sí podríamos decir que estamos razonablemente cerca, ¿o no?

En muchos aspectos de las ciencias experimentales se tienen “usos y costumbres” que definen umbrales de “hasta qué punto es aceptable” cierto acercamiento. Por ejemplo, en el análisis estadístico de datos siempre nos manejamos con *muestras* que esperamos que representen a la *población*. Si por ejemplo estamos haciendo nuestro experimento para determinar el valor del  $K_M$ , vamos a tener una serie de medidas de  $v_0$  en un rango de  $[S]$ . Por ejemplo, supongamos que a una  $[S] = 1$  mM obtenemos una  $v_0 = 0,21$   $\mu$ moles de P producidos por minuto. Repetimos el experimento, y a la misma  $[S]$  obtenemos una  $v_0 = 0,24$   $\mu$ moles de P producidos por minuto. ¿Cuál es la “verdadera”  $v_0$ ? ¿0,21 o 0,24  $\mu$ moles de P producidos por minuto? Podríamos hacer una tercera determinación para “desempatar”, pero lo más probable es que obtengamos un tercer valor, que no va a ser ni 0,21 ni 0,24  $\mu$ moles de P producidos por minuto. Y así sucesivamente, si siguiéramos repitiendo el experimento, obtendríamos una serie de valores todos distintos entre sí, pero en cierto modo, “parecidos”: difícilmente obtendríamos valores tales como 5.478  $\mu$ moles de P producidos por minuto o  $3 \cdot 10^{-14}$   $\mu$ moles de P producidos por minuto... y si los obtuviéramos, tendríamos buenas razones para sospechar de que son la consecuencia de haber hecho algo mal durante la determinación. Cada uno de los valores que vamos obteniendo es una *muestra* de la “población” de todas las determinaciones que podríamos hacer con la misma enzima, el mismo sustrato y las mismas condiciones experimentales. El hecho es que no todas las determinaciones son exactamente iguales: un pequeño error en algún volumen tomado con nuestras pipetas, una leve diferencia en la temperatura de incubación de distintos tubos, una insignificante inhomogeneidad en la distribución de las moléculas de enzima en el seno de la solución, pueden dar origen a valores levemente diferentes de la  $v_0$ , no importa cuántas veces lo hagamos. Es decir, no existe un valor “verdadero” de la  $v_0$  en esas condiciones, sino

una *distribución* de valores de  $v_0$ . Si sumamos todos estos valores y los dividimos por el número total de determinaciones, obtenemos la *media*. De nuevo, si hiciéramos todas las determinaciones posibles con la misma enzima, el mismo sustrato y las mismas condiciones experimentales, obtendríamos la *media poblacional*, pero como esto es evidentemente imposible, lo que hacemos es un conjunto de determinaciones, que constituyen una *muestra*, y su promedio es la *media muestral*. Haciendo el mismo razonamiento que antes, es fácil ver que cada muestra tendrá su media muestral, y que casi ninguna de ellas coincidirá con la media poblacional, cuyo valor seguramente ignoraremos. Por lo tanto, podemos repetirnos la pregunta ¿hasta qué punto el valor obtenido para la media muestral se parece al de la media poblacional? La estadística ha desarrollado una gran cantidad de herramientas para responder esta pregunta, basadas en el estudio de las distribuciones de datos alrededor de un promedio. El punto es que, como desconocemos el valor de la media poblacional (porque no podemos hacer la infinita cantidad de determinaciones experimentales que necesitaríamos para calcularla) todo lo que podemos decir es cuál es la *probabilidad* de que nuestra media muestral sea parecida a la media poblacional. Usando estas herramientas estadísticas se acepta, en general, que una probabilidad igual o mayor al 95% nos da un grado de confianza aceptable de que el valor obtenido en nuestra serie de determinaciones refleje el “verdadero” valor de la media poblacional. Sin embargo, no hay una justificación lógica de por qué 95% es aceptable y 94% no.

Haciendo algo similar, podríamos intentar un “uso y costumbre” (o generar una comisión de expertos) que ponga un umbral aceptable de hasta qué punto la  $v_0$  obtenida experimentalmente con [S] muy alta refleje la “verdadera”  $V_{max}$ . Por ejemplo, sabiendo que no podemos obtener la “verdadera”  $V_{max}$  experimentalmente, podríamos convenir que una  $v_0 = 10/11V_{max}$  sería una buena aproximación. Frente a esto, podemos decir que hay dos noticias: una mala y una buena. Empecemos por la mala: a menudo es imposible disolver una sustancia a una concentración del orden de  $10K_M$ . Por ejemplo: recordemos que muchos aminoácidos tienen cadenas laterales (grupos “R”) hidrofóbicas. Ejemplos de ellos serían la valina, la leucina, la isoleucina o la fenilalanina. Si por ejemplo estuviéramos interesados en determinar la  $V_{max}$  de una enzima que cataliza cierta reacción con fenilalanina como sustrato, sería seguramente muy difícil preparar una solución acuosa altamente concentrada de fenilalanina dado que su solubilidad en agua a 25°C es de solo 180 mM. Para otras enzimas, puede haber una limitación técnica adicional: muchas de ellas catalizan pasos intermedios (por ejemplo en la síntesis de fenilalanina) cuyos sustratos son moléculas inestables, difíciles de obtener en forma pura a partir de muestras naturales y que solo están disponibles en pequeñas cantidades gracias a complicados procesos de síntesis química, lo que hace difícil preparar con ellas soluciones altamente concentradas. Es decir, en la mayoría de los casos, preparar soluciones con [S] =  $10K_M$  es técnica o físicamente imposible.

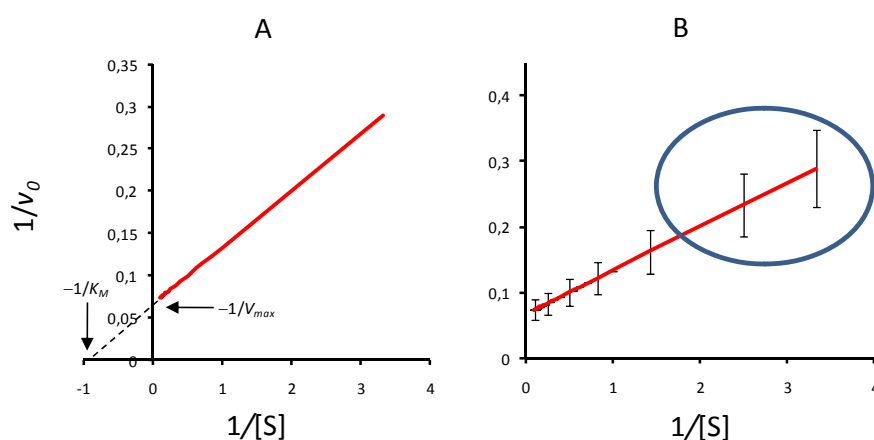
Ahora podemos dar la buena noticia: es posible calcular exactamente los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  con cualquier [S]. En 1934, H. Lineweaver y D. Burk, simplemente invirtiendo la ecuación

de Michaelis-Menten, propusieron lo que hoy conocemos como “la doble recíproca”: una función lineal de donde se pueden extrapolar los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$ :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} [S]} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.24)$$

Es decir, obtenemos la ecuación de una recta de la forma  $y = ax + b$  donde la pendiente es  $K_M/V_{max}$  y la ordenada al origen es  $1/V_{max}$ . Además, si hacemos que  $1/v_0 = 0$ , nos queda la igualdad

$$\frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} = -\frac{1}{V_{max}} \therefore$$



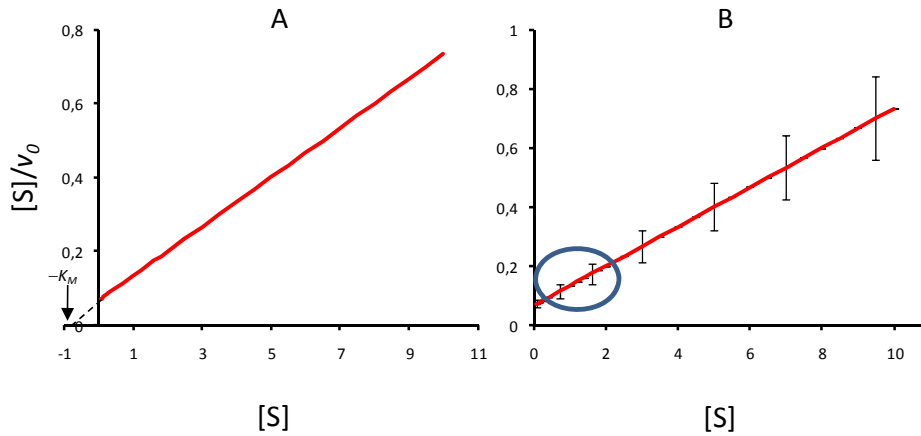
**Fig. 3.3.** Representación doble recíproca de Lineweaver-Burk de los datos de la Fig. 3.2. En **A** se muestra la línea que une los puntos experimentales (rojo) y su prolongación sobre los ejes. El corte del eje  $1/v_0$  se produce en el valor  $1/V_{max}$  y el corte del eje  $1/[S]$  se produce en el valor equivalente a  $-1/K_M$ . En **B** se muestra la misma gráfica (sin proyectar) donde se han incluido barras de error correspondientes a 10% de error en las medidas de las  $v_0$ . El óvalo azul señala los puntos que provienen de valores bajos de  $v_0$ .

$$\frac{V_{max}}{V_{max}[S]} = -\frac{1}{K_M} = \frac{1}{[S]} \quad (3.25)$$

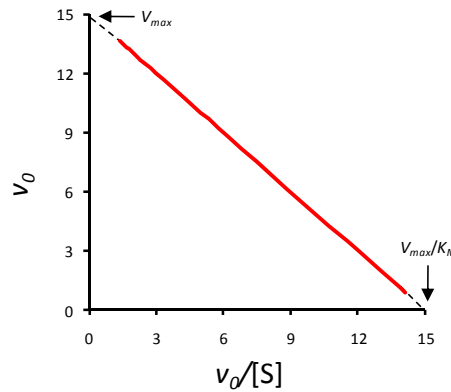
es decir, que la proyección de la recta sobre el eje de las abscisas da  $-1/K_M$ . En otras palabras, la proyección de la recta sobre los ejes  $1/v_0$  y  $1/[S]$  da por resultado las inversas de los dos parámetros de la hipérbola:  $1/V_{max}$  y  $-1/K_M$  (Fig. 3.3).

La representación de la doble recíproca, también conocida como representación de Lineweaver-Burk, si bien ha sido muy utilizada, tiene algunas limitaciones. La más importante es que, dado que en general se usan  $[S]$  relativamente bajas, los valores de las inversas  $1/[S]$  y  $1/v_0$  son grandes y por lo tanto, también lo son los desvíos ocasionados por los valores experimentales. Observando la recta de la Fig. 3.3 vemos que los errores cometidos a valores bajos de  $1/[S]$  y  $1/v_0$  van a propagarse a la pendiente de la recta con lo cual la extrapolación a los ejes de abscisas y ordenadas puede arrojar estimaciones muy erróneas. Para solucionar este problema se han propuesto modificaciones a la doble recíproca, siempre procurando transformar la ecuación de Michaelis-Menten en una ecuación de una recta. Algunas de las más importantes son la representación de  $[S]/v_0$  vs  $[S]$ , la de  $v_0$  vs  $v_0/[S]$  y la lineal directa.





**Fig. 3.4.** Representación de Hanes-Wolfe de los datos de la Fig. 3.2. En **A** se muestra la línea que une los puntos experimentales (rojo) y su prolongación sobre los ejes. El corte del eje  $[S]$  se produce en el valor equivalente a  $-K_M$ . En **B** se muestra la misma gráfica (sin proyectar) donde se han incluido barras de error correspondientes a 10% de error en las medidas de las  $v_0$ . El óvalo azul señala los puntos que provienen de valores bajos de  $v_0$ .



**Fig. 3.5.** Representación de Eadie-Hofstee de los datos de la Fig. 3.2. En este caso no se pueden trazar barras de error verticales ya que  $v_0$  se encuentra en ambos ejes.

La primera de ellas es también conocida como la representación de Hanes-Woolf y se obtiene multiplicando ambos miembros de la doble recíproca (3.24) por  $[S]$ :

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} [S] \quad (3.26)$$

En un gráfico donde el eje de las ordenadas representa  $[S]/v_0$  y el de las abscisas representa  $[S]$ , la ordenada al origen es  $K_M/V_{max}$ , la pendiente es  $1/V_{max}$  y el corte en el eje de las abscisas se produce en el valor  $-K_M$  (Fig. 3.4).

Calculando  $V_{max}$  a partir de esta pendiente, también puede obtenerse  $K_M$  despejando del valor de la ordenada al origen.

Similarmente, si multiplicamos ambos miembros de la ecuación de la doble recíproca (3.24) por  $(v_0 V_{max})$  y reorganizamos se obtiene la representación de Eadie-Hofstee:

$$\frac{v_0 V_{max}}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{v_0 V_{max}}{[S]} + \frac{v_0 V_{max}}{V_{max}} \quad (3.27)$$

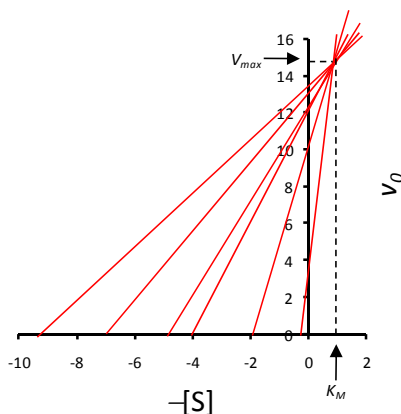
$$V_{max} = \frac{v_0}{[S]} K_M + v_0 \quad (3.28)$$

$$v_0 = V_{max} - \frac{v_0}{[S]} K_M \quad (3.29)$$

En una representación gráfica de 3.29 donde las abscisas representan  $v_0/[S]$  y las ordenadas  $v_0$ , se obtiene una recta cuya ordenada al origen es  $V_{max}$  y su pendiente es  $-K_M$  (Fig. 3.5)

En ambos casos, se evita que o bien  $[S]$  o bien  $v_0$  estén expresados como inversas, con lo cual se disminuyen las desviaciones de la pendiente que se originaban por el alto valor de la inversa del error en la doble recíproca. En la representación de Hanes-Woolf (3.26) la magnitud del error en la  $v_0$  queda relativizada por la  $[S]$ , de modo que las barras de error son menores para valores bajos de  $v_0$ . (Fig. 3.4). Por lo tanto, si el diseño del experimento demanda medir  $v_0$  bajas, es preferible utilizar esta representación antes que la doble recíproca. Por su parte, la representación de Eadie-Hofstee (3.29) permite representar las  $v_0$  en forma directa a lo largo de todo el rango desde 0 hasta  $V_{max}$  (Fig. 3.5). Además, en esta representación los datos que más se desvían de la línea de ajuste son fácilmente observables, de modo tal que es preferible utilizar esta representación cuando hay dudas acerca de si la cinética de la enzima en estudio sigue o no el modelo de Michaelis-Menten (más adelante vamos a ver comportamientos que se desvían de esta cinética).

Finalmente, en 1974 Eisenthal y Cornish-Bowden propusieron la representación lineal directa, que tiene la ventaja de que no requiere cálculos y por lo tanto puede ser utilizada en el laboratorio mientras el experimento está en curso. Ello permite ajustar concentraciones y tiempos de incubación en tiempo real para optimizar reactivos y esfuerzo. Esta representación parte de un rearrreglo de la ecuación de Michaelis-Menten (3.17), donde ahora la  $V_{max}$  y el  $K_M$  son tratados como variables:



**Fig. 3.6.** Representación lineal directa de los datos de la Fig. 3.2. Cada recta es un par de datos de  $-[S]$  y  $v_0$ , y las coordenadas del punto donde todas las rectas se cortan son  $K_M$  y  $V_{max}$ .

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \therefore V_{max} = \frac{v_0 (K_M + [S])}{[S]} \quad (3.30)$$

$$V_{max} = K_M \frac{v_0}{[S]} + v_0 \quad (3.31)$$

La ecuación 3.31 define una línea recta donde la ordenada al origen es  $v_0$  y la pendiente es  $v_0/[S]$ , que cortará al eje de las abscisas en valores de  $-[S]$  y al eje de las ordenadas en valores de  $v_0$ :

$$V_{max} = 0 \therefore -K_M \frac{v_0}{[S]} = v_0 \quad (3.32)$$

$$\frac{-K_M}{[S]} = \frac{v_0}{v_0} \quad (3.33)$$

$$K_M = -[S] \quad (3.34)$$

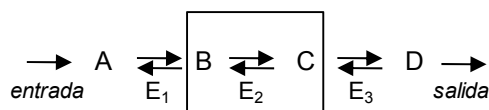
$$K_M = 0 \therefore V_{max} = 0 \frac{v_0}{[S]} + v_0 \quad (3.36)$$

$$V_{max} = v_0 \quad (3.37)$$

Por más que parezca raro usar  $v_0$  y  $[S]$  como constantes, en realidad una vez que uno las mide en un experimento puede considerar que lo son, ya que las mismas no deberían modificarse para esa medición en particular. De este modo, puede trazarse una recta para un par de valores de  $v_0$  (en el eje de las ordenadas) y  $-[S]$  (en el eje de las abscisas). Dado que para esa enzima y en ese experimento en particular va a haber un único par de valores de  $V_{max}$  y  $K_M$  que no dependerán de las  $[S]$ , una segunda recta trazada para un segundo par de valores de  $v_0$  y  $-[S]$  se deberá intersectar con la primera en un punto cuyas coordenadas en los ejes  $v_0$  y  $[S]$  deberán ser  $V_{max}$  y  $K_M$  (Fig. 3.6). Lo mismo puede decirse de cualquier par de puntos de  $v_0$  y  $-[S]$ , de modo tal que se terminará obteniendo una serie de rectas, todas las cuales se deberían cortar en el mismo punto de coordenadas  $(K_M, V_{max})$  y cuya desviación nos dará una medida del error experimental. Por lo tanto, lo único que hay que hacer es medir  $v_0$  a diferentes  $[S]$  y graficar las rectas resultantes a ver si todas se cortan en un mismo punto. Si es así, de ese punto pueden extraerse directamente los valores de  $V_{max}$  y  $K_M$  (Fig. 3.6).

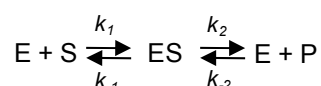
## La Forma Reversible de la Ecuación de Michaelis-Menten

Todo lo que vinimos viendo hasta aquí se basa en la idea de que trabajamos en condiciones iniciales, esto es, antes de que se haya acumulado una cantidad significativa de producto. Esto sin dudas sirve de mucho para calcular los parámetros cinéticos  $V_{max}$ ,  $k_p$ ,  $k_A$  y  $K_M$  mediante ensayos *in vitro*, pero no refleja la realidad de la célula. Si consideramos una enzima actuando en el metabolismo celular y no en el tubo de ensayo, inmediatamente veremos que cataliza su reacción específica en presencia **tanto del sustrato como del producto**. Sin embargo, como veremos más adelante, la reacción no llega al equilibrio, sino que se encuentra en un estado estacionario, tal que aún cuando no se den las condiciones iniciales, **la velocidad de reacción sigue siendo constante**. Esto puede entenderse si miramos el siguiente esquema:



que representa parte de una vía metabólica donde hay una entrada de sustancia A, que se transforma en B, luego B se transforma en C, que a su vez se transforma en D, y D sale del sistema. Si este sistema está en estado estacionario, significa que el *flujo* de materia a lo largo de la serie de reacciones es constante. En otras palabras, la velocidad con la que entra materia bajo la forma de A es igual a la velocidad con que sale materia bajo la forma de D. No importa si la molécula A es más grande o más chica que la molécula D, o si es más compleja o está más reducida, etc. Lo que importa es si la **cantidad de materia por unidad de tiempo** que entra al sistema es igual a la que sale. Para que se cumpla la condición de estado estacionario por la cual la cantidad de materia que entra por unidad de tiempo es igual a la que sale, debe cumplirse además que **todas las reacciones dentro del sistema estén ocurriendo a la misma velocidad**<sup>3</sup>. O sea, el **flujo** de materia dentro del sistema también debe ser constante. Por ende, la reacción catalizada por la enzima E<sub>2</sub> (en el recuadro) debe estar ocurriendo a una velocidad constante e igual a la de las catalizadas por E<sub>1</sub> y E<sub>3</sub> para que la condición de estado estacionario se mantenga. Esto significa que no importa que B (sustrato) y C (producto) estén presentes; la reacción va a ocurrir de todos modos con velocidad constante. Por lo tanto, necesitamos una expresión de la ecuación de Michaelis-Menten que dé cuenta de la presencia del producto para poder aplicarla al análisis de vías metabólicas.

De acuerdo con el esquema que planteamos al principio, la serie de reacciones a considerar en presencia del producto serían:



con lo cual ahora no solo debemos considerar como constante catalítica a  $k_2$ , sino también a  $k_{-1}$ , ya que hay que tomar en cuenta la reacción de formación de S a partir de P. Además, la velocidad neta ( $v_{neta}$ ) va a resultar de la diferencia entre la velocidad de formación de P a partir de S (a la que denominaremos velocidad directa, o  $v_d$ ) y la de formación de S a partir de P (a la que denominaremos velocidad reversa, o  $v_r$ ):

$$v_{neta} = v_d - v_r \quad (3.38)$$

Por lo tanto, si hacemos la simplificación de tomar en cuenta al complejo ES como el único capaz de producir P a partir de S o bien S a partir de P, el estado estacionario puede ser expresado como la situación en la cual la [ES] no cambia con el tiempo. Es decir que en este

<sup>3</sup> Esto se refiere al ejemplo de una vía lineal muy simple. Normalmente, las vías metabólicas incluyen ramificaciones y ciclos en las cuales no se puede decir que todas las reacciones ocurren a la misma velocidad, sino que el balance neto de las velocidades de entrada y salida se compensa exactamente para dar por resultado el estado estacionario.

estado la diferencia entre las velocidades de formación de ES a partir de S o de P y las velocidades de descomposición del complejo ES para dar S o P es nula:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E_T] - [ES])[S] + k_{-2}([E_T] - [ES])[P] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (3.39)$$

Agrupando los términos que contienen [ES] y reordenando, obtenemos la siguiente igualdad para [ES]:

$$[ES] = \frac{k_1 [E_T][S] + k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} \quad (3.40)$$

Esta ecuación es muy similar a 3.14, la que obtuvimos anteriormente en el tratamiento de la aproximación del estado estacionario para deducir la ecuación de Michaelis-Menten y de hecho, si se considera [P] = 0 se llega a la misma ecuación.

Ahora podríamos expresar la  $v_{neta}$  de producción de P como la diferencia entre la velocidad a la cual P es producido en la reacción  $ES \rightarrow E + P$  y la velocidad a la cual P es consumido en la reacción  $E + P \rightarrow ES$ :

$$v_{neta} = k_2[ES] - k_{-2}([E_T] - [ES])[P] \quad (3.41)$$

Reemplazando [ES] en 3.41 por lo obtenido en la igualdad 3.40:

$$v_{neta} = k_2 \frac{k_1 [E_T][S] + k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} - k_{-2} [E_T][P] + k_{-2} \frac{k_1 [E_T][S] + k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} [P] \quad (3.42)$$

Esta ecuación da un poquito de miedo, y peor va a ser ahora, que te voy a pedir que saquemos denominador común y distribuyamos el numerador. Pero enseguida vas a ver que para nuestra tranquilidad, la mayoría de los términos del numerador se van a cancelar mutuamente:

$$v_{neta} = \frac{k_1 k_2 [E_T][S] - k_{-1} k_{-2} [E_T][P] + k_2 k_{-2} [E_T][P] - k_2 k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} + \frac{k_1 k_{-2} [E_T][S][P] - k_1 k_{-2} [E_T][S][P] + k_{-2}^2 [E_T][P]^2 - k_{-2}^2 [E_T][P]^2}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} \quad (3.43)$$

la cual, luego de simplificar los términos que se cancelan mutuamente, queda:

$$v_{neta} = \frac{k_1 k_2 [E_T][S] - k_{-1} k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} \quad (3.44)$$

De nuevo, si comparamos con la ecuación 3.15 veremos que se trata de la misma ecuación, con  $[P] = 0$ . Similarmente, si consideramos  $[S] = 0$  obtendremos la ecuación simétrica para la  $v_0$  de producción de S a partir de P. Con estas consideraciones, podemos encontrar los parámetros cinéticos para S y P que quedan definidos por la relación entre las constantes  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  y  $k_{-2}$ :

$$k_{p,S} = k_2; \quad k_{p,P} = k_{-1} \quad (3.45)$$

$$K_{M,S} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; \quad K_{M,P} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad (3.46)$$

$$k_{A,S} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}; \quad k_{A,P} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2} \quad (3.47)$$

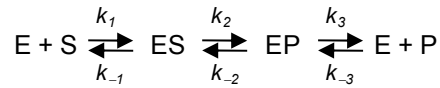
Con estas definiciones, y recordando que  $V_{max,d} = k_2 [ET]$  por lo que análogamente  $V_{max,r} = k_{-1} [ET]$ , podemos ahora dividir el numerador y el denominador de la ecuación de la  $v_{neta}$  por  $(k_{-1} + k_2)$  y expresarla así en términos de los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_{neta} = \frac{\frac{k_1 k_2 [ET][S]}{k_{-1} + k_2} - \frac{k_{-1} k_{-2} [ET][P]}{k_{-1} + k_2}}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_1 [S]}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_{-2} [P]}{k_{-1} + k_2}} \quad (3.48)$$

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}}}{1 + \frac{[S]}{K_{M,S}} + \frac{[P]}{K_{M,P}}} \quad (3.49)$$

La ecuación 3.49 se conoce como la *ecuación de Michaelis-Menten reversible* y puede verse que, como siempre, si hacemos  $[P] = 0$  se reduce a la ecuación directa 3.17. Esta ecuación puede aplicarse a vías metabólicas y utilizarse para el modelado matemático del metabolismo, donde los flujos internos van a estar determinados por las  $v_{neta}$  de las enzimas participantes.

Sin embargo, esta deducción tiene un problema, originado en una simplificación que se utilizó en el punto de partida. Recordemos que comenzamos diciendo que partiríamos de “la simplificación de tomar en cuenta al complejo ES como el único capaz de producir P a partir de S”, lo cual no es estrictamente así. En realidad, el esquema de reacciones debería representarse de la manera siguiente:



Es decir, en la simplificación que hicimos no tomamos en cuenta (deliberadamente) que una vez que se forma el complejo ES ocurre la reacción dentro del mismo, con lo cual dicho complejo se transforma en un complejo EP y solo después el P se disocia de la E. La transformación del complejo ES en EP también tiene su cinética, y en particular, es ahí donde se produce la reacción. Por lo tanto, puede considerarse que la etapa cuyas constantes cinéticas son  $k_2$  y  $k_{-2}$  es la etapa limitante de la reacción, ya que las otras dos etapas son simplemente unión y disociación. Por supuesto que si quisiéramos deducir la ecuación de la  $v_{\text{neta}}$  a partir del sistema de reacciones completo nos las veríamos negras, pero al final llegaríamos a la misma ecuación de Michaelis-Menten reversible, salvo que ahora los parámetros cinéticos van a resultar de relaciones de constantes diferentes ya que debemos incluir las constantes cinéticas de la transformación reversible de ES en EP. No vamos a deducir todos estos parámetros pero sí es importante considerar los dos  $K_M$ :

$$K_{M,S} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)}; \quad K_{M,P} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_{-3}(k_{-1} + k_{-2} + k_2)} \quad (3.50)$$

Si, como dijimos, la transformación reversible de ES en EP es la etapa limitante de la reacción, significa que tanto la reacción  $ES \rightarrow EP$  como la reacción  $EP \rightarrow ES$  deben ser ambas limitantes. Esto quiere decir que la constante  $k_2$  para la transformación  $ES \rightarrow EP$  debe ser mucho menor que la suma de las constantes ( $k_{-2} + k_3$ ), que determinan la reacción reversa  $EP \rightarrow ES$  y la disociación  $EP \rightarrow E + P$ , y simultáneamente, la constante  $k_{-2}$  para la reacción  $EP \rightarrow ES$  debe ser mucho menor que la suma de las constantes ( $k_{-1} + k_2$ ), que determinan la disociación  $ES \rightarrow E + S$  y la reacción  $ES \rightarrow EP$ :

$$k_2 \ll (k_{-2} + k_3) \quad (3.51)$$

$$k_{-2} \ll (k_{-1} + k_2) \quad (3.52)$$

Por lo tanto, si aproximamos a cero los valores de esas constantes y las reemplazamos en las ecuaciones 3.50:

$$K_{M,S} = \frac{k_{-1}(k_{-2} + k_3) + 0k_3}{k_1(k_{-2} + 0 + k_3)} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_{S,S} \quad (3.53)$$

$$K_{M,P} = \frac{0k_{-1} + k_3(k_{-1} + k_2)}{k_{-3}(k_{-1} + 0 + k_2)} = \frac{k_3}{k_{-3}} = K_{S,P} \quad (3.55)$$

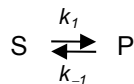
las constantes de Michaelis-Menten  $K_M$  se reducen a las constantes de disociación  $K_S$ . Por lo tanto, la ecuación 3.49 queda expresada como:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d} \frac{[S]}{K_{S,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{S,P}}}{1 + \frac{[S]}{K_{S,S}} + \frac{[P]}{K_{S,P}}} \quad (3.56)$$

donde ahora las constantes de disociación sí representan la verdadera afinidad de la enzima por S o P.

## Relación de Haldane

Al principio del capítulo aclaramos que las enzimas son catalizadores, es decir, aceleran la velocidad de las reacciones pero no modifican sus constantes de equilibrio. Ahora podríamos preguntarnos si a partir de los parámetros cinéticos podemos obtener una expresión para la constante de equilibrio. Suponiendo una reacción no catalizada:



en el equilibrio la  $v_{neta} = v_d - v_r$  es cero, con lo cual:

$$k_1[S]_{eq} = k_{-1}[P]_{eq} \quad (3.57)$$

donde  $[S]_{eq}$  y  $[P]_{eq}$  representan las concentraciones de S y P una vez que la reacción alcanzó el equilibrio. Por lo tanto, la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) será:

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} \quad (3.58)$$

Como dijimos, estas  $[S]_{eq}$  y  $[P]_{eq}$  serán las mismas si se añade la enzima que cataliza esta reacción; la única diferencia será que se alcanzarán más rápido en presencia de la enzima que en su ausencia. Por lo tanto, si utilizamos  $[S]_{eq}$  y  $[P]_{eq}$  en la ecuación 3.49, ésta forzosamente tendrá que igualarse a 0:

$$\frac{V_{max,d} \frac{[S]_{eq}}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]_{eq}}{K_{M,P}}}{1 + \frac{[S]_{eq}}{K_{M,S}} + \frac{[P]_{eq}}{K_{M,P}}} = 0 \quad (3.59)$$



Para que esto sea así, es necesario que el numerador de 3.59 valga 0, con lo cual:

$$V_{max,d} \frac{[S]_{eq}}{K_{M,S}} = V_{max,r} \frac{[P]_{eq}}{K_{M,P}} \quad \therefore$$

$$\frac{V_{max,d}}{K_{M,S}} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = K_{eq} \quad (3.60)$$

La ecuación 3.60 se llama *relación de Haldane* entre los parámetros cinéticos y la constante de equilibrio. Como la  $[E_T]$  es la misma en ambas  $V_{max}$ , la relación de Haldane también puede expresarse usando los otros parámetros cinéticos, lo cual es ilustrativo:

$$\frac{\frac{k_{p,S}}{K_{M,S}}}{\frac{k_{p,P}}{K_{M,P}}} = K_{eq} \quad (3.61)$$

$$\frac{k_{A,S}}{k_{A,P}} = K_{eq} \quad (3.62)$$

es decir que la constante de equilibrio también es la relación entre las constantes de especificidad para S y P. La reacción va a ser termodinámicamente favorable en el sentido  $S \rightarrow P$  si la constante de especificidad para S es mayor que para P. No obstante, debe recordarse siempre que estos tratamientos se refieren a tendencias termodinámicas; la reacción puede proceder en el sentido  $P \rightarrow S$  si se la inicia en presencia de P y con  $[S] = 0$ .

La relación de Haldane también puede reemplazarse en la ecuación 3.49, lo cual brinda otro resultado interesante. Comencemos por sacar divisor común en el denominador:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}}}{1 + \frac{[S]}{K_{M,S}} + \frac{[P]}{K_{M,P}}} = \frac{V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}}}{\frac{K_{M,S}K_{M,P} + K_{M,P}[S] + K_{M,S}[P]}{K_{M,S}K_{M,P}}} \quad (3.63)$$

Ahora llevemos  $K_{M,S}$  al numerador:

$$v_{neta} = \frac{K_{M,S} \left( V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}} \right)}{\frac{K_{M,S}K_{M,P}}{K_{M,P}} + \frac{K_{M,P}[S]}{K_{M,P}} + \frac{K_{M,S}[P]}{K_{M,P}}} \quad (3.64)$$

Simplificando y reordenando en el denominador:

$$v_{neta} = \frac{K_{M,S} \left( V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}} \right)}{K_{M,S} + [S] + \frac{K_{M,S}[P]}{K_{M,P}}} = \frac{K_{M,S} \left( V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}} \right)}{K_{M,S} \left( 1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.65)$$

Distribuyamos  $K_{M,S}$  en el numerador y simplifiquemos:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d}[S] - V_{max,r} \frac{K_{M,S}[P]}{K_{M,P}}}{K_{M,S} \left( 1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.66)$$

Seguidamente, multipliquemos y dividamos por  $V_{max,d}$  en el numerador y luego simplifiquemos:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d}[S] \frac{V_{max,d}}{V_{max,d}} - V_{max,r} \frac{K_{M,S}[P]}{K_{M,P}} \frac{V_{max,d}}{V_{max,d}}}{K_{M,S} \left( 1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} = \frac{V_{max,d} \left( [S] - [P] \frac{V_{max,r} K_{M,S}}{V_{max,d} K_{M,P}} \right)}{K_{M,S} \left( 1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.67)$$

Si comparamos el segundo miembro del numerador con la relación de Haldane (3.60) vamos a notar que

$$\frac{V_{max,r} K_{M,S}}{V_{max,d} K_{M,P}} = \frac{V_{max,r}}{K_{M,P}} = \frac{1}{K_{eq}} \quad (3.68)$$

De este modo, si reemplazamos 3.68 en 3.67, la ecuación que finalmente nos queda es:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d} \left( [S] - \frac{[P]}{K_{eq}} \right)}{K_{M,S} \left( 1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.69)$$

Esta ecuación es una forma muy útil de escribir la ecuación de Michaelis-Menten reversible ya que destaca, por un lado, el parecido con la ecuación de Michaelis-Menten para la  $v_0$  (3.17) y por otro lado, evidencia dos cosas fundamentales. En el numerador, evidencia que la  $v_{neta}$  depende de cuán desplazada del equilibrio esté la reacción. Llamemos a lo que tenemos dentro del paréntesis del numerador de 3.69 como *grado de desplazamiento del equilibrio* y simbolicémoslo como  $\rho$ . Si allí reemplazamos  $K_{eq}$  por la relación de concentraciones de S y P en el equilibrio (ecuación 3.58), obtenemos lo siguiente:

$$\rho = [S] - \frac{[P]}{K_{eq}} = [S] - \frac{[P]}{\frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}}} \therefore$$

$$\rho = [S] - [S]_{eq} \frac{[P]}{[P]_{eq}} \quad (3.70)$$

Asumiendo que iniciamos la reacción con S y en ausencia de P, la misma se producirá necesariamente en el sentido  $S \rightarrow P$ , independientemente de su valor de  $K_{eq}$ . A medida que transcurre la reacción [S] se aproximará a  $[S]_{eq}$ , y por lo tanto irá disminuyendo desde su valor inicial. Recíprocamente, a medida que se vaya produciendo P, [P] se irá incrementando y se irá aproximando a  $[P]_{eq}$ . Es importante notar que ni [S] podrá disminuir más que el valor de  $[S]_{eq}$  ni [P] podrá aumentar más allá de  $[P]_{eq}$ , ya que estos son los límites termodinámicos del sistema. Por lo tanto, a medida que [S] disminuya y [P] aumente,  $\rho$  tenderá a cero.

Vale la pena recordar aquí que la condición termodinámica para que una reacción se produzca es que su  $\Delta G'$  sea menor que cero. El valor de  $\Delta G'$  surge de:

$$\Delta G' = -RT \ln \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} + RT \ln \frac{[P]}{[S]} \quad (3.71)$$

Como puede verse, cuanto más desplazada del equilibrio esté una reacción, más negativo será su  $\Delta G'$  y por lo tanto, más favorable será termodinámicamente. Pero esto nada nos dice de su velocidad, ya que, como venimos insistiendo, la relación 3.71 se cumple independientemente de la presencia de la enzima, y además no incluye explícitamente al tiempo. Sin embargo, si reemplazamos 3.70 en 3.69 veremos que el grado de desplazamiento del equilibrio también determina en forma directa la  $v_{neta}$ :

$$v_{neta} = V_{max,d} \frac{\rho}{K_{M,S} \left( 1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.72)$$

Por otra parte, si miramos en el denominador de 3.69 y 3.72, notaremos que se parece mucho al denominador de la ecuación de Michaelis-Menten directa (3.17) excepto que  $K_{M,S}$  aparece multiplicado por un factor mayor que 1. El valor de este factor depende de [P] y de la afinidad de la enzima por P. Dado que P puede acceder también al sitio activo de la enzima, bloquea en parte los sitios accesibles para S. Por lo tanto, el efecto que se produce por la presencia de P es disminuir el valor de  $K_M$  ya que ahora se necesita mayor [S] para alcanzar la misma  $v_0$  que si P no estuviera. Sin embargo, la presencia de P no afecta el valor de  $V_{max}$ , ya que al ser la unión de P al sitio activo reversible, P puede ser desplazado del sitio activo aumentando suficientemente la [S]. Ya que estrictamente el  $K_{M,S}$  no se modifica por la

presencia de P, hablamos de  $K_{M,S}$  *aparente* y lo podemos simbolizar  $K_{M(ap),S}$ . Reemplazando, 3.72 queda expresada entonces como

$$v_{neta} = V_{max,d} \frac{\rho}{K_{M(ap),S} + [S]} \quad (3.73)$$

donde ahora vemos claramente cómo la  $v_{neta}$  depende del grado de desplazamiento del equilibrio y de la afinidad de P por el sitio activo de la enzima.

## Preguntas

- 1) ¿Cuáles son los aspectos característicos de las reacciones enzimáticas?
- 2) ¿Es cierto que todas las enzimas conocidas son de naturaleza proteica?
- 3) ¿Qué propiedades presentan las enzimas que las diferencian de otros catalizadores?
- 4) ¿Qué tipo de interacciones se ejercen entre la enzima y el sustrato para formar el complejo ES?
- 5) ¿A qué es igual la constante de Michaelis, de qué depende?
- 6) Defina  $K_S$  y  $k_{cat}$ .
- 7) Cuál es la diferencia entre el complejo activado y el complejo enzima-sustrato?
- 8) Para una reacción  $A \rightarrow B$  defina las condiciones en que  $K_M = K_S$ . Describa condiciones bajo las cuales esto no es cierto.
- 9) ¿Cuál es la aproximación del estado estacionario y bajo qué condiciones es válida?
- 10) ¿Cuál es el orden de reacción, con respecto al sustrato, de una reacción enzimática monosustrato?
- 11) ¿Bajo qué condiciones podemos asegurar que medimos velocidades iniciales?
- 12) ¿En cuánto tiempo se alcanza la  $V_{max}$ ?
- 13) ¿Cómo varía la velocidad inicial para  $[S] \ll K_M$  y para  $[S] \gg K_M$ ? ¿Qué utilidad tiene trabajar en cada una de estas condiciones?
- 14) ¿Cuál estimaría que fuese la concentración del sustrato fisiológica de las enzimas?
- 15) ¿Qué es el número de recambio?

## Problemas

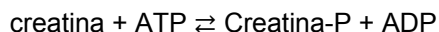
### Problema 1

Para una reacción catalizada por una enzima michaeliana:

- a- Dibuje un gráfico de velocidad de reacción en función del tiempo.
- b- Haga lo mismo para la velocidad inicial en función de la concentración del sustrato.
- c- Idem para velocidad inicial vs. concentración de enzima.

## Problema 2

La creatina quinasa cataliza la siguiente reacción:



a- De acuerdo al valor de  $K_{eq}$ , en una mezcla de creatina, ATP, creatina-P y ADP en equilibrio a pH 8,0 un 87% de la creatina se encuentra como creatina-P. Si a esta mezcla se le agrega la creatina quinasa (sin cambiar las otras condiciones), ¿podría predecir qué porcentaje de creatina-P habrá luego de una hora de reacción?

b- Si luego de alcanzado el equilibrio se agrega creatina-P marcada con  $^{32}\text{P}$ , ¿se introducirá  $^{32}\text{P}$  en el ATP?

c- El  $K_M$  de esta enzima por la creatina es  $1,6 \times 10^{-2}$  M. ¿Qué significado físico tiene este valor? ¿Como podría aumentar el  $K_M$  (creatina)?

## Problema 3

En diez mezclas de reacción conteniendo la misma concentración de enzima y distintas concentraciones de sustrato, se determinaron las velocidades iniciales:

Sustrato (M)	$v_o$ ( $\mu\text{moles min}^{-1}$ )
$1,0 \cdot 10^{-3}$	65
$5,0 \cdot 10^{-4}$	63
$1,0 \cdot 10^{-4}$	51
$5,0 \cdot 10^{-5}$	42
$3,0 \cdot 10^{-5}$	33
$2,0 \cdot 10^{-5}$	27
$1,0 \cdot 10^{-5}$	17
$5,0 \cdot 10^{-6}$	9,5
$1,0 \cdot 10^{-6}$	2,2
$5,0 \cdot 10^{-7}$	1,1

Utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk, determine gráficamente  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$ . Tenga en cuenta que uno de los factores críticos en la seguridad de esta determinación es la escala elegida para ordenada y abscisa. ¿Qué rango de concentración de sustrato es más útil para estas determinaciones?

## Problema 4

En un experimento similar al anterior, se obtuvieron los datos de la tabla que se muestra en la página siguiente.

Grafique  $v_o$  en función de  $v_o/[S]$ . Determine  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$ . ¿Cuál es la ventaja de este tipo de gráfica con respecto al gráfico de la doble recíproca?

Sustrato (M)	$v_o$ ( $\mu\text{moles min}^{-1}$ )
$4,0 \cdot 10^{-4}$	130
$2,0 \cdot 10^{-4}$	110
$1,0 \cdot 10^{-4}$	89
$5,0 \cdot 10^{-5}$	62
$4,0 \cdot 10^{-5}$	53
$2,5 \cdot 10^{-5}$	38
$2,0 \cdot 10^{-5}$	32

### Problema 5

Se estudió la dependencia de la velocidad de una reacción enzimática con la concentración de sustrato. Se midieron en un volumen de reacción de 10 ml, las velocidades iniciales a distintas concentraciones de sustrato y concentración constante de enzima:

Sustrato (M)	$v_o$ ( $\mu\text{moles min}^{-1}$ )
$5,0 \cdot 10^{-2}$	0,25
$5,0 \cdot 10^{-3}$	0,25
$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,25
$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,20
$5,0 \cdot 10^{-6}$	0,071
$5,0 \cdot 10^{-7}$	0,0096

a) ¿Cómo determina los valores de  $v_o$ ?

Utilizando cálculos numéricos (no gráficos) conteste lo siguiente:

b) ¿Cuáles son los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_M$ ?

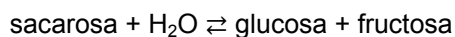
c) ¿Cuáles son las velocidades iniciales a  $[S] = 1,0 \cdot 10^{-6}$  M y  $1,0 \cdot 10^{-1}$  M?

d) Calcule la cantidad total de producto producido durante los primeros 5 minutos a  $[S] 2,0 \cdot 10^{-3}$  M. ¿Puede hacer el mismo cálculo a  $[S] 2,0 \cdot 10^{-6}$  M?

e) Suponga que la concentración de enzima en cada mezcla de reacción se incrementa en un factor de 4. ¿Cuál será el valor de  $K_M$ ? y de  $V_{m\acute{a}x}$ ? ¿Cuál será el valor de  $v_o$  a  $[S] 5,0 \cdot 10^{-6}$  M?

### Problema 6

Se desea medir parámetros cinéticos de la invertasa en un extracto de levadura comercial. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Para ello se realiza el experimento diagramado a continuación:

	Mezcla de reacción 1	Mezcla de reacción 2	Mezcla de reacción 3
Buffer Ac. acético-acetato Na 0,02 M pH 4,77	2 ml	2 ml	2 ml
Sacarosa 0,5 M	-	-	2 ml
Sacarosa 0,05 M	2 ml	4 ml	-
Extracto enzimático	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Agua	5,6 ml	3,6 ml	5,6 ml

Las tres mezclas de reacción se incubaron a 20 °C tomándose muestras de 1 ml a tiempos 2', 5' 7' y 10' de incubación. Sobre las muestras se midió la actividad de la enzima. Los resultados se expresan como  $\mu\text{moles}$  de sacarosa transformada en 10 ml de mezcla de reacción:

Tiempo	$\mu\text{moles}$ sacarosa transformada/10 ml mezcla reacción		
	M.R. 1	M.R. 2	M.R. 3
2'	1,6	2,0	3,9
5'	3,7	4,5	9,0
7'	5,5	6,3	12,6
10'	5,5	9,0	18,2

- Calcule, con estos datos,  $V_{\text{máx}}$  y  $K_M$  a partir de un gráfico  $1/v_o$  en función de  $1/[S]$ .
- Calcule las unidades de invertasa contenidas en los 0,4 ml de extracto enzimático, de acuerdo a una unidad de actividad enzimática que Ud. debe definir previamente.
- ¿Puede calcular la actividad específica de la invertasa en el extracto enzimático? Explique.

### Problema 7

Los siguientes datos se registraron para la reacción  $S \rightleftharpoons P$  catalizada enzimáticamente:

[S] (M)	$v_o$ (nmoles l <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
$6,25 \times 10^{-6}$	15,00
$7,50 \times 10^{-5}$	56,25
$1,00 \times 10^{-4}$	60,00
$1,00 \times 10^{-3}$	74,90
$1,00 \times 10^{-2}$	75,00

a- Determinar  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_M$

b-¿Cuál sería  $v_o$  si  $[S] = 2,5 \cdot 10^{-5}$  M?

b1-¿Cuál sería  $v_o$  si  $[S] = 5,0 \cdot 10^{-5}$  M?

b2-¿Cuál sería  $v_o$  si  $[S] = 2,5 \cdot 10^{-5}$  M y la concentración de enzima es el doble de la original?

c-¿Cuál es la concentración de enzima libre cuando  $[S]$  es  $1,00 \cdot 10^{-2}$  M?

d- ¿Cuál es la concentración de enzima libre cuando  $[S]$  es  $6,25 \cdot 10^{-6}$  M?

e- La  $v_o$  dada en la tabla anterior se determinó midiendo la concentración de producto acumulado en un período de 10 min. ¿Es válida la suposición de que estos valores de  $v_o$  representan las velocidades iniciales en todo el rango de  $[S]$ ?

f- Defina una unidad enzimática para este sistema y calcule la actividad en la mezcla de incubación.

## Bibliografía

Cornish-Bowden A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Londres: Wiley-Blackwell.

Dixon, M., Webb, E.C. (1980) *Enzymes* New York: Academic Press.

Fell D. (1996) *Understanding the Control of Metabolism*. Londres: Portland Press.

Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley & Sons.

Segel I.W. (1982) *Cálculos de Bioquímica*, 2da. edición. Zaragoza: Editorial Acribia.

Voet D., Voet J (2006) *Bioquímica*, 3ra. edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.



# CAPÍTULO 4

## Inhibición y Activación Reversibles

*Aníbal R. Lodeiro*

*...Y deberás crear  
si quieres ver tu tierra en paz*

LUIS ALBERTO SPINETTA, QUEDÁNDOTE O YÉNDOTE

La enorme mayoría de las enzimas son proteínas, si bien se conocen algunos (e importantes) ejemplos de ARN catalíticos. Como sabemos, las proteínas son muy complejas y sus estructuras tridimensionales presentan una enorme diversidad tanto en sus formas, como en sus tamaños, sus grados de agregación y su asociación con cofactores o grupos prostéticos. Además, estas estructuras no son rígidas, sino que en solución tienen cierta flexibilidad gracias a la cual pueden modificar su conformación sin desnaturalizarse. Dado que el sitio activo es parte integral de esta estructura compleja y flexible, él también puede modificar su conformación, lo cual puede traducirse en la aceptación de otras moléculas (que pueden ser más o menos parecidas al sustrato) por dicho sitio activo.

Uno de los biólogos evolutivos más importantes del siglo pasado fue Theodosius Dobzhansky, quien acuñó una famosa frase: *“nada en la Biología tiene sentido excepto a la luz de la Evolución”*. Esta frase tiene un profundo sentido no sólo científico sino también político. Aunque a muchos les pueda parecer raro, en EEUU existen círculos académicos muy atrasados que aún al día de hoy siguen sin aceptar la Teoría de la Evolución y en su lugar reivindican el “creacionismo”, que es más o menos una interpretación literal de la Biblia según la cual Dios creó a todos los seres vivos tal como los conocemos, si bien algunas especies se fueron extinguiendo a lo largo de los milenios. Estos grupos no son para nada marginales, sino que permanecen activos en varias universidades, sobre todo del sur del país, donde incluso han llegado a lograr que se prohíba hablar de evolución. Es por eso que la frase de Dobzhansky apuntó sobre todo al corazón del creacionismo diciéndoles, diplomáticamente, que sus creencias no pertenecen al ámbito de la Biología.

Nosotros podemos retomar la frase de Dobzhansky en su sentido científico para hacernos algunas preguntas. Claramente, el resultado de la evolución por selección natural es la adaptación. Algunos dicen que no es muy de científicos andar por la vida diciendo que lo que existe es así porque se adaptó, ya que es obvio que lo que no existe no está porque no se adaptó. Es decir, no podemos proponer un experimento que sea capaz de contradecir que lo

que existe es así porque se adaptó, pero de todos modos esa idea nos puede iluminar la interpretación y el análisis de todos los fenómenos biológicos mucho mejor que la –igualmente anticientífica– idea de que lo que existe es así porque así lo dispuso Dios. Por lo tanto, podríamos hacernos la siguiente pregunta: ¿cuál es el valor adaptativo de un sitio activo flexible en vez de uno rígido? Uno podría pensar que sería “mejor” (más adaptativo) que los sitios activos sean rígidos o al menos más rígidos que el resto de la estructura de las proteínas, porque eso les permitiría una mayor robustez<sup>4</sup> en la catálisis. Sin embargo, la observación indica que los sitios activos son flexibles. ¿Por qué? ¿cuál es la ventaja adaptativa de que sean flexibles? Para responder a esta pregunta, retornemos al ejemplo de tener que salir corriendo porque se larga la tormenta. Salimos corriendo, lo cual es posible gracias a que se acelera en nuestros músculos la velocidad de oxidación de la glucosa a CO<sub>2</sub>, lo que requiere que cierto grupo de enzimas que estaba catalizando reacciones a una dada  $v_{neta}$  cuando estábamos sentados se acelere y ahora catalice esas mismas reacciones a una  $v_{neta}$  mucho mayor. Al cabo de correr algunos metros, o cuerdas, encontramos refugio bajo techo y nos sentamos a descansar. ¿Qué pasa entonces con esas enzimas? ¿Siguen catalizando la oxidación de la glucosa a CO<sub>2</sub> a la misma  $v_{neta}$  que cuando corríamos? Si lo hicieran, seguiríamos transpirando, generaríamos calor y eventualmente, nuestros músculos empezarían a temblar. Quiere decir que es una buena adaptación que nuestras enzimas puedan modificar **repentinamente** su velocidad de catálisis. Sin que nos demos cuenta, la velocidad de catálisis también se va controlando sutilmente en todas nuestras vías metabólicas de acuerdo a las necesidades existentes en tiempo real. Por ejemplo, no hacemos lo mismo con la glucosa y los aminoácidos antes o después de comer, despiertos o dormidos, alertas o relajados. Además, las situaciones que atravesamos no son tan binarias: por ejemplo, podemos estar alertas antes o después de comer. De modo tal que es necesario **modular** la actividad de las enzimas. La flexibilidad del sitio activo sin dudas juega un papel en este control de la actividad enzimática, pero “algo” tiene que aprovechar y conducir esa flexibilidad para dar por resultado distintos niveles de actividad acordes a las necesidades del momento. Ese “algo” son pequeñas moléculas, que pueden o no estar estructuralmente relacionadas con los sustratos, y que en general se conocen como *efectores*.

Además de estos efectores producidos por nosotros mismos, hay otro conjunto de sustancias que no son producidas por nuestro cuerpo y por lo tanto no participan del control de la actividad de nuestras enzimas, pero que si son administradas desde afuera pueden también perturbar la actividad enzimática, en muchos casos inhibiéndola. En general, las sustancias que tienen esta característica son tóxicas y pueden producir perturbaciones graves e incluso la muerte, como es el caso del cianuro, que inhibe uno de los últimos pasos de la oxidación completa de la glucosa. Otras sustancias no actúan en contra nuestra pero sí en contra de bacterias patógenas, como por ejemplo los antibióticos, que inhiben enzimas claves para la biosíntesis de la pared celular en las bacterias, o para sus procesos de transcripción y

---

<sup>4</sup> El concepto de *robustez* también es importante en Biología. Se refiere a la capacidad de un sistema biológico de ejecutar una actividad en forma consistente frente a perturbaciones en el entorno.

traducción. Asimismo, muchos medicamentos son efectores más o menos artificiales de la actividad de determinadas enzimas, tanto humanas como de patógenos.

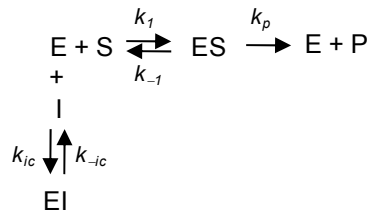
Por lo tanto, los efectores, ya sean endógenos o exógenos, pueden inhibir o activar enzimas modificando su actividad catalítica, y por lo tanto los distinguimos entre *inhibidores* o *activadores* respectivamente, sin importar si son producidos en forma endógena o no. Comenzaremos estudiando los inhibidores.

## Inhibidores

En términos generales, un *inhibidor* será una sustancia capaz de disminuir la  $v_{\text{neta}}$ . Sin embargo, existen muchas variantes. Para empezar, un inhibidor puede ser reversible o irreversible, dependiendo de cómo se una a la enzima. Dentro de los inhibidores reversibles, a su vez, hay distintos tipos de acuerdo a qué lugar de la estructura de la enzima constituya su sitio de unión. Si se unen al sitio activo, competirán por él con el sustrato y por lo tanto, serán *inhibidores competitivos*. Hay otros que además se pueden unir al sitio activo cuando éste ya unió al sustrato, produciendo distintos efectos sobre los parámetros cinéticos, según los cuales se los conoce como *inhibidores acompetitivos*, *de tipo mixto* y *no-competitivos*. Finalmente, los inhibidores también pueden distinguirse por el grado en el que bloquean la actividad enzimática. Algunos, cuando se unen a la enzima, forman un complejo que es incapaz de producir P y por lo tanto, se los conoce como *inhibidores lineales*. Otros forman complejos que poseen una actividad reducida pero no nula de producción de P y por ello se los llama *inhibidores parciales* o *hiperbólicos*. Estas clases están superpuestas a las que mencionamos anteriormente (p. ej. un inhibidor puede ser reversible, competitivo y lineal) con lo cual la variedad de efectos es muy grande. A continuación analizaremos los inhibidores lineales reversibles y luego haremos mención de los irreversibles. Los conceptos que vamos a exponer a continuación pueden asimismo aplicarse a los inhibidores hiperbólicos.

### Inhibidores Competitivos

Estos inhibidores son moléculas que se unen de tal manera a la enzima que bloquean el acceso del sustrato al sitio activo. Muchos de ellos tienen una estructura similar a la del sustrato y por lo tanto son reconocidos y unidos por la enzima con una afinidad similar, pero otros pueden unirse en la vecindad del sitio activo y “taponarlo” de tal manera que se impida la unión del sustrato. Como la unión de este tipo de inhibidores es reversible y alternativa a la unión del sustrato, una alta [S] puede desplazar el equilibrio hacia la formación de complejo ES y por lo tanto la  $V_{\text{max}}$  no varía en presencia o ausencia del inhibidor. Simbolizando al inhibidor como I, el esquema de la reacción para la condición **inicial** en presencia de I es el siguiente:



Aquí,  $k_{ic}$  y  $k_{-ic}$  simbolizan las constantes cinéticas de asociación y disociación, respectivamente, del inhibidor competitivo a la enzima para formar el complejo enzima-inhibidor, que como puede verse, es inactivo, es decir, no puede reaccionar para producir P.

Por lo tanto, ahora vamos a tener tres combinaciones diferentes para la enzima: la enzima libre (E), el complejo enzima-sustrato (ES) y el complejo *enzima-inhibidor* (EI), que se agrega a los considerados anteriormente para sumarse a la cantidad total de enzima. Dado que EI es inactivo catalíticamente, lo único que puede hacer es disociarse nuevamente a E + I. Por lo tanto, en este caso indudablemente se establecerá un equilibrio entre E, I y EI y se podrá definir la constante del inhibidor competitivo  $K_{ic}$  como la inversa de la  $K_{eq}$ :

$$\frac{1}{K_{eq}} = K_{ic} = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-ic}}{k_{ic}} \quad (4.1)$$

Asimismo, la  $v_0$  dividida la  $[E_T]$  (cf. ecuación 3.4) puede ahora expresarse como:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES] + [EI]} \quad (4.2)$$

la cual, reemplazando [ES] y [EI], nos queda:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_M} [E]}{[E] + \frac{[S]}{K_M} [E] + \frac{[I]}{K_{ic}} [E]} \quad (4.3)$$

Ahora podemos hacer lo mismo que antes (cf. ecuaciones 3.8-3.9) simplificando [E] y multiplicando numerador y denominador por  $K_M$ :

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_{ic}}} \quad (4.4)$$

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)} \quad (4.5)$$

Finalmente, pasando  $[E_T]$  al otro miembro y reemplazando  $k_p [E_T]$  por  $V_{max}$ , queda:

$$v_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{Ic}}\right)} \quad (4.6)$$

Analicemos ahora un poco la ecuación 4.6: es prácticamente igual que la ecuación de Michaelis-Menten (3.17) salvo que  $K_M$  está multiplicado por un factor mayor que 1, que depende de la  $[I]$  y de la constante del inhibidor competitivo,  $K_{Ic}$ , la cual representa la afinidad del inhibidor por la enzima libre. Esto ya lo vimos, en la ecuación de Michaelis-Menten reversible (3.69), donde  $K_M$  estaba multiplicado por el mismo factor, con  $[P]$  y  $K_{M,P}$  en vez de  $[I]$  y  $K_{Ic}$ . O sea que la competición por el sitio activo, ya sea ejercida por P o por I sobre S, nos lleva a la misma expresión para la disminución de la afinidad, con lo cual aquí también podemos hablar de un  $K_M$  aparente ( $K_{M(ap)}$ ) y reescribir 4.6 así:

$$v_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_{M(ap)}} \quad (4.7)$$

Esto, por un lado, resalta el parecido con la ecuación de Michaelis-Menten (3.17) y por otro lado, nos señala claramente que la  $V_{max}$  no cambia en presencia del inhibidor. ¿Es lógico que esto sea así? Si miramos de vuelta el esquema de reacciones, vamos a ver que la enzima libre E tiene dos caminos alternativos: o bien se une a S o bien se une a I. En ambos casos, la formación de los complejos ES o EI son reacciones reversibles, de modo que si aumentamos  $[S]$  que a una  $[I]$  fija, podremos desplazar el equilibrio hacia la formación de ES. Si llevamos  $[S]$  a una concentración infinitamente alta, en teoría podríamos desplazar el equilibrio totalmente (asintóticamente) hacia la formación de ES, con lo cual, siempre en teoría, podríamos llegar a la situación en la que toda la enzima esté como complejo ES, en cuyo caso alcanzaríamos la  $V_{max}$ . Es por eso también que este tipo de inhibición se conoce como *inhibición competitiva*.

En la Fig. 4.1a se muestran las curvas de  $v_0$  vs  $[S]$  en presencia o ausencia de un inhibidor competitivo, donde puede apreciarse cómo el  $K_{M(ap)}$  es mayor que el  $K_M$  mientras que la  $V_{max}$  tiende a la misma asíntota. Debe recalarse, sin embargo, que cuando hablamos de  $K_{M(ap)}$  no estamos diciendo que el  $K_M$  cambió. El  $K_M$  no cambia porque la unión de S al sitio activo sigue siendo igual; lo que ocurre es que algunos sitios activos están bloqueados reversiblemente, es decir, es como si hubiera “menos” sitios activos, con lo cual la  $[S]$  necesaria para alcanzar una dada fracción de la  $V_{max}$  es mayor que si no hubiera inhibidor.

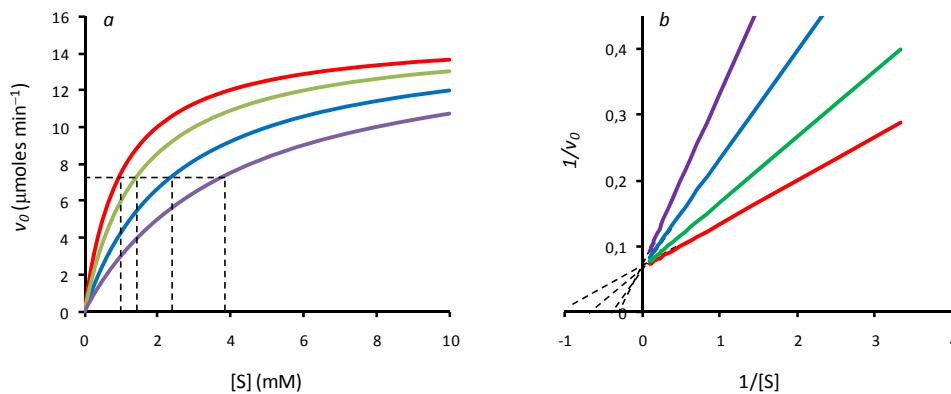
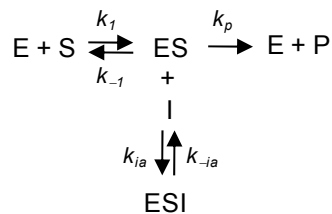
Teniendo en cuenta estas consideraciones, podemos ver que si nos manejamos con el  $K_{M(ap)}$  es fácil calcular el valor de  $K_{Ic}$ , ya que

$$K_{M(ap)} = 1 + \frac{[I]}{K_{Ic}} \quad (4.8)$$

Recordemos que al hablar de  $v_o$  en general nos estamos refiriendo a condiciones **iniciales** que ocurren *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo. Bajo esas condiciones, tanto [S] como [I] son conocidas, ya que nosotros decidimos qué concentraciones utilizar en el ensayo. Por lo tanto, usando cualquiera de los métodos de linealización podemos encontrar el valor de  $K_{M(ap)}$  y a partir de él, y conociendo [I], despejar  $K_{ic}$ . Así,  $-1/K_{M(ap)}$  será el punto donde la recta de la doble recíproca corta al eje de las abscisas,  $-K_{M(ap)}$  será el punto donde la recta de la representación de Hanes-Wolfe corta al eje de las abscisas,  $-K_{M(ap)}$  será la pendiente de la recta en la representación de Eadie-Hofstee, y  $K_{M(ap)}$  podrá encontrarse como la coordenada sobre el eje de las abscisas del punto de intersección de todas las rectas de la representación lineal directa (Fig. 3.3-3.6). A título de ejemplo, se muestra en la Fig. 4.1b el gráfico de la doble recíproca con y sin inhibidor.

## Inhibidores Acompetitivos

Este tipo de inhibidores podrían considerarse como el otro extremo de los inhibidores competitivos. Aquí, en vez de unirse a la enzima libre, el inhibidor se une reversiblemente al complejo ES, dando como resultado nuevamente un complejo ESI inactivo. Es decir, existe un *orden secuencial* en la unión de cada ligando: primero debe unirse el sustrato para que luego pueda unirse el inhibidor, ya que éste es incapaz de unirse a la enzima libre. En otras palabras, solo el complejo ES posee el sitio adecuado para la unión del inhibidor. El esquema de reacciones será, esta vez:



**Fig. 4.1.** Representación gráfica de  $v_o$  vs [S] (a) y doble recíproca (b) de la enzima de la Fig. 3.1 en presencia de un inhibidor competitivo a las siguientes concentraciones: 0 mM (rojo), 0,5 mM (verde), 1,5 mM (azul) o 3,0 mM (violeta).  $K_{ic}$ : 1,0 mM. Las líneas punteadas muestran la extrapolación a los valores de  $K_{M(ap)}$  (a) o  $1/V_{max(ap)}$  y  $-1/K_{M(ap)}$  (b).

Como antes, podemos considerar que la unión del inhibidor al complejo ES para dar el complejo inactivo ESI constituye un equilibrio, ya que dicho complejo no produce P. Así, la inversa de la constante de equilibrio representa la correspondiente constante del inhibidor acompetitivo,  $K_{Ia}$ :

$$\frac{1}{K_{eq}} = K_{Ia} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} = \frac{k_{-ia}}{k_{ia}} \quad (4.9)$$

Por lo tanto, si reemplazamos [ES] por  $[E][S]/K_M$ :

$$[ESI] = \frac{[I]}{K_{Ia}} [ES] = \frac{[I][S]}{K_{Ia} K_M} [E] \quad (4.10)$$

Ahora podemos escribir la ecuación de la  $v_0$  considerando que la  $[E_T]$  se compone de la suma de las concentraciones [E], [ES] y [ESI], y simplificando [E] como antes:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[S][I]}{K_M K_{Ia}}} \quad (4.11)$$

Multiplicando numerador y denominador por  $K_M$  y simplificando:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p [S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{Ia}}\right)} \quad (4.12)$$

Finalmente, si reemplazamos  $k_p [ET]$  por  $V_{max}$ , y dividimos numerador y denominador por  $(1 + [I]/K_{Ia})$  de modo de dejar [S] sin afectar por ningún coeficiente,

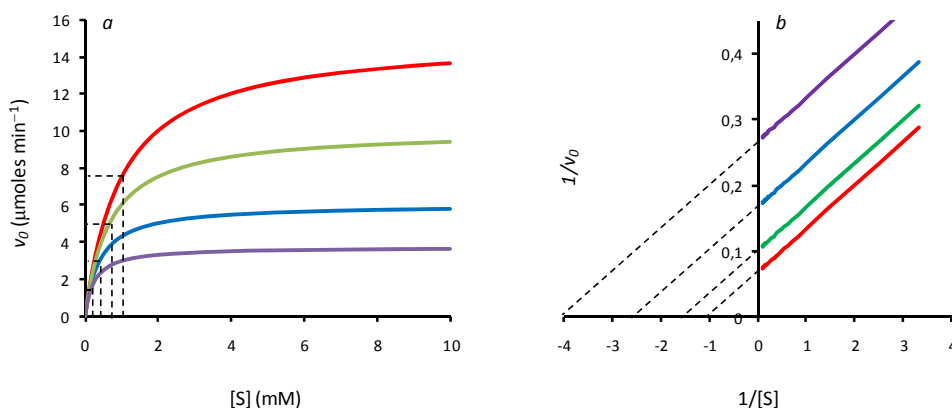
$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ia}}\right)} [S]}{\frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ia}}\right)} + [S]} \quad (4.13)$$

Es decir que ahora el factor  $(1 + [I]/K_{Ia})$  afecta tanto a  $V_{max}$  como a  $K_M$ , y por lo tanto, podríamos considerar que hay una  $V_{max}$  aparente ( $V_{max(ap)}$ ) y una  $K_M$  aparente ( $K_{M(ap)}$ ):

$$v_0 = V_{max(ap)} \frac{[S]}{K_{M(ap)} + [S]} \quad (4.14)$$

Otra vez, la ecuación se parece a la de Michaelis-Menten sin inhibidor, pero ahora hay que observar que la  $K_{M(ap)}$  no está aumentada respecto a la  $K_M$  sin inhibidor, sino que está **disminuida**. Esto significaría que la presencia del inhibidor “aumentó” la afinidad de la enzima por S. Esto obviamente no es así; en primer lugar, lo que ocurre es que la unión de S a la enzima sigue siendo la misma, razón por la cual la  $K_M$  no varía, pero en segundo lugar, la unión del inhibidor a ES secuestra complejo ES previamente formado, disminuyendo así la [ES] efectiva, lo que da origen a una menor  $V_{max}$  pero también a una menor [S] necesaria para alcanzar una dada fracción de la  $V_{max}$ . Como I se une al ES preformado, por más que aumentemos [S] nunca vamos a alcanzar la  $V_{max}$ . Es por estas razones que se ha propuesto cambiar el rótulo de “acompetitivo” —que en realidad, es bastante raro y no dice mucho acerca del mecanismo de inhibición— y denominar a este tipo de inhibidores como *inhibidores catalíticos*, para hacer notar que se unen al complejo catalítico ES.

De la misma manera que explicamos para los inhibidores competitivos, conociendo la [I] podemos calcular la  $K_{Ia}$  usando cualquiera de los métodos de linealización a partir de las extrapolaciones a los valores de  $K_{M(ap)}$  y  $V_{max(ap)}$ . Como ejemplos, en la Fig. 4.2 se presentan las gráficas de  $v_0$  vs [S] y la doble recíproca para este tipo de inhibidores.

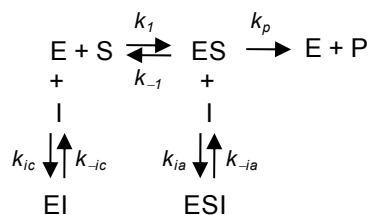


**Fig. 4.2.** Representación gráfica de  $v_0$  vs [S] (a) y doble recíproca (b) de la enzima de la Fig. 3.1 en presencia de un inhibidor acompetitivo a las siguientes concentraciones: 0 mM (rojo), 0,5 mM (verde), 1,5 mM (azul) o 3,0 mM (violeta).  $K_{Ic}$ : 1,0 mM. Las líneas punteadas muestran la extrapolación a los valores de  $K_{M(ap)}$  (a) o  $1/V_{max(ap)}$  y  $-1/K_{M(ap)}$  (b).

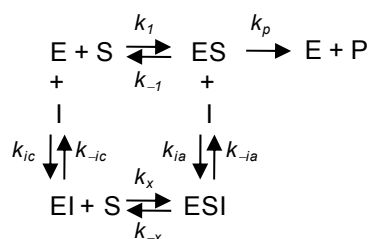
## Inhibidores de Tipo Mixto

Los inhibidores de tipo mixto reciben este nombre porque combinan las propiedades de los inhibidores competitivos y los acompetitivos, ya que pueden unirse tanto a la enzima libre como al complejo ES. De este modo, producen dos complejos inactivos en vez de uno: EI y ESI. Dado que se unen a dos formas diferentes de la enzima, es esperable que los equilibrios entre E, I y EI por un lado, y ES, I y ESI por el otro, no tengan necesariamente la misma constante de equilibrio, ya que las especies intervinientes (salvo I) son diferentes. Así, podríamos escribir el siguiente esquema de reacciones:

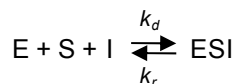




Sin embargo, ya que la unión del inhibidor no sigue un orden obligatorio puesto que puede unirse tanto a E como a ES, lo mismo debería ocurrir con S: no hay razón para suponer que solo podrá unirse a E y no a EI. Por lo tanto, el esquema debería ser así:



¿Qué valores deberían tener entonces las constantes cinéticas marcadas como  $k_x$  y  $k_{-x}$ ? Una clave es que si entendemos toda la reacción de unión del inhibidor a la enzima como un solo equilibrio, el mismo ocurriría entre las formas libres E, S e I y el complejo ESI, yendo por dos caminos: EI y ES. Esquemáticamente, lo podríamos representar así:



Es decir que la constante cinética de la reacción de formación del complejo ESI ( $k_d$ ) debería cualquiera de las dos siguientes:

$$k_d = k_1 k_{ia} \quad (4.15)$$

$$k_d = k_{ic} k_x \quad (4.16)$$

según se tome el camino que pasa por ES (ecuación 4.15) o el que pasa por EI (ecuación 4.16). Análogamente, para la reacción reversa:

$$k_r = k_{-1} k_{-ia} \quad (4.17)$$

$$k_r = k_{-ic} k_{-x} \quad (4.18)$$

Por lo tanto, si proponemos un coeficiente  $\alpha$  tal que  $K_{ia} = \alpha K_{ic}$ , las ecuaciones para el equilibrio entre E, S e I y ESI podrían expresarse como sigue:

$$K_{eq} = K_S \alpha K_{Ic} \quad (4.19)$$

$$K_{eq} = K_{Ic} \alpha K_S \quad (4.20)$$

Es decir, el coeficiente  $\alpha$  debe afectar **ambos caminos por igual**, ya que el equilibrio entre E, S, I y ESI es el mismo, independientemente de por dónde se alcance. Recordando que la constante de afinidad de S es  $K_S = k_{-1}/k_1 = [E][S]/[ES]$ , y así sucesivamente para las otras, de las ecuaciones 4.19-4.20 se deduce que:

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (4.21)$$

$$K_{Ic} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (4.22)$$

$$\alpha K_S = \frac{[EI][S]}{[ESI]} \quad (4.23)$$

$$\alpha K_{Ic} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (4.24)$$

Por lo tanto, si elegimos 4.24 y reemplazamos [ES] por 4.21,

$$[ESI] = \frac{[S][I]}{\alpha K_S K_I} \quad (4.25)$$

Luego, si hacemos los mismos reemplazos que siempre para obtener la ecuación de la  $v_0$ :

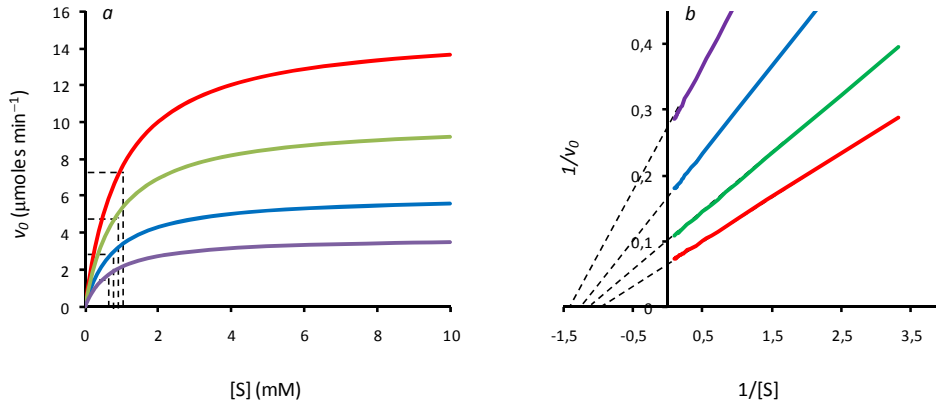
$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[I]}{K_{Ic}} + \frac{[S][I]}{\alpha K_S K_{Ic}}} \quad (4.26)$$

Utilizando la aproximación del estado estacionario, obtenemos la misma ecuación, con  $K_M$  en vez de  $K_S$ , si bien el camino es más largo porque nos encontramos con términos cuadráticos que tenemos que eliminar

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_{Ic}} + \frac{[S][I]}{\alpha K_M K_{Ic}}} \quad (4.27)$$

Si multiplicamos numerador y denominador por  $K_M$  nos queda:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p[S]}{K_M + [S] + K_M \frac{[I]}{K_{Ic}} + \frac{[S][I]}{\alpha K_{Ic}}} \quad (4.28)$$



**Fig. 4.1.** Representación gráfica de  $v_0$  vs  $[S]$  (a) y doble recíproca (b) de la enzima de la Fig. 3.1 en presencia de un inhibidor de tipo mixto a las siguientes concentraciones: 0 mM (rojo), 0,5 mM (verde), 1,5 mM (azul) o 3,0 mM (violeta).  $K_{Ic}$ : 1,5 mM;  $K_{Ia}$ : 1,0 mM. Las líneas punteadas muestran la extrapolación a los valores de  $K_{M(ap)}$  (a) o  $1/V_{max(ap)}$  y  $-1/K_{M(ap)}$  (b).

Ahora podemos pasar  $[E_T]$  al otro miembro, reemplazar  $[E_T] k_p$  por  $V_{max}$  y reordenar el denominador:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{Ic}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_{Ic}}\right)} \quad (4.29)$$

Para que nos quede  $[S]$  sin multiplicar por ningún factor, podemos dividir el numerador y el denominador por  $(1 + [I]/\alpha K_{Ic})$  de manera análoga a como lo hicimos para obtener 4.13:

$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_{Ic}}\right)} [S]}{K_M \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ic}}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_{Ic}}\right)} + [S]} \quad (4.30)$$

o lo que es lo mismo,

$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ia}}\right)} [S]}{K_M \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ic}}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ia}}\right)} + [S]} \quad (4.31)$$

Es decir que ahora  $V_{\max(ap)}$  y  $K_{M(ap)}$  van a ser, respectivamente,

$$V_{\max(ap)} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ia}}\right)} \quad (4.32)$$

$$K_{M(ap)} = K_M \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ic}}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ia}}\right)} \quad (4.33)$$

En este caso, vemos que la  $V_{\max(ap)}$  ha disminuido respecto de  $V_{\max}$  sin inhibidor, pero la  $K_{M(ap)}$  se ha modificado respecto de la  $K_M$  sin inhibidor en una forma que depende de dos constantes de equilibrio:  $K_{Ic}$  y  $K_{Ia}$ . De esta manera, no podemos predecir en qué sentido se va a modificar  $K_{M(ap)}$ : si  $K_{Ic} > K_{Ia}$  o bien  $\alpha < 1$  (es decir, la afinidad del inhibidor es mayor por el complejo ES que por la enzima libre)  $K_{M(ap)}$  será menor que  $K_M$  sin inhibidor. Por el contrario, si  $K_{Ic} < K_{Ia}$  o bien  $\alpha > 1$  (el inhibidor tiene más afinidad por la enzima libre que por el complejo ES), entonces  $K_{M(ap)}$  será mayor que  $K_M$  sin inhibidor. En la sección siguiente trataremos el caso donde  $\alpha = 1$ . Como antes, podemos expresar 4.35 así:

$$v_0 = V_{\max(ap)} \frac{[S]}{K_{M(ap)} + [S]} \quad (4.34)$$

y encontrar los valores de  $K_{Ic}$ ,  $K_{Ia}$  y  $\alpha$  despejando de los  $V_{\max(ap)}$  y  $K_{M(ap)}$  encontrados en las gráficas de linealización (Fig. 4.3).

## Inhibidores No-Competitivos

Este es el caso donde  $\alpha = 1$ , es decir que el inhibidor tiene la misma afinidad por la enzima libre que por el complejo ES. Por lo tanto, para el inhibidor no-competitivo,  $K_{Ic} = K_{Ia}$ , y las ecuaciones 4.33 y 4.36 quedan expresadas de la siguiente manera:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (4.35)$$

$$v_0 = V_{\max(ap)} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (4.36)$$

En este caso solo se modifica la  $V_{\max(ap)}$  respecto de la  $V_{\max}$  sin inhibidor, pero no hay efectos sobre el  $K_M$ . Por esta razón, en un principio este esquema fue tomado como el opuesto

a la inhibición competitiva, y de ahí su nombre. Sin embargo, son muy raros los ejemplos de inhibición no-competitiva en la naturaleza.

## Comparación de los Distintos Tipos de Inhibidores Reversibles

Para visualizar los efectos de los distintos tipos de inhibidor es útil no solo mirar las  $V_{max(ap)}$  y  $K_{M(ap)}$  sino también el cociente  $V_{max(ap)}/K_{M(ap)}$ , ya que el mismo refleja la variación de la constante de especificidad,  $k_A$  (ecuación 3.21). En la Tabla 4.1 se dan las equivalencias de para los distintos tipos de inhibidores.

Puede observarse allí fácilmente que los dos casos extremos son la inhibición competitiva y la incompetitiva, mientras que la inhibición no-competitiva es un caso especial de la inhibición de tipo mixto, con  $K_{Ic} = K_{Ia}$  (o bien  $\alpha = 1$ ). Además, puede verse que siempre que hay un efecto sobre  $V_{max}$  o sobre el cociente  $V_{max}/K_M$  se trata de una reducción de su valor. Cuando  $V_{max(ap)} < V_{max}$  el valor de esta última siempre está dividido por  $(1 + [I]/K_{Ia})$  y nunca interviene  $K_{Ic}$ . Por el contrario, cuando el cociente  $V_{max(ap)}/K_{M(ap)} < V_{max}/K_M$ , el divisor es siempre  $(1 + [I]/K_{Ic})$  y en ningún caso interviene  $K_{Ia}$ .

**Tabla 4.1: Comparación de los distintos tipos de inhibidores**

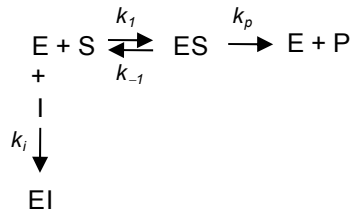
Tipo de inhibidor	$V_{max(ap)}$	$V_{max(ap)}/K_{M(ap)}$	$K_{M(ap)}$
Competitivo	$V_{max}$	$\frac{V_{max}/K_M}{1 + [I]/K_{Ic}}$	$K_M(1 + [I]/K_{Ic})$
Tipo Mixto	$\frac{V_{max}}{1 + [I]/K_{Ia}}$	$\frac{V_{max}/K_M}{1 + [I]/K_{Ic}}$	$\frac{K_M(1 + [I]/K_{Ic})}{1 + [I]/K_{Ia}}$
No-Competitivo <sup>1</sup>	$\frac{V_{max}}{1 + [I]/K_{Ia}}$	$\frac{V_{max}/K_M}{1 + [I]/K_{Ic}}$	$K_M$
Acompetitivo	$\frac{V_{max}}{1 + [I]/K_{Ia}}$	$V_{max}/K_M$	$\frac{K_M}{1 + [I]/K_{Ia}}$

<sup>1</sup>En la inhibición no-competitiva  $K_{Ia} = K_{Ic}$ ; la expresión de la tabla permite apreciar la regularidad de las ecuaciones.

En otras palabras, siempre que la  $V_{max}$  es reducida, el factor que la afecta contiene la constante de afinidad entre el complejo ES y el inhibidor, mientras que el cociente  $V_{max}/K_M$ , que indirectamente involucra a la constante específica  $k_A$ , siempre que es reducido, lo es por un factor que contiene la constante de afinidad entre la enzima libre y el inhibidor. Por último, no se puede apreciar una tendencia clara con el  $K_M$ , pero sí se puede deducir cómo se afecta a partir de la comparación de  $V_{max(ap)}$  y  $V_{max(ap)}/K_{M(ap)}$ .

## Inhibidores Irreversibles

Un inhibidor irreversible lleva a la enzima a un estado permanentemente inactivo. Así, el mecanismo de este tipo de inhibición es muy similar al de la inhibición competitiva, salvo que la etapa de unión del inhibidor a la enzima es irreversible:



donde  $k_i$  es la constante cinética de unión del inhibidor irreversible. A diferencia de la inhibición competitiva, el efecto neto de este tipo de inhibición es disminuir la cantidad de enzima total. Por lo tanto, la  $V_{max}$  se verá **realmente** disminuida, pero el  $K_M$  no se verá afectado.

## Activadores

La activación de enzimas es un proceso esencial en la regulación del metabolismo celular, y ocurre por una diversidad de mecanismos, parte de los cuales serán tratados a continuación y otra parte, en el Cap. 7. De todos modos, haremos aquí un resumen de los aspectos esenciales de la activación de enzimas.

Obviamente no todas las enzimas están activas al mismo tiempo, porque de lo contrario se generaría un caos en la célula. Además, de las enzimas que están activas no todas lo están al 100% de su actividad, ni todas están presentes a la misma concentración, ni todas están presentes en todos los compartimentos celulares, ni todas están presentes en todos los tejidos. Esto que parece una obviedad no lo es tanto si pensamos que todas las células de todos nuestros tejidos tienen exactamente el mismo genoma, es decir que todas nuestras células codifican todas (y las mismas) enzimas. ¿Cómo hace entonces una célula en particular para “elegir” qué enzimas van a estar presentes, de ellas cuáles van a estar activas, de ellas dónde van a estar activas, y de ellas qué nivel de actividad van a tener? La respuesta se cae de maduro: hay una yuxtaposición de mecanismos de activación que van desde la expresión del gen que codifica la enzima hasta el nivel de actividad que la misma va a presentar en determinado momento y lugar.

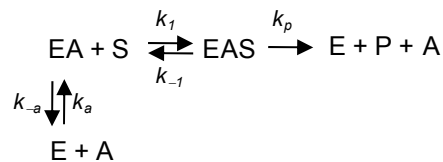
El control genético del nivel de enzima se realiza a dos niveles: la *transcripción/degradación* del ARN mensajero y la *traducción* del ARN mensajero a polipéptido y su *degradación* por proteasas específicas. Estos procesos no solo deciden qué enzimas se producen y cuáles no, sino que también controlan la cantidad de enzima presente. En un segundo nivel está la *ubicación subcelular* de la enzima. A menudo las enzimas (y las proteínas en general) se sintetizan como precursores inactivos que poseen secuencias de aminoácidos específicas que las dirigen a cierto compartimento subcelular, por ejemplo el retículo endoplasmático. Una vez

ubicadas allí, las mencionadas secuencias de aminoácidos se remueven por la acción de endopeptidasas específicas y los precursores se activan. En un tercer nivel está el requerimiento de cofactores: moléculas de naturaleza no proteica que son necesarias para la actividad de ciertas enzimas y deben acoplarse a la estructura polipeptídica para activarla. Estos cofactores o *grupos prostéticos* van desde simples iones metálicos hasta moléculas orgánicas de diversa complejidad como ser vitaminas, grupos hemo, etc. Aun en otro nivel, existen mecanismos de activación/inactivación *reversibles*. En general, podemos mencionar a tres: la modificación covalente, el alosterismo y la acción de activadores. Los dos primeros serán analizados en el Cap. 7 y aquí nos ocuparemos de los activadores.

Estas sustancias, al igual que los inhibidores, son efectores, es decir, pequeñas moléculas que deben unirse a la enzima para que ésta tenga actividad catalítica. De acuerdo con sus mecanismos de acción los podemos clasificar en activadores *esenciales* y *mixtos*.

## Activadores Esenciales

Estos activadores deben unirse primero a la enzima libre para formar un complejo enzima-activador, el cual es el único capaz de unir sustrato para formar el complejo enzima-activador-sustrato catalíticamente activo. Simbolizando al activador como A, el mecanismo de reacción sería el siguiente:



Como puede verse, el mecanismo es bastante parecido al de la inhibición competitiva, con lo cual la ecuación de la  $v_0$  que se deduce del mismo también es muy parecida, salvo que  $K_M$  se afecta por un factor igual a  $(1 + K_{Ae}/[A])$ , donde  $K_{Ae}$  representa la constante de afinidad del activador esencial por la enzima libre:

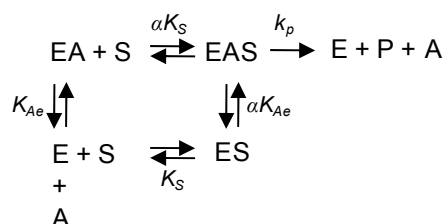
$$v_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M \left( 1 + \frac{K_{Ae}}{[A]} \right)} \quad (4.37)$$

Fijate que en este caso el modificador del  $K_M$  es un cociente inverso al que afectaba al  $K_M$  con inhibidor competitivo: en vez de ser  $[I]/K_{ic}$  ahora es  $K_{Ae}/[A]$ . Es decir que, al contrario de lo que ocurría con el inhibidor competitivo, la ausencia de activador da por resultado un  $K_{M(ap)}$  infinitamente grande, con lo cual en esta situación la  $v_0$  se reduce a 0. Esta similitud ha llevado a algunos, obsesionados con el álgebra, a llamar a este tipo de activadores "activadores

competitivos”, lo cual es evidentemente una ridiculez, ya que de ninguna manera el activador compite con el sustrato.

## Activadores de Tipo Mixto

En este caso, la unión del activador a la enzima puede ocurrir tanto a la enzima libre como al complejo ES, tal como vimos para los inhibidores de tipo mixto:



Como antes, el coeficiente  $\alpha$  afecta las constantes de afinidad  $K_S$  y  $K_{Ae}$  cuando S se une al complejo EA o cuando A se une al complejo ES, respectivamente. El esquema de reacción se parece al del inhibidor de tipo mixto, y por lo tanto, el álgebra para obtener la expresión de  $v_0$  nos lleva a algo muy parecido (con  $K_M$  en lugar de  $K_S$ ):

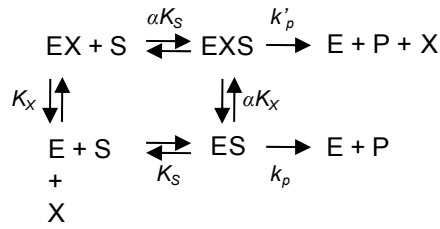
$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_M \left(1 + \frac{K_{Ae}}{[A]}\right) + [S] \left(1 + \frac{\alpha K_{Ae}}{[A]}\right)} \quad (4.38)$$

Los cálculos de  $K_{Ae}$  y  $\alpha$  pueden hacerse de la misma forma que antes, a partir de las extrapolaciones a los valores de  $V_{max(ap)}$  y  $K_{M(ap)}$  que se obtienen de cualquier método de linealización.

## Activación e Inhibición Parcial

Como dijimos al principio, el efecto de los inhibidores no tiene por qué ser la anulación total de la actividad cuando el inhibidor se encuentra unido a la enzima. Del mismo modo, la actividad de la enzima sin activador no tiene por qué ser nula. Esto nos lleva a la situación donde ya sea un complejo de enzima con inhibidor o bien una enzima sin activador pueda tener algo de actividad. El esquema general, considerando un efector en forma genérica, al que llamaremos X, sería:



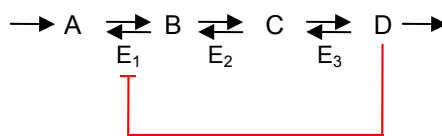


De esta manera, la  $v_0$  va a ser la resultante de  $k_p[ES] + k'_p[ESX]$  pero el efecto de X como inhibidor o activador puede deberse no solo a su naturaleza, sino también a su **concentración**. Por ejemplo, si  $k_p > k'_p$ , a alta [S] X se comportará como inhibidor, ya que en esta situación la [EXS] va a ser considerable, y por lo tanto, la  $v_0$  en presencia de X va a ser menor que en su ausencia. Sin embargo, a baja [S] el efecto de la relación entre [ES] y [EXS] puede verse compensado por la relación  $k_p/k'_p$ , y por lo tanto, la  $v_0$  puede no verse afectada por la presencia de X. Por otro lado, si  $k_p < k'_p$ , la manifestación del efecto activador de X puede requerir asimismo que la [S] esté en un rango bajo como para que haya una prevalencia de EXS por sobre ES. Otras combinaciones de constantes cinéticas más complicadas pueden asimismo determinar si X actúa como inhibidor o activador de acuerdo a la [S].

## Regulación de la Actividad Enzimática por *Feedback* y *Feedforward*

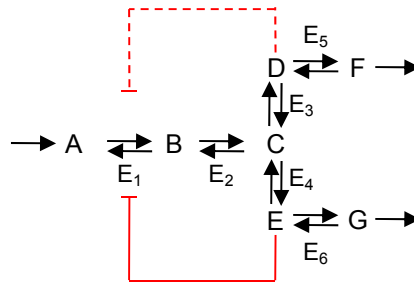
Hasta aquí hemos considerado a los efectores en esquemas de estado **inicial**, es decir *in vitro*. Deberíamos echar un vistazo a lo que ocurre con los inhibidores naturalmente, es decir, en las vías metabólicas. Un aspecto muy usual en las vías metabólicas es la necesidad de control de acuerdo cómo se van acumulando sus intermediarios. Otra necesidad del metabolismo es la de adaptarse rápidamente a cambios en el entorno. Entre los varios mecanismos que permiten satisfacer estas necesidades están la retroinhibición o *feedback* y su opuesto, el *feedforward*, que utilizan a los propios intermediarios metabólicos como efectores de la actividad de alguna de las enzimas de la vía.

El mecanismo de *feedback* consiste simplemente en que algún intermediario, o incluso el producto final, actúa como inhibidor de alguna de las enzimas que catalizan los primeros pasos de la vía, de acuerdo al siguiente esquema:



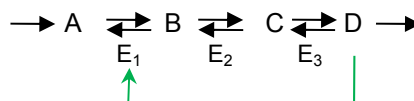
La línea roja indica que el metabolito D es un inhibidor de la enzima  $E_1$ . De esta manera, si la demanda de D es baja debido a las condiciones metabólicas del momento, la inhibición de la

primera enzima de la vía evita que D se acumule. Más importante aún, se evita un gasto de energía inútil en sintetizar B, C y D pero también se evita la acumulación de B y C, que inevitablemente ocurriría si se acumula D. Tales intermediarios de las vías metabólicas pueden resultar tóxicos a altas concentraciones, y por lo tanto, evitar su acumulación puede servir también para preservar la viabilidad de la célula. Estos mecanismos pueden también servir para controlar qué vías se favorecen. Por ejemplo, en una vía ramificada como la que se esquematiza a continuación:



En este esquema, los metabolitos D y E actúan de forma concertada como inhibidores parciales de la enzima  $E_1$  de forma tal de modular la producción de F y G según su demanda. La constante de afinidad entre cada uno de estos inhibidores y la enzima  $E_1$  puede ser diferente, tal como lo representan la línea discontinua y la continua. Asimismo, F podría actuar como retroinhibidor de  $E_3$  y G como retroinhibidor de  $E_4$  como para favorecer diferencialmente una u otra rama de la vía, y estas regulaciones a su vez superponerse sobre las retroinhibiciones de  $E_1$ . Dado que los distintos metabolitos seguramente tienen diferencias estructurales entre sí, en general este tipo de retroinhibiciones no siguen el modelo de inhibición competitiva.

Si en vez de inhibición hay activación, el esquema se transforma en un *feedforward*:



En este caso, D actúa como activador de  $E_1$ , y por lo tanto, estimulará su propia síntesis. Esto puede permitir que D se acumule rápidamente en respuesta a una necesidad repentina, pero también puede conducir a un fenómeno curioso, llamado *biestabilidad*. Este fenómeno se ha visto sobre todo en bacterias. Cultivos puros de bacterias clonales (es decir, todas las células presentan el mismo genotipo) pueden comportarse de dos maneras diferentes a pesar de que las condiciones de cultivo son idénticas para todas las células. Si los mecanismos de *feedforward* son suficientemente sensibles, el disparo del mecanismo en un conjunto de células puede llevarlas a producir (en este ejemplo) D mientras que el resto de las células permanecerán sin producir D. Si a su vez D es un regulador de un comportamiento celular macroscópico, por ejemplo, la movilidad, se obtendrá una población donde una parte de las

células son móviles y la otra no. Este tipo de comportamientos tiene importancia evolutiva, ya que permiten que una población de células esté preparada para ofrecer respuestas alternativas frente a un entorno cambiante.

## Relación de los Efectores con el Sitio Activo

Al principio del capítulo hicimos referencia a la importancia de la flexibilidad del sitio activo para las respuestas de la actividad enzimática a las demandas metabólicas. Ahora podemos volver a ese concepto, observando que si el sitio activo y el sustrato fueran estructuras rígidas, cada una encajando perfectamente en la otra como una llave y una cerradura, no habría posibilidad de regulación alguna. Por más que consideremos a los inhibidores competitivos, nunca la estructura del inhibidor va a ser **idéntica** a la del sustrato. En los casos donde los inhibidores/activadores se unen indistintamente a la enzima libre o al complejo ES, es obvio que debe haber un ajuste estructural como para que la misma molécula pueda unirse a dos formas diferentes del sitio activo.

Como vimos anteriormente, la relación del sustrato con el sitio activo es la de un *ajuste inducido*, donde la entrada del sustrato al sitio activo modifica a éste de modo tal que la unión se va produciendo durante el contacto. En vez de pensar en una llave y una cerradura, deberíamos pensar por ejemplo en un pie y una media: si bien la media no tiene preformada la estructura complementaria del pie, la misma se va formando a medida que el pie (el sustrato) va ingresando a la media (el sitio activo) y la va moldeando. Dada esa flexibilidad, la media puede admitir otras estructuras aparte de la del pie. Por ejemplo, puede admitir una berenjena (inhibidor competitivo) o puede tener lugar para que antes o después del pie ingresen un conjunto de tachuelas (inhibidor de tipo mixto). En ninguno de estos casos podríamos caminar, si bien podría haber cierta semejanza entre el pie y la berenjena pero no así entre el pie y una tachuela. Podríamos seguir buscando analogías para un inhibidor acompetitivo o un activador, pero la idea es que precisamente gracias a la flexibilidad del sitio activo y al fenómeno del ajuste inducido es que pueden existir todos estos tipos de inhibición o activación lineal o parcial. Esto es de fundamental importancia para la regulación del metabolismo... ¡y salgamos corriendo, que se viene la tormenta!

## Problemas

### Problema 1

Se estudió la cinética de una enzima a diferentes concentraciones de sustrato, en presencia y ausencia de un inhibidor (I) a concentración  $2 \cdot 10^{-3}$  M.

Sustrato (M)	$v_o$ ( $\mu\text{moles min}^{-1}$ )	
	sin inhibidor	con inhibidor
$0,3 \times 10^{-5}$	10,4	4,1
$0,5 \times 10^{-5}$	14,5	6,4
$1,0 \times 10^{-5}$	22,5	11,3
$3,0 \times 10^{-5}$	33,8	22,6
$9,0 \times 10^{-5}$	40,5	33,8

- a) ¿Cuáles son los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_M$  en ausencia y en presencia de inhibidor?
- b) ¿Qué tipo de inhibidor es?
- c) Cuando  $[S] = 1,0 \cdot 10^{-5}$  M e  $[I] = 2,0 \cdot 10^{-3}$  M ¿qué fracción de las moléculas de enzima están unidas al sustrato?
- d) Cuando  $[S] = 3,0 \cdot 10^{-5}$  M ¿qué fracción de las moléculas de enzima están unidas a sustrato en presencia y ausencia de inhibidor?. Compare esta relación con la relación de velocidades iniciales en las mismas condiciones.

### Problema 2

Se realizó un estudio exhaustivo de una cepa de *Saccharomyces cereviceae* y resultó de interés analizar el comportamiento cinético de la enzima directamente comprometida en una mutación, la porfobilinogenasa (PBGasa), la cual presenta una cinética michaeliana.

Para todos los estudios cinéticos se utilizaron las mismas cantidades de células (absorbancia medida a 540 nm). La mezcla de reacción se llevó a cabo en condiciones óptimas de temperatura y pH. En cada caso la enzima se inactivó tomando 1 ml de mezcla de reacción (que contenía una dilución 1:1000 del extracto enzimático) y agregando 4 ml de reactivo B4C (inactivador coloreado), posteriormente, se leyó la absorbancia a 500 nm.

El primer experimento se refleja en la tabla que se muestra a continuación, donde se entregan resultados de concentración de producto expresados en el tubo de colorimetría, para diferentes concentraciones de sustrato.

Tiempo (min)	Producto (nmoles)			
	[S] 15 mM	[S] 40 mM	[S] 60 mM	[S] 100 mM
2	18,0	26,0	28,8	31,4
5	36,0	52,0	57,6	62,8
10	90,0	130,0	144,0	157,0

Se realizó un segundo experimento: un estudio cinético en diferentes fases de crecimiento celular, encontrándose los resultados expresados a continuación:

	Fase de crecimiento		
	1	2	3
$V_{max}$ ( $\mu\text{moles min}^{-1}$ )	180	300	350
$K_M$ (mM)	15,1	15,3	15,2

En un tercer y último experimento se seleccionaron las células que se encontraban en la fase 2 de crecimiento y se realizó una cinética en la cual se agregó a la mezcla de reacción ácido 5-aminolevúlico obteniéndose valores de  $V_{max}=300 \mu\text{moles min}^{-1}$  y  $K_M=5,1 \text{ mM}$ .

- Determine los parámetros cinéticos utilizando los datos del primer experimento.
- Interprete los resultados del segundo experimento y si es posible, hágalo numéricamente.
- ¿Qué conclusiones puede obtener del tercer experimento?

### Problema 3

Se estudió la cinética de una enzima a diferentes concentraciones de sustrato, en presencia y ausencia de  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  de un inhibidor (I).

Sustrato (M)	$v_o$ ( $\mu\text{moles/min}$ )	
	sin inhibidor	con inhibidor
$0,3 \times 10^{-5}$	10,4	4,1
$0,5 \times 10^{-5}$	14,5	6,4
$1,0 \times 10^{-5}$	22,5	11,3
$3,0 \times 10^{-5}$	33,8	22,6
$9,0 \times 10^{-5}$	40,5	33,8

- ¿Cuáles son los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_M$  en ausencia y en presencia de inhibidor?
- ¿Qué tipo de inhibidor es?
- ¿Cuál es la constante de asociación del inhibidor?
- Cuando  $[S] = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  y  $[I] = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  ¿qué fracción de las moléculas de enzima están unidas al sustrato?
- Cuando  $[S] = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  ¿qué fracción de las moléculas de enzima están unidas a sustrato en presencia y ausencia de inhibidor? Compare esta relación con la relación de velocidades iniciales en las mismas condiciones.

### Problema 4

Se estudió la cinética de la enzima del problema anterior en presencia de un inhibidor diferente. La concentración del inhibidor fue  $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

Sustrato (M)	$v_o$ ( $\mu\text{moles/min}$ )	
	sin inhibidor	con inhibidor
$0,3 \times 10^{-5}$	10,4	2,1
$0,5 \times 10^{-5}$	14,5	2,9
$1,0 \times 10^{-5}$	22,5	4,5
$3,0 \times 10^{-5}$	33,8	6,8
$9,0 \times 10^{-5}$	40,5	8,1

- a) ¿Cuáles son los valores de  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  en presencia de este inhibidor?. Compare con los valores obtenidos en el problema anterior.
- b) ¿Qué tipo de inhibidor es?
- c) ¿Cuál es la constante de asociación de este inhibidor?
- d) Cuando  $[S] = 3,0 \cdot 10^{-5}$  M ¿qué fracción de moléculas de enzima tienen unido sustrato en presencia y ausencia de inhibidor? ( $1,0 \cdot 10^{-4}$  M).

## Bibliografía

- Cornish-Bowden A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Londres: Wiley-Blackwell.
- Dixon, M., Webb, E.C. (1980) *Enzymes* New York: Academic Press.
- Fell D. (1996) *Understanding the Control of Metabolism*. Londres: Portland Press.
- Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley & Sons.
- Segel I.W. (1982) *Cálculos de Bioquímica*, 2da. edición. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Voet D., Voet J (2006) *Bioquímica*, 3ra. edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

# CAPÍTULO 5

## Reacciones con Más de un Sustrato

*Aníbal R. Lodeiro*

Los dos capítulos anteriores proveyeron una visión general de la cinética enzimática para enzimas *monosustrato*, es decir aquellas que catalizan la reacción de un único sustrato para convertirse en productos. Aunque esta visión es de gran importancia ya que sienta las bases de todos los análisis de cinética enzimática, la realidad es que son pocas las enzimas que catalizan reacciones de un único sustrato. Las isomerasas, que con frecuencia catalizan cambios de posición de un grupo en una molécula (p. ej. la fosfoglucosa isomerasa, que cataliza la interconversión entre glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato), son las únicas que pueden considerarse verdaderamente monosustrato. Otras enzimas, como las hidrolasas (la invertasa que usaron Michaelis y Menten es un ejemplo de ellas), catalizan reacciones de hidrólisis de un sustrato, pero en realidad hay otro sustrato que interviene en la reacción: el agua. Sin embargo, el agua se encuentra a una concentración tan alta que normalmente pueden despreciarse sus efectos cinéticos. Esto nos lleva a una primera reflexión: quizás podría analizarse el comportamiento cinético de una enzima multisustrato manteniendo todos sus sustratos a saturación menos uno, calcular los parámetros cinéticos de ese, luego hacer lo mismo con otro, y así sucesivamente. Es posible, pero enseguida veremos que no es tan sencillo como parece.

La gran mayoría de las enzimas cataliza reacciones de dos o más sustratos. En este punto, es importante destacar que **todas** las moléculas que son modificadas en la reacción son sustratos. Esta aclaración parece innecesaria, pero en muchos textos aparece la palabra “coenzima” para referirse a moléculas que en realidad son sustratos y ello complica el análisis. Por ejemplo, las reacciones de óxido-reducción involucran *pares redox*: un dador reducido reacciona transfiriendo electrones a un aceptor oxidado para dar como productos el dador oxidado y el aceptor reducido, y por lo tanto en estas reacciones no puede haber un solo sustrato, sino al menos dos. Las deshidrogenasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción donde uno de los miembros del par redox es el nicotinamida-adenina-dinucleótido ( $\text{NAD}^+$  en su forma oxidada y  $\text{NADH}$  en su forma reducida) o su análogo fosforilado, el  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . Sin embargo, tanto al  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  como al  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  se los suele denominar “coenzimas”, quizás porque intervienen en toda la diversidad de reacciones catalizadas por deshidrogenasas, y otro poco porque son moléculas sintetizadas por la célula. Evidentemente, esta terminología puede llevar a confusión y oscurecer el hecho

de que el  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y el  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  son tan **sustratos** como el otro miembro del par redox, y deben ser integrados en las ecuaciones cinéticas como tales.

Los principios que vimos anteriormente con los efectores (Cap. 4) también rigen en parte la formación de complejos de la enzima con más de un sustrato. Entre estos principios podemos destacar:

- La unión de más de una molécula al mismo sitio activo requiere un ajuste inducido.
- Dos o más moléculas pueden unirse al sitio activo en forma secuencial o al azar.
- La liberación de más de una molécula del sitio activo puede ocurrir en forma secuencial o al azar.
- La presencia de una molécula en el sitio activo puede producirle modificaciones.

Así, la cinética de enzimas multisustrato se complica a medida que aumenta el número de sustratos, ya que hay una cierta diversidad de maneras en las que pueden unirse al sitio activo, reaccionar y liberarse los productos.

## Mecanismos Generales de Reacción

Vamos a enfocar a continuación algunos mecanismos de reacción con dos sustratos, que podrán ilustrar los principios generales necesarios para entender al resto de los mecanismos, incluyendo aquellos con más de dos sustratos. Esencialmente, la reacción que vamos a considerar puede esquematizarse como:



Sin embargo, hay varias maneras en las cuales los sustratos A y B pueden combinarse con el sitio activo de la enzima para dar como productos P y Q. Consideremos primero la reacción en condiciones iniciales, así luego podemos entrar en las cinéticas en presencia de productos. A grandes rasgos, vamos a dividir los esquemas en los de formación de *complejos ternarios*, donde los dos sustratos ocupan en algún momento el sitio activo, y los de *enzima sustituida*, donde uno de los sustratos transfiere un grupo a la enzima, el cual es luego transferido desde ella al otro sustrato.

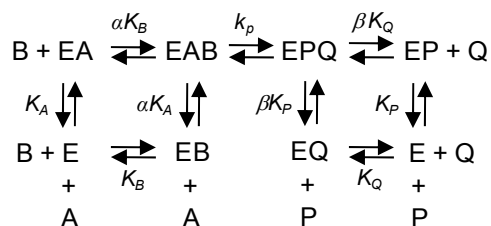
### Formación de Complejos Ternarios

En el análisis de estos mecanismos utilizaremos la aproximación del equilibrio rápido, por lo cual emplearemos como parámetros cinéticos la  $V_{max}$  y la constante de disociación del complejo enzima-sustrato. Llamaremos,  $K_A$ ,  $K_B$ ,  $K_P$  y  $K_Q$  a las constantes de disociación de los sustratos A y B, y de los productos P y Q respectivamente. Además, debemos notar que



cuando en el sitio activo ya se encuentre unido uno de los sustratos (o productos), la constante de disociación del segundo sustrato (o producto) se verá afectada ya que la afinidad no será la correspondiente a la enzima libre. Por lo tanto, en esos casos multiplicaremos las constantes de disociación por unos coeficientes,  $\alpha$  para los sustratos y  $\beta$  para los productos.

Los complejos ternarios EAB pueden formarse por una entrada al azar de los sustratos al sitio activo, o bien por una entrada ordenada de los mismos. En el caso de la unión al azar hay una similitud con los mecanismos de tipo mixto que ya vimos para los efectores:



Este mecanismo de *complejo ternario al azar* también se conoce como *equilibrio rápido al azar bi-bi*. Su característica es que el orden en que ingresan los sustratos A y B al complejo ternario es al azar, como así también lo es el orden en que se liberan los productos P y Q. Dado que en la aproximación del equilibrio rápido la etapa limitante de la reacción es la conversión lenta de EAB en EPQ, se puede suponer que todas las demás reacciones están en equilibrio. La ecuación de  $v_0$  para la condición inicial (ausencia de P y Q) se deduce de forma semejante a la de  $v_0$  en presencia de un efector de tipo mixto (ecuación 4.26) y puede escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p \frac{[A][B]}{\alpha K_A K_B}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[B]}{K_B} + \frac{[A][B]}{\alpha K_A K_B}} \quad (5.1)$$

Multiplicando numerador y denominador por  $\alpha K_A K_B$  y recordando que  $V_{max} = k_p [E_T]$  obtenemos:

$$v_0 = \frac{V_{max}[A][B]}{\alpha K_A K_B + \alpha K_B[A] + \alpha K_A[B] + [A][B]} \quad (5.2)$$

Si consideramos [A] variable y [B] fija, podemos reordenar la ecuación 5.1 para obtener una muy semejante a la de  $v_0$  con un activador de tipo mixto (4.38):

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p[A]}{\alpha K_A \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right) + [A] \left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right)} \quad (5.3)$$

Dividiendo numerador y denominador por  $(1 + \alpha K_B/[B])$  y recordando que  $k_p [E_T] = V_{max}$ :

$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right)} [A]}{\alpha K_A \frac{\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)}{\left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right)} + [A]} \quad (5.4)$$

la cual podemos expresar como:

$$v_0 = \frac{V_{max(ap)} [A]}{K_{M(ap)} + [A]} \quad (5.5)$$

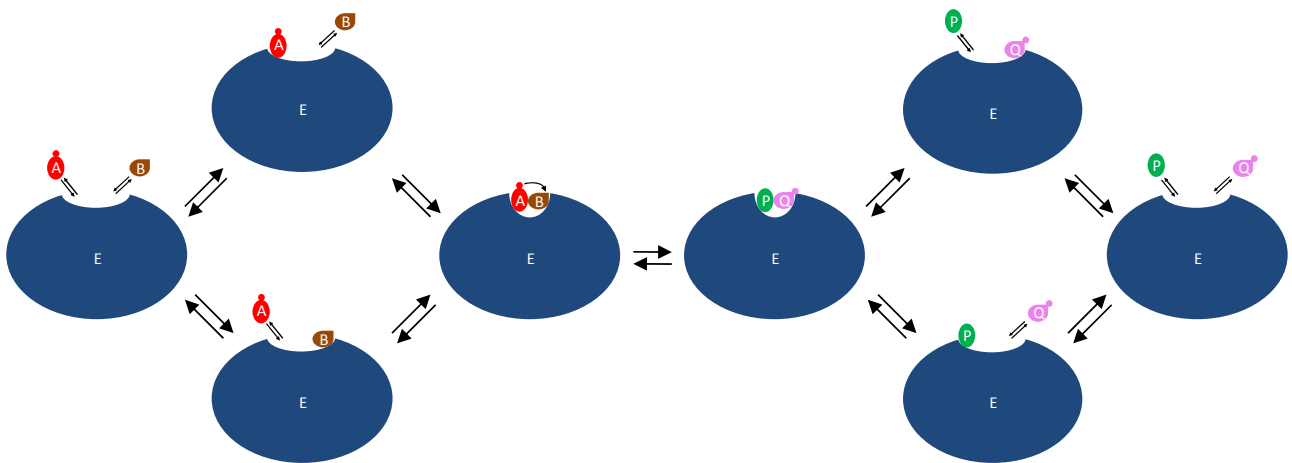
donde:

$$V_{max(ap)} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right)} \quad (5.6)$$

$$K_{M(ap)} = \frac{\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)}{\left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right)} \quad (5.7)$$

La ecuación 5.4 resalta el hecho de que por más que nos encontremos frente a un mecanismo complicado, con dos sustratos, la cinética sigue siendo fundamentalmente la de Michaelis-Menten. Es decir, la ecuación 3.17 sigue siendo la ecuación fundamental de la cinética enzimática aún cuando nos hayamos apartado del mecanismo monosustrato.

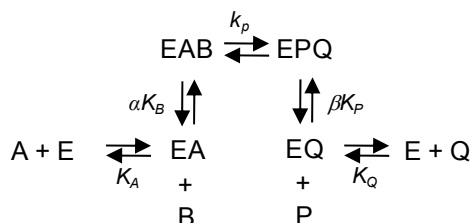
Otro esquema útil para visualizar lo que ocurre en el complejo ternario al azar es el que se presenta en la Fig. 5.1, donde se muestra un sustrato intercambiando un grupo con el otro sustrato.



**Fig. 5.1.** Representación esquemática de un complejo ternario al azar. Ambos sustratos, A y B pueden unirse en cualquier orden al sitio activo, cuya forma se ajusta en el complejo ternario. El grupo llevado por A es transferido a B, con lo cual A se transforma en P y B se transforma en Q. La salida de los productos también se produce en cualquier orden.

En realidad, muchas de las reacciones bisustrato involucran la transferencia de un grupo desde un sustrato hasta el otro, si bien el rótulo de *transferasas* ha sido reservado para una clase particular de estas enzimas. En la Fig. 5.1 puede apreciarse con mayor claridad que si bien cada sustrato puede unirse por sí solo al sitio activo, el complejo ternario es el único complejo activo. Es más: puede darse la unión de las dos moléculas desprovistas del grupo a ser transferido (complejo EBP) y en ese caso, se tendrá un complejo ternario inactivo.

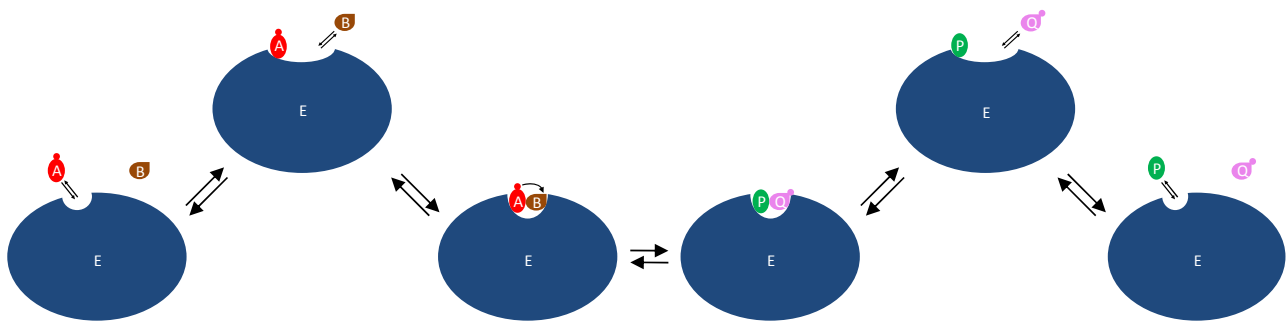
A pesar de las apariencias de la Fig. 5.1, el sitio activo y los sustratos no son tan rígidos como parecen. Como ya comentamos en el Cap. anterior, existe un *ajuste inducido* por el cual el sitio activo va adquiriendo su forma en la medida en que el sustrato va interactuando con él. Esto se puede ver más claramente en otra manera de formar el complejo ternario, conocida como *complejo ternario de orden obligatorio*, o también llamada *bi-bi ordenado*, en la cual tanto el ingreso de los sustratos al sitio activo como la liberación de los productos desde el mismo siguen una secuencia estricta. A continuación mostramos la secuencia de reacciones para este mecanismo, y en la Fig. 5.2 lo ilustramos con un diagrama.



En este caso las constantes de disociación de A y Q difieren conceptualmente de las constantes de B y P, ya que B no puede unirse a la enzima si antes no se unió A y Q no puede liberarse si antes no se liberó P. Por lo tanto, solo las constantes de A y Q pueden considerarse constantes de disociación entre sustrato o producto y la enzima. Este hecho ha sido destacado con los coeficientes  $\alpha$  y  $\beta$ , que multiplican a  $K_B$  y  $K_P$  respectivamente, pero debe tenerse en cuenta que esos coeficientes afectan a las constantes de disociación de los complejos EB y EP, que no forman parte de la secuencia de reacciones. Razonablemente, esos coeficientes  $\alpha$  y  $\beta$  deberían tener valores muy bajos ya que los complejos EB y EP se presume que serían altamente inestables.

Como puede apreciarse, este esquema es mucho más parecido al de un inhibidor acompetitivo (ecuación 4.11) que a uno de tipo mixto, con lo cual la ecuación de la  $v_0$  que se obtiene con la aproximación del equilibrio rápido es parecida también:

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_p \frac{[A][B]}{\alpha K_A K_B}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A][B]}{\alpha K_A K_B}} \quad (5.7)$$



**Fig. 5.2.** Representación esquemática de un complejo ternario de orden obligatorio. El sustrato A ingresa primero al sitio activo, cuya estructura tiene muy baja afinidad por B. Una vez que A se asoció a la enzima, la estructura del sitio activo se modifica y B puede unirse. Al formarse el complejo ternario, el grupo llevado por A es transferido a B, con lo cual A se transforma en P y B se transforma en Q. La salida de los productos también se produce en orden, en este caso primero se disocia Q y luego lo hace P.

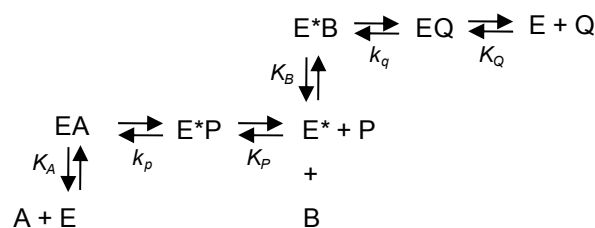
Multiplicando numerador y denominador por  $\alpha K_A K_B$  y recordando que  $V_{max} = k_p [ET]$  obtenemos:

$$v_0 = \frac{V_{max}[A][B]}{\alpha K_A K_B + \alpha K_B [A] + [A][B]} \quad (5.8)$$

Estas ecuaciones son muy similares a 5.1 y 5.2, excepto que los términos  $[B]/K_B$  y  $\alpha K_A [B]$  no aparecen, justamente debido a que la reacción entre B y la enzima libre no está contemplada en la secuencia de reacción.

### Formación de Enzimas Sustituidas

En este mecanismo, conocido también como *ping-pong bi-bi*, el grupo que se transfiere sustituye primero a un grupo reactivo del sitio activo, el sustrato dador del grupo se libera, ingresa el sustrato aceptador y finalmente el grupo se libera del sitio activo transfiriéndose al sustrato aceptador (Fig. 5.3). De esta manera, no se forma un complejo ternario ya que nunca los dos sustratos están en el sitio activo al mismo tiempo. La secuencia de reacciones es la siguiente:

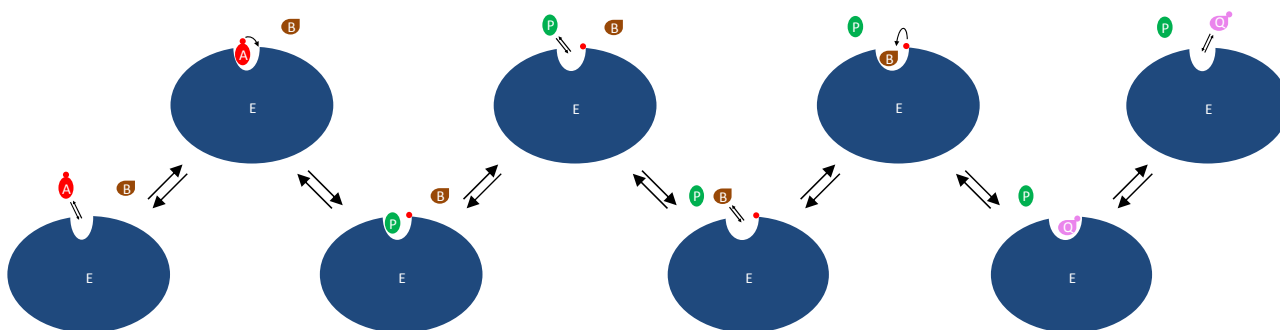


Aquí hay dos cosas importantes para observar: por un lado,  $K_A$ ,  $K_B$ ,  $K_P$  y  $K_Q$  no están multiplicadas por ningún coeficiente, ya que cada vez que cualquiera de estas moléculas se

une a la enzima, ésta no contiene otro sustrato o producto en el sitio activo; por otro lado, la enzima libre oscila entre dos estados (de ahí el nombre de “ping-pong”): E y E\*, esta última simbolizando la enzima con el grupo transferido. De esta manera, hay dos complejos activos: EA y E\*B, lo cual da origen a dos constantes catalíticas:  $k_p$  y  $k_q$  para la producción de P y Q respectivamente. De esta manera, la  $V_{max}$  dependerá en principio de una u otra constante catalítica según qué producto usemos para expresar la  $v_0$ :

$$\frac{d[P]}{dt} = k_p[E_T] \quad (5.9)$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = k_q[E_T] \quad (5.10)$$



**Fig. 5.3.** Representación esquemática de un mecanismo de enzima sustituida. El sustrato A ingresa primero al sitio activo, cuya estructura tiene muy baja afinidad por B. Una vez que A se asoció transfiere un grupo a la enzima, con lo cual se transforma a su vez en P. Seguidamente, P se libera y recién después B se une a la enzima modificada, cuyo sitio activo adquirió afinidad por B. El grupo transferido inicialmente desde A a la enzima pasa ahora desde la enzima a B, el cual se transforma en Q, y finalmente se libera.

Sin embargo,  $k_p$  y  $k_q$  no pueden ser muy distintas entre sí, ya que si lo fueran, eso significaría que la enzima tendría diferente número de ciclos catalíticos por unidad de tiempo con  $A \rightarrow P$  que con  $B \rightarrow Q$ , lo cual llevaría inevitablemente a un “atascamiento” de la enzima con uno u otro sustrato.

El tratamiento de equilibrio rápido para esta secuencia de reacciones permite obtener la ecuación de la  $v_0$  que se expresa a continuación:

$$v_0 = \frac{V_{max}[A][B]}{\alpha K_B[A] + \alpha K_A[B] + [A][B]} \quad (5.11)$$

En esta ecuación no aparece el producto de  $\alpha K_A \alpha K_B$  en el denominador, ya que no hay interacción simultánea de ambos sustratos en el sitio activo.

Las observaciones precedentes se pueden comparar en la Tabla 5.1, donde se expresan las  $v_0$  para los tres mecanismos.

**Tabla 5.1: Comparación de los distintos mecanismos de catálisis con dos sustratos**

Tipo de mecanismo	$v_0$	Observaciones
Ternario al azar	$\frac{V_{max}[A][B]}{\alpha K_A K_B + \alpha K_B [A] + \alpha K_A [B] + [A][B]}$	Los dos sustratos A y B se unen independientemente al mismo sitio activo y la reacción se produce allí.
Ternario con orden obligatorio	$\frac{V_{max}[A][B]}{\alpha K_A K_B + \alpha K_B [A] + [A][B]}$	Un sustrato (A) se une al sitio activo, después se une el otro (B) y la reacción se produce allí.
Enzima sustituida	$\frac{V_{max}[A][B]}{\alpha K_B [A] + \alpha K_A [B] + [A][B]}$	Un sustrato (A) se une al sitio activo, le transfiere el grupo a intercambiar, sale y recién después se une el otro (B), que recibe el grupo.

## Representaciones Gráficas

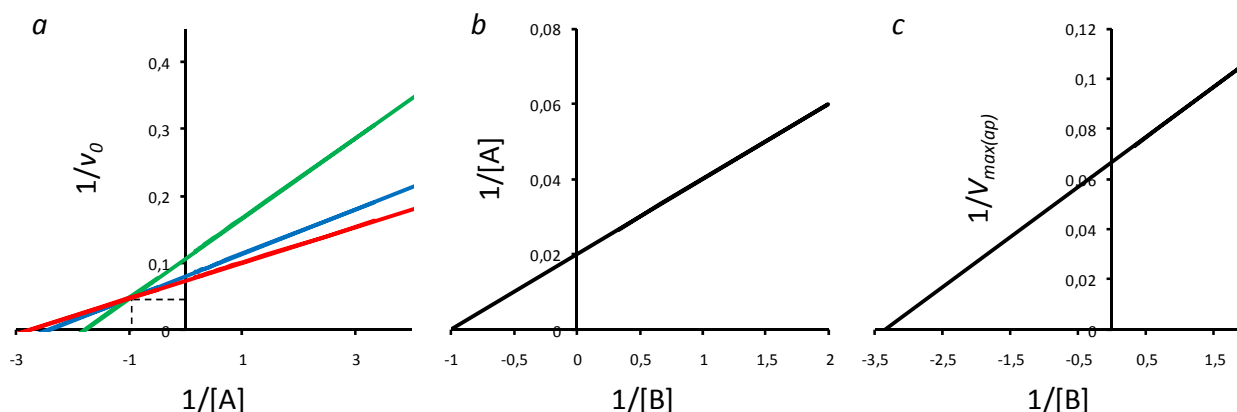
Es posible aquí también encontrar los parámetros cinéticos realizando linealizaciones de las ecuaciones cinéticas, solo que todo resulta más engorroso que para el caso de un solo sustrato (Cap. 3). En primer lugar, debemos considerar un solo sustrato variable y el otro fijo como para poder hacer gráficas bidimensionales entre la  $v_0$  y el sustrato variable. El problema es que aún así las intersecciones a los ejes de abscisas y ordenadas no dan directamente los parámetros cinéticos. Por lo tanto, a partir de los resultados de los *gráficos primarios* deben realizarse *gráficos secundarios* para encontrarlos. Para ejemplificar el procedimiento, realizaremos la representación gráfica de la doble recíproca para un esquema de complejo ternario al azar, donde A será el sustrato variable y B el sustrato cuya concentración se mantendrá fija. La doble recíproca de la ecuación 5.2 da por resultado:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha K_A}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right) \quad (5.12)$$

De esta manera, el valor de la abscisa cuando  $1/v_0 = 0$  es:

$$\frac{1}{[A]} = -\frac{1}{\alpha K_A} \frac{\left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right)}{\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)} \quad (5.13)$$

Y el valor de la ordenada cuando  $1/[A] = 0$  es:



**Fig. 5.4.** Representación doble recíproca para una enzima que cataliza una reacción de dos sustratos mediante el mecanismo de complejo ternario al azar. En *a* se muestra el gráfico primario de la doble recíproca  $1/v_0$  vs  $1/[A]$  con tres concentraciones de B: 0,5 mM (verde) 1,5 mM (azul) y 3 mM (rojo). El punto de intersección de las tres rectas tiene como coordenadas  $-1/K_A$  en las abscisas y  $1/V_{max}(1 - \alpha)$  en las ordenadas. Los puntos de corte del eje  $1/[A]$  son los valores de  $-1/K_{A(ap)}$  (ecuación 5.13) y los puntos de corte del eje  $1/v_0$  son los de  $1/V_{max(ap)}$  (ecuación 5.14). En *b* y *c* se muestran los gráficos secundarios en función de las concentraciones de B. Panel *b*: doble recíproca  $1/[A]$  vs  $1/[B]$  donde el punto de corte en el eje de abscisas es  $-1/K_B$  y en el eje de las ordenadas es  $\alpha K_A/V_{max}$ . Panel *c*: doble recíproca  $1/V_{max(ap)}$  vs  $1/[B]$ , donde el punto de corte del eje de las abscisas es  $-1/\alpha K_B$  y en el de las ordenadas es  $1/V_{max}$ . Los parámetros cinéticos utilizados en estas gráficas fueron:  $K_A = 1$  mM;  $K_B = 1$  mM,  $\alpha = 0,3$ ;  $V_{max} = 15$   $\mu$ moles de producto  $\text{min}^{-1}$ .

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{\alpha K_B}{[B]} \right) \quad (5.14)$$

De este modo, en las dos intersecciones está  $[B]$  y por lo tanto, hay que hacer los gráficos secundarios de  $1/[A]$  vs  $1/[B]$  y  $1/V_{max(ap)}$  vs  $1/[B]$  para obtener los parámetros cinéticos. En la Fig. 5.4 se ilustra el procedimiento para este tipo de esquema de reacción. La misma estrategia se utiliza con los otros mecanismos.

## Cinéticas Reversibles

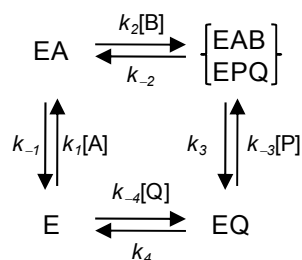
En el análisis anterior nos basamos en reacciones *in vitro* que nos permitieron obtener expresiones para la velocidad inicial,  $v_0$ . Sin embargo, en el análisis metabólico vamos a estar interesados en contemplar la presencia de los productos, ya que ellos tienen concentraciones distintas de cero en la célula. Por lo tanto, debemos encontrar las expresiones para la cinética reversible de todos los mecanismos de reacción que vimos anteriormente. Estas expresiones van a resultar altamente complejas ya que reúnen varios parámetros cinéticos ( $V_{max}$ , constante de afinidad, constante de Michaelis-Menten) para dos sustratos y dos productos, y no son fáciles de deducir con la misma metodología del Cap. 3. Para ello, es mejor utilizar una metodología desarrollada por E. King y C. Altman en 1956, basada en un método algebraico simple y sistemático. Gracias a su sistematicidad, el método ha podido ser compilado en softwares, algunos de los cuales están disponibles con acceso gratuito en Internet (p. ej. KAPattern, <http://virtualrat.org/software/ka-pattern>).

## El método de King-Altman

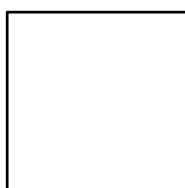
Para ejemplificar el método de King-Altman vamos a tomar una reacción catalizada por un complejo ternario de orden obligatorio. El método se basa en las siguientes etapas:

- 1) Representar la secuencia de reacciones en un esquema cerrado, que contenga todas las formas de la enzima (p.ej. enzima libre, enzima complejada con un sustrato, con dos, etc.) y todas las reacciones entre ellas.
- 2) Anotar todas las constantes cinéticas. Todas las reacciones deben tratarse como reacciones de primer orden, por lo tanto, si en una reacción hay dos reactivos (p.ej.  $E + A \rightarrow EA$ ) la constante cinética debe incorporar la concentración de A:  $k_1 [A]$ , resultando en una constante de pseudoprimer orden.
- 3) Dibujar un *patrón maestro* que represente el esqueleto del esquema.
- 4) A partir de ese patrón maestro, dibujar todos los patrones que, conteniendo solo líneas del patrón maestro, no formen estructuras cerradas y conecten todas las enzimas.
- 5) Dibujar todos los patrones que conducen a una forma dada de la enzima. Anotar las constantes cinéticas y repetir la operación para todas las formas de la enzima.
- 6) Multiplicar todas las constantes cinéticas dentro de cada patrón y luego sumarlas extendiendo la suma a todos los patrones encontrados. Realizar esta operación separadamente para los conjuntos de patrones que conducen a cada forma de la enzima.

En el ejemplo del complejo ternario de orden obligatorio, cuya secuencia de reacciones fue esquematizada en la pág. 94 se puede elaborar la secuencia de reacciones mostrada a continuación:

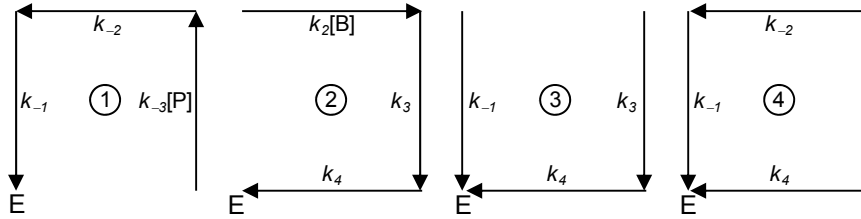


En esta secuencia se consideran como una sola cosa los complejos donde se produce la catálisis, que en este caso están encerrados entre llaves. A continuación, dibujemos el patrón maestro:





y ahora los patrones que, sin tener estructura cerrada, conectan todas las formas enzimáticas terminando en una de ellas. En este caso, dibujamos todas las que terminan en la enzima libre, E. En total vemos que son cuatro (igual al número de enzimas) y cada uno tiene tres lados (uno menos que el número de enzimas). No se pueden hacer más patrones que, conectando todas las enzimas, terminen en E y solo tengan lados que estén presentes en el patrón maestro (p.ej. no vale hacer un patrón con forma de Z porque, aunque conecte todas las enzimas, la diagonal no está en el patrón maestro). En cada uno de los diagramas está indicada la constante cinética correspondiente.



Luego, multiplicamos las constantes cinéticas que aparecen dentro de cada patrón: p.ej. para el patrón Nro. 1, el producto es  $k_{-1} k_{-2} k_{-3}[P]$ . Luego hacemos la suma extendida a los cuatro patrones del 1 al 4 para encontrar todos los caminos que conducen a E:  $(k_{-1} k_{-2} k_{-3}[P] + k_2[B] k_3 k_4 + k_{-1} k_3 k_4 + k_{-1} k_{-2} k_4)$ . Si luego hacemos lo mismo pero extendido a todas las formas enzimáticas, tendremos una suma de 16 términos (cuatro por cada una de las cuatro formas enzimáticas). Esta suma, que llamaremos  $D$ , contiene todos los caminos que llevan a todas las formas enzimáticas, es decir, todos los caminos que conducen a  $E_T$ . De esta manera, si dividimos la suma que encontramos en los caminos 1 al 4 por  $D$ , obtenemos la proporción de enzima libre respecto del total de enzima:

$$\frac{[E]}{[E_T]} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P] + k_2k_3k_4[B] + k_{-1}k_3k_4 + k_{-1}k_{-2}k_4}{D} \quad (5.15)$$

Ahora deberíamos hacer lo mismo para cada una de las formas en que se encuentra la enzima, y encontrar  $[EA]/[E_T]$ ,  $\{[EAB] + [EPQ]\}/[E_T]$  y  $[EQ]/[E_T]$ . Los resultados de hacer esas operaciones son los siguientes:

$$\frac{[EA]}{[E_T]} = \frac{k_1k_{-2}k_{-3}[A][P] + k_1k_{-2}k_4[A] + k_1k_3k_4[A] + k_{-2}k_{-3}k_4[P][Q]}{D} \quad (5.16)$$

$$\frac{\{[EAB] + [EPQ]\}}{[E_T]} = \frac{k_1k_2k_{-3}[A][B][P] + k_1k_2k_4[A][B] + k_{-1}k_{-3}k_{-4}[P][Q] + k_2k_{-3}k_{-4}[B][P][Q]}{D} \quad (5.17)$$

$$\frac{[EQ]}{[E_T]} = \frac{k_1k_2k_3[A][B] + k_{-1}k_{-2}k_{-4}[Q] + k_{-1}k_3k_{-4}[Q] + k_2k_3k_{-4}[B][Q]}{D} \quad (5.18)$$

La velocidad de la reacción deber medirse respecto de la producción de alguno de los productos (o el consumo de alguno de los sustratos) de modo tal que podría expresarse respecto de P o respecto de Q. Si la expresamos respecto de P, lo que vamos a mirar es cuál es el complejo que produce P y en qué reacción se consume P. Así podemos ver que P se produce a partir del complejo {EAB + EPQ} para dar EQ + P, y se consume en la reacción de producción del complejo: EQ + P → {EAB + EPQ}. De esta manera, la  $v_{neta}$  será:

$$\frac{d[P]}{dt} = v_{neta} = k_3\{[EAB] + [EPQ]\} - k_{-3}[EQ][P] \quad (5.19)$$

Reemplazando las concentraciones de complejo por la chorrera de constantes que averiguamos hace un rato, nos queda una tremenda ecuación:

$$v_{neta} = \frac{E_T(k_1k_2k_3k_{-3}[A][B][P] + k_1k_2k_3k_4[A][B] + k_{-1}k_3k_{-3}k_{-4}[P][Q] + k_2k_3k_{-3}k_{-4}[B][P][Q] - k_{-1}k_2k_3k_{-3}[A][B][P] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}[P][Q] - k_{-1}k_3k_{-3}k_{-4}[P][Q] - k_2k_3k_{-3}k_{-4}[B][P][Q])}{D} \quad (5.20)$$

Sin embargo, en esta ecuación hay varios términos que se cancelan (1° y 5°; 3° y 7°; 4° y 8°) de modo que lo que nos queda ahora es:

$$v_{neta} = E_T \frac{k_1k_2k_3k_4[A][B] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}[P][Q]}{D} \quad (5.21)$$

Esta notación sigue teniendo poco sentido práctico, ya que contiene un gran número de constantes cinéticas que son muy difíciles de medir experimentalmente. Sin embargo, puede expresarse empleando coeficientes que nos permitan acercarnos al un significado más enzimológico:

$$v_{neta} = E_T \frac{N_d[A][B] - N_r[P][Q]}{D_0 + D_1[A] + D_2[B] + D_3[P] + D_4[Q] + D_5[A][B] + D_6[A][P] + D_7[B][Q] + D_8[P][Q] + D_9[A][B][P] + D_{10}[B][P][Q]} \quad (5.22)$$

donde  $N_d$  es el coeficiente del numerador para la reacción directa:

$$N_d = k_1k_2k_3k_4 \quad (5.23)$$

$N_r$  es el coeficiente del numerador para la reacción reversa:

$$N_r = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} \quad (5.24)$$

y en el denominador nos quedaron 11 coeficientes. Recordemos que estos coeficientes provienen de la sumatoria de los numeradores de las ecuaciones 5.15-5.18, que representa todas las formas en que se encuentra la enzima. Los coeficientes se agruparon sacando factor común con las concentraciones de reactivos que las multiplican, y son:

$$D_0 = k_{-1}(k_{-2} + k_3)k_4 \quad (5.25)$$

$$D_1 = k_1(k_{-2} + k_3)k_4 \quad (5.26)$$

$$D_2 = k_2k_3k_4 \quad (5.27)$$

$$D_3 = k_{-1}k_{-2}k_{-3} \quad (5.28)$$

$$D_4 = k_1(k_{-2} + k_3)k_{-4} \quad (5.29)$$

$$D_5 = k_1k_2(k_3 + k_4) \quad (5.30)$$

$$D_6 = k_1k_{-2}k_{-3} \quad (5.31)$$

$$D_7 = k_2k_3k_{-4} \quad (5.32)$$

$$D_8 = (k_{-1} + k_{-2})k_{-3}k_{-4} \quad (5.33)$$

$$D_9 = k_1k_2k_{-3} \quad (5.34)$$

$$D_{10} = k_2k_{-3}k_{-4} \quad (5.35)$$

Si bien aquí hay en total 13 coeficientes (dos  $N$  y once  $D$ ), todos ellos provienen de ocho constantes cinéticas ( $k_1$ - $k_4$  y  $k_{-1}$ - $k_{-4}$ ) de manera que seguramente están relacionados entre sí. Estas relaciones nos pueden ayudar a encontrar las expresiones de las  $V_{max}$  directa y reversa ( $V_{max,d}$ ,  $V_{max,r}$ , respectivamente), las constantes de disociación y las constantes de Michaelis-Menten ( $K_i$  y  $K_{M,i}$  respectivamente, siendo  $i$  el sustrato o producto en cuestión) en función de las constantes cinéticas para este tipo de esquema de reacción. Así, la ecuación de la  $v_{neta}$  para el esquema del complejo ternario de orden obligatorio nos queda:

$$v_{neta} = \frac{\frac{V_{max,d}[A][B]}{K_A K_{M,B}} - \frac{V_{max,r}[P][Q]}{K_Q K_{M,P}}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{K_{M,A}[B]}{K_A K_{M,B}} + \frac{K_{M,Q}[P]}{K_Q K_{M,P}} + \frac{[Q]}{K_Q} + \frac{[A][B]}{K_A K_{M,B}} + \frac{K_{M,Q}[A][P]}{K_A K_Q K_{M,P}} + \frac{K_{M,A}[B][Q]}{K_A K_Q K_{M,B}} + \frac{[P][Q]}{K_Q K_{M,P}} + \frac{[A][B][P]}{K_A K_P K_{M,B}} + \frac{[B][P][Q]}{K_B K_Q K_{M,P}}} \quad (5.36)$$

donde:

$$V_{max,d} = E_T \frac{k_3 k_4}{k_3 + k_4} \quad (5.37)$$

$$V_{max,r} = E_T \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_{-2}} \quad (5.38)$$

$$K_{M,A} = \frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)} \quad (5.39)$$

$$K_{M,B} = \frac{k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_2 (k_3 + k_4)} \quad (5.40)$$

$$K_{M,P} = \frac{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}{k_{-3} (k_{-1} + k_{-2})} \quad (5.41)$$

$$K_{M,Q} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-4} (k_{-1} + k_{-2})} \quad (5.42)$$

$$K_A = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (5.43)$$

$$K_B = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_2} \quad (5.44)$$

$$K_P = \frac{k_{-1} + k_4}{k_1} \quad (5.45)$$

$$K_Q = \frac{k_4}{k_{-4}} \quad (5.46)$$

Y así podemos seguir con los otros esquemas de reacción: complejo ternario al azar y complejo de enzima sustituida. Por esto es importante que alguien se haya tomado el trabajo de compilar estos métodos en un software, pero también es importante que antes de usarlo, entiendas de dónde salen las ecuaciones que resuelve.

## Modelos Alternativos: la “Cinética de Conveniencia”

Si bien las descripciones detalladas de la  $v_{neta}$  como la que se realizó en la ecuación 5.36 permiten entender muy bien los mecanismos de reacción de enzimas individuales, la obtención de las mismas es muy laboriosa, aún con la ayuda de softwares, ya que cada enzima tiene sus particularidades y la cosa no se agota en encontrar las ecuaciones detalladas de los tres mecanismos que vimos. Por ejemplo, hay enzimas que tienen tres,

cuatro y hasta cinco sustratos. Además, muchas enzimas actúan en presencia de efectores que modifican su actividad, o bien están sujetas a regulación por otros medios, como por ejemplo, modificación covalente. Un ejemplo podría ser la glutamino sintetasa, una enzima clave en el metabolismo del nitrógeno en prácticamente todas las formas de vida. En bacterias, esta enzima tiene tres sustratos, al menos nueve efectores conocidos y además se regula por modificación covalente. No te quiero explicar lo que es la ecuación de la  $v_{neta}$  de esta enzima tomando en cuenta todos esos factores.

Además hay otro problemita: las constantes cinéticas sobre las que se basan estas ecuaciones en realidad **no son constantes** en el sentido físico ya que dependen del pH, de la temperatura y de la secuencia de aminoácidos de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el  $K_M$  de determinada enzima por un sustrato medido en el ratón puede no tener el mismo valor para la misma enzima en humanos. Aún cuando fuera así, ese  $K_M$  va a depender de la temperatura y el pH al cual fue medido, que pueden diferir de los de su entorno fisiológico en el ratón o en el humano. Entonces, por más que encontremos la ecuación correcta y podamos obtener experimentalmente los valores de todos los parámetros cinéticos, esa información se restringirá a esa enzima de esa especie en esas condiciones.

Cuando estos métodos fueron desarrollados, hace unos 60 años, no existía la posibilidad de analizar grandes masas de información a nivel del conjunto de genes, proteínas y metabolitos que contiene una célula. Esto fue posible recién en el siglo XXI debido fundamentalmente a tres avances: la secuenciación masiva de ADN, las nuevas metodologías de espectrometría de masas y el avance de la informática, con su pata biológica: la bioinformática. Estas metodologías nos permiten el acceso a lo que denominamos enfoques *ómicos*: la *genómica* (estructural y funcional), la *proteómica* y la *metabolómica*. Estas son las que nos interesan aquí, pero por supuesto hay otras ómicas referidas a las “totalidades” de alguna cosa: p.ej. la *glicómica*, referida a todos los carbohidratos de la célula, la *plasmidómica*, referida a todos los plásmidos compartidos por una comunidad de bacterias, y aún la *bibliómica*, referida a todas las publicaciones de un determinado tema.

La combinación de genómica funcional, proteómica y metabolómica permite la construcción de modelos metabólicos a escala celular. Estos modelos no son simples mapas, sino modelos dinámicos. Haciendo una analogía, el mapa de La Plata es el mismo un domingo a la medianoche que un lunes a las 9 de la mañana, pero el flujo de tránsito evidentemente, no. Si uno quisiera hacer un plan para mejorar la circulación en la ciudad, debería contar con información dinámica de los flujos de tránsito bajo distintas circunstancias (horarios, meses del año, clima, etc.). De la misma manera, el análisis metabólico requiere información dinámica. Tenemos casi todo para hacerlo: sabemos qué proteínas se expresan en la célula bajo distintas circunstancias (tipo de célula, presencia de una enfermedad, nivel nutricional, etc.), sabemos también qué metabolitos hay y cuánto de cada uno... en resumen, tenemos todos los datos para conocer cada  $[E_T]$  y cada  $[S]$  (o  $[P]$ ), pero nos faltan las constantes cinéticas de cada metabolito y los mecanismos cinéticos de cada enzima para poder transformar esos datos en un modelo matemático dinámico que permita hacer un análisis metabólico a nivel global. Es

decir, faltaría la “cinetómica”. No obstante, se han realizado algunos intentos, el más conspicuo de todos es el así llamado *silicon cell*, algo así como una célula virtual, que puede encontrarse en <http://www.siliconcell.net/sica/>. Sin embargo, muchas de estas iniciativas intentan suplir la falta de información cinética detallada con reducciones más o menos fundamentadas de las expresiones de la  $v_{neta}$ . La más simple, y más equivocada, es la que utilizan muchos modelos de balance de masas y balance de flujos metabólicos, que consideran a la velocidad de reacción como el producto simple de una constante cinética por la concentración de sustrato:  $v = k [S]$ . Al no tomar en cuenta el complejo enzima-sustrato, no toman en cuenta un rasgo fundamental de las reacciones catalizadas por enzimas, que es el *grado de saturación* de la enzima. Como venimos viendo, el aumento de  $v_{neta}$  entre dos  $[S]$  puede ser lineal si el rango de  $[S]$  es bajo respecto del  $K_M$ , pero puede ser prácticamente nulo si la  $[S]$  se aproxima a la saturación. Asimismo, cambios de concentraciones de  $[S]$  en rangos algo por encima o algo por debajo del  $K_M$  van a producir respuestas diferentes en el cambio de la  $v_{neta}$ .

En resumen, el problema consiste en lograr expresiones de menor complejidad, que puedan resolverse para un gran número de enzimas diferentes pero que al mismo tiempo capten la variabilidad de las constantes cinéticas en respuesta al ambiente y el grado de saturación de las reacciones catalizadas por enzimas con suficiente fidelidad. En otras palabras, muchas veces no hace falta conocer todos los detalles de algo para implementarlo en un modelo matemático al cual le pedimos cierta información concreta, pero la eliminación de detalles es riesgosa porque muchas podemos cambiar el sentido de las cosas.

En un intento de ofrecer una propuesta de análisis cinético que abarque a todas las formas posibles de catálisis que obedezcan la cinética de Michaelis-Menten sin perder información esencial, W. Liebermeister y E. Klipp propusieron en 2006 la *cinética de conveniencia*. Como su nombre lo indica, no pretende ser una herramienta exhaustiva, sino simplemente una aproximación conveniente que permite a los modelos matemáticos del metabolismo realizar mejores ajustes y predicciones que la simple cinética de primer orden que no toma en cuenta la existencia de la enzima. Para esta propuesta se basaron en un esquema de complejo ternario al azar con dos sustratos y dos productos y luego lo extendieron a diferentes combinaciones, con o sin efector.

En el esquema del complejo ternario al azar podemos suponer que la  $v_{neta}$  depende de la interconversión entre los complejos EAB y EPQ, que en la aproximación del equilibrio rápido sería la etapa limitante de la reacción, estando todas las otras en equilibrio. Por lo tanto, y como vimos anteriormente, las concentraciones de cada una de las formas de enzima pueden escribirse así:

$$[EA] = \frac{[A]}{K_A} [E] \quad (5.47)$$

$$[EB] = \frac{[B]}{K_B} [E] \quad (5.48)$$

$$[EAB] = \frac{[A][B]}{K_A K_B} [E] \quad (5.49)$$

$$[EP] = \frac{[P]}{K_P} [E] \quad (5.50)$$

$$[EQ] = \frac{[Q]}{K_Q} [E] \quad (5.51)$$

$$[EPQ] = \frac{[P][Q]}{K_P K_Q} [E] \quad (5.52)$$

Para mayor simplicidad, podemos escribir los términos  $[A]/K_A$ ,  $[B]/K_B$ , etc. de las ecuaciones 5.47-5.52 como  $a$ ,  $b$ , etc. puesto que ya vimos que es válido expresar las concentraciones relativizadas a sus constantes de disociación. Por lo tanto, si sumamos todas las formas de la enzima para obtener  $[E_T]$ , con esta nueva notación obtenemos:

$$[E_T] = [E](1 + a + b + ab + p + q + pq) \quad (5.53)$$

La  $v_{neta}$ , como dijimos, es:

$$v_{neta} = k_{p,d}[EAB] - k_{p,r}[EPQ] \quad (5.54)$$

donde  $k_{p,d}$  y  $k_{p,r}$  son las constantes catalíticas para las reacciones  $EAB \rightarrow EPQ$  y  $EPQ \rightarrow EAB$ , respectivamente. Reemplazando y, como siempre, dividiendo ambos miembros por la  $[E_T]$ :

$$v_{neta} = [E_T] \frac{k_{p,d}ab - k_{p,r}pq}{1 + a + b + ab + p + q + pq} \quad (5.55)$$

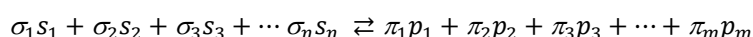
Operando en el denominador para reunir los términos correspondientes a sustratos por un lado y a productos por el otro, obtenemos:

$$v_{neta} = [E_T] \frac{k_{p,d}ab - k_{p,r}pq}{(1 + a)(1 + b) + (1 + p)(1 + q) - 1} \quad (5.56)$$

Ahora podemos imaginar a una enzima que cataliza una reacción con  $n$  sustratos  $s_1, s_2, s_3, \dots, s_n$  y  $m$  productos  $p_1, p_2, p_3, \dots, p_m$ , y lo único que tenemos que hacer es la multiplicatoria de los mismos (simbolizada por  $\Pi$ ):

$$v_{neta} = [E_T] \frac{k_{p,d} \prod_{i=1}^{i=n} s_i - k_{p,r} \prod_{j=1}^{j=m} p_j}{\prod_{i=1}^{i=n} (1 + s_i) + \prod_{j=1}^{j=m} (1 + p_j) - 1} \quad (5.57)$$

Otra cosa que hasta ahora no mencionamos es la estequiometría. En muchas reacciones interviene más de un mol de uno de los sustratos por cada mol del otro, p.ej.:  $2A + B \rightarrow P + Q$ . En general, podríamos decir que cada sustrato  $s_i$  puede tener su coeficiente estequiométrico  $\sigma_i$  y cada producto  $p_i$  su coeficiente  $\pi_i$  de tal modo que la ecuación para la reacción en general podría ser:



Para contemplar esto, en la ecuación 5.57 agregamos los coeficientes estequiométricos:

$$v_{neta} = [E_T] \frac{k_{p,d} \prod_{i=1}^{i=n} s_i^{\sigma_i} - k_{p,r} \prod_{j=1}^{j=m} p_j^{\pi_j}}{\prod_{i=1}^{i=n} (\sum_{z=0}^{\sigma_i} s_i^z) + \prod_{j=1}^{j=m} (\sum_{z=0}^{\pi_j} p_j^z) - 1} \quad (5.58)$$

La presencia de efectores puede ser también incluida a través de los factores que modifican  $V_{max}$  y  $K_S$ , tal como vimos en el Cap. 4 (ecuaciones 4.8 y 4.37).

Estas aproximaciones están siendo utilizadas para desarrollar modelos metabólicos a gran escala y en pocos años seguramente podremos apreciar sus resultados. Cuando se logre tener modelos confiables, que reproduzcan con un grado aceptable de fidelidad lo que ocurre en una célula y sean capaces de predecir el efecto metabólico causado por la modificación de la actividad de una o varias enzimas, habremos dado un paso gigantesco en la comprensión de la fisiología celular y su tratamiento.

## Bibliografía

- Cornish-Bowden A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Londres: Wiley-Blackwell.
- Dixon, M., Webb, E.C. (1980) *Enzymes* New York: Academic Press.
- Fell D. (1996) *Understanding the Control of Metabolism*. Londres: Portland Press.
- Liebermeister, W., Klipp, E. (2006) *Bringing Metabolic Networks to Life: Convenience Rate Law and Thermodynamic Constraints*. Theor Biol Med Model. 3:41.
- Qi F., Dash, R.K., Han, Y., Beard, D.A. (2009) *Generating Rate Equations for Complex Enzyme Systems by a Computer-Assisted Systematic Method*. BMC Bioinformatics. 10:238.
- Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley & Sons.
- Segel I.W. (1982) *Cálculos de Bioquímica*, 2da. edición. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Voet D., Voet J (2006) *Bioquímica*, 3ra. edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.



## CAPÍTULO 6

### Efectos del pH y la Temperatura

*Daniela F. Hozbor y Aníbal R. Lodeiro*

Durante los primeros estudios de la catálisis enzimática referidos en el Cap. 3 la situación era bastante caótica y los investigadores no se ponían de acuerdo sobre lo que estaban caracterizando. Si bien la mayoría de ellos trabajaban con la invertasa, los resultados eran muy poco reproducibles de un laboratorio a otro. Justamente fueron Michaelis y Menten quienes se decidieron a sistematizar los experimentos y en ese esfuerzo se dieron cuenta de que el control del pH era fundamental. El hecho de que los otros no hayan notado este hecho se debió a que estaban acostumbrados a los experimentos de química general, donde el control del pH muchas veces involucra valores muy ácidos o muy alcalinos, pero difícilmente se controla el pH en el rango de la neutralidad. De hecho, es una particularidad de la bioquímica actual que las constantes de equilibrio y las energías libres de Gibbs se midan a  $\text{pH} = 7,0$  y es por ello que las nombramos con un tilde, para diferenciarlas de las más tradicionales de la química. Por otro lado, los primeros investigadores razonaban que si las enzimas actúan en el entorno celular en un medio acuoso, todo lo que había que hacer era extraerlas en agua para no alterar las condiciones fisiológicas. Es por esto que desconfiaban de la adición de buffers artificiales, pero todavía no tenían una noción acabada de los efectos de diluir los buffers naturales que existen en la célula ni tampoco valoraban la cuestión de la compartimentalización celular, que se rompe al hacer la extracción. Asimismo, había pocas posibilidades de controlar la temperatura: los incubadores termostatizados no existían en esa época ni tampoco había un conocimiento acabado sobre los fenómenos de desnaturalización de las proteínas por calor, si bien se sabía que había cierta desestabilización y que la misma era revertida en parte por la presencia del sustrato.

Hoy sabemos que estas dos variables: pH y temperatura, juegan un rol fundamental en la catálisis enzimática. Esto es así a tal punto que no puede expresarse una unidad de actividad si no se informa a qué pH y temperatura se refiere. Estas dos variables afectan tanto a la enzima como al sustrato y también al curso de la reacción. Tienen influencia tanto en la estabilidad estructural de la enzima como en las constantes cinéticas, con lo cual no solo afectan la velocidad de la reacción sino también la proporción de enzima activa que hay en la muestra. El efecto del pH sobre el sustrato también determina la proporción de sustrato en la forma iónica adecuada para unirse a la enzima. De modo que el estudio de estos factores

puede ser muy abarcativo, por lo cual encararemos aquí los conceptos fundamentales acerca de cómo estas dos variables afectan la catálisis enzimática.

## Efecto del pH Sobre la Catálisis Enzimática

Las enzimas están llenas de grupos ionizables: como recordarás hay muchos aminoácidos que pueden ganar o perder protones en sus cadenas laterales (grupos R) y los extremos carboxilo y amino terminales también se protonan y desprotonan. El estado protonado/desprotonado de la enzima, además de afectar a su carga neta, puede afectar las interacciones con el sustrato en el sitio activo en dos sentidos: en la unión del sustrato o en la catálisis. Por lo tanto, el estado de ionización de la enzima puede tener efectos tanto en la  $V_{max}$  como en el  $K_M$ . Los estados de ionización dependen del pKa de cada grupo, el cual es el pH al cual el 50% de las moléculas están protonadas y el otro 50% desprotonadas para el grupo en consideración. En la Tabla 6.1 se muestran los valores de pKa para los grupos ionizables de las proteínas. Además, debes recordar que las enzimas pueden contener también grupos prostéticos que pueden tener sus propios valores de pKa. Cualquiera de estos grupos, cuando se encuentran a un pH por encima de su pKa, liberan un protón, mientras que lo ganan cuando el pH se encuentra por debajo de su pKa. Así, el pKa indica el grado de afinidad de cada grupo por los protones, o dicho de otra manera, la tendencia de cada grupo a tomar o ceder protones. Esto también lo podemos mirar como un equilibrio, que tenderá a la liberación de  $H^+$  desde el grupo ionizable cuando la  $[H^+]$  de la solución sea baja y por el contrario, tenderá a la unión de  $H^+$  al grupo ionizable cuando la  $[H^+]$  sea alta. ¿Pero qué significa aquí “alta” o “baja”? Recordá que el  $pH = -\log_{10}[H^+]$  y por lo tanto un  $pH = 3$  significa que la  $[H^+]$  es  $10^{-3}$  M, mientras que un  $pH = 7$  significa que la  $[H^+]$  es  $10^{-7}$  M. Si un grupo ionizable dado tiene un  $pKa = 3$ , significa que a cualquier concentración de  $[H^+]$  por debajo de  $10^{-3}$  M (o sea,  $pH > 3$ ) se encontrará desprotonado, mientras que un grupo ionizable que tenga un  $pKa = 10$  no soltará su protón a menos que la  $[H^+]$  sea tan baja como  $10^{-10}$  M. Es decir, el primer grupo ionizable tiene baja afinidad por los protones (los libera enseguida cuando empieza a aumentar el pH) mientras que el segundo tiene alta afinidad por los protones (no es proclive a liberarlos a menos que la concentración en la solución sea muy baja). Estas tendencias han sido resaltadas con distintos colores en la Tabla 6.1.

Las curvas del estado de ionización de las enzimas suelen tener una forma de campana, ya que son varios los grupos con diferentes pKa presentes en su estructura. Si solo parte de esos estados de ionización son catalíticamente activos, ya sea porque son los únicos capaces de unir al sustrato o porque se requiere de dicho estado para que ocurra la reacción en el complejo [ES], la  $v_0$  a distintos pH puede asumir también la forma de campana. Sin embargo, dado que el cambio en la  $v_0$  se puede deber tanto a cambios en la  $V_{max}$  como en el  $K_M$ , no es correcto mirar solo la  $v_0$ , sino que hace falta mirar la  $V_{max}$ . Esto es así porque una dada  $v_0$  puede ser un porcentaje de la  $V_{max}$  a cierto pH y otro porcentaje

distinto a otro pH, de manera que no estaremos comparando la misma cosa. Para que la comparación del efecto del pH sobre la actividad enzimática sea válida es necesario comparar las  $V_{max}$  que se obtienen a los distintos pH. Si no se puede disolver el sustrato a concentraciones suficientemente altas, será necesario hacer la linealización para un conjunto de  $v_0$  y  $[S]$  a cada valor de pH a ser considerado.

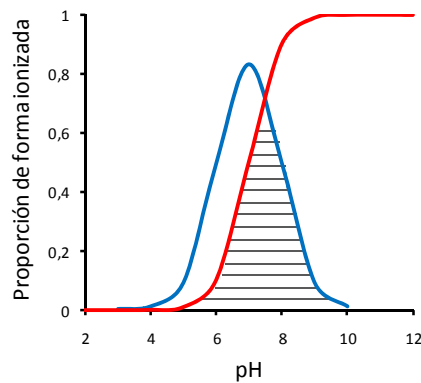
Dado que el sustrato también puede asumir distintos estados de ionización, no todos los cuales sean aptos para la unión al sitio activo o para la reacción, es posible que la curva de campana de la enzima se superponga con una curva de estado de ionización del sustrato. De la intersección de ambas curvas surgirán los pH a los cuales la reacción es posible, y el porcentaje de actividad vendrá dado por el porcentaje de formas activas en el estado de ionización correcto de la enzima. Estas curvas se muestran en la Fig. 6.1 para una enzima con dos grupos ionizables a distintos pKa.

Estos valores son los que se obtienen en solución, pero los mismos pueden variar en más/menos dos unidades según el entorno en que se encuentren dentro de la estructura de la proteína. Por ejemplo, grupos con el mismo pKa pueden interferirse entre sí para tener el mismo estado de ionización.

En algunos libros la protonación/desprotonación de las enzimas suele ser tratada como si el  $H^+$  fuera un efector. De hecho, las características estructurales del  $H^+$  lo hacen adecuado para un tratamiento del tipo de los inhibidores no-competitivos. Sin embargo, la situación es diametralmente distinta, ya que los protones se unen a varios sitios en la enzima y por lo tanto no es adecuado el tratamiento como si fueran efectores con un único sitio de unión. Por otra parte, prácticamente todas las enzimas van a ser afectadas por los protones, y el efecto mismo puede no ser una inhibición o activación total.

**Tabla 6.1: Valores de pKa de los grupos ionizables de las proteínas**

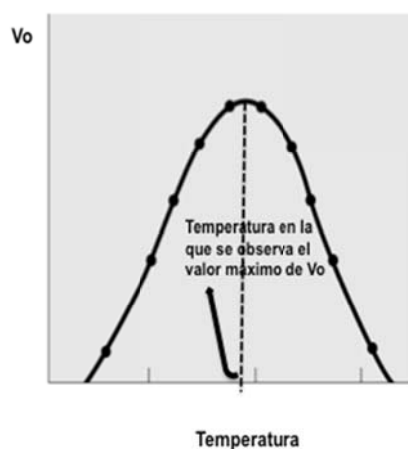
Aminoácido	Grupo Ionizable	pKa
C-terminal	Carboxilato	3,4
Aspartato	Carboxilato	4,1
Glutamato	Carboxilato	4,5
Histidina	Imidazol	6,3
N-terminal	Amonio	7,5
Cisteína	Tiol	8,3
Tirosina	Fenol	9,6
Lisina	Amonio	10,4
Argnina	Guanidinio	>12



**Fig. 6.1.** Proporción de las formas ionizadas de un sustrato cuyo  $pK_a = 7,0$  (línea roja) y una enzima con dos grupos ionizables, uno con  $pK_a = 6,0$  y el otro con  $pK_a = 8,0$  (línea azul). Suponiendo que los estados óptimos para la catálisis son el desprotonado para el sustrato y con una carga negativa para la enzima, la actividad enzimática tendrá lugar en el espacio marcado por las líneas horizontales.

## Efecto de la Temperatura Sobre la Catálisis Enzimática

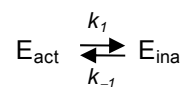
Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa con la temperatura. La variación de la actividad enzimática con la temperatura es diferente de unas enzimas a otras en función de la barrera de energía de activación de la reacción catalizada. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras reacciones químicas, en las reacciones catalizadas por enzimas el efecto de la temperatura es más complejo porque casi todas las enzimas se desnaturalizan al ser calentadas por encima de las temperaturas fisiológicas. Esto es, la conformación de las enzimas se altera usualmente de manera irreversible perdiendo la actividad catalítica. Como resultado de ambas acciones, la dependencia de la actividad catalítica ( $v_0$ ) de las enzimas con la temperatura puede representarse como se muestra en la Fig 6.2



**Fig 6.2.** Dependencia de la actividad catalítica con la temperatura. Con la flecha se indica la temperatura a la cual se registra el valor más alto de actividad enzimática ( $v_0$ )

La desnaturalización no involucra la ruptura de enlaces covalentes sino la desestabilización de puentes de hidrógeno y de otras interacciones débiles que están involucradas en el mantenimiento de las conformaciones activas de la enzima. El proceso químico de la desnaturalización es parcialmente comprendido, aquí por cuestiones de simplicidad trabajaremos la desnaturalización reversible pero teniendo en cuenta que es importante la irreversible aunque sea más compleja probablemente catalogada así porque el conocimiento sobre la misma es escaso.

El efecto de la desnaturalización sobre las constantes de velocidad puede analizarse considerando que solo una parte de la enzima va a estar activa mientras que otra parte va a estar inactivada por el efecto de la temperatura. Así, se va a generar un equilibrio entre la activa ( $E_{act}$ ) y la inactiva ( $E_{ina}$ ):



de modo que podrá considerarse una constante de equilibrio para la reacción de desnaturalización:

$$K_{eq} = \frac{[E_{ina}]}{[E_{act}]} \quad (6.1)$$

La constante de equilibrio para la desnaturalización varía con la temperatura de acuerdo con la ecuación de van't Hoff

$$-RT \ln K_{eq} = \Delta G^{o'} = \Delta H^{o'} - T\Delta S^{o'} \quad (6.2)$$

reordenando:

$$K_{eq} = \exp\left(\frac{\Delta S^{o'}}{R} - \frac{\Delta H^{o'}}{RT}\right) \quad (6.3)$$

Por su parte la constante específica de velocidad ( $k$ ) estaría gobernada por la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (6.4)$$

siendo  $A$  una constante y  $E_a$  la energía de activación de Arrhenius.

La velocidad de la reacción en condiciones de sustrato saturante, como hemos visto, podemos expresarla como:

$$V_{max} = k[E_T] \quad (6.5)$$

pero como solo una parte de la cantidad total de enzima va a estar activa, la  $[E_T] = [E_{act}] + [E_{ina}]$ , por lo tanto, la ecuación 6.5 debería expresarse como

$$V_{max} = k[E_{act}] \quad (6.6)$$

Para poder expresar esta ecuación en términos de  $[E_T]$ , multiplicaremos y dividiremos por  $[E_T]$  y reemplazaremos usando la ecuación 6.3 para la  $K_{eq}$ :

$$V_{max} = k[E_{act}] \frac{[E_T]}{[E_{act}] + [E_{ina}]} \quad (6.7)$$

sacando factor común y reordenando:

$$V_{max} = k \frac{[E_T]}{1 + \frac{[E_{ina}]}{[E_{act}]}} \quad (6.8)$$

Reemplazando por el valor de  $K_{eq}$ :

$$V_{max} = k \frac{[E_T]}{1 + K_{eq}} \quad (6.9)$$

La constante de velocidad observada,  $k_{obs}$ , puede definirse como:

$$k_{obs} = \frac{k}{1 + K_{eq}} \quad (6.10)$$

Reemplazando  $k$  y  $K_{eq}$  por las expresiones de las ecuaciones 6.3 y 6.4, podemos ver que esta constante varía con la temperatura de acuerdo con la siguiente relación:

$$k_{obs} = \frac{A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT}\right)} \quad (6.11)$$

A bajas temperaturas, cuando  $\Delta S^\circ/R$  sea bajo comparado con  $\Delta H^\circ/RT$ , la exponencial del denominador se hace pequeño. En tales circunstancias, la  $k_{obs}$  variará con la temperatura según la ecuación de Arrhenius:

$$\log k_{obs} = -\frac{E_a}{2.3RT} + \log A \quad (6.12)$$

Así, la representación de  $\log k$  versus  $1/T$  da una recta de cuya pendiente puede determinarse el valor de  $E_a$ . En un esquema de equilibrio rápido  $V_{max} = k_p [E_T]$  y de aquí también se puede calcular el valor de  $E_a$ . Pero es importante recordar aquí que una concentración de sustrato saturante no será tal para todas las temperaturas ya que  $K_M$  depende de la temperatura. Para la mayoría de las reacciones enzimáticas  $V_{max}$  depende de varias constantes de velocidad las cuales varían de manera diferencial con la temperatura. Por lo tanto, la  $E_a$  estimada a partir de  $V_{max}/[E_T]$  vs  $1/T$  será un valor aparente. La representación de Arrhenius incluso puede no ser lineal, presentando un cambio agudo en la pendiente a alguna temperatura (temperatura de transición) y esto parece deberse al hecho de que la  $V_{max}$  cambia de un proceso limitante de velocidad a otro (diferente dependencia con la temperatura de las constantes involucradas). Una caída brusca en la representación de Arrhenius indica desnaturalización de la proteína.

Esto podemos analizarlo fácilmente también de la ecuación 6.11. A temperaturas altas, el denominador se incrementa y la constante específica de velocidad decrece rápidamente a cero.

Otro parámetro que se utiliza para cuantificar el efecto de la temperatura es el coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ), que se define, para una temperatura dada, como el factor de incremento de la velocidad de reacción cuando la temperatura se incrementa 10 °C.

$$E_a = \frac{2,3RT_1T_2 \log Q_{10}}{10} \quad (6.13)$$

De aquí un  $Q_{10}=2$  es equivalente a una  $E_a$  de 12.600 cal/mol en la región de 25°C a 35°C. Más allá de esta complejidad, los valores de  $E_a$  que llegan a determinarse con estas aproximaciones y cuidados aportan información valiosa respecto de mecanismos de reacción. Así por ejemplo los autores Bender, Kézdy y Gunter (1964) realizaron estudios sobre la enzima quimotripsina en los que pudieron detectar un comportamiento especial respecto de la temperatura pudiendo evidenciar los mecanismos que se veían afectados por la temperatura. Estos autores realizaron comparaciones con enzimas con mecanismos conocidos y eso les llevó a una clara comprensión de la química del proceso dependiente con la temperatura.

Ahora bien, el efecto de la temperatura depende también del tiempo de incubación de la enzima a las distintas temperaturas. Resulta fácil de comprender que la progresión de la desnaturalización será más rápido cuanto mayor sea la temperatura. Así se podrá identificar una temperatura óptima para una reacción catalizada enzimáticamente que depende del tiempo del ensayo escogido. La temperatura óptima será entonces aquella en la que se observa el valor máximo de actividad enzimática que se mantiene constante a lo largo de un período de tiempo por lo menos tan largo como el que dura el ensayo. La temperatura óptima puede establecerse realizando el ensayo de estabilidad que implica la incubación de la enzima sin sustrato a diferentes temperaturas durante una o dos veces el tiempo de ensayo deseado y midiendo luego de agregar el sustrato la actividad de la enzima a la temperatura donde se había observado el valor más alto de actividad (indicada con una flecha en la Fig 6.2).

## Ensayo de Estabilidad Frente a la Temperatura

A modo de ejemplo en la Fig. 6.3 se presenta la gráfica de la dependencia de la actividad enzimática de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, una enzima que interviene de en el metabolismo de hidratos de carbono. Dicha gráfica fue obtenida preparando mezclas de reacción (en este caso 11 mezclas de reacción) de igual composición que son incubadas cada una de ellas a las temperaturas indicadas en la figura. Cada punto de la gráfica se obtiene de la evaluación a cada temperatura de la variación de la concentración de producto en función de tiempo (velocidad inicial y en este caso la  $V_{max}$ ). En este caso particular se graficó la actividad enzimática porcentual calculada respecto del valor de actividad enzimática hallada a 25°C.

Es importante remarcar aquí que de esta gráfica no se define la temperatura óptima. De esta gráfica se puede definir la o las temperaturas a las que se detecta el valor más alto de  $V_{max}$ . Para establecer la temperatura óptima se realizó un *ensayo de estabilidad* que implica, como hemos mencionado, incubar las mezclas de reacción sin sustrato a distintas temperaturas por un tiempo igual o el doble del empleado en el ensayo de actividad. Una vez finalizada la incubación de la enzima sin sustrato a cada temperatura, a la mezcla de reacción se le adiciona el sustrato y se incuba a la temperatura en que se detectó el valor más alto de  $V_{max}$  que en este caso podría ser cualquier temperatura entre 25°C y 32°C. Los resultados obtenidos al hacer un experimento de estabilidad térmica como el descrito se muestran en la Fig 6.4. En esta figura se puede observar que cualquiera de las temperaturas entre 25°C y 32°C puede tomarse como temperaturas óptimas. También se observa en la gráfica que por encima de 35°C la enzima se desnaturaliza y deja de ser funcional.

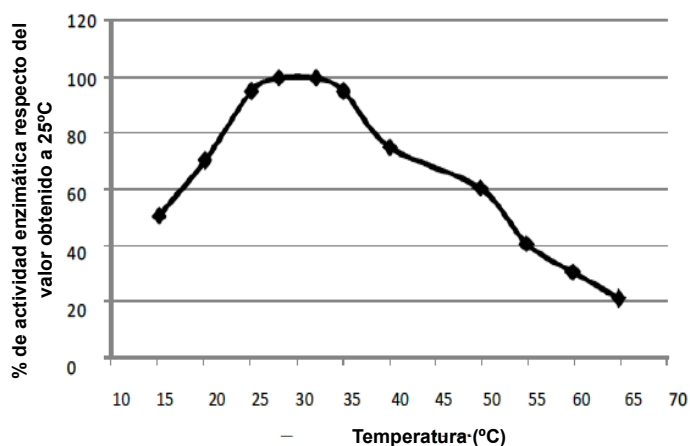
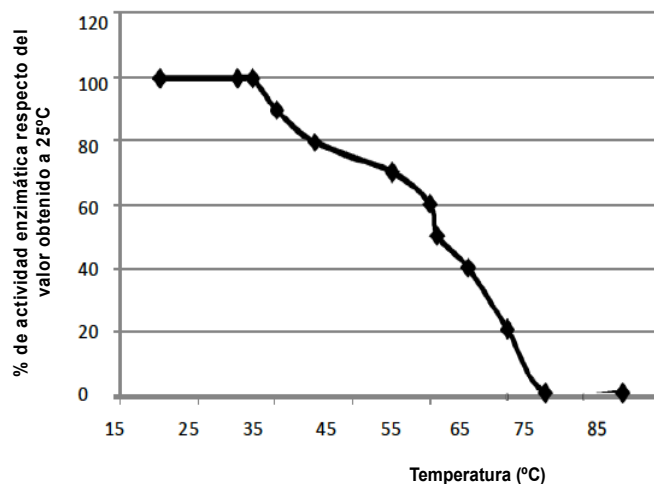


Fig 6.3. Dependencia de la actividad enzimática de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa con la temperatura





**Fig 6.4.** Actividad remanente respecto de la actividad detectada a 25°C luego de incubar el extracto enzimático durante 10 minutos a cada una de las temperaturas ensayadas.

## Problemas

### Problema 1

La fumarasa cataliza la deshidratación reversible del malato a fumarato:



La energía de activación de la reacción es:

Ea: 15.600 cal/mol.

a- ¿Cuál es el cambio de la constante de velocidad cuando se aumenta la temperatura de 25 a 35°C?

b- Sabiendo que el valor de la constante de velocidad a 25°C es  $k_{25} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , calcule el valor de la misma a 35°C.

c- Dibuje el perfil de energías a lo largo de la coordenada de reacción indicando a qué corresponde cada región de la curva.

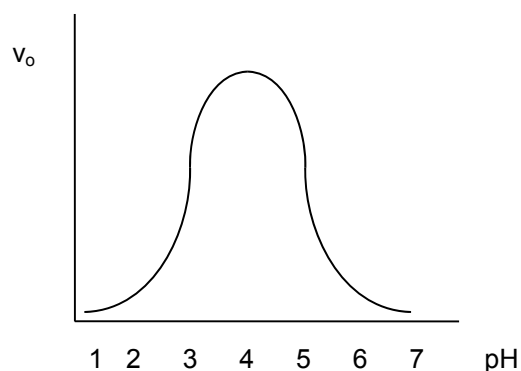
### Problema 2

a) Se encontró que la velocidad de la reacción de hidrólisis de las uniones  $\alpha$ -1→4 de almidón, catalizada por la enzima alfa-amilasa, experimentaba un aumento de tres veces al pasar de 20 a 30°C. En base a estos datos calcule la energía de activación (Ea) de la reacción.

b) En presencia de ácido, la energía de activación para la reacción de hidrólisis es de 25.000 cal/mol. ¿Con cuál de los dos catalizadores será mayor el aumento de la velocidad inicial de reacción para un determinado aumento de temperatura? ¿Por qué?

### Problema 3

Se midió la actividad de una enzima a diversos pH y se obtuvo la siguiente curva:



- a) ¿Cuáles serían los aminoácidos involucrados en el centro activo y cuál el estado de ionización requerido para obtener la máxima actividad?
- b) Por exposición durante 5 minutos a pH 5,0, la enzima se inactiva en un 50%. Dibuje el gráfico comparativo de las curvas [P] en función del tiempo, para el pH óptimo y para pH 5,0.
- c) Dibuje la curva que obtendría al exponer la enzima 5 minutos a cada uno de los pH correspondientes a la curva I y luego medir su actividad a pH 4,0.

#### Problema 4

Se midió la actividad de la enzima monoaminoxidasa a diferentes pH y se obtuvieron los siguientes valores (en unidades relativas a la actividad a pH 7,0):

<b>pH</b>	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0
<b>actividad</b>	100	150	200	215	30

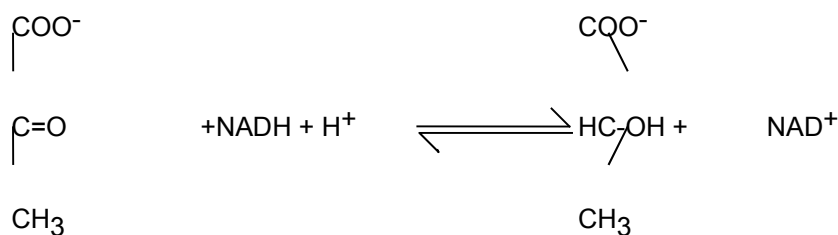
- a- Grafique actividad vs pH. ¿Cuál es el pH óptimo de esta enzima?
- b- Luego de preincubar la enzima durante 5 minutos a cada uno de los pH indicados, se midió su actividad a pH 7,3 y se obtuvieron los siguientes valores:

<b>pH de preincubación</b>	8	9	10	11
<b>actividad a pH 7,3</b>	120	120	100	20

- b- Grafique y explique estos resultados.

#### Problema 6

La enzima lactato deshidrogenasa cataliza la siguiente reacción:



El mecanismo de reacción implica la transferencia coordinada de un  $H^+$  (proveniente del residuo His 195) y un  $H^+$  (proveniente de la coenzima NADH ) al piruvato. El sustrato se une luego de la unión enzima-coenzima.

A partir de diferentes líneas experimentales se llegó a los siguientes resultados:

a- En el caso en que la proteína se modificó, reemplazando el residuo Arg 109 por Gln, la reactividad química del piruvato unido se reduce drásticamente; la velocidad de transferencia del  $H^+$  se reduce a menos del 0,07% con respecto a la enzima nativa. En cambio, la afinidad de unión del piruvato se reduce mucho menos (5%) y la del NADH no sufre alteración.

b- Un residuo Asp 168 se encuentra cercano a la His 195. Su reemplazo por Ala o Asn causa una fuerte reducción de la velocidad de reacción.

c- El reemplazo de un residuo Arg 171 por Lys reduce la afinidad de la enzima por el sustrato al 0,05% con respecto a la unión con la enzima nativa. Asimismo, se modifica la especificidad de la unión E-S. Mientras la enzima nativa tiene  $K_M = 0,05$  mM y 2,00 mM para sustratos con cadenas de uno y dos carbonos, respectivamente, el mutante Lys tiene  $K_M$  de 120 y 60 mM.

d- El reemplazo de un residuo Ile 250 por Asn reduce la unión del NADH.

En base a estos resultados, prediga:

a- La localización posible de los residuos mencionados en la enzima nativa, en relación con el sustrato y el NADH.

b- ¿Cuál sería su función en la catálisis?

## Bibliografía

Cornish-Bowden A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Londres: Wiley-Blackwell.

Dixon, M., Webb, E.C. (1980) *Enzymes* New York: Academic Press.

Fell D. (1996) *Understanding the Control of Metabolism*. Londres: Portland Press.

Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley & Sons.

Segel I.W. (1982) *Cálculos de Bioquímica*, 2da. edición. Zaragoza: Editorial Acribia.

Voet D., Voet J (2006) *Bioquímica*, 3ra. edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

# CAPÍTULO 7

## Alosterismo y cooperativismo

*Gustavo Parisi*

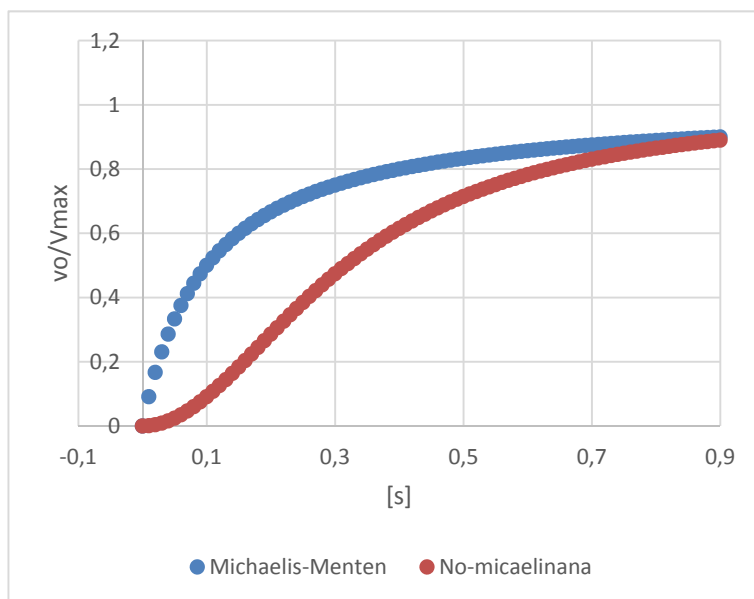
*Without an adequate technological advance the pathway of progress is blocked, and without an adequate guiding vision there is no pathway, there is no way ahead'.*

CARL WOESE, IN "A NEW BIOLOGY FOR A NEW CENTURY", 2004

### Introducción

Comencemos por el final: **el cooperativismo y el alosterismo son propiedades generales de las proteínas**. No todas las proteínas son cooperativas pero la gran mayoría son alostéricas. Clásicamente en Bioquímica es un tema que se lo asocia a enzimas, pero por un lado históricamente el cooperativismo se descubrió en una proteína que no es una enzima: la hemoglobina y por otro en los últimos años se ha encontrado que la gran mayoría de las proteínas serían alostéricas. De esta forma una proteína transportadora, un receptor hormonal o una proteína estructural pueden o no presentar cooperativismo y/o alosterismo. Además, una proteína puede ser sólo cooperativa, sólo alostérica o tener ambas propiedades juntas. De aquí en más hablaremos indistintamente de proteína o enzima.

Definimos **cooperativismo** como la capacidad que tiene una proteína de **cambiar sus constantes de unión para un determinado ligando**, en función de la concentración de **ese** ligando. Definimos **alosterismo** como la capacidad que tiene una proteína de **cambiar sus constantes de unión para un determinado ligando**, en función de la concentración de **otro** ligando. La evidencia experimental más común de la existencia de cooperativismo es el alejamiento del comportamiento miceliano cuando graficamos  $v_0$  vs.  $[s]$  o  $v_0/V_{max}$  como en la Figura 7.1



**Fig. 7.1.** Comparación de cinética micaselina y no micaseliana. Notese que en el eje Y se representa  $v_0/V_{max}$ .

El comportamiento sigmoide, en contraposición a la hipérbola cuadrática típica de enzimas y proteínas micaselinas, constituye una **fuerte evidencia** de la presencia de cooperativismo. El hecho de graficar  $v_0/V_{max}$  es muy conveniente para darnos cuenta que este tipo de gráficos se pueden hacer tanto para enzimas como para proteínas que unan un determinado tipo de ligando. Utilizando la ecuación de Michaelis-Menten podemos ver que

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{[s]}{K_m + [s]}$$

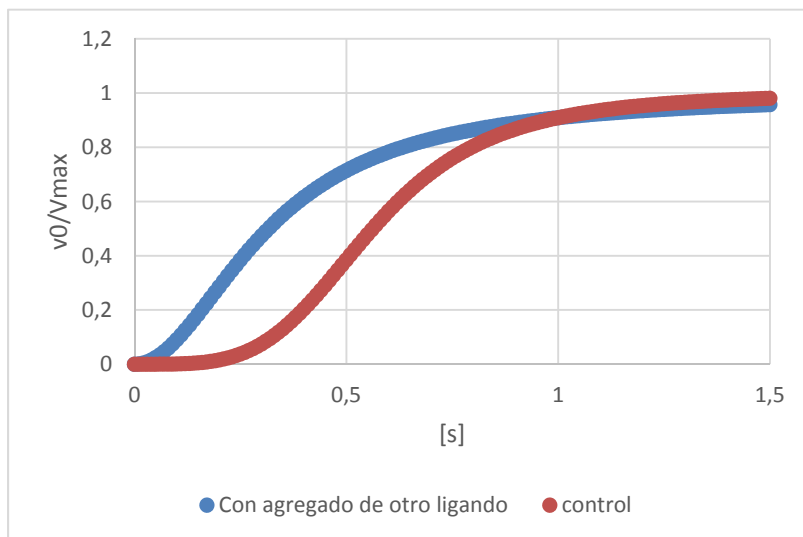
reemplazando  $v_0$  y  $V_{max}$  tenemos:

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{[s]}{K_m + [s]} = \frac{k_{cat}[ES]}{k_{cat}[Et]} = \frac{[ES]}{[Et]} = \phi$$

Donde  $\phi$  representa el porcentaje de la enzima asociado a una determinada concentración de sustrato. Cuando la enzima está saturada  $\phi = 1$  como ocurre cuando vemos en la figura 7.1 el gráfico a altas concentraciones de sustrato. Si la proteína no es una enzima, como la hemoglobina, la podremos estudiar de la misma forma que estudiamos a las enzimas pero ahora viendo cómo varía  $\phi$  vs.  $PO_2$ .

Cual es la evidencia experimental más común para el alosterismo? La proteína con el comportamiento no-micaseliano de la figura 7.1 (línea roja) podría ser alostérica, pero por las variables que estoy graficando  $\phi$  vs  $[s]$  no lo estoy poniendo de manifiesto. Repasemos las definiciones dadas más arriba, **cooperativismo**, capacidad que tiene una enzima de modificar sus constantes de unión para un ligando en función de la concentración de **ese** ligando,

mientras que el **alosterismo** es la capacidad que tiene una proteína de cambiar sus constantes de unión para un ligando en función de la concentración de **otro** ligando, distinto al primero. Ahora en la figura 7.1 no se menciona explícitamente ningún “otro ligando” que no fuera s, el sustrato. Así que para comprobar si la proteína tiene comportamiento alostérico debería repetir el ensayo sumando otra variable, la concentración de **otro ligando**.



**Fig. 7.2.** Al agregar un modulador en la mezcla control (curva roja) vemos que esta se desplaza hacia arriba. Este modulador veremos más adelante que es un modulador alostérico positivo. El cambio de la curva roja a la azul cuando se lo compara a una determinada concentración de sustrato indica la presencia de alosterismo.

Según la figura 7.2, la línea azul es distinta a la línea control (que corresponde al agregado solamente de sustrato), la diferencia entonces resulta del agregado de “otro ligando” al sistema. La diferencia entre ambas curvas (a una determinada concentración de sustrato) **pone de manifiesto la presencia de alosterismo**.

Las curvas sigmoidales implican que la unión de ligando se hace cada vez más fácil al aumentar la concentración de ese ligando. De ahí que una condición necesaria para que exista cooperativismo es que la proteína tenga al menos dos sitios de unión al ligando. Sin embargo, esta condición no es suficiente, ya que para que exista cooperativismo los sitios tienen que influenciarse uno con otro para facilitar la unión del ligando. Obviamente existen proteínas con la propiedad inversa, en vez de favorecer la unión de ligando, la desfavorecen. De ahí que el cooperativismo puede dividirse en positivo (favorecen la unión de ligando) y negativo (desfavorecen la unión de ligando).

Ahora que ya tenemos algunos conceptos iniciales, veamos brevemente la historia de estas propiedades. Una de las primeras evidencias del cooperativismo fue obtenida estudiando la hemoglobina y su curva de saturación en oxígeno. La misma fue estudiada en 1904 por Christian Harald Lauritz Peter Emil Bohr (padre de Niels Bohr, físico atómico a quien debemos uno de los primeros modelos atómicos). Bohr estudió tanto el comportamiento de la hemoglobina en función de la concentración de oxígeno, así como

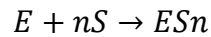
también cómo variaba este comportamiento en función de “otros ligandos” como la concentración de protones (pH) y CO<sub>2</sub>. Cuando en 1913 Michaelis-Menten formularon las bases matemáticas del comportamiento cinético de las enzimas, las enzimas que posteriormente se estudiaron y se apartaban de este comportamiento micaliano, dando curvas no-michaelianas o sigmoidales, **eran tomadas como errores o artefactos**. Para comprender esta actitud, debemos recordar que a principios de siglo XX era bastante difícil trabajar con proteínas y enzimas en el laboratorio. El éxito de Michaelis-Menten en obtener un formalismo para explicar la cinética enzimática, **no sólo se debió a su pericia matemática** sino también **experimental**. Michaelis-Menten se encuentran entre los primeros investigadores que pudieron mantener constante el pH para mantener la estabilidad de la enzima durante el ensayo cinético y obtener datos coherentes sin artefactos producidos por desnaturalizaciones de la enzima. Es importante destacar que la obtención de curvas sigmoidales bien se podría deber a la desestabilización de la enzima (por distintos efectos, pH, temperatura, etc) o efectos relacionados con el sustrato. Por ejemplo, como usualmente la unión de sustrato implica un factor de estabilización adicional, en el transcurso de un experimento cinético al variar la [s], la enzima inicialmente desestabilizada podría ir ganando estabilidad con el aumento de la [s] con lo que daría una cinética posiblemente no-michaeliana o sigmoidal. Además, como al comienzo del siglo XX todavía no estaban caracterizadas las rutas metabólicas y en varios casos no se conocían los sustratos naturales de las enzimas, varias veces ocurrían desviaciones de la cinética michaeliana por no tener bien caracterizado al sustrato. Por ejemplo, en el caso de enzimas que utilizan ATP, el verdadero sustrato de la enzima es el ATP complejoado con magnesio, de ahí que la falta de control de la presencia del ión podría introducir desviaciones en la cinética. Fueron necesarios varios años, concretamente hasta casi comienzos de la década del 60, para que se alcanzara una maduración conceptual del comportamiento sigmoidal en proteínas, pero esta maduración fue necesariamente acompañada de una notable mejora en las técnicas analíticas para la caracterización química (pensemos que para estimar velocidades iniciales es necesario detectar pequeñas variaciones de producto o sustrato o como mencionamos anteriormente lograr la estabilidad del sustrato y de la enzima). Fue así, que más de 40 años después de su descubrimiento se desarrollaron modelos matemáticos para explicar el cooperativismo y el alosterismo.

## **Modelos matemáticos para explicar el cooperativismo**

### **Modelo de Hill y Adair**

La primera descripción matemática para explicar una curva sigmoidea fue descrita por Archibald Hill en 1910. Hill quería expresar matemáticamente **las distintas curvas de saturación que presentaba la hemoglobina en soluciones con distintas concentraciones**

**salinas.** En esa época, no se conocía bien el peso molecular de la hemoglobina, así que se tenían curvas para lo que hoy sabemos eran las formas monoméricas, diméricas, etc. Considerando que la hemoglobina podía unir, una, dos, tres o cuatro moléculas de oxígeno en un solo paso Hill llegó a la siguiente ecuación:



$$\Phi = \frac{ES}{Et} = \frac{S^n}{K_s + S^n}$$

Donde otra vez encontramos a  $\Phi$  como el porcentaje de saturación de la enzima y  $K_s$  es la constante “aparente” de disociación (es aparente ya que la enzima tiene varios sitios de unión). En esta ecuación **n** representa el **coeficiente de Hill**. La ecuación de Hill tiene una suposición muy fuerte, casi irreal en considerar que **los ligandos de una enzima o proteína** (suponiendo la hemoglobina con cuatro sitios de unión) **se unen al mismo tiempo a la molécula** (sería algo muy poco probable que 5 moléculas interaccionaran todas al mismo tiempo). Si bien el **n** en la ecuación de Hill representa el número de moléculas que se unen a la enzima, en la práctica este **n** nunca alcanza ese valor teórico. De ahí que en la ecuación de Hill el **n** se lo denomine “**coeficiente de Hill**” y no “número de sitios de unión” de la enzima. Por ejemplo, la estimación del **n** para la hemoglobina oscila entre 2.7 y 3.2, lo que tendría que dar un valor de 4 si el modelo fuera correcto.

A pesar de esta fuerte consideración poco realista, la ecuación de Hill es **enormemente simple** y muy utilizada para realizar una primera caracterización de una proteína posiblemente cooperativa.

Una forma útil de utilizar la ecuación es en su forma lineal

$$\log(\Phi) = n \log(s) - \log(K_s)$$

De donde podemos estimar fácilmente **n**. Este coeficiente además de darnos información sobre el número aproximado de sitios, también nos da información sobre el tipo de cooperatividad. Si **n**>1 tenemos cooperatividad positiva en cambio si **n**<1 tenemos cooperatividad negativa y finalmente si **n**=1, la ecuación de Hill se reduce a un comportamiento micelaiano, o sea no hay cooperatividad.

Hacia 1925 Gilbert Adair **estimó correctamente el peso molecular de la hemoglobina y confirmó que poseía 4 sitios de unión poniendo de manifiesto las desviaciones derivadas de la ecuación de Hill**. Adair comprendió entonces que la hemoglobina completamente saturada se formaba en etapas uniéndose secuencialmente las cuatro



moléculas de oxígeno y no en un solo paso como sugería Hill. Estimó así las cuatro constantes de unión (una para cada paso) encontrando una ecuación que ajustaba correctamente la curva de saturación de la hemoglobina. Sin embargo, no propuso un mecanismo para explicar la cooperatividad.

Linus Pauling hacia 1935 fue quien propuso el **primer modelo mecanístico** para explicar la cooperatividad. Este reinterpreto la ecuación de Adair suponiendo que las distintas constantes de unión de la hemoglobina se podían interpretar en términos de interacciones entre las subunidades de la hemoglobina. Sin embargo, las ecuaciones derivadas por él se basaron en presunciones falsas sobre la organización estructural de la hemoglobina. Deberíamos esperar hasta la década del 60 para que dos nuevas teorías pudieran explicar en términos mecanísticos (bioquímicos podríamos decir) no sólo la cooperatividad, sino una nueva propiedad de las proteínas: el alosterismo.

## Contexto histórico de los nuevos modelos

Numerosos estudios en la década del 50 parecerían confirmar que dos enzimas, la aspartato transcarbamilasa y la treonina deaminasa, se apartaban de la cinética michaeliana. Los estudios en estas enzimas formaban parte de numerosos esfuerzos para comprender el control metabólico en microorganismos. En 1956, Umbarger estaba estudiando la posible existencia de lo que se llama en inglés *negative-feedback* o control negativo por retroalimentación. En una publicación clave publicada en la prestigiosa revista *Science*, mostró el efecto inhibitorio de la isoleucina sobre la enzima treonina deaminasa, primer paso en la síntesis de isoleucina a partir de la treonina. Pero además demostró que la cinética de la enzima no era michaeliana aunque tomando los recaudos necesarios para suavizar la posibilidad que sus resultados fueran erróneos ya que contrariaban la bien establecida cinética michaeliana (*“Further experiments are in progress in an effort to decide whether this peculiar kinetic behavior is apparent or real”*, o algo así como “Se están llevando a cabo experimentos adicionales para decidir si esta cinética tan particular es aparente o real”). Posteriormente Jean-Pierre Changeux se topó con los mismos problemas al encontrar que la enzima tenía una cinética “compleja” y que “no sigue la simple cinética de Michaelis-Menten”. Pero la contribución más importante de Changeux fue demostrar que el sitio de unión del sustrato (treonina) permanecía funcional después del agregado de ciertas sustancias desnaturizantes, pero significativamente, la enzima no se inactivaba en presencia de isoleucina. Resultados similares se encontraron por esos años para la enzima aspartato transcarbamilasa, donde el CTP inhibe a la enzima, otra vez uniéndose a un sitio distinto al del sustrato. Estos experimentos condujeron a Jaques Monod y a Françoise Jacob en 1961 a postular la idea del alosterismo, la capacidad que tiene una enzima de modular la unión de un determinado ligando en función de otro ligando (de ahora en más lo llamaremos modulador alostérico) que se une en un sitio distinto al sitio activo de la enzima (sitio alostérico).

La importancia del descubrimiento del alosterismo produjo un cambio conceptual sobre el comportamiento sigmoide que presentaban estas enzimas forzando de alguna forma al redescubrimiento del cooperativismo (ya que el fenómeno se conocía desde los tempranos estudios de la hemoglobina hacia 1904 por C. Bohr). Fue así, que la necesidad de comprender el control del flujo metabólico en la década del 50 derivó en la conceptualización de dos propiedades fundamentales de las proteínas para regular el metabolismo: el cooperativismo y el alosterismo.

## Modelo de Monod

Como vimos en el capítulo 2, hacia fines de la década del 50 Daniel Koshland desafió el clásico modelo de llave-cerradura propuesto por Emile Fischer en 1894. **Un nuevo paradigma surgía para explicar cómo funcionan las proteínas: la flexibilidad o dinámica de la proteína.** Koshland propuso que una proteína existía en una forma única, sin embargo, esta forma o conformación sufría un cambio conformacional en presencia del ligando para lograr una mejor especificidad sobre el mismo. Como era el ligando el que producía el cambio conformacional, Koshland denominó a su modelo ajuste-inducido (**ajuste** de la conformación de la enzima **inducido** por el sustrato). La existencia de cambios conformacionales en presencia o ausencia de ligando, comenzó a visualizarse con la cristalización de la hemoglobina en sus dos conformaciones, desoxigenada y oxigenada, respectivamente T y R según Max Perutz. La idea del alosterismo y cooperativismo recientemente emergidas hacia 1961 como comentamos arriba, sumada a la cristalografía de la hemoglobina llevaron a Monod, Wyman y Changeux en 1965 a formular el modelo de pre-equilibrio para explicar ambas propiedades.

El modelo de Monod entonces se basa básicamente en que la proteína se encuentra en solución representada por distintos conformémeros, básicamente dos, T y R. Indicaremos T<sub>0</sub> y R<sub>0</sub> usando el subíndice para indicar el número de ligandos unidos a cada forma. Estos conformémeros T<sub>0</sub> y R<sub>0</sub> se encuentran en equilibrio representado por la constante  $L = T_0/R_0 > 1$ , de esta forma en el equilibrio prevalece el conformémero T. Vimos que este equilibrio pre-existe al agregado del ligando de ahí que al modelo se lo conozca también como de pre-equilibrio.

Los conformémeros T y R poseen distintas constantes de afinidad al sustrato ( $K_d^R$  y  $K_d^T$ ) cuya relación define la constante c:

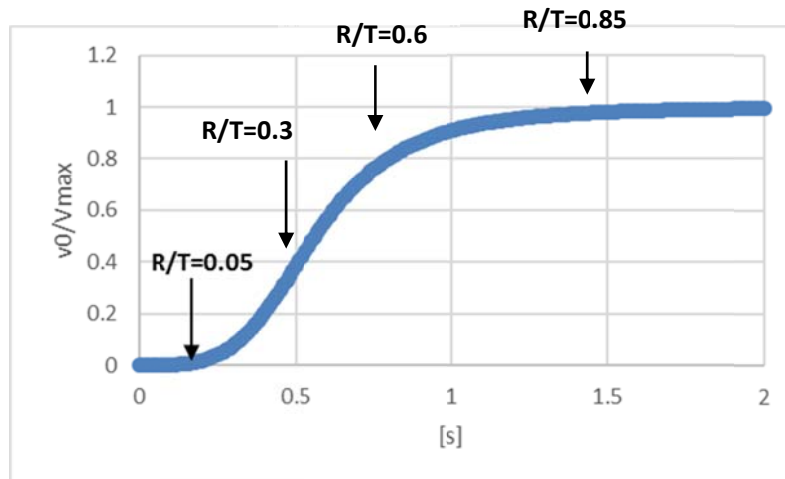
$$c = \frac{K_d^R}{K_d^T}$$

Si  $c=1$  las dos constantes de afinidad (expresada como constantes de disociación) serán iguales. Usualmente en el modelo  $c < 1$  indicando que el conformémero R tiene mayor afinidad que el conformémero T. Dicha constante también nos dice el sentido del desplazamiento del

equilibrio T y R al agregar sustrato. Si  $c$  es pequeña y menor que 1, el equilibrio se desplazará hacia la forma R ya que el sustrato se unirá preferentemente a la forma R. Es importante destacar que el modelo original de Monod se proponía sólo para proteínas oligoméricas, ya que en ese momento eran las únicas proteínas con más de un sitio de unión a sustrato que se conocían. Según el modelo original una proteína oligomérica (pensemos en la hemoglobina con cuatro subunidades) tendría la misma constante de afinidad ( $K_d^R$  o  $K_d^T$ ) para cada uno de sus sitios en el respectivo conformero R o T. Expresado de otra forma, todos los sitios de unión al sustrato en la forma R tienen idéntica constante de afinidad, y lo mismo ocurre en el conformero T. La consideración que las proteínas cooperativas o alostéricas fueran oligoméricas en la actualidad se ha relajado ya que se conocen muchas proteínas cooperativas y/o alostéricas que son monoméricas. Sólo recordemos que la condición necesaria para que exista cooperativismo es que la proteína tenga al menos dos sitios de unión al sustrato y que ambos sean modificables entre sí. Como vimos, junto con la definición de alosterismo, la condición necesaria para que exista tal propiedad es que exista en la proteína al menos un sitio alostérico (aquel que unirá como definimos más arriba un modulador alostérico).

Como en otros modelos vistos anteriormente, el modelo de Monod nos da una expresión para  $\Phi$  (el porcentaje de saturación) que es una función de la concentración de sustrato, del número de sitios de unión de ligandos, de la constante  $c$  y la constante  $L$ . Esta función  $\Phi$  ajusta las curvas sigmoideas observadas en las proteínas cooperativas.

¿Cuál es el fundamento del cooperativismo en el modelo de Monod? Supongamos como ejemplo una proteína con dos sitios de unión. Sabemos que la constante  $c < 1$  o sea el conformero R tiene mayor afinidad por el sustrato que T y sabemos además que los dos sitios de unión al sustrato tienen la misma constante de afinidad en el conformero T ( $K_d^T$ ) y en el conformero R ( $K_d^R$ ). El sistema inicialmente se encuentra en equilibrio, definido por la constante  $L = R_0/T_0$ . Al agregar sustrato, este seleccionará (se unirá preferencialmente) al conformero con mayor afinidad (R) comenzando a saturar sus sitios de unión en función de la concentración de sustrato. Pero lo mismo ocurrirá con el conformero T, aunque en menor escala ya que su constante de afinidad es mucho menor. Vemos entonces que, **en función de la concentración de sustrato**, la población de sitios con constante de afinidad  $K_d^T$  (mayoritarios en ausencia de sustrato ya que vimos que  $L \ll 1$ ) va a ir disminuyendo al ir aumentando la concentración de sustrato, enriqueciéndose en sitios con constante de afinidad  $K_d^R$ . A medida que aumentamos la concentración de sustrato, la población de conformeros R se va enriqueciendo y con estos aumenta la proporción de sitios  $K_d^R$  (figura 7.3).



**Fig. 7.3.** Según el modelo de Monod podemos explicar el cooperativismo de una enzima como el desplazamiento del equilibrio conformacional hacia el confórmero con mayor actividad (R) en este caso en función de la concentración de sustrato. Para distintas concentraciones de sustrato, mostramos como varía la relación R/T llegando a invertirse a concentraciones saturantes de sustrato cuando se la compara con concentraciones bajas de sustrato.

Responde esta propuesta a nuestra definición de cooperatividad mencionada al comienzo del capítulo? Repasemos: cooperatividad es la capacidad que tiene una proteína de **cambiar sus constantes de unión para un determinado ligando**, en función de la concentración de **ese** ligando. El punto clave en el modelo de Monod es comprender que las **constantes no cambian** (en el sentido que un confórmero (R o T) no cambia “estructuralmente” su constante) sino que lo que cambia **es la distribución de los confórmeros que tienen asociadas determinadas constantes de afinidad**.

¿Por qué una enzima con **un solo sitio no es cooperativa** según el modelo de Monod? En realidad, podríamos pensar que, si tengo dos constantes de unión, una para el confórmero T y otra para el confórmero R, pensaría entonces que el sistema **podría ser cooperativo**. El punto clave es que el cambio de afinidad (en el caso de cooperatividad positiva) **debería mejorar en función de la concentración de sustrato**. Al agregar sustrato a una determinada concentración, podríamos decir que el mismo se une preferencialmente a la forma R (ya que tiene una menor  $K_d^R$ ). La unión del “primer” ligando podríamos decir que paga un costo energético al convertir T0 a R0 y de ahí pasar de R0 a R1 y desplazar el equilibrio conformacional. Ahora si agrego más sustrato y **si la proteína tiene un solo sitio de unión**, se tendrá que pagar el mismo costo energético para repetir el ciclo. En cambio, si la proteína tuviera dos sitios de unión, el pago de convertir T0 a R0 lo realiza de alguna forma la unión de la primera molécula para formar R1. Pero a este confórmero le queda libre un sitio en R1 de ahí que la segunda molécula de sustrato se une a R1 **en forma más fácil** (sin volver a pagar el costo del cambio conformacional) para obtener R2. **Si la unión de una segunda molécula de sustrato se une con mayor facilidad que la primera se corresponde entonces con la definición de cooperatividad positiva**.

Finalmente, el modelo de Monod se llama también **de simetría**, ya que por las consideraciones del modelo todos los sitios del confórmero T tienen la misma constante de afinidad  $K_d^T$  y todos los sitios del confórmero R tienen la misma constante de afinidad  $K_d^R$ .

Estas constantes son estado (confórmero) específicas y no se alteran si pasamos por ejemplo de R0 a R1 a R2. Esta propiedad de simetría es una de las principales diferencias que veremos con el próximo modelo de cooperatividad, el modelo de Koshland.

¿Cómo explica el modelo de Monod el alosterismo? Vimos anteriormente que los moduladores alostéricos se unían a otros sitios, distintos de los sitios de unión al sustrato. Estos moduladores podría favorecer la actividad de la enzima o disminuirla, de ahí que se llamen moduladores positivos o negativos. La forma que tiene un modulador alostérico positivo de activar a la enzima es simplemente unirse a la forma R y desplazar el equilibrio conformacional “activando” a la enzima. Esto es, si este experimento se llevó a cabo a una determinada concentración de sustrato (ver figura 7.2) y luego en la misma forma, pero con el agregado del modulador, esperamos que, para la misma concentración de sustrato, el modulador desplace aún más el equilibrio obteniendo de esta forma una mayor proporción del confórmero R. De ahí que, para esa dada concentración de sustrato, la proteína muestre mayor actividad. De la misma forma, un modulador alostérico negativo tendrá mayor afinidad de unión por la forma T de la enzima, ya que al unirse desplazará el equilibrio hacia la forma inactiva de la enzima.

En forma general, podemos decir que los moduladores alostéricos son moléculas orgánicas que simplemente estabilizan diferencialmente a un confórmero en detrimento de otro. Muchos remedios actúan como moduladores alostéricos negativos. Varios de ellos podrán parecerse a sustancias naturales que actúan modulando la actividad natural de la enzima. Sin embargo, **muchos pueden ser artificiales**, incluso unirse a sitios “alostéricos” nuevos, ya que la enzima no evolucionó para unir ese tipo de moduladores. La búsqueda de sitios alostéricos “nuevos”, o sitios por los cuales al unirse una sustancia a la enzima se desplaza el equilibrio en algún sentido, es uno de los objetivos centrales del diseño de nuevos fármacos y reguladores metabólicos.

## Modelo de Koshland

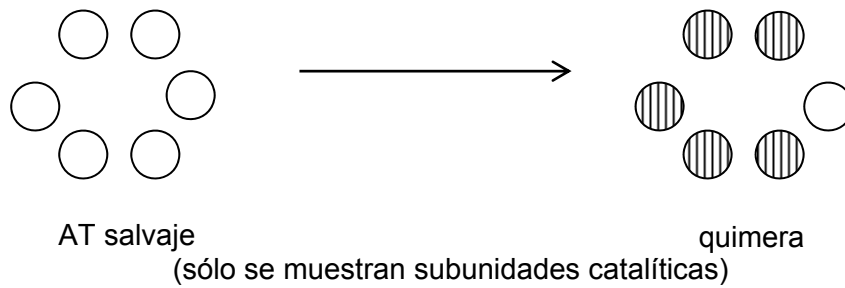
Daniel Koshland propuso un modelo en 1966 para explicar el cooperativismo y alosterismo basado en su modelo de ajuste-inducido de 1958. Recordemos que dicho modelo proponía la existencia de una sola estructura como representación de la estructura nativa de la proteína, pero que en presencia de ligando se podría modificar conformacionalmente para aumentar su especificidad por el sustrato. Suponiendo nuevamente una proteína oligomérica donde cada subunidad contiene un sitio de unión al ligando, esta unión induce un cambio conformacional en esa subunidad que altera la afinidad de las subunidades vacías restantes. Este cambio conformacional se propaga a las otras subunidades por la modificación de las interfaces entre las subunidades. De esta forma la cooperatividad en el modelo de Koshland está dada principalmente por la intensidad del cambio conformacional y cómo este se propague al resto de las subunidades

vacías. El modelo de Koshland se denomina secuencial, ya que cada subunidad puede sufrir el cambio conformacional en forma independiente del resto, dando lugar a estructuras “intermediarias” donde algunas subunidades cambiaron conformacionalmente y otras no. Esta es una de las principales diferencias con el modelo de Monod.

## **Evidencias experimentales en favor de los modelos**

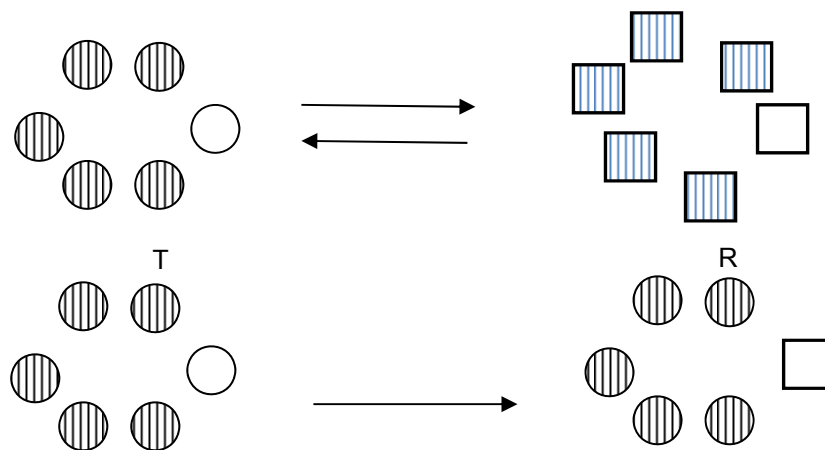
Tanto el modelo de Koshland como el de Monod **ajustan correctamente las curvas sigmoidales de la gran mayoría de las enzimas y proteínas cooperativas y/o alostéricas**. Desde este punto de vista, tratar de interpretar los datos experimentales de saturación y/o velocidades en función de la concentración de sustrato no nos permite en general favorecer a un modelo sobre otro. La validación experimental de cada modelo se demoró por décadas hasta que el avance tecnológico comenzó a aportar pruebas experimentales sobre cuál de los modelos representaba mejor el mecanismo cooperativo o alostérico de las proteínas. Numerosas evidencias experimentales obtenidas en los últimos años **dan amplio soporte al modelo de Monod sobre el modelo de Koshland**, aunque en los últimos años se han publicado modelos que funcionarían como una mezcla de los dos modelos arquetípicos.

La evidencia experimental crucial para determinar si una dada proteína funciona siguiendo el modelo de Monod o el de Koshland consistiría en determinar **la presencia del pre-equilibrio de los conformeros T y R** (resultado que daría soporte al modelo de Monod) o **determinar la presencia de los intermediarios conformacionales a medida que se va induciendo los cambios con la unión del sustrato** (resultado que daría soporte al modelo de Koshland). Entre todos los experimentos realizados, mayormente técnicas de difracción de rayos X, NMR y otras técnicas para detectar la presencia de distintos conformeros, hemos seleccionado uno de los experimentos concluyentes que dan soporte al modelo de Monod sobre el modelo de Koshland utilizando la enzima aspartato transcarbomilasa (AT). La AT es una enzima hexamérica. Contiene 6 unidades catalíticas y 6 unidades regulatorias que contienen al sitio alostérico. En un experimento llevado a cabo por el grupo del Dr. Kantrowitz en 2001, se obtuvo una AT quimérica. El grupo de investigación obtuvo una mutante de AT incapaz de unir el sustrato (la mutación bajaba la afinidad de la enzima por su sustrato unas 1005 veces). Los investigadores estudiaron que dicha mutación no afectara la dinámica ni la estructura de tal forma que la AT mutante fuera lo más parecida posible a la AT salvaje, salvo en su capacidad de unir el sustrato. Para eso usaron técnicas bioquímicas (estimación de  $k_{cat}$ ,  $K_m$  e incluso la estructura cristalográfica de la AT mutante). Con esta AT mutante, construyeron entonces una enzima quimérica compuesta de 5 subunidades AT mutante y 1 AT salvaje (figura 7.4).



**Fig. 7.3.** Representación esquemática de las 6 subunidades catalíticas de la AT salvaje (círculos vacíos) y subunidades mutadas (círculos rayados). La quimera que utilizaron en el ensayo consiste de 5 subunidades catalíticas mutadas y una salvaje. Esta última es la única que une sustrato en la quimera. Las subunidades regulatorias, si bien presentes en los ensayos bioquímicos, se han removido de los gráficos por comodidad.

Los investigadores entonces agregaron sustrato a dicha AT quimérica y cristalizaron la proteína para ver los posibles cambios conformacionales. Por un lado, si la AT salvaje funcionara según el modelo de Koshland, los investigadores esperarían obtener 5 subunidades sin cambio conformacional y una sola subunidad (la salvaje, la única que podría unir el sustrato) con los cambios conformacionales productos del efecto inducido por la unión del sustrato. Ya vimos en el capítulo 2 que los conformeros son estructuras alternativas de una misma proteína, así que dichos cambios conformacionales (en este caso inducidos por el sustrato) serían detectables por cristalografía de rayos X. Pero por otro lado, si la AT salvaje funcionara siguiendo el modelo de Monod, los investigadores esperarían obtener que las 6 subunidades catalíticas cambiaron su conformación, debido a que el sustrato se unió a la única subunidad capaz de unir sustrato en la quimera, y con sólo esta unión el equilibrio conformacional se desplazaría hacia el conformero R de la AT. En la figura 7.4 representamos estas dos hipótesis.

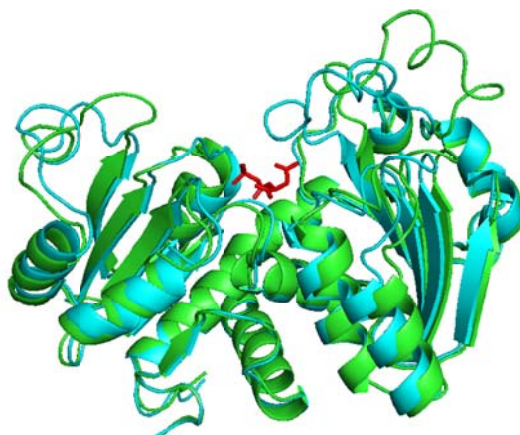


**Fig. 7.4** Hipótesis alternativas para explicar los posibles resultados de incubar la AT quimérica en presencia de sustrato y co-cristalizar el sistema para obtener su estructura cristalina. En el panel superior, se presenta el pre-equilibrio de la AT quimérica si esta siguiera el modelo de Monod. Los círculos rayados y vacíos indican las subunidades catalíticas mutadas y salvajes respectivamente en el conformero T. Por el contrario, los cuadrados representan las conformaciones (salvajes y mutadas) en el conformero R. En el panel inferior de la figura encontramos el mismo estado inicial, pero si el sistema siguiera el modelo de Koshland la única subunidad que sufriría un cambio conformacional sería la subunidad salvaje.

El resultado del experimento fue contundente. La estructura cristalina encontrada representaba a la forma R de la AT, esto es todas las subunidades de la AT quimérica se encontraban en su forma R (ver figura 7.4 panel superior). La interpretación de este resultado fue entonces que el sustrato

solamente desplazó el equilibrio al unirse a la forma R y no indujo un cambio conformacional en la única subunidad a la que se unió (la subunidad salvaje). En la figura 7.5 mostramos una superposición estructural de los conformeros T y R de la AT salvaje. Se pueden observar los cambios estructurales entre ambos conformeros. Dependiendo si la cristalización se realizó en presencia o ausencia de sustrato (o algún análogo) se puede inferir si se trata del conformero R o T.

El experimento que elegimos mostrar es uno entre varios experimentos que soportan la idea que las proteínas funcionan mayormente siguiendo el modelo de Monod.



**Fig. 7.5** Conformeros R (verde) y T (celeste) de la AT. La molécula orgánica en el centro de la imagen es un análogo del sustrato.

## Problemas

1. Para la ATCasa del ejercicio anterior se realizaron distintos estudios cinéticos con supuestos activadores o inhibidores. Los resultados de dichos estudios se muestran en la tabla:

Sustrato aspartato mM	Enz nativa	Enz con calent 4' a 60C	Enz nat 0.1mM CTP	Enz calent 0.1mM CTP	Enz ATP 2mM
1	0.15	0.4	0.025	0.4	0.4
2	0.25	0.6	0.1	0.6	0.55
2.5	0.3	0.85	0.125	0.85	0.9
4	0.7	1.2	0.35	1.3	1.35
5	1.1	1.4	0.5	1.4	1.4
7.5	1.7	1.95	1.03	2	2
10	2.2	2.4	1.6	2.4	2.4
15	2.95	3	2.5	2.95	3
20	3.05	3.1	2.9	3.1	3.1



La actividad de la enzima se midió en micromoles de fosfato producido por hora.

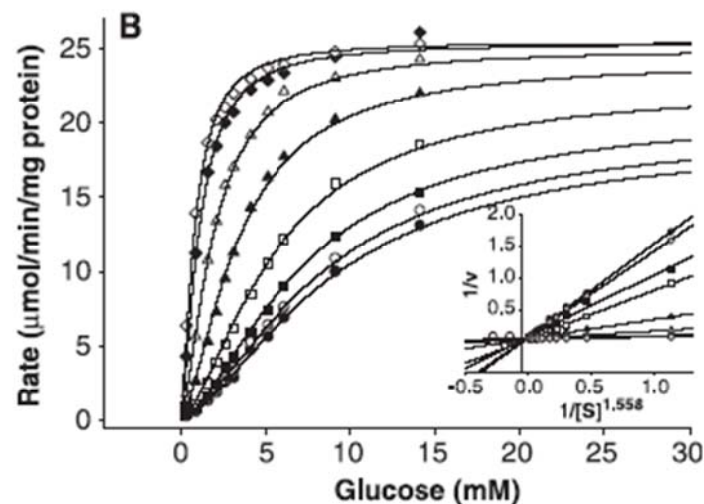
En base a estos datos

Obtenga un gráfico de la actividad en función de [S].

¿Cuál es el efecto del CTP y del ATP?

¿Cuál es el efecto del calentamiento sobre la cinética de la enzima? Para que se realiza este calentamiento?

2. La glucocinasa (GK) es una enzima citoplasmática que cataliza la fosforilación de la glucosa. La GK que se expresa en páncreas e hígado se cree que interviene en la regulación de los niveles de glucosa sanguínea. Se ha descrito que ciertos tipos de diabetes (personas que tienen una capacidad nula o ineficiente de manejar los niveles de glucosa sanguínea) podrían verse beneficiados por la presencia de efectores artificiales de la GK en sangre. Recientemente se ensayaron distintas concentraciones de uno de esos efectores con el siguiente resultado:



- a. ¿Cuál es el efecto de la acción del efector sobre la GK?
- b. Explique las consecuencias cinéticas del efector usando el modelo de Monod.

## Bibliografía

- Cornish-Bowden A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Londres: Wiley-Blackwell.
- Dixon, M., Webb, E.C. (1980) *Enzymes* New York: Academic Press.
- James, L. C., Tawfik, D. S. (2003) *Conformational diversity and protein evolution- a 60-year-old hypothesis revisited*. *Tibs*. Vol28, 7

- Macol, C, Tsuruta, H, Stec, B and Kantrowitz, E. (2001) *Direct structural evidence for a concerted allosteric transition in Escherichia coli aspartate transcarbamoylase*. Nature Structural Biology Vol8, 5.
- Changeux, J. Edelstein, S (2011) *Conformational selection or induce fit? 50 years of debate resolved. F1000 biology reports*. Vol3.
- Changeux, J. (2012) Allostery and the Monod-Wyman-Changeux model after 50 years. Annual Review of Biophysics. Vol41.
- Stefan, M, Le Novere, N. (2013) *Cooperative binding*. Plos Comp. Biol. Vol 9, 6.
- Cárdenas, M. (2013) Michaelis and Menten and the long road to the Discovery of cooperativity. Febs Letters. Vol 587, 17.

# CAPÍTULO 8

## Análisis del Control Metabólico

*Augusto A. Melgarejo*

En este capítulo introduciremos algunas ideas básicas que consideramos centrales en referencia al estudio de problemas desde una perspectiva Sistémica y Macroscópica. En el contexto de este marco teórico discutiremos en qué medida el estudio de los problemas fuera del equilibrio en sus diferentes estructuras deben ser pensadas desde un enfoque sistémico. En este sentido presentaremos aspectos generales sobre la Termodinámica del equilibrio así como fuera del equilibrio y el concepto de estado estacionario. Por último presentaremos las ideas centrales de la Teoría del Control Metabólico así como algunas observaciones de las limitaciones de este enfoque.

### **¿Qué Entendemos por una Descripción Sistémica?**

Los sistemas, en tanto totalidades organizadas, tienen dos características fundamentales:

- Las propiedades del sistema, en un momento dado, no resultan de la simple adición de las propiedades de los componentes. La vulnerabilidad o resiliencia, así como las condiciones de estabilidad, son propiedades estructurales del sistema en su conjunto.
- La evolución del sistema responde a una dinámica que difiere de las dinámicas propias de los componentes. Así, por ejemplo, el sistema total integra, en su evolución, procesos de escala temporales que varían considerablemente entre los subsistemas, e índice cambios en estos últimos.

Está claro que, aun cuando hablemos de esos sistemas como “totalidades”, ello no indica que tengan límites precisos, puesto que están inmersos en una variedad de contextos que se van insertando en dominios cada vez más amplios.

### **Intercambios con el Entorno y Entropía**

En general este concepto está rodeado de un microclima especial y es central para la construcción de un enfoque sistémico. Es probable que este microclima se origine en que, en

las presentaciones clásicas, se realizan una combinación poco feliz de dos puntos de vista esencialmente distintos: el termodinámico propiamente dicho, y el mecánico estadístico. Este último presupone de un modelo microscópico a partir del cual encuentra las funciones termodinámicas tales como la *Entropía*. Uno de los elementos importantes que aparece es que la Entropía definida en este marco, sólo coincide con la termodinámica para los estados de equilibrio. Lo que buscamos poner en evidencia es que las propiedades y el formalismo de las funciones termodinámicas no dependen de la visión microscópica que se haga de los sistemas (modelo microscópico), sino por el contrario, todo modelo mecánico estadístico debe satisfacer estas propiedades. Esto último hace que la termodinámica sea una herramienta de trabajo tan poderosa y útil al momento de estudiar un sistema del que conocemos pocas cosas.

Una idea fundante en la Termodinámica es el concepto de *estado*. En este sentido, vamos a hacer una observación acerca de los tipos de variables termodinámicas. Estas variables se clasifican en extensivas e intensivas y, debido a que existe en la literatura una discusión bastante detallada sobre ellas, sólo diremos que lo que caracteriza a las variables extensivas es que en un sistema compuesto la variable extensiva del sistema no es más que la suma de la correspondiente variable extensiva de los subsistemas. Esta característica no la presentan las intensivas. Esta clasificación tiene por objetivo construir un formalismo donde el estado de equilibrio quede definido sólo por variables extensivas y no por intensivas, debido a que un formalismo basado en estas últimas puede conducirnos a algunas contradicciones. Por ejemplo, si hacemos uso de la idea intuitiva de equilibrio térmico, podemos dar una buena descripción de estas posibles contradicciones. Es bien sabido que si tenemos dos sistemas en equilibrio termodinámico entre sí, sus temperaturas son iguales. Pero ocurre también que existen algunos sistemas vivos, que pueden encontrarse en equilibrio térmico con el medio, pero de ninguna forma se encuentran en equilibrio termodinámico.

## Entropía en el Primer Principio

Para introducir el Primer Principio de la Termodinámica, supondremos la existencia de una función de estado macroscópica continua, a la que llamaremos energía interna del sistema  $U$ . Esta función puede variar cuando el sistema interacción con otro (por ejemplo, un sistema en contacto con su medio ambiente). Para que la energía interna de un sistema varíe, es evidente que debe recibir o entregar energía del entorno. Esto puede ocurrir por dos mecanismos posibles: intercambio de energía por medio de trabajo ( $W$ ) o por intercambio de energía por medio de calor ( $Q$ ). Es conveniente notar que todavía no hemos especificado el tipo de trabajo, el cual puede ser de origen mecánico o químico. Notemos que en forma implícita ha quedado definido el concepto de calor. Éste no se trata de una forma de energía, sino de una forma de transmitir energía, en un mismo pie de igualdad que el trabajo. Este análisis se expresa mediante la relación:

$$\Delta U = Q + W \quad (8.1)$$

Tal como lo hemos discutido más arriba, un estado de equilibrio termodinámico del sistema es un estado en el que las variables extensivas están bien definidas. Si escribimos el primer principio en forma diferencial (o de pequeños intercambios) vemos que adopta la siguiente forma:

$$dU = \delta Q + \delta W \quad (8.2)$$

Aquí las cantidades  $\delta W$  y  $\delta Q$ , a diferencia de  $dU$  que representa un cambio diferencial de la *Energía Interna*  $U$ , no se corresponden con diferenciales de funciones si no intercambios pequeños de energía en forma de trabajo ( $\delta W$ ) o en forma de calor ( $\delta Q$ ). La igualdad en la ecuación (8.2) representa el límite del sistema. Es decir, el trabajo y el calor son formas que tiene el sistema de interactuar Energía con su entorno. Intuitivamente podemos definir al intercambio de energía Mecánica mediante la relación  $dW = -PdV$ . La adopción de esta definición lleva implícita la convención de signos que adoptaremos. Consideraremos positiva a la energía transferida hacia el sistema y negativa a la transferida desde el sistema.

Para fijar ideas, supongamos que inicialmente tenemos que el sistema intercambia energía con el medio ambiente sólo en forma de trabajo, es decir en forma adiabática ( $\delta Q = 0$ ). De la relación (8.2) tenemos:

$$dU = -PdV \quad (8.3)$$

Esto nos permite concluir dos cosas. En primer lugar, afirmar que el trabajo mecánico realizado sobre, o por el sistema, genera un cambio en la energía interna a partir de la variación de una variable extensiva, el volumen. En segundo lugar, como la Energía Interna es una función continua y derivable de sus variables, debe cumplirse que la presión debe ser la derivada de la Energía interna respecto al volumen  $P = -(\partial U / \partial V)$ .

Si ahora consideramos un caso más general en que el sistema además de intercambiar Energía en forma de trabajo lo hace en forma de calor ( $\delta Q \neq 0$ ), tenemos de la relación (8.2) que:

$$dU = \delta Q - PdV \quad (8.4)$$

La pregunta que surge inmediatamente es: si para el trabajo la variable extensiva del sistema que daba cuenta de la variación energética es el volumen, ¿cuál es la variable extensiva asociada a un flujo energético en forma de calor?

En este contexto introducimos una variable extensiva  $S$  a la que denominamos *Entropía del sistema* que cumple la relación:  $dQ = TdS$  donde  $T$  es la temperatura y corresponde a la

variable intensiva asociada al intercambio de energía en forma de calor. De esta manera, usando esta relación en el resultado (4):

$$dU = TdS - PdV \quad (8.5)$$

Al igual que en el caso anterior, observamos que la Energía Interna cambia con la variación del volumen y la variación de Entropía. De manera que la Energía Interna depende naturalmente de la entropía  $S$  y el volumen  $V$ . Formalmente escribimos a esta relación como  $U = U(S, V)$ , donde la Energía es la variable dependiente. A esta forma de escribir la relación llamamos "Representación Energética" en la que se considera a la Energía Interna como una función continua y diferenciable de sus variables por lo que se desprende directamente que:

$$T = (\partial U / \partial S)_V \text{ y } P = -(\partial U / \partial V)_S.$$

## Segundo Principio de la Termodinámica

Asumiendo que la temperatura es positiva ( $T > 0$ ), podemos concluir que, como la derivada de la Energía respecto a la Entropía es positiva, la Energía debe ser una función monótona creciente de la Entropía. Esta propiedad nos permite realizar un despeje y escribir formalmente a la Entropía como variable independiente, esto es  $S = S(U, V)$ . Cuando escribimos a la Entropía en esta forma diremos que nos encontramos en la "Representación Entrópica". En forma más general y si agregamos un término que represente el intercambio de energía en forma de trabajo químico, aparece una nueva variable extensiva la masa o número de moles  $N$  como otra variable independiente. En este sentido, la dependencia funcional toma la forma:  $S = S(U, V, N)$ , o bien  $S = S(U, V, N_1, \dots, N_r)$  si el sistema posee  $r$ -componentes.

Las propiedades que posee la función Entropía son:

La función (denominada entropía) de los parámetros extensivos de cualquier sistema compuesto, está definida para todos los estados de equilibrio con las siguientes propiedades:

- 1) *Los valores que toman los parámetros extensivos, en ausencia de ligaduras internas, son aquellos que maximizan la entropía respecto al conjunto de los estados de equilibrio ligados.*
- 2) *La entropía de un sistema compuesto es aditiva respecto a la de los subsistemas constituyentes.*
- 3) *La entropía es continua, diferenciable, y es una función monótonamente creciente de la energía interna.*

Lo que hemos presentado es un viejo anhelo (buscado y no siempre encontrado en la Física): expresar las leyes por intermedio de principios extremales. En otras palabras, buscando el extremo de la función Entropía, uno puede ser capaz de encontrar cuáles son los valores de las variables termodinámicas que identifican al estado. Más precisamente, si conocemos el estado inicial, estamos en condiciones de predecir el estado final, conociendo la función  $S$ . Sin embargo, la consecuencia verdaderamente importante es que contamos con una magnitud física la cual nos marca el sentido en el que el sistema va a evolucionar espontáneamente, pero también nos dice algo que la experiencia cotidiana nos muestra en forma cotidiana, la irreversibilidad de los procesos. Un proceso es irreversible si su entropía aumenta, formalmente  $\Delta S > 0$ . Si su entropía permanece constante  $\Delta S = 0$ , se dice que el proceso es reversible. Aunque este último caso es ideal, conceptualmente es muy importante ya que es una consecuencia de nuestro marco teórico. Es imprescindible no confundir proceso reversible con proceso cuasiestático. Un proceso cuasiestático (definido como una sucesión de estados de equilibrio) puede ser reversible o irreversible, pero un proceso reversible necesariamente debe ser cuasiestático. La desigualdad  $\Delta S > 0$  marca la direccionalidad de los procesos espontáneos. Esta desigualdad usualmente es conocida como “Segundo Principio de la Termodinámica”.

## Sistemas Fuera del Equilibrio

A pesar de lo útil que ha demostrado ser la caracterización de los estados de equilibrio por la teoría de la termostática, debe admitirse que nuestro interés fundamental se enfoca con más frecuencia hacia los procesos que hacia los estados. En biología, particularmente, es el proceso vital el que atrae nuestra imaginación, más que el estado de equilibrio final hacia el cual se encamina inevitablemente todo organismo. La termostática facilita dos métodos que nos permiten inferir cierta información limitada acerca de los procesos, pero ambos métodos son indirectos y proporcionan unos resultados muy pobres. En primer lugar, estudiando los estados de equilibrio inicial y final, es posible algunas veces aislar un proceso y luego determinar el efecto del proceso en su totalidad. En segundo lugar, si cierto proceso se produce con lentitud extrema, podemos compararlo con un proceso cuasiestático, idealizado y no físico. Pero ninguno de estos métodos se enfrenta al problema central de los procesos físicos reales.

La rama de la termodinámica que se ocupa de las velocidades de los procesos físicos es la teoría de la *Termodinámica Irreversible* o *Termodinámica del no Equilibrio*, como la llamaremos en el presente texto.

## Afinidades y Flujos

Como preparación para nuestro estudio, definiremos ciertas magnitudes que describen de manera apropiada los sistemas fuera del equilibrio. Básicamente, se requieren dos tipos de parámetros: uno, para describir la “fuerza” que impulsa un proceso, y el otro, para describir la respuesta a dicha fuerza.

Los procesos de interés más general se producen en sistemas continuos, tales como el flujo de energía en una barra con un gradiente continuo de temperatura. Sin embargo, para sugerir la manera más adecuada de seleccionar los parámetros en tales sistemas continuos, consideraremos primero el caso relativamente simple de un sistema discreto. Un proceso típico en un sistema discreto podría ser el flujo de energía de un subsistema homogéneo a otro a través de una separación diatérmica infinitamente delgada.

Consideremos un sistema compuesto constituido por dos subsistemas. Un parámetro extensivo tiene valores  $X_k$  y  $X'_k$  en los dos subsistemas, y la condición de cierre exige que:

$$X_k + X'_k = cte \quad (8.6)$$

Por ejemplo si  $X_k$  representa el volumen, la suma del volumen de cada subsistema constituyente del sistema en cuestión es constante. De la misma forma puede pensarse para el resto de las variables extensivas. Si  $X_k$  y  $X'_k$  no están ligados, sus valores de equilibrio estarán determinados por la anulación de la magnitud:

$$F_k = \frac{\partial S}{\partial X_k} - \frac{\partial S'}{\partial X'_k} = f_k - f'_k \quad (8.7)$$

Si  $F_k \neq 0$ , tiene lugar un proceso irreversible, que lleva al sistema hacia el estado de equilibrio.

La magnitud  $F_k$  que es la diferencia entre los parámetros intensivos en la representación entrópica, actúa como una “fuerza generalizada” que “impulsa” el proceso. Tales fuerzas generalizadas se denominan Afinidades.

Precisando más, consideremos dos sistemas separados por una pared diatérmica y sea  $X_k$  la energía interna  $U$ , entonces la afinidad será:

$$F_k = (1/T) - (1/T') \quad (8.8)$$

No pasa calor alguno a través de la pared diatérmica si la diferencia entre las inversas de las temperaturas se anula. En cambio, una diferencia no nula de las inversas de las



temperaturas, que actúa como una fuerza generalizada, activa un intercambio de energía en forma de calor entre los subsistemas.

La respuesta a la fuerza aplicada la caracterizaremos por la velocidad de cambio del parámetro extensivo asociado,  $X_k$ , que en el caso anterior sería la energía. El flujo se define entonces por:

$$J_k = dX_k / dt \quad (8.9)$$

Por consiguiente, el flujo se anula si se anula la afinidad, y una afinidad diferente de cero conduce a un flujo diferente de cero. Es la relación entre flujos y afinidades lo que caracteriza las velocidades de los procesos fuera del equilibrio.

La identificación de las afinidades en un tipo particular de sistema suele resultar más cómoda cuando se considera la velocidad de producción de entropía. Derivando la Entropía  $S(X_0, X_1, \dots)$  con respecto al tiempo, tenemos (con el objeto de generalizar hemos realizado la siguiente identificación  $X_0 \equiv U, X_1 \equiv V, X_2 \equiv N_1 \dots$ ):

$$\frac{dS}{dt} = \sum_i \frac{\partial S}{\partial X_i} \frac{dX_i}{dt} = \sum_i F_i J_i \quad (8.10)$$

Así la velocidad de producción de entropía es la suma de los productos de cada flujo por su afinidad asociada y es una función positiva ( $dS / dt \geq 0$ ).

La ecuación de producción de Entropía es particularmente útil para extender la definición de las afinidades a sistemas continuos en lugar de sistemas discretos. Con este objeto introducimos la idea de Entropía Local:

Asociemos a cualquier región infinitesimal una Entropía local donde, por definición, la dependencia funcional de  $S$  con respecto a los parámetros extensivos locales  $X_0, X_1, \dots, X_n$  se considera idéntica a la dependencia en el equilibrio. Esto es, adoptaremos simplemente la ecuación fundamental del equilibrio para asociar una Entropía local a los parámetros locales  $X_0, X_1, \dots, X_n$ . En este sentido para sistemas continuos se extiende la Expresión para la Velocidad de Producción de Entropía en la siguiente forma:

$$\frac{dS}{dt} = \sum_i \nabla f_i J_i \geq 0 \quad (8.11)$$

Donde  $F_i = \nabla f_i$  es el gradiente de la variable intensiva y representa la "fuerza generalizada". Para fijar ideas, en nuestro ejemplo la fuerza generalizada sería  $\nabla(1/T)$ . Es

decir lo que en sistemas discretos se calcula como una diferencia, en sistemas continuos se transforma en un gradiente.

Es sabido que cada flujo  $J_i$  se anula cuando se anulan las afinidades  $F_i$ , por lo que podemos desarrollar en potencias de las afinidades sin ningún término constante:

## Coeficientes de Onsager

Para ciertos sistemas, los flujos en un instante dado dependen solamente de los valores de las afinidades en dicho instante. A tales sistemas les llamamos markoffianos aceptando la terminología de la teoría de los procesos aleatorios. Limitaremos nuestra atención a este tipo de sistemas.

Para un sistema markoffiano, por definición, cada flujo local depende únicamente de las afinidades locales instantáneas y de los parámetros intensivos locales.

$$J_i = \sum_j L_{ij} F_j + \sum_{ijk} L_{ijk} F_j F_k + \dots \quad (8.12)$$

## Procesos Lineales

Se presenta una situación de gran interés práctico si las afinidades son tan pequeñas que pueden despreciarse todos los términos de orden superior al primero en la ecuación (8.12). Un proceso que pueda describirse adecuadamente por las ecuaciones truncadas aproximadas:

$$J_i = \sum_j L_{ij} F_j \quad (8.13)$$

se denomina proceso lineal de Markoff. Para el análisis de tales procesos, este desarrollo es una herramienta particularmente poderosa. Los coeficientes  $L_{ij}$  se denominan coeficientes de Transporte con la propiedad que  $L_{ij} = L_{ji}$ . La relación (13) muestra las fuerzas como variables independientes y los flujos causados por todas las fuerzas intervinientes. Una consecuencia directa es la existencia de fenómenos acoplados cuando los coeficientes  $L_{ij} \neq 0$ .

## Estado Estacionario: Régimen Lineal en Sistemas Biológicos

En el régimen lineal, los estados que minimizan la velocidad de producción de Entropía ( $dS/dt$ ), se denominan estados estacionarios y se caracterizan porque las magnitudes que identifican el estado del sistema no dependen del tiempo.

Para fijar ideas y a modo de ejemplo abordaremos el proceso de conversión de energía usado en el transporte de sustancias a través de la membrana celular. En este proceso la fuente de energía es el trifosfato de adenosina (ATP), que ha sido producido por la fosforilación oxidativa (OP) en la membrana interna de la mitocondria.

Lo pensaremos como un proceso acoplado de dos flujos. En particular veremos como el acoplamiento entre flujos permite abordar y entender el transporte activo en sistemas biológicos. Usaremos el acoplamiento entre flujos para evaluar la fosforilación oxidativa con una bomba de  $H^+$  como un proceso de transporte por respiración, suponiendo que el transporte de iones se encuentra en estado estacionario. En este contexto, las relaciones lineales fenomenológicas se escriben como:

$$J_1 = L_{11}F_1 + L_{12}F_2 \quad (8.14a)$$

$$J_2 = L_{12}F_1 + L_{22}F_2 \quad (8.14b)$$

En donde  $J_1$  representa el flujo neto de ATP,  $J_2$  el flujo neto de oxígeno,  $F_1$  el potencial fosfato y  $F_2$  el potencial redox entre el donador y el aceptor de electrones. El grado de acoplamiento se puede definir como:

$$q = \frac{L_{12}}{(L_{11}L_{22})^{1/2}} \quad (8.15)$$

Donde  $0 < |q| < 1$ .

Así mismo introduciendo el coeficiente estequiométrico fenomenológico (diferente al molecular):

$$Z = \left( \frac{L_{11}}{L_{22}} \right)^{1/2} \quad (8.16)$$

Y dividiendo entre si las ecuaciones (14), se obtiene la relación entre flujos  $j = J_1/(J_2Z)$  en términos de la relación entre las fuerzas  $f = F_1Z/F_2$ , dada por:

$$j = \frac{f + q}{qf + 1} \quad (8.17)$$

Como la oxidación conduce a la fosforilación  $F_1 < 0$ ,  $F_2 > 0$  y  $J_1/J_2$  representa la relación P/O, mientras que  $F_1/F_2$  es la relación entre el potencial fosfato y el potencial redox. Existen dos tipos de estados estacionarios.

- $s_1$  en el cual el flujo de ATP se anula.
- $s_2$  en el cual el potencial fosfato se anula.

Estos son dos casos extremos, pueden darse situaciones en los que ni  $F_1$  ni  $J_1$  se anule.

Volviendo a nuestros casos extremos, para  $s_1$  el flujo de oxígeno  $J_2$  consumido y el potencial fosfato se expresan como:

$$(J_2)_{s_1} = L_{22}F_2(1 - q^2) \quad (8.18)$$

$$(F_1)_{s_1} = -\frac{qF_2}{Z} \quad (8.19)$$

Donde  $L_{22}$  se interpreta como el coeficiente de conductancia de la cadena respiratoria. Por lo tanto la energía es convertida y consumida por la mitocondria.

En el estado estacionario  $s_2$  la relación entre los flujos se escribe como:

$$\left(\frac{J_1}{J_2}\right)_{s_2} = qZ \quad (8.20)$$

Por lo tanto si el grado de acoplamiento es conocido es posible calcular  $Z$  midiendo la relación P/O.

La eficiencia de la conversión lineal de energía queda definida en función del grado de acoplamiento:

$$\eta = -\frac{J_1F_1}{J_2F_2} = -\frac{f + q}{q + (1/f)} \quad (8.21)$$

La eficiencia alcanza su valor óptimo entre los dos estados  $s_1$  y  $s_2$  dependiendo únicamente del grado de acoplamiento:

$$\eta_{op} = \frac{q^2}{(1 + \sqrt{1 - q^2})^2}$$

Los valores de  $f$  para  $\eta_{op}$  estarán dados por:

$$f_{op} = -\frac{q}{1 + \sqrt{1 - q^2}} \quad (8.22)$$

La velocidad de producción de entropía en términos de la relación de fuerzas  $f$  y el grado de acoplamiento  $q$  se escribe:

$$\frac{dS}{dt} = (f^2 + 2qf + 1) L_{22} F_2^2 \quad (8.23)$$

Si suponemos que  $F_2$  es constante la velocidad de producción de entropía es mínima en el estado  $s_1$ , la relación de fuerzas es  $f_{s_1} = -q$ , y adopta el valor:

$$\left( \frac{dS}{dt} \right)_{s_1} = (1 - f^2) L_{22} F_2^2 \quad (8.24)$$

Si evaluamos en el estado  $s_2$  y el óptimo obtenemos:

$$\left( \frac{dS}{dt} \right)_{s_2} = L_{22} X_2^2 \quad \text{y} \quad \left( \frac{dS}{dt} \right)_{op} = \frac{(1 - f^2)^2}{1 + f^2} L_{22} X_2^2$$

Con estos resultados encontramos que:

$$\left( \frac{dS}{dt} \right)_{s_1} < \left( \frac{dS}{dt} \right)_{op} < \left( \frac{dS}{dt} \right)_{s_2} \quad (8.25)$$

La mínima disipación (producción de entropía) no ocurre para el estado más eficiente. Para mejorar este resultado debe agregarse un tercer flujo que represente la hidrólisis del ATP.

## Más Allá del Régimen Lineal

Como se explicitó más arriba, la el uso de las relaciones (8.13) es adecuado cuando en el desarrollo (8.12) pueden despreciarse los términos de orden superior, en otras palabras

cuando el sistema se encuentra cerca del equilibrio. La distancia respecto del equilibrio puede medirse por medio de los gradientes y afinidades impuestas al sistema. Por ejemplo una reacción química se encuentra en el régimen lineal si la afinidad es pequeña comparada con  $RT$  ( $A \approx 2.5Kjoule/mol$  a  $T = 300K$ ). Sin embargo, la mayoría de las reacciones se encuentran en el rango de  $10-100Kjoule/mol$ , por lo que se encuentran lejos del régimen lineal y poseen más de un estado estacionario posible, en algunos casos muestran bifurcaciones que conducen a nuevos estados de organización. En este libro no discutiremos las estructuras teóricas provenientes de la Termodinámica del no Equilibrio que permiten abordar estas situaciones. En su lugar y centrándonos en el estudio de rutas metabólicas como problema que posee estados alejados del equilibrio en donde el régimen lineal no aplica, haremos una breve presentación la Teoría del Control Metabólico.

## Análisis de Control Metabólico

Una ruta metabólica se puede modelar por un conjunto de reacciones enzimáticas acopladas parametrizadas por las concentraciones de los metabolitos involucrados. En este sentido el análisis del control metabólico (ACM) es un desarrollo matemático para la descripción de vías metabólicas. ACM cuantifica como las variables, los flujos o las concentraciones de metabolitos, dependen de los parámetros de la red en que están inmersas, en particular, es capaz de describir cómo las propiedades dependen de la ruta, (descritos por determinados coeficientes llamados de control). Por lo tanto, en el ACM se estudia el control relativo ejercido por cada uno de los pasos (reacciones enzimáticas) en las variables del sistema (flujos y las concentraciones de metabolitos). Este control se mide mediante la aplicación de una perturbación mientras se analiza o estudia el efecto en la variable de interés después de que el sistema ha alcanzado un nuevo estado estacionario.

### Coeficientes de control

El coeficiente de control mide el cambio relativo en estado estacionario en un sistema variable (por ejemplo flujos o concentraciones) en respuesta a un cambio relativo en un parámetro (por ejemplo actividad enzimática). Los dos principales coeficientes de control son los de flujo y concentración. En este sentido el Coeficiente de control de flujo se define como:

$$C_{E_k}^J = \frac{E_k}{J} \frac{\partial J}{\partial E_k} \quad (8.26)$$

Y el Coeficiente de control de concentración:

$$C_{E_k}^S = \frac{E_k}{S} \frac{\partial S}{\partial E_k} \quad (8.27)$$

Aquí  $S$  representa a la concentración de sustrato y no a la Entropía.

Se define como reacción (o enzima) limitante, a aquella reacción (enzima) cuyo coeficiente de control de flujo es igual a la unidad. Encontrar la enzima limitante de una vía implica encontrar aquella enzima o paso que controla toda la vía convirtiéndola en un objetivo ideal para el aumento de su flujo.

## Coeficientes de elasticidad

El coeficiente de elasticidad cuantifica la capacidad de respuesta de una reacción enzimática a cambios en un parámetro (por ejemplo concentración de sustrato, producto, efectores, temperatura, etc.) mientras los demás parámetros permanecen constantes. Operativamente se define como el cociente entre el cambio relativo en la velocidad enzimática ( $v$ ) y el cambio relativo en el parámetro ( $p$ ). El valor del coeficiente de elasticidad nos proporciona, por lo tanto, una idea de la capacidad de respuesta de una reacción enzimática al cambio en un determinado parámetro. De manera más explícita, un valor alto nos dice que el sistema posee una mayor sensibilidad y una baja sensibilidad en caso contrario. Matemáticamente y en forma similar a los coeficientes de control, los coeficientes de elasticidad se definen como:

$$\varepsilon_p^v = \frac{p}{v} \frac{\partial v}{\partial p} \quad (8.28)$$

## Teoremas fundamentales

En esta parte del texto explicitaremos los teoremas fundamentales de la Teoría del Control Metabólico encontrados independientemente por Kacser/Burns y Heinrich/Rapoport entre los años 1960 y 1970. Sólo los enunciaremos y expondremos sus principales consecuencias. Los primeros de los teoremas corresponden a los Teoremas de suma que conducen a los siguientes resultados:

$$\sum_i C_{E_i}^J = 1 \quad (8.29)$$

$$\sum_i C_{E_i}^S = 0 \quad (8.30)$$

La suma de los coeficientes de flujos es una propiedad sistémica. Cuando se produce un cambio en una de las reacciones, es compensado por cambios en el control en el mismo flujo por todas las otras reacciones.

Los segundos de los teoremas son los Teoremas de Conectividad que relacionan los coeficientes de control con los coeficientes de elasticidad:

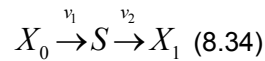
$$\sum_i C_i^J \mathcal{E}_S^i = 0 \quad (8.31)$$

$$\sum_i C_i^{S_n} \mathcal{E}_{S_m}^i = 0, n \neq m \quad (8.32)$$

$$\sum_i C_i^{S_n} \mathcal{E}_{S_m}^i = -1, n = m \quad (8.33)$$

La utilidad de este Teorema radica en que ponen de relieve la estrecha relación entre las propiedades cinéticas de las reacciones individuales y las propiedades del sistema de una vía. Dos conjuntos básicos de teoremas existen, uno para el flujo y otro para las concentraciones. Los teoremas de conectividad concentración se dividen a su vez en función de si la especie de sistema  $S_n$  es diferente de las especies locales  $S_m$ .

En la práctica es posible combinar los teoremas de sumas y conectividad para relacionar los coeficientes de elasticidad y conectividad. Con este objetivo consideremos la siguiente ruta:



Supongamos que  $X_0$  y  $X_1$  son especies fijas de manera que la ruta alcanza un estado estacionario. Centrándonos en los coeficientes de flujo podemos escribir un teorema de conectividad y uno de suma para la ruta:

$$C_{v_1}^J + C_{v_2}^J = 1 \quad (8.35)$$

$$C_{v_1}^J \mathcal{E}_S^{v_1} + C_{v_2}^J \mathcal{E}_S^{v_2} = 0 \quad (8.36)$$

Usando (8.35) y (8.36) podemos encontrar los coeficientes de control en función de los de elasticidad:

$$C_{v_1}^J = \frac{\mathcal{E}_S^{v_2}}{\mathcal{E}_S^{v_2} - \mathcal{E}_S^{v_1}} \quad (8.37)$$

$$C_{v_2}^J = -\frac{\mathcal{E}_S^{v_1}}{\mathcal{E}_S^{v_2} - \mathcal{E}_S^{v_1}} \quad (8.38)$$



Usando estos resultados podemos analizar algunos comportamientos extremos. Por ejemplo, supongamos que el primer paso es completamente insensible a su producto, es decir, no reacciona con él. En estas condiciones tenemos que  $\varepsilon_S^{v_1} = 0$ .

$$C_{v_1}^J = 1$$

$$C_{v_2}^J = 0$$

El flujo a través de la ruta queda determinado por el primer paso. Esta situación representa el paso limitante clásico que se menciona con frecuencia en las presentaciones básicas.

Un comentario que consideramos relevante para realizar como característica limitantes del enfoque de la Teoría del Control Metabólico es que se posee características locales, en el sentido que los coeficientes de control o elasticidad, al estar definidos por derivadas de los flujos o concentraciones respecto a las concentraciones enzimáticas, tienen validez en un entorno de los valores en que son determinados. De esta manera no pueden ser predictivos en otras regiones de posible interés para los problemas que se estudian.

## Problemas

La ecuación fundamental del sistema A está dada por:

$$S_A = \left( \frac{R^2}{V_0 \theta} \right)^{1/3} [N_A V_A U_A]^{1/3}$$

Y la de un sistema B:

$$S_B = \left( \frac{R^2}{V_0 \theta} \right)^{1/3} [N_B V_B U_B]^{1/3}$$

¿Cuál es la función compuesta para el sistema A+B?

Calcule la temperatura  $T$  para cada subsistema A y B.

¿Puede dar una expresión para la fuerza generalizada  $F_T$ ?

¿Si  $N_A > N_B$  y  $V_A = V_B$ . ¿Puede indicar en qué dirección es el flujo de energía?

## Bibliografía

Callen, H. B. (1985). *Termodinámica*. Madrid: Editorial AC.

Cornish-Bowden A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Londres: Wiley-Blackwell.

Fell D. (1996) *Understanding the Control of Metabolism*. Londres: Portland Press.

Kondepudi, D., Prigogine, I. (1998). *Modern Thermodynamics: From Heat Engines to Dissipative Structures*. Chichester: John Wiley & Sons.

# CAPÍTULO 9

## Métodos Empleados en la Purificación de Enzimas

*Daniela Bottero y Daniela Hozbor*

*Los errores tienen casi siempre un carácter sagrado. Nunca intentéis corregirlos. Al contrario: lo que procede es racionalizarlos, compenetrarse con aquellos integralmente. Después, os será posible sublimarlos.*

SALVADOR DALÍ

Los organismos están compuestos por una amplia variedad de proteínas que aunque difieren en la secuencia de sus aminoácidos, y en el plegamiento 3-D de la cadena de aminoácidos, comparten una serie de propiedades ya que se componen esencialmente de los mismos aminoácidos. Es así que varias proteínas que se encuentran en un mismo organismo pueden compartir algunas propiedades como por ejemplo su tamaño o su carga. En consecuencia cuando se busca purificar alguna proteína se deben realizar una serie de pasos secuenciales (marcha de purificación) en los que se van discriminando diferencias que en muchos casos resultan ser sutiles. El diseño de una estrategia de purificación de proteínas es algo así como la búsqueda de una ruta que debe transitarse en tramos eliminando lo innecesario hasta alcanzar el objetivo con solo lo necesario. Diferentes rutas y diferentes tramos de rutas pueden ser exploradas y para continuar, cada tramo andado debe ser analizado adecuadamente de forma de tomar decisiones sobre si retroceder o seguir y en caso de seguir se debe analizar cuál sería el mejor tramo para continuar el camino. La elección de tramos se debe realizar en base a consideraciones sobre cómo evitar pérdidas de lo necesario, favorecer al máximo la eliminación de lo innecesario y también los costos y tiempo. Así en cada paso de purificación se debe evaluar no solo el rendimiento en la purificación de la proteína problema sino también la pureza alcanzada de la misma. Si bien no hay una sola secuencia de técnicas a seguir, en general se recomienda empezar por técnicas de alta capacidad y seguir con las de baja capacidad pero mayor especificidad. La estrategia a emplear deberá diseñarse teniendo en cuenta la cantidad y el grado de pureza que se quiera alcanzar según el uso que se dará a la proteína. Para usos en investigación, la escala es en general reducida y es más importante la pureza que el rendimiento. Para usos terapéuticos la escala es mayor y la pureza requerida es máxima. Para usos industriales, frecuentemente se requiere gran cantidad, bajo

costo y menor pureza. Si el interés está en la proteína y no importa el organismo de donde se la extraerá, conviene buscar una fuente fácil de obtener, que contenga esa proteína en abundancia y de ser posible de bajo costo. Lo óptimo sería producir la proteína por métodos de ADN recombinante. Dependiendo también de la finalidad, la proteína que se quiere purificar deberá ser obtenida en conformaciones nativas o desnaturalizadas. Por ejemplo para evaluar actividad biológica la proteína debe tener una estructura funcional, en cambio para determinar la estructura primaria, la proteína puede estar desnaturalizada.

En este capítulo se presenta una descripción que incluye los aspectos más sobresalientes de las técnicas más utilizadas en el aislamiento, purificación y caracterización de enzimas.

Antes de introducirnos en las técnicas es importante tener en cuenta que es imposible diseñar y o realizar una estrategia de purificación de una proteína si no contamos con un método cuali y cuantitativo específico de la proteína en cuestión. Debemos contar con metodologías que nos permitan analizar luego de cada etapa de purificación si la proteína problema está, cómo está y de estar determinar en qué cantidad está. En el caso de enzimas, mientras que la determinación de las unidades enzimáticas totales (Actividad enzimática) resulta esencial para evaluar el rendimiento de su purificación, las medidas de la actividad específica (AE, relación entre la cantidad de proteína que se purifica sobre la cantidad de proteína total nos indica el grado de purificación alcanzado. El rendimiento y el grado de purificación pueden evaluarse en forma global comparando los valores de actividad total y actividad específica hallados en la etapa final de la marcha de purificación respecto de los obtenidos en la etapa inicial de la purificación pero también puede evaluarse en cada nueva etapa respecto de la etapa anterior. En el primer caso estaríamos evaluando el proceso global de la marcha de purificación y en el segundo estas determinaciones nos hablarán de la eficiencia de una etapa de purificación en particular. A continuación se presenta una tabla de purificación y los cálculos que nos permitirían evaluar la marcha de purificación realizada.

**Tabla 9.1: Ejemplo de una marcha de purificación**

<b>Paso de Purificación</b>	<b>Actividad Total (Unidades enzimáticas totales; <math>UE_T</math>)</b>	<b>Actividad Específica (<math>UE_T</math> /mg de proteína total)</b>
1	$UE_{T_{paso\ 1}}$	$UE_{T_{paso\ 1}}/mg\ proteína\ total_{paso\ 1}$
2	$UE_{T_{paso\ 2}}$	$UE_{T_{paso\ 2}}/mg\ proteína\ total_{paso\ 2}$
3	$UE_{T_{paso\ 3}}$	$UE_{T_{paso\ 3}}/mg\ proteína\ total_{paso\ 3}$

$$\text{Rendimiento Global} = UE_{T_{paso\ 3}} / UE_{T_{paso\ 1}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento Paso 2 respecto del paso 1} = UE_{T_{paso\ 2}} / UE_{T_{paso\ 1}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento Paso 3 respecto del paso 2} = UE_{T_{paso\ 3}} / UE_{T_{paso\ 2}} \times 100$$

$$\text{Grado de purificación Global} = \frac{\text{Actividad específica del paso 3}}{\text{Actividad específica del paso 1}}$$

Grado de purificación alcanzado en el paso 2= Actividad específica del paso 2  
Actividad específica del paso 1

Grado de purificación alcanzado en el paso 3 respecto de la del 2 = Actividad específica del paso 3  
Actividad específica del paso 2

Por otra parte, la calidad de muestra purificada se evalúa generalmente a través de corridas electroforéticas en geles desnaturalizantes y en geles nativos los cuales pueden estar asociados o no a técnicas específicas de inmunoblot. Estas técnicas son descritas en este capítulo.

## **Selección de la fuente de la enzima a purificar y solubilización de proteínas**

Como hemos mencionado para comenzar a purificar una proteína debemos contar con una metodología que nos permita medir cuantitativamente la presencia de la proteína problema. En el caso de ser una enzima esto se consigue mediante la evaluación de la actividad enzimática. Con esta metodología se elige el material de partida de forma de seleccionar aquel que contenga una gran cantidad de la proteína de interés. Una vez seleccionado el material de origen, es necesario en general realizar un procedimiento para lograr que las proteínas sean liberadas de la célula que la contienen y estén en solución. El método de elección para este procedimiento depende de la localización de la proteína en cuestión y del tejido o célula que la contiene. Si la enzima de interés se encuentra en el citosol celular, su liberación requerirá de la lisis de la célula. El método más sencillo y menos drástico para conseguirlo es la lisis osmótica. Este método consiste en suspender a las células en una solución en la que la concentración molar total de los solutos resulta ser menor que la hallada en el interior de la célula de forma que las células se hinchen y estallen. Los detergentes y los solventes orgánicos como el tolueno o la acetona en condiciones adecuadas para no desnaturalizar a las proteínas, pueden ser utilizados. A veces se requiere de rupturas mecánicas empleando un homogeneizador, un mortero de forma de moler un tejido congelado o una prensa francesa que permite romper las células al hacerlas pasar con alta presión por un orificio muy pequeño. También se puede lisar las células tratándolas con ultrasonido (sonicación). En el caso de las bacterias suelen realizarse tratamientos con enzimas como la lisozima que cataliza la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano presentes en la pared bacteriana. Si la enzima a purificar se encuentra en alguna organela, luego de la lisis debe separarse la organela que la contiene generalmente mediante centrifugación diferencial, es decir centrifugaciones secuenciales que difieren en la velocidad de centrifugación para hacer separaciones por tamaño. Una vez separada la

organela se suelen realizar tratamientos con detergentes o solventes orgánicos para liberar a la proteína en cuestión.

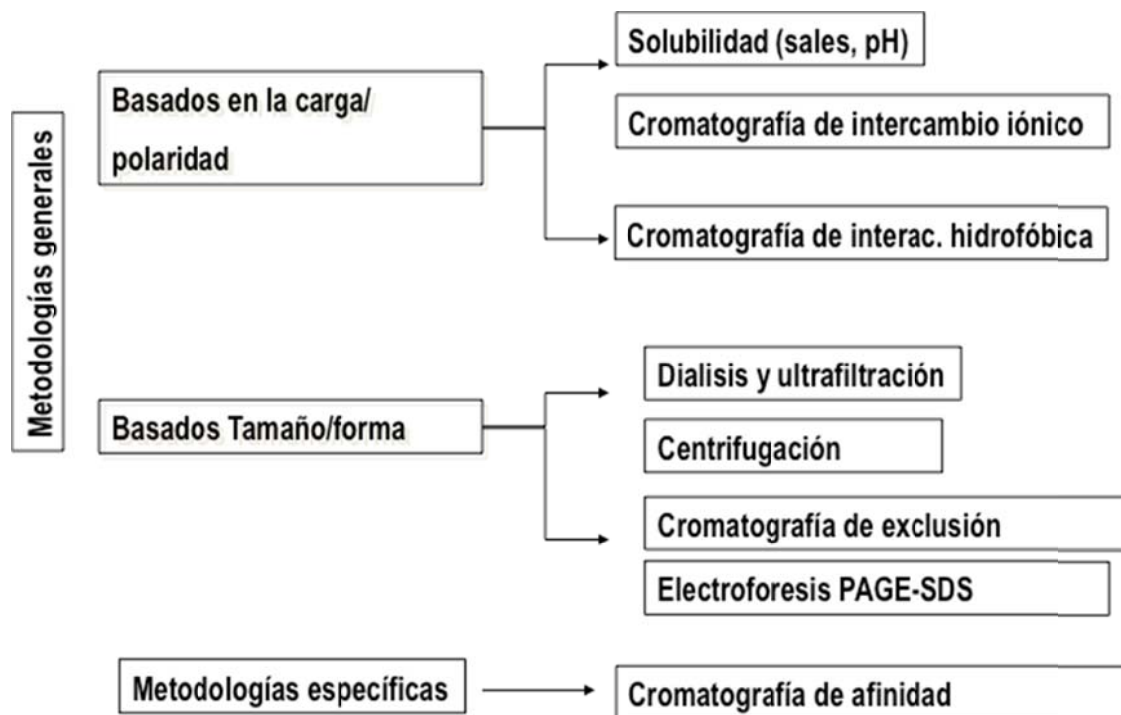
Una vez en solución, las proteínas (extracto crudo) deben preservarse de su desnaturalización/degradación para ello se las suele disolver en soluciones amortiguadoras y manipular en frío y evitando la formación de espuma.

## Fraccionamiento del extracto crudo

Una vez solubilizadas las proteínas desde la fuente de origen (extracto crudo) se procede a la aplicación de distintas metodologías (pasos o etapas de purificación) que con diferente fundamento buscan eliminar a los contaminantes (otras proteínas, otras biomoléculas) preservando al máximo posible a la proteína de interés.

Las metodologías que generalmente se emplean para el fraccionamiento del extracto crudo se presentan en el siguiente cuadro.

**Cuadro 9.1** Metodologías corrientemente empleadas en el fraccionamiento de un extracto crudo



A continuación presentaremos una breve descripción de cada una de estas metodologías.

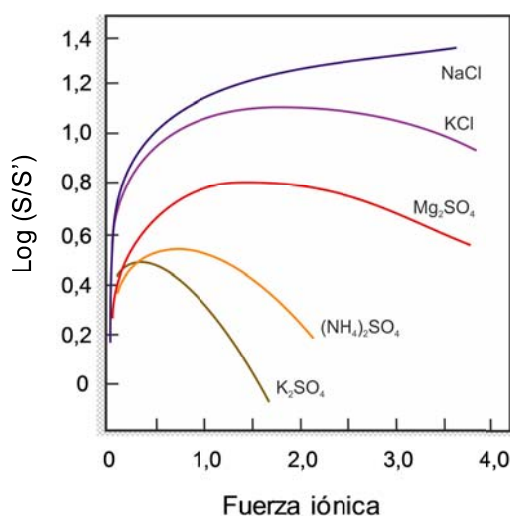
### Diferencia de solubilidad de las proteínas

Es posible separar unas proteínas de otras mediante la modificación de las condiciones del entorno de forma de afectar diferencialmente su solubilidad. Aquí es importante recordar que la solubilidad de una sustancia es la medida de la capacidad de disolverse en un determinado

medio, a una temperatura y presión definidas. Las proteínas en disolución pueden cambiar su solubilidad diferencialmente de acuerdo a su composición aminoacídica en función de 1) concentraciones salinas, 2) disolventes orgánicos, 3) pH y 4) temperatura.

## Efecto del agregado de sales

Modificando la concentración salina, se puede aumentar (*salting in*) o disminuir (*salting out*) la solubilización de las proteínas. Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilidad por salado o *salting in*, en el que los contraiones adicionales recubren con mayor eficacia las numerosas cargas iónicas de las moléculas proteicas, con lo que se incrementa la solubilidad de las mismas. La efectividad en la solubilización de las proteínas depende de la sal utilizada. Este efecto lo observamos en la Fig 9.1 que muestra la solubilidad de la carboxihemoglobina en su punto isoeléctrico dependiendo de la fuerza iónica y del tipo de ion. S y S' representan respectivamente las solubilidades de la proteína en la disolución de la sal y en el agua pura.



**Fig. 9.1.** Solubilidad de la carboxihemoglobina en su punto isoelectrico en función de la fuerza iónica y el tipo de ion. S/S' son las solubilidades de la proteína en solución salina y en agua pura respectivamente

La capacidad de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas está en función de su fuerza iónica, que constituye una medida tanto de la concentración como del número de las cargas eléctricas aportados por la sal. Por otra parte, a medida que la fuerza iónica aumenta, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir. A una fuerza iónica lo suficientemente elevada, la solubilidad de una proteína puede reducirse drásticamente, efecto llamado insolubilización por salado o *salting out*, que es el resultado de la competencia por moléculas de solvatación entre los iones salinos agregados y los otros solutos disueltos. Así a concentraciones salinas elevadas el solvente disponible se torna insuficientes para disolver los

otros solutos y la interacción de los solutos en estos casos se vuelven más fuertes que la del soluto con el solvente y ello es lo que conduce a la insolubilización de los solutos.

La solubilización e insolubilización por salado, son procedimientos importantes para la separación de mezclas de proteínas, ya que las diferentes proteínas varían en su respuesta frente a la concentración de sales neutras. Generalmente las proteínas insolubilizadas por salado retienen su conformación nativa y pueden disolverse de nuevo, normalmente sin experimentar desnaturalización. El sulfato de amonio es el reactivo más utilizado para precipitar las proteínas por salado, debido a su gran solubilidad en agua (760 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /1000 ml. de agua a una temperatura de 20°C), lo que permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas. Para ello generalmente se prepara una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  la cual es adicionada de manera gradual de forma de permitir el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas pero no desnaturalizadas.

La ecuación de la precipitación con sales es como sigue:

$$\log S = A - m[\text{sal}]$$

donde: S = Solubilidad de la proteína a un valor dado de concentración salina. A = Constante que depende fuertemente del pH y la temperatura. Esta constante usualmente toma un valor mínimo en el punto isoeléctrico, es característica de cada proteína e independiente del tipo de sal. m = Pendiente de la curva de solubilización por salado. Esta pendiente es independiente del pH y la temperatura, pero varía con el tipo de sal y de proteína. Las sales que contienen aniones polivalentes tales como sulfatos y fosfatos tienen valores de m mayores que las sales univalentes. Los cationes polivalentes como el calcio y el magnesio disminuyen el valor de m.

## **Efecto de los Solventes Orgánicos en la Solubilidad de las Proteínas**

La adición de solventes orgánicos miscibles con el agua, particularmente etanol o acetona, disminuye la solubilidad de las proteínas porque sus bajas constantes dieléctricas reducen el poder de solvatación de las soluciones acuosas hacia los iones disueltos como las proteínas. El estudio cuantitativo de este efecto muestra que la solubilidad de una proteína a un pH y fuerza iónica determinados está en función de la constante dieléctrica del medio. Así la adición de etanol a una disolución acuosa de proteína incrementa la fuerza de atracción entre las cargas opuestas, disminuyendo de este modo el grado de ionización de los grupos R de la proteína. Como resultado, las moléculas de proteína tienden a agregarse disminuyendo su solubilidad. El uso de solventes orgánicos generalmente se realiza a bajas temperaturas ya que a temperaturas superiores a 10°C pueden llevar a la desnaturalización de las proteínas.



La reducción de la constante dieléctrica por el agregado de solventes orgánicos también aumenta las diferencias entre proteínas respecto de su comportamiento en la insolubilización por salado, por lo que ambas técnicas pueden utilizarse combinadas.

## **Efecto del pH**

La solubilidad de la mayor parte de las proteínas globulares se halla profundamente influida por el pH del sistema. Casi todas las proteínas globulares muestran un mínimo de solubilidad, aunque el pH al que ello ocurre varía de una proteína a otra. El pH al que una proteína muestra ese mínimo de solubilidad es su pH isoelectrico (también denominado *punto isoelectrico*, pI), definido como aquel valor de pH al que la molécula no posee carga eléctrica neta y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico. En estas condiciones no existe repulsión electrostática entre moléculas de proteína próximas y tienden a agregarse. Puesto que las diferentes proteínas poseen valores de pH isoelectrico variados, debido a que difieren en el contenido de aminoácidos con grupos R ionizables, con frecuencia pueden separarse unas de otras, mediante precipitación isoelectrica. Cuando el pH de una mezcla de proteínas se ajusta al pH isoelectrico de uno de sus componentes, la mayor parte o casi todo el componente se insolubilizará, quedando en la disolución las proteínas cuyos valores de pH isoelectrico se hallen por encima o por debajo de aquel. La “proteína isoelectrica” insolubilizada permanecería en su conformación nativa, y puede re disolverse en un medio de pH apropiado y concentración salina adecuada. Las proteínas sin carga neta resultan ser insensibles a la concentración salina pero a medida que el pH se aleja del valor del pI de la proteína, esto es a medida que la carga neta de la proteína aumenta, esta se verá cada vez más influida por el fenómeno de solubilización por salado.

## **Efecto de la temperatura**

Dentro de una fluctuación limitada entre los 0°C y los 40°C aproximadamente, la solubilidad de mayoría de las proteínas globulares aumenta al aumentar la temperatura, aunque existen algunas excepciones, como ocurre con los electrolitos sencillos. Por encima de los 40°C y los 50°C, la mayor parte de las proteínas aumentan su inestabilidad y comienzan a desnaturalizarse, generalmente con pérdida de solubilidad en la zona neutra de pH.

## **Métodos cromatográficos**

La cromatografía es esencialmente un método fisicoquímico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (lecho estacionario), y otra móvil (fase móvil) la cual percola circula? a través de la primera. En la cromatografía durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución) ocurren repetidos procesos de adsorción-desorción,

produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. A la distribución final de los componentes en función del volumen de elución, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma. Esta técnica fue descrita por primera vez por el botánico ruso M. Tswett (1910), quien la aplicó para la separación de pigmentos de plantas. El nombre de cromatografía parece haber surgido como consecuencia de las bandas coloreadas de pigmentos que se separaban por su adsorción selectiva sobre columnas de yeso. Esta técnica aunque exitosa quedó prácticamente olvidada hasta 1930, año en que fue redescubierta por Kuhn y Lederer, quienes la aplicaron para la separación de carotenoides. A partir de este momento, el uso de esta técnica se fue extendiendo cada vez más y un hito importante en el desarrollo de la misma lo constituye el desarrollo de la cromatografía gas-líquido que encontró rápidamente aplicaciones de gran importancia. En la actualidad no hay campo de la química, ciencias biológicas, etc. en el que no se utilice la cromatografía en alguna de sus formas, tanto en su formato preparativo como analítico.

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse en función del mecanismo de separación de los componentes entre las fases. En función del mecanismo de separación, las técnicas de cromatografía pueden clasificarse en: **cromatografía por tamaño molecular y forma**, y **cromatografía por carga**.

## **Cromatografía por Tamaño Molecular y Forma**

También llamada de permeación de gel, de exclusión molecular o de tamiz molecular. Consiste en la separación de las moléculas basándose en su tamaño y forma. Las fases estacionarias empleadas para este tipo de cromatografía pueden ser inorgánicas (zeolitas), o geles orgánicos compatibles con disolventes acuosos (agarosa, poliacrilamida) u orgánicos (copolímeros estireno/divinilbenceno) (Tabla 9.2). Estas fases estacionarias poseen cavidades en las cuales las moléculas de los compuestos a separar pueden penetrar y ser retenidas, siendo las moléculas mayores las eluidas de la columna en primer lugar. Por lo tanto, las moléculas más grandes atraviesan la columna con más rapidez, esto es, en un volumen de elución menor que el de aquellas moléculas más pequeñas que si logran ingresar en los poros. El límite de exclusión se define como el peso molecular a partir del cual los compuestos pasarán a través del lecho estacionario sin experimentar retención. El rango de trabajo de estas fases estacionarias, se define como el intervalo de pesos moleculares que pueden ser separados. El volumen de elución de una proteína determinada,  $V_e$ , refiere a la cantidad de solvente necesaria para eluir dicha proteína desde el momento en que se puso en contacto con el tamiz. El volumen muerto de una columna se define como el volumen del solvente que rodea a las esferas del tamiz. Este volumen se puede determinar experimentalmente midiendo el volumen de elución de una molécula más grande que el límite de exclusión del tamiz. Así el comportamiento de una proteína particular en un tamiz se caracteriza por el cociente entre su

volumen de elución y el volumen muerto de la columna. A este cociente se lo denomina volumen relativo de elución.

Este tipo de cromatografía puede ser utilizado para determinar las masas moleculares de las proteínas. Para un rango considerable de masas moleculares existe una relación lineal entre el volumen relativo de elución y el logaritmo de las masas moleculares. Es así que haciendo pasar una solución de proteínas de masas moleculares conocidas puede construirse una curva de calibración para luego con el dato de volumen de elución relativo propio de la proteína en cuestión puede estimarse su masa molecular. La precisión de esta técnica está limitada por la exactitud de la afirmación subyacente que indica que las moléculas conocidas y la desconocida tienen idénticas formas.

La cromatografía de exclusión molecular también puede utilizarse para eliminar sales de una solución proteica. Si por ejemplo se realizó una insolubilización por salado, la sal empleada puede eliminarse haciendo una cromatografía de exclusión molecular con un límite de exclusión menor que la masa molecular de la proteína. Al eluir la columna con el buffer, la proteína abandonará la columna antes que la sal.

Tabla 9.2 Materiales frecuentemente empleados como relleno de las columnas de exclusión molecular

Nombre	Tipo	Rango de fraccionamiento (kDa)
Sephadex G-10	Dextrán	0,05-0,7
Sephadex G-25	Dextrán	1-5
Sephadex G-50	Dextrán	1-30
Sephadex G-100	Dextrán	4-150
Sephadex G-200	Dextrán	5-600
Bio-Gel P-2	Poliacrilamida	0,1-1,8
Bio-Gel P-6	Poliacrilamida	1-6
Bio-Gel P-10	Poliacrilamida	1,5-20
Bio-Gel P-30	Poliacrilamida	2,4-40
Bio-Gel P-100	Poliacrilamida	5-100
Bio-Gel P-300	Poliacrilamida	60-400
Sepharosa 6B	Agarosa	10-4.000
Sepharosa 4B	Agarosa	60-20.000
Sepharosa 2B	Agarosa	70-40.000
Biol-Gel A-5	Agarosa	10-5.000
Biol-Gel A-50	Agarosa	100-50.000
Biol-Gel A-150	Agarosa	1.000-150.000

## Cromatografía por Carga

También llamada cromatografía de intercambio iónico, este tipo de cromatografía permite la separación de moléculas según la carga eléctrica. La fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil, la cual suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas generalmente en forma de buffer. Los iones de ésta compiten con los analitos (en este caso proteínas) por los sitios activos de la fase estacionaria. Las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el entorno iónico. La mayoría de las proteínas son

estables dentro de un margen de pH determinado (es decir, hay un margen en el que no se desnaturalizan), en el que están cargadas positiva o negativamente. Por lo tanto si una proteína es estable a valores de pH por encima del punto isoeléctrico, se debe utilizar un intercambiador aniónico. Si es estable a valores de pH situados por debajo del punto isoeléctrico, debe utilizarse un intercambiador catiónico. Los intercambiadores aniónicos poseen grupos con cargas positivas que unen aniones de forma reversible. Los intercambiadores catiónicos son portadores de grupos con carga negativa que unen cationes de modo reversible. Las proteínas que son portadores de cargas positivas y negativas pueden unirse tanto a los cambiadores de cationes como a los de aniones, dependiendo de su carga neta. La afinidad con la que un polielectrolito concreto se une a un cambiador iónico determinado depende de las identidades y de las concentraciones de los demás iones presentes en la disolución, debido a la competencia entre los diversos iones por los sitios de unión sobre el intercambiador iónico. La matriz o relleno puede estar hecha de diferentes materiales. Los de uso más corriente son el dextrano, la celulosa, poli(acrilamida), copolímeros del estireno y divinilbenceno, en los que el divinilbenceno contiene los grupos cargados y se entrecruza con las cadenas de poliestireno. La elección entre intercambiadores fuertes o débiles está basada en el efecto del pH sobre la carga y la estabilidad. Por ejemplo, si se va a cromatografiar una sustancia débilmente ácida que necesita pH muy altos o muy bajos para su ionización, se requiere un intercambiador fuerte debido que este funciona a pH extremos. No obstante, si la sustancia es lábil, es preferible la utilización de intercambiadores débiles. Los intercambiadores débiles son también excelentes para la separación de moléculas con una carga elevada de aquellas con poca carga, debido a que los iones débilmente cargados no se unen, por lo general, al intercambiador.

El primer paso para llevar a cabo esta metodología consiste en el equilibrio de la fase estacionaria con las condiciones iniciales deseadas para cargar la columna. Cuando el equilibrio se ha logrado, toda la fase estacionaria se encuentra asociada a iones complementarios (que pueden ser cloro o sodio). El paso siguiente es sembrar la muestra y para ello es necesario aplicar un buffer con el mismo pH y fuerza iónica que el buffer inicial para que todas las proteínas cargadas se unan al intercambiador. Las moléculas retenidas por el intercambiador luego pueden ser eluidas a través de cambios en la composición del buffer. La elución puede realizarse de dos formas diferentes; la más usual consiste en aumentar progresivamente la concentración de un contra ión, de modo de desplazar el equilibrio de unión de la macromolécula hacia la forma libre. El contra ión es normalmente una sal, disuelta en eluyente (NaCl, KCl, etc). Las macromoléculas de una mezcla se irán desplazando de manera secuencial, de acuerdo a la fuerza de unión: las que posean menos densidad de carga eluirán antes, mientras que para las de mayor carga neta el tiempo de retención será mayor.

La otra manera es realizar un cambio en el pH del solvente; esta técnica se emplea con intercambiadores débiles. La lógica es que al cambiar el pH, de modo de acercarnos al pI de cada proteína, la carga neta de esta irá disminuyendo y en algún punto dejará de interactuar con la matriz. Sin embargo, esta técnica posee sus desventajas dado que en este caso las

proteínas se eluirán a un pH igual a su pI su solubilidad estará disminuida y pueden precipitar. El proceso de purificación puede mejorarse si la columna cargada con proteínas se lava con el método de elución en gradiente. Con este método, la concentración salina o de pH o ambos varían en forma continua a medida que se eluye la columna de manera de liberar en forma secuencial a las distintas proteínas que están unidas al intercambiador iónico. El gradiente más utilizado es el lineal. En todos los casos la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que eluyen se representan en un cromatograma como el que se muestra en la Fig. 9.2.

Respecto al tipo de intercambiador, el dietilaminoetil (DEAE)-celulosa es el intercambiador aniónico más utilizado mientras que la carboximetil (CM)-celulosa es el intercambiador catiónico más empleado.

## Cromatografía de Afinidad

Esta técnica se fundamenta en la interacción específica de ciertas proteínas por ciertos ligandos que están unidos covalentemente a una matriz inerte y porosa. La proteína de interés al pasar a través de este material cromatográfico se une al ligando mientras que las otras sustancias son arrastradas con el líquido de elución. La proteína retenida puede luego recuperarse mediante un cambio en las condiciones de elución como puede ser un cambio de pH, de polaridad o incluso el agregado de una sustancia que tenga mayor afinidad por el ligando que la proteína de interés. Si la proteína de interés es una enzima, el ligando puede ser un análogo de sustrato no hidrolizable o el propio sustrato pero agregado en condiciones tales que no permitan el funcionamiento catalítico de la enzima.

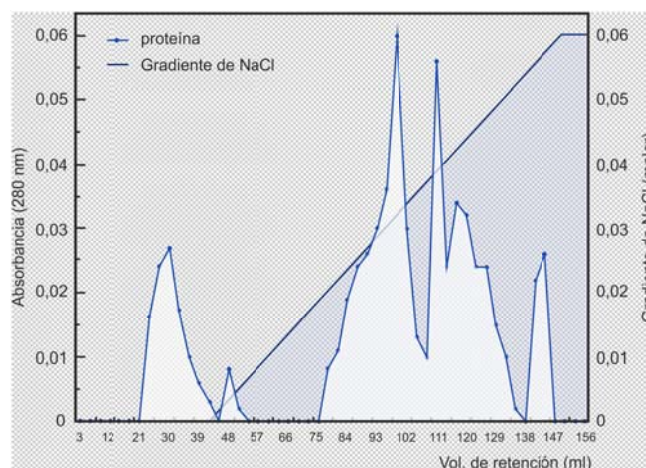


Fig. 9.2. Cromatograma obtenido de un intercambiador iónico.

La matriz utilizada en este tipo de cromatografía deber ser químicamente inerte, altamente poroso y tener un elevado número de grupos funcionales capaces de unirse covalentemente al ligando. Uno de los materiales que cumple con estos requisitos es la agarosa que posee numerosos grupos hidroxilos.

El poder de separación de la cromatografía de afinidad en general es mucho mayor que el de las otras técnicas cromatográficas. Esta característica permitiría reducir muchos de los pasos que se incluyen usualmente en una marcha de purificación, logrando además mayor pureza y mayor rendimiento.

## **Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

Este tipo de cromatografía permite separar moléculas en base a su polaridad. Aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos. Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede substituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente. La versatilidad y eficiencia de este tipo de cromatografía se ha visto incrementada con el uso de sistemas de alto desempeño (HPLC, del inglés "High Performance Liquid Chromatography") que utilizan alta presión para mejorar la resolución y reducir los tiempos de separación.

## **Diálisis**

La diálisis es una forma de filtración molecular (pero no es un proceso cromatográfico) que implica el uso de membranas semipermeables con poros menores a las dimensiones de las macromoléculas. Estos poros permiten que moléculas pequeñas como las de los disolventes, sales y metabolitos pequeños, se difundan a través de la membrana pero impiden el tránsito de moléculas mayores. Rutinariamente esta metodología se emplea para cambiar el disolvente en el que se encuentran disueltas las macromoléculas. Una disolución macromolecular se introduce en el saco o bolsa de diálisis, la cual se sumerge en un volumen del disolvente nuevo. Las moléculas pequeñas pasan a través de la membrana al fluido externo hasta que se alcanza el equilibrio, las macromoléculas permanecerán en el interior de saco de diálisis. El proceso puede repetirse varias veces a fin de sustituir completamente un sistema disolvente por otro.

La diálisis puede usarse también para concentrar una solución de proteínas pero para ello se debe colocar la bolsa de diálisis dentro de un desecante polimérico como puede ser el polietilenglicol. La concentración se logra por la difusión del agua a través de la membrana para que la absorba el polímero.

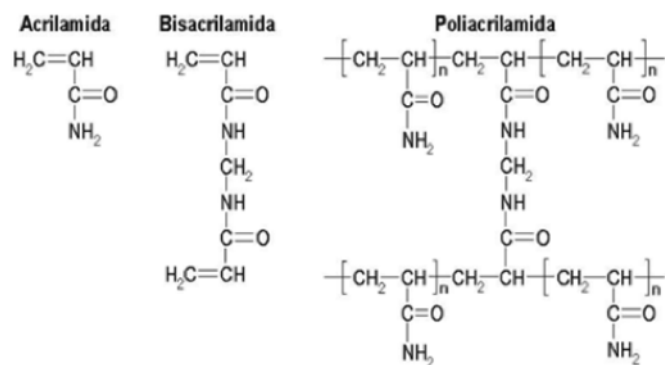
## Ultrafiltración

La ultrafiltración es el proceso capaz de fraccionar, separar y concentrar sustancias sin que éstas sufran cambios. Aquí también se utiliza una membrana semipermeable con poros de tamaño definido, que determina el tamaño de las partículas que pasarán a través de ella. Debido a que la membrana utilizada es semipermeable, es necesaria la presencia de una presión (entre 4 a 8 atm) que auxilie a las partículas a fluir a través de la misma. Este se puede lograr a través de la centrifugación.

Existen diferentes dispositivos y diferentes categorías de membrana. Están aquellas membranas formadas por polímeros orgánicos que formando una capa definen el tamaño de las partículas que podrán pasar. Estas membranas tienen distinto tamaño de poro por lo que pueden separar macromoléculas de distinto tamaño. La segunda generación de membranas de ultrafiltración se prepara a partir de materiales cerámicos. Las capas sucesivas se producen por un fritado de granos cerámicos que generan poros residuales cuyo tamaño depende del tamaño de los granos; para obtener una capa activa de ultrafiltración es necesario usar suspensiones coloidales de óxidos que luego se depositan sobre un material macroporoso y se fritan. En la práctica se utilizan ambas, una delgada capa de las membranas orgánicas determina el tamaño de macromoléculas que se pueden separar, sobre una gruesa capa de las inorgánicas que le aportan resistencia a la presión.

## Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.

Esta técnica implica la migración de iones en un campo eléctrico y se emplea mayormente para la separación de proteínas, aunque también puede ser útil para ácidos nucleicos. Se puede emplear tanto con fines preparativos como con fines analíticos. El uso de la electroforesis en la separación de proteínas fue divulgado por primera vez en 1937 por el bioquímico sueco Arne Tiselius quien introdujo la técnica denominada electroforesis de entorno móvil que ocurría completamente en solución. Esta técnica requería de un equipo sofisticado para prevenir la mezcla convectiva de las proteínas durante la migración. Luego fue reemplazada por la electroforesis zonal que implica el desplazamiento de los iones en un soporte sólido e inerte. Los geles de poliacrilamida se emplean usualmente en el caso de la separación de proteínas ya que es químicamente inerte frente a las moléculas biológicas, transparentes y estables en un amplio intervalo de valores de pH, temperatura y fuerza iónica; son también resistentes a agentes desnaturalizantes (urea, detergentes) y evitan la convección y minimizan la difusión. El gel de poliacrilamida que se forma por la polimerización de la acrilamida y la N,N'-metileno bisacrilamida (Fig 9.3) inducida por radicales libres en un buffer se prepara de modo que sus poros sean de un tamaño comparable al de las proteínas, de manera que produzcan un efecto de tamizado molecular.



**Fig 9.3** Estructura de acrilamida, bisacrilamida y poliactilamida

La separación electroforética en estos geles sin agentes denaturalizantes (geles nativos o no desnaturalizantes) depende entonces de la densidad de carga de las moléculas y de su tamaño, por lo que dos proteínas con idéntica densidad de carga, pero de tamaño diferente pueden ser separadas, ya que el soporte dificulta más el avance de la de mayor tamaño. La polimerización de la acrilamida se obtiene por la adición de catalizadores de la polimerización que inician y aceleran el proceso de formación de un gel tridimensional. Normalmente, el proceso se inicia con la adición de persulfato de amonio a una disolución acuosa (tampón) de ambos monómeros (acrilamida + bisacrilamida), seguido de la adición de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina) que actúa como propagador de la reacción de polimerización a pH básico (el pH ácido retarda la polimerización). Por lo tanto, ajustando las concentraciones de persulfato y TEMED puede controlarse la velocidad de polimerización. Siempre debe evitarse la presencia de oxígeno, pues inhibe la polimerización; por ello, la mezcla de polimerización debe desgasificarse a vacío (lo que impide, además, la formación de burbujas durante la polimerización que distorsionan el gel y alteran el campo eléctrico). La temperatura óptima de polimerización es de 25-30°C y el proceso ocurre en pocos minutos, aunque conviene dejarlo transcurrir más tiempo para que no queden restos de monómeros o de pequeñas cadenas libres.

Los monómeros (ya sea en polvo o en disolución) son neurotóxicos por absorción a través de la piel o por inhalación. Por ello, deben manejarse con guantes y mascarilla. Una vez realizada la polimerización, la toxicidad se reduce al mínimo, pero es recomendable continuar manipulando el gel con guantes, debido a la posible presencia de radicales libres.

El tamaño de poro de los geles de poliactilamida viene determinado por la concentración total de monómeros. Así, un gel de poliactilamida se define por el reticulado (%T) que es la concentración total de monómeros (acrilamida + bisacrilamida; % p/v) y la dureza (%C) que viene dada por la relación de la cantidad de bisacrilamida al total de monómeros (es un valor bastante constante y, normalmente, inferior al 1%). Incrementando %T el tamaño de poro decrece (los geles con %T inferiores a 2,5 % son casi líquidos y los geles con un %T del 30% presentan un reticulado tan denso que moléculas tan pequeñas como 2000-3000 Da difícilmente pueden atravesarlos). El tamaño medio de poro es 800Å, 50Å y 20Å para valores de 2.5, 7.5 y 30%T respectivamente.



## PAGE en Condiciones No Desnaturalizantes (Geles Nativos)

Esta técnica implica realizar las corridas electroforéticas en condiciones en las que no se altera la conformación nativa de las proteínas separadas, por lo que finalizada la electroforesis, pueden realizarse estudios de funcionalidad de dichas proteínas (actividad enzimática, capacidad de unión de anticuerpos, unión a receptores, etc.).

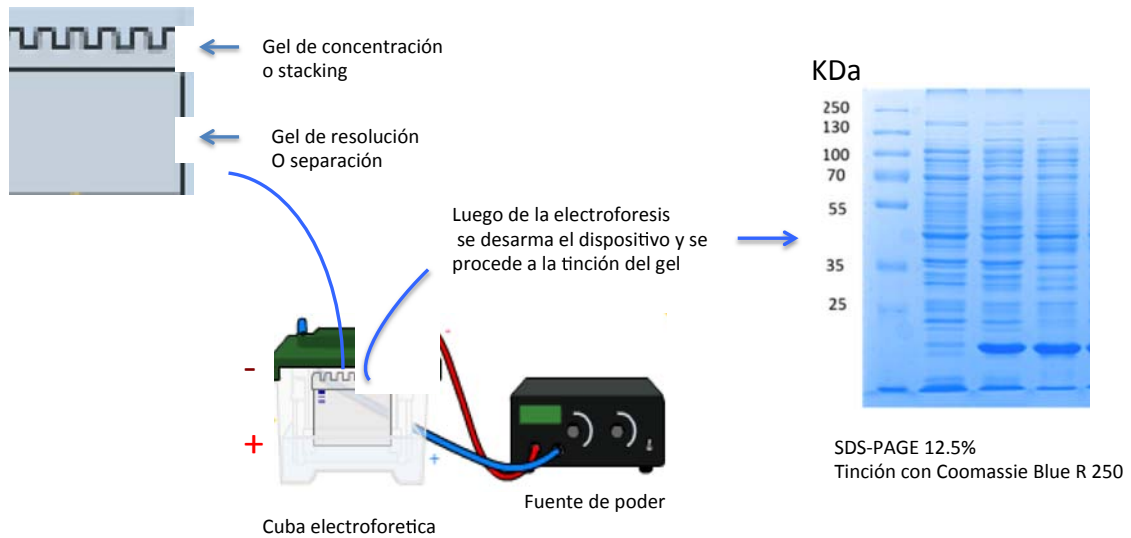


Fig 9.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacríamida (PAGE) desnaturalizantes.

Una modalidad de electroforesis no desnaturalizante que más frecuentemente se utiliza es aquella en la que el tampón presente en los reservorios es diferente al que impregna el gel, el cual tampoco es homogéneo, ya que, en realidad, hay dos geles diferentes en uno solo: una zona de resolución o separación (donde tiene lugar la separación de las proteínas) que se polimeriza sin colocar el peine (por lo que la parte superior presenta un frente plano) y otra pequeña zona de concentración de 1-3 cm que se polimeriza sobre la anterior (quedan hundidas), que contiene los pocillos de aplicación de la muestra y cuya finalidad es concentrar la muestra en la zona de contacto con la zona de resolución (figura 9.4). Este hecho es debido a que la zona de concentración tiene un tamaño de poro muy grande (2.5-3.0%T), por lo que no es restrictiva frente al de la zona de resolución cuyo tamaño de poro sí es restrictivo.

## PAGE en Condiciones Desnaturalizantes

En presencia de algunos compuestos químicos, las proteínas pierden su estructura nativa; tales compuestos, llamados agentes desnaturalizantes, producen el desplegamiento de la proteína perdiendo la organización tridimensional característica de su funcionalidad biológica.

En algunas proteínas hay puentes disulfuro entre los residuos de Cys de una misma cadena polipeptídica (puentes intracatenarios) o de diferentes cadenas (puentes intercatenarios) de algunas proteínas con estructura cuaternaria. La ruptura de dichos enlaces puede lograrse mediante tratamiento con determinados agentes reductores, como por ejemplo, el  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me) o el ditioneitol (DTT).

Otros agentes desnaturalizantes de proteínas, son la urea y determinados detergentes. La urea interfiere con las interacciones hidrofóbicas de las proteínas y debe incluirse en el tampón de la muestra y en todas las etapas que se empleen para la preparación de los geles.

Los detergentes afectan a la estructura nativa de las proteínas y a las interacciones con otras moléculas (proteínas, lípidos, etc.), ya que las interacciones hidrofóbicas de las proteínas son sustituidas por interacciones detergentes-proteína. Existen tres tipos principales de detergentes: *Detergentes no iónicos*: Son débilmente desnaturalizantes y no alteran la carga de las proteínas a las que se unen; se pueden utilizar en geles con urea y en electroenfoque. Los más empleados son el Triton X-100 y el octilglucósido, particularmente para solubilizar proteínas de membrana. Se utilizan a concentraciones de 0.1-3.0% (p/v) y deben incluirse en el tampón de la muestra y en el del gel. *Detergentes iónicos*: Pueden tener carga positiva (catiónicos) que se usan para la separación de proteínas muy ácidas o muy básicas; el más utilizado es el cetiltrimetilamonio (CTAB). Otros poseen carga negativa y un fuerte carácter desnaturalizante; el más empleado es el dodecilsulfato sódico o lauril sulfato sódico (SDS). *Detergentes anfóteros*: Son débilmente desnaturalizantes y no afectan a la carga de las proteínas; algunos, como el 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS) solubilizan muy bien las proteínas de membrana. Son compatibles con la utilización de urea y su uso es frecuente como alternativa a los detergentes no iónicos.

## SDS-PAGE

Se trata de una electroforesis en la que se adiciona el detergente SDS. Este detergente se une a las proteínas de modo que una molécula de SDS interacciona por cada dos aminoácidos, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas por la carga negativa que aporta la molécula de SDS. De esta forma los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (la carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos). A diferencia del PAGE en el que la movilidad electroforética de las proteínas es función del tamaño y de la carga por unidad de masa; como ésta es constante para todos los complejos SDS-proteína, la movilidad de las proteínas en un

gel SDS-PAGE será solamente función de la masa molecular, es decir, cuanto menor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma y viceversa.

En resumen, el SDS-PAGE es la electroforesis más utilizada para el análisis de proteínas debido entre otros a: - todos los complejos SDS-proteína tienen carga negativa y migran, por lo tanto, en el mismo sentido. - la densidad de carga es muy elevada, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas, la separación depende de un parámetro físico-químico, como es la masa molecular, que se puede calcular y - los complejos SDS-proteína se tiñen fácilmente.

La preparación de la muestra a colocar en el gel es importante ya que es allí donde se logra la modificación del estado conformacional y fisicoquímico de las proteínas. Para preparar la muestra se agrega al tampón en el que va disuelta la o las proteínas (Tris HCl; 0.05M, pH = 6.8) un exceso de SDS (2% p/v); para facilitar la unión del SDS a las proteínas, la muestra se calienta a 100°C durante al menos 3-5 minutos y, opcionalmente, se añade  $\beta$ -ME (5% v/v) ó DTT (20 mM) si se requieren condiciones reductoras. Para incrementar la densidad de la disolución de la muestra, se añade glicerol o sacarosa al 10% (p/v) y como marcador del frente de corrida, azul de bromofenol al 0.001% (p/v).

La cantidad de muestra que se añade depende de la sensibilidad de la tinción posterior que se vaya a utilizar, pero como regla general y para geles de 20x20 cm de 1.5mm de espesor y tinción con azul de Coomassie R250, se suele añadir entre 1-10 $\mu$ g de muestra (más de 100 $\mu$ g de proteína supone una sobrecarga del gel).

Para lograr condiciones desnaturalizantes el SDS debe también incluirse en el tampón de los reservorios, en los de los geles (de concentración y de resolución) y en el de la muestra para mantener las condiciones desnaturalizantes. El SDS-PAGE puede realizarse en condiciones reductoras o no reductoras; la ausencia de reductores se traduce en que si las proteínas poseen puentes disulfuro, el SDS sólo producirá una desorganización parcial de la estructura. Si son dos o más las cadenas unidas por puentes disulfuro intercatenarios, en presencia de SDS, quedarán más o menos desplegados en función de la posición de los puentes disulfuros.

Hasta aquí se describieron las principales técnicas que se emplean usualmente en las marchas de purificación. Lo importante de ellas es comprender sus fundamentos, sus alcances, la interpretación de los resultados que arrojan pues ello permitirá el uso adecuado de las mismas.

Como se ha mencionado en el comienzo del capítulo un aspecto esencial es evaluar la purificación en términos de rendimiento y pureza de acuerdo al objetivo planteado. Las medidas de actividad enzimática total y actividad específica nos permitirán determinar rendimiento y grado de purificación según lo descrito al comienzo del capítulo.

En cuanto a calidad de la muestra obtenida, los geles nativos asociados a técnicas inmunológicas (immunoblotting o western blot) serán las metodologías de elección por ser relativamente sencillas.

Para finalizar este capítulo se incluye aquí una breve descripción de la técnica denominada inmunlotting o western blot. Esta técnica consiste en la transferencia de las proteínas separadas a través de corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida a membranas microporosas generalmente bajo la influencia de una corriente eléctrica. Los perfiles de proteínas obtenidos en los geles son así transferidos a la membrana. La membrana con las proteínas transferidas es luego tratada con una solución de proteínas ajenas al sistema de estudio (proteínas de la leche) de forma que con este tratamiento toda la membrana quede cubierta de proteínas. El tratamiento de la membrana con aquella solución de proteínas se conoce como etapa de bloqueo porque así se bloquean los sitios de la membrana de pegado inespecífico. La membrana bloqueada luego es incubada con una solución que contiene anticuerpos específicos de la proteína de interés. Solo si la proteína de interés está presente en la membrana, el anticuerpo interaccionará específicamente con ella. Esta interacción puede ser luego detectada mediante la adición de un segundo anticuerpo que interacciona específicamente con el primer anticuerpo y que está unido a enzimas u otros marcadores. Las bandas que interaccionaron con el primer anticuerpo y con el segundo se hacen luego visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles que se depositarán en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína (Fig. 9.5)

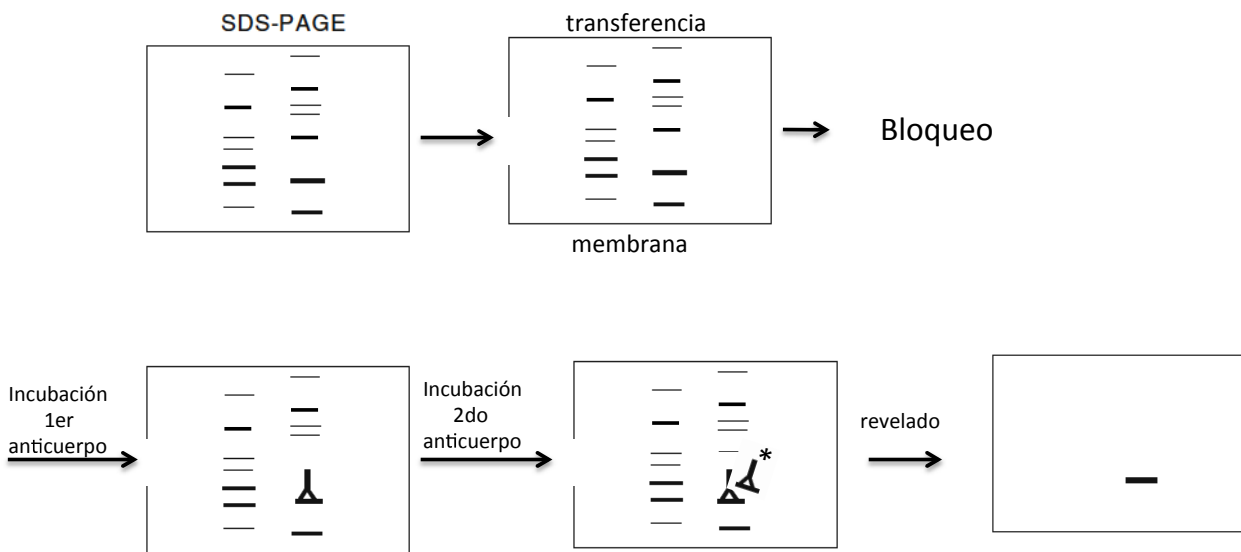


Fig 9.5. Pasos en la técnica de western blot

## Problemas

### Problema 1

En la purificación de una enzima se obtuvieron los siguientes resultados:

Fracción	Volumen total (ml)	Actividad total (unidades enzim.)	Proteínas (mg/ml)
Extracto acuoso	62	4550	40,2
Fracción 40-50% de sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	640	5,9
Eluato $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5	335	1,2

- Calcular la actividad específica en cada fracción
- Calcular cuántas veces se ha purificado la proteína.
- Calcular el rendimiento en todo el procedimiento.
- ¿Cómo supone Ud. que puede variar la actividad específica a lo largo del proceso de purificación? (Aumenta, disminuye, permanece constante). ¿Por qué?

### Problema 2

Se desean estudiar las propiedades de una enzima que se encuentra en plantas. Para ello se ha diseñado un método de purificación con el que se pretende obtener esta enzima en condiciones nativas, y se han realizado algunos análisis de sus propiedades.

Para la purificación de esta enzima usted partió de hojas de espinaca y obtuvo un extracto crudo de 72 ml. Seguidamente se precipitó con sulfato de amonio por agregado de 117 ml de solución saturada de dicha sal. Luego de separar el precipitado, el mismo se resuspendió en buffer pH 7,0 en un volumen final de 25 ml. A esta fracción se la precipitó isoelectricamente y se separó el precipitado del sobrenadante mediante centrifugación. La fracción conteniendo la enzima (precipitado) se resuspendió en 7.5 ml de buffer pH 7 y se cromatografió en DEAE-celulosa. Se juntaron todas las fracciones correspondientes al pico de actividad (volumen total 7,2 ml). Como último paso se realizó una concentración de la muestra.

A todas las fracciones de la purificación se les midió actividad de la enzima y concentración de proteínas por el método de Lowry (0,2 ml de muestra en el tubo de colorimetría de volumen final 1,3 ml).

- En base a los datos presentados: ¿A qué grado de saturación de sulfato de amonio precipita la enzima?
- En cada etapa de la purificación de esta enzima calcule: la actividad específica, el rendimiento respecto de la etapa anterior y del proceso total. ¿Cree que el protocolo aplicado fue adecuado en todas las etapas? Si no es así, explique por qué y sugiera las modificaciones que crea necesarias.

Fracción	Actividad UE/ml	Proteína mg/ml	Actividad Específica	Factor de Purificación	Rendimiento
Extracto crudo	342	57			
Ppdo. de sulfato de amonio	653	36			
Precipitación isoelectrica	1262	3			
Cromatografía en DEAE-celulosa	433	2,6			
Concentrado de proteína	1068	2,5			

### Problema 3

Se obtuvieron 250  $\mu\text{g}$  de una proteína vegetal (Ch-pro) con suficiente grado de pureza para intentar una caracterización físico-química. Ch-pro es parte de un complejo de absorción de luz, presentando un pico de absorción a 520 nm, propiedad que es utilizada para seguir la marcha de su purificación. Se sabe que la actividad específica de Ch-pro pura es 0,01 UA/ $\mu\text{g}$  y que constituye el 0,9% del total de proteínas celulares presentes en el extracto crudo (EC).

Para purificarla se procedió como se muestra en la tabla a continuación. En la precipitación fraccionada se recuperó el 90% de la actividad de Ch-pro y un 70% de las proteínas solubles del extracto. En la cromatografía de exclusión molecular se recuperó (respecto al paso anterior) 11,4% de la proteína total y 89% de Ch-pro.

En el último paso (cromatografía de afinidad) se recuperó el 6% de las proteínas totales. Considerando que con esta marcha Ch-pro se purificó 90 veces, complete la tabla (expresé el rendimiento y grado de purificación respecto al extracto crudo).

	Proteína (mg)	Act (U)	Act. Esp	Rendimiento	Purificación
Extracto crudo					
Precipitación fraccionada					
Exclusión molecular					
Cromatografía de afinidad	0,25				90

## **Bibliografía**

Janson, J.C. (2011) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, 3rd Edition. New York: Wiley & Sons.

Simpson, R.J., Adams, P.D., Golemis, E.A. (2009) *Basic Methods in Protein Purification and Analysis: A Laboratory Manual*, 1st Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# CAPÍTULO 10

## Protocolos de Ensayo de Actividad Enzimática

*Daniela Hozbor y Daniela Bottero*

*La sencillez es la hija de una complejidad de creación  
que no se nota, ni tiene por qué notarse.*

EDUARDO GALEANO

La vida es posible gracias a la acción coordinada y eficiente de cientos y miles de enzimas que en respuesta a señales intra o extracelulares modifican su síntesis y/o su actividad. Resulta fascinante poder comprender el comportamiento de las enzimas, *in vivo* dada la exquisitez de los mecanismos involucrados en su acción y regulación. En contraposición con lo complejo de las interrelaciones existentes en un sistema *in vivo*, los investigadores intentamos desentrañar este universo e hipotetizar sobre su comportamiento a través de uso de entornos simplificados dentro de tubos de ensayo en los laboratorios. En muchos casos las aproximaciones son muy buenas. En este capítulo nos centraremos en los métodos que permiten medir la actividad enzimática *in vitro* haciendo hincapie en las consideraciones que deben tenerse en cuenta para lograr un procedimiento adecuado.

### ¿Qué significa medir una actividad enzimática?

Medir una actividad enzimática implica medir **la velocidad de una reacción química catalizada enzimáticamente. Dado que una enzima puede catalizar la reacción en la que interviene un sustrato en particular o en una familia de sustratos relacionados estructuralmente, la medida de actividad enzimática resulta ser específica para cada par Enzima-Sustrato. Así, la medida de la actividad enzimática brinda información cuantitativa de la presencia de una enzima particular en una muestra en la que la enzima en cuestión puede no estar pura.** La determinación de la actividad enzimática no sólo será reflejo de la cantidad de enzima y de sustrato presentes en la mezcla de reacción, sino también de las condiciones de temperatura, pH, concentración y tipos de sales en las que ocurre la reacción. La presencia de activadores e inhibidores en la mezcla de reacción también tendrán efecto sobre la velocidad de una reacción.



## Unidades para la Expresión de la Actividad Enzimática

Como se ha mencionado, la actividad enzimática se determina experimentalmente midiendo la **velocidad de reacción** es decir, la cantidad de sustrato convertido a producto por unidad de tiempo evaluada en condiciones de reacción definidas. Dos unidades enzimáticas utilizadas internacionalmente son, el *katal* (kat) del Sistema Internacional de Unidades y la unidad Internacional (UI). Cada una de ellas se define como:

**1 kat** = cantidad de enzima necesaria para convertir 1 mol sustrato en producto por segundo en condiciones de concentración de sustrato saturante; temperatura, pH y fuerza iónica óptimos para la enzima en cuestión.

**1 UI** = cantidad de enzima necesaria para convertir 1  $\mu\text{mol}$  sustrato en producto por minuto en condiciones de concentración de sustrato saturante; temperatura, pH y fuerza iónica óptimos para la enzima en cuestión.

Estas unidades luego se refieren en un cierto volumen de muestra. A modo de ejemplo podemos pensar en el rótulo de un extracto que contiene a la enzima que es estudiada, en este caso la enzima  $\beta$ -galactosidasa, como:

**$\beta$ -galactosidasa: 8 UI/ml**

Esta notación significa que el extracto de  $\beta$ -galactosidasa contenido en el recipiente presenta por cada mililitro, la cantidad de enzima capaz de catalizar la conversión de 8  $\mu\text{moles}$  de sustrato por minuto en condiciones de concentración de sustrato saturante y pH, temperatura y fuerza iónicas óptimos. Esta nomenclatura nos acerca a la idea de concentración de la enzima en términos de su funcionalidad siendo la forma usual de expresión de concentración enzimática.

Si bien existe consenso internacional respecto de las unidades de actividad enzimática ya mencionadas es decir katal y unidades internacionales, cada experimentador puede generar una definición propia de unidad enzimática en función de las características del sistema de estudio o de la facilidad para el manejo de los datos. La definición de esa unidad de actividad debe incluir: cantidad de sustrato, condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica y sales utilizadas. Por ejemplo en el caso de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que *in vivo* cataliza la reacción de ruptura del disacárido lactosa, puede ser medida en el laboratorio utilizando un análogo de aquel sustrato, el o-nitrofenil –  $\beta$  – d- galactopiranosido (ONPG). Como producto de esa reacción se obtiene un producto coloreado, el o-nitrofenol (ONP), que puede monitorearse espectrofotométricamente a  $\lambda=420\text{ nm}$ :



La reacción se lleva a cabo en un medio conteniendo buffer Z (Buffer Z pH: 7;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16,1 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5,5 g/l, KCl =0,75 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,246g/l,  $\beta$ -

mercaptoetanol 2,7 ml/l). Teniendo en cuenta todas estas características de la reacción puede definirse una unidad enzimática (UE) como sigue:

**1UE=** la cantidad de enzima necesaria para generar un cambio de 0,2 unidades de Absorbancia en la mezcla de reacción por minuto, en condiciones de [ONPG] saturante, a 37°C y empleando el buffer Z.

## Utilidad de las medidas de Actividad Enzimática

La cuantificación de la actividad enzimática, brinda información útil sobre la cinética enzimática de la reacción, posibilita caracterizar los mecanismos con los que la enzima funciona *in vivo*, desentrañar mecanismos de regulación, inhibición y activación de la misma. Las medidas de actividad enzimática a distintos pHs brindan adicionalmente información sobre la identidad de los residuos R aminoacídicos involucrados en el sitio activo y en posiciones de la estructura proteica esenciales para estabilizar las conformaciones funcionales de la enzima. Más aún, dado que la actividad enzimática es específica del par enzima - sustrato, la utilidad de esta medida radica también en que es posible evaluarla aún en mezclas complejas como el que se puede encontrar durante una marcha de purificación de proteínas. Ante el desafío de purificar una enzima en particular a partir de un tejido, célula u organela, es condición necesaria contar con un procedimiento estandarizado de cuantificación de actividad enzimática. La medida cuantitativa de actividad enzimática aplicada en los sucesivos pasos de una marcha de purificación (ver para más detalla Capítulo 9 de este libro) será indispensable para evaluar la marcha de purificación en forma global y cada paso de purificación en particular. Puntualmente la medida de actividad enzimática, se utiliza para calcular el rendimiento del procedimiento de purificación y la de actividad específica (Actividad enzimática total/cantidad de proteína) el grado de purificación. Específicamente el rendimiento da cuenta del porcentaje de la cantidad de enzima de interés que se ha podido recuperar después de la purificación respecto a lo que había en el material de partida. El grado de purificación refleja en forma cuantitativa cuántas veces se ha logrado purificar la enzima luego del procedimiento de purificación. Estas determinaciones de rendimiento y grado de pureza se pueden realizar respecto de un paso anterior de la marcha de purificación según se muestra a continuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Actividad total paso (i)}}{\text{Actividad total paso (i - 1)}} \cdot 100$$

$$\text{Actividad específica o AE } \left( \frac{\text{UE}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Actividad total paso (i)}}{\text{Proteínas totales paso (i)}}$$

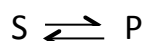
$$\text{Grado de purificación o GP} = \frac{\text{AE paso (i)}}{\text{AE paso (i - 1)}}$$

**Importante:** con el fin de evitar errores de cálculos hay que tener siempre presente cuáles son las unidades de cada parámetro. El Rendimiento será un porcentaje, la Actividad Específica tendrá unidades de Actividad Enzimática (por ejemplo UI) por masa de proteínas (por ejemplo mg) o UI/mg mientras que el Grado de purificación será adimensional.

## ¿Cómo se mide la actividad de una enzima?

### Diseño de un protocolo de medida

Consideremos una reacción de primer orden catalizada por la enzima E en la que una molécula de un Sustrato S se convierte a una molécula de Producto P según se representa a continuación:



La velocidad de esta reacción se determina como la cantidad de sustrato consumido o de producto generado por unidad de tiempo según la siguiente ecuación:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k[S]$$

Esta ecuación es válida para las reacciones catalizadas enzimáticamente. Durante el avance de una reacción química catalizada o no enzimáticamente, la velocidad de la reacción no será constante en el tiempo. De hecho, sólo a tiempos cortos cuando todavía no se ha formado suficiente cantidad de producto como para que la reacción inversa de P a S tenga lugar, la velocidad de la reacción será constante. Sin embargo a medida que avanza la reacción, la velocidad disminuirá hasta finalmente hacerse cero (Figura 3.1). Esto es, la velocidad que se mantiene constante por un periodo de tiempo y es distinta de cero puede calcularse de la pendiente de la gráfica que evalúa la cantidad de sustrato transformado o producto formado en el tiempo. El cambio en la concentración de P o S en ese período de tiempo donde la reacción inversa de P a S no está teniendo lugar, se denomina **velocidad inicial de reacción** o  $v_0$ :

$$\lim_{t \rightarrow 0} v = v_0 = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt}$$

La velocidad de la reacción como sabemos depende de concentración inicial de sustrato en la mezcla de reacción, la cantidad de enzima, la temperatura y buffer por lo que todas estas variables deben ser definidas. En esas condiciones se podrá hallar un valor de actividad enzimática que eventualmente podrá expresarse en las unidades enzimáticas definidas es decir, katalas, unidades internacionales o una unidad enzimática propia. Para informar la

actividad de un extracto enzimático, será necesario realizar cálculos para convertir el resultado en la Unidad definida y a un volumen de “extracto enzimático” o al “volumen de enzima” agregado en la mezcla de reacción.

## Factores a tener en cuenta al momento de diseñar el protocolo

Diseñar un protocolo de medida de actividad enzimática implica definir los componentes una mezcla de reacción en donde ocurrirá la reacción catalizada enzimáticamente, los tiempos de medida, las condiciones, la forma de medida y los controles. Respecto de la forma de medida, a la hora de diseñar de un protocolo resulta esencial contar con una metodología que permita cuantificar el sustrato o el producto de la reacción. La metodología específica cuantitativa que se seleccione según la reacción tendrá un **rango de detección** en el que se correlacionará directamente la señal detectada con la cantidad de la sustancia presente. Por tanto, el rango de detección del método seleccionado será una limitante a la hora de planificar el experimento. Es decir, la reacción debe transcurrir de forma que la cantidad (P) que se produzca o de (S) que se convierta se encuentre entre el límite inferior y el límite superior de detección del método empleado. Por otra parte, la sensibilidad del método de cuantificación debe ser tal que permita detectar los incrementos o disminuciones de la sustancia que se esté monitoreando entre dos tiempos sucesivos de medida.

Otra condición de contorno ineludible al planificar estos experimentos es que la medida debe realizarse **en condiciones de velocidad inicial de reacción**. Durante los cálculos previos del diseño experimental se considera que la condición de  $v_0$ , se mantendrá hasta tanto no se haya consumido más del 5% del sustrato presente en la mezcla de reacción. En esta condición será despreciable la reacción inversa en la que el producto se convertirá a sustrato por lo que la velocidad de reacción será la velocidad instantánea de reacción y constante.

Las medidas cuantitativas de sustrato consumido o producto formado pueden realizarse en dos formatos, uno en que la determinación se realiza de manera continua a medida que avanza la reacción y otro discontinuo en el que se toman alícuotas de la mezcla de reacción a distintos tiempos para detener la reacción y luego realizar la medición analítica de sustratos o productos.

En el primer caso, es decir en los ensayos de **medida continua**, la reacción transcurrirá en una celda, dentro del mismo equipo en el que se tomará la medida cuantitativa del sustrato o del producto, de modo que el equipo de medida debe poder termostatizarse. Es muy frecuente el uso de técnicas espectroscópicas como la absorción ultravioleta-visible y la emisión de fluorescencia. Así, si el sustrato o el producto son coloreados o presentan un máximo de absorbancia en el espectro de luz UltraVioleta (ej: NAD(P)H: 340nm), se podrá emplear como equipo de medida un espectrofotómetro con control de temperatura. Mediante la ecuación de Lambert y Beer que relaciona la Absorbancia (Abs) con la concentración (c) ( $Abs = \epsilon bc$ ) y conociendo el coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) específico para la sustancia en las

condiciones de medida y el camino óptico (b), se podrá calcular las concentraciones de sustrato o producto en la mezcla de reacción a cada uno de los tiempos que se quiera evaluar.

Cabe destacar que, aún cuando no resulte posible determinar espectrofotométricamente la concentración de S o P puede determinarse la velocidad de la reacción a través del empleo de estrategias como por ejemplo el empleo de **reacciones acopladas** en las si puede evaluarse por espectrofotometría P o S de esta reacción acoplada. Brevemente, esta estrategia consiste en asociar una reacción enzimática a la reacción de interés de manera que el producto de la reacción de interés sirva como sustrato para la reacción que ha sido acoplada, de modo que se genere un nuevo producto que sí podrá ser medido cuantitativamente por espectrofotometría. Es importante remarcar que los componentes que se introducen en la mezcla de reacción para que la reacción acoplada proceda de manera coordinada con la reacción de interés, deben ser tales que la velocidad de la reacción dependa exclusivamente de la reacción de interés. En términos generales, la reacción acoplada requerirá de la incorporación de una enzima adicional (E') y probablemente de un nuevo sustrato (A) que sólo se requiera para que la reacción acoplada ocurra. Las cantidades de estos componentes "adicionales de la mezcla de reacción" E' y A deben ser tales que no limiten la velocidad de la reacción catalizada por E. En general se emplean concentraciones de A saturante y de E' en cantidades mayores que E (10 veces más E' que E). Así, conociendo la estequiometría de ambas reacciones y disponiendo de una metodología cuantitativa para determinar la generación del producto (B\*) de la reacción acoplada, la Actividad Enzimática debida a la enzima E podrá expresarse como el cambio en la concentración del nuevo producto B\* cuantificable en el tiempo:

$$v_0 = \frac{d[B^*]}{dt}$$

En muchos casos este tipo de ensayos acoplados se han utilizado para estudiar enzimas metabólicas en las que un producto dado puede ser oxidado o reducido por la intervención coenzimas cromomogénicas como NAD(P)H en el mecanismo de reacción.

En caso de que no pueda medirse el S o P porque ambos carecen de propiedades espectrofotométricas o porque las mismas son similares, es necesario recurrir a otro tipo de ensayos que implica la separación y el marcaje de sustrato o producto. Estos métodos suelen clasificarse también como discontinuos ya que se requiere de la separación de alícuotas de la mezcla de reacción a los tiempos de medida, la detención de la catálisis inmediata y la separación eficiente de S o P. Una vez separadas las fracciones de S y P, se realizará el marcado de uno de ellos o se efectuará una reacción química específica para alguno, de manera de realizar la cuantificación. Para lograr la detención instantánea de la catálisis se utilizan agentes desnaturizantes como ácidos, bases o sustancias quelantes aunque también puede utilizarse cambios bruscos de temperatura. El agregado de compuestos con acción desnaturizante sobre la enzima, aportará un entorno químico, que no deberá interferir con el procedimiento posterior de separación y detección de S o P. Un ejemplo de marcaje, consiste en el empleo de ensayos radiométricos que en general presentan elevada sensibilidad.

Usualmente se emplean isótopos radioactivos cuya vida media, es decir el tiempo en el que se haya producido el decaimiento del 50% de los átomos, es mayor que el tiempo de medida de actividad enzimática. En este sentido, los isótopos más utilizados son  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ . En estas condiciones luego del recuento de centelleo al medio que contiene el producto purificado (por ejemplo, la resina de intercambio iónico donde se realiza un análisis densitométrico sobre el gel de electroforesis) se determinará la actividad según se especifica a continuación:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{\text{cpm}}{(\text{Actividad radioactiva específica, cpm} \cdot \mu\text{mol}^{-1})(\text{vol, } \mu\text{l})(\text{t, seg})}$$

## Diseño del Protocolo de Medida de Actividad Enzimática - Preparación de las Mezclas de Reacción

Como hemos visto la medida de actividad enzimática (o velocidad de reacción) debe realizarse en condiciones de **velocidad inicial de reacción**, es decir cuando el consumo del sustrato sea menor al 5% de la concentración de sustrato inicial o lo que es igual cuando la reacción inversa de P a S no está teniendo lugar. También tenemos que considerar que la mezcla de reacción y los tiempos de medida deben establecerse de forma que la cantidad acumulada de producto o de sustrato consumido caigan dentro del rango de detección del método cuantitativo de detección.

El **volumen final de la mezcla de reacción** estará sujeto al método de detección que se vaya a emplear. En el caso más sencillo de medidas espectrofotométricas continuas, la mezcla de reacción podrá ser del volumen de la cubeta espectrofotométrica (habitualmente del orden de 1 ml). Estas celdas de medida tanto las de plástico como las de cuarzo, en caso de medir compuestos coloreados (Absorbancias >400nm) o en el espectro ultravioleta respectivamente, se colocarán dentro del espectrofotómetro que se programará de manera de tomar en el tiempo medidas de Absorbancias. En caso de que las medidas sean discontinuas deberá tenerse en cuenta que el volumen final de la mezcla sea suficiente de modo tal que supere la suma de los volúmenes de al menos 5 alícuotas que se someterán a la cuantificación a los distintos tiempos estipulados.

**Cada mezcla de reacción** incluirá los siguientes componentes: buffer de reacción, extracto enzimático y sustrato(s). Todos estos componentes, se prepararán como stock a una concentración mayor que la final requerida en la mezcla de reacción de modo que cuando cada uno se diluya en la mezcla de reacción al volumen final planificado, alcancen la concentración deseada. En el caso particular del buffer de reacción, éste aportará no sólo el pH adecuado al medio de la reacción, sino también las sales (por ejemplo NaCl o KCl), osmolitos (como polietilenglicol, glicerol, glicol o sacarosa) y agentes reductores (como 2-mercaptoetanol o ditioneitol) en caso de necesitarse para mantener la estabilidad y la actividad de la enzima. La preparación de solución stock de sustrato más concentrada, tendrá como limitante experimental

la solubilidad a la temperatura de trabajo seleccionado por lo que es deseable recabar esta información de tablas.

La reacción comenzará a hacerse visible cuando el S y la E entren en contacto. Se recomienda que la enzima sea el primer componente a agregar en la mezcla de reacción de forma de que se encuentre ya termostalizada a la hora de que se agregue el sustrato. Es conveniente también disponer de una preparación stock de enzima concentrada tal que, el volumen que se agregue a la mezcla de reacción no supere el 10% del volumen final de la mezcla. El agregado de sustrato a la mezcla de reacción marca el momento de inicio de la catálisis o tiempo cero de la cinética a partir del cual se determinarán cantidades de producto formado o de sustrato consumido en tiempos sucesivos. En el formato de ensayos de medida continuos, una vez agregada el sustrato a la mezcla de reacción e iniciado el conteo del tiempo, la cubeta de medida se colocará inmediatamente dentro del espectrofotómetro para comenzar a tomar valores de Absorbancia. Con los ensayos discontinuos, a los tiempos estipulados de medida se deberán tomar alícuotas de la mezcla de reacción que se combinarán con las correspondientes para la detención de la reacción (o solución de frenado o *Stop*). Cuando se plantea medir **la actividad enzimática en la medida de lo posible se buscará determinar  $V_{max}$ , es decir la velocidad de la reacción cuando la concentración de sustrato es saturante. Si el sustrato no es soluble en la condición de sustrato saturante (100 veces el valor de  $K_m$ ) o si es extremadamente caro, la determinación de la actividad se realizará a una concentración de sustrato que no será la saturante, será otra  $v_0$ .**

En paralelo se deben **preparar blancos**, que darán cuenta de componentes que absorban a la longitud de onda del ensayo pero que no se originen en la catálisis. Estos blancos consistirán en mezclas de reacción en las que se reemplaza en igual volumen final de mezcla de reacción el volumen correspondiente al Sustrato (Blanco de Sustrato) o el de Enzima (Blanco de Enzima) por agua. La absorbancia medida en el Blanco de Sustrato será debida a componentes del extracto enzimático con un pico de Absorbancia a la longitud de onda del ensayo mientras que la debida al Blanco de Enzima dará cuenta de la Absorbancia debido al avance de la reacción independientemente de la catálisis. Los dos valores de Absorbancia de estos blancos deberán restarse a las medidas de Absorbancia debidas a la catálisis en cada tiempo.

El paso siguiente en la confección de un protocolo de medida de actividad enzimática, será la elaboración de una **Tabla de tiempos**, es decir estipular con anterioridad al inicio del ensayo los tiempos en que se tomarán medidas de Sustrato convertido o de Producto formado. Los tiempos de medida deberán asegurar que en el menor de los tiempos se haya acumulado una cantidad del componente espectroscópicamente activo suficiente que alcance el rango inferior de medida y en el otro extremo que en el último de los tiempos de medida no se supere el límite superior del rango de medida. Debido a que en la mayoría de los ensayos de medida de actividad enzimática no se conoce a qué velocidad procederá la reacción, se eligen arbitrariamente tiempos de medida (por ejemplo 10 medidas entre 1 y 20 minutos) y considerando el rango de detección de la metodología que se utilice para la cuantificación (por

ejemplo para un compuesto que se monitorea espectrofotométricamente el rango de detección de la Absorbancia: 0,1- 1) se consigna que el protocolo pautado será útil en un rango de Actividad determinado entre la velocidad mínima (Absorbancia del límite inferior en el máximo tiempo de medida: 0,1Abs/20minutos) y la velocidad máxima (Absorbancia del límite superior en el menor tiempo de medida: 1Abs/1minuto). El diseño de un protocolo que arroje valores de Actividad por fuera de este rango requerirá de la modificación de la cantidad de Enzima agregada en la mezcla de reacción.

¡Solo resta entonces ponerse manos a la obra y comenzar con las medidas!

### **Diseño de un protocolo experimental para la medida de actividad enzimática - Ejemplo**

Les proponemos ahora, ensayar el diseño de un protocolo para la medida de la actividad enzimática de un extracto de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en UI/ml de extracto. Para efectuar esta medida disponemos de un espectrofotómetro termostatzado con celdas de medida de 1ml y 1 cm de camino óptico que permite monitorear a  $\lambda=420$  nm la aparición de ONP ( $\epsilon_{\text{ONP } 420\text{nm-nitrofenol}} = 4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), se sabe el rango de linealidad del equipo es 0,1 – 1 Absorbancia y se dispone de datos bibliográficos del  $K_m$   $\beta$ -galactosidasa 1,8 mM. Como reactivos se dispone del extracto enzimático, Buffer Z 10X, solución stock de [ONPG]= 18mM.

Debemos armar una mezcla de reacción que nos permita monitorear la [ONP] en el tiempo ya que nuestro objetivo es calcular la actividad de un extracto enzimático, es decir determinar la pendiente de la grafica [ONP] en función del tiempo a tiempos tendiendo a cero. Idealmente querríamos que la mezcla de reacción tenga una concentración de sustrato saturante es decir del orden cien veces el valor de  $K_m$ , en este caso 180mM, de modo de medir  $v_{0\text{max}}$ . Dado que el ONPG presenta una solubilidad límite de 18mM en buffer Z a 37°C, tomaremos por ejemplo medidas de  $v_0$  a una [ONPG]=1,8mM y sabiendo que la enzima sigue un comportamiento Michaeliano, se podrán transformar los valores de  $v_0$  a  $V_{\text{max}}$ . Usaremos una única mezcla de reacción con volumen final de 1ml, la medida de [ONP] se realizará ajustando el espectrofotómetro a  $\lambda=420$  nm y 37°C, se tomarán medidas cada 30 segundos hasta 5 minutos (10 puntos, estipulados arbitrariamente en el diseño del protocolo). La transformación de los valores de Absorbancia a [ONP] se realizará con la ecuación  $\text{Abs} = \epsilon_{\text{ONP } 420\text{nm-nitrofenol}} \cdot b \cdot C$  ya que nos referiremos a la concentración del extracto enzimático en unidades de UI/ml de extracto . La elección del volumen del extracto que agregaremos es arbitraria ya que no conocemos el valor de actividad enzimática, sin embargo es conveniente utilizar volúmenes del 10% del de la mezcla de reacción final.

Definidas estas variables la **mezcla de reacción** quedará constituida según:



ONPG= 100µl  
Buffer Z 10X = 100 µl  
Extracto enzimático= 100 µl  
H<sub>2</sub>O= 700 µl

-----  
Volumen final= 1000 µl

Como mencionamos también debemos preparar dos blancos de medida:

**Blanco de enzima:**

ONPG= 100µl  
Buffer Z 10X = 100 µl  
H<sub>2</sub>O= 800 µl

-----  
Volumen final= 1000 µl

**Blanco de sustrato:**

Extracto enzimático= 100µl  
Buffer Z 10X = 100 µl  
H<sub>2</sub>O= 800 µl

-----  
Volumen final= 1000 µl

Estas dos mezclas se colocan a 37°C y luego de 5 minutos se toma la medida de Absorbancia. Estos valores se restan a los que se obtengan a cada tiempo.

Resta definir los límites de actividad enzimática en los que es útil este protocolo, como hemos mencionado si en el primer tiempo de medida se toma un valor de 1Abs, es decir 1Abs/30 seg o 0,44µmoles de ONP/min en la mezcla de reacción, todas las cantidades de producto acumulado en la mezcla de reacción en los tiempos siguientes no se podrá cuantificar. En el otro extremo, si al medir el último punto a los 5min sólo se alcanza una Abs de 0,1, es decir 0,1Abs/5min o  $4,44 \cdot 10^{-3}$  µmoles de ONP/min en la mezcla de reacción está será la mínima  $v_0$  que se puede medir con el protocolo propuesto.

Límites de velocidades medibles = 0,44 –  $4,44 \cdot 10^{-3}$  µmoles de ONP/min  
con el protocolo propuesto

Para verificar que la medida de velocidad tomada es efectivamente una velocidad inicial, se debe corroborar que luego de transcurridos los 5 minutos de reacción no se haya consumido más del 5% del ONPG presente en la mezcla de reacción o sea 0,09µmoles. En caso de que se supere este límite, deberán tomarse medidas a tiempos menores o reducir la cantidad de enzima en la mezcla de reacción mediante una dilución del extracto enzimático.

## Problemas

### Problema 1

La glucoquinasa cataliza la siguiente reacción:



El curso de reacción se sigue colorimétricamente por el método de Somogyi-Nelson, titulando la glucosa remanente no fosforilada, previa precipitación de la glucosa-6-P como sal de bario. Se ensaya la actividad de una preparación de hexoquinasa, en una mezcla de reacción de 1 ml que contiene 0,4 ml de glucosa 0,01 M; 0,05 mg de enzima;  $\text{Mg}^{++}$ ; buffer pH 7,0 y ATP en exceso.

- Si a los 3 minutos quedan 3,91  $\mu\text{moles}$  de glucosa/ml de mezcla de reacción, calcule la velocidad inicial de la reacción expresada en  $\mu\text{moles}$  de glucosa transformada por minuto.
- Calcule la  $V_{m\acute{a}x}$  sabiendo que  $K_M = 0,8 \cdot 10^{-2}$  M.
- Calcule la cantidad total de glucosa fosforilada en los primeros 6 minutos, cuando a la mezcla de reacción se le agregan 0,6 ml de glucosa 0,01 M y 0,05 mg de enzima.
- La glucosa-1,6-difosfato tiene una acción inhibitoria sobre este sistema enzimático. Esquematice un protocolo para determinar experimentalmente qué tipo de inhibidor es.

## Problema 2

La invertasa cataliza la reacción de hidrólisis de la sacarosa:



Su actividad se mide a 20 °C, en una mezcla de reacción que contiene buffer acético-acetato a pH 4,77, 20 mM. Los productos de reacción se detectan por el método de Somogii-Nelson, el cual detecta ambos monosacáridos. El procedimiento consiste en parar la reacción y desproteinizar con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (para 0,5 ml de mezcla de reacción, 0,5ml de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0,3M). Luego se agrega 0,5 ml de  $\text{ZnSO}_4$  0,3 M (precipita  $\text{BaSO}_4$ ), se lleva a 5 ml finales y se filtra. A 1 ml del filtrado se le adicionan los reactivos de colorimetría (volumen final 10 ml). Los límites del método colorimétrico son 3-30 nmoles glucosa/ml mezcla colorimétrica. El  $K_M$  de la invertasa por la sacarosa es 0,01 M.

Se quiere estudiar si la urea actúa como inhibidor sobre esta reacción enzimática. Se cuenta con los siguientes reactivos:

- Sacarosa 1 M
- Buffer HAc-Ac-, pH 4,77; 0,1 M.
- Urea 8 M.
- Reactivos de colorimetría (Somogii-Nelson).
- $(\text{OH})_2\text{Ba}$  0,3 M y  $\text{ZnSO}_4$  0,3 M.
- Glucosa 0,3 M.

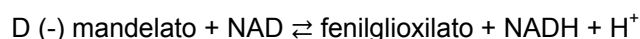
La preparación de invertasa posee una actividad de  $3 \cdot 10^{-3}$  catales/litro.

- a) Diseñe un protocolo para realizar el estudio mencionado. Especifique en el mismo:
- Mezclas de reacción, aclarando volumen de cada reactivo, si es necesario dilución previa de algunos de ellos, y el orden de agregado de los mismos.
  - Procedimiento para la determinación de la actividad, incluyendo tiempos de toma de muestra, volúmenes, tubos que se utilizan y patrones necesarios.
  - Controles a incluir.
- b) ¿Cómo relaciona los resultados que obtiene del experimento? ¿Qué conclusiones puede obtener?
- c) Si ud encuentra que la urea es inhibitoria de la reacción, su experimento ¿le permitió diferenciar entre un inhibidor reversible o uno irreversible? Explique.

### Problema 3

Algunas bacterias y hongos son capaces de crecer utilizando como única fuente de carbono y energía el D (-), L (+) o el DL (±) mandelato. La oxidación del mandelato requiere una actividad enzimática, la mandelato-deshidrogenasa. En el caso de *Rhizodotorula graminis* (levadura) se ha podido aislar una D (-) mandelato deshidrogenasa NAD<sup>+</sup> dependiente.

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



En la caracterización de esta enzima se han realizado diversos experimentos (a concentración de enzima constante), cuyos resultados son los siguientes:

**Tabla 1: Medidas obtenidas con la reacción directa D (-) mandelato + NAD → fenilglioxilato + NADH + H<sup>+</sup>**

pH	$K_M$ (D (-) mandelato) $\mu\text{M}$	$K_M$ (NAD <sup>+</sup> ) $\mu\text{M}$	actividad específica $V_{max}/\text{mg}$ de proteína
5.85	ND	ND	ND
7.00	3050	309	36.8
9.50	500	77.5	86.7

ND: velocidad no detectable

**Tabla 2: Medidas obtenidas con la reacción reversa fenilglioxilato + NADH + H → D (-) mandelato + NAD<sup>+</sup>**

pH	$K_M$ (fenilglioxalato) $\mu\text{M}$	$K_M$ (NADH) $\mu\text{M}$	actividad específica $V_{max}/\text{mg}$ de proteína.
5.85	51.8	38	572
7.00	45.5	36	490
9.50	70.7	26.3	310

**Ensayo enzimático: a. Reacción directa** (oxidación del D (-) mandelato). Volumen de reacción: 1 ml

Buffer: Bicino/NaOH 200 mM pH: 9,5

NAD<sup>+</sup>; D (-) mandelato

Extracto enzimático purificado

**b. Reacción reversa** (reducción de fenilgloxilato)

Volumen de reacción: 1 ml

Buffer: fosfato potásico 200 mM pH: 5,85

NADH; fenilgloxilato

Extracto enzimático purificado

Las reacciones se realizan en cubeta termostatzada a 27°C.

Se lee espectrofotométricamente en forma continua a una longitud de onda: 340 nm

$\epsilon$  NADH:  $6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$

El NAD<sup>+</sup> no absorbe significativamente a 340 nm.

Unidad enzimática: cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en las condiciones de reacción antes descriptas y en concentración de sustrato saturante.

a) Diseñe un protocolo para determinar el  $K_M$  (D (-) mandelato) a pH:9.5. Suponga que la actividad específica del extracto enzimático es de 90 unidades/mg de proteína

b) El L (4-) mandelato es un inhibidor de la reacción directa ¿Cree que el L (+) mandelato es un inhibidor competitivo, no competitivo o acompetitivo? ¿Por qué? Explique cómo haría para verificar su hipótesis (con un esquema claro, pero no con protocolos detallados).

c) La influencia del pH sobre una reacción catalizada enzimáticamente puede deberse al efecto del pH sobre uno o sobre varios parámetro del sistema. Analice los datos de las Tablas 1 y 2, y sugiera cuál o cuáles parámetros de esta reacción serán afectados por la variación del pH.

## Bibliografía

Bisswangner, H. (2008). *Enzyme Kinetics. Principles and Methods* Second Edition. Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co.

Harris, T. K (2009). *Measurement of Enzyme Activity*. *Methods Enzymol.* 463: 57-71.

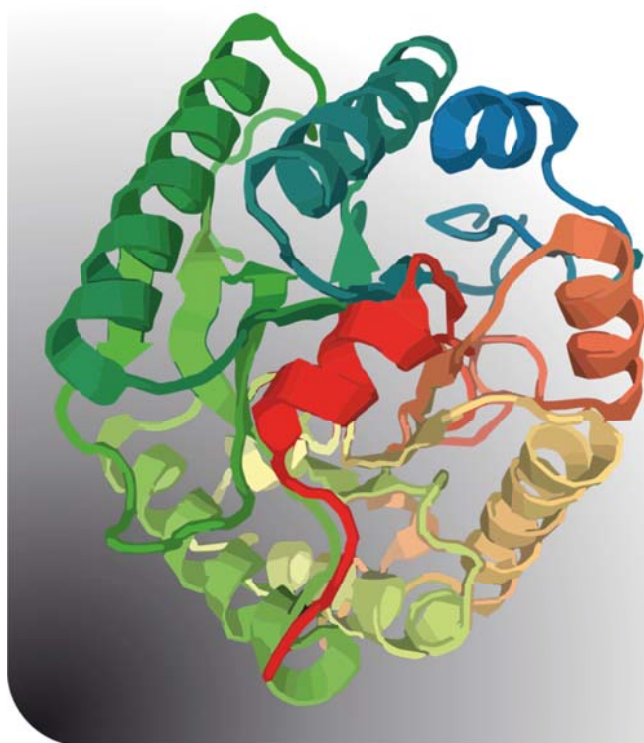
Marangoni, A. (2003). *Enzyme Kinetics A Modern Approach*. New York John Wiley & Sons.

Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley & Sons.

## CAPÍTULO 11

# Búsqueda de nuevas enzimas con actividades de interés (¿por qué? ¿para qué? ¿cómo?): Minería de nuevas actividades naturales. Ingeniería de proteínas hacia la creación de enzimas de diseño

*M. J. Lozano y A. Lagares*



En este capítulo se introducirá a la búsqueda y diseño de nuevas enzimas. Se discutirán metodologías asociadas a la búsqueda de nuevas actividades en ambientes naturales. Se discutirán brevemente las tecnologías asociadas a la modificación de enzimas conocidas hacia el diseño de variantes con cambios en sus actividades catalíticas (modificación de sitios activos y regulatorios, combinación de dominios, shuffling).

La capacidad de las enzimas para catalizar reacciones altamente específicas en condiciones experimentales moderadas y sin la generación de residuos tóxicos (condiciones amigables ecológicamente), las ha vuelto indispensables para una gran cantidad de procesos industriales y de estudios básicos. En la actualidad son principalmente utilizadas en aplicaciones técnicas (industria del papel, industria textil, formulación de detergentes/jabones) o para la catálisis de procesos relacionados a la industria alimentaria (incluida la nutrición animal), en la industria cosmética, en procesos de síntesis química, en la industria farmacéutica, y en actividades de investigación y desarrollo. En el caso de la industria es frecuente, sin embargo, que la utilización de enzimas sea considerada recién cuando se ha agotado el arsenal de reacciones químicas disponibles para un objetivo dado. Esto se debe, en general, a que en muchos casos se desconocen enzimas con las actividades requeridas (Adrio and Demain, 2014; Li et al., 2012). Por tal razón, el descubrimiento y la explotación de nuevos

tipos de enzimas, el mejoramiento de las propiedades de las mismas, y la optimización de los procesos para su producción, se han convertido todos en objetivos principales para la innovación en la industria de manufactura de enzimas. Con estos objetivos, además del descubrimiento de nuevas enzimas, en las últimas décadas se ha: a) incrementado la búsqueda de nuevas enzimas con características superiores a las actualmente disponibles, a partir de diferentes muestras naturales, b) desarrollado en mayor magnitud la mejora mediante ingeniería genética de las enzimas existentes, y c) desarrollado diferentes tecnologías para la optimización de los procesos catalíticos.

En este capítulo exploraremos las diferentes estrategias que han sido utilizadas en los últimos años para la búsqueda de nuevas actividades en diferentes ambientes naturales, de genes codificantes de enzimas con actividades de interés industrial, y finalmente nos dedicaremos a las herramientas de ingeniería genética disponibles para la modificación de enzimas.

## Descubriendo Nuevas Enzimas

Entre las diferentes opciones para el descubrimiento de nuevas actividades enzimáticas o de nuevas enzimas con características más adecuadas para el uso industrial, una de las estrategias más utilizadas ha sido la exploración de la biodiversidad, especialmente de microorganismos. Esta exploración se ha focalizado principalmente en organismos que pueden ser crecidos en condiciones de laboratorio y para los cuales, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación (para una revisión ver Buermans and Dunnen, 2014), existen cada vez más genomas secuenciados (Land et al., 2015). En especial los microorganismos extremófilos, capaces de crecer en condiciones ambientales adversas, han resultado de gran interés, ya que de ellos han podido aislarse enzimas más robustas y con una mayor adaptabilidad a los procesos industriales que se realizan en condiciones muchas veces agresivas para proteínas de eubacterias (Littlechild, 2015).

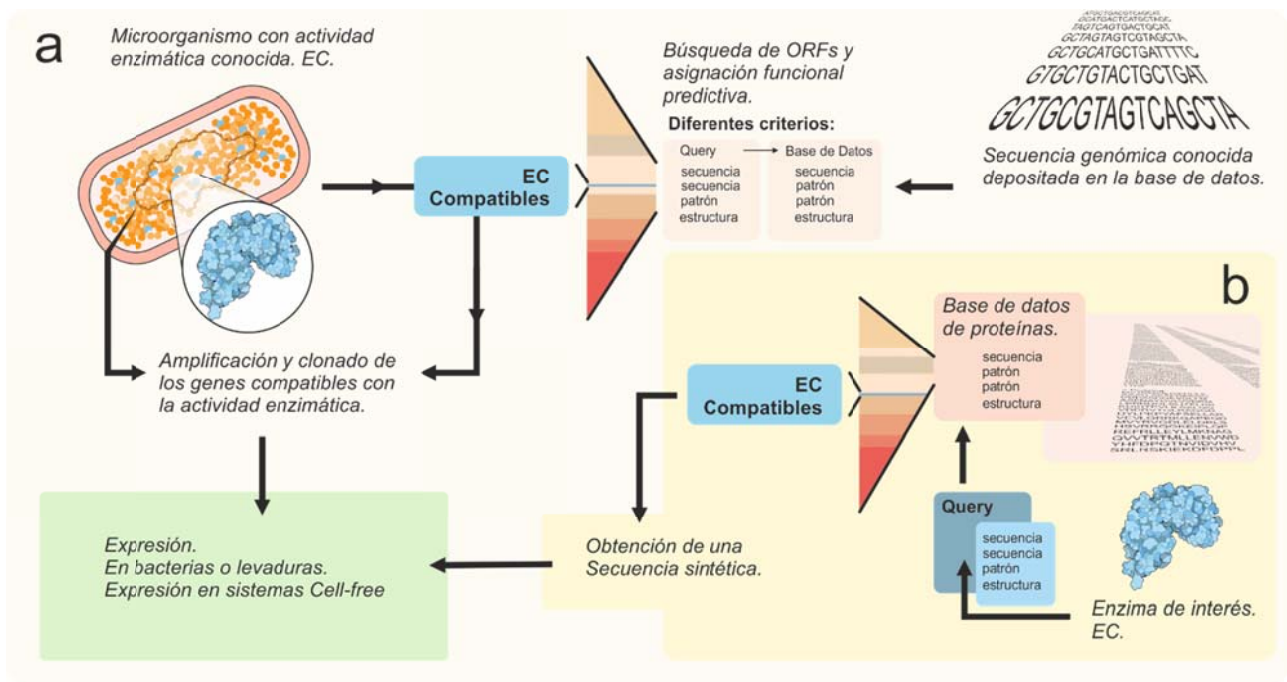
La información actualmente disponible indica que sólo aproximadamente 1% de los microorganismos del ambiente son cultivables en condiciones de laboratorio, representando el 99% restante una fuente potencial muy valiosa para la búsqueda de actividades aun no descubiertas, y que ha comenzado a aprovecharse con más intensidad en la última década mediante aproximaciones metagenómicas y más recientemente metatranscriptómicas. Esto ha contribuido en gran manera al aumento del número de secuencias depositadas en el SRA (*Sequence Read Archive*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) que contiene toda la información cruda generada por metodologías de secuenciación masiva. A continuación, describiremos brevemente las estrategias utilizadas para aprovechar los recursos genómicos disponibles (minería de datos), y para la generación de nuevos datos en busca de funciones, prestando especial atención a la metagenómica y metatranscriptómica.

## Minería de Datos

Al día de hoy, existen genomas completos para más de 50.000 organismos y más de 2 petabases (2.000 terabases) de información genética disponible de forma abierta. Tal reservorio de datos representa una fuente muy valiosa de información para la búsqueda, por medio de herramientas bioinformáticas, de genes que codifiquen proteínas con actividades enzimáticas de interés (mejores que la de enzimas ya conocidas, y nuevas actividades). Existen dos estrategias principales que permiten aprovechar esta información (Luo, 2012).

La primera, está orientada a la búsqueda, en un organismo del cual ya se conoce que posee una actividad de interés (Figura 11.1.a), cuales proteínas son las mejores candidatas a corresponderse con la enzima/s buscada/s (se buscan secuencias/dominios que se conoce que están asociados a las enzimas que se buscan). Una vez identificadas las secuencias codificantes para dichas proteínas es necesario clonarlas en sistemas que permitan su expresión, y finalmente realizar una evaluación funcional (Figura 11.1.a). La expresión es realizada normalmente a partir de microorganismos (procariotas o eucariotas) (Ghaemmaghami et al., 2003; Rosano and Ceccarelli, 2014; van Oers et al., 2015), o mediante sistemas de expresión *in vitro* (*cell-free*) (Katzen et al., 2005). La búsqueda de proteínas homólogas puede realizarse mediante un número creciente de aplicaciones bioinformáticas. Las mismas se basan en la aplicación de diferentes criterios de búsqueda que van desde la comparación de secuencias de ADN o proteína en busca de similitudes, como ya hemos dicho, hasta la búsqueda de patrones de estructura secundaria asociadas a las enzimas de interés. Incluso, si está disponible la estructura tridimensional (o se puede modelar) existen algoritmos que permiten realizar alineamientos totales o locales (de dominios) de las estructuras tridimensionales, permitiendo búsquedas en homólogos más distantes por similitud estructural de dominios relacionados al mecanismo catalítico de la enzima, a la unión de sustratos a la misma, etc, (Lok, 2015; Luo, 2012).

El segundo método consiste en buscar en todas las secuencias depositadas en la base de datos aquellas con similitud de secuencia (genes/proteínas) a enzimas de actividad conocida utilizadas como punto de partida (Figura 11.1.b). En este caso, el clonado del gen codificante de la enzima de interés podrá realizarse a partir del gen sintetizado artificialmente (*gene synthesis*) (Kosuri and Church, 2014), lo cual permite adicionalmente introducir modificaciones como optimizar los codones presentes en el gen de interés para que correspondan a los más frecuentemente usados por la célula huésped. Por esta metodología se han podido identificar muchas enzimas de microorganismos extremófilos (en general termófilos e hipertermófilos) que presentan grandes ventajas para su implementación industrial.



**Fig 11.1.** Minería clásica de datos para la búsqueda de actividades de interés en organismos que las expresan, o en la base de datos general no redundante. El número EC (*Enzyme Commission number*, EC number) es un esquema numérico de clasificación enzimática según el tipo de reacción química que catalizan.

## Metagenómica y Metatranscriptómica

Como hemos mencionado anteriormente, estimaciones actuales indican que 85-99 % de bacterias y arqueas del ambiente no pueden ser al día de hoy propagadas en el laboratorio, lo que ha restringido severamente el conocimiento de la vida microbiana, e indirectamente el descubrimiento de nuevas enzimas. Con el objetivo de explorar esta “caja negra” que representa la mayoría de la biodiversidad bacteriana, surgió la metagenómica como una herramienta que permite acceder a la genómica de comunidades complejas sin la necesidad de crecer los microorganismos. **La metagenómica puede definirse como el análisis funcional y de secuencia de ADN del colectivo de genomas microbianos presentes en una muestra ambiental** (para revisiones mirar Riesenfeld et al., 2004; Tringe and Rubin, 2005; Tringe et al., 2005). Existen dos aproximaciones experimentales para la búsqueda de nuevas enzimas mediante metagenómica. La primera, la metodología de secuenciación ambiental por *shotgun* (ESS, *environmental shotgun sequencing*) (Eisen, 2007), comenzó a utilizarse previo al auge de las tecnologías de secuenciación masiva, y se basa principalmente en la construcción de **bibliotecas** a partir del ADN aislado de muestras ambientales. Las más recientes, posibles gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación en los últimos 10 años, están basadas en la **secuenciación directa** del ADN/cADN (ARN) aislado de muestras ambientales.



## Bibliotecas Metagenómicas

La idea de analizar la diversidad microbiana en base a la secuenciación de moléculas de ADN / cADN (ARN)(ARN 16S / 18S en los comienzos) de muestras ambientales surgió en los años 80. Estos estudios revelaron la gran cantidad de especies microbianas incapaces de ser cultivadas en el laboratorio. Recién en el año 2002 (Breitbart et al., 2002) se realizó el primer estudio orientado a la búsqueda de secuencias codificantes obtenidas a partir de muestras de agua marina enriquecidas en virus por la metodología de secuenciación ambiental por *shotgun* (ESS, *environmental shotgun sequencing*). En el año 2003, utilizando la metodología ESS Venter et al. (2004) tomaron muestras del Mar de Sargasso encontrando más de 1 millón de genes, de los cuales cientos de miles codificaron para enzimas. Un esquema de esta metodología se muestra en la Figura 11.2.a.

La metodología ESS implica la creación de bibliotecas a partir de la clonación del ADN aislado de la muestra de interés. Una biblioteca es una colección de clones bacterianos<sup>5</sup>, en donde cada clon contiene un vector que posee un fragmento de ADN independiente (es decir en la mayoría de los casos será diferente, pero puede haber clones con el mismo fragmento clonado en un evento independiente). Para la creación de una biblioteca metagenómica, el ADN aislado de la muestra de interés es fragmentado, lo que puede lograrse mediante diferentes métodos (normalmente mediante la digestión con endonucleasas de restricción) y seleccionado por tamaño para su posterior clonado en vectores de diferentes características (para clonado de fragmentos de ADN de diferentes tamaños, que presenten alto o bajo número de copias por célula, de expresión, etc) según el objetivo del estudio metagenómico en cuestión.

Una vez creada la biblioteca, es necesario realizar un tamizado (*screening*), es decir una búsqueda analizando el total de los clones con un objetivo particular, cómo encontrar aquellos clones que contengan secuencias de ADN homólogas a la secuencia codificante de una enzima de interés, o bien, buscar directamente la función de dicha enzima (por ejemplo, si se dispone de protocolos rápidos y específicos para medir su actividad) (Li et al., 2012). En el primero de los casos, el *tamizado* puede realizarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de cebadores degenerados que hibridan específicamente con una clase o familia de enzimas, o mediante metodologías basadas en hibridación con sondas específicas (*colony blot*). En el segundo de los casos, el objetivo es detectar directamente enzimas funcionales dentro de la biblioteca. Este objetivo puede lograrse de diferentes maneras, pero posee fuertes limitaciones, principalmente, el requisito de un huésped en el cual las proteínas puedan expresarse y ser funcionales. Adicionalmente existen fragmentos que son imposibles de clonar por que resultan tóxicos. El huésped más utilizado es *Escherichia coli*, aunque hoy en día existen diversidad de huéspedes disponibles.

---

<sup>5</sup> Actualmente también se denomina biblioteca a la colección de fragmentos de ADN a secuenciar por tecnologías de secuenciación masiva.

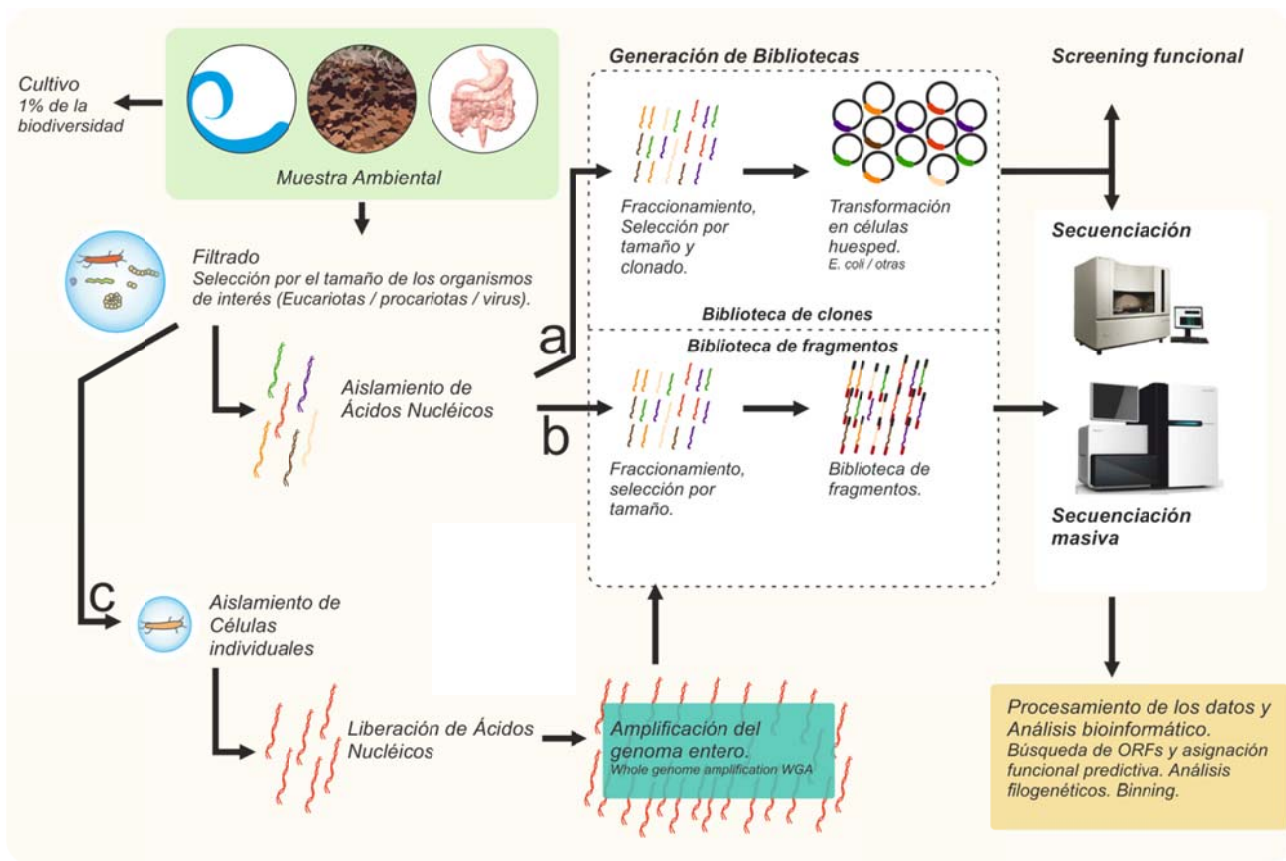
## Secuenciación Directa y Secuenciación de una Sola Célula (*single cell sequencing*)

Con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación se facilitó de gran manera la secuenciación de bibliotecas metagenómicas y se hizo posible el secuenciamiento directo de ADN y cADN ARN (metatranscriptoma) aislado de muestras ambientales.

El esquema de trabajo (Figura 11.2.b-c) en este caso implica el aislamiento del ADN (o ARN, en el caso de la metatranscriptómica) de la muestra de interés, la preparación de bibliotecas de fragmentos (usualmente utilizando reactivos específicos según la plataforma de secuenciación), la secuenciación y finalmente el procesamiento de los datos obtenidos (Wooley et al., 2010).

En una primera etapa es necesario procesar con herramientas bioinformáticas las lecturas de ADN obtenidas (millones / cientos de millones según la plataforma utilizada)(Reuter et al., 2015) usualmente de un tamaño de entre 50 y 500 pares de bases, para obtener secuencias contiguas de mayor tamaño (denominadas contigos) a partir de las cuales puede realizarse la búsqueda de genes. Este proceso, llamado **ensamblado**, es realizado mediante algoritmos eulerianos que son los encargados de solapar las regiones idénticas entre todas las secuencias cortas de ADN para generar cóntigos de mayor tamaño, aunque raramente pueden ensamblarse genomas enteros debido generalmente a la existencia de secuencias repetidas. A continuación debe realizarse la predicción de marcos abiertos de lectura (*open reading frames - ORFs*) y la asignación de una probable función a los mismos. Una de las estrategias más utilizadas con este objetivo (normalmente automatizadas mediante programas bioinformáticos para anotación de genomas o metagenomas) es la asignación funcional basada en la identificación de genes homólogos mediante alineamientos de la secuencia incógnita (*query*) contra una base de datos conocida. Existen también, como ya se discutió anteriormente, opciones basadas en alineamientos estructurales de proteínas.

Además de identificar nuevas secuencias codificantes de enzimas de interés pueden realizarse análisis de secuencias de rADN 16S/18S (o de otros genes marcadores de diversidad) con el objetivo de conocer la biodiversidad presente en la muestra ambiental, y finalmente el *binning* (enlatado) por medio del cual se pueden agrupar genes provenientes del mismo genoma. Esto es de mucho interés para el estudio de las posibles rutas metabólicas presentes en cada organismo.



**Fig. 11.2.** a. Aproximaciones metagenómicas al estudio de comunidades de microorganismos ambientales y de las funciones asociadas a ellos. Esquema de las etapas implicadas en la metodología ESS (Secuenciación ambiental por *shotgun*). b. Esquema general de las etapas implicadas en el análisis metagenómicos por secuenciación directa. c. Esquema del procedimiento para la secuenciación de una sola célula.

El estudio metagenómico realizado a partir del ADN proveniente de mezclas de microorganismos posee algunos inconvenientes que no siempre son solucionados durante el procesamiento de las secuencias. Uno de los principales problemas es la posibilidad de generación de secuencias quiméricas a partir de fragmentos de ADN cuya secuencia es lo suficientemente similar para que puedan solaparse, pero que corresponden a organismos distintos. En la actualidad, es posible solucionar en muchos casos este problema mediante distintas estrategias. Una de ellas es mejorar el largo de las lecturas individuales de los equipos de secuenciamiento de modo de tener mayor certeza en el ensamblado de porciones de secuencias que correspondan a un mismo organismo y sean contiguas. Otra alternativa, hoy aun poco usada por su complejidad técnica (necesidad de reactivos de altísima calidad libres de ADN) es la secuenciación de células únicas (Figura 11.2.c). Esta tecnología implica la separación de células individuales mediante diferentes metodologías (separación de células activadas por fluorescencia, FACS), microscopía de disección laser y otras técnicas de micromanipulación, para una revisión ver Wang and Navin, 2015), la amplificación del genoma de una célula individual, y su secuenciación mediante plataformas de última generación.

## Mejorando las Enzimas Conocidas.

Como fue mencionado con anterioridad, una de las principales debilidades de los procesos biocatalíticos, es la inherente inestabilidad en el largo plazo de las enzimas. Durante la primer ola de biocatálisis, que comenzó hace más de un siglo, este problema pudo solucionarse, en algunos casos, mediante la **inmovilización de las enzimas**, lo que a su vez facilitó su reutilización. Entre los años 80s y 90s, surgió una segunda serie importante de cambios al incorporar técnicas de **ingeniería de proteínas** principalmente basadas en estudios estructurales (diseño racional), con lo que se logró extender el rango de sustratos de algunas enzimas y ampliar de esta forma el campo de aplicación a la industria farmacéutica y a la química fina. A partir de los años 90, comenzaron a usarse una serie de nuevas estrategias de biocatálisis, basadas en lo que hoy se conoce como **evolución dirigida**. La evolución dirigida es una versión *in vitro* y acelerada que emula algunos aspectos de la concepción darwinista de la evolución, en la que se realizan ciclos de mutaciones al azar en la secuencia codificante de una determinada proteína, luego de los cuales, mediante diferentes estrategias de tamizado funcional se seleccionan aquellas variantes con mejores propiedades catalíticas y de estabilidad (Bornscheuer et al., 2012). Estos métodos, de la mano de la capacidad de sintetizar genes y operones han producido en los últimos años un gran avance en las posibilidades de diseño de nuevos procesos de biocatálisis.

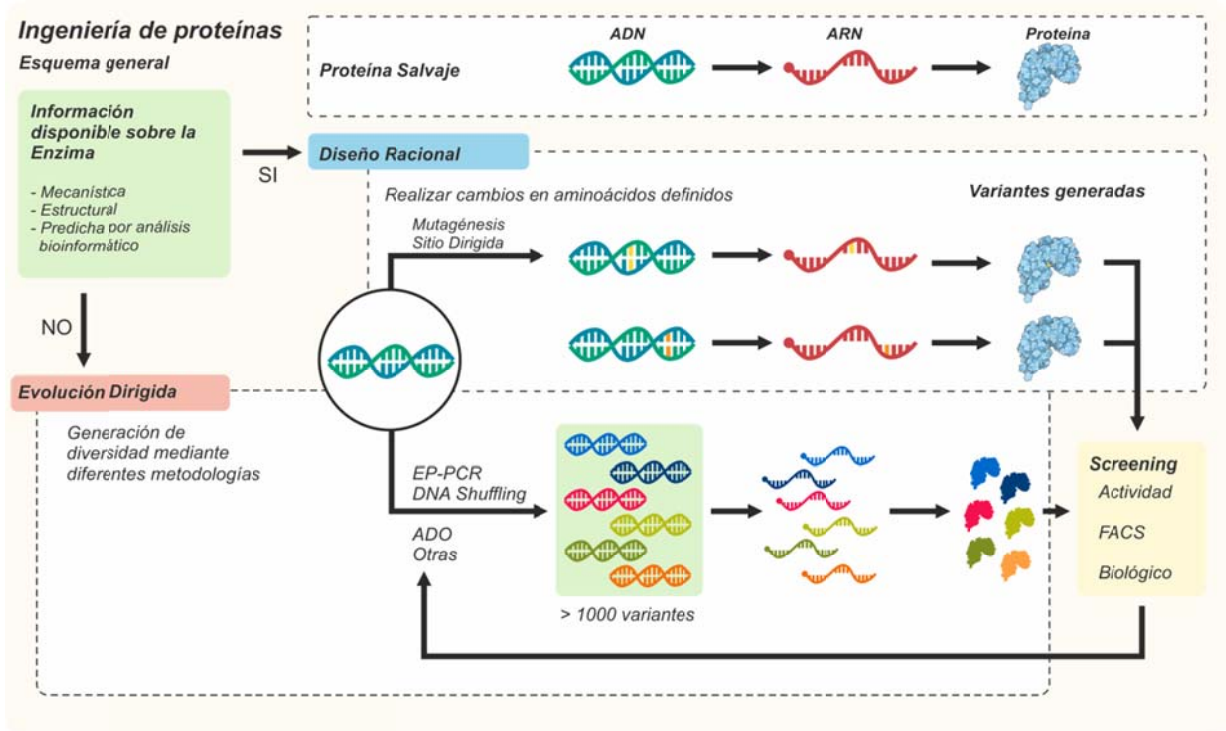


Fig. 11.3. Esquema general de las estrategias utilizadas para el mejoramiento de enzimas.

La ingeniería de proteínas involucra, normalmente, tres pasos que pueden realizarse mediante diferentes estrategias experimentales: 1. elegir los cambios que se desea realizar, 2. realizar dichos cambios, y 3. evaluar el efecto de los mismos, lo que en general implica el *tamizado* de una colección de proteínas modificadas (Figura 11.3). El grado de laboriosidad del tamizado en busca de moléculas

con actividades mejoradas es variable, y cuando el mismo tiene capacidad de evaluar miles de variantes de modo eficiente se puede eliminar por completo el diseño racional (evolución dirigida).

En los párrafos que siguen describiremos algunos de los métodos más utilizados en experimentos de diseño racional de variantes moleculares, evolución dirigida, y abordaremos brevemente los conceptos principales de ingeniería metabólica.

## **Diseño Racional**

El diseño racional de proteínas implica la realización de mutaciones sitio dirigidas que producen un cambio de codón en la secuencia de ADN codificante de la macromolécula (en algunos casos también puede ser de interés la inserción o delección de codones) y, por lo tanto, requiere un conocimiento detallado de la roteína que se desea modificar. Con la creciente información presente en las diferentes bases de datos, hoy en día podemos obtener mucha de esta información con relativa facilidad. Los objetivos del diseño racional de enzimas han sido principalmente alterar la especificidad y estero selectividad hacia diferentes sustratos, modificar los sitios activos, y aumentar la estabilidad térmica.

### **¿Dónde realizar las Mutaciones?**

Los estudios estructurales de enzimas aisladas de organismos termófilos (capaces de crecer a temperaturas altas y extremas) ha evidenciado que una característica común a estas enzimas es que poseen una estructura más rígida. Esta información y el conocimiento creciente de la estructura tridimensional de proteínas y de las fuerzas e interacciones que las estabilizan (ver Capítulo 2 de este libro), permite generar modelos computacionales en los que se puede evaluar el efecto estabilizador de diferentes modificaciones tendientes a introducir interacciones estabilizantes como puentes disulfuro, puentes salinos, y generar también la estabilización de *loops* (mayor proporción de prolina). Otros análisis permiten evaluar la flexibilidad (B-factor) de las cadenas polipeptídicas y focalizar la mutagénesis en las mismas (Kazlauskas and Bornscheuer, 2009). Por otro lado, los estudios evolutivos concluyen que en muchos casos los aminoácidos más conservados están relacionados a una mayor estabilidad.

Como observación general cabe destacar finalmente que diferentes estudios señalan que mientras las mutaciones asociadas a efectos de mayor selectividad por diferentes sustratos e isómeros ópticos suelen encontrarse cercanas al sitio activo, las que se asocian a generar una mayor actividad enzimática suelen estar más dispersas en toda la cadena polipeptídica.

### **¿Cómo Introducir las Mutaciones Deseadas?**

Las estrategias para introducir mutaciones puntuales dirigidas (*site directed mutagénesis*, SDM) más utilizadas actualmente están basadas en métodos similares al de QuikChange™ desarrollado por Stratagene (existen varias posibilidades alternativas dirigidas a cambiar un codón específico por otro). Este sistema QuikChange™ en particular (Figura 11.4.a, parte superior) utiliza un par de

cebadores para introducir una (o más) mutaciones puntuales en una proteína cuyo gen se encuentra clonado en un plásmido. El ADN plasmídico que codifica para la proteína salvaje (*parental*), se encuentra modificado por metilación, y es utilizado como molde para realizar una PCR utilizando los cebadores diseñados para introducir la mutación deseada. A continuación de la PCR se utiliza la endonucleasa *DpnI* capaz de degradar ADN modificado por metilación, por lo que el plásmido parental será degradado, quedando solo el portador de la proteína mutante.

Una mejora en el simple reemplazo de un codon por otro, es la utilización de metodologías como la mutagenesis de saturación (*site saturation mutagenesis*, SST, Figura 11.4.a, parte inferior) (Kazlauskas and Bornscheuer, 2009) que permite reemplazar de una misma vez un aminoácido por los 19 restantes.

En algunos casos solo es posible ver efectos modificando más de un aminoácido, aunque aumenta exponencialmente la dificultad del *tamizado*.

Es interesante que en algunos casos en los que el reemplazo sitio dirigido de un codón por otro no ha dado resultados, se han podido incorporar aminoácidos no naturales, con características fisicoquímicas diferentes, permitiendo un aumento en la actividad enzimática. Para ello, se ha reemplazado el codón de interés por un codón stop (UAG), y se ha utilizado un tRNA supresor aminoacilado con el aminoácido no natural (Mabbitt and Jackson, 2015).

## **Evolución Dirigida**

El termino evolución dirigida agrupa una serie de metodologías vinculadas al modelo evolutivo darwinista (cambio-selección→cambio-selecciónvin→.....). La estrategia implica la generación de mutantes y el *tamizado* y selección de los que presenten las características deseadas en uno o en más ciclos de trabajo. Se han utilizado diferentes estrategias con este objetivo, apuntadas en general a reemplazar uno o muchos aminoácidos mediante metodologías de mutagénesis o recombinación (para una revisión completa verPacker and Liu, 2015). Las técnicas más importantes, así como las estrategias para el *tamizado* se presentan en las secciones siguientes.

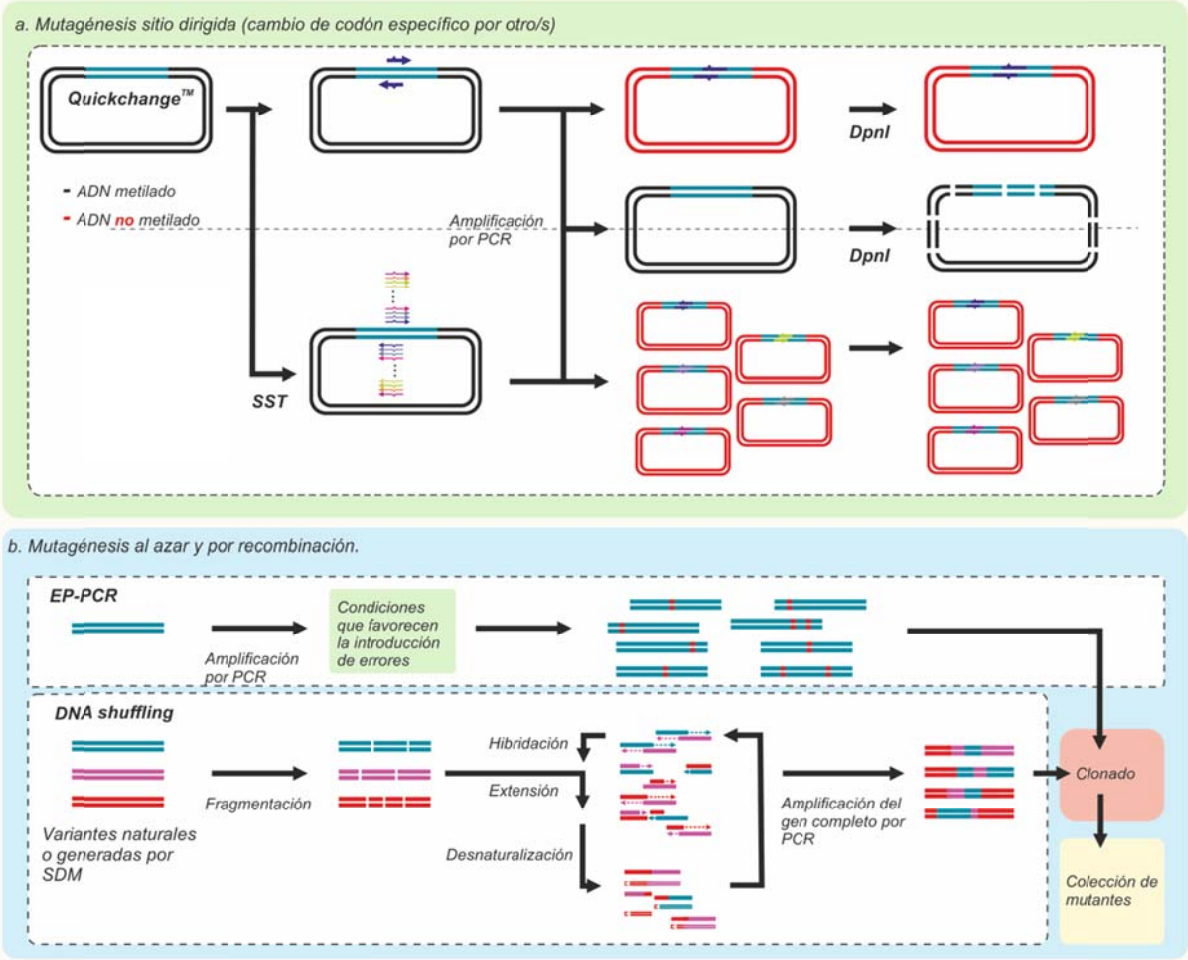
### **¿Cómo Generar las Bibliotecas de Mutantes?**

Uno de los métodos más utilizados es la generación de mutantes puntuales al azar. Aunque tradicionalmente las mutagénesis al azar se realizaron mediante métodos químicos, esta metodología, sin embargo, no es muy utilizada en evolución dirigida ya que presenta sesgos en el espectro de mutaciones que puede generar. La alternativa más utilizada saca provecho del error de copia de las ADN polimerasas, y de la posibilidad de amplificarlo mediante modificaciones en las condiciones de la reacción (*error-prone* PCR, Figura 11.4.b, parte superior). En el caso de las mutaciones puntuales, existen varias limitaciones, principalmente el hecho de que las mutaciones beneficiosas ocurren con muy baja frecuencia por lo que es muy difícil lograr grandes mejoras. Adicionalmente, es necesario generar una gran diversidad de mutantes, y realizar el *tamizado* funcional de los mismos. Para el caso de una proteína de 200 aminoácidos, existen 7.183.900

combinaciones para 2 sustituciones al azar, y para el caso de 3 sustituciones son 9.008.610.600 posibilidades (Bornscheuer et al., 2012). Normalmente, el proceso de evolución dirigida por mutagénesis puntual se realiza de forma iterativa, realizando mutaciones por un método determinado, seleccionando las mejores variantes (usualmente son mayoritarias las mutaciones deletereas), y volviendo a realizar el proceso.

Una metodología para la generación de variantes con una concepción diferente (generar variantes “de a parches”) es la metodología de mezclado de ADN (*DNA shuffling*, Figura 11.4.b, parte inferior). En esta metodología, la secuencia codificante para una enzima (modalidad de un solo gen) es fragmentada al azar (usualmente con DNAsa I) y reensamblada mediante PCR (controlando el nivel de error) en secuencias quiméricas (Stemmer, 1994). Este proceso se repite iterativamente, incluyendo en algunas etapas secuencias salvajes para eliminar mutaciones innecesarias. Mediante esta metodología es posible lograr una evolución rápida y con grandes cambios de actividad. Existen variantes que aumentan la potencia de esta metodología, como son la metodología de *gene family shuffling* (en la que se incorporan secuencias homólogas de diferentes orígenes aumentando de esta forma la diversidad inicial) o *synthetic shuffling* (en donde se sintetizan oligonucleótidos degenerados que incorporan toda la diversidad deseada).

**Estrategias de mutagénesis más utilizadas.**



**Fig. 11.4.** Estrategias generales de mutagénesis. Mutagénesis sitio dirigida (parte a., SDM) y mutagénesis con evolución dirigida (parte b., EP-PCR y *DNA Shuffling*)

Estas metodologías pueden ser combinadas con análisis estadísticos multivariados (ProSAR, Fox et al., 2007), en los que se asigna un peso a cada mutación, para decidir si una mutación debería pasar o no a la próxima iteración para generar nuevas variantes por *DNA shuffling*. De esta forma se ha logrado mejorar hasta 4.000 veces la actividad enzimática.

alternativa al mezclado *in vitro* de secuencias de ADN, la metodología de recombinación de heteroduplex (Volkov et al., 1999) permite la generación de diversidad por recombinación *in vivo* de diferentes secuencias naturales (o mutantes) utilizados como punto de partida.

Además de las metodologías anteriores, que son las que han sido más utilizadas, existe una diversidad creciente de estrategias para obtener mejores enzimas por evolución dirigida que ofrecen mejoras en la tasa de mutaciones [*Random Chimeragenesis on Transient Templates*, *Assembly of Designed Oligonucleotides* (ADO), *mutagenic and unidirectional reassembly* (MURA), *Nucleotide exchange and excision technology* (NExT), *staggered extension process* (StEP), *Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes* (ITCHY), *Non-homologous random recombination* (NRR) y otros (Packer and Liu, 2015)]. En particular las metodologías ITCHY y NRR, basadas en recombinación no homóloga, presentan la ventaja de generar variantes que no existen en la naturaleza, pero al costo de generar proteínas no funcionales.

Finalmente, la combinación de estrategias de diseño racional durante las diferentes etapas iterativas del proceso de evolución dirigida, puede aumentar mucho las posibilidades de conseguir variantes proteicas con mejores características de actividad y estabilidad.

## **Estrategias de Tamizado**

Como se describió anteriormente, todas las metodologías utilizadas en la generación de bibliotecas de mutantes para el mejoramiento de la actividad enzimática terminan en un proceso de *tamizado* funcional. Debido a la magnitud del espacio mutacional, el éxito depende en gran forma en la capacidad de realizar el *tamizado* sobre miles, incluso millones de variantes. Existen dos aproximaciones principales al *tamizado* de bibliotecas enzimáticas, y ambas requieren de la expresión de las enzimas en un huésped determinado, usualmente *E. coli*. La diferencia entre una y otra es el requisito de tener o no las enzimas separadas espacialmente (colonias aisladas / cultivos) (Packer and Liu, 2015) (Figura 11.5.a). La separación de clones en cultivos aislados tiene la ventaja principal de que casi todas las actividades enzimáticas pueden ser determinadas en ensayos en placa, ya sea mediante la determinación de cambios en la concentración de productos coloreados / fluorescentes, o mediante resonancia magnética nuclear, HPLC, cromatografía gaseosa o espectrometría de masas. La principal limitante es la infraestructura requerida, y que solo puede realizarse el *tamizado* de un espacio mutacional reducido (usualmente no más de 10.000 variantes por ronda). Este tipo de *screening* es normalmente más utilizado en diseño racional. En el caso de



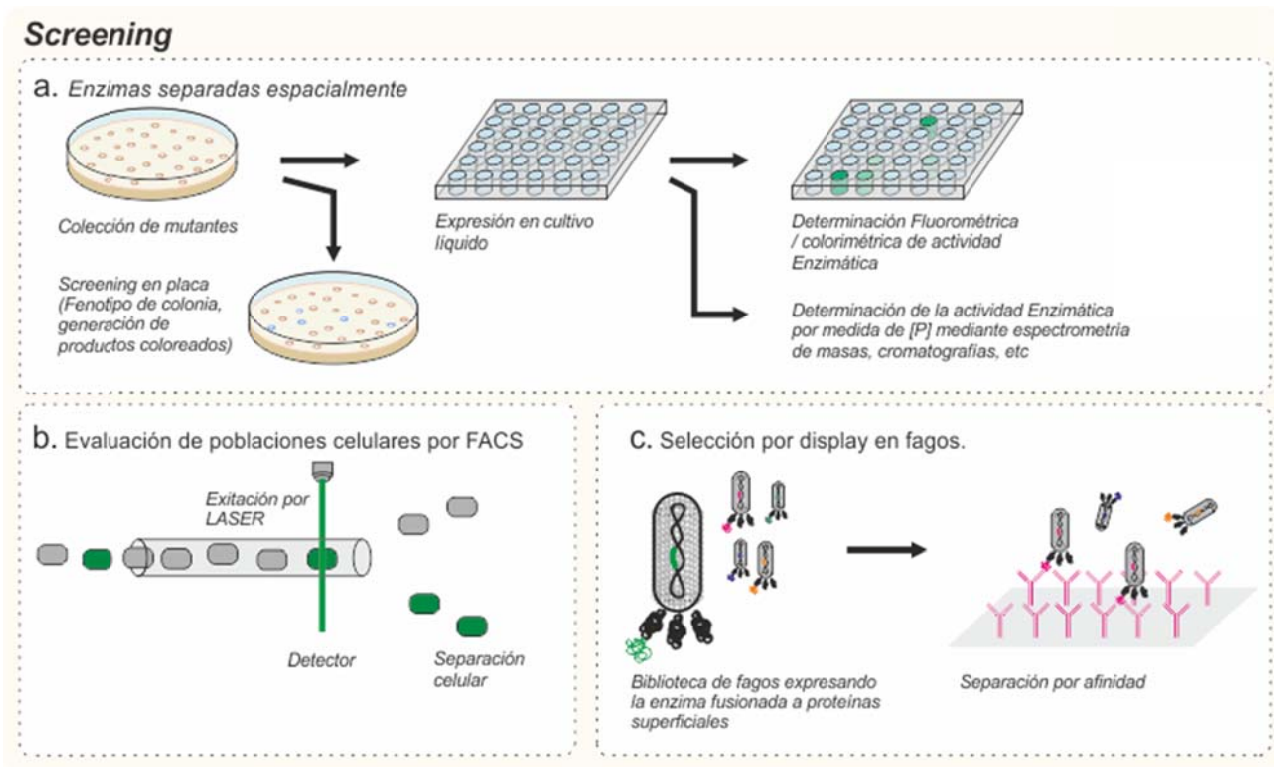
fenotipos observados directamente (fluorescencia, morfología de colonias, etc) el *tamizado* de un mayor número de variantes es más sencillo.

Sin embargo, la exploración de un mayor espacio mutacional requiere de metodologías de alto rendimiento que evalúan directamente poblaciones celulares y no requieren del aislamiento de clones individuales. Uno de los métodos más utilizados es la FACS o separación celular activada por fluorescencia (*Fluorescence-activated cell sorting*, Figura 11.5.b) que permite realizar el *screening* de más de 100 millones de variantes en 24 horas, separando las células que poseen las variantes con mayor actividad. La FACS se basa en la generación de productos fluorescentes no difusibles, de modo que las células que expresan una variante con mayor actividad serán más fluorescentes en un menor tiempo, posibilitando su selección y separación. Adicionalmente, FACS puede ser utilizado para el *screening* de proteínas expresadas *in vitro*. Para ello, han podido generarse pequeños compartimentos (en emulsiones agua/aceite/agua), cada uno de los cuales posee un único gen que es transcrito y traducido en la variante enzimática correspondiente. La micro emulsión también posee un sustrato que por catálisis enzimática genera un producto fluorescente, el cuál al acumularse permite la separación de las gotitas conteniendo las variantes enzimáticas con mayor actividad (Bernath et al., 2004).

En algunos casos es de interés seleccionar las proteínas modificadas en base a su afinidad de unión al sustrato. En ese caso, las metodologías de expresión de proteínas en la superficie de bacteriofagos (*phage display*, Figura 11.5.c) o células eucariotas (*yeast surface display*) ha sido de gran utilidad. Para ello, las proteínas son fusionadas a proteínas expresadas en la superficie de la cubierta de fagos o en la membrana celular respectivamente, y sometidas a una separación por afinidad de unión a un sustrato inmovilizado. Estas metodologías permiten aislar los fagos o células que contienen el gen codificante de las variantes enzimáticas que presentaron una mayor afinidad. Con una lógica similar, se han utilizado estrategias en las que las proteínas son unidas a los ribosomas (Ribosome display) o RNA mensajeros (mRNA display).

Finalmente, en algunos casos es posible acoplar la expresión de enzimas con mayor actividad a la supervivencia de una célula huésped. Principalmente se ha utilizado esta estrategia para el *tamizado* de proteínas implicadas (o que puedan vincularse indirectamente) en la resistencia a antibióticos, o para las cuales se pueden generar mutantes auxotróficos en el huésped. La selección se realiza entonces en base a la mejor capacidad de crecimiento en las células que expresan la enzima con mayor actividad.

Debe remarcarse que en todo proceso de tamizado el diseño cuidadoso del criterio y tecnologías de selección resulta una variable central para hacer aplicable (en términos prácticos) la búsqueda de cualquier nueva actividad. El diseño inteligente de la etapa de tamizado es por otra parte esencial para disminuir (muchas veces en órdenes de magnitud) los tiempos requeridos para la identificación de las variantes moleculares buscadas.



**Fig. 11.5.** Esquema general de las estrategias utilizadas para el *tamizado* de clones que expresen enzimas con actividades de interés.

## Bibliografía

- Adrio, J. Demain, A. (2014). *Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes*. Biomolecules 4: 117–139.
- Bernath, K. Hai, M. Mastrobattista, E. Griffiths, A.D. Magdassi, S. Tawfik, D.S. (2004) *In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting*. Anal. Biochem. 325: 151–157.
- Bornscheuer, U.T. Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J. Lutz, S. Moore, J.C., Robins, K. (2012) *Engineering the third wave of biocatalysis*. Nature 485: 185–194.
- Breitbart, M. Salamon, P. Andresen, B. Mahaffy, J.M. Segall, A.M. Mead, D. Azam, F., Rohwer, F. (2002) *Genomic analysis of uncultured marine viral communities*. Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 14250-14255.
- Buermans, H.P.J. Dunnen, J.T. Den, A.C. (2014) *Next generation sequencing technology: Advances and applications*. BBA - Mol. Basis Dis. 1842: 1932–1941.
- Eisen, J.A. (2007). *Environmental Shotgun Sequencing: Its Potential and Challenges for Studying the Hidden World of Microbes*. PLoS Biol. 5. e82.
- Fox, R.J. Davis, S.C., Mundorff, E.C. Newman, L.M. Gavriloic, V. Ma, S.K. Chung, L.M. Ching, C. Tam, S. Muley, S. Grate, J. Gruber, J. Whitman, J.C. Sheldon, R.A. Huisman, G.W. (2007). *Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution*. Nat. Biotechnol. 25: 338–344.

- Ghaemmaghami, S. Huh, W.-K. Bower, K. Howson, R.W. Belle, A. Dephoure, N. O'Shea, E.K. Weissman, J.S. (2003). *Global analysis of protein expression in yeast*. *Nature* 425: 737–741.
- Katzen, F. Chang, G. Kudlicki, W. (2005). *The past, present and future of cell-free protein synthesis*. *Trends Biotechnol.* 23: 150–156.
- Kazlauskas, R.J. Bornscheuer, U.T. (2009). *Finding better protein engineering strategies*. *Nat. Chem. Biol.* 5: 526–529.
- Kosuri, S., Church, G.M. (2014) *Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications*. *Nat Methods* 11: 499–507.
- Land, M. Hauser, L. Jun, S.-R., Nookaew, I. Leuze, M.R. Ahn, T.-H. Karpinets, T. Lund, O. Kora, G. Wassenaar, T. Poudel, S. Ussery, D.W. (2015) *Insights from 20 years of bacterial genome sequencing*. *Funct. Integr. Genomics* 15: 141–161.
- Li, S. Yang, X. Yang, S. Zhu, M. Wang, X. (2012) *Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering* *Comput Struct Biotechnol J.* 2:e201209017
- Littlechild, J.A. (2015) *Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3: 1–9.
- Lok, B.Y.C. (2015) *Mining the Dark*. *Nature* 522: 270–273.
- Luo, X. (2012) *Genomic Data Mining: An Efficient Way to Find New and Better Enzymes*. *Enzym. Eng.* 01: 1–4.
- Mabbitt, P. Jackson, C. (2015) *A Protein Engineering Toolkit for Synthetic Biology*. *Showcase on Research*: 46: 13–16.
- Packer, M.S. Liu, D.R. (2015) *Methods for the directed evolution of proteins*. *Nat. Rev. Genet.* 16: 379–394.
- Reuter, J.A. Spacek, D. V. Snyder, M.P. (2015) *High-Throughput Sequencing Technologies*. *Mol. Cell* 58: 586–597.
- Riesenfeld, C.S. Schloss, P.D. Handelsman, J. (2004) *Metagenomics: genomic analysis of microbial communities*. *Annu Rev Genet* 38: 525–552.
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E. A. (2014) *Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges*. *Front. Microbiol.* 5: 1–17.
- Stemmer, W.P. (1994) *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. *Nature*. 370:389-391.
- Tringe, S.G., Rubin, E.M. (2005) *Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples*. *Nat. Rev. Genet.* 6: 805–14.
- Tringe, S.G. Von Mering, C. Kobayashi, A. Salamov, A. a. Chen, K. Chang, H.W. Podar, M. Short, J.M., Mathur, E.J. Detter, J.C. Bork, P. Hugenholtz, P. Rubin, E.M. (2005) *Comparative metagenomics of microbial communities*. *Science* 308: 554–557.
- Van Oers, M.M. Pijlman, G.P. Vlak, J.M. (2015) *Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology*. *J. Gen. Virol.* 96: 6–23.
- Venter, J.C. Remington, K. Heidelberg, J.F. Halpern, A.L. Rusch, D. Eisen, J.A. Wu, D. Paulsen, I. Nelson, K.E. Nelson, W. Fouts, D.E. Levy, S. Knap, A.H. Lomas, M.W. Nealson, K. White, O. Peterson, J. Hoffman, J. Parsons, R. Baden-Tillson, H. Pfannkoch, C. Rogers,

- Y.H. Smith, H.O. (2004) *Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea*. Science 304:66-74.
- Volkov, a a, Shao, Z., Arnold, F.H. (1999) *Recombination and chimeragenesis by in vitro heteroduplex formation and in vivo repair*. Nucleic Acids Res. 27: e18.
- Wang, Y. Navin, N.E. (2015) *Advances and Applications of Single-Cell Sequencing Technologies*. Mol. Cell 58: 598–609.
- Wooley, J.C. Godzik, A. Friedberg, I. (2010) *A primer on metagenomics*. PLoS Comput. Biol. 6: e1000667.

# Los autores

## Coordinador

### **Aníbal Lodeiro**

Es Ingeniero Agrónomo de la Universidad de Buenos Aires, Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata e Investigador Independiente de CONICET. Trabaja en microbiología y biología molecular de las interacciones planta-microrganismo, específicamente en la movilidad de bacterias en suelos. Es Profesor Adjunto del Área de Biotecnología y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Ha dirigido numerosas tesis doctorales y publicado gran cantidad de artículos especializados, capítulos de libros y una patente. Asimismo, ha establecido numerosas colaboraciones con colegas del país y del exterior y ha recibido numerosos subsidios para investigación, nacionales e internacionales.

## Autores

### **Alberto Capparelli**

Es Licenciado en Química y Doctor en Química de la Universidad Nacional de La Plata e Investigador Principal del CONICET. Trabaja en cinética química y Fotoquímica en el INIFTA (CONICET-UNLP). Es Profesor Emérito de la Cátedra de Fisicoquímica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Ha dirigido numerosas tesis doctorales y publicado gran cantidad de artículos especializados y libros. Asimismo, ha establecido numerosas colaboraciones con colegas del país y del exterior y ha recibido numerosos subsidios para investigación, nacionales e internacionales.

### **Antonio Lagares**

Es Bioquímico y Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional de La Plata e Investigador Principal del CONICET. Trabaja en biología molecular de las interacciones planta-bacteria, también en la genómica funcional de bacterias y en el estudio metagenómico de plásmidos bacterianos en el IBBM (CONICET-UNLP). Es Profesor Titular del Área de Biotecnología y

Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Ha dirigido numerosas tesis doctorales y publicado gran cantidad de artículos especializados y capítulos de libros. Asimismo, ha establecido numerosas colaboraciones con colegas del país y del exterior y ha recibido numerosos subsidios para investigación, nacionales e internacionales. Ha colaborado en el establecimiento de equipamientos de alta tecnología para estudios bioquímicos y moleculares.

### **Gustavo Parisi**

Es Bioquímico y Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional de La Plata e Investigador Independiente de CONICET. Trabaja en Bioinformática, específicamente en el desarrollo de herramientas computacionales para el estudio de la evolución y estructura de proteínas. Es Profesor Titular de Bioquímica en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes y Profesor Adjunto en el Área de Biotecnología y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata donde dicta Bioinformática. Actualmente dirige el Programa Prioritario de Investigación denominado “Simulación de procesos moleculares de relevancia fisicoquímica y biológica” con sede en la UNQ. Ha dirigido numerosas tesis doctorales y publicado gran cantidad de artículos especializados y capítulos de libros. Asimismo, ha establecido numerosas colaboraciones con colegas del país y del exterior y ha recibido numerosos subsidios para investigación, nacionales e internacionales.

### **Daniela Hozbor**

Es Bioquímica y Doctora en Bioquímica de la Universidad Nacional de La Plata e Investigadora Principal del CONICET. Trabaja en bioquímica y biología molecular vacunas bacterianas, más específicamente las dirigidas contra pertussis en el IBBM (CONICET-UNLP). Es Profesora Titular del Área de Biotecnología y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Ha trabajado en el establecimiento a nivel nacional de una red de diagnóstico laboratorial para pertussis. Ha dirigido numerosas tesis doctorales, publicado gran cantidad de artículos especializados, capítulos de libros y patentes, y es editora académica de una revista internacional. Asimismo, ha establecido numerosas colaboraciones con colegas del país y del exterior y ha recibido numerosos subsidios para investigación, nacionales e internacionales. Ha colaborado en el establecimiento de plataformas tecnológicas con equipamiento de última generación para estudios bioquímicos y moleculares.

### **Augusto Melgarejo**

Es Licenciado en Física y Doctor en Física de la Universidad Nacional de La Plata.. Trabaja en sistemas confinados y problemas fuera del equilibrio, específicamente en relación con las redes metabólicas y la bioenergética bacteriana en el Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Ingeniería de la UNLP. Es Profesor Adjunto con Dedicación Exclusiva en la

asignatura Matemática A (Cálculo Diferencial en una y varias variables) de la Facultad de Ingeniería de la UNLP. Ha publicado gran cantidad de artículos especializados y capítulos de libros. Asimismo, ha establecido numerosas colaboraciones con colegas del país y del exterior y ha recibido subsidios para investigación.

### **Daniela Bottero**

Es Bioquímica y Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata e Investigadora Adjunta del CONICET. Trabaja en bioquímica y biología molecular vacunas bacterianas, más específicamente las dirigidas contra pertussis en el IBBM (CONICET-UNLP). Es Profesora Adjunta del Área de Biotecnología y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Ha sido Bioquímica Residente en hospitales de La Plata. Ha publicado gran cantidad de artículos especializados y capítulos de libros. Asimismo, ha establecido colaboraciones con colegas del país y del exterior y ha recibido subsidios para investigación.

### **Mauricio Lozano**

Es Bioquímico y Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata e Investigador Asistente del CONICET. Trabaja en estudios moleculares de las interacciones planta-microorganismo, específicamente en la biología molecular de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno entre rizobios y leguminosas. Es Jefe de Trabajos Prácticos del Área de Biotecnología y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Ha publicado gran cantidad de artículos especializados y capítulos de libros. Asimismo, ha establecido colaboraciones con colegas del país y del exterior y ha recibido subsidios para investigación.

Catálisis enzimática : fundamentos químicos de la vida / Alberto Capparelli ... [et al.] ; coordinación general de Aníbal Lodeiro. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2016.  
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online  
ISBN 978-950-34-1382-1

1. Cinética Química. 2. Catálisis. I. Capparelli, Alberto II. Lodeiro, Aníbal, coord.  
CDD 541.395

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata  
47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina  
+54 221 427 3992 / 427 4898  
edulp.editorial@gmail.com  
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2017  
ISBN 978-950-34-1382-1  
© 2017 - Edulp

**e**  
**exactas**



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA