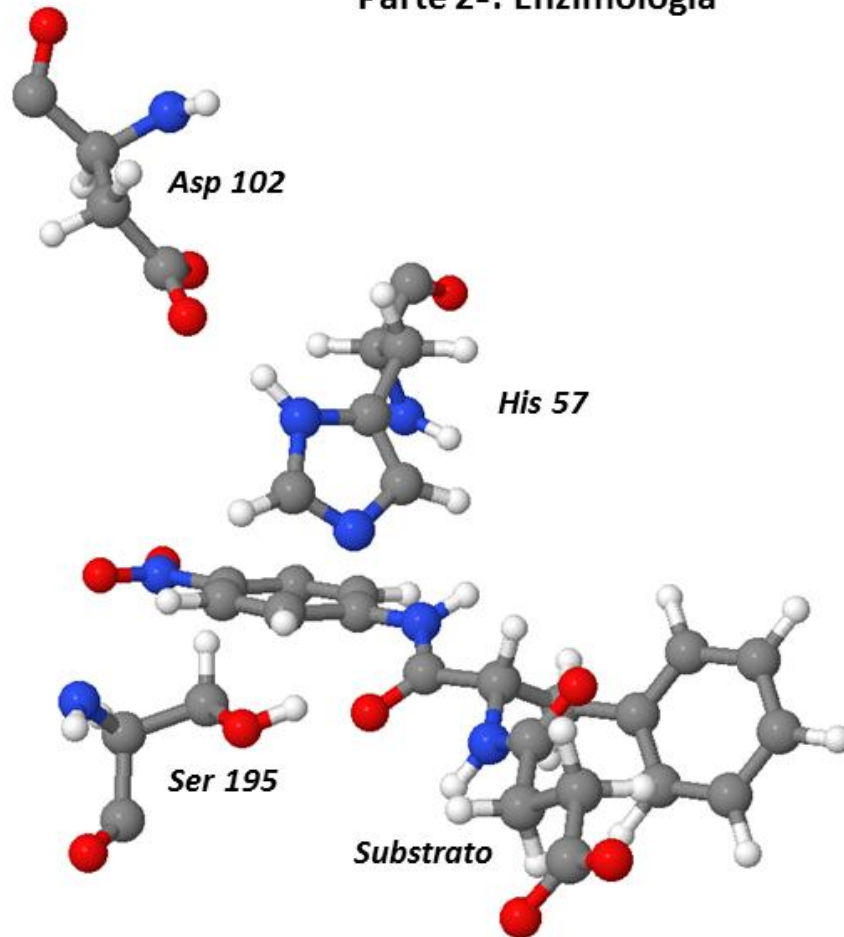


Introducción a la Bioquímica, 2

Parte 2ª: Enzimología



Enrique Battaner Arias

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN A LA ENZIMOLOGÍA	7
Notas históricas	8
El estudio de la Enzimología	11
Bibliografía general.....	12
CAPÍTULO 1: Las reacciones químicas: criterios de espontaneidad y cinética	14
1.1 ¿En qué circunstancias tiene lugar espontáneamente una reacción?	15
1.2 La velocidad de las reacciones químicas.....	19
CAPITULO 2: Catálisis enzimática: términos, conceptos y características generales	32
2.1 Conceptos y términos	33
2.2 Naturaleza química de las enzimas.....	39
2.3 La especificidad de las enzimas	41
2.4 Otros aspectos de la catálisis enzimática	45
2.5 Teorías sobre la acción enzimática	45
CAPÍTULO 3: Clasificación y nomenclatura de las enzimas. Reacciones enzimáticas	48
3.1 Principios generales de clasificación y nomenclatura de enzimas	48
3.2 Reacciones enzimáticas	50
3.2.1 Grupo 1: Oxidorreductasas	50
3.2.2 Grupo 2: Transferasas	55
3.2.3 Grupo 3: Hidrolasas.....	59
3.2.4 Grupo 4: Liasas	64
3.2.5 Grupo 5: Isomerasas.....	1
3.2.6 Grupo 6: Ligasas o Sintetasas	3
CAPITULO 4: Coenzimas o cofactores	6
4.1 Introducción.....	6
4.2 Coenzimas asociadas a procesos redox	8
4.2.1 Coenzimas piridínicas (NAD ⁺ , NADP ⁺)	8
4.2.2 Coenzimas flavínicas.....	12
4.2.3 Coenzimas hemínicas	15
4.2.4 Quinonas	19
4.2.5 Ácido ascórbico (vitamina C).....	20
4.2.6 Glutatión.....	21
4.2.7 Otras coenzimas redox.....	23
4.3 Coenzimas asociados a otras reacciones (no redox)	24
4.3.1 Tiamina pirofosfato	24

4.3.2 Piridoxal fosfato	25
4.3.3 Coenzimas folínicas	27
4.3.4 Coenzimas cobamídicas	30
4.3.5 Biotina	33
4.3.6 S-adenosil metionina	34
4.3.7 Panteteínas.....	35
4.3.8 Carnitina	37
4.3.9 3'-Fosfoadenosil 5'-fosfosulfato (PAPS).....	38
4.3.10 Adenosina 5' trifosfato (ATP)	39
4.3.11 Otros nucleótidos que operan como coenzimas.....	40
CAPÍTULO 5: Cinética de las reacciones enzimáticas	41
5.1 Introducción.....	41
5.1.1 Interés de los estudios cinéticos	41
5.1.2 Concepto de velocidad inicial.....	43
5.2 Efecto de la concentración de enzima.....	44
5.3 Efecto de la concentración de sustrato	48
5.3.1 Estudio cinético de la interacción enzima-sustrato	49
5.3.2 Mecanismo de Michaelis y Menten	51
5.3.3 Concepto de K_m	52
5.3.4 Concepto de V_{max}	55
5.3.5 Aproximación de estado estacionario.....	55
5.3.6 Eficiencia catalítica de las enzimas.....	57
5.3.7 Determinación experimental de K_m y V_{max}	59
5.4 Efecto del pH sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas	61
5.4.1. Bases moleculares	61
5.4.2 Significado biológico del efecto del pH	65
5.5 Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas	66
5.5.1 Bases moleculares	66
5.5.2 Significado biológico del efecto de la temperatura	68
CAPÍTULO 6: Inhibición enzimática.....	69
6.1 Concepto e importancia	69
6.2 Tipos de inhibidores	71
6.2.1 Inhibidores reversibles	71
6.2.2 Inhibidores irreversibles.....	72
6.3 Inhibición competitiva	73
6.3.1 Cinética de la inhibición competitiva	73

6.3.2 Diagnóstico cinético de la inhibición competitiva.....	75
6.3.3 Aspectos estructurales de la inhibición competitiva.....	77
6.3.4 Análogos de estado de transición	80
6.3.5 Anticuerpos catalíticos	82
6.3.6 Importancia práctica de la inhibición competitiva	83
6.4 Otras formas de inhibición reversible	84
6.4.1 Inhibición no competitiva.....	84
6.4.2 Inhibición acompetitiva o anticompetitiva	86
6.5 Inhibición irreversible	87
6.5.1 Generalidades	87
6.5.2 Reactivos de grupo -SH.....	88
6.5.3 Metales pesados.....	91
6.5.4 Inhibidores que combinan con cationes esenciales.....	91
6.5.5 Reactivos específicos de grupo y marcadores de afinidad	91
6.6 Substratos suicidas	93
6.6.1 Modo de acción de los antibióticos β -lactámicos	94
6.6.2 Resistencia a los antibióticos β -lactámicos: la <i>β-lactamasa</i>	96
6.6.3 Otros inhibidores suicidas	98
CAPÍTULO 7: El Centro Activo enzimático. Mecanismos de la acción enzimática	99
7.1 El centro activo	99
7.1.1 Concepto	99
7.1.2 Pruebas experimentales de la existencia del centro activo	100
7.1.3 Número de centros activos	102
7.1.4 Aminoácidos y grupos químicos implicados en el centro activo.....	103
7.2 Mecanismos de la acción enzimática	107
7.3.1 Efectos de proximidad y orientación.....	108
7.3.2 Catálisis ácido-base	109
7.3.3 Grupos nucleófilos y electrófilos.....	112
7.3.4 Formación de intermediarios covalentes con la enzima.....	112
7.3.5 Efectos mecanocuánticos.....	113
7.4 Estudio del centro activo de la quimotripsina	114
CAPITULO 8: Regulación de la actividad enzimática, 1	119
8.1 Generalidades.....	119
8.1.1 Tipos de regulación enzimática	120
8.2 Control por retroalimentación negativa	123
8.2.1 Retroalimentación negativa en sistemas enzimáticos	124

8.2.2 Características generales del control enzimático por retroalimentación negativa	127
8.3 Alosterismo	129
8.3.1 Definición	129
8.3.2 Pruebas experimentales.....	132
8.3.3 Alosterismo y cooperatividad	132
8.3.4 Interpretación cuantitativa del alosterismo.....	136
8.3.5 La aspartato transcarbamilasa	138
8.3.6 La hemoglobina	143
CAPÍTULO 9: Regulación de la actividad enzimática, 2. Modificación covalente de las enzimas.	
Activaciones proteolíticas	149
9.1 Introducción.....	149
9.1.1 Modificación covalente: su importancia biológica.....	149
9.1.2 Formas de modificación covalente	152
9.1.3 Concepto de segundo mensajero.....	153
9.2 Regulación de la glucógeno fosforilasa	156
9.2.1 Reacción catalizada y formas moleculares de la glucógeno fosforilasa.....	156
9.2.2 Cascada de activación en la glucógeno fosforilasa	158
9.2.3 Mecanismos moleculares en el sistema de la glucógeno fosforilasa.....	161
9.2.4 Otras actividades ligadas al sistema de la glucógeno fosforilasa.....	170
9.3 Otros sistemas de fosforilación de proteínas	173
9.3.1 Protein kinasas A	173
9.3.2 Protein kinasas G	174
9.3.3 Protein kinasas C	174
9.3.4 Protein kinasas dependientes de calcio-calmodulina	174
9.3.5 Protein tirosin kinasas	176
9.4 Otras formas de modificación covalente.....	177
9.4.1 ADP-ribosilación	177
9.4.2 Adenilación y Uridilación.....	178
9.5 Activaciones proteolíticas: Zimógenos digestivos	181
9.5.1 Pepsina	182
9.5.2 Tripsina	182
9.5.3 Quimotripsina.....	183
9.6 Activaciones proteolíticas: Coagulación de la sangre.....	183
9.6.1 El proceso de coagulación: generalidades	184
9.6.2 Polimerización del fibrinógeno	185
9.6.3 Formación de trombina.....	188

9.6.4 Formación del complejo protrombinasa.....	189
CAPÍTULO 10: Enzimas en Medicina	193
10.1 Las enzimas en el diagnóstico clínico	193
10.1.1 Procedencia de las enzimas séricas.....	194
10.1.2 Alteraciones en la concentración enzimática en suero	194
10.1.3 Estudio de las principales enzimas con interés diagnóstico	196
10.2 Enzimas en Terapéutica	201
10.2.1 Terapéuticas sustitutivas.....	202
10.2.2 Enzimas en Cirugía	203
10.2.3 Trastornos de la circulación	204
10.2.4 Trastornos de la coagulación sanguínea	204
10.2.5 Enzimas en terapéutica antineoplásica.....	205
10.2.6 Otros usos terapéuticos de enzimas	205

INTRODUCCIÓN A LA ENZIMOLOGÍA

Si algo distingue realmente a la Bioquímica del resto de las disciplinas químicas, es el papel central que en los seres vivos desempeñan las *enzimas*. Y si algún elemento distintivo hay en la Bioquímica frente a las ciencias biológicas es que las enzimas nos brindan un modelo interpretativo de uso general para todas ellas sin excepción en términos de la teoría atómico-molecular. El estudio de las biomoléculas no es en sí mismo más que una serie de capítulos de la Química Orgánica, por más que se utilicen técnicas poco convencionales desde el punto de vista de esta ciencia. Lo realmente único en la química biológica es esa impresionante cantidad de catalizadores específicos encargados cada uno de un determinado proceso dentro de los muchos miles de reacciones químicas posibles en los organismos. ¿Cómo son las enzimas? ¿Cómo funcionan? ¿Cómo se forman? La respuesta a estas preguntas, entendidas en su más amplio significado, nos brindaría la explicación a todos los fenómenos que asociamos a la vida: la posibilidad de un metabolismo; de su regulación, y por tanto de su integración a un nivel fisiológico; igualmente, de su biosíntesis y todos los fenómenos genéticos a ella asociados; y por último, de las complicadas pautas evolutivas y adaptativas de los organismos vivientes.

No es de extrañar, por tanto, que los espectaculares avances de la Bioquímica habidos en los últimos treinta años hayan tenido lugar normalmente en torno a sistemas experimentales nacidos del estudio "convencional" de las enzimas. Los métodos y técnicas de purificación y aislamiento de enzimas han marcado las pautas de toda la Bioquímica preparativa o extractiva; los métodos que la Enzimología emplea en la cuantificación de enzimas forman la base de la Bioquímica Analítica, habiendo transcendido su uso al Análisis Químico General; el estudio químico de los inhibidores ha creado los protocolos que hoy se siguen en el desarrollo sistemático de nuevos fármacos.

Y ya en la esfera puramente teórica, el estudio de las reacciones enzimáticas nos ha suministrado un modelo de aplicación general a todas las interacciones biológicas; el de un ligando uniéndose a un receptor de naturaleza proteica, y desencadenando en él un cambio que es el último responsable molecular del efecto fisiológico investigado. Por otra parte, el estudio cinético de cadenas de reacciones enzimáticas nos va dando una idea, hoy todavía aproximada, de las complejidades dinámicas que pueden surgir en el ser vivo por la acción de los enzimas, y que en un terreno puramente especulativo podemos relacionar sin demasiada dificultad con cuestiones tan abstractas como el origen objetivo del tiempo biológico o las asimetrías (y simetrías) espaciales que surgen en la ontogenia de los seres vivos.

En el momento actual quizá es posible que el término "Enzimología" pueda sonar un tanto pasado de moda, sobre todo en comparación con otros como "Biotecnología" o

"Ingeniería Genética", y que nos recuerde los viejos laboratorios donde se hacía Bioquímica clásica allá por los años 50 y 60. Por ello trato de reivindicar la importancia de la misma. Si la Biotecnología no es otra cosa que introducir en gran escala a las enzimas en el proceso productivo y económico, la Ingeniería Genética actual no es concebible sin la ayuda de una serie muy concreta de enzimas; y además, sus últimas aspiraciones son enteramente enzimáticas: la introducción de nuevos procesos metabólicos allá donde normalmente no los hay. La Genética Molecular se ocupa de los planos del edificio viviente; la Enzimología, del estudio del propio edificio funcionando.

El propósito del autor de este libro es presentar una visión actualizada de las enzimas, pero a un nivel de estudiante de Grado, y específicamente, en el área de Ciencias de la Salud. Para el especialista hay numerosas y magníficas monografías, aparte de series periódicas e innumerables artículos de investigación y de divulgación que tratan con enzimas directa o indirectamente. A tal fin se da una cierta extensión a capítulos como la cinética enzimática, que en los textos consagrados de Bioquímica ocupan un espacio a nuestro juicio harto reducido, pero sin llegar por ello a extremos monográficos o especializados. El autor pretende demostrar que la metodología del estudio de las enzimas, tanto en lo puramente técnico como en lo más conceptual y abstracto, es la indicada para el abordaje de la gran mayoría de los problemas, puros o aplicados, que nos plantea el estudio de los seres vivientes.

Notas históricas

1. Los orígenes

El pensamiento *yatroquímico* que floreció a partir de **Paracelso**, en el s.XVI, es el más remoto antecedente histórico de la Bioquímica y de la Enzimología. Precisamente el representante más genuino de este pensamiento, **Van Helmont**, a principios del s.XVII sugirió que la digestión de los alimentos implicaba su transformación a partir de "fermentos", tomando este término de la tecnología del vino, y en la idea de que ambos procesos tenían mucho en común. Este pensamiento discrepaba radicalmente de la tradición galénica, que veía en la digestión una serie de "cocciones". Tanto en un caso como en otro imperaba el razonamiento de analogía, pero hemos de reconocer que van Helmont estaba mucho más cerca de la realidad. Y además, desde entonces se estableció una fructífera relación entre los estudios que hoy llamaríamos bioquímicos con los procesos de digestión y de fermentación, pues ambos fenómenos fueron desde entonces el objeto principal de los estudios que han desembocado en la moderna Enzimología.

Réné de Réaumur (1683-1757) emprendió hacia el final de su vida (1752) una serie de estudios sobre la digestión que representaron un importante avance metodológico.

Alimentando a aves con tubos metálicos rellenos de distintas materias alimenticias estudió las transformaciones de éstas a lo largo del tubo digestivo y pudo comprobar que existía realmente una transformación química de los alimentos durante la digestión. **Lazzaro Spallanzani** (1729-1799) amplió estos estudios dejando fuera de duda el hecho de la transformación química de los alimentos durante el proceso digestivo. Si consideramos que por aquel entonces su contemporáneo **Antoine de Lavoisier** (1743-1794) reducía a términos químicos el proceso respiratorio, que **Karl Wilhelm Scheele** (1742-1786) comenzaba el estudio de los "productos naturales" y que unos pocos años más tarde (1804) **John Dalton** (1766-1844) resucitaba en términos científicos el primitivo atomismo de **Demócrito**, bien podemos sugerir que estaba teniendo lugar una verdadera revolución química al mismo tiempo que la Revolución Francesa. En cuanto al proceso digestivo, en 1836, **Schwann** y **Eberle** describieron un principio en el jugo gástrico capaz de degradar proteínas, al que denominaron "pepsina".

Otro campo, el de las reacciones químicas, se desarrollaba ampliamente por aquel entonces. En lo que a nuestra discusión se refiere, es importante señalar que en 1812 **Kirchoff** demostró la producción de azúcar a partir de almidón por acción de ácidos sin que éstos quedaran modificados; y en 1814 comprobó que el mismo proceso podía tener lugar en presencia de un extracto de trigo en lugar de ácidos. Unos años más tarde (1817-1822), e independientemente, **Davy**, **Döbereiner**, **Mitscherlich** y **Thénard** descubrieron que la descomposición del peróxido de hidrógeno era acelerada por metales, sin cambios apreciables en éstos; Thénard, por su parte, observó el mismo fenómeno en presencia de fibrina sanguínea. En 1833 **Payen** y **Persoz** obtuvieron a partir de malta un principio similar al antes mencionado de Kirchoff, al que dieron el nombre de "diastasa"; por su parte, **Robiquet** en 1830 descubrió en las almendras amargas un principio "albuminoide" que era capaz de descomponer la amigdalina en glucosa, benzaldehído y CNH (y bautizado posteriormente por **Liebig** y **Wöhler** como "emulsina"). Con todos estos datos y algunos más, **Jöns Jacob Berzelius** (1779-1848) elaboró su teoría de la catálisis, central en toda esta discusión. Por ello le citamos literalmente:

"...Tenemos amplias razones para suponer que en las plantas y en los animales vivientes tienen lugar miles de procesos catalíticos entre los tejidos y los fluidos, y que de ellos resulta la formación de gran número de distintos compuestos, para cuyo origen a partir de la sangre o de los jugos vegetales no podemos asignar hoy día una causa conocida" (1836)

Y aquí entra en escena otro gran protagonista de la historia de la Enzimología: el estudio de la fermentación alcohólica.

2. La fermentación alcohólica

Conocido desde tiempo inmemorial, este proceso empezó a recibir atención científica a finales del siglo XVIII. En 1779 la Academia de Ciencias de Francia estableció un premio consistente en una libra de oro para el trabajo que arrojará luz sobre el hasta entonces misterioso proceso químico. Aunque este premio fue retirado en 1793, no hay duda que contribuyó decisivamente a nuestro actual conocimiento no sólo de las fermentaciones, sino de la Enzimología en general.

J.L.Gay-Lussac (1778-1850) reconoció como productos el etanol y el CO₂, aunque sus datos no establecieron la estequiometría del proceso. **C.Cagniard-Latour** (1777-1859) sugirió la naturaleza celular de la levadura, estimando su diámetro en 6-7 μ m y observando el proceso de gemación. Igualmente demostró las diferencias entre la levadura de cerveza y la del vino; desde el punto de vista químico, comprobó el requerimiento de compuestos nitrogenados en el proceso. Observaciones similares fueron llevadas a cabo por **F.T.Kützing** (1807-1893) y por **T.Schwann** (1810-1882).

Justus von Liebig (1803-1873), junto con **F.Wöhler** (el autor de la síntesis de urea) consideraban la levadura como una sustancia química "inestable" que al comunicar su inestabilidad al azúcar lo degradaba a alcohol. Esto entraba en contradicción con el punto de vista sostenido por Schwann, Kützing y Cagniard-Latour, es decir, la naturaleza celular de la levadura. Por tanto se planteó la cuestión de si las fermentaciones dependían de la propia calidad "viviente" de la célula o bien se trataba de un componente "inanimado" de la misma. Liebig defendía esta última postura, mientras que Schwann sostenía la primera.

Los experimentos de **Louis Pasteur** (1822-1895) parecieron dar la razón enteramente a Schwann. En 1860 escribía lo siguiente:

"...El acto químico de la fermentación es esencialmente un fenómeno correlativo a un acto vital, que comienza y termina con éste. Creo que la fermentación alcohólica no puede tener lugar si no viene acompañada de la organización, desarrollo y multiplicación de las células, o bien de la vida continua de las células ya formadas"

A consecuencia de este punto de vista, se estableció la distinción entre fermentos "organizados" (o formes), de los que la levadura era el ejemplo, y fermentos "no organizados" (o informes) como la diastasa, pepsina, emulsina, invertasa, etc. (cuya lista iba creciendo), que podían ser extraídos de las células. Precisamente para evitar esta complicada nomenclatura, **Kühne** introdujo en 1878 el término "enzima" (literalmente, "en la levadura") para denominar los hasta entonces conocidos como "fermentos no organizados", indicando así que estaban dentro de la célula, pero que no eran la célula. El punto de vista de Pasteur prevaleció momentáneamente, a pesar de que algunas voces se alzaron en contra (en particular las de **Claude Bernard**, **Berthelot** y **Traube**; citamos a este último (1878):

"...Los fermentos no son, como creía Liebig, sustancias inestables que transmiten a materiales normalmente no reactivos su vibración química, sino que son sustancias químicas, relacionadas con las proteínas y que como todas las demás sustancias poseen una estructura química definida...La hipótesis propuesta por Schwann y Pasteur de que la fermentación ha de ser considerada como expresión de la actividad vital de los organismos inferiores no es satisfactoria... Los fermentos son la causa de los procesos químicos vitales no sólo en los organismos inferiores, sino también en los superiores".

En 1897 **E. Büchner** (1860-1917) dio con la clave final al preparar un extracto acelular de levadura capaz de fermentar azúcar, lo que echó por tierra la teoría celular de la fermentación (y todo el vitalismo que implicaba); la totalidad del proceso fermentativo podía ser llevada a cabo por enzimas individuales en el sentido de los definidos por Kühne (es decir, los "no organizados").

Y por fin, **Arthur Harden** (1865-1940) utilizó el sistema de Büchner mediante una metodología que pasó a ser clásica en todos los estudios metabólicos: calentamiento, diálisis, inhibidores, etc. de forma que unos años más tarde **Meyerhof** pudo enumerar una a una todas las enzimas y reacciones de la fermentación alcohólica.

A partir de entonces, el desarrollo histórico de la Enzimología se confunde con sus capítulos concretos, y a ellos nos remitimos. Igualmente, el origen de la Bioquímica moderna podemos cifrarlo en el momento en que quedó resuelta la polémica sobre las fermentaciones; la aparición de las enzimas en la escena científica fue lo suficientemente importante como para discernir esta ciencia de sus diversas predecesoras, como la Fisiología, la Farmacia, la Química y la Agronomía. Además, los estudios de Harden y Young dotaron a la nueva ciencia de su arma principal: el sistema acelular.

El estudio de la Enzimología

A lo largo de esta obra, trataremos de presentar la Enzimología de acuerdo con la siguiente sistemática:

- En primer lugar, se repasan algunas nociones de químicofísica que son necesarias para la comprensión, siquiera superficial, de las reacciones químicas. Los conceptos importantes que se abordan son: la energía libre, la velocidad y el orden cinético de las reacciones y el fenómeno de catálisis tratado de una manera general.

- Pasamos a continuación a una visión introductoria de la catálisis enzimática. Para ello definimos los principales términos propios de la Enzimología, para seguir con las principales propiedades de las enzimas: su naturaleza química, su especificidad y su eficiencia

catalítica. Se discuten por último las principales teorías sobre la acción enzimática.

- En el capítulo 3 se describen las reacciones enzimáticas, con las normas vigentes de clasificación y nomenclatura. El capítulo 4 presenta el estudio de las coenzimas, los reactivos específicos de la química biológica.

- Los dos capítulos siguientes se refieren a la cinética de las reacciones enzimáticas y a sus inhibidores, respectivamente (caps. 5 y 6). Veremos cómo el estudio cinético nos ayuda a comprender los mecanismos básicos de reacción y nos permite en muchas circunstancias un estudio de los pasos individuales. La inhibición, que se estudia inicialmente bajo un punto de vista cinético, se termina discutiendo en términos más estructurales, indicando su importancia práctica, y muy particularmente como paradigma de la terapéutica farmacológica.

- El siguiente capítulo (7) trata de la estructura molecular de las enzimas. Se contempla dicho estudio sobre todo en torno al centro activo enzimático, presentándose los diversos métodos de su estudio. Por otra parte, las estructuras primarias de las moléculas de enzima nos introducen a la evolución filogenética y el origen de los enzimas.

- La regulación de la actividad enzimática, que se presenta en el siguiente capítulo (8), tiene la enorme importancia de ser el nexo de unión entre el nivel metabólico celular y la fisiología del organismo. Se presentan el fenómeno del alosterismo, otros modelos regulatorios, la regulación covalente de los enzimas y las cascadas de actividades enzimáticas (estos dos últimos aspectos en el capítulo 9).

- Se estudian a continuación (cap. 10) algunos aspectos de la Enzimología aplicada a la Medicina, muy especialmente en el diagnóstico y en la terapéutica.

Bibliografía general

Mencionamos a continuación algunas referencias bibliográficas y de Internet que pueden ser de utilidad en el estudio de la Enzimología.

Libros y artículos

Barrow, G.M. Química Física, 3ª ed. Ed.Reverté, Barcelona, 1975

Cornish-Bowden, A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. Portland Press, London 1984.

Fersht, A.R. Enzyme Structure and Metabolism, 2ª ed. W.H.Freeman and Co. New York 1984

Koshland, D.E.Jr. Evolution of catalytic function Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. LII, 1-7, 1987

Matthews

Monod, J., Wyman, J., Changeux, J-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model J.Mol.Biol. 12, 88-118, 1965

Nelson, D.L. & Cox, M.M. Lehninger. Principios de Bioquímica Omega, 2001

Núñez de Castro, I. Enzimología, Pirámide, Madrid 2001

Price, N.C. & Stevens, L. Fundamentals of Enzymology Oxford University Press, Oxford 1987

Prigogine, I & Stengers, I. La Nueva Alianza. Metamorfosis de la Ciencia. Alianza Editorial., Madrid 1979

Segel, I.H. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of rapid equilibrium and steady-state systems John Wiley and Sons, New York, 1975

Stryer

Voet, D. & Voet J.G. Bioquímica, Panamericana 2006

Páginas web

<http://www.expasy.ch/enzyme/>

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

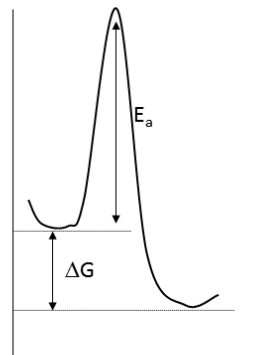
<http://en.wikipedia.org/wiki/Enzymes>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Coenzyme>

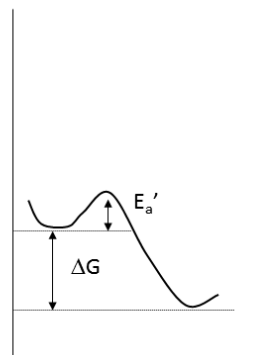
http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme_kinetics

http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme_inhibitor

CAPÍTULO 1: Las reacciones químicas: criterios de espontaneidad y cinética



Reacción no catalizada



Reacción catalizada

Los organismos vivientes mantienen de forma constante y simultánea varios miles de reacciones químicas, cuyo conjunto llamamos metabolismo. Este conjunto de reacciones es tan característico de los mismos que de hecho, un punto de vista perfectamente válido para la definición de vida es la capacidad de mantenimiento de un metabolismo. Por el momento, no sabemos de ningún proceso nuclear que tenga lugar en los seres vivos, y de ahí que la metodología más adecuada para el estudio de los seres vivos sea la propia de la Química. En química estudiamos las reacciones desde el punto de vista de su velocidad y de su mecanismo. Ambos tipos de estudio son asimismo cruciales, como veremos, en el particular terreno de la Bioquímica. Pero en este último se da un hecho de importancia trascendental: la práctica totalidad de las reacciones químicas que se dan en un ser vivo están catalizadas, es decir, en ellas interviene un agente que no aparece en la estequiometría global de la reacción pero que

acelera la consecución del equilibrio. Se conocen, como es lógico, muchas otras reacciones catalizadas fuera del mundo viviente, pero a lo largo de éste y los próximos capítulos trataremos de ver por qué la catálisis biológica es tan importante en el contexto de un curso de Bioquímica. Antes de entrar en esta materia específica, es preciso que consideremos brevemente algunas generalidades sobre las reacciones químicas, particularmente su posibilidad y su velocidad.

1.1 ¿En qué circunstancias tiene lugar espontáneamente una reacción?

La función básica de toda ciencia natural es la predicción de fenómenos, y los fenómenos químicos forman parte de nuestra experiencia cotidiana. Por ejemplo, tenemos todos una idea bastante aproximada de qué sustancias pueden entrar en combustión al acercarse a una llama; sabemos que es mucho más fácil disolver sal que sacarla de la solución; y que una vez cuajada la clara de un huevo no podemos restituir ésta a su estado original. Es decir, en muchos casos tenemos una concepción empírica del sentido espontáneo en que cursan las reacciones, y evidentemente puede ser de gran utilidad un conjunto de reglas científicas que nos permitan discernir clara y cuantitativamente la posibilidad o no de reacciones químicas. La respuesta a este problema nos la da la Termodinámica clásica, de forma que hoy día podemos predecir con toda exactitud la posibilidad de cualquier reacción química real o imaginable. Veamos a continuación dichos criterios.

1.1.1 El calor absorbido o desprendido en reacciones químicas

Somos conscientes de que en muchas reacciones químicas hay intercambio de calor. Cuando un sistema se transforma a presión y temperatura constantes, el calor desprendido o absorbido en el proceso recibe el nombre de *entalpía* (y se representa por ΔH). Como los procesos biológicos tienen lugar por lo general en estas condiciones, en lo sucesivo utilizaremos calor y entalpía prácticamente como sinónimos. Asimismo, hemos de señalar una importante convención respecto a las variaciones de entalpía en una transformación: el incremento en entalpía se considera positivo cuando el sistema absorbe calor a partir del entorno; en caso contrario, el incremento se considera negativo. Por ejemplo, si se nos dice que una reacción cursa con un incremento de entalpía de -100 kJ (kilojoules), ello significa que la transformación desprende esa energía en forma de calor desde el sistema al entorno. El caso contrario (absorción de calor por el sistema desde el entorno) se representa como variación positiva de entalpía.

Pues bien: una primera aproximación empírica a la definición de un criterio de espontaneidad en las reacciones químicas nos diría que en nuestra experiencia son más usuales aquellas

reacciones en las que se desprende calor. Así, definiríamos como espontáneas las reacciones *exotérmicas* (reacciones que desprenden calor, con incremento negativo de entalpía) y como no espontáneas las reacciones endotérmicas (esto es, que absorben calor, con incremento positivo de entalpía).

Es fácil refutar esta hipótesis, pues bastan unas pocas observaciones para comprobar que existen procesos endotérmicos y que son sin embargo espontáneos. Por ejemplo, la entrada en solución de sales como el cloruro amónico es un proceso perfectamente espontáneo, y sin embargo cursa con absorción de calor, como podemos comprobar al tacto por el enfriamiento del recipiente que contiene la solución. Por tanto, no es factible un criterio sobre espontaneidad de las reacciones químicas basado únicamente en la entalpía.

1.1.2 Orden o desorden introducido en un sistema: la entropía

Fijémonos en el ejemplo que refutaba la hipótesis anterior. La disolución de una sal amónica en agua es un proceso endotérmico y sin embargo, espontáneo. El fenómeno de disolución de la sal implica el paso de un sistema altamente ordenado, cual es el caso de un sólido cristalino, al desorden propio de una solución, similar al que existe en el estado gaseoso. Toda vez que el desorden de un sistema es medido por una magnitud termodinámica de estado, la *entropía*, que se representa con el símbolo ΔS , y que el Segundo Principio establece el aumento global de la entropía en cualquier transformación que sufra un sistema aislado, podríamos pensar que un criterio válido para dictaminar la espontaneidad de las reacciones sería el siguiente: Son espontáneas las transformaciones de un sistema que cursen con un incremento de entropía (y que por tanto van a favor de la *flecha del tiempo*). Debemos hacer notar que en este caso definimos como positivas las variaciones en las que aumenta la entropía del sistema.

Tampoco es válido este segundo criterio. Por ejemplo, la congelación del agua a 0°C y presión atmosférica es un fenómeno totalmente espontáneo y cursa con una importante disminución entrópica, la propia de pasar del relativamente desordenado estado líquido al orden propio de los sólidos cristalinos. Igualmente, la desnaturalización de una proteína cursa con un fuerte incremento de entropía en el sistema, ya que la estructura nativa de aquella representa un sistema muy ordenado, y sin embargo, las proteínas no se desnaturalizan espontáneamente.

1.1.3 Trabajo útil potencial en una transformación: la Energía Libre

A pesar de las consideraciones anteriores, las transformaciones espontáneas cursan por lo general o con desprendimiento de calor o con incremento de entropía. Existe una tercera magnitud termodinámica de estado, la energía libre de Gibbs, que se representa como ΔG y

que se define por la siguiente ecuación en procesos isotérmicos a presión constante:

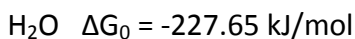
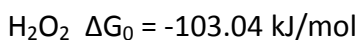
[1]

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

en la que vemos que entran como variables la entalpía ΔH , la entropía ΔS y la temperatura absoluta T . La energía libre de Gibbs representa la cantidad máxima de trabajo útil que puede obtenerse en una transformación a presión constante, y constituye un criterio válido para predecir la espontaneidad de las reacciones químicas. Así, un incremento negativo en energía libre (es decir, cuando el sistema desprende energía libre hacia el entorno) significa que la transformación puede tener lugar espontáneamente. Una variación positiva tiene lugar cuando el sistema absorbe energía, y tales transformaciones no pueden tener lugar espontáneamente. La magnitud ΔG tiene una gran importancia en todo tipo de cálculos químicos, y por tanto en los biológicos.

1.1.3.1 Normalmente se dispone de tablas en las que se especifican las *energías libres standard de formación* de compuestos. Esta magnitud es el incremento en energía libre que tiene lugar en la reacción de formación del compuesto a partir de sus elementos en estado standard (se toma como cero la energía libre de formación standard de un elemento en su estado más estable). Estas energías libres de formación se refieren a estados standard, es decir, concentración unidad, 298 °K (25 °C), 1 atm de presión, etc. A partir de las energías de formación de los reactivos y productos podemos calcular muy fácilmente la energía libre standard de una reacción dada. Esta energía libre standard se representa por el símbolo ΔG_0 .

Ejemplo: Calcúlese la energía libre standard de la descomposición del peróxido de hidrógeno: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Esta es un interesante reacción en el metabolismo celular, catalizada por enzimas llamados peroxidasa, de las cuales el ejemplo más representativo es la catalasa, que cataliza esta misma reacción. Sabemos que las energías libres de formación son:



Solución: Al ser la energía libre una función termodinámica de estado, su variación depende únicamente de los estados inicial y final de la reacción, sin importar el camino seguido. Por tanto, las energías libres se suman o restan de la misma forma que en ecuaciones termoquímicas. A partir de la relación

$$\Delta G_0 = \Delta G_0 \text{ (productos)} - \Delta G_0 \text{ (reactivos)}$$

Tendremos para la ecuación propuesta:

$$\Delta G_0 = -227.65 - (-103.04 + 0) = -124.61 \text{ kJ/mol}$$

Lo cual nos indica que en condiciones standard, la reacción cursará espontáneamente de izquierda a derecha, tal como ha sido enunciada.

En aquellas reacciones en que intervienen ácidos, el protón H^+ suele ser un reactivo o un producto; a concentración unidad, por tanto, las energías libres standard de las reacciones en que intervienen ácidos disociados total o parcialmente, se refieren a $pH = 0$ (es decir, el pH para el cual $[H^+] = 1 \text{ M}$). En el medio biológico el pH siempre es cercano a 7 (la neutralidad ácido base) y se prefiere, por esa razón, calcular las energías libres standard de las reacciones a $pH 7$, es decir, a una concentración de protones igual a 10^{-7} M . Las energías libres así calculadas se representan por el símbolo $\Delta G_0'$.

1.1.3.2 Para unas condiciones dadas, diferentes de las standard, podemos calcular el incremento en energía libre de una reacción concreta $A \rightarrow B$ mediante la relación

[2]

$$\Delta G = \Delta G_0' + RT \ln \frac{[B]}{[A]}$$

En la que R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, y $[A]$ y $[B]$ las concentraciones de reactivo y producto, respectivamente.

1.1.3.3 De la relación anterior podemos obtener otra muy interesante, mediante la cual se calcula la constante de equilibrio de una reacción a partir de la energía libre standard, o viceversa. En el equilibrio, $\Delta G = 0$, y por tanto,

[3]

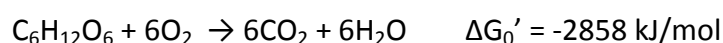
$$\Delta G_0' = -RT \ln(K_{eq})$$

En la que K_{eq} es la constante de equilibrio de la reacción, y R y T tienen el mismo significado que en [2]. Esta relación nos indica que (a) son espontáneas aquellas reacciones para las que $\Delta G_0'$ es negativa, o lo que es lo mismo, tienen una K_{eq} mayor que la unidad; y a la inversa, (b) no pueden producirse espontáneamente reacciones para las que $\Delta G_0'$ es positiva, o bien, cuya constante de equilibrio es menor que la unidad.

1.1.3.4 Por útil que sea la magnitud energía libre standard, debemos tener muy en cuenta que una cosa son las condiciones standard de una reacción y otra muy distinta las condiciones actuales en que se desarrolla la reacción que nos interesa. Así, por ejemplo, podemos ver que una reacción metabólica cuyo cálculo de energía libre standard nos indica que tiene lugar espontáneamente en un sentido, puede estar funcionando en el metabolismo en sentido inverso porque las condiciones en el interior de la célula son evidentemente distintas, y en particular las concentraciones de reactivos y productos.

1.1.3.5 Por último, veamos la reacción de combustión aeróbica de la glucosa:

[4]



Según las consideraciones anteriores, esta reacción cursará espontáneamente puesto que transcurre con un fuerte incremento negativo en energía libre. Sin embargo, todos somos conscientes de que la glucosa en presencia de oxígeno (por ejemplo, dentro de un frasco) es perfectamente estable y no arde "espontáneamente". Esto no está en contradicción con todo lo que acabamos de exponer, ya que la energía libre standard nos informa acerca de la posibilidad de una reacción, pero no nos da ninguna información acerca de la dimensión tiempo de los fenómenos. Para tener una idea de la velocidad con que transcurre una reacción, no nos queda hoy por hoy más remedio que ir al laboratorio y estudiarla experimentalmente. Quizá los progresos en química cuántica y las actuales facilidades de cálculo nos permitan algún día hacer predicciones teóricas de la velocidad; entre tanto, sólo las determinaciones empíricas nos valen para algo, como veremos a continuación.

1.2 La velocidad de las reacciones químicas

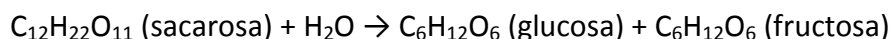
La velocidad en sentido químico es la variación de concentración por unidad de tiempo, o más propiamente, la variación instantánea en concentración. Para una reacción cualquiera $A \rightarrow B$, podemos medir su velocidad bien como (a) velocidad de desaparición del reactivo A, es decir, $-d[A]/dt$, o bien (b) velocidad de aparición del producto B, es decir, $d[B]/dt$.

La velocidad de una reacción química depende de varios factores cuyo efecto podemos medir experimentalmente en el laboratorio. De estos factores tienen especial significación para nosotros la concentración de reactivos, la temperatura y la presencia o ausencia de catalizadores.

1.2.1 Velocidad y concentración: orden de reacción y molecularidad

Hacia 1850 **Wilhemy** estudió la reacción de inversión de la sacarosa:

[5]



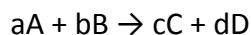
Olvidándonos por el momento de que el agua es un reactivo en esta reacción, los resultados que obtuvo eran compatibles con la siguiente ley: *La velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de sacarosa*. Es decir,

[6]

$$-d[\text{A}]/dt = d[\text{B}]/dt = d[\text{C}]/dt = k[\text{A}]$$

Donde representamos como **A** la sacarosa, **B** la glucosa y **C** la fructosa; **k** representa la constante de proporcionalidad entre la velocidad y la concentración. En general, para una reacción irreversible

[7]



En donde **A** y **B** son los reactivos, **C** y **D** los productos, y **a**, **b**, **c** y **d** los respectivos coeficientes estequiométricos, la velocidad **v** (en ausencia de productos, es decir, en el momento **t=0** de la reacción) puede en general expresarse como

[8]

$$v = -d[\text{A}]/dt = -d[\text{B}]/dt = d[\text{C}]/dt = d[\text{D}]/dt = k[\text{A}]^x[\text{B}]^y$$

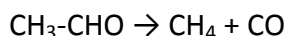
es decir, como el producto de las concentraciones de los reactivos elevadas a los exponentes **x** e **y** (que no son necesariamente iguales a los coeficientes estequiométricos **a** y **b**).

1.2.1.1 Llamamos *orden de reacción* a la suma de los exponentes que aparecen en la ecuación de velocidad. En el caso de la inversión de la sacarosa, el orden es de uno, o reacción de primer orden; en el caso de la reacción [7], el orden es de (**x+y**). En este último caso podemos también decir que la reacción es de orden **x** respecto a **A**, de orden **y** respecto a **B** y de orden global (**x+y**).

Es importante señalar que el orden de reacción es una magnitud experimental, es decir, que

la obtenemos a partir de mediciones en el laboratorio. En este sentido, debemos tener presente que son posibles órdenes de reacción no enteros; por ejemplo, en la reacción de descomposición del acetaldehído

[9]

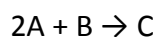


la experimentación nos dice que tiene un orden de 3/2 con respecto al acetaldehído, a pesar de que la observación de la ecuación estequiométrica nos haría pensar en un primer orden para esta reacción.

De la misma manera, son posibles órdenes *cero* de reacción. Más adelante tendremos ocasión de ver que en las reacciones catalizadas por enzimas, a altas concentraciones de sustrato, el orden es prácticamente de cero, es decir, la velocidad es independiente de la concentración del reactivo.

Volvamos a la ecuación [7]. En ella se decía que la velocidad puede ser igual a $k[\text{A}]^x[\text{B}]^y$, y por tanto el orden de reacción global igual a $(x+y)$. Es importante insistir en el hecho de que el orden de reacción no es necesariamente igual a la suma de los coeficientes estequiométricos, ya que el orden de reacción depende del mecanismo de la misma, y no de su estequiometría global. Supongamos una reacción en la que dos moléculas de A reaccionen con una de B para dar el producto C:

[10]



Para esta reacción son posibles varios mecanismos. Por ejemplo: en un caso podemos suponer que las tres moléculas colisionan simultáneamente para producir C. En ese caso la reacción sería de orden 3. Ahora bien, si la reacción transcurre de manera que en primer lugar reacciona una molécula de A con una de B para dar un intermediario X y éste posteriormente reacciona con una nueva molécula de A para dar el producto C, el orden ya no sería de 3, sino que estaría comprendido entre 2 y 3. Y de esta misma manera podemos pensar en muchos otros mecanismos para esta reacción, cada uno de los cuales nos daría un orden distinto. De hecho, órdenes de reacción de 3 son muy raros en la práctica; y superiores a 3 son realmente excepcionales.

1.2.1.2 Por las consideraciones anteriores debemos definir un nuevo concepto en la cinética de reacciones químicas, la **molecularidad**. La molecularidad de una reacción es el número de moléculas que participan en la configuración del complejo activo (véase más adelante), y por tanto, es un número que necesariamente ha de ser entero, a diferencia del orden de reacción. Y así como éste es una magnitud experimental, la molecularidad lo es teórica, ya que se debe definir para los pasos elementales del mecanismo. En el ejemplo [10] vimos que podíamos postular varios mecanismos. De los propuestos, en el primero de ellos habría una sola reacción de molecularidad 3; en el segundo, había dos reacciones

sucesivas de molecularidad 2 cada una.

1.2.1.3 Particularmente importantes en el mundo biológico son los **procesos de primer orden**. Definíamos estos procesos como los que obedecen a la relación

[11]

$$-d[A]/dt = k[A]$$

Esta relación puede integrarse directamente y conduce a la expresión

[12]

$$A_t = A_0 \exp(-kt)$$

En la que A_t es la cantidad de A que queda a tiempo t ; A_0 es la cantidad inicial de A; k la constante de primer orden, y t el tiempo. Si tomamos logaritmos naturales de esta expresión llegamos a

[13]

$$\ln A_t = \ln A_0 - kt$$

lo cual indica que si representamos el logaritmo de A en función del tiempo, obtendremos una línea recta de pendiente $-k$ y cuyo corte en ordenadas será igual al logaritmo de A_0 . Por otra parte, se define en estos procesos otra importante magnitud derivada: el *semiperíodo* o tiempo en que A queda reducido a $A/2$. No es difícil deducir de [13] que el semiperíodo $t_{1/2}$ es igual a

[14]

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

Ejemplos:

(a) La desintegración de un elemento radioactivo es un proceso de primer orden. Por tanto, si conocemos la constante k (que en este caso se llama constante de desintegración) y la actividad total A , podremos conocer la actividad A_t en cualquier tiempo t pasado o futuro. En este principio se basan los métodos de datación radioquímica de muestras biológicas, midiendo la cantidad de ^{14}C que permanece en una muestra y calculando el período de tiempo que ha tenido que transcurrir a partir de una proporción de ^{14}C igual a la de los seres vivientes.

(b) Otro método de datación de muestras biológicas consiste en la medición de la relación D-aspartato/L-aspartato. Teniendo en cuenta que en un ser viviente todo el ácido aspártico

presente lo está en forma L-, y que el D-aspartato se forma por racemización del isómero L- después de la muerte, siendo éste un proceso de primer orden, conocida dicha relación en la muestra se puede calcular el período aproximado de muerte de la muestra biológica.

(c) La inactivación de enzimas por agentes físicos o químicos es muy a menudo un proceso de primer orden. Así, en algunos procesos patológicos, como el infarto de miocardio, la destrucción de las células hace que se vierta su contenido a la circulación sanguínea. Entre los componentes celulares vertidos a la sangre se encuentran muchas enzimas; alguna de ellas, como la creatin kinasa, nos sirven para diagnosticar la presencia de un infarto. Teniendo en cuenta que a lo largo del tiempo la actividad enzimática en la sangre va disminuyendo según un proceso de primer orden, a partir de mediciones seriadas del enzima podemos calcular la cantidad inicial vertida a la sangre, y de esta manera podemos tener una idea de la extensión y gravedad del infarto.

(d) La inactivación por calor de algunas enzimas, como la fosfatasa alcalina, sigue un proceso de primer orden. Esta enzima se emplea como indicador de enfermedades óseas o del árbol biliar, entre otras; y las enzimas de distintas procedencias se pueden distinguir por su estabilidad térmica. Así, el semiperíodo de inactivación de la fosfatasa alcalina de origen óseo a 56 °C es de dos minutos, mientras que el de la de procedencia hepática es de 7 minutos.

(e) La desaparición de un componente (por ejemplo, un medicamento) de cualquiera de los compartimentos líquidos del organismo sigue muchas veces una cinética de primer orden (y a veces también de órdenes superiores). Teniendo presente este hecho, podemos hacer un diseño racional de las pautas terapéuticas para que la concentración de medicamento se mantenga en niveles óptimos.

1.2.1.4 La ecuación [5] representaba la inversión de la sacarosa. En realidad se trata de una reacción bimolecular, en la que una molécula de agua ataca al enlace glicosídico constituido entre glucosa y fructosa. Sin embargo, las mediciones experimentales nos muestran que aparentemente es una reacción de primer orden. Ello es debido a que siendo uno de los reactivos el agua y teniendo lugar la reacción en solución acuosa, el agua aparece a una concentración muy elevada (55.5 M) y en la práctica constante, ya que es mucho mayor que la de reactivos y productos. Este tipo de procesos (de hecho, todas las reacciones de hidrólisis en el medio biológico) se comportan como si fueran de primer orden a pesar de ser bimoleculares. Por ello reciben el nombre de *procesos de pseudo primer orden*.

1.2.2 Velocidad y temperatura: concepto de energía de activación

En 1889, **Arrhenius** propuso que la dependencia de la constante de velocidad **k** en función de la temperatura viene dada por la expresión

[15]

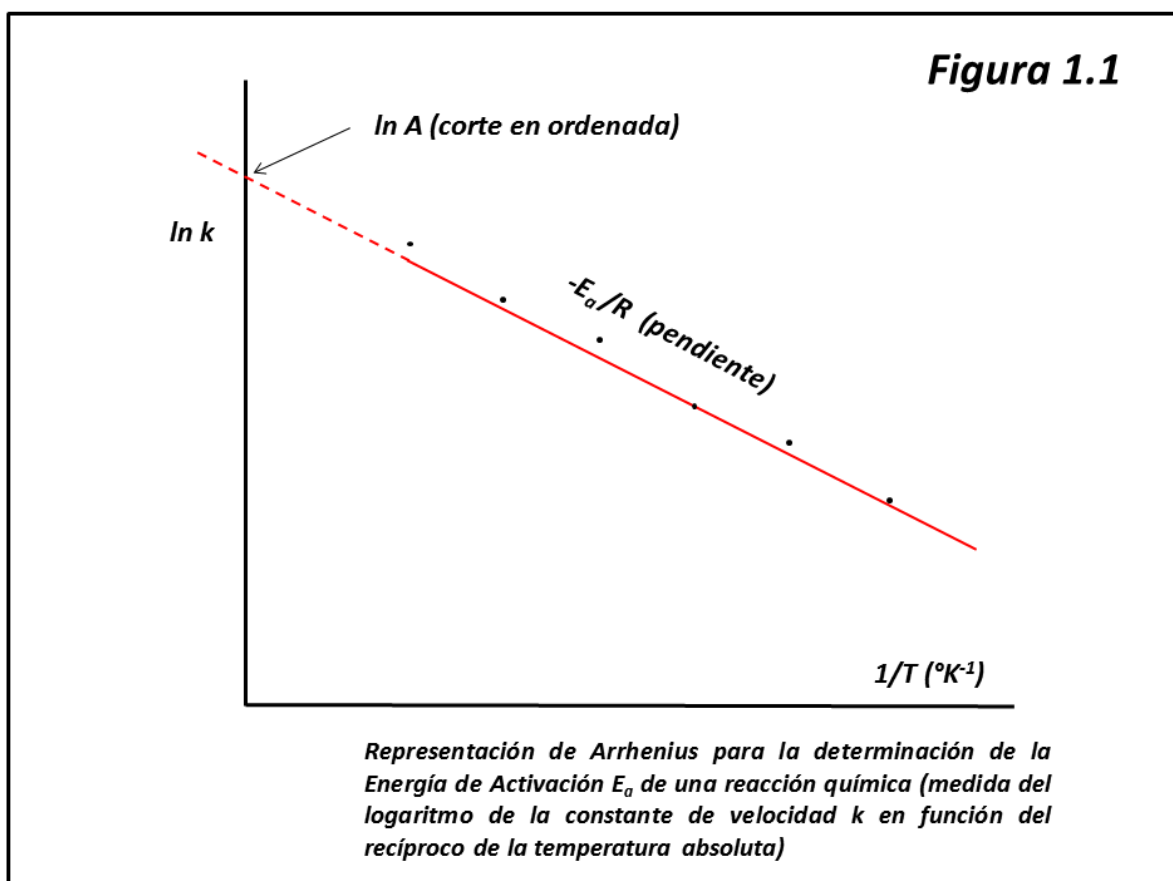
$$k = A \exp(-E_a/RT)$$

en la que **R** es la constante de los gases, **T** la temperatura absoluta, **A** el llamado *factor de frecuencia* y **E_a** la *energía de activación*. Tomando logaritmos en la expresión [15] llegamos a

[16]

$$\ln k = -E_a/RT + \ln A$$

En la que vemos que una representación del logaritmo de la constante de velocidad en función del recíproco de la temperatura absoluta **1/T** nos da una recta cuya pendiente es **-E_a/R** y su corte en ordenadas **ln A** (figura 1.1) Por tanto, podemos calcular la energía de activación midiendo el valor de la constante de velocidad en función del recíproco de la temperatura y representando los datos conforme a la ecuación [16], lo que se conoce como *representación de Arrhenius*.

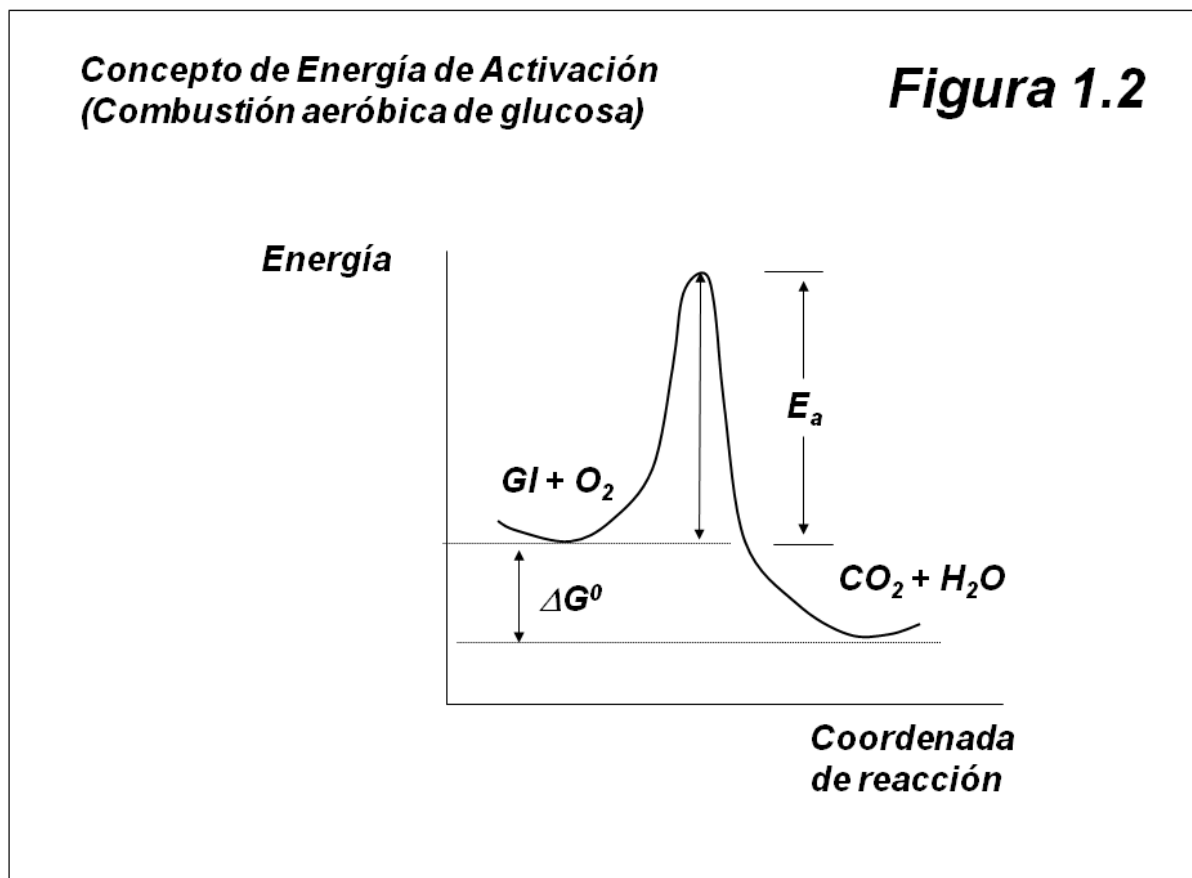


Podemos dar una interpretación de esta relación de la siguiente forma: La temperatura es una medida de la energía cinética media de las moléculas de un reactivo. Para una temperatura concreta T, las energías de las moléculas se distribuyen conforme a una ley de

probabilidad no muy diferente de las que rigen para fenómenos aleatorios; habrá un cierto número de moléculas con energía igual a la media, otras con energías superiores y otras con energías inferiores. El factor $\exp(-E_a/RT)$ (*factor de Boltzmann*) es precisamente la fracción de moléculas con una energía igual o mayor a la requerida para reaccionar. El factor de frecuencia, **A**, por su parte, tiene las mismas dimensiones que la constante de velocidad **k**, y es proporcional a la frecuencia de colisiones entre las moléculas, de ahí su nombre.

La ecuación de Arrhenius nos indica que las moléculas reactivas deben alcanzar una energía crítica E_a antes de que puedan reaccionar. La figura 1.2, por su parte, nos muestra gráficamente el concepto de energía de activación como la barrera que debe superarse para alcanzar el complejo activo, de energía máxima, y a partir de él, caer del lado de los productos. Por otra parte, en esta gráfica se ve que el intercambio global de energía, ΔE no depende del camino que siga la reacción, sino únicamente de los estados inicial y final.

La ecuación [16] nos demuestra que la constante de velocidad se hace mayor a medida que disminuye la energía de activación. Como veremos, la acción de los catalizadores es precisamente ésta: Disminuir la energía de activación gracias a situar los reactivos en un entorno físicoquímico más favorable a su interacción.



Las representaciones de Arrhenius no se utilizan solamente en el campo de la químicofísica.

Una descripción rigurosa del efecto de la temperatura sobre cualquier fenómeno biológico debe hacerse en base a este tipo de representaciones. Por ejemplo, el estudio del efecto de la temperatura sobre la función cardiovascular en animales poiquilotermos, como los reptiles, se hace mediante representaciones de Arrhenius. Puede observarse que hay variables, como la frecuencia cardíaca, que dentro de ciertos límites siguen una relación similar a la ecuación [1.16].

A veces se emplea el índice Q_{10} ; si a es el valor de una variable a la temperatura T , y a' el valor de la misma a la temperatura $T+10$, el Q_{10} es el cociente a'/a . Un valor grande de este índice denota una fuerte dependencia de la temperatura. Una regla empírica aproximada para las reacciones químicas en general es que su Q_{10} es aproximadamente de 2 (pero como toda regla empírica debe utilizarse con suma cautela).

1.2.3 Catálisis

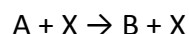
Las velocidades de reacción se ven alteradas por la presencia de catalizadores. El término *catálisis* fue propuesto por **Berzelius** en 1835 para describir la acción de sustancias que "*por su mera presencia inducen reacciones químicas que no tendrían normalmente lugar en su ausencia*". Hay una serie de ideas centrales respecto al fenómeno de catálisis:

1.2.3.1 Los catalizadores no entran en la ecuación estequiométrica global

Esto quiere decir que aun cuando participan en la reacción, los catalizadores no sufren cambio alguno por efecto de la misma, o si lo sufren, en el transcurso de la reacción vuelven a su estado original; de esta forma, en la ecuación estequiométrica global aparecerían iguales tanto en el término de la derecha como en el de la izquierda, por lo que pueden ser eliminados de la misma.

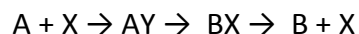
Una reacción cualquiera $A \rightarrow B$ catalizada por X puede representarse como

[17]

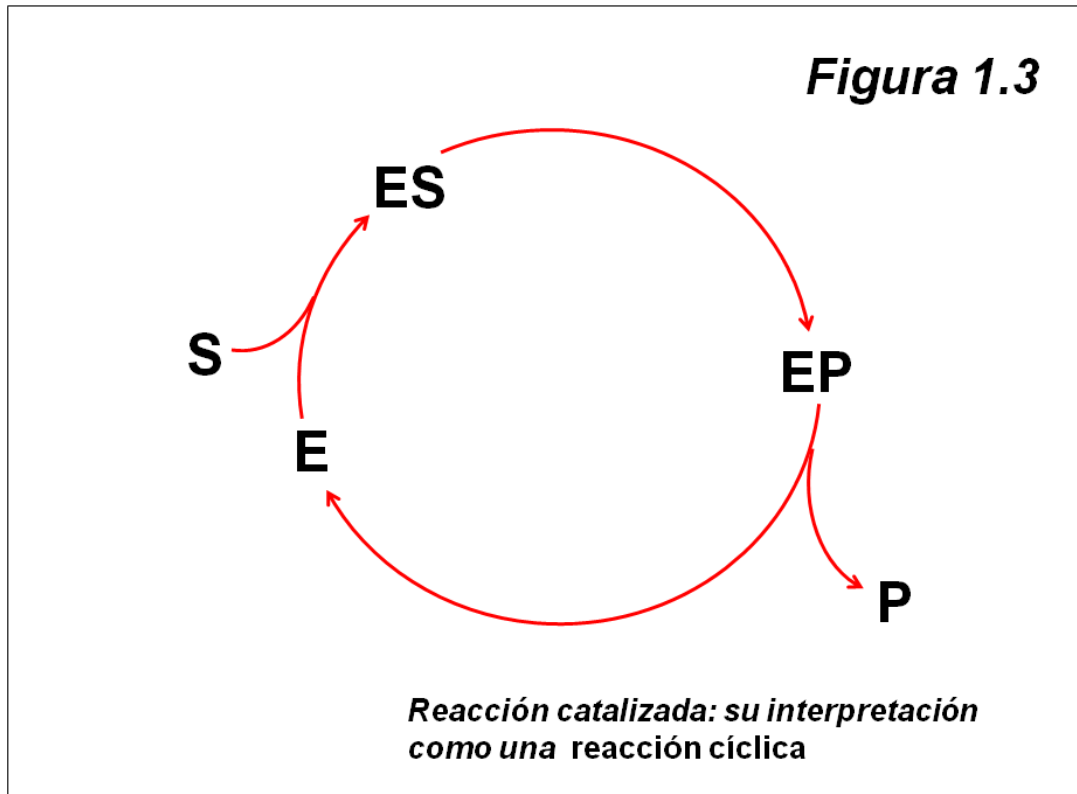


con los pertinentes pasos intermedios, si los hubiere; por ejemplo,

[18]



Por esta razón, las reacciones catalizadas siempre pueden representarse como un proceso cíclico (figura 1.3). Este hecho tiene particular importancia en el metabolismo, en el que las vías cíclicas (como el *ciclo de Krebs*, por ejemplo), se comportan *catalíticamente*.



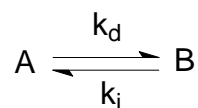
1.2.3.2 Los catalizadores no alteran la posición de equilibrio de la reacción

Antes hemos visto la relación entre la energía libre standard $\Delta G_0'$ y la constante de equilibrio de una reacción, K_{eq} . Siendo la energía libre una magnitud termodinámica de estado, su variación depende únicamente de los estados inicial y final, y no del camino seguido en la transformación. Como la constante de equilibrio es función de la energía libre standard, podemos decir lo mismo de la posición de equilibrio. Por lo tanto, esta posición es independiente del camino seguido por la reacción, con o sin catalizador. Lo que altera el catalizador es la velocidad de la reacción. **Ostwald** demostró que un catalizador que alterara la posición de equilibrio de una reacción entraría en contradicción con el Primer Principio de la Termodinámica.

Por otra parte, dado que un catalizador no modifica la posición de equilibrio de una reacción, pero altera su velocidad, debemos concluir que los catalizadores alteran tanto la reacción directa como la inversa, y en la misma medida.

Sea la reacción reversible

[19]



en la que k_d es la constante de velocidad directa y k_i la inversa. En este caso, $K_{eq} = k_i/k_d$; si K_{eq} no se modifica por la acción del catalizador, pero aumenta k_d , tiene necesariamente que aumentar k_i .

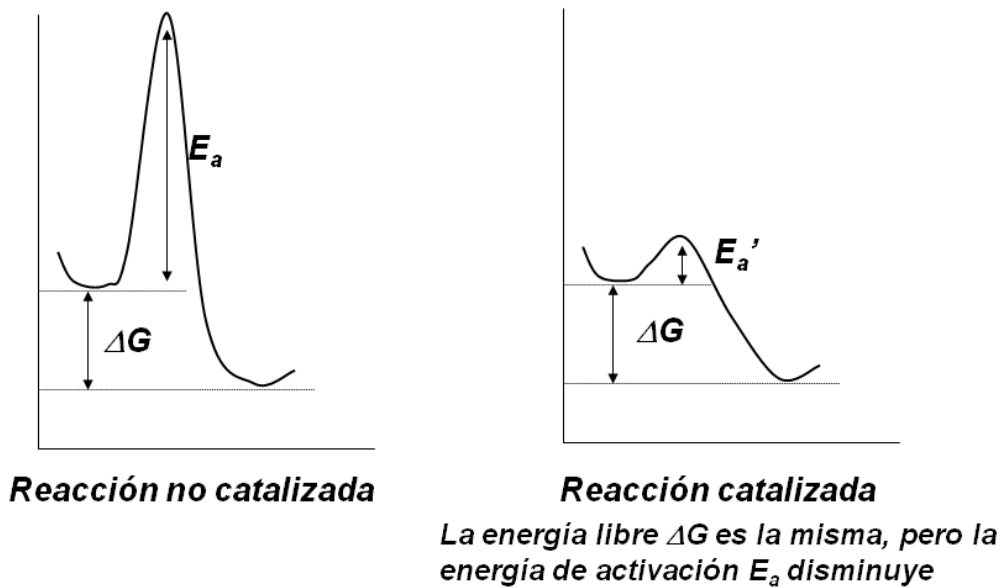
1.2.3.3 Los catalizadores modifican la energía de activación.

Según la teoría de las colisiones, para que se produzca una reacción entre átomos o moléculas, éstas deben primero colisionar entre sí. De esta forma se explica que a una mayor concentración de reactivo se acelere la reacción. Ahora bien, no todas las colisiones son eficaces; para que lo sean se necesita que las moléculas reaccionantes posean una cierta energía cinética y además, que las moléculas entren en colisión con la orientación precisa.

Los catalizadores permiten un nivel energético más bajo, bien sea por introducir un nuevo agente en la reacción que posteriormente se regenera (por ejemplo, en la catálisis específica ácido-base), o bien por permitir el encuentro de las moléculas en la orientación adecuada (caso de la catálisis heterogénea). En todo caso, la acción del catalizador se traduce en una disminución de la energía de activación, haciendo más grande el factor de Boltzmann, y por tanto, aumentando el número de moléculas con capacidad de reaccionar en unas condiciones dadas (figura 1.4)

Figura 1.4

Catálisis



Una reacción ampliamente estudiada y de gran importancia industrial es la síntesis de amoníaco por el *proceso Haber*, en el que se hace reaccionar nitrógeno e hidrógeno en fase gaseosa para producir amoníaco:

[20]



A pesar del valor negativo de ΔG_0 , que nos indica que el equilibrio favorecerá la formación de amoníaco, la reacción es extraordinariamente lenta, y para que se lleve a cabo se necesitan temperaturas de 450 °C y presiones que van de 200 a 1000 atmósferas. El amoníaco así obtenido se utiliza ampliamente en la fabricación de fertilizantes, explosivos, fibras sintéticas, etc., de tal manera que la cantidad total de amoníaco producido por la industria química viene a ser de unas 5×10^7 Tm/año.

Los seres vivos, en concreto las llamadas *bacterias fijadoras de nitrógeno*, realizan un proceso que globalmente es análogo al de Haber, fijando el nitrógeno atmosférico a compuestos amínicos como los aminoácidos, pero en una magnitud global mucho mayor; por esta vía se incorporan aproximadamente 1.75×10^8 Tm/año. Lo realmente notable es que este proceso tiene lugar a presión atmosférica y a la temperatura del suelo, que es donde residen las bacterias capaces de realizar esta función (géneros *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Clostridium*, etc.). Estas cifras nos dan idea de la extremada eficiencia de los catalizadores

biológicos, capaces de reducir la energía de activación hasta hacer posible un proceso a temperatura y presión ambientales que de otra forma (e incluso en presencia de catalizadores metálicos) requiere unas condiciones mucho más extremas, y por tanto, consumidoras de energía.

1.2.3.4 Catálisis homogénea y heterogénea

Se suele distinguir entre catálisis homogénea, en la cual toda la reacción tiene lugar en la misma fase físicoquímica, y catálisis heterogénea, en la cual la reacción ocurre en una interfase (líquido-sólido, gas-sólido, gas-líquido), también llamada *catálisis de superficie*. La catálisis homogénea de mayor interés para nosotros es la que tiene lugar en solución, y particularmente la *catálisis general ácido-base* o la *catálisis específica ácido-base*, que estudiaremos con mayor detenimiento en un capítulo posterior.

La catálisis heterogénea tiene lugar en superficies, normalmente de partículas sólidas finamente divididas (con lo que se incrementa la superficie activa del catalizador), mediante la adsorción de moléculas a dicha superficie. De esta manera los reactivos se encuentran a una concentración local mucho mayor en la superficie del catalizador y en orientaciones óptimas para producir la reacción. Aun cuando no podemos discutir con la extensión adecuada este tema, es importante señalar que el primer tratamiento cuantitativo sobre la adsorción a sólidos fue el publicado por **Langmuir** en 1916; según este autor, la adsorción de gases a sólidos sigue la relación

[21]

$$\theta = \frac{bP}{1 + bP}$$

en donde θ es la fracción de sitios en el sólido ocupados por el gas, es decir, el cociente (nº de sitios ocupados/nº de sitios totales), b es una constante empírica (determinada a partir de medidas experimentales), y P es la presión parcial del gas (equivalente a lo que en una solución sería su concentración). Al estar definida para una temperatura dada, la relación [21] recibe el nombre de *isoterma de adsorción de Langmuir*.

No es exagerado afirmar que esta relación es una de las más importantes en el campo de la química biológica. Como veremos, en la catálisis enzimática hay componentes de catálisis homogénea (general y específica ácido-base, por ejemplo), y de catálisis heterogénea (puesto que la reacción se lleva a cabo en una zona concreta de la superficie del enzima). Por esta última razón, las mejores descripciones cuantitativas de la catálisis enzimática se hacen en base a expresiones análogas a la isoterma de adsorción de Langmuir (por ejemplo, la ecuación de **Michaelis-Menten**):

[22]

$$v = \frac{V_{\max} s}{K_m + s}$$

que relaciona la velocidad de una reacción enzimática, v , con la concentración de sustrato, s , y dos constantes empíricas, K_m y V_{\max} , y que estudiaremos muy detenidamente en los siguientes capítulos. Obsérvese que al dividir ambos miembros de la ecuación [22] por V_{\max} , obtenemos

[23]

$$\frac{v}{V_{\max}} = \theta = \frac{s}{K_m + s}$$

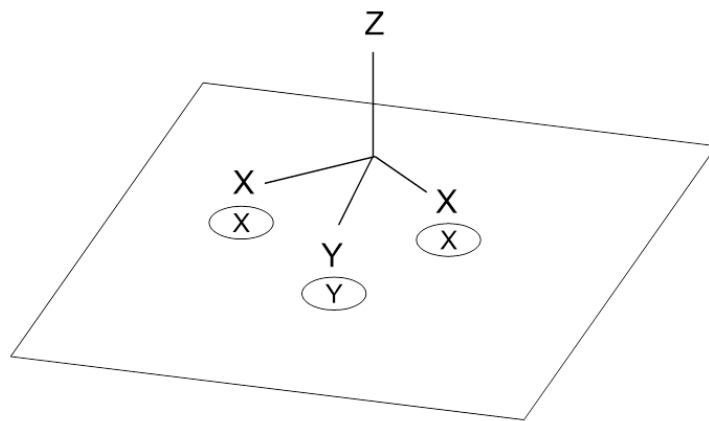
dividiendo numerador y denominador por K_m , y llamando $b = 1/K_m$,

[24]

$$\theta = \frac{bs}{1 + bs}$$

Análoga a la isoterma de adsorción de Langmuir en [21].

CAPITULO 2: Catálisis enzimática: términos, conceptos y características generales



Los seres vivos se caracterizan por llevar a cabo varios miles de reacciones químicas diferentes, a cuyo conjunto damos el nombre de metabolismo. Estas reacciones no tienen lugar aleatoriamente; en líneas generales, los fines que persiguen son los siguientes: (a) proveer a la célula de energía en una forma directamente aprovechable; (b) sintetizar los elementos plásticos necesarios en la estructura celular; (c) generar y procesar señales informativas a efectos regulatorios y adaptativos; y (d) propagar y mantener la información genética propia de la especie. La mera enumeración de estos fines nos da una idea de la complejidad de los sistemas bioquímicos, y de las complicadas reagrupaciones moleculares que tienen lugar en el metabolismo. Todas las reacciones que en un momento dado tienen

lugar en la célula cursan, como es lógico, en el sentido de un incremento negativo en energía libre en la forma definida por la ecuación 1.2 del capítulo anterior. Ahora bien, la gran mayoría de ellas serían extremadamente lentas para el ritmo temporal propio de los seres vivos; por eso todas ellas, o al menos la gran mayoría, son reacciones catalizadas, y llamamos enzimas a estos catalizadores. Pero a diferencia de otros catalizadores que emplea la Química, las enzimas tienen la particularidad de ser específicas para cada reacción. No sería rigurosamente exacto, pero tampoco muy alejado de la realidad, afirmar que en el metabolismo hay tantas enzimas como reacciones; en otras palabras, cada reacción tiene su enzima específica. Uno de los criterios exigidos cuando se propone teóricamente una vía metabólica estriba en el hallazgo de una enzima específica para cada uno de los pasos postulados.

En este capítulo vamos a tratar de ofrecer una idea de las características más relevantes de la catálisis enzimática, como la naturaleza proteica de las enzimas, su especificidad y su eficiencia como catalizadores. Antes de entrar a estos apartados, vamos a definir algunos términos comúnmente empleados en Enzimología, y de los que se hará amplio uso en el presente estudio.

2.1 Conceptos y términos

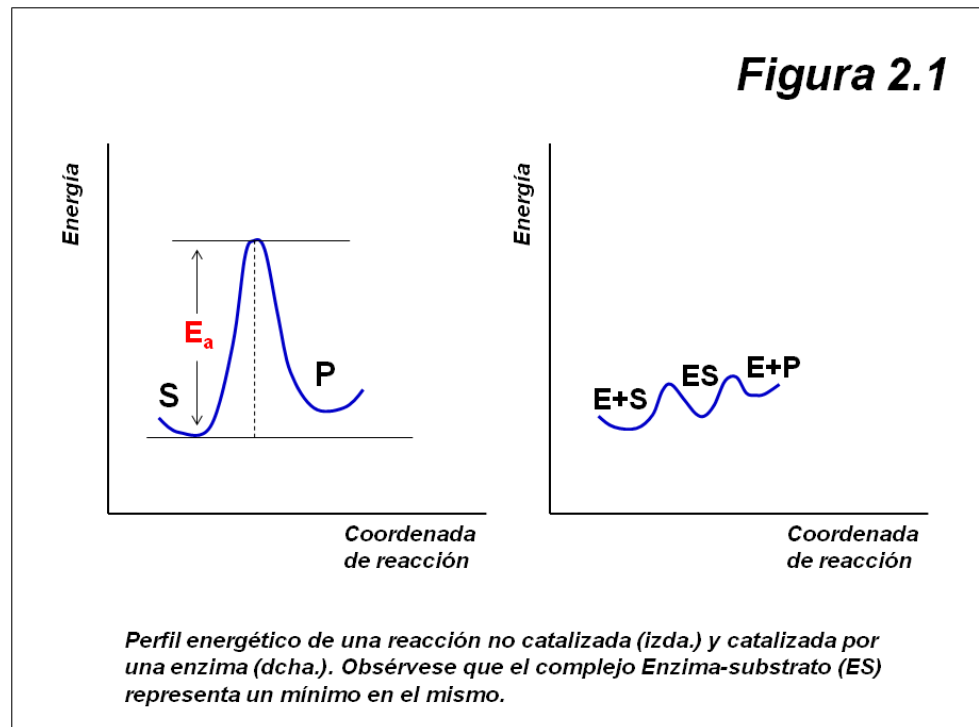
2.1.1 Enzima

Siguiendo la definición de **Dixon y Webb**, llamamos enzima a "*una proteína dotada de actividad catalítica debida a su capacidad de activación específica*". Son varios los puntos que merecen comentario en esta definición.

En primer lugar, y ya desde el principio hacemos alusión al carácter proteico de las enzimas. Este concepto predominó en la Bioquímica hasta que en la década de los 80 del pasado siglo se descubrieron RNAs con actividad catalítica (*ribozimas*). No obstante, casi todas las enzimas conocidas son proteínas, y en este curso partiremos de esa base. En la mayoría de los casos, la actividad enzimática se debe a los grupos químicos propios de las proteínas. Esto no excluye que en determinadas ocasiones (a) la actividad catalítica esté ligada a grupos no proteicos asociados a la enzima; o bien (b) el caso citado de las ribozimas, moléculas de RNA dotadas de actividad catalítica. Pero estas excepciones no contradicen en absoluto el principio antes citado. Más adelante se discutirá con mayor profundidad este concepto.

Al hablar de "capacidad de activación" estamos dando a entender la acción propia de todos los catalizadores, esto es, la disminución en la energía de activación. Pero también aludimos al modo de acción concreto de las enzimas. Como veremos, la acción enzimática procede gracias a la formación de un complejo enzima-sustrato, que no hay que confundir con el "complejo activo" de la cinética química; el complejo enzima-sustrato (complejo ES)

es una entidad bastante más estable, y representa un mínimo local de energía potencial en la coordenada de reacción (figura 2.1), a diferencia del complejo activo, que es un máximo.



Por último, el adjetivo "específica" se refiere a una característica general y propia de todas las enzimas, consistente en su capacidad para catalizar sólo una o unas pocas reacciones similares (a diferencia de los catalizadores convencionales) y que se tratará más adelante con mayor detenimiento. Su generalidad es motivo suficiente para que entre en la definición de enzima.

2.1.1 Substrato

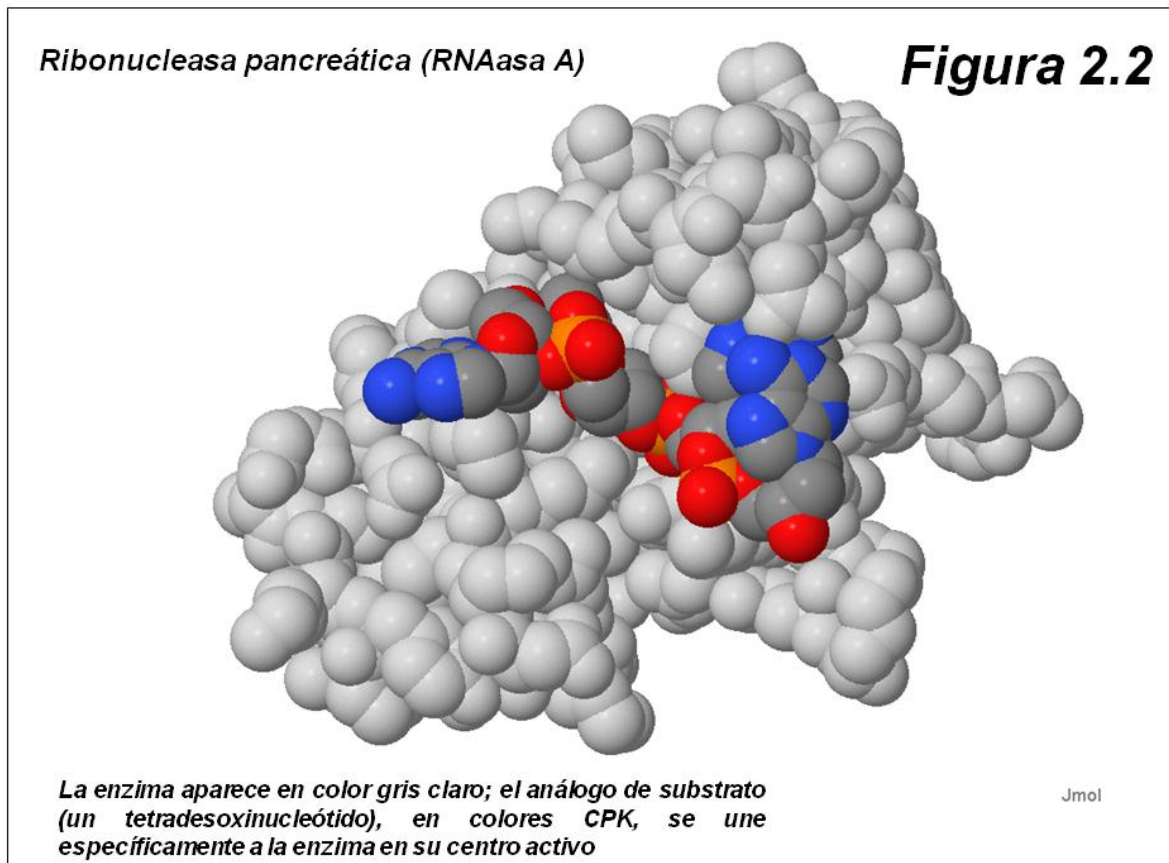
Denominamos substrato a la sustancia sobre la que actúa la enzima, y a quien se refiere por otra parte la especificidad de la misma. Téngase en cuenta que la gran mayoría de las enzimas tienen más de un substrato; las reacciones estrictamente monosustrato son la excepción. Igualmente, el substrato entra a formar parte del complejo ES al interactuar con los grupos activos de la enzima.

2.1.3 Centro activo

Es la región de la molécula de enzima que fija el substrato y contiene los grupos químicos que lo transforman. Nótese que el concepto de "centro activo" indica un carácter heterogéneo en la catálisis enzimática, en el sentido de que el substrato es fijado a la molécula de enzima en un sitio específico. Como veremos, la razón molecular de la especificidad radica en la configuración tridimensional, altamente precisa, del centro activo. En líneas generales, existe un solo centro activo por molécula de enzima o protómero (véase más adelante). Conviene pensar en el centro activo como realizando dos funciones: una, la

fijación específica del sustrato; otra, su transformación. En muchos casos estas funciones no son estrictamente dissociables; aún así, nuestra idea de la catálisis enzimática se ve facilitada por esta distinción.

Hoy día disponemos de las estructuras tridimensionales de muchas enzimas. Muy a menudo se logra la cocrystalización de la enzima con su sustrato o un análogo del mismo. En la figura 2.2 se presenta la estructura de la ribonucleasa pancreática unida a un análogo de sustrato, un oligodesoxinucleótido (que se fija a la enzima pero no reacciona por no disponer de un 2'-OH).



2.1.4 Protómero

Es éste un término introducido por **Monod, Wyman y Changeux**. Alude a que al poseer estructura cuaternaria la mayor parte de las enzimas, a veces de una gran complejidad, llamamos protómero a la mínima parte de la molécula capaz de exhibir actividad enzimática, o lo que es lo mismo, la parte de la molécula que configura un único centro activo. Protómero y subunidad son, en ocasiones, equivalentes: así, la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa de músculo de conejo posee cuatro subunidades idénticas, todas ellas activas. Pero en otras ocasiones, como en la aspartato transcarbamilasa, un protómero consta de más de una subunidad; la enzima necesita dos subunidades tipo C (la estructura cuaternaria es C_6R_6) para configurar un centro activo. Las

asociaciones de protómeros y subunidades tienen un importante papel en los fenómenos de regulación enzimática.

2.1.5 Actividad enzimática

Entendemos por actividad enzimática la *velocidad* con que transcurre una reacción catalizada por una enzima. Nótese que excluimos cualquier otro significado que pueda atribuirse al término "actividad"; una enzima muy activa, en el presente estudio, significa que está catalizando muy rápidamente una reacción. La velocidad de una reacción enzimática es en todo momento directamente proporcional a la concentración de enzima; por tanto, *la actividad es una medida de la concentración de enzima*.

La actividad enzimática se expresa en unidades de velocidad (concentración/tiempo). En principio se utilizaban unidades arbitrarias, derivadas del método de ensayo, y a la unidad se le solía dar el nombre del autor del método. Así se hablaba de unidades Bodansky, unidades Karmen, unidades Rosalki, etc.etc. Posteriormente se normalizó la medida de la actividad enzimática en (a) la Unidad Internacional y (b) el katal.

La *Unidad Internacional* (UI) es la actividad enzimática que transforma un μmol de sustrato por minuto a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y en condiciones óptimas de pH. Esta unidad fue la recomendada por la I.U.B. hasta que con la adopción del sistema SI de unidades fue necesario definir el *katal*.

El *katal* (kat) es la actividad enzimática que transforma un mol de sustrato por segundo, sin referirse a ningún otro tipo de condición. Puede observarse que el katal es una unidad muchísimo más grande que la UI ($1\text{ kat} = 6.10^7\text{ UI}$). Por esa razón se prefieren submúltiplos del mismo, como el μkat o el nkat .

Es importante insistir en la equivalencia actividad - concentración. Ya hemos tenido ocasión de comentar que en muchas circunstancias patológicas el contenido celular de los tejidos dañados se vierte a la sangre, y por esa razón podemos estimar la magnitud del daño midiendo la cantidad de una enzima "marcadora" presente en el suero. Resulta a veces sorprendente que esta cantidad sea medida como "UI/L" o " $\mu\text{kat/L}$ ". Pero dada la proporcionalidad directa entre actividad y concentración enzimática, tan válida es esta forma de expresión como la de $\mu\text{g/L}$ o mg/L , por ejemplo.

2.1.6 Actividad específica, actividad molecular, número de recambio

Se define la actividad específica como la actividad por unidad de masa de proteína en la preparación enzimática. Es éste un término ampliamente utilizado en la purificación de enzimas. En una preparación cruda de enzima, existe una gran cantidad de proteína contaminante, que no tiene nada que ver con la enzima que tratamos de purificar. A medida que la purificación avanza, vamos eliminando la proteína contaminante. Si la purificación va bien, se conserva la actividad enzimática pero aumenta la actividad

específica. Es obvio que la actividad específica a lo largo de una purificación llega a un límite superior correspondiente a la actividad intrínseca de la enzima pura.

Cuando conocemos el peso molecular de la enzima, podemos medir la actividad molecular como actividad enzimática por mol de enzima. Si conocemos el número de centros activos por molécula de enzima, podremos expresar la actividad del centro catalítico como moles de sustrato transformados por mol de centro activo y por segundo. Esta última medida de actividad era conocida también como *número de recambio* o *número de "turnover"*.

2.1.7 Inhibidor

Es el agente cuya presencia en la reacción hace disminuir la actividad enzimática. Existen inhibidores que alteran irreversiblemente la estructura de la enzima y su efecto, por tanto, no desaparece al eliminar el inhibidor. Son los llamados *inhibidores irreversibles*. Otros, por el contrario, se fijan reversiblemente a la molécula enzimática y su efecto desaparece cuando son eliminados: son los *inhibidores reversibles*. El estudio de la inhibición enzimática es de suma importancia, y le dedicaremos todo un capítulo.

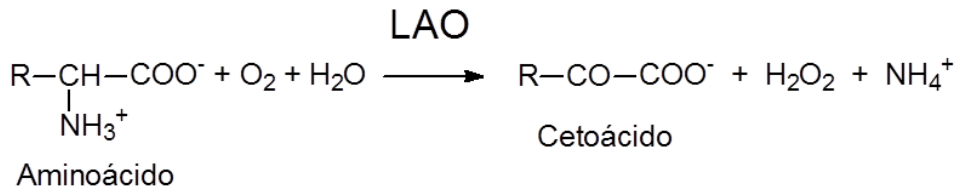
2.1.8 Activador

Es el agente cuya presencia en la reacción hace que aumente la actividad enzimática. El fenómeno de activación es un tanto más ambiguo que el de inhibición, ya que en algunas ocasiones se trata de un componente cuya presencia en la reacción es obligatoria, como por ejemplo los activadores metálicos, mientras que en otras es un efector de alguna regulación fisiológica, o incluso un agente capaz de restaurar la estructura nativa de la proteína enzimática, perdida en parte por las maniobras experimentales de purificación y ensayo (caso de los compuestos -SH como mercaptoetanol y ditioneitol).

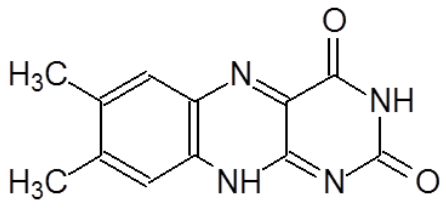
2.1.9 Coenzima

Es un componente adicional, aparte de enzima y sustrato, que es necesario para la reacción enzimática, y que tiene la particularidad de participar en muchas reacciones enzimáticas diferentes (aunque generalmente del mismo tipo). Algunas de ellas (como los nucleótidos flavínicos, figura 2.3) suelen volver al estado original al término del ciclo reactivo, y hay autores que reservan el término *coenzima* para éstas. Otras, por el contrario, aparecen modificadas al término de la reacción (como los nucleótidos de nicotinamida, figura 2.4) y en la misma línea sería preferible el término de *cosustrato*; ambos tipos de agentes, en conjunto, serían los *cofactores*. En el presente trabajo, sin embargo, no se hará esta distinción terminológica, y utilizaremos indistintamente estos términos.

Figura 2.3

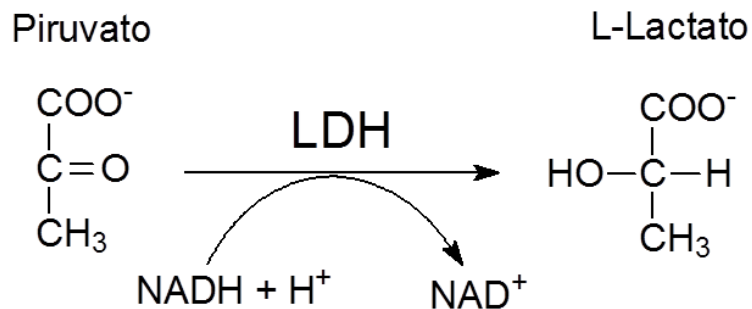


LAO: L-aminoácido oxidasa: una flavoproteína



Las flavoproteínas tienen un grupo prostético flavínico, que interviene en el proceso catalítico sin salir modificado del mismo (coenzima).

Figura 2.4



LDH: Lactato deshidrogenasa

Utiliza como cofactor NADH, el cual sale de la reacción oxidado a NAD⁺. La regeneración a NADH requeriría otra enzima (cosubstrato).

Ya desde aquí es interesante señalar la relación que existe entre los términos de *coenzima* y

vitamina. Muchas coenzimas tienen estructuras químicas complejas que no pueden ser sintetizadas por nuestro organismo. Por lo general, no se trata de toda la molécula, sino tan solo de una parte. Esta porción no sintetizable debe necesariamente ingresar en el organismo con la dieta, y por ello son factores obligatorios en la alimentación: muchos de ellos son lo que llamamos vitaminas. Ahora bien, conviene no confundir los términos: ni todas las coenzimas son vitaminas, ni todas las vitaminas forman parte de coenzimas, al menos en el sentido restringido en el que han sido definidos aquí.

2.1.10 Isoenzima

Las grandes vías metabólicas son comunes a todos los seres vivos, y se llevan a cabo gracias a enzimas que catalizan la misma reacción aunque tengan estructuras moleculares diferentes. Pero este fenómeno no se da solamente entre diferentes especies, sino entre diferentes órganos y tejidos del mismo individuo. Así, por ejemplo, la hexokinasa (ATP:D-hexosa fosfotransferasa), enzima que permite la entrada de glucosa en el metabolismo a través de su transformación en glucosa-6-fosfato, presenta diferentes formas según el tejido de procedencia: hexokinasa cerebral, hexokinasa muscular, hexokinasa hepática, etc., cada una de ellas con diferente estructura molecular.

2.2 Naturaleza química de las enzimas

Hoy día sabemos por un impresionante cúmulo de evidencia que la gran mayoría de enzimas son proteínas. Este concepto, que hoy se da por hecho, ha recibido sin embargo a lo largo de muchos años, hasta aproximadamente la mitad del siglo pasado, múltiples ataques que curiosamente se han basado en la extremada eficiencia catalítica de las enzimas. Así, durante las primeras décadas del siglo, no se disponía de métodos suficientemente sensibles para la detección de las minúsculas concentraciones proteicas que se dan en algunas preparaciones enzimáticas purificadas. Por tanto, al persistir en ellas sin embargo una apreciable actividad enzimática, podía ser lógico pensar que la actividad catalítica no estaba ligada a las proteínas; en todo caso, éstas podrían ser un mero "soporte" de la actividad enzimática. Este hecho, unido al estudio químico de muchos enzimas en los que el centro activo estaba constituido por un grupo prostético (flavínico o porfirínico, por ejemplo), y por tanto, no proteico, eran los principales argumentos que se esgrimían contra el concepto de la naturaleza proteica de las enzimas.

Sin embargo, dicho concepto ha prevalecido de tal manera que hoy nadie duda de la naturaleza proteínica de las enzimas. El fallo en la detección de proteína era debido, como se dijo, a la inadecuación de los métodos cuantitativos para detectar cantidades muy pequeñas de proteína, junto con las impresionantes cifras de actividad molecular de algunos enzimas. En cuanto a los grupos prostéticos detectados en algunos enzimas, hoy día sabemos que son efectivamente parte del centro activo enzimático, pero su reactividad y su

función biológica, en definitiva, se deben al entorno proteico de la *apoenzima* (Cuando una enzima presenta un grupo prostético, denominamos *holoenzima* a la enzima completa, y *apoenzima* a la parte específicamente proteica de la misma).

Repasaremos a continuación las principales líneas de evidencia que nos llevan a afirmar categóricamente la naturaleza proteica de las enzimas.

1. Una de las primeras observaciones a este respecto fue que la actividad enzimática puede ser eliminada de una preparación mediante tratamiento de la misma con *enzimas proteolíticas*, como pepsina, tripsina o quimotripsina.

2. Análogamente, la actividad enzimática desaparece de las muestras biológicas con aquellos tratamientos capaces de *desnaturalizar* las proteínas: calor, interfases, solventes orgánicos, reactivos de grupos -SH, urea, guanidina, extremos de pH, etc.

3. Los mismos procedimientos que se emplean en la purificación y aislamiento de proteínas son los adecuados para la purificación de enzimas; por ejemplo, precipitación isoeléctrica, precipitación salina, cromatografía y electroforesis. En estadios avanzados de purificación, por ejemplo, la electroforesis de proteínas llega a presentar una única banda a partir de preparaciones enzimáticas purificadas.

4. El *peso molecular* de las enzimas, en aquellos casos en que puede ser determinado, es compatible con una estructura proteica.

5. Un importantísimo avance en la determinación de la naturaleza química de las enzimas fue la cristalización de la ureasa por **Sumner** en 1926. A falta de otros métodos más avanzados para definir criterios de pureza, durante mucho tiempo se consideró que la obtención de un compuesto en estado cristalino era la máxima purificación posible. Una enzima en estado cristalino, y dando todas las reacciones propias de una proteína, constituyó una importante evidencia a favor de la naturaleza proteica de las enzimas. Hoy sabemos que los primeros cristales de Sumner contenían muchas impurezas. No obstante, su trabajo fue seguido por los estudios de **Northrop** y **Kunitz** sobre la cristalización de enzimas proteolíticas digestivas. Hoy día se cuentan por centenares las enzimas que han podido ser purificadas hasta la cristalización; todas ellas son proteínas.

6. La prueba definitiva de estructura que se exige en Química es la síntesis a partir de la estructura postulada. Pues bien, esto se consiguió por vez primera en el caso de la *ribonucleasa pancreática*. Independientemente, los grupos de **Merrifield**, en la Universidad Rockefeller, y de **Denkewalter** y **Hirschmann** en la Compañía Merck, consiguieron la síntesis por medios químicos de esta enzima. Las propiedades de la enzima sintética, incluidas por supuesto las catalíticas, son idénticas a la enzima natural.

7. Al aplicar a enzimas cristalinas los métodos de difracción de rayos X para el conocimiento de su estructura terciaria, no solamente se ha comprobado su estructura proteica. Los estudios de **Phillips** sobre la *lisozima* de clara de huevo, pioneros en este campo, pudieron

determinar incluso la disposición molecular de los grupos enzimáticos en relación a la estructura molecular del sustrato, comprobando la complementariedad estereoespecífica entre unos y otros y el papel determinante de algunos residuos en la acción catalítica. Se dispone hoy día de estudios similares con muchas otras enzimas; los avances en cristalografía de rayos X han llegado al punto de que la auténtica dificultad de los mismos sea lograr la cocrystalización de enzima y ligando (sustrato o análogo estructural del mismo).

2.3 La especificidad de las enzimas

La característica diferencial más llamativa de las enzimas en relación a los catalizadores inorgánicos radica en su especificidad. La mayor parte de las enzimas son únicamente capaces de actuar sobre un sustrato dado o a lo sumo sobre moléculas muy parecidas al mismo. No obstante, existen grados diferentes de especificidad, que van desde la absoluta de aquellas enzimas que sólo pueden actuar sobre un único sustrato a la relativa de aquellas otras que reconocen a lo sumo un determinado grupo químico, como éster o amida. Veremos a continuación algunos datos referentes a la especificidad enzimática.

2.3.1 Especificidad sobre estereoisómeros

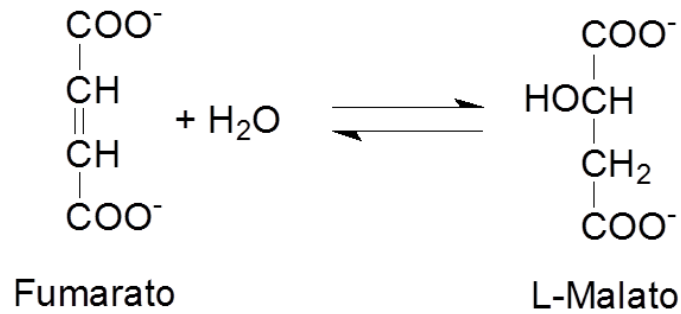
Cuando el sustrato tiene un centro de asimetría, la especificidad suele ser absoluta si el grupo atacado está sobre el carbono asimétrico. Así, las reacciones de oxidación de los hidroxácidos que contienen el grupo -CHOH- suelen ser absolutamente específicas hacia el isómero L- o hacia el D-, no actuando la enzima en absoluto sobre el enantiómero. Si el carbono asimétrico está relativamente lejos del grupo atacado en la reacción enzimática, la especificidad ya no es tan absoluta y puede haber un cierto grado de reactividad por parte del enantiómero; en otras ocasiones éste se comporta como *inhibidor competitivo*.

Por otra parte, las enzimas son capaces de llevar a cabo síntesis asimétrica, es decir, de generar un solo enantiómero a partir de un grupo simétrico. Por ejemplo, en la reducción del piruvato llevada a cabo por la lactato dehidrogenasa, encontramos que sólo se produce L-lactato (en el caso de la enzima de fuentes animales) o D-lactato (en la enzima procedente de bacterias). Esta reacción se presenta en la figura 2.4.

La especificidad suele ser absoluta asimismo en el caso de isómeros geométricos (isómeros cis-trans) cuando el grupo atacado es el que porta el doble enlace. Un caso particularmente llamativo es el de la fumarato hidratasa, que presenta especificidad cis-trans absoluta hacia el fumarato y especificidad óptica absoluta hacia el L-malato (figura 2.5)

Figura 2.5

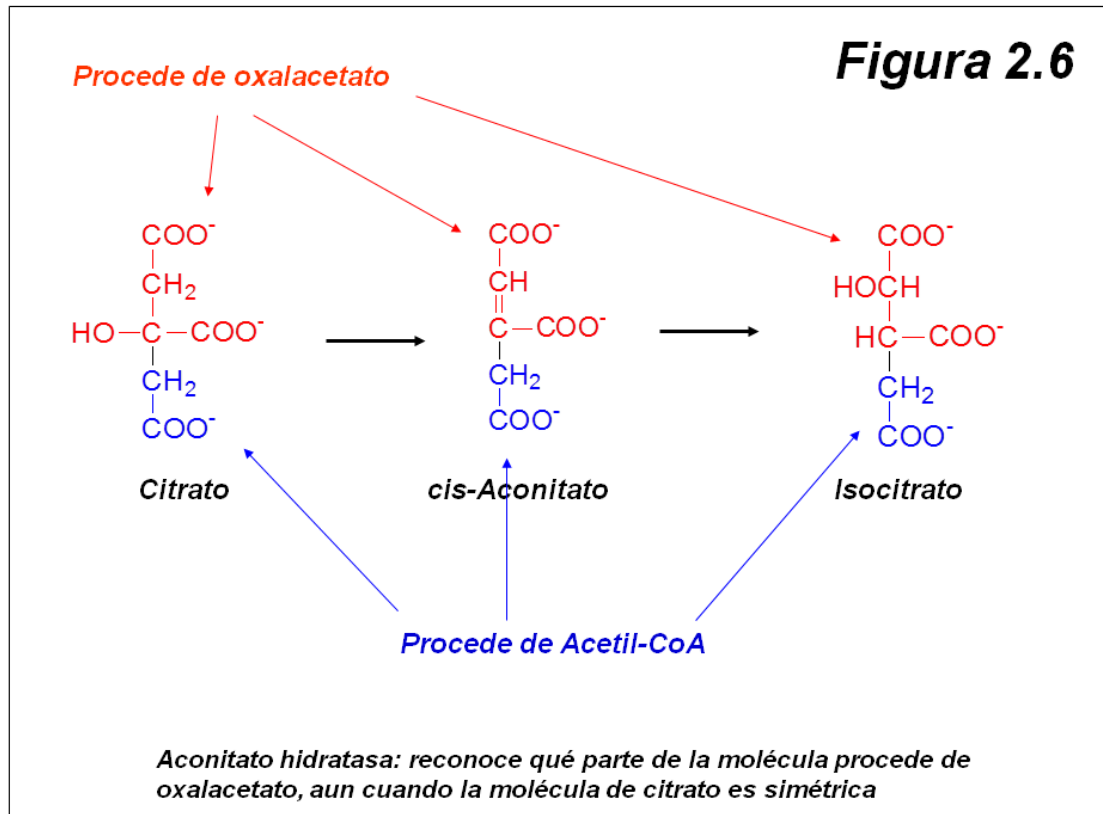
Especificidad absoluta:



Fumarato hidratasa: Específica hacia el isómero L- del malato y hacia el isómero trans- del fumarato.

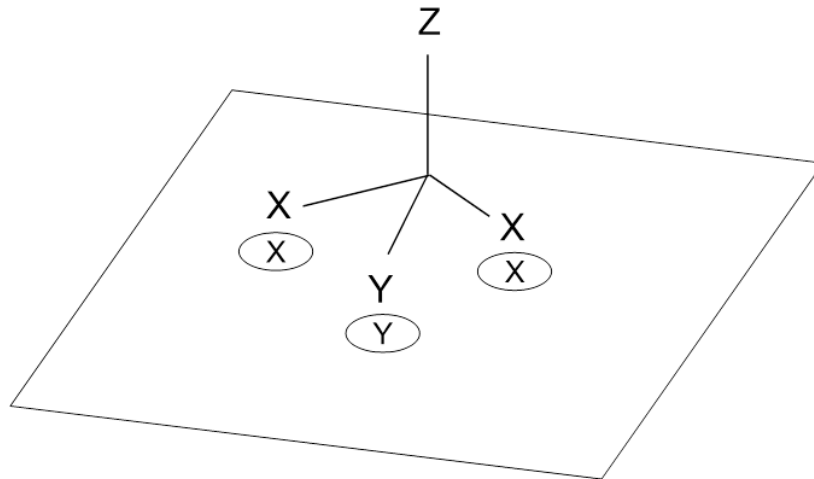
2.3.2 Proquiralidad

Las enzimas son capaces de diferenciar grupos iguales en moléculas simétricas, lo cual es imposible por medios químicos convencionales. Así, en la molécula de citrato, la enzima aconitasa ataca al grupo $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ que procede de oxalacetato, mientras que no actúa sobre el grupo idéntico procedente de acetato (véase figura 2.6).



Ogston ha explicado el fenómeno de proquiralidad en el sentido expresado en la figura 2.7: Cuando un carbono C está sustituido por dos grupos **x**, un grupo **y** y un grupo **z** (es decir, cuando su estructura puede representarse como **Cx₂yz**), caben dos formas de interacción con el centro activo de la enzima en el caso en que sean necesarios tres de los cuatro grupos para la fijación. Sólo una será la forma correcta, y de ese modo la enzima reconocerá como distintos los dos grupos idénticos.

Figura 2.7



Explicación del fenómeno de proquiralidad: cuando en la fijación a enzima intervienen dos grupos idénticos (X) y otro diferente (Y) la acción enzimática tiene lugar sobre Y y no sobre Z.

2.3.3 Especificidad relativa

Algunas enzimas, particularmente *esterasas*, *fosfatasas* y *peptidasas* tienen una especificidad muy débil hacia sus substratos. Así, las enzimas citadas únicamente reconocen en sus substratos los grupos $-CO-O-$ (esterasas), $-CO-NH-$ (peptidasas) o $-CH_2-O-PO_3H_2$ (fosfatasas). No obstante, existen algunas enzimas de estos tres grupos que presentan especificidad absoluta hacia sus substratos.

2.3.4 Especificidad en enzimas multisubstrato

Cuando la enzima cataliza una reacción multisubstrato (lo cual es más regla que excepción en Bioquímica), la especificidad suele ser absoluta hacia todos ellos. Esto ocurre particularmente con las *deshidrogenasas* y las *quinasas* (bisubstrato) y las *sintetasas* (trisubstrato). Como es lógico, existen también excepciones a esta regla. La alcohol deshidrogenasa es completamente específica hacia uno de sus substratos, la coenzima NAD^+ , pero admite muchos tipos de alcohol como segundo substrato.

2.3.5 Especificidad en secuencias de nucleótidos

Un interesantísimo grupo de enzimas, las *endonucleasas de restricción*, ampliamente

utilizadas en la moderna tecnología genética, reconocen secuencias específicas en los ácidos nucleicos, a veces de hasta doce pares de nucleótidos. Así, la enzima *EcoRI*, enzima de restricción obtenida de *E.coli*, es capaz de reconocer específicamente la secuencia

-GAATTC-
-CTTAAG-

Por otra parte, las *aminoacil-tRNA sintetasas* son capaces de reconocer una secuencia específica en el tRNA propio del aminoácido que activan; esta secuencia se sabe que es diferente del anticodon.

2.4 Otros aspectos de la catálisis enzimática

Ya mencionamos anteriormente que una de las características más sobresalientes de las enzimas es su extraordinaria eficiencia como catalizadores. Las actividades molares de las enzimas oscilan entre 10 moléculas por segundo y centro activo para las más lentas hasta cifras tan altas como 10^8 moléculas por segundo y centro activo para las más rápidas. Este hecho, unido a la ya comentada especificidad de las reacciones enzimáticas, hace que muchos campos de la tecnología moderna, particularmente los relativos al procesado de alimentos o el reciclaje de residuos, por citar sólo algunos, estén muy interesados en la catálisis enzimática en un doble sentido: (a) utilización de enzimas naturales aisladas de fuentes biológicas; (b) estudio de los mecanismos enzimáticos al objeto de mejorar procesos artificiales.

Por otra parte, las enzimas son catalizadores polivalentes en el sentido de que son muchos los tipos de reacciones catalizadas por ellos, a pesar de que los mecanismos intrínsecos de la catálisis enzimática son relativamente pocos. Entre las reacciones catalizadas encontramos: reacciones redox, transferencia de grupos, hidrólisis, deshidrataciones y decarboxilaciones, fosforolisis, condensaciones aldólicas, reacciones de radicales libres, polimerizaciones, etc.etc.

2.5 Teorías sobre la acción enzimática

El carácter proteínico de las enzimas lleva a pensar en una interacción entre el sustrato y una porción de la superficie de la proteína enzimática (el centro activo) para explicar la acción de las enzimas. Por otra parte, el estudio cinético de las reacciones enzimáticas nos muestra (como veremos en capítulos posteriores) que la acción procede a través de la formación de un complejo enzima-sustrato; para una reacción monosustrato,



donde **E** es la enzima, **S** el sustrato, **P** el producto de la reacción y **ES** el complejo enzima-sustrato. La suposición de que la reacción tiene lugar en la superficie de la molécula de enzima da un carácter de catálisis heterogénea a la acción enzimática, y de ahí que su velocidad pueda expresarse por una relación análoga a la isoterma de adsorción de **Langmuir**, como veremos al estudiar la cinética enzimática (la ecuación de **Michaelis-Menten**).

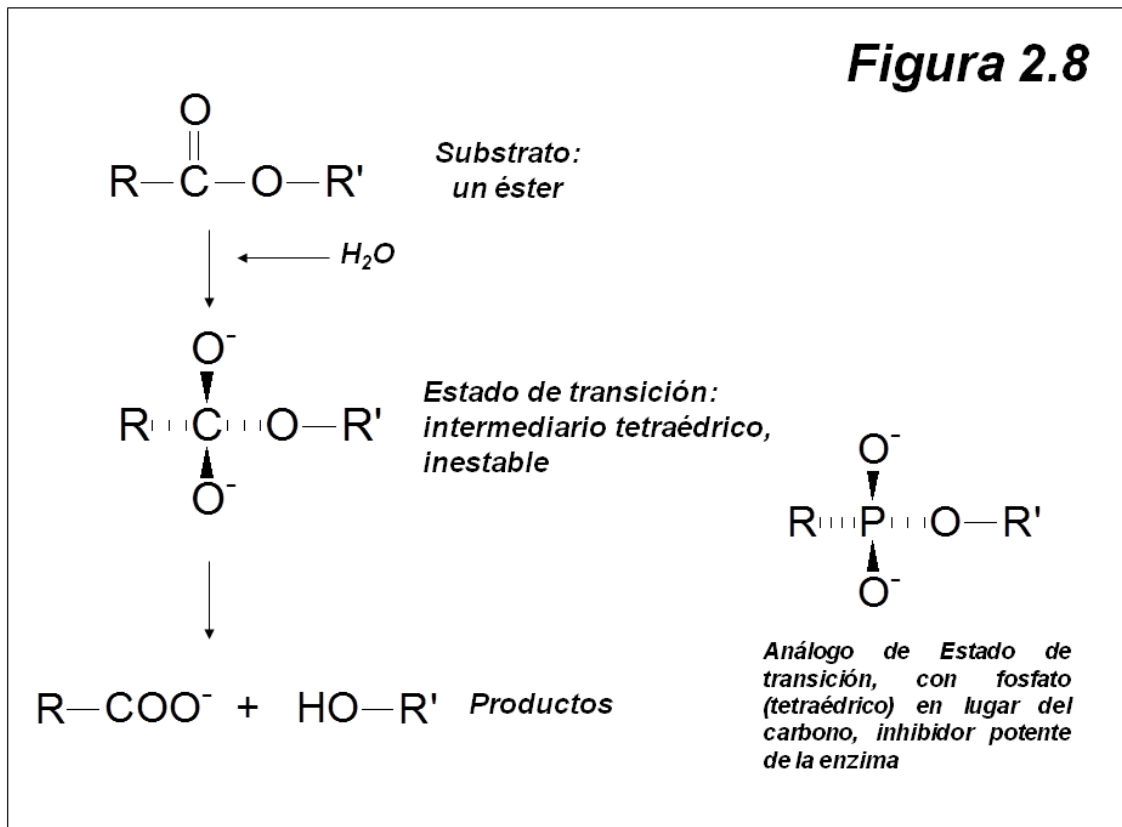
Pero por otra parte, la especificidad de las reacciones enzimáticas nos indica que la interacción enzima-sustrato está mediada a través de una disposición altamente precisa de los grupos químicos de la enzima, de forma que sólo pueden entrar al centro activo las moléculas que encajen perfectamente en los mismos. De esta forma, una pequeña variación en la estructura molecular del sustrato podría impedir su fijación al centro activo.

Estas ideas fueron adelantadas por **Emil Fischer** en 1894, cuando propuso su conocida analogía de la *llave y la cerradura* para explicar la especificidad enzimática; una enzima es específica hacia su sustrato de la misma forma que una cerradura sólo puede ser abierta por una llave determinada. Esta idea se ha mantenido básicamente inalterada durante décadas, y ha dado lugar a lo que podríamos llamar el *modelo de interacción estereoquímica* que explica no sólo la acción enzimática, sino muchos otros fenómenos biológicos que tienen lugar a través de la interacción de una proteína y un ligando (por ejemplo, la acción hormonal y el efecto de fármacos).

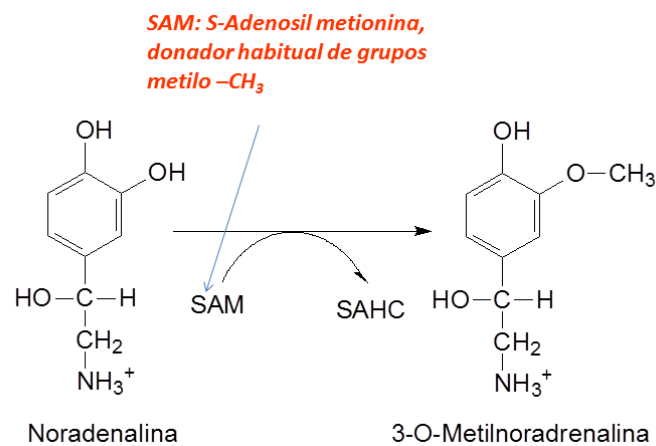
A pesar de su general aceptación, el modelo de llave y cerradura no explica algunos fenómenos en Enzimología. Para eliminar estos inconvenientes **Koshland** en 1959 amplió la hipótesis de llave y cerradura para dar origen a la *teoría del ajuste inducido*, según la cual, la fijación del sustrato al centro activo altera la configuración de la enzima de modo que acerca los grupos encargados de su transformación a sus objetivos específicos. Este punto de vista está más de acuerdo con lo que hoy sabemos de la estructura proteica, que imaginamos mucho más flexible que lo que se suponía; y asimismo encaja con el modo de acción de los llamados *efectores alostéricos*. Esto no quiere decir que se haya abandonado la idea de llave-cerradura; de hecho, la acción de muchas enzimas se puede explicar en esa línea; el ajuste inducido no ha hecho sino ampliar su significado; en un símil mecánico, podríamos hablar de llaves y cerraduras *flexibles* para exponer nuestro actual concepto de la acción enzimática.

La teoría del ajuste inducido conduce a un desarrollo ulterior sobre la acción enzimática. Ésta puede ser descrita en términos de *estabilización del estado de transición*. El estado de transición es una especie química inestable, situada en un máximo de energía potencial, con una configuración tridimensional que no es ni la de los reactivos ni la de los productos, sino una forma intermedia. Así, la fijación al centro activo de la enzima depende de la disposición estereoquímica precisa y complementaria de una serie de grupos químicos. Esta complementariedad se refiere, pues, sobre todo al *estado de transición*, y no a los reactivos o

productos en su estado basal. Este concepto será analizado más detenidamente en el capítulo 6 de esta obra, cuando se hable de los llamados análogos de estado de transición, poderosísimos bloqueadores de la acción enzimática (figura 2.8).



CAPÍTULO 3: Clasificación y nomenclatura de las enzimas. Reacciones enzimáticas



3.1 Principios generales de clasificación y nomenclatura de enzimas

A lo largo del s.XIX y durante gran parte del XX no se disponía de una nomenclatura o clasificación sistemática de las enzimas. El nombre de cada enzima reflejaba vagamente la reacción catalizada en el mejor de los casos, y no era en absoluto extraño encontrar nombres nacidos directamente de la jerga del laboratorio descubridor: *diastasa* (separador, por separar dextrinas solubles a partir de almidón insoluble); *Zwischenferment* (enzima intermedia), *Gelbferment* (enzima amarilla), y otros que aún siguen hoy en plena vigencia a pesar de su inadecuación o su falta de sistemática descriptiva: *catalasa*, *pepsina*, *tripsina*, etc. En otras ocasiones se pretendía reflejar el género o especie biológica de procedencia; así, la *ficina*, un grupo de enzimas proteolíticas extraídas del género *Ficus*, o la *papaína*, aislada del latex de la papaya. Por último, y ya de una forma semisistemática, se intentaba

denominar a la enzima por el sustrato atacado y añadiendo al mismo el sufijo -asa: *ureasa*, *maltasa*, *tirosinasa*, etc. El inconveniente de esta forma de denominación era obvio: no daba ningún detalle sobre el tipo de reacción catalizada.

Para tratar de poner orden y dar lugar a un criterio uniforme de clasificación, en los años 50 del siglo pasado se constituyó en el seno de la I.U.B. una Comisión para redactar una serie de reglas a partir de las cuales la denominación de las distintas enzimas fuera inequívoca. Esta Comisión (*Enzyme Commission, E.C.*) presentó sus primeras propuestas al V Congreso de la IUB celebrado en Moscú (1961), propuestas que han sido revisadas y perfeccionadas varias veces y forman la base de la clasificación que hoy se utiliza, aun cuando estas recomendaciones no son ni mucho menos seguidas al pie de la letra en la bibliografía bioquímica. Muy brevemente expondremos los principios generales de la Clasificación Internacional, que pueden encontrarse en las direcciones web <http://www.expasy.ch/enzyme/> (Base de datos ENZYME en el entorno ExPASy), y <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (Nomenclatura de enzimas en la página de la IUPAC – IUBMB).

3.1.1 Nomenclatura

La clasificación de las enzimas se hace sobre la base de la reacción catalizada. Ésta, junto con los sustratos, forma el nombre completo de la enzima. Además de este nombre sistemático, en muchas enzimas se recomienda también un nombre más corto, en general menos descriptivo pero más consagrado por el uso. En todo caso las recomendaciones de la E.C. cuidan que en estos casos no haya ambigüedades o equívocos en la denominación. Además del nombre sistemático y del nombre usual, cada enzima es reconocida por un número sistemático formado por cuatro elementos numéricos separados por punto y precedido de las siglas E.C. Por ejemplo,

Acetil-CoA:colina O-acetiltransferasa (Nombre sistemático)

Colina acetiltransferasa (Nombre recomendado)

[E.C. 2.3.1.6] (Número)

En el nombre sistemático vemos: la reacción catalizada (*O-acetil transferasa*) y el nombre de los sustratos (*acetil-CoA* y *colina*), en orden dador:aceptor. El nombre recomendado, *colina acetiltransferasa*, sustituye al primitivo *colinacetilasa* con el que era conocido esta enzima. El número consta de cuatro elementos; el primero [2] corresponde al *grupo*, en este caso el grupo 2 (transferasas). El segundo y tercer elemento [3] y [1] son *subgrupos* y *sub-subgrupos* de la clasificación; y por último, el cuarto elemento [6], la enzima individual.

Ahora bien, enzimas que catalizan una misma reacción pueden proceder de muy diversas fuentes (microorganismos, vegetales, animales), y varía ampliamente su estructura molecular; igualmente, dentro de un mismo organismo, enzimas que catalizan la misma

reacción pueden corresponder a estructuras moleculares distintas (isoenzimas). Por ello, se suele añadir entre paréntesis la fuente biológica de la enzima, y en su caso el órgano; por ejemplo,

[E.C. 2.7.1.1], ATP:D-hexosa fosfotransferasa, hexokinasa (cerebro de rata)

3.1.2 Clasificación

La clasificación de las enzimas se hace distribuyéndolos en seis grupos conforme a la naturaleza de la reacción catalizada. El número de grupo (1-6) es el que aparece como primer elemento en el número sistemático de la enzima. Estos grupos son los siguientes:

1.Oxidorreductasas; 2. Transferasas; 3. Hidrolasas; 4. Liasas; 5. Isomerasas; y 6. Ligasas.

Pasamos a continuación a un descripción somera de estos grupos y sus principales reacciones.

3.2 Reacciones enzimáticas

En la exposición que sigue, como regla general, no mencionaremos en este apartado a efectos de brevedad enzimas que vamos a encontrar más adelante en el curso, en la parte correspondiente a metabolismo. Se ha seleccionado las reacciones más ilustrativas de la acción de cada grupo.

3.2.1 Grupo 1: Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción, que en el medio biológico tienen lugar a través de la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno de un dador (reductor) a un aceptor (oxidante). Otras veces la reacción consiste en la incorporación de átomos de oxígeno en el sustrato. El nombre sistemático de las oxidorreductasas se forma así:

Dador:aceptor oxidorreductasa

Por ejemplo: *Glucosa: O₂ oxidorreductasa, glucosa oxidasa, [E.C. 1.1.3.4]*

3.2.1.1 Clasificación sistemática de las oxidorreductasas

En el número sistemático de las oxidorreductasas, el primer dígito es el de grupo. Por ello todas ellas llevan el número 1 en dicha posición. El segundo elemento del número sistemático en las oxidorreductasas es el *subgrupo*. En la mayoría de los casos, pero no en todos, los subgrupos dependen de la naturaleza del dador electrónico. Por ejemplo (no exhaustivo):

- 1.1.-.- Actúan sobre grupos alcohol (-CHOH-)
- 1.2.-.- Actúan sobre grupos aldehído u oxo (-CHO, -CO-)
- 1.3.-.- Actúan sobre grupos -CH-CH-
- 1.4.-.- Actúan sobre grupos -CH-NH₂
- 1.5.-.- Actúan sobre grupos -CH-NH-
- 1.6.-.- Actúan sobre NADH o NADPH

Y así hasta 20 subgrupos, constando cada uno, además de varios sub-subgrupos.

En el contexto de esta obra, sería excesivo seguir al pie de la letra las recomendaciones de la EC para hacer una descripción elemental de las enzimas. Se ha presentado esta clasificación únicamente a efectos informativos.

3.2.1.2 Nomenclatura alternativa (recomendada) para las oxidorreductasas

Al tratar de oxidorreductasas es muy frecuente utilizar nombres abreviados o triviales. Ahora bien, estos nombres aluden a categorías de oxidorreductasas que no se corresponden, a veces en absoluto, con la clasificación sistemática. Por su interés, y su uso generalizado, damos a continuación alguno de estos nombres: Deshidrogenasas, Oxidasas, Oxigenasas, Hidroxilasas o Reductasas. En cada caso se citarán una o dos enzimas características de la categoría.

3.2.1.3 Algunas reacciones enzimáticas catalizadas por oxidorreductasas

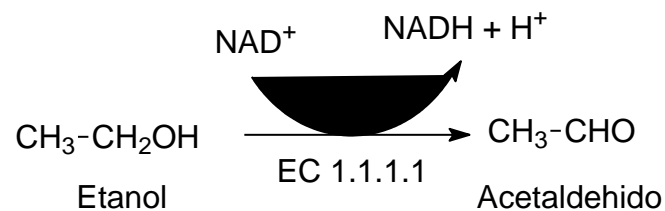
- (a) Deshidrogenasas

La transferencia de electrones catalizada por estas enzimas se hace en forma de átomos de hidrógeno (2 átomos, esto es, dos protones y dos electrones, o un ion hidruro H⁻, un protón y dos electrones). Puede verse que en lo que respecta a la clasificación anterior, podemos

encontrar deshidrogenasas en todos los grupos. Las deshidrogenasas utilizan siempre alguna coenzima; por ejemplo, nucleótidos de nicotinamida (NAD^+ , NADP^+), nucleótidos de flavina (FAD, FMN), ácido lipoico, ácido ascórbico, quinonas, pteridinas, etc.

Un gran número de reacciones redox están catalizadas por deshidrogenasas.

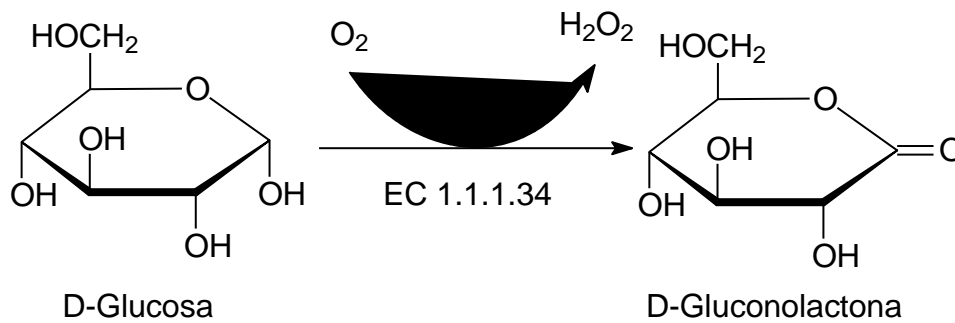
EC 1.1.1.1, Alcohol deshidrogenasa (ADH). Cataliza la oxidación de alcoholes a aldehidos, con NAD^+ como aceptor. Se trata de una importante enzima, implicada en el metabolismo del etanol o alcohol etílico, siendo la última enzima del proceso de fermentación alcohólica. Tiene poca especificidad, dado que es capaz de oxidar un gran número de alcoholes primarios o secundarios y hemiacetales. Es una metaloenzima, que contiene Zn o Fe.



- (b) Oxidasas

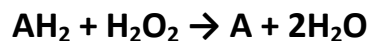
Son las enzimas que utilizan como aceptor electrónico el oxígeno molecular, produciéndose por lo general H_2O_2 o H_2O , o incluso el anión superóxido O_2^- , en el curso de la reacción. Al utilizar O_2 , estas reacciones son aeróbicas, mientras que las catalizadas por deshidrogenasas pueden tener lugar aeróbica o anaeróbicamente. Las oxidasas suelen ser flavoproteínas o metaloproteínas, o ambas cosas a la vez; las reacciones que catalizan suelen ser bastante complejas.

EC 1.1.3.4, Glucosa oxidasa. (GOD) Se trata de una enzima de origen fúngico con una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas. Es una flavoproteína con estructura de homodímero, y utiliza FAD como cofactor. La gran mayoría de los métodos actuales de determinación de glucosa en fluidos biológicos se basa en la reacción catalizada por esta enzima.

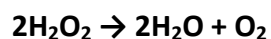


- (c) Peroxidasas

Utilizan peróxidos (R-O-OH) y muy frecuentemente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como aceptores electrónicos. Hemos visto que este último compuesto se produce muy frecuentemente en las reacciones catalizadas por oxidasas, y puede resultar bastante dañino hacia las estructuras celulares. De ahí que sean necesarias enzimas encargadas de su reducción a H_2O . Este papel lo cumplen las peroxidasas. En general, las peroxidasas suelen ser hemoproteínas, es decir, con un grupo prostético porfirínico. Las peroxidasas corresponden al subgrupo 1.11.-.- de la clasificación sistemática.



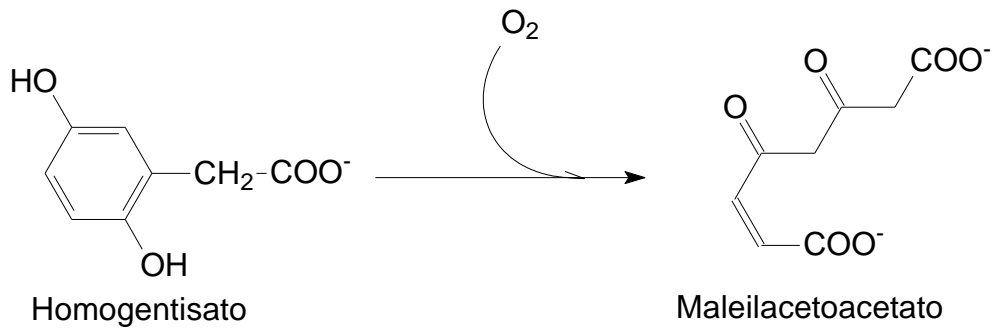
EC 1.11.1.6 Catalasa. Pertenece a este grupo la catalasa, enzima que cataliza la descomposición de H_2O_2 a H_2O y oxígeno molecular O_2 . Es muy abundante en los leucocitos polimorfonucleares, y es la responsable del burbujeo de oxígeno cuando la sangre entra en contacto con peróxido de hidrógeno (agua oxigenada).



- (d) Oxigenasas (no confundir con Oxidasas)

Introducen oxígeno molecular en la molécula de sustrato, lo que resulta normalmente en la apertura de una estructura cíclica cuando la introducción se hace en un enlace doble (dioxigenasas), o bien se introduce un solo átomo de oxígeno y el otro se libera en forma de agua (monooxigenasas). Aparecen en los subgrupos 1.13 y 1.14 de la clasificación sistemática.

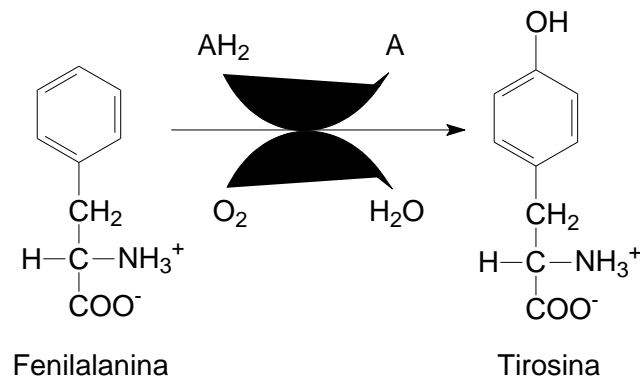
EC 1.13.11.5 Homogentisato-1,2-dioxigenasa. Forma parte de la vía de degradación de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. Su carencia congénita conduce a la enfermedad metabólica conocida como *alcaptonuria*.



- (e) Hidroxilasas

Catalizan la introducción de un átomo de oxígeno a partir de oxígeno molecular con formación de un grupo hidroxilo -OH, al tiempo que un segundo dador electrónico reduce al átomo de oxígeno restante. Como en el caso anterior, corresponden a los subgrupos sistemáticos 1.13 y 1.14.

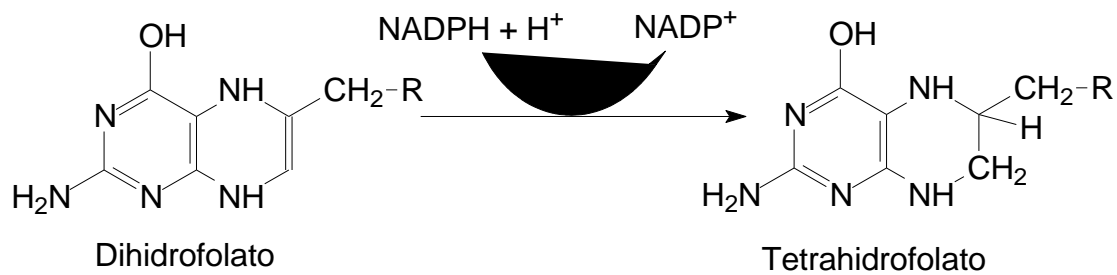
EC 1.14.16.1, Fenilalanina 4-monooxigenasa (Fenilalanina hidroxilasa). Cataliza la formación de tirosina a partir de fenilalanina, introduciendo un grupo hidroxilo- en el anillo bencénico de la fenilalanina. Utiliza como correductor un biopterina reducida (representada por AH₂). Es una enzima clave en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos, y su deficiencia congénita conduce a una grave enfermedad congénita, la *fenilcetonuria*.



- (f) Reductasas

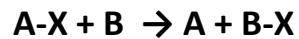
Se trata de un nombre que se asigna sin ninguna sistemática a muchas reacciones catalizadas por oxidoreductasas, cuando la reacción relevante, o de importancia biológica, es una reducción.

EC 1.5.1.3, Dihidrofolato reductasa. Reduce el dihidrofolato a tetrahidrofolato, que es una coenzima activa en la transferencia de grupos monocarbonados, de gran importancia en el metabolismo de nucleótidos (síntesis del anillo purínico). Por ello su inhibición específica se emplea en la quimioterapia antineoplásica, mediante un inhibidor competitivo de esta enzima, el *methotrexate*.



3.2.2 Grupo 2: Transferasas

La reacción general catalizada por este grupo de enzimas es



En rigor, esta reacción general sería asimismo válida para las oxidorreductasas si el grupo transferido X fuera un par electrónico, dos átomos de hidrógeno o un ion hidruro. Asimismo, las hidrolasas catalizan una reacción similar. Igualmente, las reacciones de fosforólisis, similares a las de hidrólisis, son catalizadas por enzimas de este grupo que reciben el nombre de *fosforilasas*. Desde el punto de vista de nomenclatura, las transferasas forman su nombre sistemático como

Dador:aceptor grupo-transferasa

y se clasifican conforme al grupo transferido.

3.2.2.1 Clasificación sistemática de las transferasas

Algunos de los subgrupos más representativos de este grupo son:

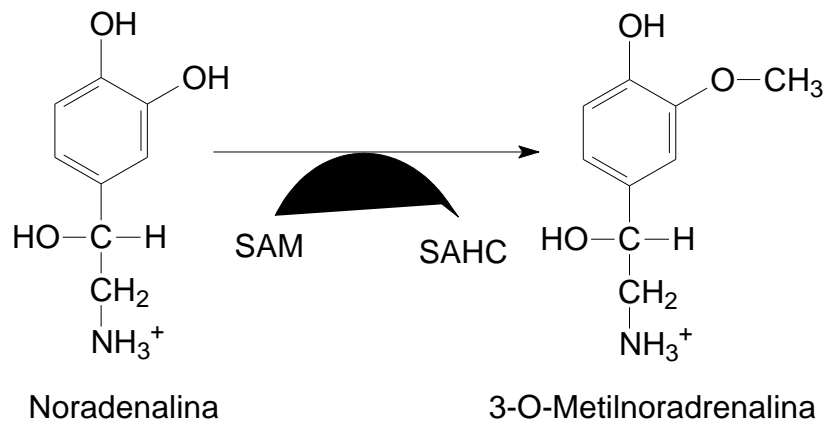
- 2.1.-.-Transfieren grupos monocarbonados (-CH₃, -CHO, -COOH, -CHNH₂, etc.)
- 2.4.-.- Glicosiltransferasas
- 2.5.-.- Transfieren grupos alquil- o aril-, distintos del grupo metil-.
- 2.6.-.- Transfieren grupos nitrogenados
- 2.7.-.- Transfieren grupos fosforados

3.2.2.2 Algunas reacciones enzimáticas catalizadas por transferasas

(a) Subgrupo 2.1: Transfieren grupos monocarbonados

El subgrupo 2.1 comprende a las transferasas de grupos monocarbonados, esto es, que transfieren entre dador y receptor los grupos metilo $-CH_3$, hidroximetilo $-CH_2OH$, formil $-CHO$ y formimino $-CHNH$. Las metiltransferasas utilizan normalmente como dador la coenzima S-adenosil metionina (SAM); las transferencias de los restantes grupos se hacen a partir de coenzimas folínicas. Estos últimos tienen particular importancia en la síntesis de nucleótidos, entre otros procesos.

EC 2.1.1.6 Catecol-O-metiltransferasa (COMT). Transfiere el grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) a un catecol aceptor. SAM se convierte en S-adenosil homocisteína (SAHC). Se trata de una reacción de gran importancia en el catabolismo de aminas neurotransmisoras (catecolaminas), como dopamina, adrenalina y noradrenalina. Esta enzima funciona en combinación con la aminooxidasa (monoaminoxidasa, MAO, EC 1.4.3.4) para dar los distintos catabolitos de estas aminas.



(d) Subgrupo 2.4: Glicosil transferasas

En el subgrupo 2.4 están las glicosiltransferasas, que transfieren restos glicosilo entre dador y aceptor. En ocasiones el aceptor es fosfato inorgánico, y en ese caso hablamos de *fosforilasas*. Estas reacciones suelen ser reversibles en las condiciones intracelulares, de modo que la fosforilasa, por ejemplo, puede catalizar la transferencia de restos glicosídicos desde un éster fosfato a una cadena de poli- u oligosacárido. Otras veces se transfiere todo un segmento oligosacárido, como en el caso de la enzima ramificante del glucógeno. Asimismo, muchas de estas enzimas utilizan como substratos derivados de nucleósido-difosfatos, como el UDP, ADP o CDP. En este subgrupo encontramos enzimas de una gran importancia metabólica; además de las ya citadas fosforilasas, tenemos todos los implicados en la glucuronoconjugación de compuestos, importantísima reacción de los

procesos detoxificantes del organismo.

EC 2.4.1.1 Glucógeno fosforilasa. Esta enzima tiene una extraordinaria importancia metabólica, por cuanto que cataliza la reacción de degradación del glucógeno, hepático o muscular. La reacción de degradación es una fosforolisis (de ahí le viene el nombre a la enzima) realizada sobre un residuo α -1,4-glucosil situado en los extremos no reductores de α -glucanos como amilopectina, amilosa o glucógeno.

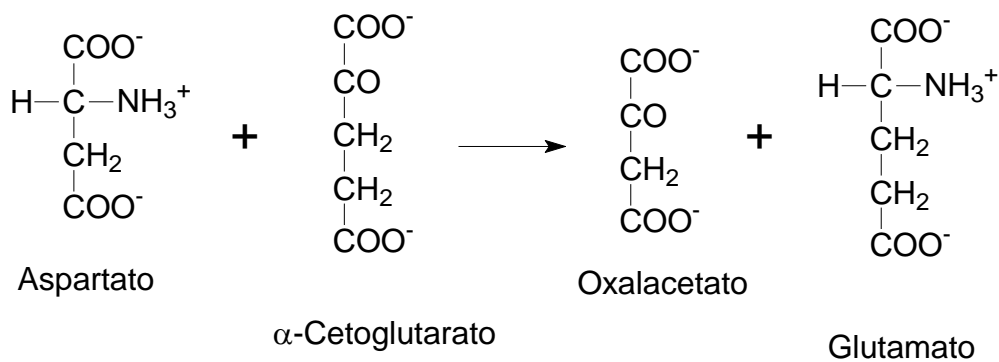
Utiliza como cofactor piridoxal fosfato. La enzima hepática controla, mediante esta reacción, el nivel de glucemia sistémica. Por ello no es de extrañar que sea una enzima fuertemente regulada; alostéricamente, mediante una activación ejercida por AMP e inhibición por ATP, ADP y glucosa-6-fosfato; y lo que es más importante, a través de una compleja cascada de modificaciones covalentes, que se exponen detalladamente en el capítulo 9 de esta obra.



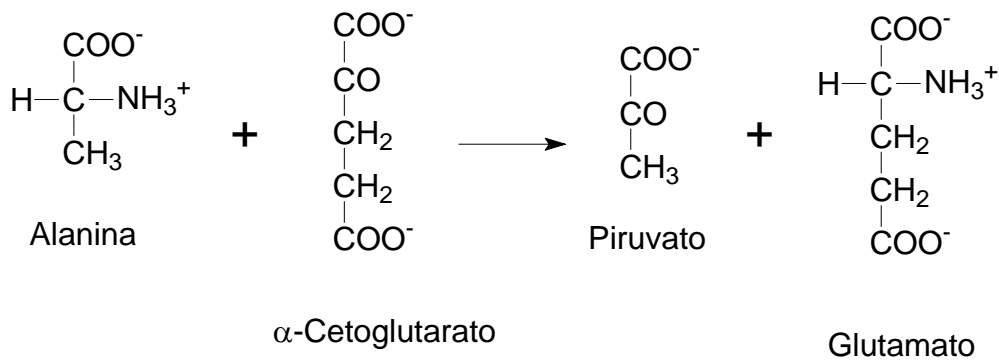
(c) Subgrupo 2.6: transfieren grupos nitrogenados

Otro importante subgrupo de transferasas es el 2.6 que agrupa las enzimas encargadas de la transferencia de grupos nitrogenados, y particularmente el 2.6.1 (*aminotransferasas* o *transaminasas*). Estas últimas catalizan el intercambio de un grupo amino entre un aminoácido y un cetoácido; se trata de reacciones reversibles que utilizan como coenzima el piridoxal fosfato. Una pareja aceptor-dador muy frecuente en estas reacciones es oxoglutarato-glutamato. De esta manera en el catabolismo de los aminoácidos el nitrógeno amínico va concentrándose en forma de glutamato, para formar posteriormente amoníaco libre mediante la glutamato dehidrogenasa. Por otra parte, las aminotransferasas tienen una gran importancia en Bioquímica Clínica, como elementos diagnósticos de enfermedades hepáticas y miocárdicas (v. cap. 14)

EC 2.6.1.1 Aspartato aminotransferasa (AST, glutamato-oxalacetato transaminasa, GOT). Cataliza la transaminación de aspartato (y también fenilalanina, tirosina y triptófano) a 2-oxoglutarato, con formación de glutamato y el correspondiente cetoácido (oxalacetato en caso de aspartato). Es una reacción fácilmente reversible, de gran importancia en el metabolismo de aminoácidos. Es una enzima ampliamente distribuida por todos los tejidos animales, siendo especialmente abundante en el hígado y en el músculo cardíaco. Se trata de un homodímero que utiliza piridoxal fosfato como cofactor (ver cap. 4) y que presenta en eucariotas dos isoenzimas, una citoplásmica y otra mitocondrial. Su determinación se emplea ampliamente en Bioquímica Clínica como marcador de enfermedades hepáticas y cardíacas, aunque su especificidad es menor que la de otras enzimas.



EC 2.6.1.2 Alanina aminotransferasa (ALT, glutamato-piruvato transaminasa, GPT). Se trata de una reacción muy similar a la anterior, aunque el sustrato prácticamente único es la alanina, que cede su grupo amino al 2-oxoglutarato con formación de piruvato y glutamato. Al igual que la AST, requiere piridoxal fosfato, tiene gran importancia metabólica, es un heterodímero y presenta isoenzimas citoplásmica y mitocondrial. Es una enzima inducible por glucocorticoides. A pesar de estar ampliamente distribuída, su valor como enzima marcadora es bastante mayor que el de la AST, dado que es particularmente abundantemente en hígado. Todas las enfermedades del parénquima hepático cursan con elevaciones sustanciales en sangre de la ALT (GPT).

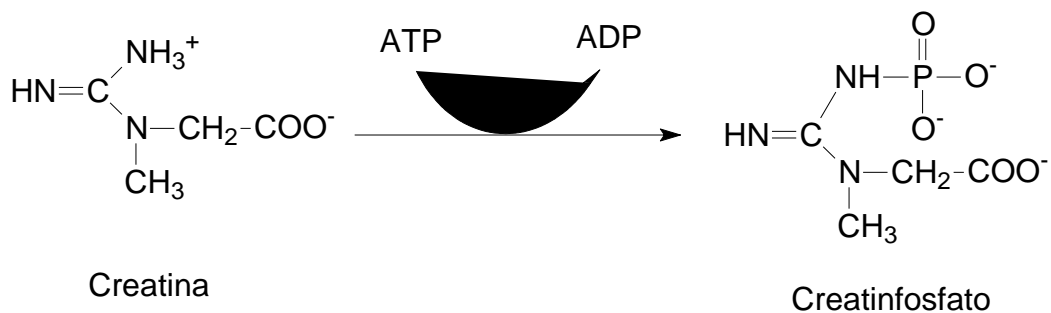


(f) Subgrupo 2.7: Fosfotransferasas o kinasas

El subgrupo 2.7 contiene a unas enzimas de gran importancia metabólica y fisiológica: las fosfotransferasas. Dentro del mismo, los apartados 2.7.1 a 2.7.4 contienen las enzimas llamados comúnmente *kinasas*. Normalmente el compuesto dador es el ATP, o más propiamente, el complejo ATP-Mg²⁺. La importancia de estas enzimas deriva del hecho de ser enzimas activantes de multitud de sustratos, que entran en el metabolismo en forma de ésteres fosfóricos. En el subgrupo 2.7.7 encontramos las nucleotidil transferasas, entre las que se encuentran enzimas como las *DNA polimerasas* y las *RNA polimerasas*.

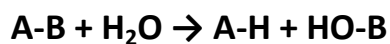
EC 2.7.3.2, Creatinkinasa (CK, Creatinfosfokinasa, CPK). Cataliza la transferencia de un fosfato desde el ATP a la creatina para formar creatinfosfato, un fosfígeno muy abundante en tejidos cuyas necesidades energéticas son grandes y pueden fluctuar ampliamente, como el músculo esquelético, corazón, cerebro y espermatozoides.

Se trata de una enzima homo- o heterodimérica formada por subunidades de tipo B o de tipo M (existen además otros dos tipos de subunidades de origen mitocondrial). Así, las isozimas de la CK pueden ser BB, MB y MM. La isozima BB es predominante en el tejido cerebral, y la MM en el músculo esquelético. La isozima MB está presente en el músculo miocárdico y se utiliza en química clínica como enzima marcadora de infarto de miocardio, siendo su nivel elevado un signo relativamente precoz del mismo, muy específico y con importancia pronóstica.



3.2.3 Grupo 3: Hidrolasas

Son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis. La reacción general catalizada puede representarse como



El nombre de las hidrolasas se forma a partir del sustrato seguido de "hidrolasa". Ahora bien, el nombre común o recomendado de estas enzimas se forma con el nombre del sustrato seguido del sufijo "asa"; es decir, en nombres como ureasa, fosfatasa, amilasa, etc., se entiende que se trata de enzimas hidrolíticas. En muchos casos, particularmente en las proteinasas, se conservan nombres consagrados por el uso sin que tengan ninguna sistemática; por ejemplo, tripsina, pepsina, papaína, ficina, etc.

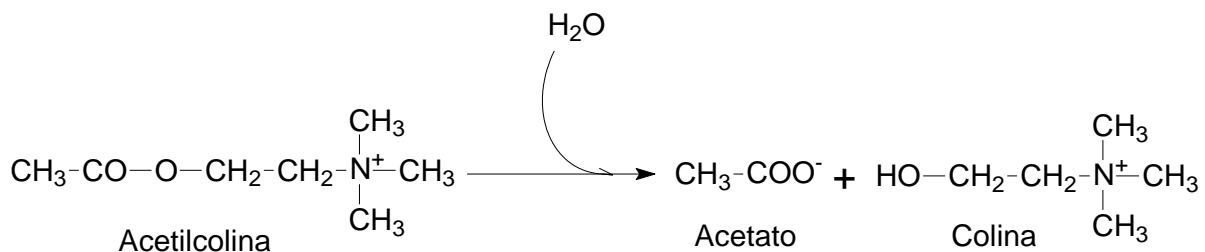
3.2.3.1 Clasificación sistemática de las hidrolasas

Presentamos alguno de los subgrupos más representativos.

- 3.1.-.- Hidrolizan enlaces éster
- 3.2.-.- Glicosidasas
- 3.4.-.- Péptido hidrolasas
- 3.6.-.- Hidrolizan acil-anhídridos

(a) Subgrupo 3.1. Hidrolizan enlaces éster

EC 3.1.1.7, Acetilcolinesterasa. Esta enzima hidroliza la acetilcolina a acetato y colina. y de esta manera se interrumpe la acción de este neurotransmisor en los receptores colinérgicos. Es el inactivador fisiológico de este tipo de sinapsis. Por ello, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (por ejemplo, los organofosfóricos, ver cap. 6) hacen persistir el efecto de la acetilcolina, lo que en la placa neuromuscular se traduce en una activación continua de la misma, produciendo parálisis muscular (y en su caso la muerte a través de la parálisis respiratoria).

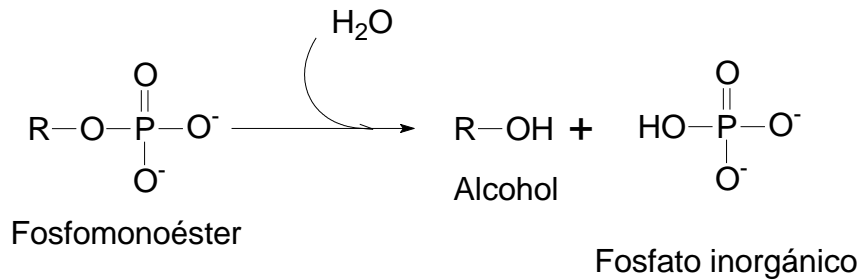


EC 3.1.3.1, Fosfatasa alcalina. Hidroliza una gran variedad de ésteres fosfóricos y se caracteriza por tener un óptimo de pH alcalino (en torno a 10). Requiere para su actividad zinc y magnesio. No se conoce con exactitud la función de esta enzima, que también cataliza transfosforilaciones; no obstante, se cree que tiene un papel importante en los procesos de osificación. Es una enzima muy ampliamente distribuida y se presenta en muchas formas isozimáticas: placentaria, seudoplacentaria, intestinal y tisular (a su vez, con formas hepática, ósea y renal). Es un importante marcador en Bioquímica Clínica, sobre todo de enfermedades del aparato hepatobiliar (p.e. colestasis) y del sistema óseo (enfermedad de Paget, tumores óseos primitivos, metástasis óseas de tumores, etc.)

EC 3.1.3.2, Fosfatasa ácida. Hidroliza una gran cantidad de fosfomonoésteres, y también es capaz de catalizar transfosforilaciones, al igual que la fosfatasa alcalina. La principal diferencia con ésta radica en su pH óptimo, que está entre 5 y 6, y de ahí su nombre. Se conocen varias isozimas de la fosfatasa ácida: las isozimas S y F del hematíe, variantes de la ACP1; la ACP2, o fosfatasa ácida lisosómica; la ACP5, o fosfatasa ácida tartrato-resistente (que aumenta en determinados estados patológicos: enf. de Gaucher, enf. de Hodgkin,

ciertas leucemias linfocíticas); y la ACPP o fosfatasa ácida prostática, que es un marcador característico de los carcinomas prostáticos.

En ambas enzimas la reacción es la siguiente:



Subgrupo 3.2: Glicósido hidrolasas (glicosidasas)

Es un numeroso grupo de enzimas cuya acción consiste en la hidrólisis de enlaces glicosídicos. Tienen un gran interés biotecnológico, en las industrias del almidón, de la celulosa y otros productos naturales (ver cap. 14). Se clasifican en tres subgrupos: 3.2.1, rompen O-glicósidos; 3.2.2 rompen N-glicósidos; 3.2.3, rompen S-glicósidos. El mecanismo de acción de todas ellas es similar, presentando dos residuos de aminoácidos dicarboxílicos (aspártico o glutámico) en el centro activo.

EC 3.2.1.17 Lisozima. Hidroliza los enlaces β -glicosídicos establecidos entre residuos de N-acetilmurámico y N-acetil glucosamina de los peptidoglicanos bacterianos. Se trata de una enzima ampliamente difundida en la naturaleza, desde los bacteriófagos hasta los mamíferos, y cumple una función esencialmente bactericida. Está presente en multitud de secreciones (lágrima, clara de huevo, etc.) y su estructura y función están muy bien estudiadas. Fue la primera enzima que pudo estudiarse mediante cristalografía de rayos X formando complejo con su sustrato.

Subgrupo 3.4: Péptido hidrolasas

En el subgrupo 3.4 encontramos las péptido hidrolasas, que hidrolizan enlaces peptídicos -CO-NH-. Normalmente se distingue entre *peptidasas*, antiguamente llamadas *exopeptidasas*, de las *proteinasas* o *endopeptidasas*. Las primeras hidrolizan los enlaces peptídicos situados en los extremos de la cadena; distinguimos así las *aminopeptidasas*, que operan sobre el N-término, y las *carboxipeptidasas*, que lo hacen sobre el C-término. Las proteinasas operan sobre enlaces peptídicos establecidos en el interior de las cadenas polipeptídicas.

Las péptido hidrolasas se clasifican asimismo atendiendo al mecanismo catalítico. Éste puede ser de cuatro tipos distintos: (1) Presentan una serina en el centro activo, acompañada de una histidina y un residuo dicarboxílico (aspartato o glutamato), constituyendo lo que se llama una *tríada catalítica*. Son las *serin proteinasas*. (2) Poseen en el centro activo un grupo -SH de una cisteína, siendo por lo demás el mecanismo catalítico muy parecido al de las anteriores. Se conocen como *tiol proteinasas*. (3) El sitio activo es un residuo dicarboxílico, normalmente ácido aspártico: son las *aspartil-proteinasas* o *proteinasas ácidas*. (4) Otras tienen un ion metálico, generalmente Zn^{2+} , vital para la actividad catalítica: las *metalloproteinasas*.

(a) Serin proteinasas

EC 3.4.21.1, Quimotripsina. Es una enzima pancreática, producida como zimógeno en las células acinares de este órgano, y que se activa proteolíticamente en la luz intestinal. Es una enzima muy bien conocida, siendo el prototipo de las serinproteinasas. Su centro activo está configurado por los residuos de serina, histidina y aspártico y su modo de acción muy bien estudiado (ver capítulo 7). Tiene preferencia por enlaces -Tyr-X-, -Trp-X-, -Phe-X y -Leu-X.

EC 3.4.21.4 Tripsina. Es asimismo una enzima pancreática, producida como zimógeno que se activa al ser secretado a la luz intestinal por la acción de la propia enzima o de la enteropeptidasa (EC 3.4.21.9). Se trata también de una serin proteinasa con un centro activo y un mecanismo catalítico muy parecido al de la quimotripsina. Rompe enlaces constituídos por un aminoácido dibásico y cualquier otro aminoácido, es decir, -Arg-X y -Lys-X

Entre las serinproteinasas tenemos asimismo una gran cantidad de factores de la coagulación sanguínea, como por ejemplo la *trombina*.

(b) Tiol proteinasas

EC 3.4.22.2 Papaína. Es el prototipo de tiolproteínasa, con un residuo de cisteína en el centro activo y un mecanismo catalítico similar al de las serinproteinasas (ver cap. 7). Se extrae del latex de la papaya. Hidroliza una amplia variedad de enlaces peptídicos y tiene muchas aplicaciones en la tecnología de alimentos. Otras tiolproteinasas de origen vegetal son la *ficina* y la *bromelaína*.

(c) Proteinasas ácidas

EC 3.4.23.1 Pepsina. Es el prototipo de proteínasa ácida(o aspartilproteínasa).Se trata de la enzima propia de la secreción gástrica. Se produce como zimógeno (pepsinógeno) en las células principales de la mucosa gástrica y se activa a través del pH ácido del contenido

gástrico. Presenta cinco isoenzimas distintas, de las cuales la principal es la pepsina A. Tiene preferencia por enlaces establecidos entre aminoácidos hidrofóbicos y o aromáticos en ambas posiciones respecto al enlace roto. Tiene la particularidad de tener un pH óptimo de acción muy bajo, entre 0 y 2.

(d) Metaloproteinasas

EC 3.4.24.7 Colagenasa intersticial. Rompe las moléculas de colágeno en el dominio helicoidal, aproximadamente a las tres cuartas partes de la molécula desde el N-término. Requiere un ion de zinc para su actividad catalítica.

Subgrupo 3.6: Acil anhídrido hidrolasas

En el subgrupo 3.6 encontramos las hidrolasas de anhídridos de ácido. Tienen particular importancia en este grupo las que hidrolizan anhídridos fosfóricos, y sobre todo las adenosin trifosfatasa o ATPasas. Son enzimas ampliamente distribuidas y su acción está acoplada a procesos de transporte iónico y transducción de energía; por ejemplo, la Na^+, K^+ -ATPasa de la membrana plasmática, o la Ca^{++} -ATPasa de la mitocondria.

EC 3.6.1.37 ATPasa transportadora de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (ATPasa bomba de sodio). Se encuentra esta enzima en la membrana plasmática de las células animales, de las que forma parte integral. La hidrólisis de ATP llevada a cabo por esta enzima está acoplada al transporte contra gradiente de Na^+ y K^+ (sodio hacia el exterior y potasio hacia el interior celular). Por esta razón tiene una extraordinaria importancia en todos los fenómenos celulares acoplados al gradiente iónico (como excitabilidad, p.e.). Es un heterotrímero $\alpha\beta\gamma$, y su actividad puede ser inhibida de forma característica por los glicósidos cardiotónicos (*digital*, *ouabaína*, etc.) y por el anión *vanadato*.

EC 3.6.1.38 ATPasa transportadora de Ca^{2+} (ATPasa bomba de calcio). Se encuentra formando parte integral de las membranas del retículo endoplásmico, y su función consiste en bombear contra gradiente iones de calcio hacia el interior de las vesículas. En el músculo cumple una función destacada, ya que es el ion Ca^{2+} el segundo mensajero que induce la contracción muscular. Esta ATPasa vuelve a integrar los iones liberados a sus depósitos en el retículo sarcoplásmico (nombre específico que recibe el retículo endoplásmico en la célula muscular)..

3.2.4 Grupo 4: Liasas

Son enzimas que catalizan reacciones de rotura (o establecimiento) de un enlace de forma que la reacción puede describirse como adición o sustracción de un grupo a o desde un doble enlace, y que normalmente suelen ser reversibles. Se caracterizan por tener un substrato en una dirección y dos en la contraria. Esquemáticamente las reacciones liásicas pueden describirse como



El nombre sistemático de estas enzimas se forma así:

Substrato grupo-liasa

Por ejemplo: *L-Malato hidro-liasa (Fumarato hidratasa, E.C.4.2.1.2)*

Entre los nombre recomendados para estas enzimas, encontramos, por ejemplo, *descarboxilasas*, enzimas que eliminan CO₂; *sintasas* (no confundir con *intetasas*), cuando la reacción relevante es la de unión; *aldolasas*, cuando catalizan condensaciones aldólicas; *hidratasas*, cuando la reacción consiste en una adición de agua a un doble enlace.

La clasificación de las liasas se hace conforme al enlace atacado.

3.2.4.1 Clasificación sistemática de las liasas

- 4.1.-.- Liasas C-C
- 4.2.-.- Liasas C-O
- 4.3.-.- Liasas C-N
- 4.4.-.- Liasas C-S
- 4.5.-.- Liasas C-halógeno
- 4.6.-.- Liasas P-O
- 4.99.-.- Otras liasas

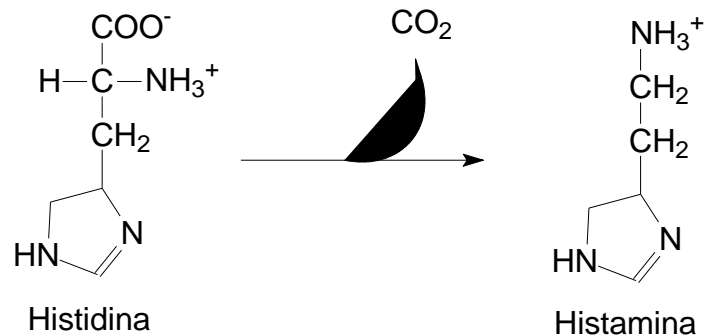
3.2.4.2 Algunas reacciones enzimáticas catalizadas por liasas

(a) Subgrupo 4.1: Liasas C-C

El subgrupo 4.1 contiene varios sub-subgrupos importantes de enzimas. 4.1.1 son las *descarboxilasas*, enzimas que eliminan grupos carboxilo, de gran importancia en el metabolismo. Muchas de ellas utilizan tiamina difosfato o piridoxal fosfato como coenzimas. El sub-subgrupo 4.1.2 son las *aldehido-liasas* o *aldolasas*, que catalizan condensaciones

aldólicas; en 4.1.3 están agrupadas las *oxoácido-liasas*, con enzimas de gran importancia metabólica, como la *citrato sintasa* o enzima condensante. Veremos su acción detallada al estudiar el metabolismo.

EC 4.1.1.22 Histidina descarboxilasa. Cataliza la descarboxilación de histidina para dar histamina. Ésta reacción y otras similares son importantes en la síntesis de numerosos neurotransmisores. Esta enzima es un homodímero que requiere piridoxal fosfato. La histamina es un efector muy potente en los estados alérgicos y anafilácticos.



(b) Subgrupo 4.2: Liasas C-O

El subgrupo 4.2 son las liasas C-O. En el apartado 4.2.1 encontramos las hidro-liasas (*hidratasas* o *dehidratasas*), enzimas que catalizan la adición o eliminación de agua en un doble enlace.

EC 4.2.1.1 Carbonato deshidratasa (anhidrasa carbónica). Esta enzima cataliza la hidratación de CO₂ a ácido carbónico, el cual se disocia inmediatamente en bicarbonato y protón.



Requiere zinc como cofactor, y se conocen al menos siete formas moleculares distintas de la enzima en mamíferos. Tiene una gran importancia fisiológica, ya que participa en el proceso de transporte de gases en sangre, en la secreción de HCl por el estómago y en la excreción renal de bicarbonato.

3.2.5 Grupo 5: Isomerasas

Catalizan reagrupamientos dentro de la misma molécula. A pesar de ser (aparentemente) enzimas monosustrato, muchas veces las reacciones catalizadas por estas enzimas son muy complicadas.

3.2.5.1 Clasificación sistemática de las isomerasas

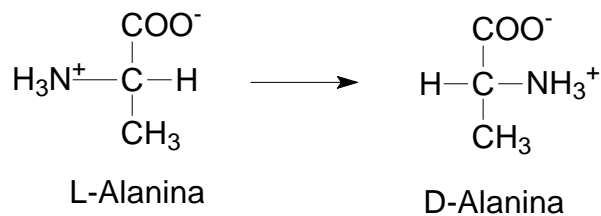
- 5.1.-.- Racemasas y epimerasas
- 5.2.-.- Isomerasas cis-trans
- 5.3.-.- Oxidoreductasas intramoleculares
- 5.4.-.- Transferasas intramoleculares (mutasas)
- 5.5.-.- Liasas intramoleculares
- 5.99.-.- Otras isomerasas

3.2.5.2 Algunas reacciones enzimáticas catalizadas por isomerasas

(a) Subgrupo 5.1: Racemasas y epimerasas

El subgrupo 5.1 contiene las racemasas y las epimerasas, que catalizan la inversión de configuración en un carbono asimétrico. Son importantes las que actúan sobre aminoácidos y sobre monosacáridos o sus UDP-derivados.

EC 5.1.1.1 Alanina racemasa. Presentamos esta reacción como ejemplo de las aminoácido racemasas. Requiere piridoxal fosfato como cofactor. Es una enzima importante en el metabolismo bacteriano, en el que la D-alanina es necesaria en la síntesis del peptidoglicano.



(b) Subgrupo 5.2: Isomerasas cis-trans

En el subgrupo 5.2 encontramos enzimas que catalizan isomerizaciones cis-trans en torno a un doble enlace.

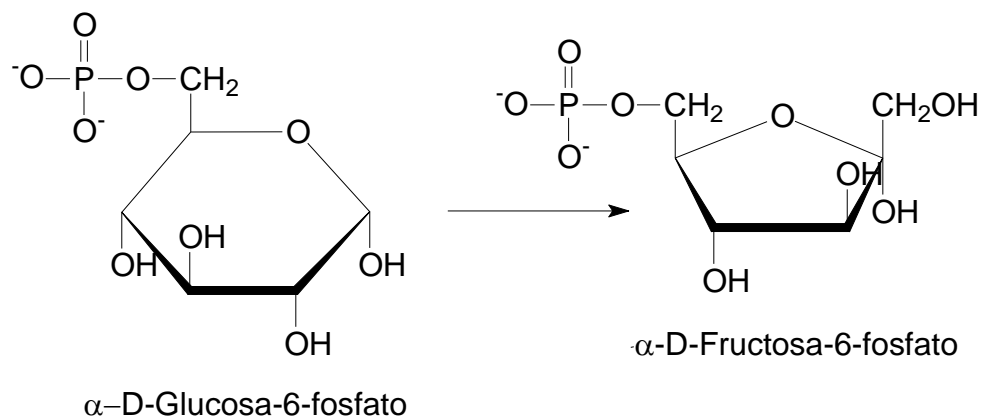
EC 5.2.1.3 Retinal isomerasa. Cataliza la isomerización de *todo-trans*-retinal a *11-cis*-retinal.

Tiene, por esa razón, una gran importancia en el proceso visual, ya que éste consiste en la absorción de un fotón por el isómero 11-cis para dar lugar al todo-trans. La retinal isomerasa regenera la molécula receptora.

(c) Subgrupo 5.3: Oxidorreductasas intramoleculares

Las oxidorreductasas intramoleculares constituyen el subgrupo 5.3; tienen importancia, por ejemplo, las enzimas que interconvierten aldosas en cetosas, o que transfieren dobles enlaces entre carbonos de la misma molécula.

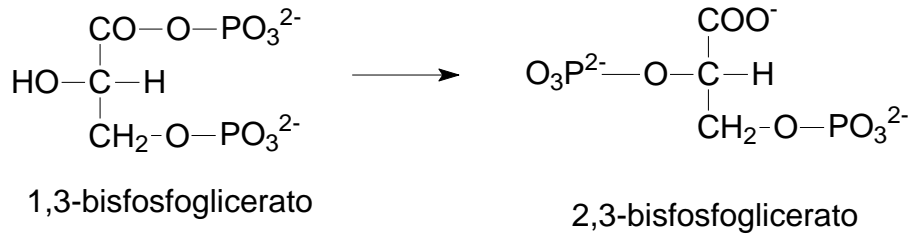
EC 5.3.1.9 Glucosa-6-fosfato isomerasa (fosfoglucosa isomerasa, fosfohexosa isomerasa) Es una enzima de la vía glicolítica encargado de la interconversión entre glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. Es un homodímero. Las formas mutantes de esta enzima son causa de anemias hemolíticas.



(d) Subgrupo 5.4: Transferasas intramoleculares (mutasas)

El subgrupo 5.4 contiene a las transferasas intramoleculares; genéricamente reciben el nombre de *mutasas*. Catalizan la transferencia de un determinado grupo de una parte a otra de la misma molécula.

EC 5.4.2.4 Bisfosfoglicerato mutasa. Cataliza la conversión de 1,3-bisfosfoglicerato en 2,3-bisfosfoglicerato. La reacción tiene lugar de manera que la enzima es en primer lugar fosforilada por 1,3-bisfosfoglicerato para dar fosfoenzima y 3-fosfoglicerato; en una segunda fase, este último es refosforilado en la posición 2. El bisfosfoglicerato es un importante efector alostérico de la hemoglobina, que da lugar a una disminución en la afinidad de ésta por el oxígeno. La ausencia de esta enzima es causa de anemias hemolíticas.



(e) Subgrupo 5.99: Otras isomerasas

EC 5.99.1.2 DNA topoisomerasa. Esta enzima cataliza la interconversión entre distintos isómeros topológicos del DNA, por ejemplo, la relajación de un superenrollamiento negativo. A diferencia de la siguiente, no requiere ATP. Participa en multitud de procesos asociados a la replicación, reparación y recombinación del material genético. Estas acciones las lleva a cabo a través de la introducción de un corte en una cadena (*nick*, melladura) y el cabo roto de DNA se fija transitoriamente a través de un fosfodiéster al grupo fenol de un residuo de tirosina. Posteriormente la cadena rota vuelve a soldarse por acción de la misma enzima.

EC 5.99.1.3 DNA topoisomerasa dependiente de ATP (DNA girasa). Interconvierte isómeros topológicos de DNA a través de la rotura dependiente de ATP de DNA. A diferencia de la anterior, la DNA girasa rompe los dos filamentos del ácido nucleico. Esta enzima puede introducir superenrollamiento negativo o positivo en moléculas de DNA. No aparece en eucariotas. La DNA girasa es inhibida por los antibióticos del grupo de las *quinolonas* (ácido nalidíxico, ciprofloxacino, etc.)

3.2.6 Grupo 6: Ligasas o Sintetasas

Catalizan la unión de dos moléculas concomitante a la hidrólisis de un enlace pirofosfato del ATP u otro nucleósido trifosfato. Para estas enzimas se utiliza el nombre de "*sintetasas*" en contraposición a las "*sintasas*", que son liasas y no requieren la rotura de un enlace rico en energía. Las reacciones catalizadas por las sintetasas suelen ser bastante complejas, ya que son reacciones trisubstrato como mínimo. La reacción general podría describirse como



o bien



Siendo Pi fosfato inorgánico y PPi pirofosfato inorgánico.

3.2.6.1 Clasificación sistemática de las ligasas

Se clasifican conforme a la naturaleza del enlace formado:

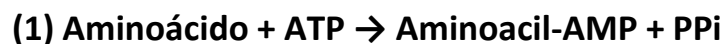
- 6.1.-.- Ligasas C-O
- 6.2.-.- Ligasas C-S
- 6.3.-.- Ligasas C-N
- 6.4.-.- Ligasas C-C
- 6.5.-.- Ligasas P-O

3.2.6.2 Algunas reacciones enzimáticas catalizadas por ligasas

(a) Subgrupo 6.1: Ligasas C-O

El subgrupo 6.1 contiene las ligasas que forman enlaces C-O. Entre ellas, el sub-subgrupo 6.1.1 es el correspondiente a las *aminoacil-tRNA sintetetasas*, enzimas encargadas de la activación de los aminoácidos en la síntesis de proteínas.

EC 6.1.1.1 Tirosina-tRNA ligasa (Tirosil-tRNA sintetasa). Citamos a esta enzima como el prototipo de las aminoacil-tRNA sintetetasas, enzimas encargadas de la unión de un aminoácido a su tRNA específico. La reacción es dependiente de ATP, formándose en una primera fase un aminoacil-adenilato y transfiriéndose después el residuo aminoacil al término 3' del polinucleótido. Estas enzimas son de una especificidad absoluta para sus sustratos, tanto el aminoácido como el tRNA.

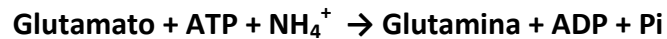


(b) Subgrupo 6.3: Ligasas C-N

Las sintetetasas que forman enlaces C-N están en el subgrupo 6.3. Entre ellas destacan la asparragina- y glutamina sintetetasas, encargadas de la introducción de NH_3 en el carboxilo terminal de aspartato o glutamato.

EC 6.3.1.2 Glutamato-amonio ligasa (Glutamina sintetasa). La actividad de esta enzima consiste en la formación de un grupo amida por unión de amoníaco al γ -carboxilo del ácido glutámico, con formación de glutamina (en dos pasos). Es una enzima de gran importancia

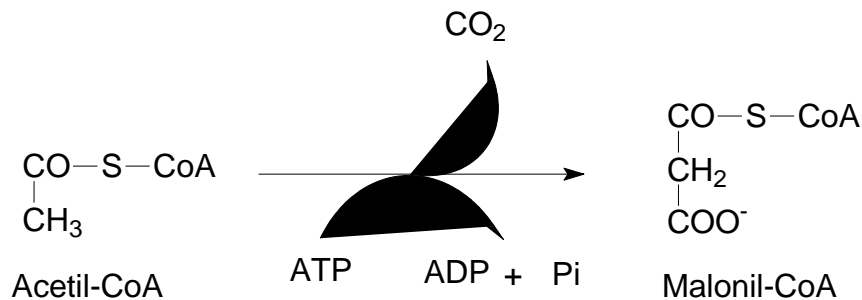
metabólica por cuanto que es un sistema central en el metabolismo nitrogenado. Se encuentra sometida a un complicado sistema de regulación por modificación covalente.



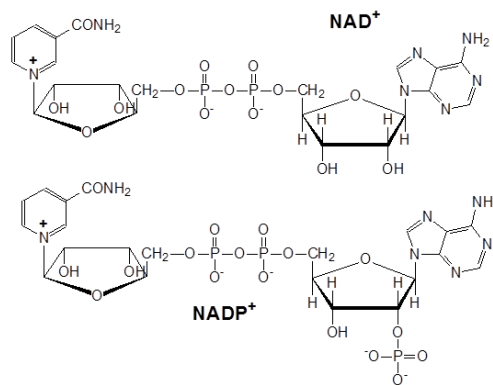
(c) Subgrupo 6.4: Ligasas C-C

El subgrupo 6.4 presenta las enzimas encargadas de formar enlaces C-C, normalmente en reacciones de carboxilación, por lo que las enzimas de este grupo son las llamadas *carboxilasas* (no confundir con las *descarboxilasas*). La mayor parte de ellas contienen *biotina* como grupo prostético.

EC 6.4.1.2 Acetil-CoA carboxilasa. Es una enzima multifuncional. La actividad que nos interesa en este contexto es la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y CO_2 , que es el paso limitante en la biosíntesis de ácidos grasos. Es el prototipo de las enzimas conocidas como carboxilasas. Utiliza, como todas las carboxilasas, *biotina* como cofactor (ver capítulo 4). Es una enzima sometida a regulación, con efectos alostéricos y modificación covalente a través de fosforilación.



CAPITULO 4: Coenzimas o cofactores



4.1 Introducción

Ya hemos visto en el capítulo 2 el significado de estos términos. Una coenzima es una molécula que participa en un determinado tipo de reacciones enzimáticas, generalmente de una de dos maneras distintas: (a) o bien como *grupo prostético*, en cuyo caso suele estar fuertemente unida al centro activo enzimático, a veces de forma covalente, y que en este caso permanece inalterada una vez terminado el ciclo de reacción (es decir, una participación propiamente *catalítica*), o bien (b) como una molécula adicional que actúa como *transportador* entre dos reacciones distintas, catalizadas por enzimas diferentes, de forma que la molécula es modificada en una reacción y regenerada en la siguiente. Hay quien reserva el término de *coenzima* para el primer caso, y de *cosubstrato* para el segundo (y *cofactores* como abarcando a ambos). En el presente trabajo, sin embargo, aplicaremos el término coenzima por igual en las dos categorías. Bien es verdad que en el segundo caso no

está clara la distinción entre sustrato y coenzima; y que definimos a éstas en función de una segunda reacción ulterior que lo puede regenerar. Pero en el caso de las primeras, es decir, los llamados grupos prostéticos, encontramos el mismo comportamiento, salvo que la regeneración se produce sobre el mismo centro activo enzimático, no necesitándose una segunda enzima.

En todo caso, el concepto de coenzima queda en realidad reducido al de transportador de grupos químicos. Casi todas las reacciones enzimáticas pueden ser interpretadas en términos de *transferencia*:



donde el grupo transferido X puede ser, por ejemplo, electrones o equivalentes de reducción en las oxidoreductasas; fosfato, grupos amino, grupos monocarbonados, residuos glicosídicos, grupos acilo, etc., en otras reacciones. Y además, podemos considerar asimismo la existencia de coenzimas (ATP o GTP) que transfieren energía libre química entre unas reacciones y otras. Por lo tanto, es este concepto de coenzimas como transportadores el que nos interesa; otros elementos que puedan participar en la reacción enzimática, como metales, efectores o moduladores, etc., no son considerados coenzimas. También veíamos en el capítulo anterior que las reacciones hidrolásicas pueden interpretarse en términos de transferencia.

Ya adelantamos la estrecha relación existente entre las *vitaminas*, factores dietéticos indispensables, y algunas coenzimas. Siendo éstas por lo general moléculas orgánicas complejas, la síntesis de la totalidad de la molécula es con frecuencia imposible en los distintos organismos; por ello, en muchos casos es necesario el aporte dietético de la totalidad o parte de la molécula coenzimática. Su falta en la dieta da lugar a las llamadas enfermedades *carenciales*, como el *escorbuto*, el *beri-beri*, la *pelagra*, etc. Durante un tiempo se dio mucha importancia a las enfermedades carenciales en la Patología Humana, y por consiguiente, al estudio de las vitaminas como tales en Bioquímica. Hoy preferimos hablar de ello en el contexto más general de las coenzimas. Determinados síndromes carenciales presentan hoy día un interés renovado debido al uso de análogos de coenzimas en la terapéutica (por ejemplo, el antifólico *methotrexate* en la quimioterapia antineoplásica), que desencadenan alteraciones similares a la carencia dietética de los mismos. Por otra parte, existen vitaminas cuya adscripción a coenzimas determinadas es más que dudosa; bien sea por desconocerse su modo de acción, o bien porque su función fisiológica no es lo que se espera de una coenzima en el sentido estricto en que fueron arriba definidos; tal es el caso de los *retinoides* (vitamina A), en los que su participación en el proceso visual no es propiamente una función coenzimática de transportador (en todo caso de *transductor*) y su papel en otros procesos celulares es aún bastante oscuro aunque sin duda importantísimo. Por tanto, en la presente exposición aludiremos al carácter vitamínico allá donde sea pertinente en cuanto a la discusión de las coenzimas.

4.2 Coenzimas asociadas a procesos redox

4.2.1 Coenzimas piridínicas (NAD^+ , NADP^+)

NAD^+ (*Nicotinamido adenil dinucleótido*, *Niacin adenil dinucleótido*) y NADP^+ (*NAD^+ fosfato*) son dos importantes transportadores redox en el metabolismo celular. Actúan fundamentalmente como coenzimas de deshidrogenasas, pero también tienen un importante papel, como veremos, en otros procesos como la ADP-ribosilación de proteínas. En el trabajo clásico de **Harden y Young** de 1904 se establecía que la fermentación acelular de glucosa requería la presencia de un factor termoestable y dializable, que fue bautizado por los autores como *cozimasa*. Purificado posteriormente por **von Euler** y cols. y por **Warburg y Christian** en 1936, su conocimiento quedó complementado por el descubrimiento del NADP por estos últimos autores como factor dializable necesario para la oxidación de la glucosa-6-fosfato en hematíes. Estos dos factores han recibido los nombres de *Coenzima I* y *DPN* (difosfopiridin nucleótido), el NAD^+ , y *Coenzima II* y *TPN* (trifosfopiridin nucleótido) el NADP^+ . Ambas coenzimas están ampliamente distribuidas en todo tipo de células y tejidos; dentro de su papel como transportadores redox, podemos decir en líneas generales que el NAD^+ participa preferentemente en procesos asociados a fermentaciones y respiración, mientras que el NADP^+ , o más bien su forma reducida NADPH , suele proveer el poder reductor necesario para las biosíntesis celulares.

4.2.1.1 Estructura química y modo de acción

La hidrólisis de NAD^+ da lugar a 1 adenina, 1 nicotinamida, 2 ribosa y 2 ortofosfato. La de NADP^+ produce los mismos componentes, pero con 3 ortofosfatos en lugar de dos. En la figura 4.1 se presentan las estructuras de estas dos coenzimas.

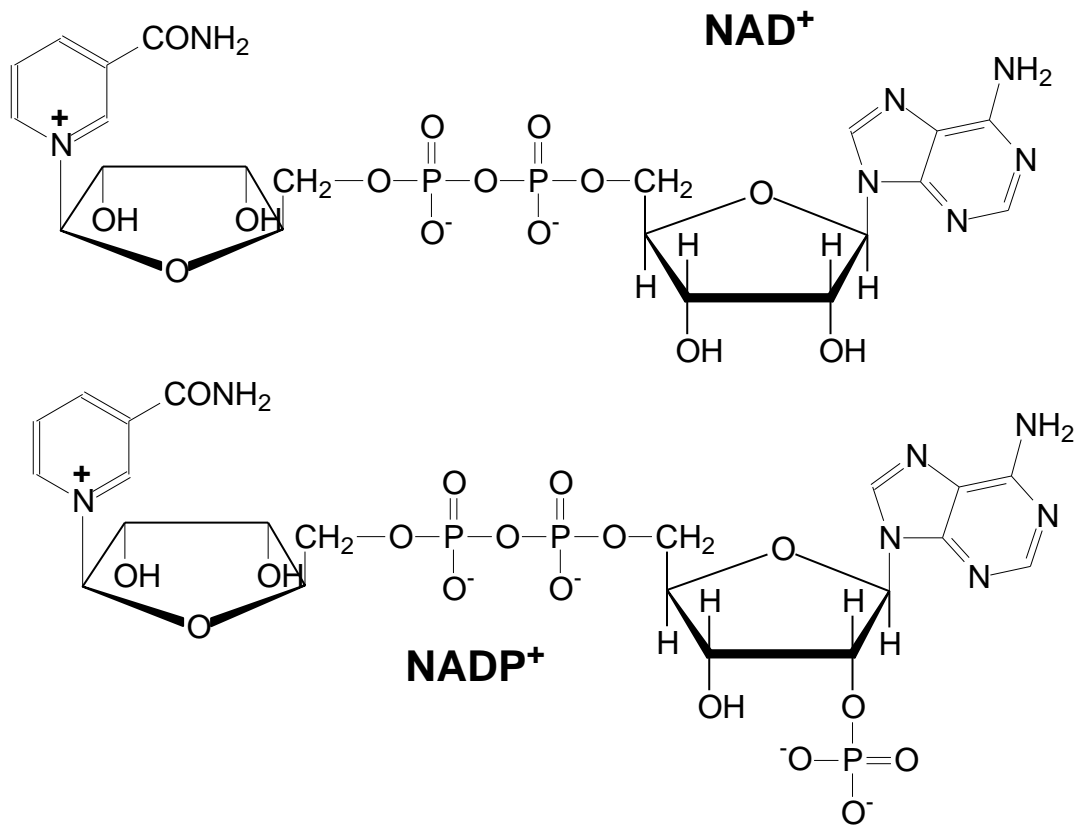


Figura 4.1 Estructura de las coenzimas piridínicas (formas oxidadas)

En el caso del NAD⁺, podemos ver que se trata de un nucleótido de adenina unido a un nucleótido de nicotinamida a través de sus fosfatos. La nicotinamida (también llamada *niacina*) es la *3-amidopiridina* (de ahí el nombre de coenzimas piridínicas). Los enlaces de ambas bases a sus respectivas ribosas son del tipo β-N-glicosídico. La unión glicosídica en α- da lugar a análogos inactivos de estos coenzimas (α-NAD⁺ y α-NADP⁺). En el NADP⁺ el fosfato adicional aparece unido al C-2' de la ribosa adenosínica.

En su forma oxidada, el anillo piridínico de la nicotinamida se presenta en forma catiónica, y de ahí la representación como NAD⁺ y NADP⁺ de los mismos, a pesar de que al pH celular, los fosfatos están ionizados y por tanto estos compuestos presentan una carga neta de -1 el NAD⁺ y -2 el NADP⁺.

Al ser reducidos por un dador electrónico adecuado en presencia de la correspondiente enzima, por ejemplo, etanol y alcohol deshidrogenasa, el anillo piridínico se reduce a una forma quinonoide, desapareciendo la carga positiva y pasando el carbono 4 a una forma metilénica -CH₂- (figura 4.2). Con la reducción hay un aumento significativo de la absorbancia a 340 nm, lo que se emplea para el ensayo de todas las enzimas ligadas a estas coenzimas.

En el curso de la reducción, pues, el substrato que se oxida pierde dos átomos de hidrógeno (dos protones y dos electrones), transfiriéndose a la coenzima un *ion hidruro* (H⁻ un protón y dos electrones) y liberándose a la solución el protón restante.

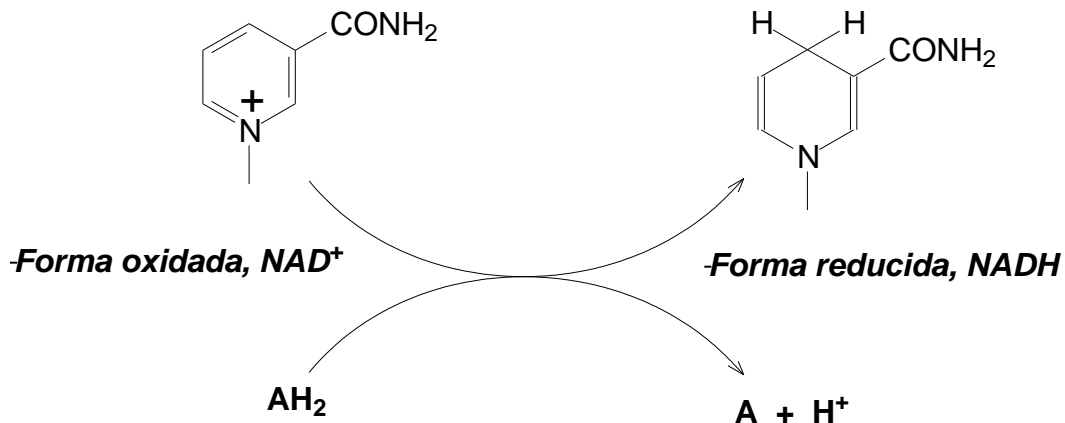
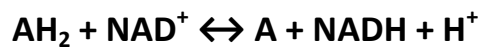
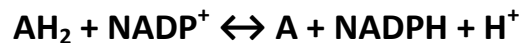


Figura 4.2 Reducción del anillo piridínico de nicotinamida

Por esa razón las reacciones asociadas a estas coenzimas se representan así:



o bien



4.2.1.2 Significación metabólica y fisiológica

Un gran número de oxidorreductasas utiliza coenzimas piridínicas. La gran mayoría de reacciones redox a nivel sustrato, por ejemplo, suelen ser deshidrogenaciones ligadas a estas coenzimas. No es de extrañar, por tanto, la distribución tan extensa de las mismas en todas las células y tejidos. En los animales predomina en cantidad la pareja NAD⁺/NADH sobre la de NADP⁺/NADPH, mientras que en los vegetales la proporción suele ser aproximadamente la misma; en el caso del primero predomina la forma oxidada, NAD⁺ y en el del segundo la forma reducida NADPH.

(a) NAD⁺

El par redox NAD⁺ / NADH + H⁺ participa, entre otras muchas reacciones, en oxidorreducciones ligadas a procesos de producción energética, como la fermentación de la glucosa y la degradación aeróbica de ácidos grasos, azúcares y aminoácidos. En el primer caso, se produce en primer lugar NADH que posteriormente es regenerado a NAD⁺; no hay

producción energética directa, por tanto, a partir de estas coenzimas. En las degradaciones aeróbicas, sin embargo, el NADH producido por las deshidrogenasas del ciclo de Krebs o de la β -oxidación son oxidadas por la cadena respiratoria y en último término sus electrones van a parar al oxígeno, teniendo lugar al mismo tiempo la fosforilación oxidativa, con producción de ATP.

(b) NADP⁺

En las células el NADPH se produce esencialmente en las reacciones redox de la *vía de las pentosas*; su concentración determina lo que se ha dado en llamar *poder reductor* de la célula, que es ampliamente utilizado en procesos de biosíntesis (ácidos grasos, esteroides, etc.), así como de destoxificación y mantenimiento. A diferencia de los procesos respiratorios, que tienen lugar en la mitocondria, las biosíntesis ligadas a NADPH son de localización citoplásmica.

Por otra parte, el poder reductor generado en el proceso fotosintético en plantas verdes o microorganismos autotróficos toma normalmente la forma de NADPH.

4.2.1.3 Carácter vitamínico

Una gran cantidad de organismos, entre ellos el hombre, son incapaces de sintetizar el anillo de nicotinamida (o el correspondiente ácido nicotínico), por lo cual deben recibirlo como factor dietético esencial. En el s.XVIII el médico de la corte de Felipe V **Gaspar de Casal** describió el "mal de la rosa" en poblaciones cuya alimentación era esencialmente a base de maíz. Esta enfermedad, llamada asimismo *pelagra*, consiste en una serie abigarrada de sintomatología neurológica, cutánea e intestinal (la tríada dermatitis- diarrea-demencia). En 1937, **Elvehjem** y **Woolley** demostraron que la pelagra podía ser prevenida por la administración de ácido nicotínico o de nicotinamida, recibiendo así el nombre de *factor PP* (*preventivo de la pelagra*) reconocido por los estudios de **von Euler** y **Warburg** como un componente de la primitiva coenzima de **Harden** y **Young**. También es conocida como **Vitamina B₃**.

En realidad, la pelagra es una deficiencia alimenticia casi generalizada; es decir, producida no sólo por la deficiencia de nicotinamida, sino que va acompañada de otras deficiencias vitamínicas o proteicas; de ahí su variabilidad semiológica. En cualquier caso, se ha podido comprobar que en los enfermos de pelagra el metabolismo oxidativo no está alterado significativamente; ello da pie a pensar que la limitación en estos enfermos está en el papel que el NAD⁺ desempeña en otros procesos, particularmente la ADP-ribosilación de proteínas y su papel en la reparación del DNA (por ejemplo, en la DNA-ligasa) y en otros procesos asociados al flujo de información genética.

4.2.2 Coenzimas flavínicas

La presencia de pigmentos *flavínicos* (del Lat. *flavus*, amarillo) fue detectada el siglo XIX en preparaciones de suero de leche; pigmentos de este tipo fueron parcialmente caracterizados en los años 30 de este siglo por **Szent-Györgyi** y **Ellinger**, entre otros. Fue el descubrimiento por **Warburg** de la *enzima amarilla* capaz de oxidar el NADPH producido en la reacción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa lo que dio pie al conocimiento más sistemático de estas coenzimas. Warburg observó que al tratar con metanol la enzima amarilla se disociaba en un pigmento y una proteína incolora. El pigmento fue caracterizado como *flavin mononucleótido* (FMN), nombre algo incorrecto dado que la unión de la base (isoaloxazina) al azúcar (en realidad el polialcohol ribitol) no es propiamente una unión glicosídica; una forma más correcta de denominarlo sería la de *riboflavin fosfato*. Con posterioridad al descubrimiento del FMN, **Warburg** y **Christian** estudiaron la D-aminoácido oxidasa, otra flavoenzima pero conteniendo *flavin adenin dinucleótido* (FAD). El FAD es la unión del FMN con un nucleótido de adenina a través de los fosfatos, como en el caso del NAD⁺ (figura 4.3).

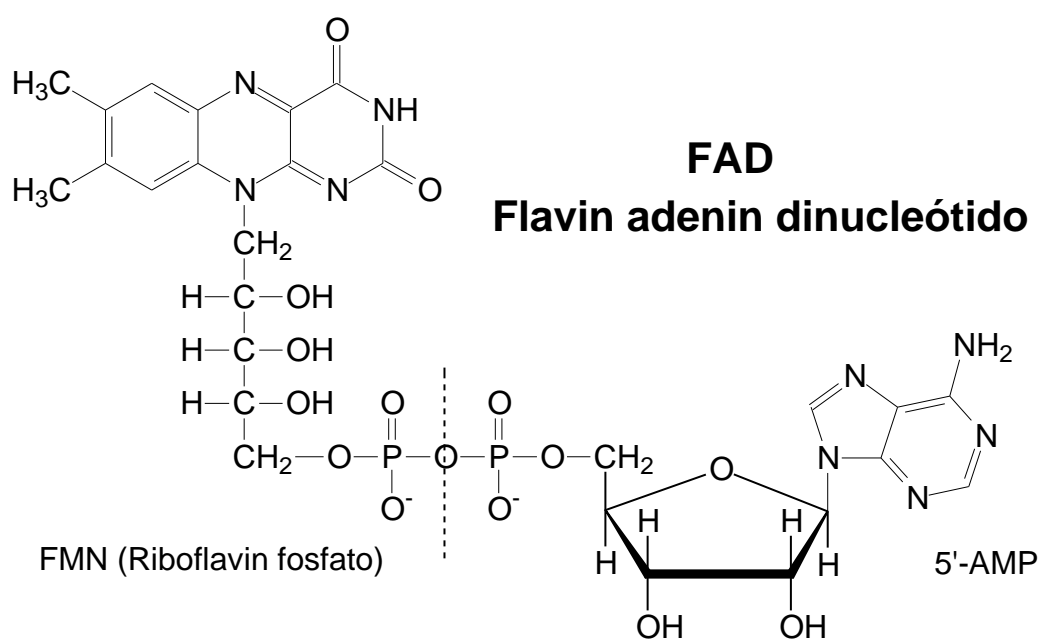


Figura 4.5: Estructura de las coenzimas flavínicas

A pesar de lo que superficialmente pudiera parecer al ver las estructuras de las coenzimas flavínicas, y particularmente del FAD, sus características biológicas son bastante diferentes a las de las coenzimas piridínicas. El rasgo diferencial más acusado es sin duda la unión con la proteína. Mientras en el caso de NAD⁺ y NADP⁺ esta unión no es más intensa que la de cualquier sustrato, las coenzimas flavínicas aparecen fuertemente unidas a la proteína enzimática, formando lo que comúnmente llamamos *flavoproteínas*. En la flavoproteína

tiene lugar normalmente todo el ciclo catalítico; la coenzima es reducida por un dador electrónico y oxidada por un aceptor sobre la misma molécula, a diferencia de las coenzimas piridínicas, que necesitan dos enzimas distintas, y por tanto, su disociación de los mismos. Otra importante diferencia estriba en que muchas coenzimas flavínicas, formando las correspondientes flavoproteínas, pueden utilizar el oxígeno molecular como aceptor electrónico.

4.2.2.1 Estructura química y modo de acción

La estructura de estas coenzimas se presenta en la figura 4.3. Constan de una base tricíclica, la *isoaloxazina*, unida a través del N-10 al polialcohol *ribitol*. Esta estructura recibe el nombre de *riboflavina*, y como su síntesis no es posible en el organismo humano, debe ingresar como tal en la dieta. Tiene, por tanto, carácter vitamínico (*vitamina B₂*).

El ribitol esterificado en C-5' a fosfato da lugar al riboflavin fosfato o flavin mononucleótido (FMN), el cual aparece como coenzima en multitud de flavoproteínas. La unión del FMN a través de un anhídrido fosfórico con 5'-AMP da lugar al flavin adenin dinucleótido (FAD), que es la otra coenzima flavínica.

El modo de acción en reacciones redox puede observarse en la figura 4.4

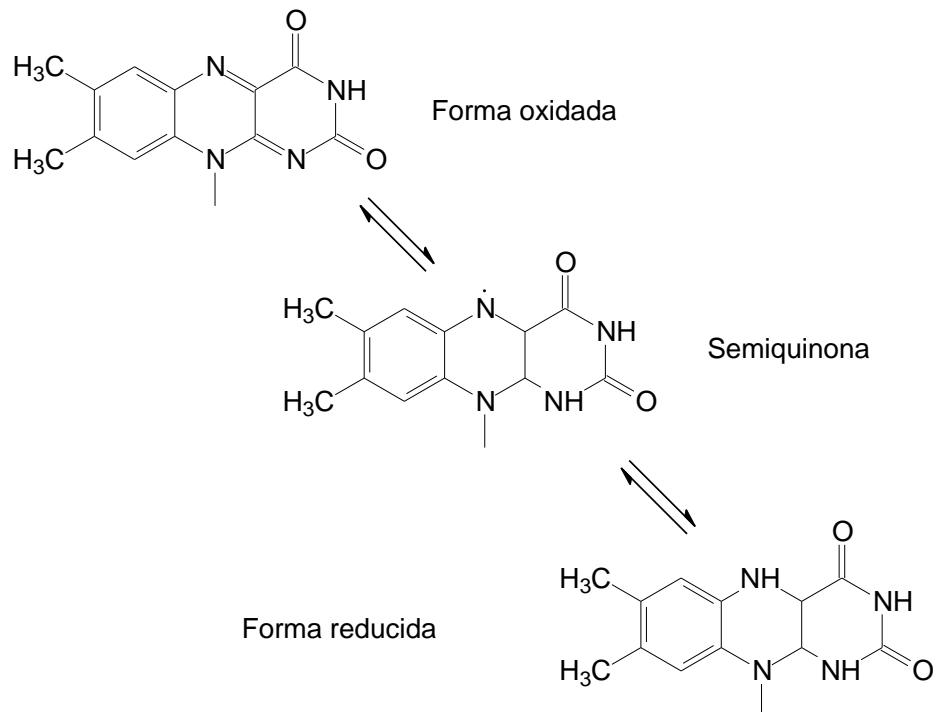


Figura 4.4: Formas redox de las coenzimas flavínicas

La isoaloxazina plenamente oxidada puede captar uno o dos equivalentes de reducción en forma de átomos de hidrógeno (y no ion hidruro como en las coenzimas piridínicas). Esto da lugar a que existan tres grados en el proceso de reducción del anillo: la forma oxidada, la semiquinona y la forma plenamente reducida ($FMNH_2$ y $FADH_2$). Las distintas flavoenzimas

(se conocen alrededor de un centenar) se diferencian entre sí, por tanto, respecto al modo de oxidorreducción en tres grupos: (a) las que oscilan entre las formas plenamente reducida y plenamente oxidada, es decir, $F - FH_2$, como la glucosa oxidasa; (b) las que oscilan entre la forma oxidada y la semiquinona, $F - FH^\bullet$, como es el caso de la dihidrolipoamida deshidrogenasa; y (c) las que oscilan entre la semiquinona y la forma plenamente reducida, es decir, $FH^\bullet - FH_2$.

4.2.2.2 Flavoproteínas

FAD y FMN aparecen en la célula unidos a proteínas formando las llamadas *flavoproteínas*. Como ya se ha dicho, la unión de las coenzimas a la apoproteína es mucho más fuerte que en el caso de los piridin nucleótidos, hasta el punto que pueden ser propiamente considerados como *grupos prostéticos*. La unión es muy fuerte, con constantes de disociación del orden de 10^{-8} M a pH 7. El aumento de la fuerza iónica y el descenso del pH favorecen la disociación del grupo flavínico, dejando libre la apoproteína. En ocasiones encontramos la coenzima unida covalentemente a la estructura proteica, generalmente a residuos de histidina o cisteína.

La unión con la proteína produce cambios importantes en las propiedades de las flavinas:

(a) La unión a la proteína determina la aparición de *especificidad*. Las flavinas libres pueden ser reducidas u oxidadas por multitud de dadores o aceptores electrónicos. La unión a la proteína hace mucho más restringido el conjunto de compuestos que pueden reaccionar con la flavina.

(b) La unión a la proteína favorece la interacción de las flavinas con otros grupos, particularmente metales como Fe o Mo. Esto permite un gran espectro de actividades redox para estas proteínas. En este mismo sentido, podemos decir que aunque la mayor parte de las flavoproteínas contienen un solo grupo prostético, puede haberlas con dos, en cuyo caso, teniendo en cuenta los modos de reducción que veíamos antes (reducida, semiquinona y oxidada), los estados de oxidorreducción de algunas flavoproteínas pueden ser extremadamente variados.

4.2.2.3 Carácter vitamínico

La riboflavina no puede ser sintetizada por el organismo animal; de ahí que fuera reconocida como factor vitamínico en la dieta con el nombre de **vitamina B₂**. Sin embargo, no se conoce en el hombre una enfermedad carencial definida por la falta de riboflavina; sí se ha reconocido la falta de la misma en síndromes pluricarenciales, como el *kwashiorkor* y la pelagra. Las características clínicas supuestamente debidas a la falta de riboflavina, como lesiones en torno a la boca y lengua, o posibles alteraciones corneales, se observan también

en otros estados carenciales, por lo que no pueden ser consideradas como específicas.

4.2.3 Coenzimas hemínicas

Las estructuras tetrapirrólicas cíclicas, *porfirinas*, presentan una amplísima distribución en toda la materia viviente. Podemos decir que su evolución ha ido pareja con la del metabolismo aeróbico en general, es decir, con todos aquellos procesos relacionados con el oxígeno. Desde la clorofila, pigmento tetrapirrólico cíclico modificado presente en organismos fotosintéticos (y por tanto, relacionados con la evolución del O₂ libre en la atmósfera), hasta las peroxidasas encargadas de combatir los efectos tóxicos del propio oxígeno, pasando por transportadores de oxígeno, como hemoglobina y mioglobina y transportadores de electrones como los citocromos, encontramos estructuras cuyo tipo general se presenta en la figura 4.5. Esta estructura aparece con un metal coordinado y formando el grupo prostético de una proteína, que en conjunto denominamos *hemoproteínas*. Estos grupos, por otra parte, se comportan como coenzimas en el sentido en que se expuso en la introducción: al igual que los grupos flavínicos, no se disocian de la proteína.

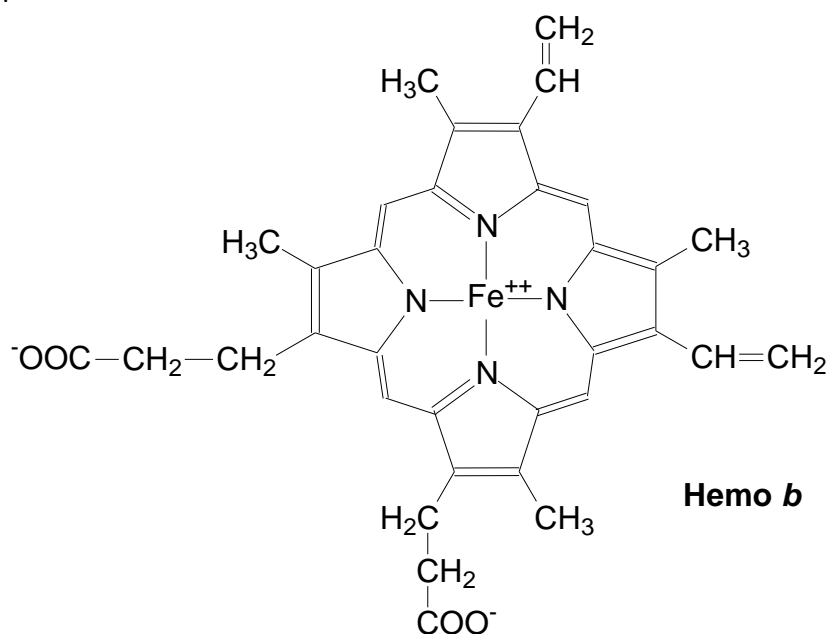


Figura 4.5: Estructura del grupo hemo. Se trata de una protoporfirina IX coordinada a un ion Fe⁺⁺. El hemo es el grupo prostético característico de la hemoglobina y de los citocromos b.

A diferencia de los grupos flavínicos y piridínicos que hemos visto hasta ahora, nuestro

organismo sintetiza por completo la porfirina, por lo cual no tiene carácter vitamínico. Está descrita en humanos una serie interesantísima de trastornos metabólicos relacionados con la síntesis del grupo porfirínico, las denominadas *porfirias*. Y además, el interés que presentan estos compuestos se extiende también a sus productos de degradación, los *pigmentos biliares* (bilirrubina, biliverdina, etc.)

4.2.3.1 Estructura química y modo de acción

Podemos apreciar en la figura 4.5 que se trata de un sistema tetrapirrólico cíclico, denominado genéricamente *porfirina* y que de manera característica es capaz de formar quelatos con un átomo o ion metálico coordinado a los cuatro nitrógenos centrales del anillo.

El papel fisiológico de estos compuestos está íntimamente ligado al metal que invariablemente aparece coordinado al sistema tetrapirrólico planar, que en las formas funcionales de estas estructuras, aparece como grupo prostético de una proteína. En la mayoría de los casos, este metal es el hierro, bien en forma ferrosa, o en forma férrica, o alternando ambas, o incluso en estados de valencia superiores, como en las peroxidasas. Dado que el hierro se presenta en complejos hexacoordinados de forma octaédrica (figura 4.6) su unión al grupo porfirínico deja libres otras dos posiciones de coordinación. Estas posiciones están normalmente ocupadas bien por grupos de la apoproteína, o por ligandos propios del sistema, o no están ocupadas. El grupo porfirínico suele estar ubicado en el interior de la estructura proteica, dado su carácter hidrofóbico.

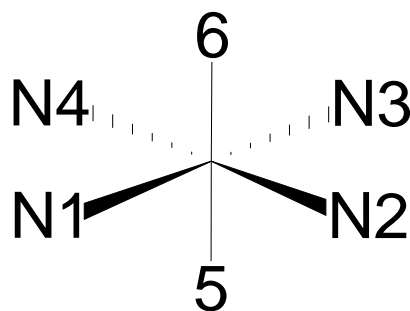


Figura 4.6: Forma octaédrica de los ligandos de coordinación al hierro en las hemoproteínas. Las posiciones 1-4 están ocupadas por los nitrógenos pirrólicos; 5 y 6, por ligandos de la proteína o bien, el 6, por otros ligandos (oxígeno, agua, cianuro, etc.)

Existen tres grandes grupos de hemoproteínas relacionadas con el metabolismo aeróbico: las proteínas transportadoras de oxígeno hemoglobina y mioglobina; las peroxidasas y los citocromos. En esta exposición trataremos brevemente de estos dos últimos.

4.2.3.2 Las peroxidasas

Las peroxidasas (o hidropoxidasas) son un grupo de hemoenzimas cuya función metabólica fundamental es la descomposición de peróxidos, productos a su vez de multitud de reacciones oxidásicas. Tienen una amplia distribución en la naturaleza, paralela al desarrollo de la vida aeróbica; en este sentido contribuyen a la defensa antioxidante de la célula. Los peróxidos, producto de numerosas reacciones metabólicas, dan lugar a *radicales libres* altamente reactivos y perjudiciales para la integridad de las estructuras celulares. Las peroxidasas se encargan indirectamente, pues, de su eliminación. Una peroxidasa particularmente abundante es la *catalasa*, enzima encargada de la eliminación de peróxido de hidrógeno (ver cap. 3)

Casi todas las peroxidasas conocidas suelen ser hemoproteínas que contienen una ferriprotoporfirina IX. El modo de reacción de las peroxidasas es bastante complejo y puede seguirse por mediciones ópticas y magnéticas. Así se ha podido determinar, por ejemplo, que en el curso de la reacción las posiciones quinta y sexta del complejo están esencialmente vacantes, y que el hierro pasa por estados de valencia superiores a tres (iones ferrilo, 4^+ y perferrilo, 5^+).

La mayor parte de la catalasa celular está contenida en los *peroxisomas*, orgánulos celulares que contienen también D-aminoácido oxidasa y urato oxidasa. Estas partículas son especialmente abundantes en los leucocitos polimorfonucleares, consumen una gran cantidad del oxígeno celular y se cree que tienen un importante papel en la defensa antioxidante. Hay quien cree que los peroxisomas son un vestigio de las partículas respiratorias de las células protoeucarióticas, antes del establecimiento evolutivo del sistema simbiótico mitocondrial.

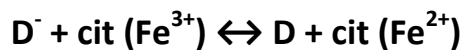
4.2.3.3 Los citocromos

Los citocromos fueron descubiertos por **McMunn** en el siglo XIX al estudiar tejidos animales con un espectroscopio y observar sus bandas de absorción características. Fue **Keilin** alrededor de 1925 quien sistematizó el conocimiento en torno a estas hemoproteínas (y a quien debemos el nombre de las mismas).

A diferencia de la hemoglobina y la mioglobina, los citocromos tienen ocupadas todas las posiciones de coordinación y su función fisiológica se ejerce a través de la alternancia de estados ferroso (2^+) y férrico (3^+) en el hierro coordinado. Por esa razón los citocromos actúan esencialmente como *transportadores electrónicos*, y no como enzimas. Los citocromos son moléculas amplísimamente difundidas en la Naturaleza, y son el prototipo de moléculas *conservadas*, esto es, con secuencias de aminoácidos muy poco variadas a lo largo de la escala filogenética.

Los citocromos operan como transportadores electrónicos. Las reacciones en que participan

pueden representarse como



Es decir, el dador electrónico D cede un electrón a la forma oxidada del citocromo, el *ferricitocromo*, que se reduce a *ferrocitocromo*; éste cede el electrón a un aceptor que se reduce. Encontramos entre los diversos citocromos conocidos una amplia gama de potenciales redox. Estas variaciones se deben al entorno proteico del grupo hemo, que varía de unos a otros.

Existen tres tipos principales de citocromos que reciben el nombre de citocromos **a**, **b** y **c**. Los **citocromos a** suelen tener por lo general un potencial redox elevado y por tanto los encontramos como dadores a los aceptores terminales de electrones: O₂ en organismos aeróbicos, NO₃⁻ y SO₄²⁻ en bacterias anaeróbicas. Estos citocromos que reducen a los aceptores terminales se caracterizan por tener vacante la sexta posición de coordinación, a diferencia de todos los demás citocromos, en los que el hierro aparece hexacoordinado. Esta es la razón por la cual los citocromos terminales son sensibles a cianuro y monóxido de carbono, cuyo modo de acción consiste precisamente en la unión al hierro a través de la sexta posición vacante e impidiendo su funcionamiento normal. La porfirina de los citocromos **a** es el llamado *hemo A*, que se caracteriza por la presencia de una cadena lateral poliprenoide (fítill) sustituyendo a la porfirina. En ocasiones se presentan varios citocromos sobre un mismo complejo proteico; tal es el caso de la citocromo oxidasa, que es una proteína conteniendo citocromos **a** y **a₃** además de Cu²⁺.

Los **citocromos b** suelen aceptar electrones a partir de sustratos de bajo potencial dentro de la cadena respiratoria. Su grupo prostético es una protoporfirina IX con un ion de hierro, es decir, el mismo *grupo hemo* que la hemoglobina y la mioglobina, con la diferencia de que el ion de hierro oscila entre los estados 2⁺ y 3⁺. Dentro de este tipo nos encontramos, aunque con características algo diferentes, al citocromo P-450, característico de los sistemas redox microsómicos de células animales, implicados en importantes procesos de hidroxilación (de esteroides, compuestos xenobióticos, compuestos aromáticos, etc.). En realidad, en torno al citocromo P-450 se establece todo un sistema de transporte electrónico no mitocondrial responsable de una gran parte del consumo celular de oxígeno, en el que se incluyen otros citocromos, flavoproteínas y ferrosulfoproteínas.

Los **citocromos c** tienen un potencial redox intermedio entre los **a** y los **b**; por ello los encontramos como transportadores *centrales* en los sistemas redox celulares. Uno de ellos, el citocromo c (los demás se conocen como c₂, c₃, etc.) tiene la particularidad de ser fácilmente extraíble de la mitocondria por su solubilidad en agua. Esta característica lo hace único en su género, dado que los demás suelen estar fuertemente unidos a membranas de manera que su estudio ha de hacerse necesariamente a partir de la disociación de éstas por métodos más o menos drásticos: detergentes, pH, etc. El grupo prostético en este tipo de citocromos es el *hemo C*, cuya estructura es análoga al B excepto en la unión a la proteína, que en este caso es covalente a través de dos residuos de cisteína invariantes en la proteína.

4.2.4 Quinonas

Un grupo muy extendido de cofactores redox está basado en el anillo quinónico y su eventual reducción a hidroquinona (figura 4.7).

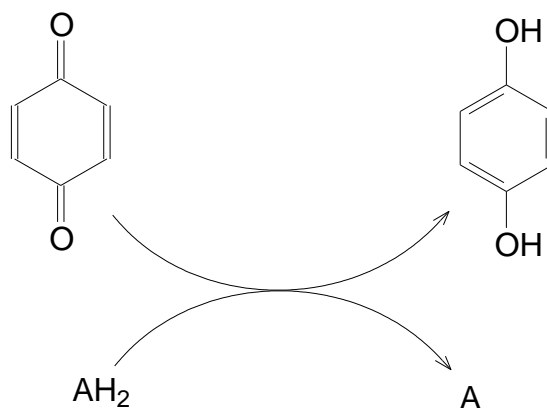
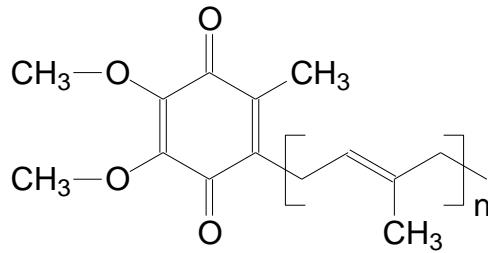


Figura 4.7: El anillo quinónico como transportador redox.

Las formas biológicamente relevantes de este tipo de coenzimas aparecen sustituidas y con una cadena lateral poliprenoide, a través de la cual se piensa que estos cofactores se anclan en las estructuras lipídicas relacionadas con el transporte electrónico. A diferencia de los cofactores que hemos estudiado en los tres últimos apartados, las ubiquinonas no aparecen unidas a una proteína en sus fuentes naturales. Existen tres grupos interesantes dentro de este tipo de coenzimas: las *ubiquinonas*, las *plastoquinonas* y las *vitaminas K*.

4.2.4.1 Ubiquinona o Coenzima Q

La ubiquinona mitocondrial, también llamada *coenzima Q*, es un transportador redox cuya estructura aparece en la figura 4.8.



Ubiquinona (Coenzima Q)

Figura 4.8: Estructura de la ubiquinona o coenzima Q.

Posee una cadena lateral poliprenoide compuesta por diez unidades isoprénicas en mamíferos y seis en algunas bacterias. La ubiquinona opera en el transporte electrónico mitocondrial, entre los complejos I y III y entre los complejos II y III, cuestión que estudiaremos detalladamente en el metabolismo.

La ubiquinona no tiene carácter vitamínico.

4.2.4.2 Otras quinonas

Existen en la naturaleza muchas otras quinonas que operan como coenzimas redox: las *plastoquinonas*, compuestos análogos a la ubiquinona en la cadena de transporte electrónico fotosintético del cloroplasto; las *vitaminas K* o *naftoquinonas* y la *pirroloquinolina quinona* (PQQ), grupo prostético de las *quinoproteínas*, proteínas presentes en bacterias metilotróficas de gran interés biotecnológico.

4.2.5 Ácido ascórbico (vitamina C)

Se trata de una molécula muy abundante en todos los seres vivos que opera esencialmente como transportador redox, aunque son relativamente pocas las reacciones enzimáticas conocidas en las que participa como coenzima. Por esta razón se piensa que su abundancia en los tejidos se debe ante todo a su poder antioxidante, ya que reacciona de forma espontánea con multitud de aceptores electrónicos. El ácido ascórbico es una vitamina para los primates y el cobaya; el resto de los seres vivos sintetiza la molécula. Su síndrome carencial es el *escorbuto*, enfermedad ampliamente conocida por los marineros de la época de navegación a vela. Fueron precisamente estudios conducidos por la Royal Navy británica durante el siglo XVIII los que sentaron las bases de la prevención del escorbuto mediante las verduras frescas, y sobre todo, el zumo de lima. Reconocido en el siglo XX como vitamina (la **vitamina C**), fue aislado y cristalizado por **Szent-Györgyi** en 1928, determinando **Haworth** posteriormente su estructura.

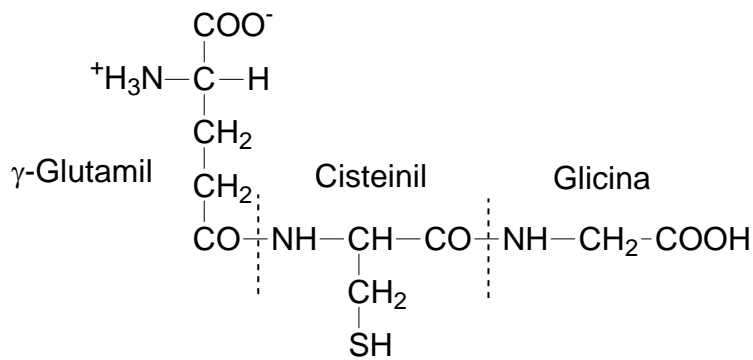
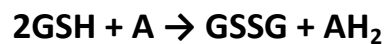


Figura 4.10: Glutati3n reducido (GSH)

Est3 presentee en la pr3ctica totalidad de tejidos y c3lulas vivas, a concentraciones que pueden llegar al nivel mM. Es el tiol de bajo peso molecular m3s abundante entre las biomol3culas. Se suele representar la estructura del glutati3n como GSH para la forma reducida y GSSG el disulfuro. La reacci3n m3s caracter3stica es su oxidaci3n al disulfuro:



La oxidaci3n a GSSG puede tener lugar mediante yodo o ferricianuro. Tambi3n puede ser oxidado por ox3geno molecular y citocromo c.

Otra reacci3n importante caracter3stica del glutati3n es la transferencia del grupo γ -glutamilo a un amino3cido, reacci3n catalizada por la γ -glutamyl transferasa:



Las funciones del glutati3n pueden establecerse en dos categor3as: (a) protectoras contra el *stress* oxidativo y (b) de transporte y metab3licas. Nos ocuparemos solamente de las primeras.

(1) El glutati3n participa en reacciones de transhidrogenaci3n, intercambiando sus equivalentes reductores con otros tioles intracelulares, por lo que se cree que su principal misi3n es el mantenimiento de 3stos en estado reducido. Se ha podido comprobar que intercambia hidr3geno *in vivo* con ciste3na, homociste3na, coenzima A y prote3nas. Se han aislado igualmente disulfuros mixtos.

(2) Participa asimismo como donador de la capacidad reductora necesaria para la formaci3n de desoxirribonucle3tidos (sistema de la ribonucle3tido reductasa).

(3) El glutati3n forma parte de sistemas de protecci3n contra per3xidos y radicales libres. La

enzima clave en estos procesos es la *glutación peroxidasa*, en cuya reacción actúa como correductora la forma GSH produciéndose GSSG. Posteriormente éste se reduce a GSH por el concurso de la GSSG reductasa, enzima muy difundida que utiliza NADPH. Así, una de las consecuencias del *déficit en glucosa-6-fosfato dehidrogenasa* es la inversión de la relación celular normal GSH/GSSG, que en condiciones normales es muy superior a la unidad. Asimismo hay en dicho déficit desnaturalización de la hemoglobina y destrucción de la membrana.

(4) Puede ser oxidado enzimáticamente por ácido dehidroascórbico en presencia de glutación dehidrogenasa; la forma oxidada, por su parte, es reducida por la glutación reductasa en presencia de la coenzima NADPH.

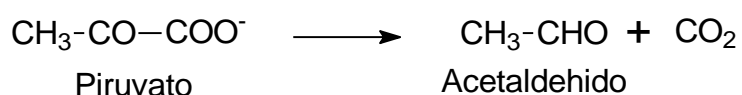
4.2.7 Otras coenzimas redox

Estudiaremos en su contexto metabólico otras coenzimas que participan en procesos de oxidorreducción, como las ferredoxinas (o proteínas NHI, *Non-Heme Iron*), las biopterinas, el ácido lipoico, etc.

4.3 Coenzimas asociados a otras reacciones (no redox)

4.3.1 Tiamina pirofosfato

Tiamina pirofosfato es una coenzima que opera esencialmente como transportador de grupos carbonilo (aldehído o ceto) y por tanto con un importante papel metabólico en las reacciones en que participan cetoácidos o cetosas. Fue reconocido como un cofactor indispensable en la descarboxilación no oxidativa de piruvato en levadura por **Lohman** y **Schuster** en 1937, y caracterizado con el nombre de *coarboxilasa*:



Previamente se había reconocido a la tiamina como un factor nutricional esencial en el hombre y los animales, habiendo sido aislada independientemente por **Jansen** y **Donath**, por una parte, y **Windaus**, en Alemania, en 1925 (recibió el nombre de **vitamina B₁**). Pronto se demostró su papel fundamental en la descarboxilación oxidativa de piruvato y de α -cetoglutarato, reacciones ambas asociadas al ciclo de Krebs. La estructura de la tiamina fue establecida por **Williams** y **Cline** en 1935 (figura 4.11)

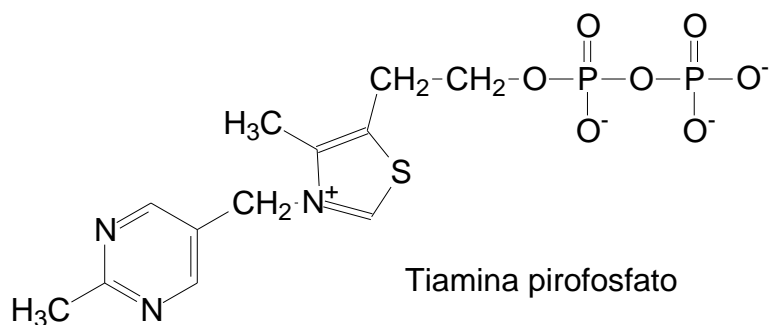


Figura 4.11 Tiamina pirofosfato

4.3.1.1 Estructura química y modo de acción

La tiamina consta de una pirimidina sustituida unida a un grupo tiazólico, como se puede apreciar en la figura 4.11. La parte activa de la molécula es el grupo tiazólico. La coenzima activa es tiamina pirofosfato (TPP), que aparece unida a la proteína enzimática de una forma bastante débil.

La tiamina pirofosfato participa en varias reacciones enzimáticas. Para nosotros, las más importantes son las ya citadas descarboxilaciones oxidativa y no oxidativa de α -cetoácidos. Por ejemplo, la no oxidativa a acetaldehído y la oxidativa a acetil-CoA catalizada por el complejo de la piruvato dehidrogenasa; una reacción similar es la descarboxilación de α -cetoglutarato a succinilCoA en el ciclo de Krebs. En estos dos últimos casos, se trata de reacciones muy complejas que requieren la acción concertada de varias enzimas y coenzimas.

4.3.1.2 Carácter vitamínico

Los animales pluricelulares han perdido la capacidad de síntesis de tiamina, por lo cual debe ingresar en la dieta como factor esencial, y en este contexto recibe el nombre de *vitamina B₁*. Es asimismo un factor indispensable para el crecimiento de muchos microorganismos.

La carencia de vitamina B₁ en los animales de experimentación produce una polineuritis comparable al síndrome carencial que se da en humanos, el *beriberi*, polineuritis endémica en el Sudeste asiático y en general en todos los países cuya alimentación se hace a base de arroz descascarillado. En otro contexto, el déficit de tiamina es un factor patogénico importante en el *síndrome de Wernicke-Korsakow* de los alcohólicos crónicos.

4.3.2 Piridoxal fosfato

El piridoxol o piridoxina fue parcialmente caracterizado por **Birch** y **Gyorgy** en 1934. Su estructura fue determinada por **Gale** y **Epps**, y **Braunstein** y **Kritzman** independientemente en 1943. Caracterizado en principio como un factor necesario para la prevención de la *acrodinia*, dermatitis carencial desarrollada en ratas sometidas a dietas sintéticas suplementadas con tiamina y riboflavina, se pudo comprobar posteriormente que alguno de los metabolitos urinarios del piridoxol tenían una capacidad preventiva mucho mayor, particularmente la forma aldehído piridoxal y la amínica piridoxamina. En sistemas microbiológicos de ensayo se determinó que el metabolito activo es el piridoxal fosfato, lo que es cierto asimismo para los demás organismos. Es un factor indispensable en la dieta humana; como tal se le conoce como **vitamina B₆**.

El piridoxal fosfato participa en una gran cantidad de reacciones enzimáticas. La gran mayoría de ellas, pero no todas, están relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos. Este es el aspecto químico mejor conocido del piridoxal como coenzima, que discutiremos a continuación.

4.3.2.1 Estructura química y modo de acción; metabolismo de aminoácidos

El piridoxol es la 3-hidroxi 4,5-dihidroxi metil 2-metil piridina (fig.4.12). La forma enzimáticamente activa es el *piridoxal fosfato*, en el que el sustituyente en 4 es un grupo aldehído y el alcohol en 5 aparece esterificado a ortofosfato. En esta forma aparece unido más o menos fuertemente a las proteínas en las que opera como coenzima.

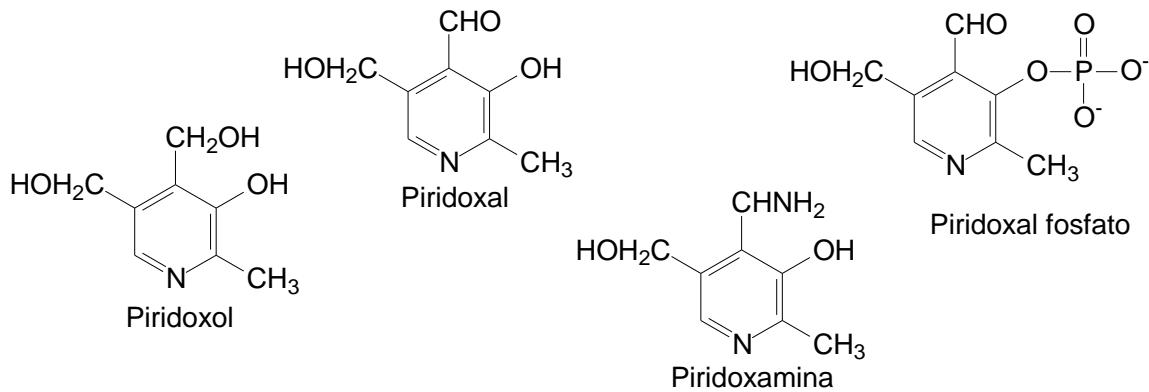


Figura 4.12: Estructura de las diversas formas del piridoxal

El espectro de reacciones en que participa el piridoxal fosfato se extiende principalmente en las relacionadas con el metabolismo y reacciones generales de aminoácidos. Participa entre otras muchas, en (a) racemizaciones; (b) transaminaciones; (c) descarboxilaciones.

En la forma descrita, el piridoxal fosfato actúa como coenzima en los grupos 2.4.1 (aminotransferasas o transaminasas), 4.1.1 (carboxilasas o descarboxilasas) y 5.1.1 (aminoácido racemasas), entre otros.

4.3.2.2 Otras reacciones dependientes de piridoxal fosfato

Algunas reacciones no directamente relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos dependen asimismo de piridoxal fosfato. Entre ellas destaca la *glucógeno fosforilasa* (EC 2.4.1.1) encargada de la degradación del glucógeno. No se conoce el modo de acción de la coenzima en esta reacción.

Otros enzimas o grupos en los que participa el piridoxal son: transferasas de grupos CH_2OH -, CHO -, CHNH_2 -, etc. (grupo 2.1.2) y algunas aldehído-liasas del grupo 4.1.2.

4.3.2.3 Carácter vitamínico

No se ha descrito en la especie humana un síndrome propio de la carencia de vitamina B₆. En pacientes tratados durante mucho tiempo con isoniazida (un tuberculostático) pueden aparecer síntomas de deficiencia (dermatitis, anemia microcítica, etc.) que remiten rápidamente ante el tratamiento con la vitamina. En el hombre, como en todos los mamíferos, el requerimiento de B₆ varía con el aporte proteico de la dieta. Cuanto mayor es éste, mayor es el requerimiento de vitamina B₆.

4.3.3 Coenzimas folínicas

El *ácido fólico* fue primitivamente aislado a partir de levadura por **Day** como un factor nutricional requerido para el crecimiento de *Lactobacillus*. Aislado posteriormente de las hojas de espinaca, en las que se presenta en elevada concentración, y de donde deriva precisamente su nombre (Lat. *folium*, hoja), fue reconocido como factor vitamínico (**vitamina B₉**) en la dieta humana; su carencia es la responsable de la aparición de *anemias megaloblásticas*. Como veremos, algunos fármacos activos en la terapéutica antineoplásica son análogos de ácido fólico (*aminopterina* y *methotrexate*, por ejemplo), por lo que el síndrome carencial correspondiente tiene una cierta importancia clínica.

La coenzima activa es el *ácido tetrahidrofólico* (THF), forma reducida del *ácido dihidrofólico* que se oxida muy fácilmente en presencia de O₂, razón por la cual esta última es la forma común en que se aísla esta coenzima a partir de fuentes biológicas. El papel metabólico del ácido tetrahidrofólico está íntimamente relacionado con la *transferencia de grupos monocarbonados*, particularmente formil (-CHO), hidroximetil (-CH₂OH), formimino (-CHNH), metileno (-CH₂-) y metenil (-CH=); con menor frecuencia opera como transportador de grupos metilo (-CH₃). En este sentido podemos considerar al ácido tetrahidrofólico como miembro de una familia de coenzimas involucrados de un modo u otro en el metabolismo de grupos monocarbonados, y que estaría integrado, además del THF, por *S-adenosil metionina* (como transportador principal de grupos metilo), la *biotina* (de grupos carboxilo -COOH) y las *coenzimas cobamídicas* (cuya función no suele ser la de transportadores estrictos, como los anteriores, sino que participan en sus interconversiones).

4.3.3.1 Estructura química y modo de acción

Químicamente el ácido tetrahidrofólico es una *pteridina* reducida unida al *ácido p-aminobenzoico* o *4-aminobenzoico* (PAB) y éste a uno o varios residuos de ácido glutámico unidos a través del grupo γ -carboxilo, dando lugar a la estructura *pteroil n-glutámico* o *pteroil poliglutámico* (figura 4.13). El grado de polimerización del ácido glutámico varía entre 1 y 10.

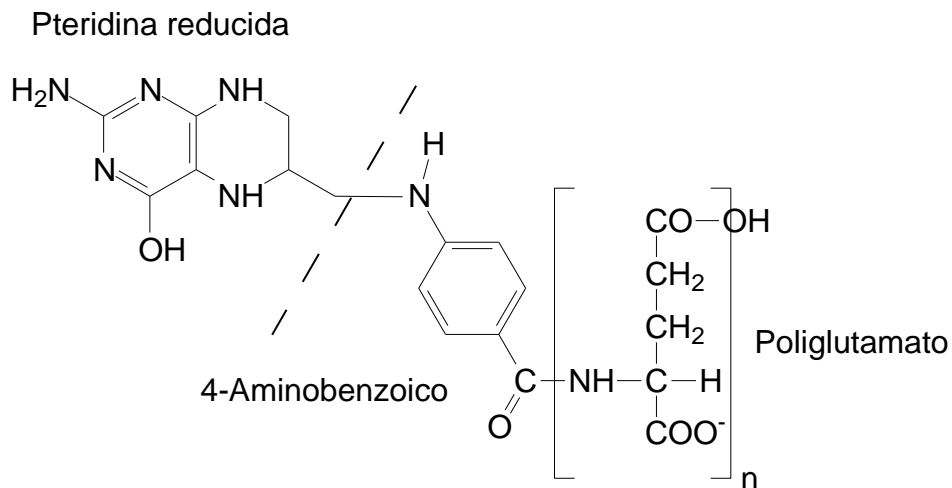


Figura 4.13: Estructura del ácido tetrahidrofólico (THF)

La función transportadora de grupos monocarbonados tiene lugar a través de la formación de enlaces covalentes entre éstos y los nitrógenos 5 y 10 de la pteridina. Algunas de estas estructuras se presentan en la figura 4.14: N¹⁰ formil-THF (1), N⁵N¹⁰ metenil-THF (2), y N⁵N¹⁰ metilen-THF (3)

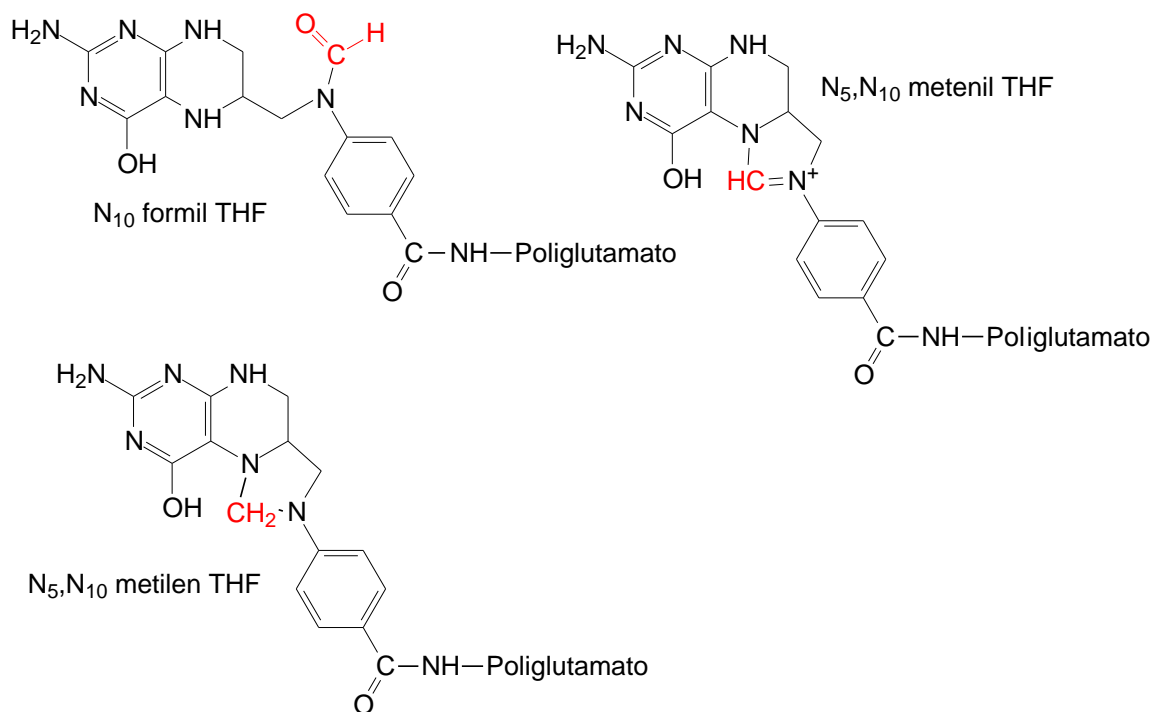


Figura 4.14: Algunas coenzimas folínicas. El grupo transportado se representa en rojo

Participan como coenzimas en los siguientes sistemas, entre otros:

Transferasas: EC 2.1.1.13-14, enzimas encargadas de la transferencia de grupo metilo desde metil-THF a homocisteína para dar metionina. La enzima de mamífero requiere una

coenzima cobamídica. EC 2.1.2.1-10, que catalizan las reacciones propias de estas coenzimas: transferencias de grupos formil, hidroximetil, formimino, etc.

Ligasas: EC 4.3.2.12, dihidrofolato sintetasa; EC 4.3.3.2, metenil-THF sintetasa; y EC 4.3.4.3, formil-THF sintetasa.

La función transportadora de grupos monocarbonados es esencial en la síntesis de nucleótidos, y por lo tanto, en la síntesis de ácidos nucleicos. Tanto en la síntesis del anillo purínico como en muchos otros procesos asociados a dicha síntesis (por ejemplo, conversión de uracilo en timina) las coenzimas folínicas son indispensables.

4.3.3.2 Carácter vitamínico

La carencia de ácido fólico (vitamina B₉) en la especie humana se traduce en una anemia de tipo megaloblástico como principal síntoma (Se llaman megaloblásticas las anemias que cursan con hematíes de mayor tamaño que el normal). La causa de la misma radica probablemente en la incapacidad de síntesis de ácidos nucleicos ante la carencia de ácido fólico. En este sentido, señalaremos que las coenzimas folínicas participan en la incorporación de dos carbonos del anillo purínico (C2 y C8) y en la incorporación del grupo 5-metil de la timina. En las carencias experimentales de ácido fólico puede observarse que el suplemento de la dieta con purinas hace desaparecer el síndrome carencial.

La importancia de este tipo de megaloblastosis ha aumentado últimamente debido al empleo de agentes *antifólicos* en la terapéutica antineoplásica, en especial *methotrexate* y *aminopterina*. Por tanto, estas anemias pueden darse en individuos sometidos a este tipo de tratamientos.

4.3.3.3 Farmacología asociada al ácido fólico

Los análogos de ácido fólico se emplean en la terapéutica antineoplásica por su papel de inhibidores indirectos de la síntesis de ácidos nucleicos. Los principales antifólicos son los ya citados aminopterina y methotrexate (fig. 4.15), que operan inhibiendo a la dihidrofolato reductasa, encargada de la formación de ácido tetrahidrofólico.

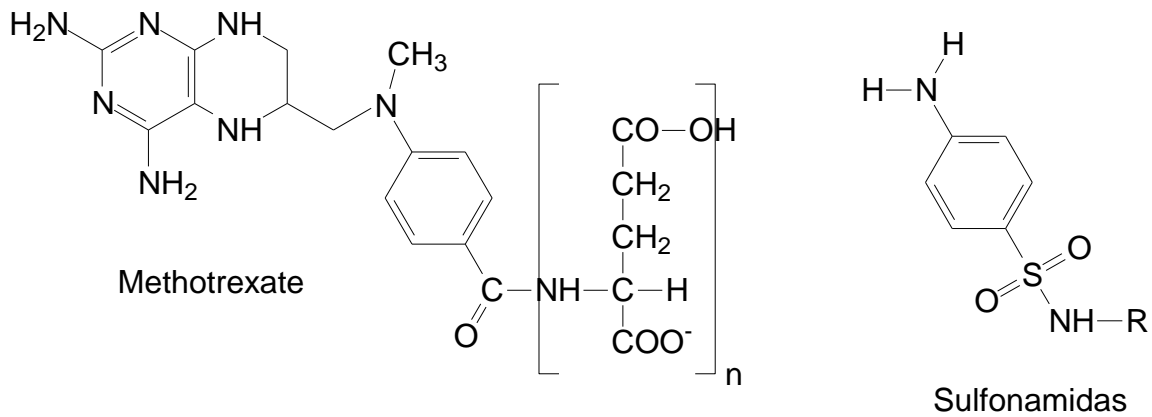


Figura 4.15: Análogos de ácido fólico empleados en terapéutica

En otro orden de cosas, la terapéutica antibacteriana emplea desde principios del siglo XX las *sulfonamidas* (ver fig.4.15) que son análogos del ácido 4-aminobenzoico y en cuya presencia no puede tener lugar la síntesis normal de ácido fólico en bacterias (inhiben la folato sintetasa de estos organismos). Por esta razón las sulfonamidas no actúan sobre organismos incapaces de formar ácido fólico, como por ejemplo la especie humana; y de ahí su interés terapéutico. Una acción parecida puede atribuirse al ácido p-aminosalicílico (PAS), primer quimioterápico que se demostró efectivo en el tratamiento antituberculoso.

4.3.4 Coenzimas cobamídicas

En 1926 **Murphy** describió el valor terapéutico del extracto de hígado en la *anemia perniciosa* humana, un síndrome megaloblástico asociado a trastornos gástricos. En 1948, e independientemente, los equipos de **Folkers** en Estados Unidos y **Smith** en Inglaterra cristalizaron el factor responsable, al que se le había dado el nombre de **vitamina B₁₂**. En 1957, gracias a los estudios de **D.Hodgkin** se pudo conocer la complicada estructura química de la misma. Se trata de un factor que no es sintetizado ni por animales ni por plantas; únicamente ciertos microorganismos, afortunadamente muy abundantes, producen esta vitamina. Es asimismo requerida para el crecimiento de muchos otros microorganismos, lo que ha facilitado su aislamiento gracias al desarrollo de ensayos microbiológicos. Otra observación importante fue que la anemia perniciosa humana se debe en la mayor parte de los casos no a la falta de vitamina B₁₂, sino a la carencia de una proteína presente en la secreción gástrica, el *factor intrínseco*, que es el responsable de la absorción intestinal de la vitamina B₁₂.

4.3.4.1 Estructura química

Tal y como es normalmente aislada del extracto de hígado, la vitamina B₁₂ aparece bajo la forma de *cianocobalamina*, cuya estructura se presenta en la figura 4.16.

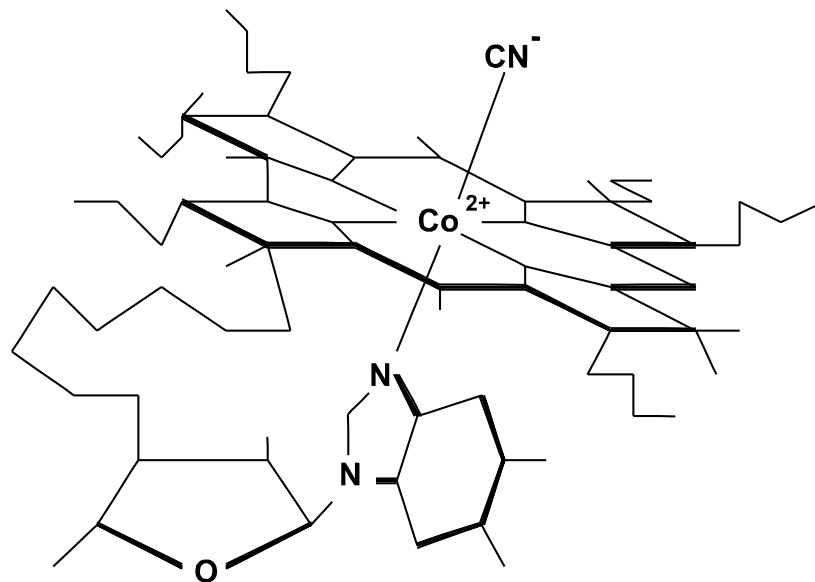


Figura 4.16: Estructura de la cianocobalamina.

Consiste en un sistema tetrapirrólico llamado *corrina* y una estructura parecida a un nucleótido (bencimidazol). El anillo corrínico (por lo que las coenzimas cobamídicas se llaman también *corrinoideas*), es semejante a una porfirina, con la salvedad de presentar dos pirroles unidos directamente y no por el habitual grupo meténico de las porfirinas. Coordinado a los nitrógenos pirrólicos aparece un ion de cobalto, cuyo estado de valencia varía según la naturaleza de los distintos corrinoideas. La quinta posición de coordinación del cobalto aparece unida al nucleótido. El ligando de la sexta varía; en la cianocobalamina se trata de un ion cianuro CN⁻ pero es un artefacto del método de extracción. En esta posición pueden verse asimismo los grupos hidroxilo, agua, nitrito, cloruro y sulfato, dando lugar a las distintas cobalaminas: hidroxicobalamina, acuocobalamina, nitritocobalamina, etc.

Las formas activas como coenzimas cobamídicas o corrinoideas presentan la sexta posición de coordinación del cobalto ocupada por un ligando distinto a los aniones con los que suelen ser aisladas. En un caso se trata del nucleósido 5'-desoxiadenosina (otra singularidad: los desoxinucleósidos del DNA son 2'-desoxi y no 5'-desoxi como en este caso), y hablamos entonces de *adenosilcorrinoideas*. En otros casos la sexta posición está ocupada por agua, por lo que hablamos de *acuocorrinoideas*. Los sistemas enzimáticos mejor caracterizados en los que participan las coenzimas cobamídicas son por lo general sistemas bacterianos. Son muy pocas las enzimas conocidas de tejidos de mamífero que requieran estas coenzimas.

4.3.4.2. Modo de acción

Se ha podido comprobar que los adenosil corrinoides participan en reacciones en las que hay un intercambio de hidrógeno con otro grupo situado en principio en un carbono contiguo (intercambio 1,2), aunque en ocasiones puede darse este intercambio de forma intermolecular y no necesariamente intramolecular. Un ejemplo de estas reacciones es la catalizada por la *metilmalonil-CoA mutasa*, que se presenta en la figura 4.17.

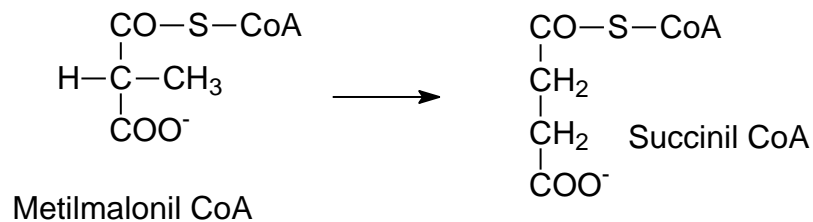


Figura 4.17: Reacción de la metilmalonil-CoA mutasa

Las coenzimas cobamídicas participan en muchas otras reacciones, de distinto tipo; desde la *ribonucleótido reductasa* bacteriana (fundamental en la síntesis de DNA), pero no en la de mamíferos.

También participan en la formación de metionina a partir de homocisteína; esta actividad existe tanto en bacterias como en mamíferos. De hecho, se puede mantener a ratas en dietas carentes de metionina si se las suplementa con homocisteína.

Las cobamidas participan también en la síntesis de metano en bacterias metanogénicas.

4.3.4.3 Carácter vitamínico

Ni las plantas superiores ni los animales son capaces de sintetizar coenzimas cobamídicas, y para muchos microorganismos se trata de un factor necesario para su crecimiento. La carencia "pura" de vitamina B₁₂ no existe en la práctica; normalmente la flora bacteriana intestinal sintetiza toda la necesaria en la nutrición. En la especie humana, el síndrome carencial (*anemia perniciosa*) se debe esencialmente a la carencia de *factor intrínseco*. Éste es una glicoproteína producida por las células parietales del estómago, con un P.M. de 50 kDa, que fija vitamina B₁₂ en la proporción 1:1 y que es esencial para la absorción de la vitamina en los tramos distales del tubo digestivo. Una vez absorbidas, las cobalaminas circulan en la sangre asociadas a dos proteínas, transcobalaminas I y II.

Las principales fuentes naturales de esta vitamina se dan en los fangos y en el estiércol; los tejidos animales, como el hígado, pueden ser asimismo una fuente rica en la vitamina, pero no los vegetales.

4.3.5 Biotina

Reconocida en principio como un factor de crecimiento para la levadura, la *biotina* fue aislada de la yema de huevo por **Kögl** en 1935, y se identificó con la coenzima R de *Rhizobium*. **Du Vigneaud**, en 1943, estableció su estructura química e identificó la biotina como el factor capaz de prevenir la aparición del *síndrome tóxico de la clara de huevo* (producido por la administración a ratas de grandes cantidades de clara de huevo cruda). Los estudios de **Lardy** sugirieron un papel para la biotina en las reacciones de carboxilación, ampliamente corroborados por estudios posteriores. La biotina tiene en el hombre carácter vitamínico (fue conocida como vitamina H, pero hoy se prefiere el nombre de **Vitamina B₇**).

4.3.5.1 Estructura química y modo de acción

La estructura de la biotina se presenta en la figura 4.18. Se presenta normalmente unida a las proteínas a través del carboxilo de su cadena lateral unido a un grupo ϵ -amino de la lisina. De hecho, en hidrolizados de estas enzimas se encuentra frecuentemente la *biocitina*, formada por la unión de biotina y lisina.

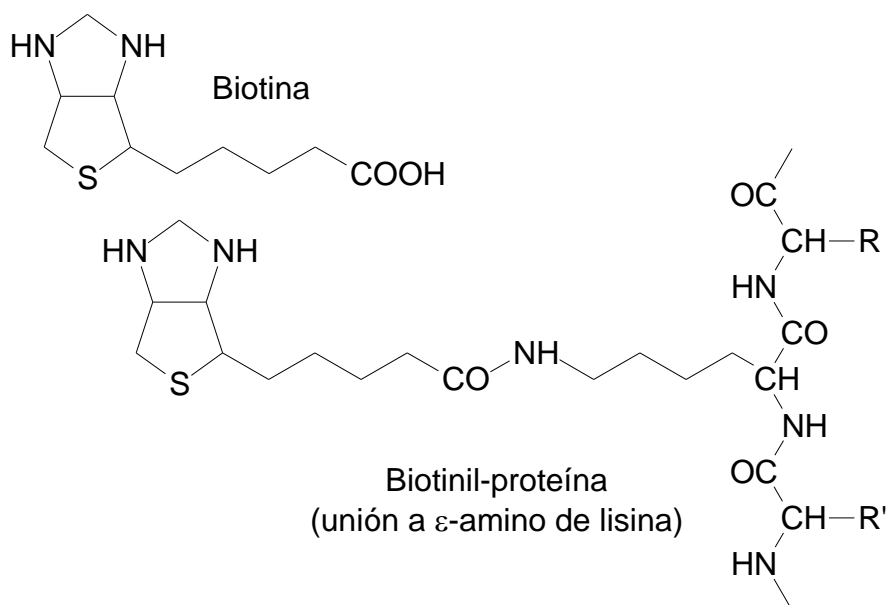


Figura 4.18: Estructura de la biotina y su unión a proteína.

Las reacciones en que participa la biotina son esencialmente carboxilaciones dependientes de ATP (que se hidroliza a ADP en el proceso), catalizadas por enzimas del grupo 6.4 (ligasas C-C). Como ejemplos podemos citar la *piruvato carboxilasa* y la *acetil-CoA carboxilasa*.

Las reacciones de carboxilación mediadas por biotinil-enzimas tienen lugar mediante la formación dependiente de ATP de *carboxibiotina* (fig.4.19).

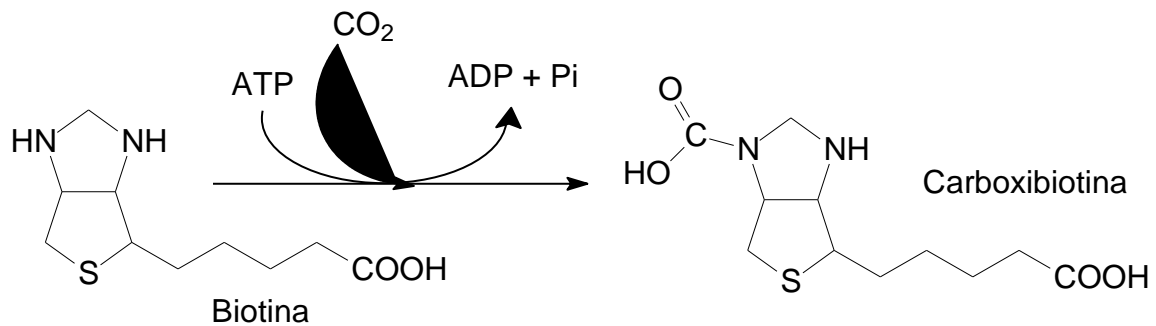


Figura 4.19: Estructuras de biotina y carboxibiotina

4.3.5.2 Avidina

El síndrome tóxico de la clara de huevo se debe a la existencia en ésta de una concentración apreciable de *avidina*. Se trata de una glicoproteína de 70 kDa compuesta por cuatro subunidades idénticas y que es capaz de fijar biotina con una extraordinaria afinidad (K_a de aprox. 10^{15}). De ahí que la toxicidad de la clara de huevo resulte de eliminar prácticamente toda la biotina libre.

4.3.6 S-adenosil metionina

La *S-adenosil metionina* (SAM, S-AM) es una coenzima que participa en la práctica totalidad de las reacciones de metilación que se dan en el medio biológico. No tiene carácter vitamínico, siendo sintetizada por el organismo humano siempre que haya suministro dietético de metionina (que es un aminoácido esencial)

4.3.6.1 Estructura química

En la figura 4.20 aparece la estructura de la S-adenosil metionina. La característica más acusada de este compuesto es la presencia de un grupo sulfonio, lo que le confiere un carácter de compuesto de alta energía de hidrólisis.

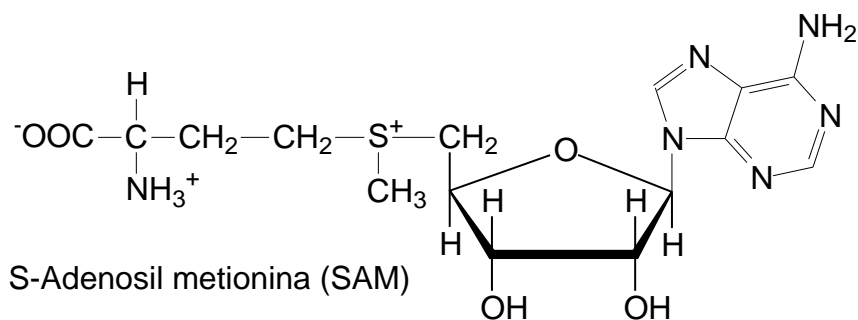


Figura 4.20 Estructura de la S-adenosil metionina

4.3.6.2 Función metabólica

La práctica totalidad de las metilaciones metabólicas conocidas están mediadas por la S-adenosil metionina. Es decir, casi todas las enzimas del grupo 2.1.1 operan con esta coenzima. Alguno de los procesos con particular interés biológico son los siguientes:

(a) Sistemas de metilación de DNA. El reconocimiento del DNA como "propio" tiene lugar en las células a través de un patrón específico de metilación de las bases. Si éste no existe, el DNA es degradado por enzimas de restricción. Las metilaciones más frecuentes tienen lugar en N6 de adenina y C5 de citosina.

(b) Síntesis de ribotimidilato a partir de UMP para la formación de tRNA.

(c) Síntesis de lecitinas (fosfatidil colinas) a partir de fosfatidil-etanolaminas.

(6) Metabolismo e interconversiones de neurotransmisores; por ejemplo, formación de adrenalina a partir de noradrenalina; O-metilación de catecoles por la catecol-O-metil transferasa (COMT); metilación de la N-acetil serotonina por la HIOMT (hidroxiindol-O-metil transferasa) para dar melatonina, hormona muy abundante en la glándula pineal y cuya actividad parece estar ligada a ritmos biológicos cuyo período es de 24 horas (*ritmos circadianos*).

4.3.7 Panteteínas

Estas coenzimas funcionan metabólicamente como transportadores de grupos acil. Dentro del grupo se distinguen dos coenzimas: la coenzima A y la proteína transportadora de acilos (ACP, *Acyl Carrier Protein*).

La coenzima A es una molécula de muy amplia distribución en todas las células. En realidad,

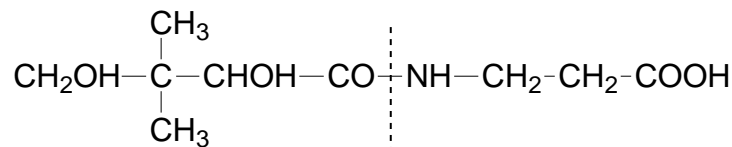
podemos decir que las formas metabólicamente activas de los ácidos grasos son derivados de coenzima A, un poco de la misma manera que los ésteres fosfóricos son la forma metabólica activa de los azúcares.

La coenzima A está relacionada con el requerimiento dietético de *ácido pantoténico* como factor vitamínico (**Vitamina B₅**). **Lipmann** demostró la participación del ácido pantoténico en la estructura de la coenzima A. Posteriormente, **Vagelos** caracterizó un péptido requerido en la biosíntesis citoplásmica de ácidos grasos, llamado *proteína transportadora de acilos* (ACP según las siglas inglesas) y cuyo grupo activo era otro derivado de ácido pantoténico, la 4'-fosfopanteteína.

4.3.7.1 Estructura química

El ácido pantoténico (fig.4.21) es la pantoil β-alanina. Es ésta la parte de la molécula que los organismos animales no pueden sintetizar y que es requerida por tanto en la dieta. La unión del ácido pantoténico con la cisteamina (producida por descarboxilación de cisteína) da lugar a la panteteína, que es la estructura común en estos dos coenzimas.

Ác. Pantoténico



Panteteína

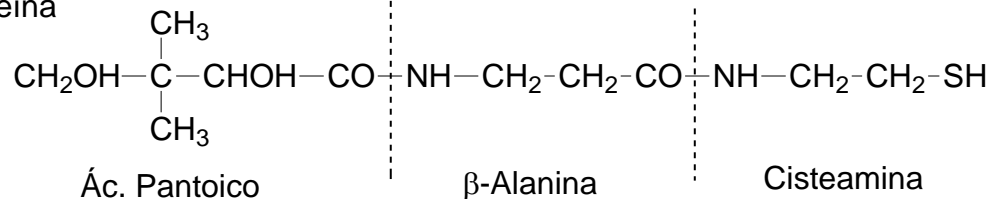


Figura 4.21: Estructura del ácido pantoténico y de la panteteína.

La coenzima A se forma por unión de la panteteína a un 3'-fosfo ADP (fig.4.22) dando lugar a una compleja estructura con muchos sitios reactivos potenciales; los estudios de **Lynen**, sin embargo, demostraron que el grupo reactivo de la coenzima A es el tiol (-SH) terminal. Como tantas otras coenzimas, pues, la coenzima A presenta una estructura de nucleótido de adenina.

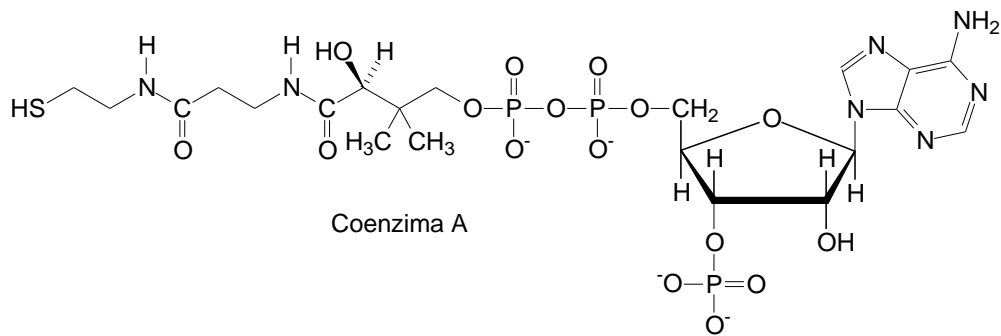


Figura 4.22: Estructura de la coenzima A

La ACP es un péptido de un peso molecular de aproximadamente 8500 en *E.coli*. El grupo prostético es una panteteína unida por un enlace fosfodiéster a un residuo de serina en el péptido.

4.3.7.2 Modo de acción

El aislamiento y caracterización de la coenzima A por parte de **Lynen** demostró que la acción de la coenzima A es a través de la formación de tiolésteres. Estos ésteres tiólicos son compuestos de alta energía de hidrólisis. La coenzima A se une a los grupos acil- a través de este tipo de enlaces. Los acil-CoA (o acil-S-CoA) formados participan en todo tipo de reacciones en los que se requiere un ácido carboxílico activado. Esto nos da idea de la gran importancia de la coenzima A en el metabolismo de ácidos grasos.

La ACP opera en la síntesis de ácidos grasos catalizada por el complejo de la ácido graso sintetasa citoplásmica. En este sentido, los derivados de ACP llevan a cabo reacciones muy parecidas a los derivados de coenzima A.

4.3.8 Carnitina

La carnitina (β -hidroxi γ -butirobetaína, fig.4.23) es un transportador de acilos con una función muy concreta: la translocación de ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial. Los derivados de CoA y la propia CoA son moléculas muy grandes que no atraviesan dicha membrana. Por ello las enzimas 2.3.1.7 y 2.3.1.8 (*acil-CoA: carnitina aciltransferasas*) forman los correspondientes derivados acil-carnitina. En este caso el enlace formado es un O-acil de alta energía con el carboxilo de la carnitina.

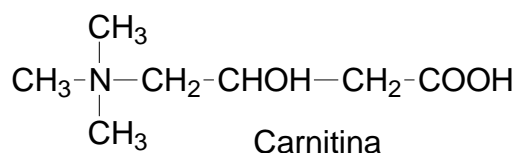


Figura 4.23: Estructura de la carnitina.

No parece que la carnitina tenga carácter vitamínico. Ahora bien, su síntesis requiere lisina y S-adenosilmetionina, por lo que algunos autores recomiendan su adición a la dieta, sobre todo a deportistas; parece que en muchos casos la concentración de carnitina es limitante en cuanto a la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

4.3.9 3'-Fosfoadenosil 5'-fosfosulfato (PAPS)

Esta coenzima es el principal donador de grupos sulfato en el metabolismo, al tiempo que en los organismos capaces de reducir sulfato a sulfuro (vegetales y algunos microorganismos), el PAPS es la forma primitiva de entrada del azufre en el metabolismo. Su estructura aparece en la figura 4.24.

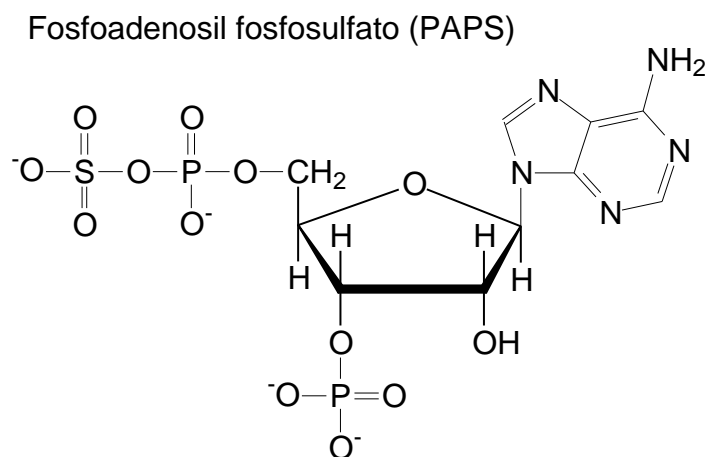


Figura 4.24: Estructura del fosfoadenilil fosfosulfato (PAPS).

El PAPS no tiene carácter vitamínico. Esta coenzima opera con todas las sulfotransferasas del grupo 2.8.2. Algunas de las funciones más importantes de este proceso son las siguientes:

(a) Transferencia de grupos sulfato a polisacáridos en la formación de condroitin sulfatos, heparina, heparan- y dermatan sulfatos, etc.

(b) Formación de sulfátidos por sulfatación de glicolípidos.

4.3.10 Adenosina 5' trifosfato (ATP)

Toda la energía libre producida o captada en los procesos de fermentación, respiración y fotosíntesis adopta en todos los organismos conocidos la forma de ATP. El papel de este nucleósido trifosfato fue establecido por **Lipmann**, y la variedad de procesos en los que participa a todos los niveles metabólicos impide una discusión completa en el presente contexto. La estructura del ATP se presenta en la figura 4.25. Toda la molécula puede ser sintetizada por cualquier organismo; no tiene, pues, ningún carácter vitamínico.

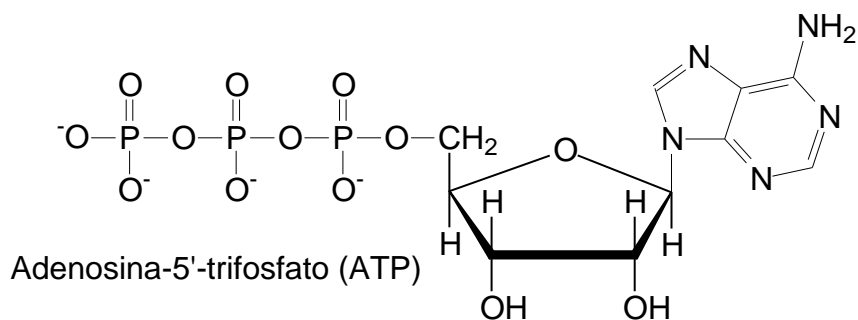


Figura 4.25: Estructura del adenosin-5'-trifosfato (ATP).

Las reacciones en que participa ATP pueden clasificarse dentro de dos grandes grupos: transferencia de alguna porción de la molécula de ATP a un aceptor adecuado, o bien rotura de los enlaces pirofosfato del ATP para suministrar energía libre a reacciones en principio desfavorables energéticamente.

(a) Reacciones de transferencia ligadas al ATP

La gran mayoría de las enzimas de los grupos 2.7.1-4 (fosfotransferasas o kinasas) utilizan ATP para la transferencia de un fosfato a un aceptor adecuado.

(b) Suministro de energía para otras reacciones

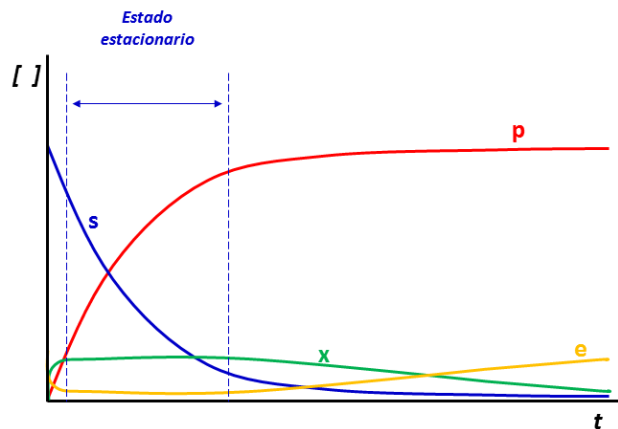
El ATP participa también en procesos que normalmente no tendrían lugar por sus características energéticas. En este caso, el proceso en cuestión aparece acoplado a la hidrólisis de algún enlace del ATP que provee un intercambio energético favorable.

4.3.11 Otros nucleótidos que operan como coenzimas

En el metabolismo de los monosacáridos son fundamentales los derivados de uridindifosfato. Los UDP-monosacáridos son los substratos preferentes de las enzimas del grupo 2.4.1 (hexosil transferasas). Estos derivados operan normalmente en la formación de glicósidos (heterósidos y polisacáridos) y de glucuronoconjugados en los procesos de detoxificación, así como en reacciones de transformación del azúcar (intercambio UDP-glucosa por UDP-galactosa, por ejemplo)

Otros nucleótidos participan también en reacciones similares. Así, en los vegetales los nucleótidos de adenina sustituyen a los de uracilo en todas estas reacciones. En otros procesos operan como coenzimas de transferencia los CDP-derivados (por ejemplo, CDP-colina y CDP-etanolamina en la síntesis de lípidos complejos). Otros derivados nucleotídicos lo son de GDP (p.e. GDP-manosa o GDP-fucosa) o de CMP (CMP-N-acetilneuramínico).

CAPÍTULO 5: Cinética de las reacciones enzimáticas



5.1 Introducción

5.1.1 Interés de los estudios cinéticos

Con mucha frecuencia la cinética de reacciones enzimáticas es un tema que para estudiantes de Biología o Medicina parece algo innecesariamente formalista, además de tedioso. Este punto de vista se ve reforzado cuando al pasar al laboratorio, vemos que el comportamiento real de las enzimas dista a veces mucho de la pretendida claridad de las explicaciones cinéticas. En particular, en el campo de la regulación enzimática, vemos muy a menudo que cada enzima agota su especie; es decir, los modelos "generales" para explicar comportamientos regulatorios se aplican, y con dificultades, a un número reducido de casos.

Sin embargo, la importancia de los estudios cinéticos bien merece emplear un tiempo considerable en su estudio. Trataremos a continuación de ofrecer algunas razones; veamos primero las más generales:

(a) En la Biología actual falta todavía un *tratamiento rigurosamente cuantitativo* de los fenómenos. Como veremos, la cinética de la acción enzimática se describe mediante relaciones cuya importancia trasciende el marco relativamente restringido de los biocatalizadores para dar lugar a una primera aproximación cuantitativa al fenómeno viviente, en tanto en cuanto una gran cantidad de hechos biológicos pueden reducirse a una *interacción proteína-ligando*. De todas estas interacciones, la que tiene lugar entre enzima y substrato es, de lejos, la más y mejor estudiada.

(b) El *conocimiento del mecanismo de reacción* implica llegar a niveles atómicos y moleculares, lo cual no es siempre posible, a pesar de todos los progresos instrumentales. En estos casos, un estudio cinético detallado es la única vía de que disponemos para obtener algún dato sobre el mecanismo de la reacción. Incluso cuando es posible un estudio más estructural del mecanismo, el estudio cinético es una condición previa; cualquier camino propuesto para la reacción deberá concordar con los datos experimentales cinéticos.

(c) De todos es conocida la *sensibilidad de los sistemas biológicos a variables como pH y temperatura*, particularmente en organismos pluricelulares. Esta sensibilidad no sólo se aprecia a nivel químico, sino también, y a veces dramáticamente, en aspectos fisiológicos y fisiopatológicos. La constancia del medio interno, principio básico en la fisiología, no es más que el prerequisite para el correcto funcionamiento de las enzimas (o en sentido amplio, de los receptores). De ahí la importancia del estudio de las variables cinéticas mencionadas.

(d) El fenómeno de la *inhibición enzimática es la base y fundamento de toda la Terapéutica farmacológica* y de todo tipo de acción química selectiva sobre el medio biológico, como por ejemplo el control de plagas en la agricultura. Por tanto, el diseño racional y la evaluación de todos los compuestos potencialmente útiles requiere necesariamente por el estudio cinético de la reacción que inhiben.

Pasemos a continuación a ofrecer razones de tipo más concreto:

(e) En muchas ocasiones es necesario conocer la actividad enzimática de una determinada muestra biológica, tanto en el terreno tecnológico como en la investigación pura. El diseño de un sistema eficiente de ensayo de actividad es una condición ineludible para que la medida tenga garantía. Y para ello, es imprescindible el conocimiento del efecto que tienen las distintas variables cinéticas: concentración de enzima, concentración de substrato, pH, temperatura, etc. En la misma línea, la definición correcta de unidades pasa siempre por un conocimiento cinético detallado de la reacción enzimática.

(f) El empleo creciente de reactivos enzimáticos en procesos industriales exige generalmente un diseño cuidadoso antes de su incorporación a los reactores donde vayan a

ser empleados. El estudio cinético de las enzimas es por tanto condición previa a todo tipo de aplicación industrial de los mismos.

(g) Cuando acometemos la purificación de una enzima a partir de un material biológico la única fuente válida de información sobre la misma nos la da su estudio cinético, ya que dentro de ciertos límites, puede dar datos interesantes para la identificación de la enzima aun en preparaciones no purificadas.

La velocidad de las reacciones enzimáticas se estudia tradicionalmente en función de cuatro variables: *concentración de enzima*, *concentración de substrato*, *pH* y *temperatura*. Aun cuando constituyen capítulos aparte, la inhibición enzimática y la regulación enzimática se consideran parte del estudio cinético. Antes de pasar a estudiar estas variables conviene establecer el concepto de velocidad inicial.

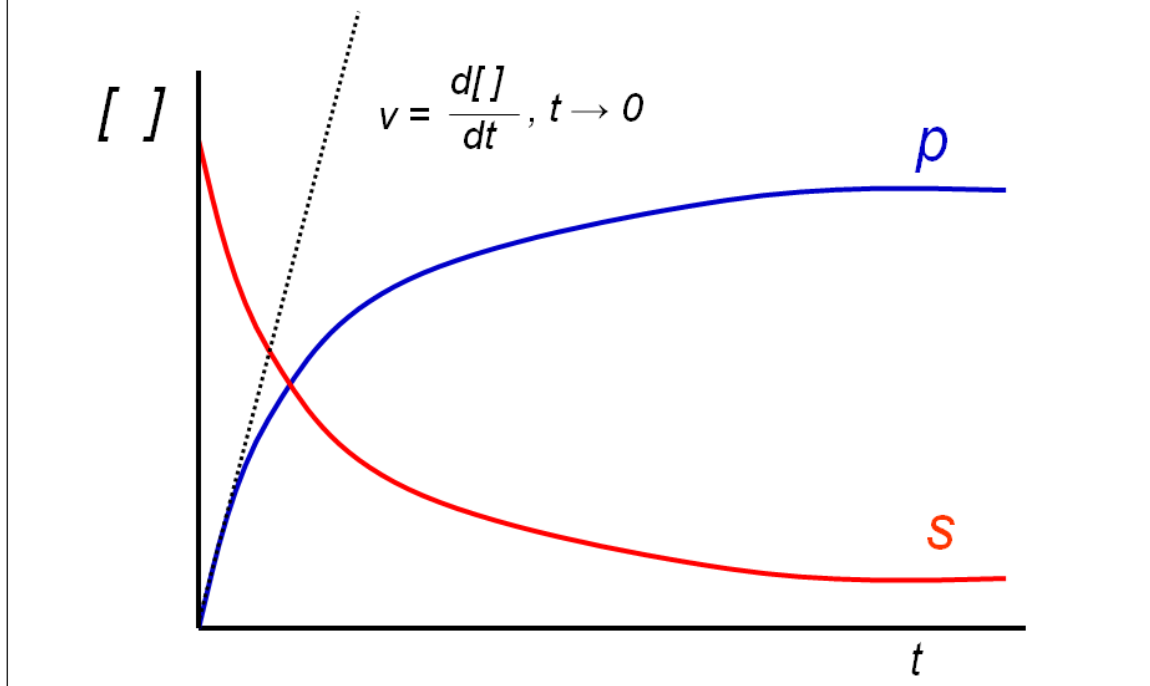
5.1.2 Concepto de velocidad inicial

Cuando a través de algún método de monitorización continua de la reacción seguimos la marcha en el tiempo de una reacción enzimática, obtenemos, con tiempos suficientemente largos, curvas como la que aparece en la figura 5.1. En la misma se presenta el *curso temporal* (o *curva de progreso*) de una reacción enzimática $S \rightarrow P$. Se ilustra el concepto de velocidad inicial como la tangente a tiempo $t=0$.

En estas gráficas representamos la desaparición del substrato o la aparición del producto en función del tiempo. Puede apreciarse que la curva va aplanándose progresivamente a medida que transcurre el tiempo de reacción, lo cual significa que la velocidad va haciéndose cada vez menor. Pueden ser muchas las razones de este fenómeno; pero entre ellas es obvio que la desaparición del substrato es la razón principal.

Figura 5.1

Concepto de velocidad inicial

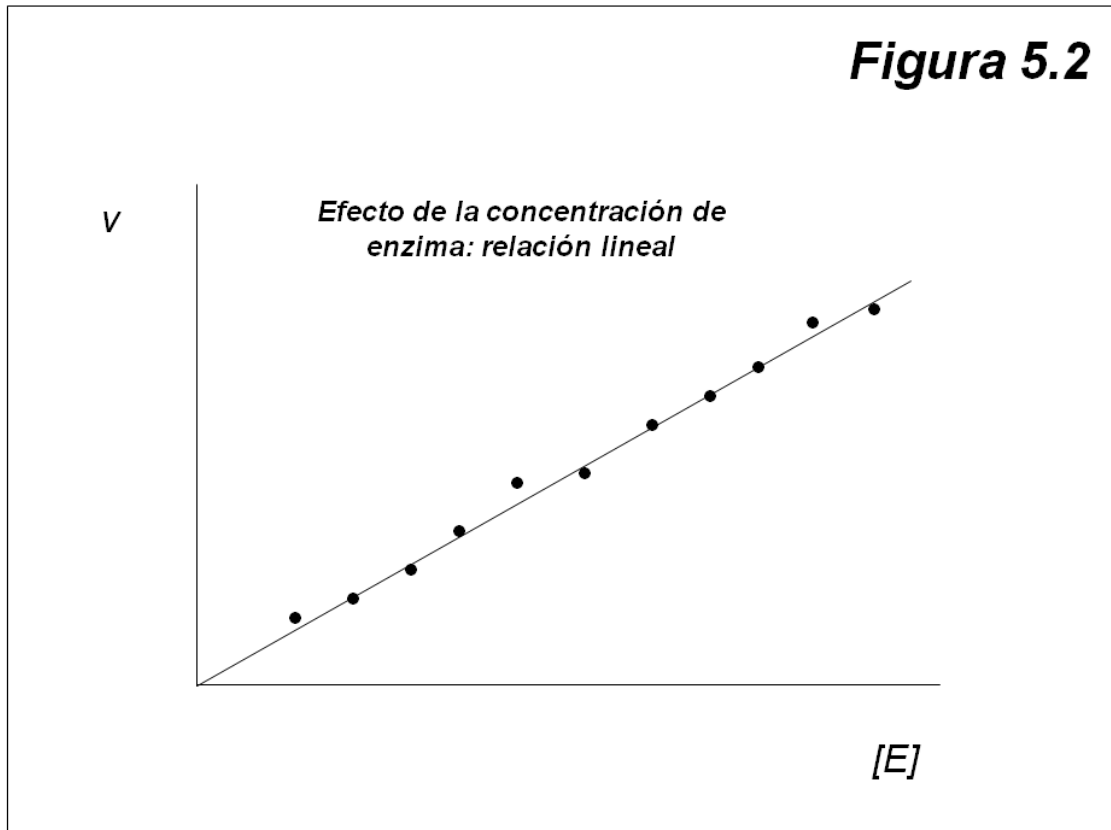


Por esta razón, las medidas de actividad enzimática (recuérdese que en Enzimología *actividad* es sinónimo de *velocidad*) sólo son válidas en los primeros tramos de la curva de progreso. En rigor, la velocidad válida para la medida es la pendiente a tiempo cero, que es la llamada *velocidad inicial* (en la figura 5.1 la medición válida de velocidad es la tangente a la curva para $t=0$). Normalmente los ensayos enzimáticos son diseñados de manera que el tramo lineal de la curva de progreso sea lo más largo posible, con lo que se facilita la medición de la velocidad inicial. Ahora bien, cuando se trata de puntos experimentales reales, trazar una tangente a $t=0$ puede ser mucho más difícil de lo que la figura 5.1 muestra. En lo sucesivo, y mientras no se especifique lo contrario, siempre que hablemos de velocidad, queremos decir velocidad inicial.

En los apartados que siguen estudiaremos muy someramente la cinética de las reacciones enzimáticas. En el contexto del presente curso, no tendría sentido discutir, por ejemplo, la cinética multisustrato o las cinéticas de estado inicial (o pre-estado estacionario), así como los efectos de pH y temperatura desde un punto de vista cuantitativo. Por esa razón nos centraremos en la cinética monosustrato, y con preferencia, bajo las suposiciones de **Michaelis-Menten**. (ver más abajo)

5.2 Efecto de la concentración de enzima

La velocidad de una reacción enzimática, según muestran las determinaciones experimentales, y siendo constantes el resto de las condiciones, es directamente proporcional a la concentración de enzima, según se muestra en la figura 5.2.



Dicho de otro modo, la reacción enzimática es de primer orden en relación a la concentración de enzima **[E]**; **k** es una constante de velocidad.

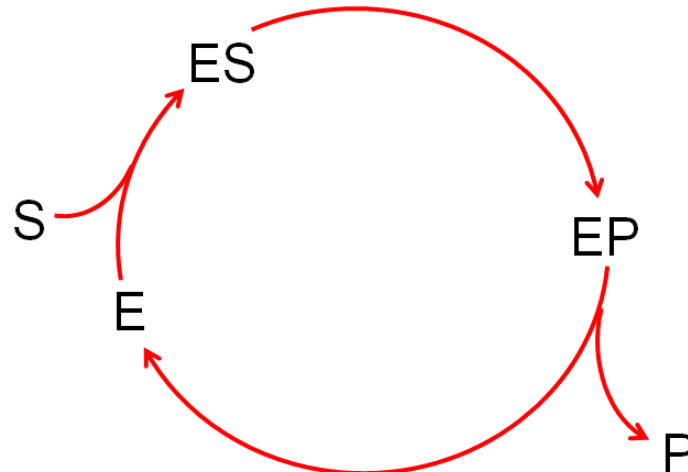
[1]

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k[E]$$

En general, este es un resultado propio de todos aquellos procesos que, como la catálisis, son de índole *regenerativa*, tal y como aparece expresado gráficamente en la figura 5.3, y no es atribuible a ninguna característica específica de las enzimas.

Reacción catalizada: su interpretación como una reacción cíclica

Figura 5.3

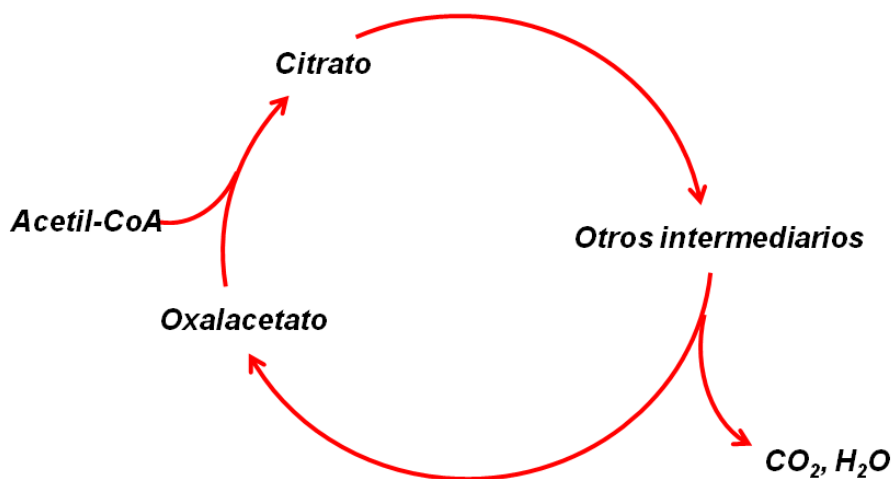


Una cinética lineal implica un proceso regenerativo, cíclico

De hecho, uno de los argumentos que utilizó Krebs para postular el ciclo de los ácidos tricarboxílicos que lleva su nombre era la relación lineal entre el consumo de oxígeno y la concentración de una serie de aniones orgánicos que como el citrato, succinato, malato y oxalacetato, son intermediarios del mismo, y que por lo tanto se regeneran en cada ciclo de reacción (figura 5.4).

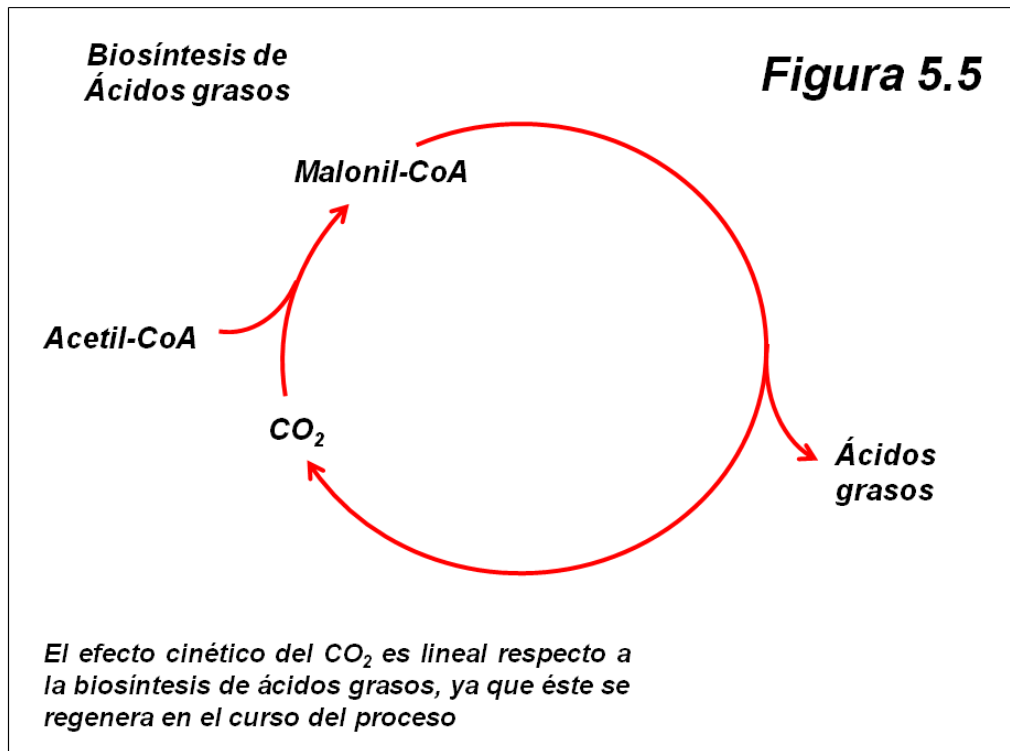
Ciclo de Krebs

Figura 5.4



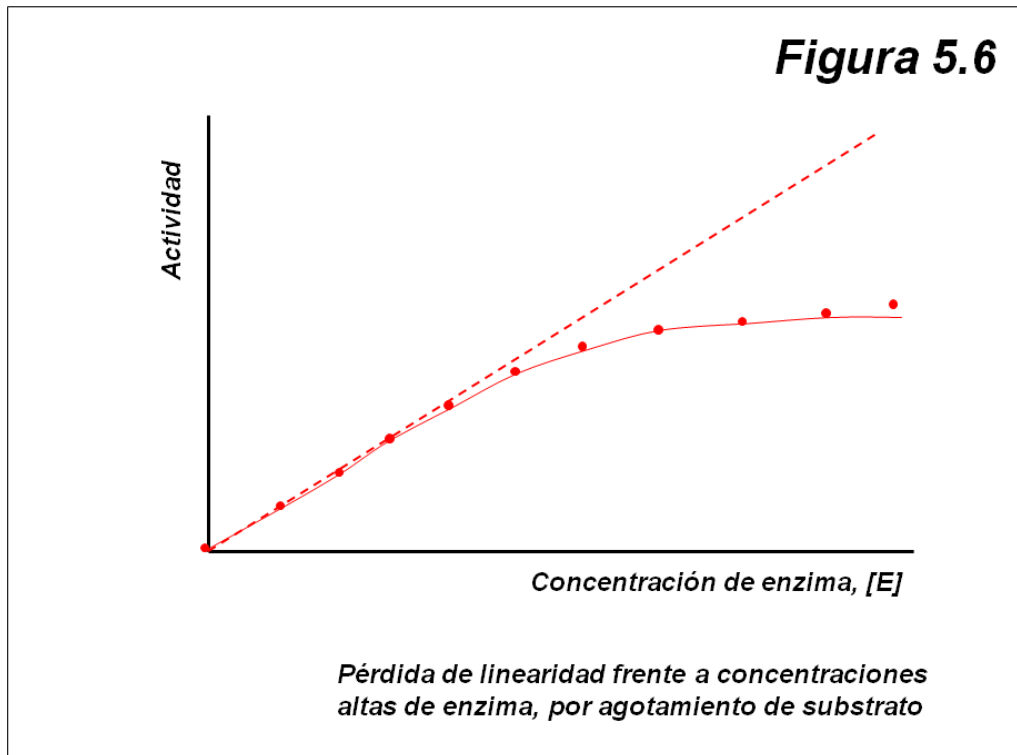
El consumo de O_2 es lineal respecto a la concentración de los substratos del ciclo, ya que éstos se regeneran en el curso de la reacción

Un fenómeno parecido tiene lugar en la biosíntesis citoplásmica de ácidos grasos, proceso enteramente dependiente de la presencia de CO_2 y cuya velocidad es proporcional a la concentración del mismo (normalmente en forma de ion bicarbonato HCO_3^-). El CO_2 se incorpora mediante la acetil-CoA carboxilasa y posteriormente se regenera al condensarse la unidad malonil- con la unidad acil- en la superficie de la sintetasa de ácidos grasos (figura 5.5).



No obstante, nos encontramos en el laboratorio muchas situaciones experimentales en las que no podemos evidenciar esta relación lineal entre concentración de enzima y velocidad de reacción. Esto es debido generalmente a artefactos experimentales, como veremos seguidamente.

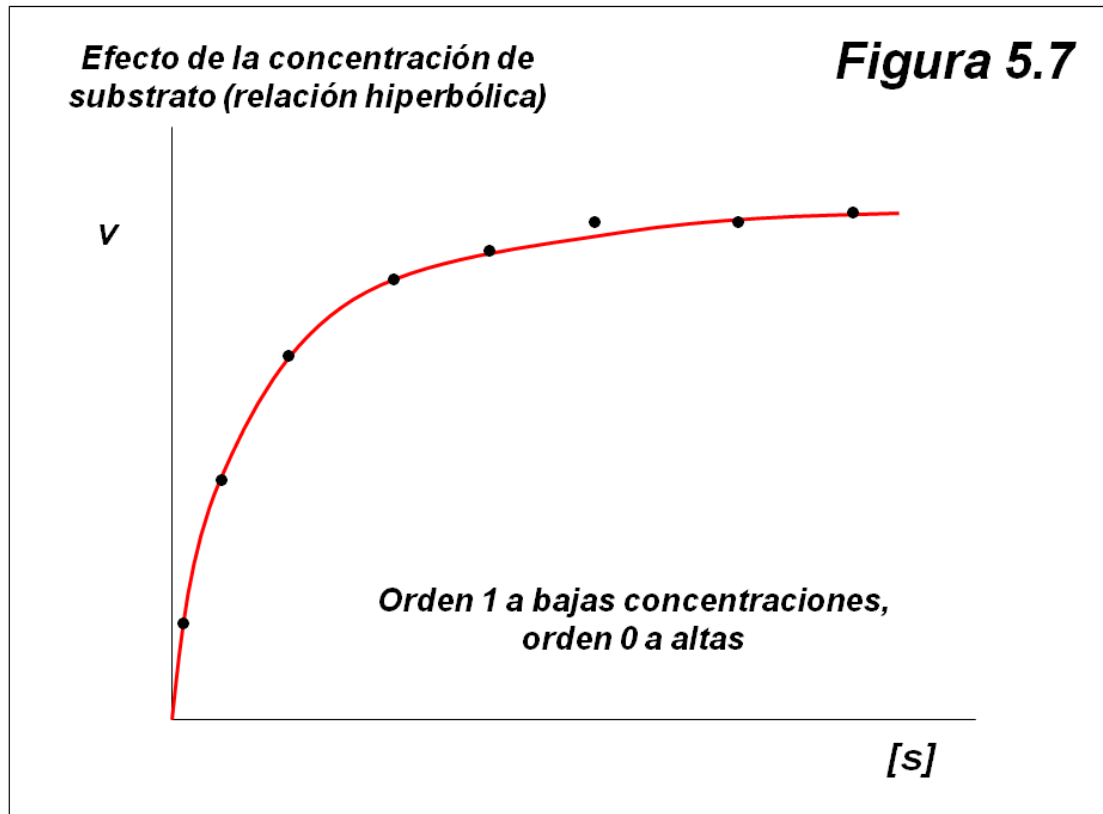
Algunas veces, particularmente en preparaciones muy activas, la representación de actividad frente a concentración de enzima, da lugar a curvas que progresivamente se aplanan (ver figura 5.6). La razón más común para este fenómeno es el agotamiento del sustrato. Al ser muy alta la actividad, la concentración de sustrato disminuye muy rápidamente hasta hacerse *limitante*.



Este efecto es particularmente importante cuando en el laboratorio clínico medimos actividades enzimáticas muy altas (por ejemplo, la alanina aminotransferasa en las hepatitis víricas) en las que si no repetimos la medición con el suero (que es donde está la enzima) convenientemente diluído, se corre el peligro de subestimar la verdadera actividad enzimática presente en el mismo, y por tanto, dar un informe equivocado a efectos diagnósticos o pronósticos. En general, cuando obtenemos un aplanamiento de la relación entre concentración de enzima y velocidad se trata de un defecto metodológico.

5.3 Efecto de la concentración de sustrato

Cuando ensayamos la actividad de una enzima en función de la concentración de sustrato, manteniendo constantes todas las demás condiciones, como concentración de enzima, pH, temperatura y concentración de otros sustratos si los hubiere, obtenemos una relación como la que se presenta en la figura 5.7. En ella podemos ver que a bajas concentraciones del sustrato la velocidad aumenta de forma casi lineal; esta dependencia se va aplanando a medida que aumenta la concentración y para concentraciones muy altas, la curva se aproxima asintóticamente a un límite máximo, la *velocidad máxima*, que no se modifica por mucho que aumentemos la concentración de sustrato.



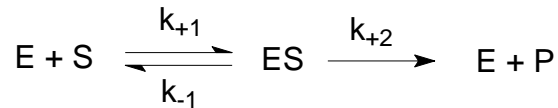
En otras palabras, la velocidad de una reacción enzimática es de orden mixto respecto a la concentración de sustrato: casi de primer orden a bajas concentraciones y casi de orden cero a las concentraciones altas del mismo, siendo de orden fraccionario entre 1 y 0 para las concentraciones intermedias. La forma geométrica que resulta de esta relación, es decir, la gráfica presentada en la figura 5.7, es la de una hipérbola rectangular.

En el capítulo 3 hemos visto que la acción enzimática puede interpretarse mediante un modelo que supone al sustrato fijándose a una región específica y complementaria de la superficie de la enzima, el *centro activo*, en el que los grupos químicos de la proteína transforman al sustrato. Dado que la enzima está a una concentración finita, y que el número de centros activos por tanto también lo es, hay en total un número fijo y determinado de sitios; cuando la concentración del sustrato es suficientemente alta, todos los sitios estarán ocupados y la velocidad no aumentará aun cuando aumente la concentración del sustrato. Se dice entonces que la enzima está *saturada*. En general, los mecanismos que dan lugar a este tipo de curvas se denominan *saturantes*.

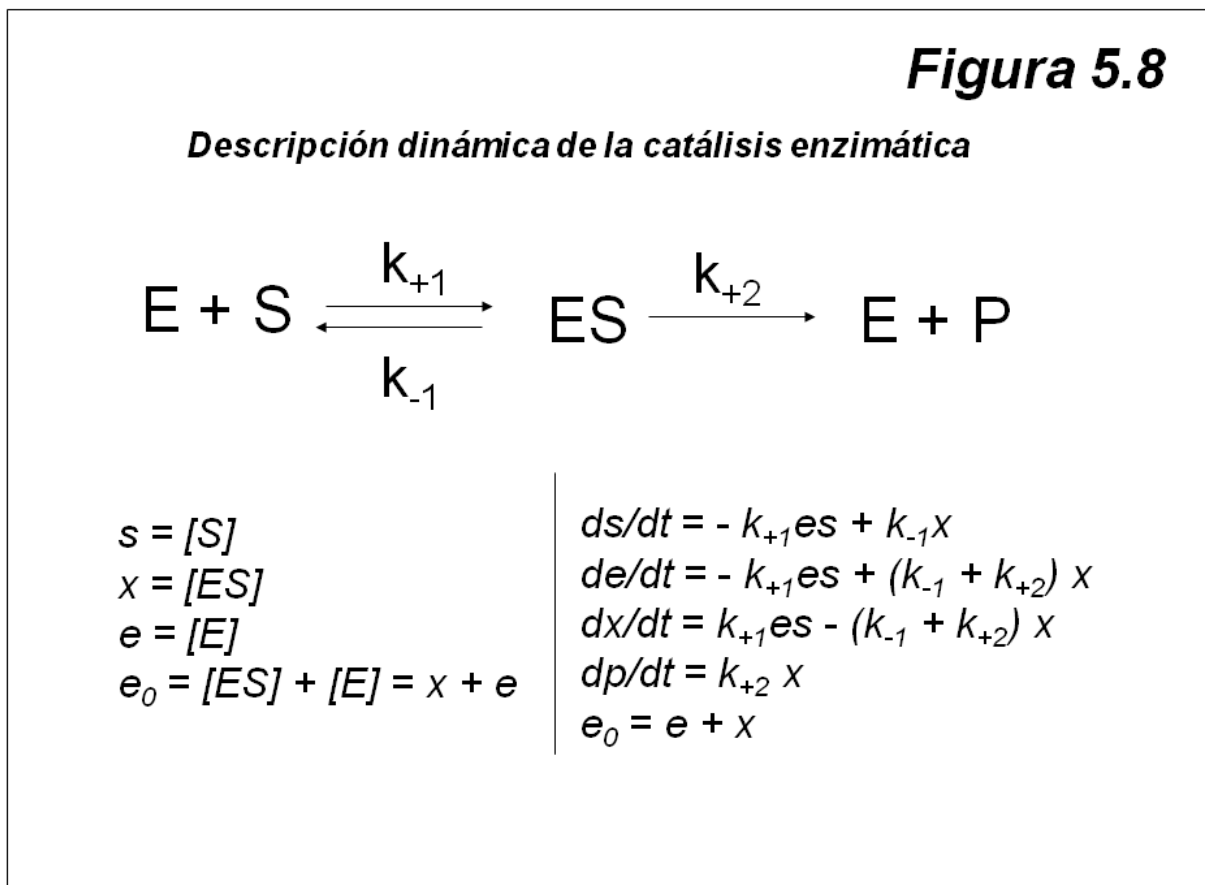
5.3.1 Estudio cinético de la interacción enzima-sustrato

Suponemos que las enzimas operan según el siguiente mecanismo:

[2]



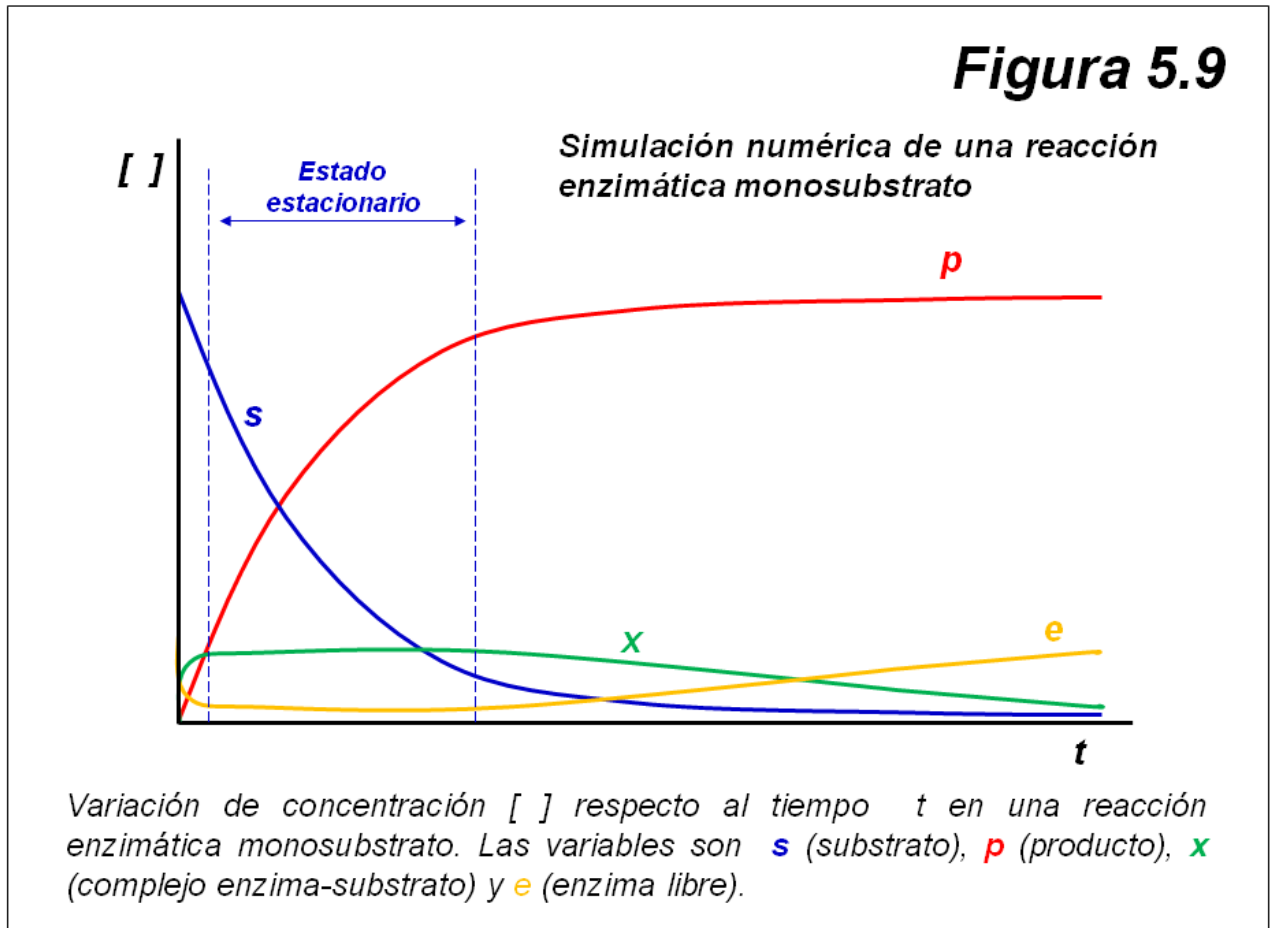
En donde E es la enzima, S el sustrato, ES el complejo enzima-sustrato y P el producto. Para evitar confusiones en las letras, en lo sucesivo llamaremos e a la concentración de enzima libre, e_0 a la de enzima total, s a la de sustrato, x a la del complejo enzima-sustrato y p a la del producto. Igualmente, y para simplificar el tratamiento matemático del mecanismo, suponemos que el complejo ES (cuya concentración es x) se forma reversiblemente a partir de E y S, con constantes de velocidad de k_{+1} para la reacción directa y k_{-1} para la inversa; y que el complejo se descompone irreversiblemente a E y P con constante de velocidad k_{+2} . Si la cantidad inicial de enzima en la reacción es e_0 , en cualquier momento se cumplirá que $e_0 = e + x$. Asimismo, y por simplicidad, supondremos que la concentración de sustrato es mucho mayor que la de enzima, esto es, $s \gg e_0$. Con estas premisas podríamos plantear el mecanismo como *un conjunto de ecuaciones diferenciales que no admiten solución analítica* (que se presentan, a efectos informativos, en la figura 5.8).



Las únicas soluciones posibles son las numéricas o bien aquellas que introducen ciertas suposiciones simplificadoras del mecanismo. En cualquier caso, la velocidad de la reacción siempre será

$$v = k_{+2}x$$

Donde v es la velocidad, k_{+2} la constante de velocidad de formación de producto P y x la concentración de complejo enzima-substrato. La figura 5.9 representa una curva de progreso para este mecanismo calculada numéricamente.



5.3.2 Mecanismo de Michaelis y Menten

Brown y **Henri** en 1902 fueron los primeros en sugerir el mecanismo [2], es decir, que la acción enzimática tiene lugar formándose primero un complejo ES que posteriormente se descompone a $E + P$. En 1913, **Michaelis** y **Menten** postularon una suposición adicional sobre este mecanismo que conduce a una solución sencilla que concuerda con los datos experimentales en la mayoría de los casos (suposición de *equilibrio rápido*)

Estos autores introdujeron una nueva simplificación (añadida a la suposición de que $s \gg e_0$) en este mecanismo al postular que la formación del complejo ES a partir de enzima y sustrato es mucho más rápida que su descomposición ulterior a enzima y producto; y por

tanto, se alcanza el equilibrio muy rápidamente. Dicho de otra forma, $k_{+1} \approx k_{-1} \gg k_{+2}$. En ese caso, y utilizando la misma nomenclatura que en el apartado anterior, podemos utilizar una ecuación de equilibrio para obtener la concentración x del complejo ES:

[4]

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{e_s}{x} = \frac{(e_0 - x)s}{x}$$

En donde K_m es la constante de equilibrio de disociación del complejo ES, y por tanto, igual al cociente de las constantes de velocidad k_{-1}/k_{+1} . Despejando x ,

[5]

$$x = \frac{e_0 s}{K_m + s}$$

Pero la velocidad de la reacción enzimática, según [3] es $dp/dt = k_{+2}x$; por lo tanto, al sustituir el valor de x por [5] obtenemos

[6]

$$v = \frac{dp}{dt} = k_{+2}x = \frac{k_{+2}e_0 s}{K_m + s}$$

Ahora bien: si el producto $k_{+2}x$ nos da la velocidad de la reacción, el producto $k_{+2}e_0$ representa la *máxima velocidad* que puede alcanzar la misma; de hecho, este producto sería la velocidad en el caso de que toda la enzima estuviera en forma de complejo ES (es decir, cuando toda la enzima está saturada por el substrato, $x = e_0$). Por esa razón, a partir de ahora, llamaremos V_{max} a dicho producto, con lo que la ecuación [6] se transforma en:

[7]

$$v = \frac{V_{max} s}{K_m + s}$$

Que es la relación conocida como *ecuación de Michaelis-Menten*. Representada gráficamente, vemos que se trata de una hipérbola rectangular cuya asíntota es V_{max} , como la curva representada en la figura 5.10. Esta relación nos da la velocidad inicial obtenida para cualquier concentración s del substrato siempre que conozcamos las dos constantes K_m y V_{max} , cuyo significado analizaremos a continuación.

5.3.3 Concepto de K_m

1. La K_m definida según el tratamiento de **Michaelis-Menten** que acabamos de exponer, es la constante de equilibrio de la disociación del complejo ES:

[8]

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

considerando E, S y ES a sus concentraciones de equilibrio. Por tanto, un valor grande de la K_m significa que en el equilibrio predominan las formas libres [E] y [S], o en otras palabras, que la afinidad de la enzima por el sustrato es pequeña. Por el contrario, un valor pequeño de K_m supone que la afinidad de la enzima por el sustrato es grande, ya que en el equilibrio predominará el complejo [ES] sobre las formas libres. Por otra parte, de la ecuación [8] se puede deducir que la K_m se mide en unidades de concentración. Hemos de tener en cuenta asimismo que la K_m es una constante que se define para una pareja enzima-sustrato; por ejemplo, en la reacción de la *hexokinasa*

[9]



hablaremos de la K_m de la glucosa, de la K_m del ATP, de la K_m de la glucosa-6-fosfato y de la K_m del ADP (estas dos últimas para la reacción inversa).

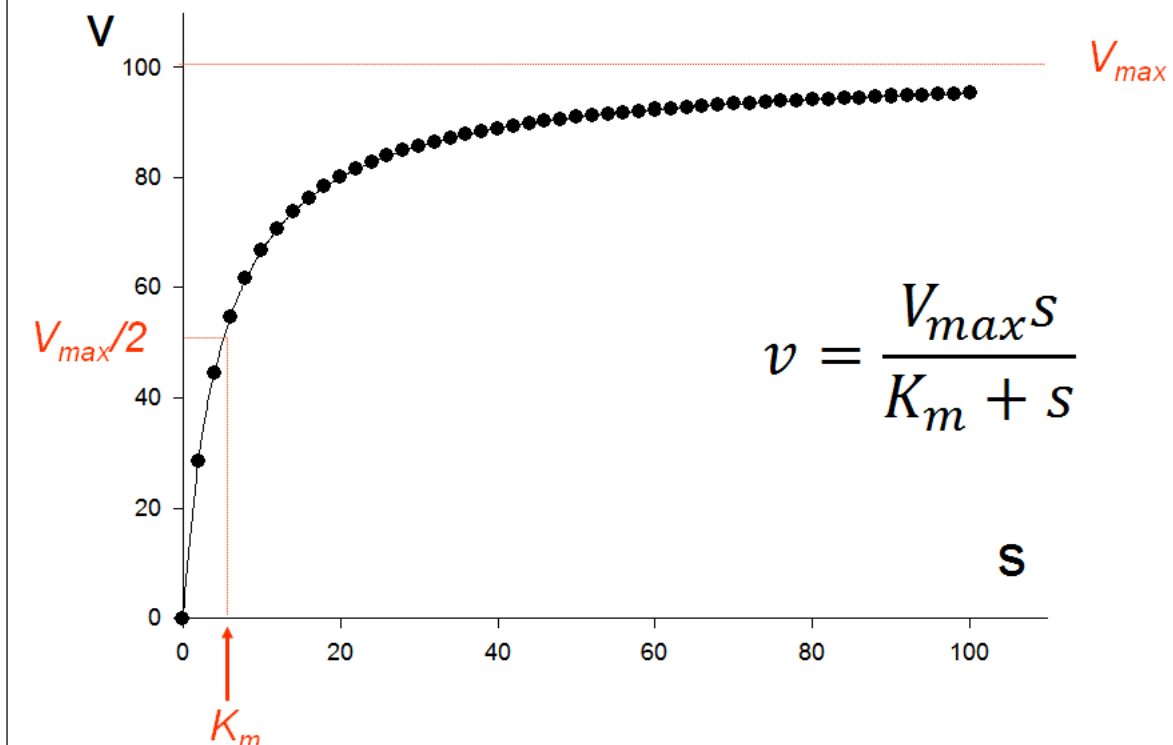
Ahora bien, se debe tener presente que el concepto de K_m como medida de afinidad es solamente válido en aquellos casos en que el mecanismo obedezca a las condiciones de Michaelis y Menten, es decir, cuando la formación de complejo ES sea mucho más rápida que la descomposición de éste hacia el producto, lo cual es por lo general la regla en muchas reacciones enzimáticas.

2. La K_m es independiente de la concentración de enzima. Se obtienen experimentalmente los mismos valores de esta constante ante cualquier concentración de enzima.

3. De [7] puede deducirse fácilmente que cuando la concentración de sustrato es igual a su K_m , la velocidad de la reacción será igual a $v_{max}/2$. Otra forma, pues, de definir la K_m es la siguiente: aquella concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la máxima. En la figura 5.10 se ilustra gráficamente este concepto.

Comportamiento experimental de una enzima. Se observa que la velocidad tiende a una asíntota V_{max} . La K_m es aquella concentración de sustrato para la que $v = V_{max}/2$

Figura 5.10



En este sentido, podemos denominar también a la K_m como $s_{0.5}$, es decir, concentración de sustrato que da lugar a $0.5V_{max}$. En el caso de que la enzima obedezca al mecanismo de Michaelis, $s_{0.5}$ es la constante de disociación del complejo enzima-sustrato.

Como veremos más adelante, la ecuación de Michaelis-Menten, con las oportunas salvedades, puede describir todos aquellos fenómenos en los que exista interacción de un ligando con un receptor. En ese caso, el parámetro $s_{0.5}$, definido como la concentración de ligando que provoca un efecto igual a la mitad del máximo posible, se toma siempre como una medida de afinidad del ligando con el receptor. Si es grande, la afinidad es pequeña, y si es pequeña, la afinidad es grande. Por ejemplo, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (fijación que, por cierto, no puede ser descrita por dicha ecuación) se mide en términos de P_{50} , parámetro que significa la presión parcial de oxígeno que da lugar a un 50 % de saturación; y que tiene, por lo tanto, el mismo significado que la $s_{0.5}$ o la K_m (bajo suposiciones de Michaelis-Menten).

4. En el capítulo 2 vimos que podemos considerar al centro activo de las enzimas como dotado de dos funciones: (1) la fijación estereoquímicamente complementaria del sustrato y (2) su transformación catalítica. Estas dos funciones no son necesariamente independientes la una de la otra. Con las reservas oportunas, podemos decir que la K_m describe cuantitativamente la primera de estas dos funciones. Veremos este concepto con más detenimiento al hablar de la inhibición enzimática.

5. Cuando la concentración de un sustrato es aproximadamente igual o menor a su K_m , la dependencia de la velocidad respecto a la concentración de sustrato es más o menos lineal. Esto significa que en dicho intervalo de concentraciones las variaciones que pueda haber en la concentración de sustrato dan lugar a variaciones aproximadamente proporcionales en la velocidad. Por ello, a estas concentraciones de sustrato, podemos considerar que las enzimas poseen una cierta *autoregulación*; una acumulación de sustrato conduce a un incremento en la velocidad de la enzima que lo transforma, y viceversa. Se ha pretendido que las concentraciones intracelulares de estado estacionario de los sustratos tienden a estar en los niveles próximos a su K_m . No se puede dar una norma general a este respecto, pero este hecho es cierto para muchos metabolitos.

5.3.4 Concepto de V_{max}

1. La V_{max} representa la velocidad que se consigue cuando la concentración de sustrato tiende a infinito, es decir, es la asíntota superior de la ecuación de Michaelis-Menten; o bien, la velocidad conseguida cuando toda la enzima presente está en forma de complejo enzima-sustrato. Esta constante tiene dimensiones de velocidad, y por tanto, en cinética enzimática se expresa en UI o en kat (v. Cap. 2)

2. La propia definición de V_{max} como $k_{+2}e_0$ (en el mecanismo [2]) nos permite deducir que la V_{max} es directamente proporcional a la concentración de enzima. En este contexto se prefiere denominar a la constante k_{+2} como k_{cat} que es el *número de recambio* o de *turnover* de la enzima, es decir, el número de moles de sustrato transformadas en la unidad de tiempo por mol de enzima, y sus dimensiones son de t^{-1} . e_0 es la concentración molar de enzima. Por tanto, V_{max} queda establecida como el producto $k_{cat}e_0$. Al ser k_{cat} independiente de la concentración de enzima, hoy día se prefiere el uso de esta constante en lugar de V_{max} .

3. A partir de la consideración anterior, podemos suponer a la V_{max} como la medida cuantitativa de la intensidad de transformación catalítica del sustrato, de la misma manera que la K_m representaba la función de fijación al mismo.

5.3.5 Aproximación de estado estacionario

Las suposiciones de Michaelis y Menten no son de aplicación a todas las enzimas. En particular, cuando se trata de sistemas multisustrato, la disociación de productos a partir del complejo puede ser tan rápida como la fijación de sustratos al mismo.

Volvamos a la figura 5.9, en la que se presentaba la solución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales que describían la acción enzimática (figura 5.8). Puede observarse que durante un período de tiempo muy apreciable la concentración del complejo enzima-sustrato x permanece prácticamente constante (es decir, $dx/dt = 0$) Esta fue la

base para que **Briggs y Haldane** propusieran en 1925 el mecanismo de *estado estacionario* para derivar una relación entre velocidad y concentración de sustrato que no estuviera sometida a las restricciones del mecanismo de Michaelis, particularmente en lo que a los valores relativos de constantes de velocidad se refiere. Si exceptuamos los primeros momentos de la reacción, la concentración de complejo ES (representada por **x**) permanece prácticamente constante. En estas condiciones, tenemos:

La cinética enzimática formal se describe a partir de una serie de ecuaciones diferenciales que aparecen en la figura 5.8. La ecuación que describe la dinámica del complejo enzima-sustrato **x** es la siguiente:

[10]

$$dx/dt = k_{+1}es - (k_{-1} + k_{+2})x$$

El sistema de ecuaciones que aparece en la figura no tiene solución analítica, pero se pueden hacer aproximaciones numéricas, una de las cuales aparece en la figura 5.9. En ella se aprecia que durante un período muy apreciable de tiempo la concentración de **x** permanece constante (lo que llamamos *estado estacionario*). Por lo tanto, podemos decir que en ese caso,

[11]

$$dx/dt = k_{+1}es - (k_{-1} + k_{+2})x = 0$$

Entonces,

[12]

$$x = \frac{k_{+1}es}{k_{-1} + k_{+2}}$$

Pero sabemos que

[13]

$$e_0 = e + x \quad || \quad e = e_0 - x$$

Es decir, la enzima total **e₀** es igual a la enzima libre **e** más el complejo enzima-sustrato **x**. Y la enzima libre es igual a **e₀** menos el complejo **x**.

Sustituyendo el valor de **e** en la ecuación [2] y desarrollando términos,

[14]

$$k_{+1}e_0s - xs = (k_{-1} + k_{+2})x$$

Despejando **x**,

[15]

$$x = \frac{e_0 s}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + s}$$

Llamando K_m al cociente $[(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}]$,

[16]

$$x = \frac{e_0 s}{K_m + s}$$

La velocidad de la reacción será

[17]

$$v = k_{+2} x = \frac{k_{+2} e_0 s}{K_m + s}$$

Pero $k_{+2} e_0 = V_{max}$, y por lo tanto,

[18]

$$v = \frac{V_{max} s}{K_m + s}$$

Ecuación análoga a la de Michaelis-Menten (ecuación [7]) pero en la que K_m tiene un significado distinto. Si bajo condiciones de equilibrio rápido (condiciones de Michaelis-Menten), K_m puede ser descrita como el cociente k_{-1}/k_{+1} , en condiciones de estado estacionario será $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$. Por tanto, bajo la suposición de estado estacionario, K_m no mide la afinidad de la enzima por el substrato. Sin embargo, K_m sigue siendo la $s_{0.5}$, es decir, la concentración de substrato para la cual se alcanza una velocidad igual a $V_{max}/2$.

La hipótesis de estado estacionario es la que normalmente se emplea cuando tratamos con sistemas multisubstrato, ya que la derivación de ecuaciones de velocidad por este procedimiento es fácil y directa. No la trataremos aquí.

5.3.6 Eficiencia catalítica de las enzimas

La velocidad de una reacción enzimática correspondiente al mecanismo estudiado viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación [7]). Para concentraciones altas de substrato ($s \gg K_m$), esta ecuación se reduce a:

[19]

$$v = V_{\max} = k_{cat}e_0$$

En la cual no aparece ningún término en s , lo que nos indica que en estas condiciones la reacción enzimática es orden cero respecto al sustrato. Sin embargo, a concentraciones bajas de sustrato ($s \ll K_m$), la ecuación de Michaelis-Menten toma la forma

[20]

$$v = \frac{V_{\max}}{K_m} e_0 s$$

En la que vemos que la reacción es primer orden respecto a sustrato y segundo orden global (ya que depende de dos términos de concentración, e_0 y s , siendo la constante k_{cat}/K_m la constante de velocidad de segundo orden. Esta constante representa la *eficiencia catalítica de la enzima*, y su valor será tanto mayor cuanto más eficiente sea ésta. Pero enzimas y sustratos se encuentran normalmente en un medio acuoso, y en último término la velocidad de la reacción llegaría a estar controlada por la velocidad de difusión de enzimas y sustratos en dicho medio. La estructura molecular de las enzimas puede llegar a hacerse extremadamente eficiente en la catálisis, pero es obvio que no tiene ningún sentido evolutivo obtener eficiencias catalíticas superiores a la velocidad de difusión. Ésta se ha calculado en un orden de magnitud de 10^8 moles/segundo; por ello, esta cifra representa un límite máximo a la eficiencia catalítica de las enzimas. Muchas enzimas conocidas alcanzan esta cifra: se dice que son *enzimas controladas por difusión*, o bien *enzimas plenamente evolucionadas*. Algunas se presentan en la tabla I:

Tabla I

Eficiencia catalítica de algunas enzimas

Enzima	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m
Catalasa	4×10^7	1.1	3.63×10^7
Fumarasa	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
Anhidrasa carbónica	10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7

5.3.7 Determinación experimental de K_m y V_{max}

K_m y V_{max} son constantes *empíricas*, es decir, deben necesariamente determinarse a partir de experimentación. Para ello, seleccionamos un intervalo adecuado de concentraciones de sustrato y ensayamos la actividad enzimática para cada concentración, manteniendo todas las demás condiciones de ensayo constantes: pH, temperatura, fuerza iónica y concentración de enzima. Normalmente las determinaciones se hacen como mínimo por duplicado o triplicado, y para cada condición determinamos la velocidad inicial.

Por lo general, antes de proceder a la determinación de las constantes cinéticas se requieren experimentos previos. Por ejemplo, un rango adecuado de concentraciones de sustrato es aquél en el que vaya incluida la K_m ; concentraciones demasiado pequeñas darían lugar a una recta de pendiente positiva; concentraciones demasiado altas darían lugar a una recta de pendiente cero; en ninguno de los dos casos podríamos determinar eficazmente las constantes cinéticas. Por ello, en experimentos previos se debe determinar al menos el orden de magnitud en el que se encuentra la K_m . Si se trata de una enzima multisustrato, debemos asimismo experimentar con la concentración óptima de los otros sustratos. La selección de la concentración de enzima es asimismo importante. Una concentración demasiado alta puede dar dificultades a la hora de determinar velocidades iniciales (véase más arriba); una concentración demasiado baja puede crear problemas con la sensibilidad del método de seguimiento o con el tiempo necesario para cada ensayo. Las condiciones de pH y temperatura deben también ser objeto de experimentos previos.

Una vez realizado el ensayo, representamos en una gráfica los resultados obtenidos; la concentración de sustrato en el eje X, y la velocidad inicial obtenida para cada condición en el eje Y. Un resultado típico se presenta en la figura 5.10, en la que los resultados parecen seguir claramente la ecuación de Michaelis. A partir de ella podemos determinar la V_{max} (como la asíntota superior) y a continuación la K_m como concentración de sustrato que da lugar a una velocidad igual a $V_{max}/2$.

Ahora bien, este tipo de gráficas no nos permite una determinación precisa de V_{max} , y por tanto de K_m . El error de los puntos experimentales hace muy difícil situar exactamente la asíntota; por otra parte, ajustar los puntos a una hipérbola es más difícil que hacerlo a una línea recta. Por estas razones se prefiere hacer transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten.

5.3.7.1 Transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten

Si transformamos la ecuación de Michaelis-Menten en las siguientes expresiones:

[21]

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{s} + \frac{1}{V_{\max}}$$

[22]

$$\frac{s}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \times s + \frac{K_m}{V_{\max}}$$

[23]

$$v = -K_m \times \frac{v}{s} + V_{\max}$$

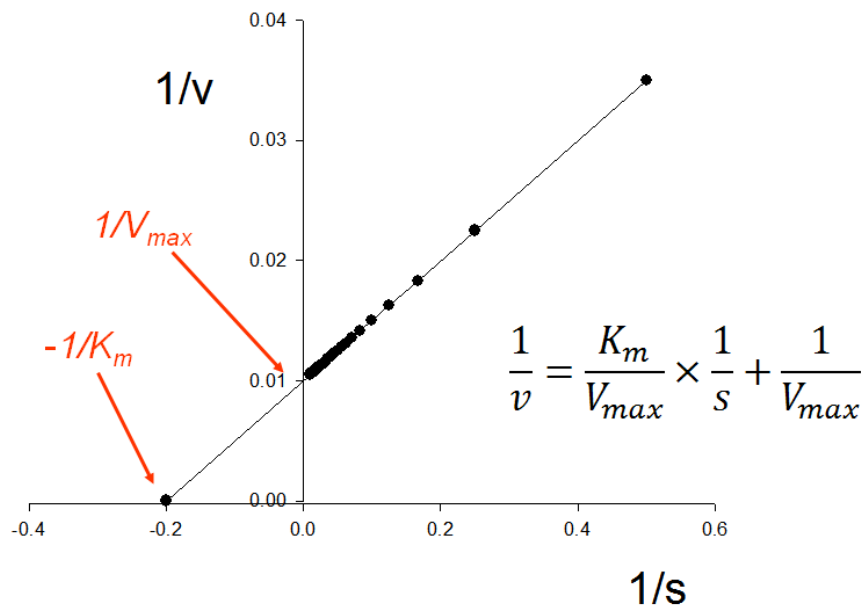
Podemos ver que se trata de otras tantas ecuaciones de una recta. En el primer caso [21], tenemos que la representación de $1/v$ en función de $1/s$ nos da una línea recta cuya pendiente es K_m/V_{\max} ; su corte en ordenada es $1/V_{\max}$ y el corte en abscisa es $-1/K_m$, tal y como aparece en la figura 5.11. Este tipo de representación se llama *recíproca doble*, o bien *representación de Lineweaver y Burk*.

A partir de cualquiera de ellas, mediante una *regresión de mínimos cuadrados*, o bien gráficamente sobre papel milimetrado, pueden obtenerse los valores de K_m y de V_{\max} . En los tres casos se procede de una manera parecida: obtenidos los puntos experimentales, se traza la línea de regresión; esta línea nos brinda el valor de la pendiente y el corte en ordenadas, a partir de los cuales calculamos los valores de K_m y de V_{\max} . Por lo general, los puntos se ponderan respecto a la dispersión obtenida en los correspondientes duplicados o triplicados de cada punto.

El uso cada vez más generalizado de ordenadores en el análisis de datos cinéticos hace que el interés de estos métodos sea cada vez más reducido. En general, hoy día los programas cinéticos parten de *regresiones no lineales*, lo que les hace mucho más eficientes y versátiles. Existen hoy día paquetes de programas adaptados al cálculo de las constantes cinéticas que brindan una gran cantidad de información adicional.

Los mismos datos de la figura 5.10 en representación recíproca doble (Lineweaver-Burk)

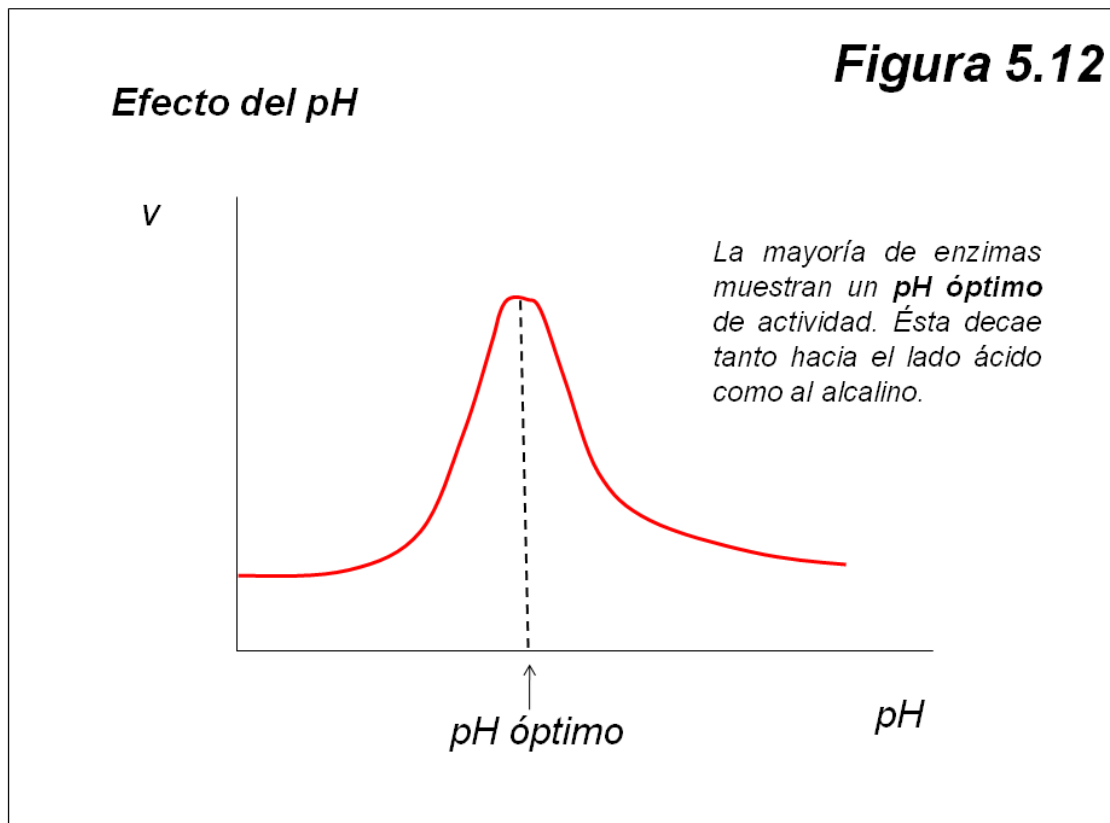
Figura 5.11



5.4 Efecto del pH sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas

5.4.1. Bases moleculares

El pH del medio es una de las variables a las que más sensible es la acción enzimática. En general, cuando representamos el efecto del pH sobre la actividad de una enzima se suelen obtener gráficas como la presentada en la figura 5.12.

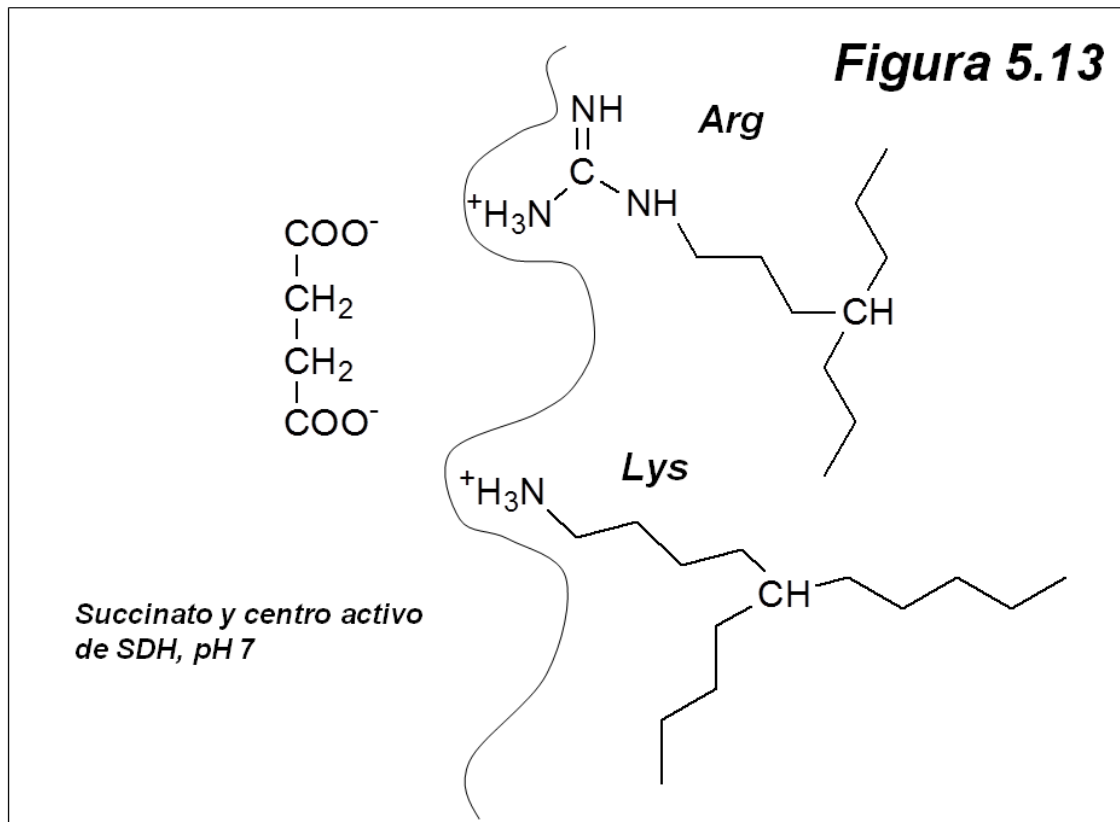


Se trata de una curva acampanada que muestra una región de actividad máxima (el pH óptimo de la enzima) con regiones de actividad decreciente a uno y otro lado. En algunos casos falta una de las dos ramas descendentes; en otros, la región óptima está extendida en una amplia gama de pH; pero la forma más usual de dependencia es la citada en primer lugar.

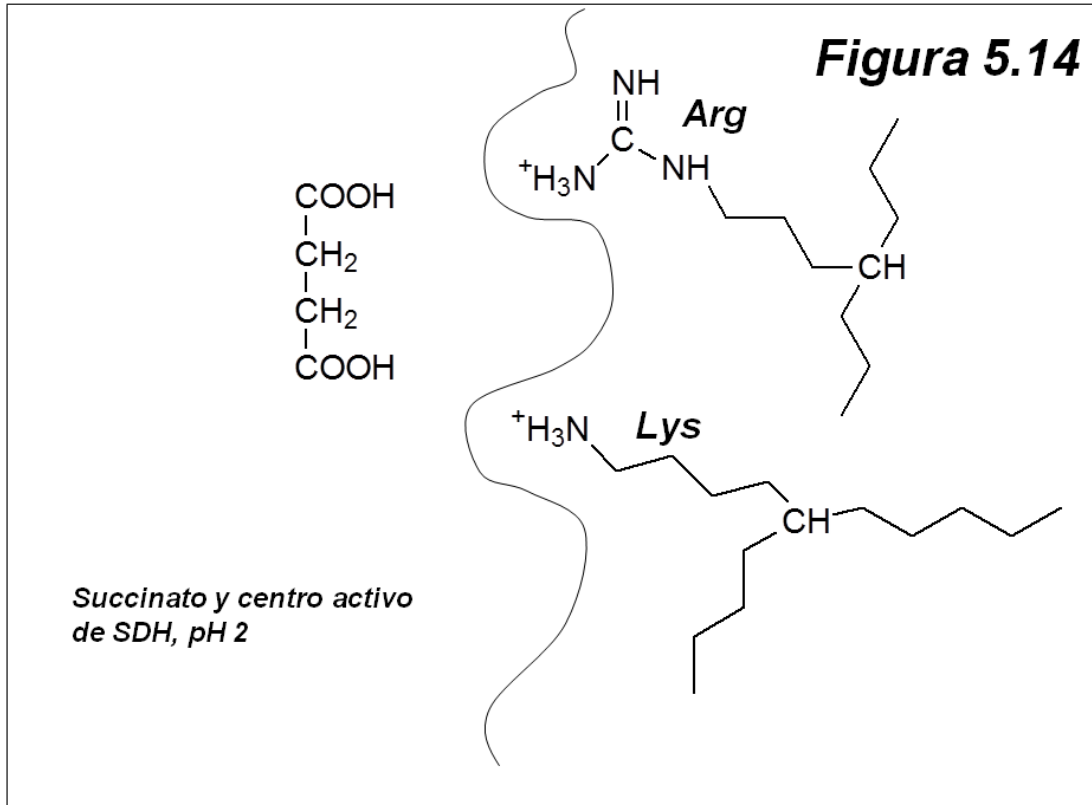
En algunos casos un estudio detenido de los efectos del pH puede dar información muy valiosa sobre los grupos presentes en el centro activo. Pero los efectos del pH son, por lo general, mucho más complejos. Teniendo en cuenta que el pH determina el estado de ionización de los grupos químicos tanto del sustrato como de la enzima, el efecto de esta variable puede ejercerse sobre: (a) la ionización del sustrato; (b) la ionización de los grupos enzimáticos del centro activo, que a su vez pueden determinar variaciones sobre la fijación del sustrato o sobre la actividad catalítica, o ambas a la vez; (c) la ionización de grupos en la molécula de enzima no directamente relacionados con la actividad enzimática, pero sí con el mantenimiento de su estructura tridimensional, y de ahí su efecto indirecto sobre los grupos del centro activo.

Podemos entender estos efectos analizando la dependencia de pH de la enzima *succinato deshidrogenasa*. Esta enzima cataliza la transformación de succinato en fumarato, una importante reacción del ciclo de Krebs de los ácidos tricarbónicos. Tiene un pH óptimo en torno a 7. La fijación de sustrato a la enzima media a través de interacciones iónicas entre los grupos carboxilo del sustrato y aminoácidos dibásicos (lisina y arginina) situados en la superficie de la enzima.

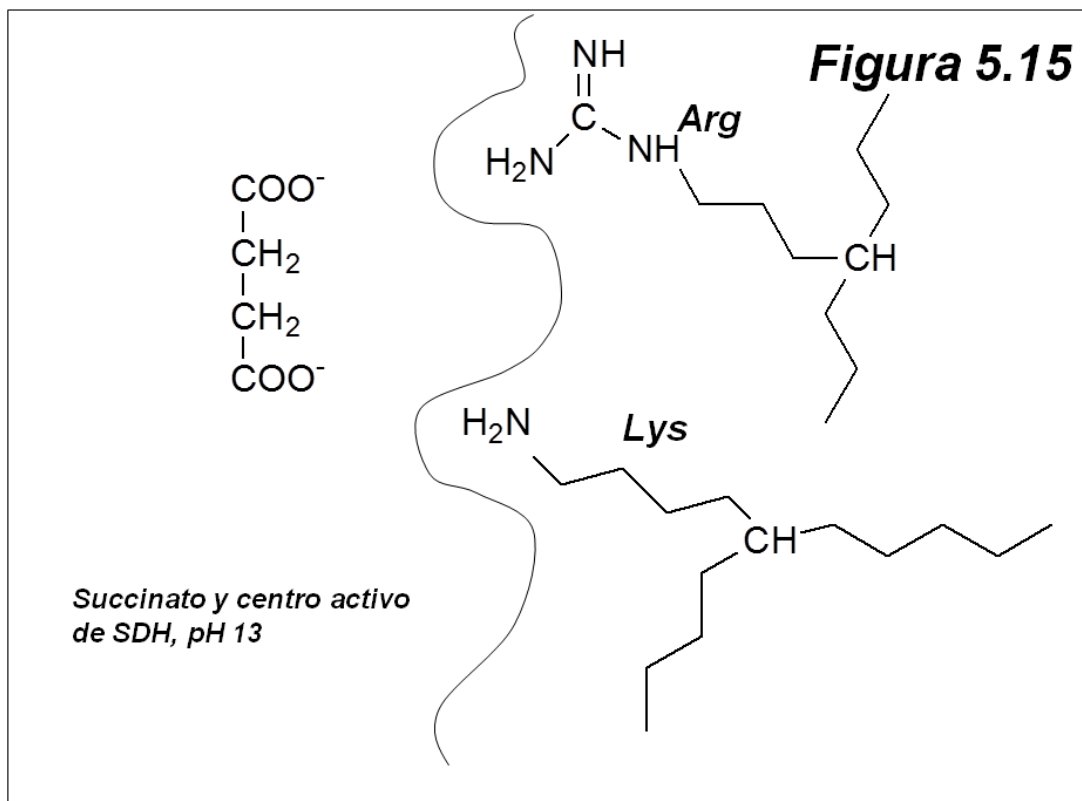
1. A pH 7 (figura 5.13) podemos ver cómo el estado de ionización es tal que los dos carboxilos del succinato están disociados (con carga negativa) y los dos aminoácidos de la superficie de la enzima protonados (con carga positiva). La interacción enzima-sustrato es óptima en estas condiciones.



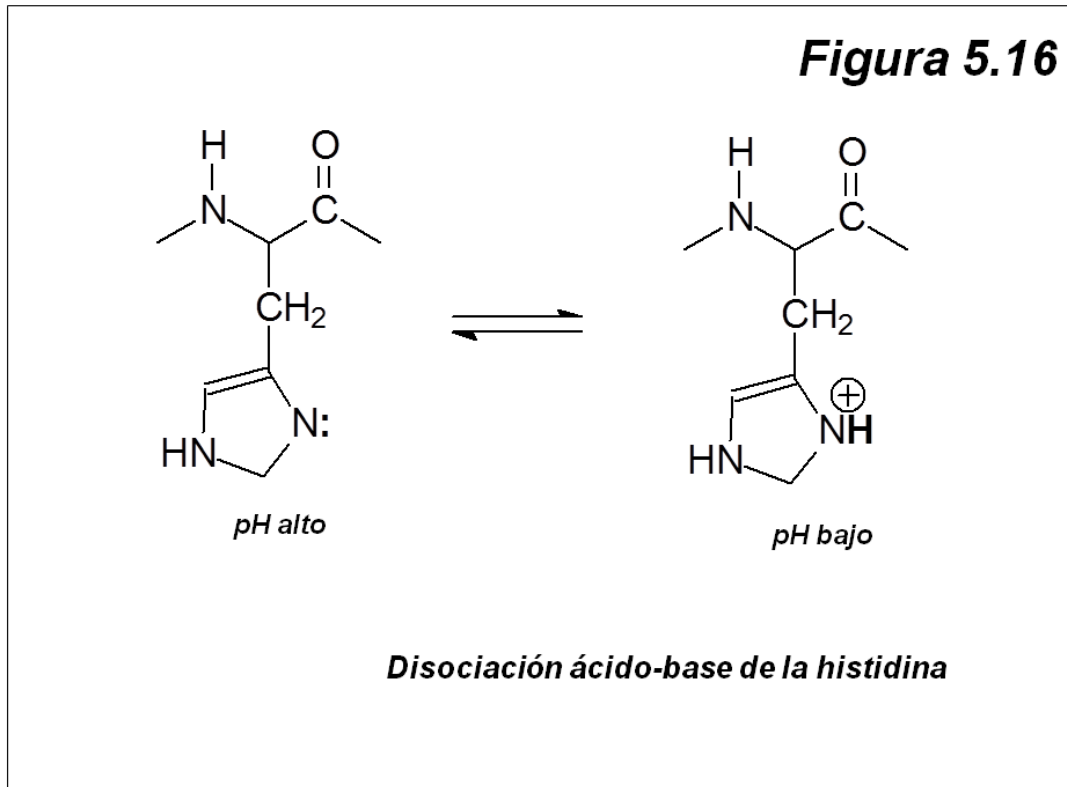
2. A pH 2 (figura 5.14), inferior al pK de los carboxilos del sustrato, éste se presenta en estado protonado, y por tanto no tiene carga eléctrica, lo que impide su fijación al centro activo de la enzima.



3. A pH 13 (figura 5.15), superior al pK de los grupos básicos laterales de lisina y arginina, éstos aparecen en su forma de base conjugada, que en este caso no tiene carga eléctrica. En estas condiciones tampoco se puede fijar el sustrato.



En muchas enzimas está presente el aminoácido *histidina* en el centro activo. Por lo general, la forma activa de las histidina en este contexto es la disociada (sin carga eléctrica, dejando libre el par electrónico del nitrógeno imidazólico). Es obvio que el descenso de pH provocará la protonación de este grupo (figura 5.16), impidiendo así su funcionamiento como reactivo (ver capítulo 7).



Podríamos citar de esta manera ejemplos para casi todas las enzimas en las que conocemos la estructura y el mecanismo catalítico.

5.4.2 Significado biológico del efecto del pH

En los organismos pluricelulares, una de las constantes más cuidadosamente mantenidas es el pH del medio interno, en el que unas pocas décimas de variación pueden llegar a ser incompatibles con la vida. La razón fundamental de esta falta de tolerancia radica precisamente en la sensibilidad de las enzimas del metabolismo celular hacia el pH. Por otra parte, pequeñas variaciones locales del pH pueden dar lugar a alteraciones delicadas en la actividad enzimática, lo que supone una posibilidad de regulación intracelular de la actividad enzimática. Si tenemos en cuenta que los principales grupos implicados en la catálisis enzimática son el imidazol de la histidina, el hidroxilo de serina, carboxilos de aspartato y glutamato, tiol de cisteína y amino de lisina, no es de extrañar que las variaciones de pH afecten a la actividad enzimática puesto que todos estos grupos son susceptibles de disociación ácido-base. Si a esto añadimos que las interacciones de tipo

salino pueden ser determinantes en la unión del sustrato a la enzima, y éstas dependen de grupos con carga eléctrica, estaremos en condiciones de comprender la importancia del efecto del pH sobre la actividad enzimática (tal como hemos visto en el ejemplo del apartado anterior)

El interior celular posee una alta concentración proteínica y sin duda es ésta la defensa principal del citoplasma ante cambios del pH. No ocurre así, sin embargo, en el medio interno (es decir, el medio extracelular) de organismos pluricelulares; de ahí que en el curso de la evolución hayan surgido complejos sistemas de regulación ácido-base. En los mamíferos, estos sistemas implican a la sangre (plasma y glóbulos), al aparato respiratorio, al riñón, al sistema nervioso y al sistema endocrino. Su estudio queda fuera de contexto en este manual, pero no está de más recordar su existencia a efectos de una mejor comprensión del efecto del pH.

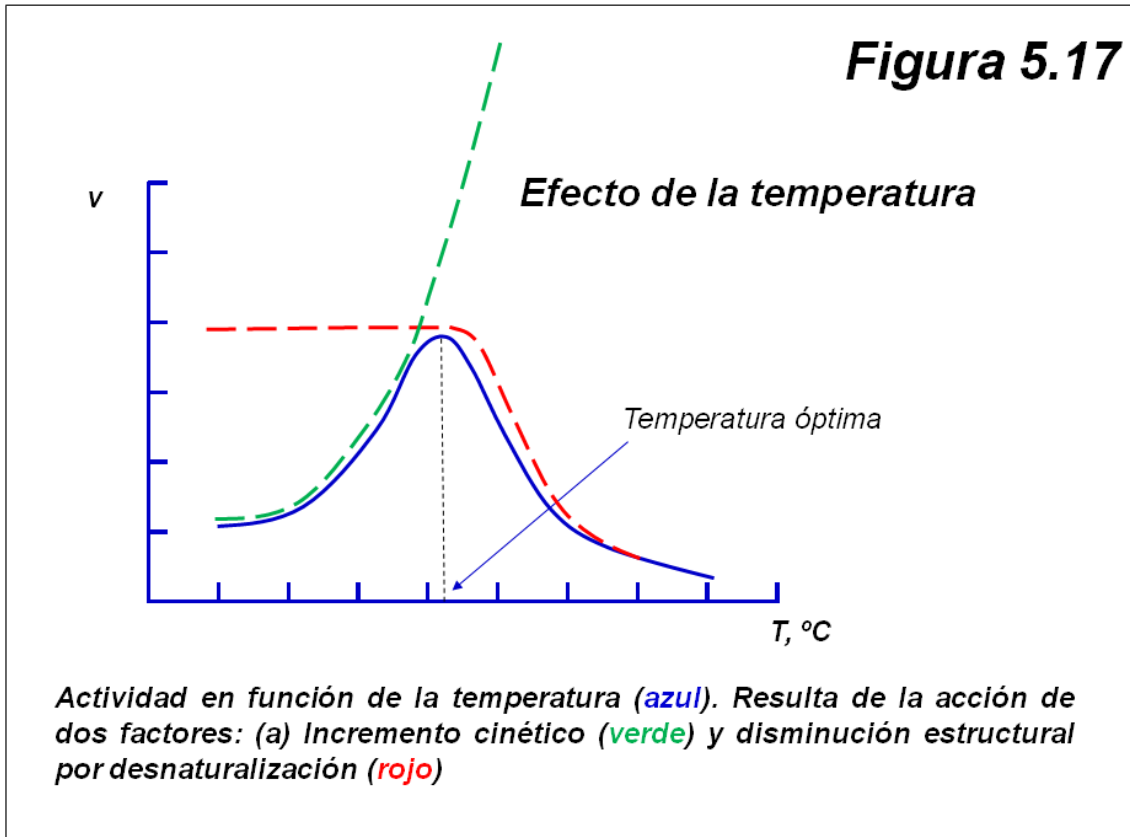
Ahora bien, una vez más debemos ampliar el significado de la interacción enzima-sustrato. Esta unión no es más que un caso del modelo más general de interacción entre proteínas y ligandos (*Modelo de Interacción Estereoquímica*). En este modelo generalizado, el pH cumple el mismo papel que hemos visto en el caso de la cinética enzimática; de ahí que todo tipo de interacción proteína-ligando (receptores hormonales, receptores nerviosos, sistemas de transporte, efectos farmacológicos, etc.) sea extremadamente sensible a variaciones del pH.

5.5 Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas

5.5.1 Bases moleculares

Cuando estudiamos en el laboratorio el efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas normalmente se obtienen curvas parecidas a la representada en la figura 5.17, es decir, una curva acampanada, no muy diferente en aspecto a la que se observa al comprobar el efecto del pH. Por esa razón hablamos de la existencia de una temperatura óptima para la actividad enzimática, que corresponde al máximo de la curva.

Figura 5.17



El efecto de la temperatura es mucho más complejo de lo que esta simple curva pudiera sugerir. Dos son los componentes principales en juego: por una parte, el efecto cinético de la temperatura sobre las constantes individuales de velocidad en la catálisis enzimática; por otra parte, el efecto de la temperatura sobre la estructura enzimática.

Estos dos factores operan en sentido inverso; una mayor temperatura acelera la velocidad de las reacciones individuales, tal como establece la ecuación de **Arrhenius**:

[15]

$$k_{cat} = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

pero al propio tiempo, el aumento de temperatura promueve la desnaturalización de la proteína, fenómeno que va acompañado de la disminución y eventual pérdida total de la actividad enzimática.

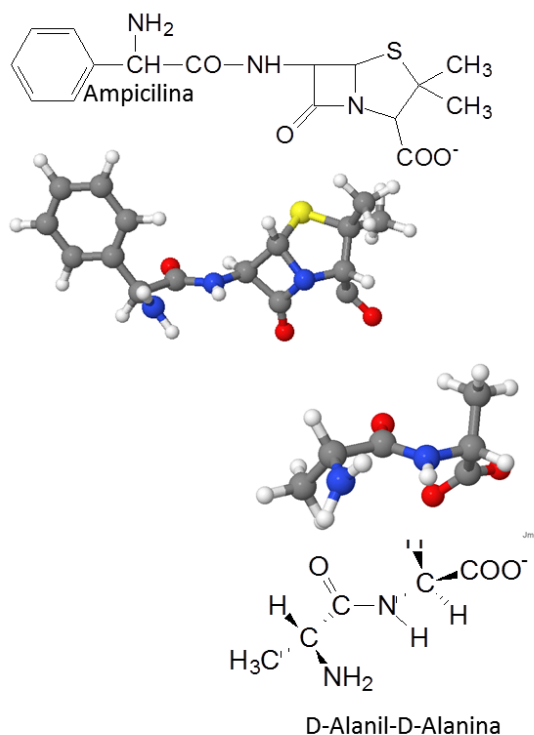
Respecto a este último efecto, podemos ver que la temperatura inactiva a las enzimas casi de forma generalizada. Temperaturas de 70 °C son suficientes para hacer desaparecer la actividad en unos pocos minutos; la fosfatasa alcalina del tejido óseo presenta un semiperíodo de inactivación a 56 °C de escasamente dos minutos. Las enzimas termorresistentes conocidas proceden de microorganismos habituados a altas temperaturas ambientales, como *Bacillus stearothermophilus* (entre las Bacterias) o bien las Arqueas termoacidófilas que se encuentran en manantiales termales o en los fondos marinos

cercanos a la crestas mediooceánicas, en las que la actividad volcánica permite temperaturas locales extremadamente altas para las que se observan normalmente en dichos ambientes.

5.5.2 Significado biológico del efecto de la temperatura

Podemos hacer respecto a la temperatura consideraciones finales análogas a las que se hicieron sobre el pH en el apartado anterior. El margen de temperaturas sobre el que se desarrollan los seres vivos es, en términos relativos, casi tan estrecho como el de pH. Desde los seres que viven a temperaturas árticas hasta los microorganismos termófilos, el margen es ligeramente superior a los 100 °C. Para los animales homeotermos, lo es de hecho mucho más reducido. La base molecular de esta restricción está en el efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas, en el sentido amplio a que antes nos referíamos, esto es, el efecto de la temperatura sobre todo tipo de interacción proteína-ligando.

CAPÍTULO 6: Inhibición enzimática



6.1 Concepto e importancia

Se denomina inhibidor a *todo agente capaz de hacer disminuir la actividad de una enzima*. En el estudio de la Enzimología, sin embargo, el término inhibidor posee un significado algo más restringido. Dentro de la definición que hemos adelantado es lógico que podamos considerar, por ejemplo, al ion H^+ como inhibidor, dado que muchas enzimas pierden actividad por el lado ácido de la escala de pH, o bien al ion OH^- por una razón similar; las temperaturas elevadas serían también inhibitorias; los agentes desnaturizantes de la proteína enzimática también lo serían, y así sucesivamente.

Por esta razón vamos a restringir el uso del término inhibidor a *aquellos agentes que hacen disminuir la actividad enzimática al interactuar con los grupos específicos responsables de*

la acción catalítica o de su regulación. Esta acción catalítica la concebimos en un doble sentido: fijación específica del sustrato y su transformación química. Nótese que podíamos haber establecido esta restricción a los agentes que actúan sobre el centro activo. No lo hemos hecho así porque como veremos, pueden existir regiones en la molécula de la enzima no directamente relacionadas con el mismo y que sin embargo pueden modular su acción catalítica (los *centros alostéricos*). Aun cuando los agentes capaces de actuar sobre centros alostéricos pueden perfectamente ser denominados inhibidores en el sentido de esta definición, dejaremos su estudio para un capítulo ulterior.

El estudio de la inhibición enzimática es de una enorme importancia tanto en Enzimología básica como en sus aplicaciones:

1. El empleo de inhibidores es un instrumento ampliamente utilizado en el *estudio de los mecanismos cinéticos*. Las medidas de velocidad inicial no pueden por sí solas llevar al conocimiento completo de un mecanismo, y muy particularmente, en el estudio de la cinética multisustrato.

2. Los inhibidores brindan una información valiosísima acerca de las *características moleculares del centro activo*. Hay inhibidores de estructura parecida al sustrato cuyo estudio sirve para determinar las características estéricas de aquél. Otros inhibidores atacan de forma específica a los diferentes grupos que pueden estar implicados en la transformación catalítica. A veces esta última interacción es muy específica. Así, los *organofosfóricos* atacan al residuo de serina del propio centro activo de las serin-enzimas, dejando intactos todos los demás residuos de este aminoácido que pudiera haber en la molécula. Por otra parte, el estudio de la fijación de un inhibidor específico nos puede dar amplia información sobre el número de centros activos presentes en una muestra enzimática. En la actualidad, una línea muy importante de inhibidores está constituida por los llamados *análogos de estado de transición*, que como su nombre indica, tienen una forma molecular parecida a la conformación energizada del sustrato cuando ocupa el centro activo de la enzima. En esta línea, hoy día es posible el diseño altamente específico de fármacos y drogas a partir del conocimiento de la estructura del centro activo y del complejo activo. Un tipo especial de inhibidores, los *sustratos suicidas*, son un arma fundamental de la Terapéutica moderna.

3. El empleo de inhibidores que bloquean una enzima específica ha sido determinante en el estudio de vías metabólicas: así, el empleo de *yodoacetato*, inhibidor de grupos $-SH$, fue crucial en el enunciado de la vía glicolítica y el de *malonato*, inhibidor competitivo de succinato, en el del ciclo de Krebs de los ácidos tricarbónicos.

4. Muchos inhibidores son tan específicos como el sustrato. De esta forma, *se pueden diseñar inhibidores que afectan solamente a una determinada enzima sin alterar para nada a ninguna otra*. Esto constituye la base de toda la terapéutica química o Farmacología. Podemos apreciar claramente este concepto cuando ampliamos el modelo enzima-sustrato a toda interacción entre una proteína y su ligando específico. De esta forma, el modo de acción de los fármacos llega en último término a interpretarse siempre como una competición entre el fármaco y el ligando fisiológico (que es el sustrato en el

caso de las enzimas). Hay que hacer notar que esta competición no tiene por qué ser necesariamente inhibitoria; en muchos casos, es, de hecho, *agonística*. Por ejemplo: el ligando fisiológico del *receptor colinérgico muscarínico* es la *acetilcolina*; el alcaloide *muscarina* (obtenido del hongo *Amanita muscaria*) excita al receptor de la misma manera que la acetilcolina (es decir, la muscarina es un *agonista*) mientras que el alcaloide *atropina* (obtenido de la planta *Atropa belladonna*) se fija al receptor pero bloqueándolo (por lo que la atropina es un *antagonista*). De un modo parecido actúan los receptores hormonales y, en general, los receptores a todas las señales químicas.

5. Al igual que los fármacos, *muchos otros agentes de gran importancia económica* son inhibidores enzimáticos. Por ejemplo, los *insecticidas*, tanto clorados como organofosforados; los *herbicidas*, *defoliantes* y todo tipo de fitosanitarios; muchos *aditivos* de la industria alimentaria, etc.

Por estas razones, el estudio de la inhibición enzimática es un tema central en toda exposición sistemática de la Enzimología. Este estudio se hace tanto en términos cinéticos como desde el punto de vista estructural.

6.2 Tipos de inhibidores

Dentro de la restricción que establecimos más arriba, se consideran dos tipos generales de inhibidores: *reversibles* e *irreversibles*.

6.2.1 Inhibidores reversibles

Los inhibidores reversibles son aquellos cuyo efecto desaparece cuando los eliminamos de la solución por diálisis o cualquier otro procedimiento. La inhibición se ejerce a través de su *fijación reversible a la enzima* según el proceso

[1]



en el que el equilibrio se alcanza muy rápidamente. Para este equilibrio definimos una constante de disociación, K_i (obsérvese que se trata de una K mayúscula, lo que indica una *constante de equilibrio*), que tiene respecto al inhibidor el mismo significado que la K_m en la teoría de Michaelis respecto al sustrato. Por tanto, una K_i pequeña supondrá una afinidad grande del inhibidor hacia la enzima, y viceversa. Tengamos en cuenta también que la fijación del inhibidor puede tener lugar a los diferentes complejos que aparecen en el curso

de la acción enzimática. Así, habrá inhibidores que se fijan a la forma libre de la enzima E (como en [1]); otros lo harán al complejo ES ; y otros pueden hacerlo a ambos, E y ES .

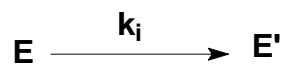
La actividad de una enzima viene descrita por dos constantes, K_m y k_{cat} . En este sentido, los inhibidores pueden actuar sobre una de ellas o sobre las dos. Según este criterio, se distinguen tres tipos básicos de inhibidores reversibles: **Inhibidores competitivos**, cuando su efecto consiste en un aumento aparente de la K_m respecto al sustrato sin efecto sobre V_{max} (o más propiamente, sobre la k_{cat}); **Inhibidores no competitivos**, cuando disminuyen el valor de la V_{max} sin afectar al valor de la K_m ; e **Inhibidores mixtos**, cuando ambas constantes aparecen afectadas. Dentro de este último grupo se suele hacer distinción entre los inhibidores **mixtos** y los inhibidores **acompetitivos o anticompetitivos**. En esta exposición estudiaremos con cierto detenimiento los primeros.

Atendiendo a la forma enzimática afectada, los tipos de inhibidores descritos en el párrafo anterior tienen las siguientes correspondencias: los inhibidores competitivos sólo pueden fijarse a la enzima libre, compitiendo en ello con el sustrato de forma que la fijación es mutuamente exclusiva; los inhibidores no competitivos se fijan indistintamente a la enzima libre E y al complejo enzima-sustrato ES ; los inhibidores anticompetitivos sólo pueden hacerlo al complejo enzima-sustrato ES ; y los mixtos operan como los no competitivos pero alterando de alguna manera la fijación del sustrato a la enzima.

6.2.2 Inhibidores irreversibles

Los inhibidores irreversibles son aquellos que *reaccionan* con la enzima, modificándola de forma *covalente*, de tal manera que aunque eliminemos al inhibidor la acción del mismo persiste. En contraste con los inhibidores reversibles, cuyo equilibrio se establece rápidamente, una característica distintiva de los inhibidores irreversibles es que su acción es *dependiente del tiempo*; es decir, el grado de inhibición depende del tiempo a que haya sido expuesta la enzima al inhibidor. Por ello, su acción se describe a partir de una ecuación de velocidad:

[2]



En la que k_i (Obérvase que se trata de una k minúscula, constante de velocidad) es la constante de velocidad del proceso tal que

[3]

$$v_i = k_i[E][S]$$

donde v_i es la velocidad de inactivación. Nótese que en este caso (a) no consideramos la existencia de un equilibrio: esta inhibición es irreversible; (b) el proceso se describe por una constante de velocidad de segundo orden k_i , y no por una constante de disociación K_i como en el caso de los inhibidores reversibles.

Ahora bien, conviene no tomar el término *irreversible* demasiado al pie de la letra. Una enzima atacada por un inhibidor irreversible puede en ocasiones *reactivarse* mediante un tratamiento químico que produzca el efecto inverso al del inhibidor. Así, los grupos -SH transformados en disulfuro -S-S- por un agente oxidante pueden reactivarse mediante un agente reductor. Por ello hay quien prefiere llamar a la inhibición irreversible *inactivación*, y al proceso contrario, *reactivación*.

En la discusión que sigue, discutiremos algunos aspectos de los inhibidores competitivos, de los inhibidores irreversibles y de los llamados sustratos suicidas.

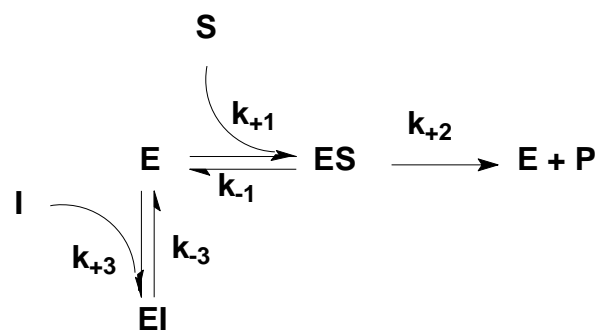
6.3 Inhibición competitiva

Es aquella inhibición reversible en la cual el inhibidor impide o dificulta la fijación del sustrato al centro activo de la enzima, sin afectar a su transformación catalítica; es decir, el sustrato, si llega a fijarse al centro activo, es transformado con toda normalidad.

6.3.1 Cinética de la inhibición competitiva

Cinéticamente, la inhibición competitiva corresponde al mecanismo

[4]



En el cual vemos que tanto el sustrato como el inhibidor pueden fijarse a la enzima siendo

esta fijación mutuamente exclusiva; el inhibidor impide la fijación del sustrato, y éste, la del inhibidor (es decir, ambos *compiten* por la fijación a la enzima). Es por esta competición entre uno y otro por lo que este tipo de inhibición recibe su nombre. Naturalmente, el complejo **EI** es improductivo y no da lugar a productos. A partir de estos dos equilibrios podemos fácilmente darnos cuenta de que para una concentración dada de inhibidor, las concentraciones altas de sustrato harán desaparecer la inhibición, alcanzándose la misma V_{max} que en la reacción no inhibida. Eso sí, hará falta una mayor concentración de sustrato para llegar a este nivel; y por tanto, una mayor concentración de sustrato para llegar a $V_{max}/2$, lo que nos muestra el principal dato cinético de la inhibición competitiva: un aumento aparente de la K_m hacia el sustrato en presencia del inhibidor, y sin que se modifique la V_{max} .

1. Tratando el mecanismo por una suposición de equilibrio rápido (según Michaelis y Menten), veríamos que los complejos **ES** y **EI** se forman mucho más rápidamente que la evolución de ES hacia enzima libre y producto. En ese caso, definimos las constantes respectivas de equilibrio de disociación K_m y K_i de la siguiente forma:

[5]

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Llamando (como en el capítulo anterior) e_0 a la concentración de enzima total, e a la enzima libre, x a la del complejo **ES**, y a la del complejo **EI**, s a la concentración de sustrato, e i a la de inhibidor, y suponiendo que tanto la concentración de sustrato como la de inhibidor son mucho mayores que la de enzima total, tendremos que

[6]

$$K_m = \frac{(e_0 - x - y)s}{x} \quad K_i = \frac{(e_0 - x - y)i}{y}$$

Para obtener una ecuación de velocidad en función de las concentraciones de sustrato e inhibidor, sabiendo que $v = k_{+2}x$, resolveríamos el sistema de ecuaciones [6] para x y obtendríamos

[7]

$$x = \frac{e_0 s}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i} \right) + s}$$

que multiplicado por k_{+2} nos daría la siguiente ecuación de velocidad:

[8]

$$v = \frac{V_{\max} s}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i} \right) + s}$$

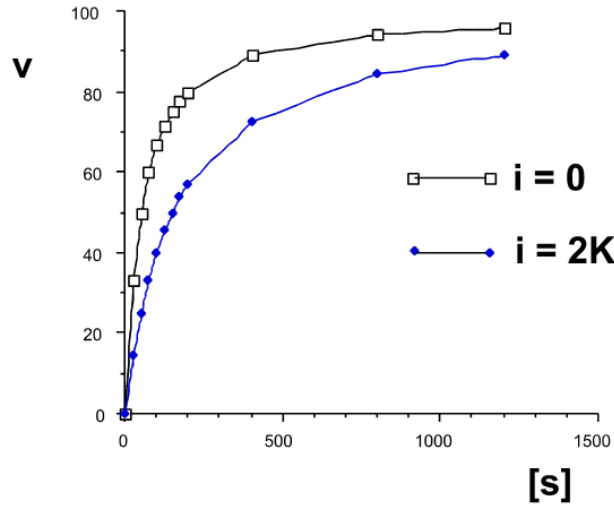
en la que vemos que K_m aparece multiplicada por el factor $(1 + i/K_i)$, en donde i es la concentración de inhibidor y K_i es la constante de disociación del complejo EI tal como se definió en 6.5. Esta expresión nos muestra todas las características de la inhibición competitiva: un aumento aparente de la K_m y la desaparición del efecto inhibitor a altas concentraciones de sustrato. Obsérvese que para una concentración de inhibidor igual a su K_i , la K_m aparente toma un valor de dos veces la K_m real. Asimismo, podemos ver que la eficiencia del inhibidor como tal será tanto más grande cuando menor sea el valor de K_i ; y al igual que en el caso de la K_m , sus dimensiones son de concentración. Para concentraciones muy altas de s , la inhibición desaparece.

En un tratamiento de *estado estacionario* del mecanismo [4], llegaríamos a un resultado idéntico (con la salvedad del distinto significado de la K_m).

6.3.2 Diagnóstico cinético de la inhibición competitiva

Gráficamente, el efecto del inhibidor competitivo aparece en la figura 6.1. En la representación directa (v frente a s) vemos que la presencia del inhibidor hace disminuir la pendiente de la curva en todos sus puntos, pero tiende a alcanzar la asíntota V_{\max} , lo que tiene lugar a concentraciones suficientemente altas de sustrato.

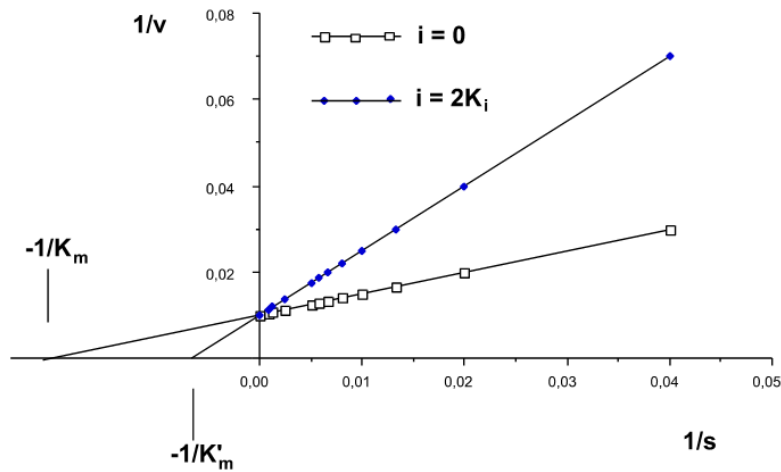
Figura 6.1



Representación directa de la acción de un inhibidor competitivo

En la representación recíproca doble vemos cómo el corte en ordenada ($1/V_{max}$) no se modifica, pero la pendiente de la recta (K_m/V_{max}) es mayor en presencia que en ausencia de inhibidor, siendo el corte en abscisa igual a $-1/K'_m = 1/[K_m(1+i/K_i)]$ (figura 6.2)

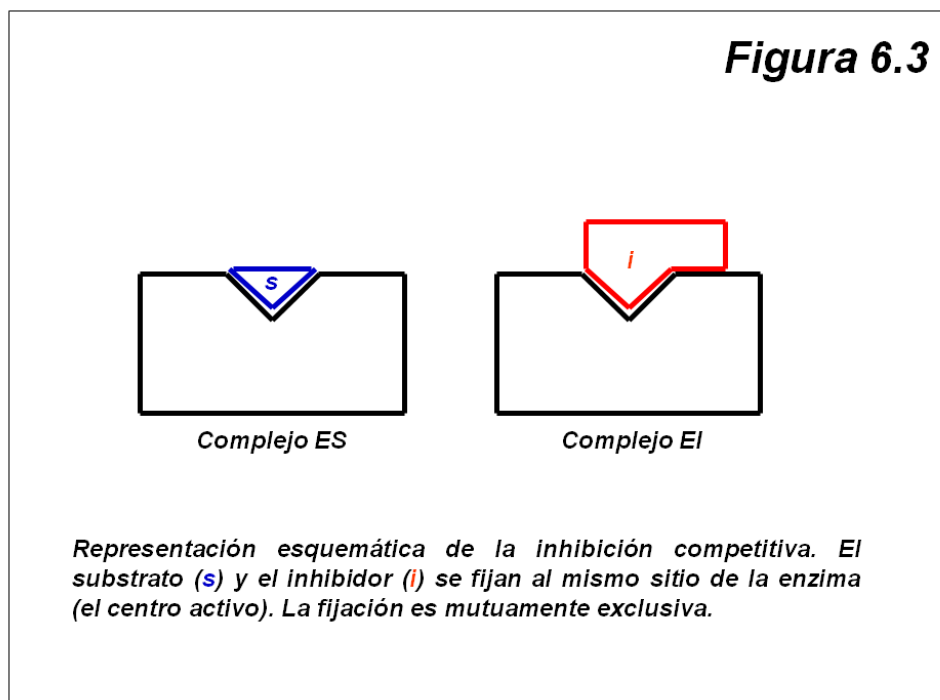
Figura 6.2



Representación recíproca doble de los mismos datos de la figura 6.1

6.3.3 Aspectos estructurales de la inhibición competitiva

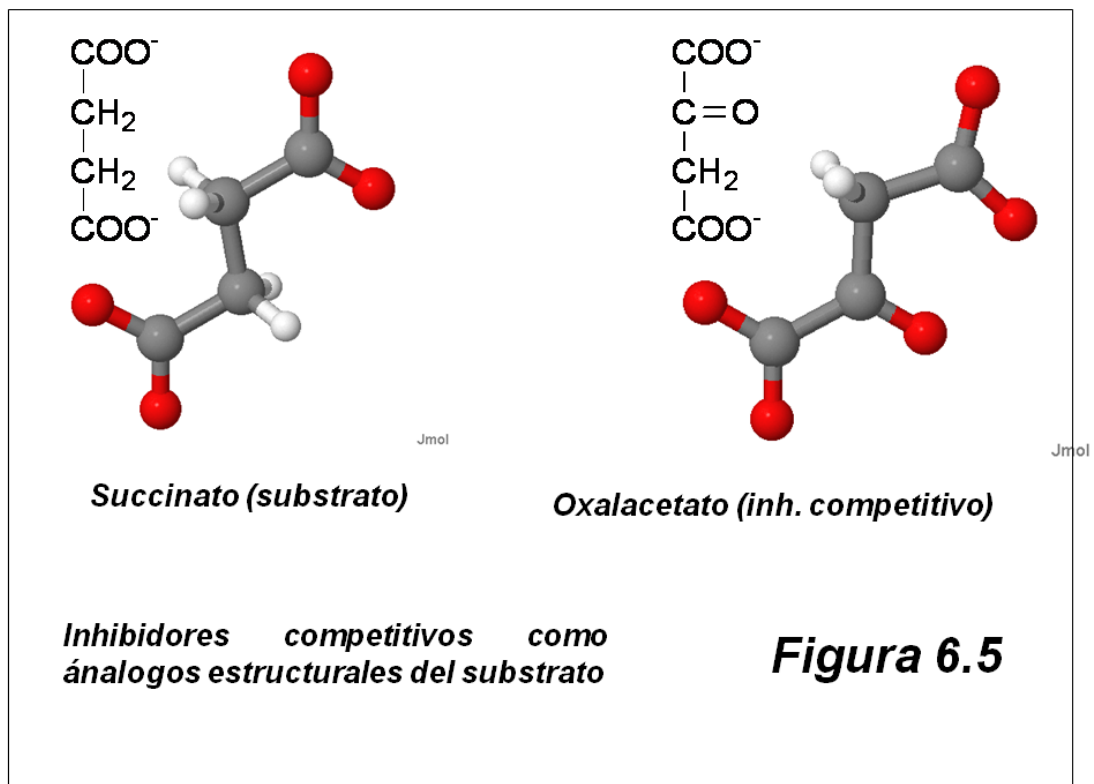
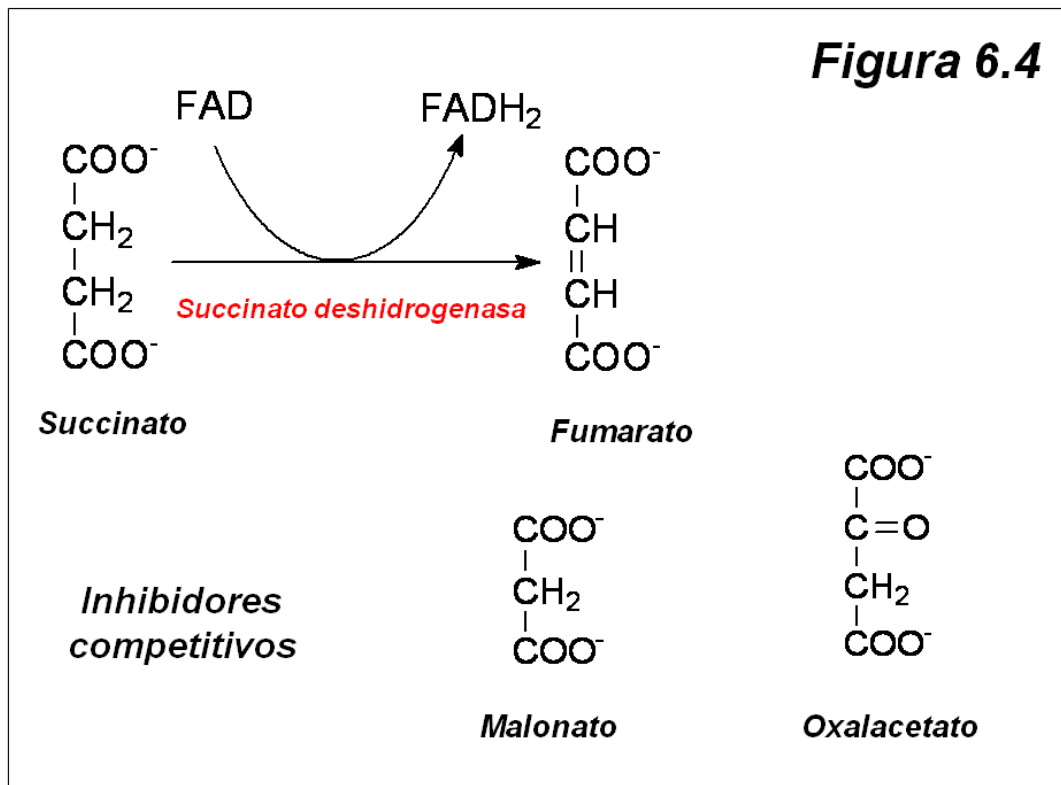
Por regla general, los inhibidores competitivos son todos ellos análogos estructurales del sustrato, es decir, moléculas muy parecidas. Si a esto unimos el hecho de que la inhibición competitiva es tan específica como la interacción enzima-sustrato, así como las peculiaridades cinéticas de la inhibición competitiva, surge inmediatamente la idea de que el inhibidor en este caso es un "falso sustrato" que ocupa el lugar de éste en el centro activo, pero que no reacciona. Es decir, tiene la suficiente similitud con el sustrato como para poder fijarse a los grupos complementarios (impidiendo la fijación del sustrato normal), pero también las suficientes diferencias como para no poder reaccionar. La acción de un inhibidor competitivo se representa esquemáticamente en la figura 6.3.



Es importante, sin embargo, no llevar demasiado lejos esta equivalencia entre análogo e inhibidor competitivo. El concepto de inhibición competitiva es puramente cinético, y se refiere al aumento aparente de la K_m por el sustrato. Que muchos inhibidores competitivos sean análogos químicos del sustrato no significa necesariamente que todos los análogos vayan a ser inhibidores o viceversa. Como veremos, muchos inhibidores fisiológicos, es decir, efectores de la normal regulación de una enzima, se comportan como inhibidores competitivos en el sentido de aumentar la K_m aparente, pero sin que tengan ningún parecido estructural con el sustrato (y por esa razón se les llama *alostéricos*, en contraposición a los aquí tratados, que serían *isostéricos*).

En general, los análogos de sustrato caen en alguna o varias de las siguientes clases: *enantioméricos*, cuando se trata de la imagen especular de una molécula asimétrica; *anoméricos*, referidos a las formas α o β del enlace glicosídico; isómeros *posicionales*, isómeros *geométricos*; *productos* de reacción, que en muchos casos compiten con el sustrato por la enzima libre, o bien, en general, compuestos con parecido estructural por el

substrato. Así, en el bien conocido caso de la *succinato deshidrogenasa*, han sido descritos como inhibidores competitivos, entre otros, los compuestos que aparecen en la figura 6.4. La analogía estructural de uno de ellos (oxalacetato) se ilustra en la figura 6.5.

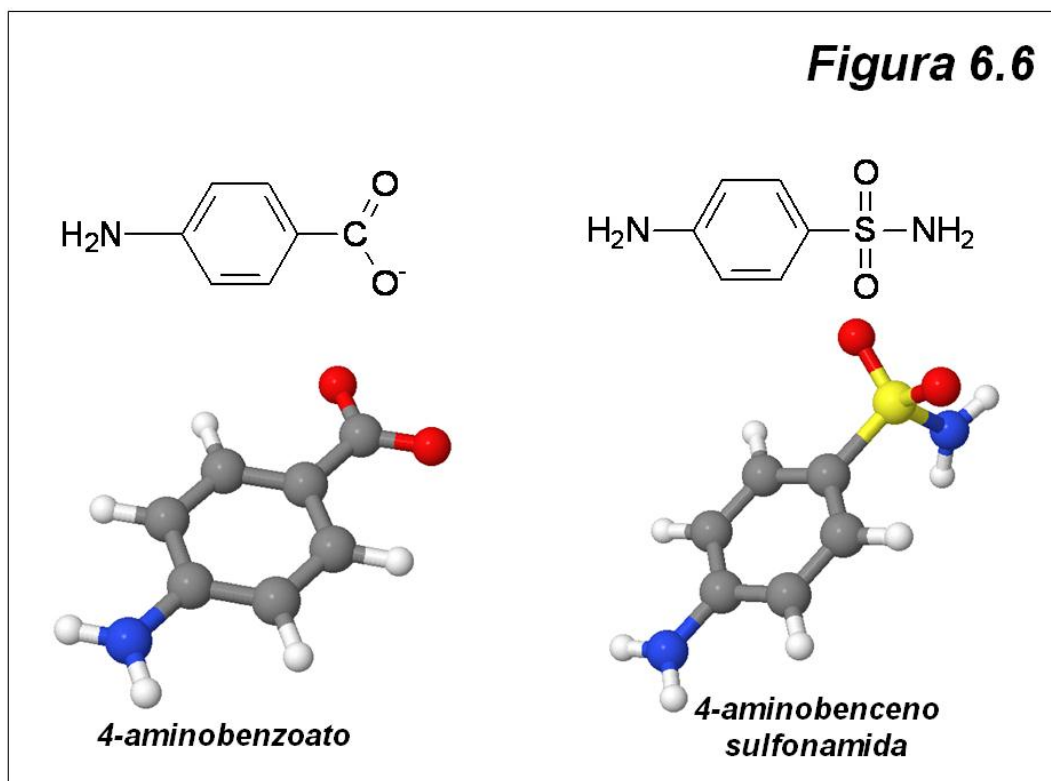


En el caso de la succinato deshidrogenasa, el estudio de las constantes de inhibición nos

muestra que los inhibidores más potentes son aquellos con carboxilos terminales situados a una distancia parecida a la del sustrato; así, la K_i por oxalacetato es de 1.6 mM mientras que por malonato es de 40 mM. Por tanto, este estudio nos indica que la presencia de los dos grupos carboxílicos (ambos ionizados al pH de ensayo) es importante para la fijación al centro activo de la enzima, y la distancia entre ambos también (malonato es peor inhibidor que oxalacetato). Esto implica, además, la existencia en el centro activo de dos grupos electropositivos. Nótese que es perfectamente posible que la enzima pueda tener mayor afinidad por el inhibidor que por el propio sustrato normal.

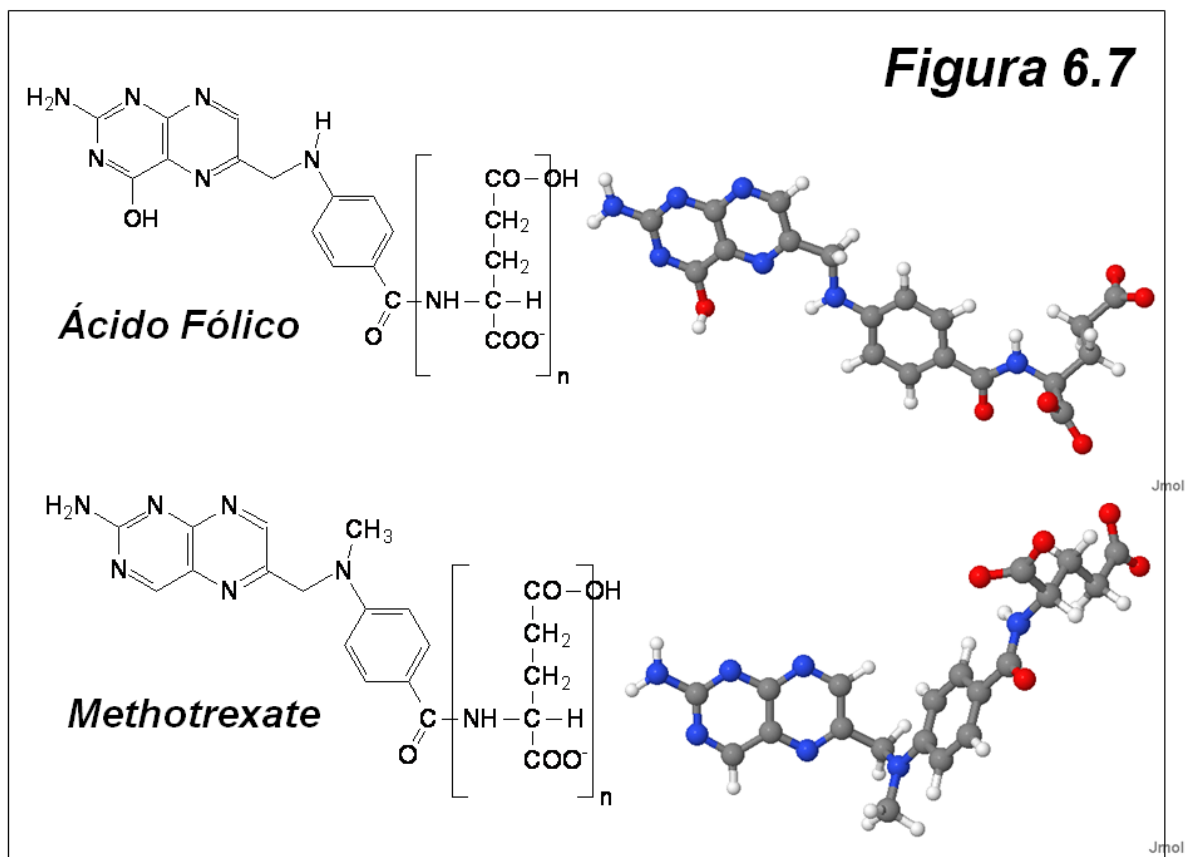
Cada enzima tiene, lógicamente, sus propios inhibidores competitivos. Una línea muy importante de éstos son los *análogos de base* o *análogos de nucleósido*, que interfieren en todos los procesos asociados al DNA o al RNA (replicación, transcripción, transcripción inversa, etc.).

Además de los análogos de sustrato, un grupo de compuestos muy importante son los *análogos de cofactor o coenzima*, sobre todo por su uso terapéutico; por ejemplo, las *sulfonamidas* (análogos del ácido 4-aminobenzoico, figura 6.6) o los antifólicos como el *methotrexate* (figura 6.7); otros análogos de cofactores son *piridin-3-sulfonato* (análogo de nicotinamida), *desoxipiridoxol fosfato* (análogo de piridoxal fosfato), *pirtiamina* (análogo de tiamina), etc.



Otro grupo muy interesante de inhibidores, que se suelen comportar como competitivos (o como *inhibidores suicidas*, v. más adelante), son los *inhibidores naturales*. Entre éstos tenemos la *avidina*, proteína presente en la clara de huevo capaz de fijar biotina (un cofactor enzimático, cap. 4) con extraordinaria afinidad (K_d 10^{-15} M); la α_1 -1-*antitripsina* y

proteínas relacionadas, que inhiben la actividad de serinproteasas (llamadas genéricamente *serpinas*); las *cistatinas*, que inhiben las tiolproteasas, etc.etc.



6.3.4 Análogos de estado de transición

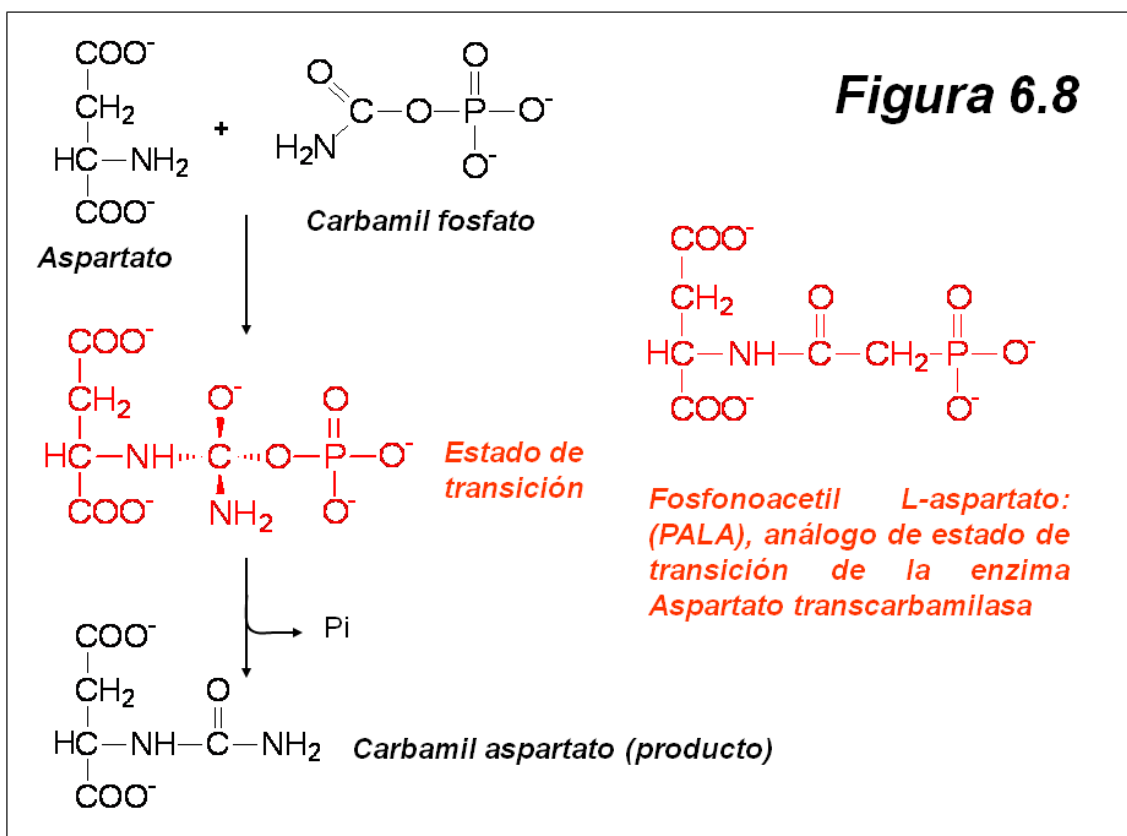
Según vimos en el capítulo 2, el modo de acción de las enzimas puede explicarse en el sentido de que la complementariedad estereoquímica tiene lugar no entre la enzima y el sustrato, sino más bien entre la enzima y el *estado de transición* de la reacción catalizada. El estado de transición es una especie molecular de vida media muy corta, y representa un máximo en el perfil energético de la reacción. No obstante, se han podido sintetizar análogos estables de estructura parecida al estado de transición para multitud de enzimas, y que reciben el nombre de *análogos de estado de transición* (AET). El concepto de inhibidor competitivo se amplía, pues, con la inclusión de estos análogos.

La primera característica de los análogos de estado de transición es su extraordinaria afinidad hacia la enzima, con K_i en el orden nM; de hecho, en muchas ocasiones, varios órdenes de magnitud menor que la K_m del sustrato natural. Sin embargo, la velocidad de fijación (medida por la constante de velocidad k_{+1}) es en ocasiones bastante menor que la correspondiente a aquél. Este resultado se corresponde con lo que hoy se piensa sobre el modo de acción de las enzimas, en un sentido de *ajuste inducido*: la fijación distorsiona la estructura del sustrato para aproximarla a la del estado de transición; por ello, éste y el

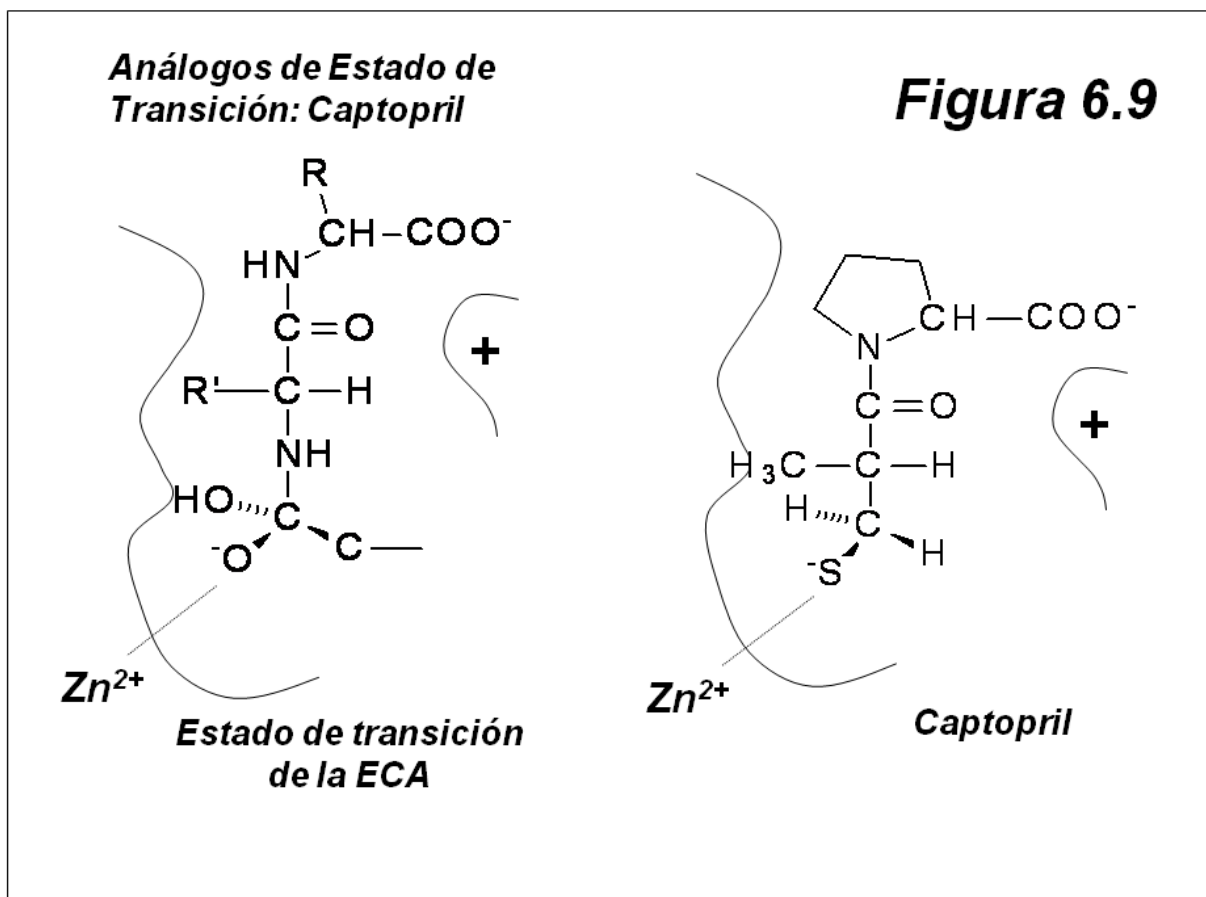
substrato son especies estructuralmente distintas y las enzimas han evolucionado para fijar el substrato, y no a su estado de transición; aunque una vez fijado es mucho más difícil desplazarlo de la unión a la enzima.

Los AET son unos inhibidores muy potentes de la acción enzimática; lo que unido a su especificidad, hace que exista una investigación muy activa en este campo para el diseño de fármacos, lo cual, a su vez, impulsa el estudio del modo de acción de las enzimas para el conocimiento de los diferentes estados de transición.

Como ejemplo de AET tenemos el *fosfonoacetil-L-aspartato* (PALA), sobre la *aspartato transcarbamilasa*, enzima limitante de la biosíntesis de pirimidinas. Esta enzima transfiere el grupo carbamil fosfato al aspartato, formando carbamil aspartato, que posteriormente dará lugar al anillo pirimidínico. En la figura 6.8 se representan las estructuras de los substratos, del estado de transición de la enzima y del AET.

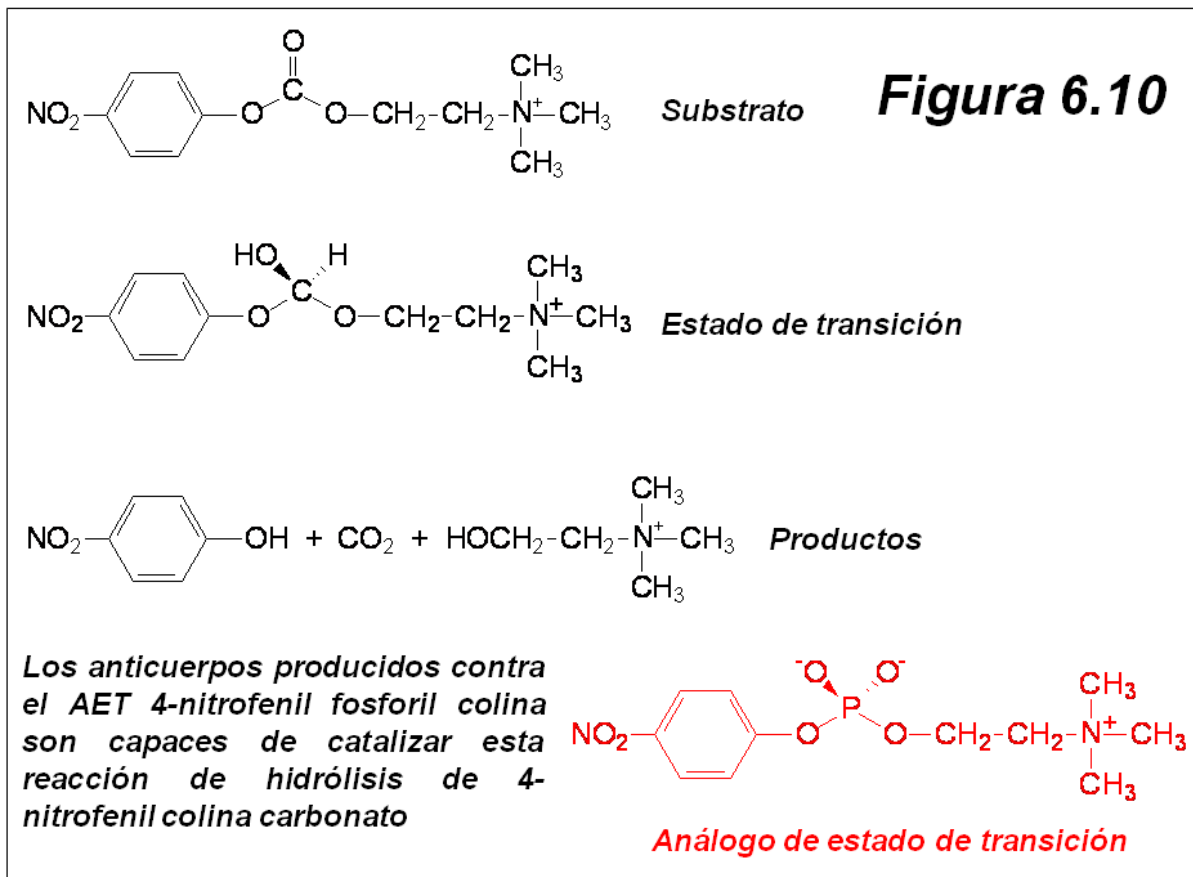


Muchos fármacos utilizados en clínica humana son AET's. Por ejemplo, el *Captopril*, utilizado ampliamente como agente antihipertensivo, es un AET de la *enzima convertidora de angiotensina*. Esta enzima cataliza la producción de angiotensina II, péptido cuya acción vasoconstrictora es muy potente (figura 6.9)



6.3.5 Anticuerpos catalíticos

Por otra parte, los AET se han utilizado para la producción de *anticuerpos catalíticos* o *inmunoenzimas*. Se trata de anticuerpos monoclonales desarrollados contra *haptenos* que son análogos de estado de transición de determinadas reacciones químicas. Los anticuerpos así producidos presentan una complementaridad estereoquímica con el estado de transición de la reacción, lo que en determinadas circunstancias permite que el anticuerpo tenga actividad catalítica. Tal es el caso de la *4-nitrofenil fosforilcolina*, que es análogo del estado de transición de la hidrólisis del correspondiente carbonato (figura 6.10). Un anticuerpo monoclonal producido contra 4-nitrofenil fosforilcolina (como hapteno) es capaz de catalizar la hidrólisis del carbonato.



6.3.6 Importancia práctica de la inhibición competitiva

El modelo de interacción entre una proteína y un ligando constituye uno de los fundamentos de la Biología actual. Hemos visto cómo esta interacción explica multitud de fenómenos biológicos que no están directamente relacionados con la catálisis enzimática. Por ello hablamos de *señales químicas* en un sentido mucho más general. La acción de los neurotransmisores sobre sus receptores es un ejemplo. En último término, la acción de éstos consiste en alterar el comportamiento de una neurona en sentido excitatorio o inhibitorio; pero el efecto molecular inmediato, del que deriva todo lo demás, es la interacción del neurotransmisor con su receptor, interacción estereoquímicamente complementaria que se rige por las mismas relaciones que la catálisis enzimática, y que participa de toda su fenomenología.

La inhibición competitiva representa una manera de inhibir de forma específica una enzima, o en un sentido más amplio, de inhibir la fijación de un ligando determinado a su receptor, y también de forma específica. Por esta razón, los inhibidores competitivos constituyen el principal contingente de compuestos que utiliza la Farmacología, y el fenómeno de competición, en su forma más general, la base y fundamento de toda la Terapéutica química. En la mayoría de casos en los que se conoce el modo de acción de una droga

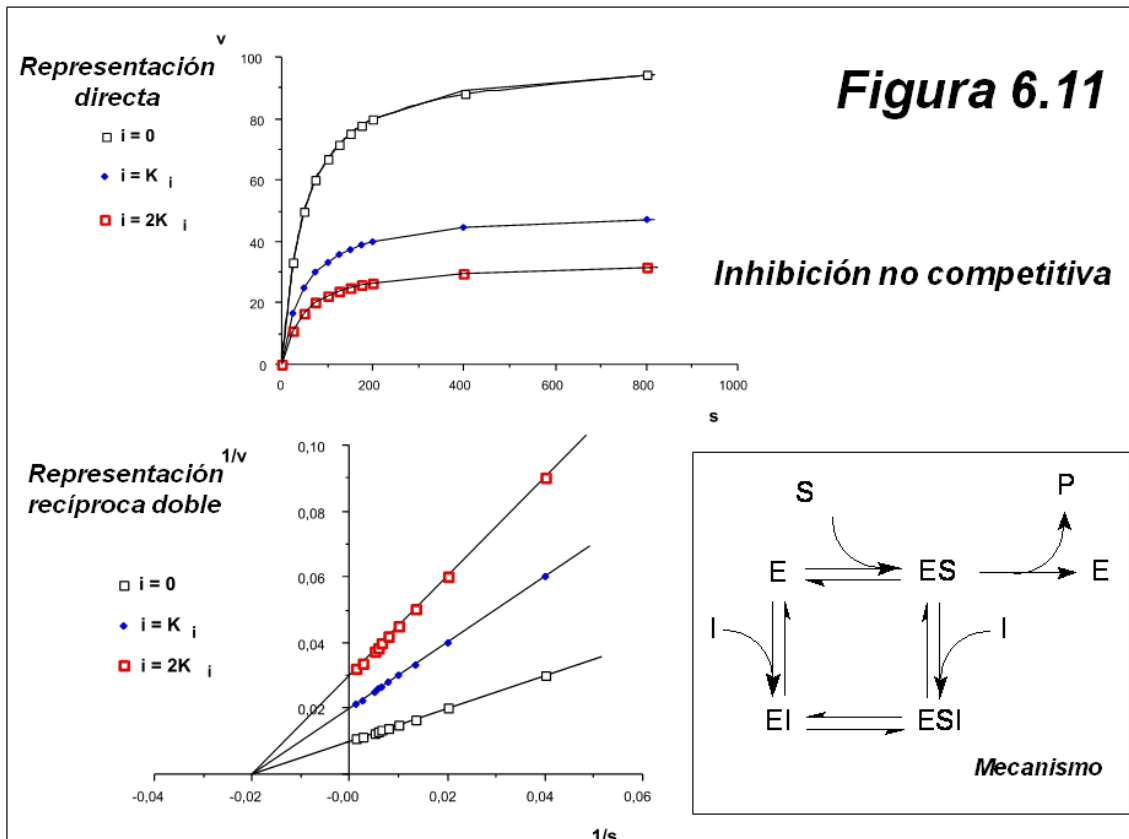
encontramos una competición como razón última de la acción del fármaco. Pero además, al ser este fenómeno específico, por estar mediado a través de una interacción estereoquímica complementaria, la inhibición competitiva permite la supresión o atenuación de un proceso concreto sin alterar en principio ningún otro. Claro está que nos estamos refiriendo aquí a una generalización, con todos sus inconvenientes. No todos los fármacos son inhibidores; los hay que actúan como *agonistas*, es decir, produciendo los mismos efectos que el ligando fisiológico; aunque en estos casos el efecto del fármaco suele ser más persistente que el de aquél, al no ser metabolizado eficientemente. De la misma forma, no todas las drogas terapéuticas (o de abuso) son estrictamente inhibidores competitivos, en el sentido cinético del término; las hay con modos de inhibición mucho más complejo, o que operan como inhibidores irreversibles (v. más adelante). Asimismo, este sentido restrictivo que hemos dado a la Farmacología excluye, sin razón aparente, a todo tipo de terapéutica sustitutiva. La idea que realmente pretendemos comunicar es que las acciones farmacológicas que emprendemos sobre un organismo, y que se hacen con compuestos muchas veces radicalmente extraños al mismo, en último término van dirigidas a la modificación de una interacción entre un ligando y su receptor. Las más de las veces esta modificación es una inhibición competitiva.

6.4 Otras formas de inhibición reversible

Mencionaremos en este apartado la inhibición no competitiva y la inhibición anticompetitiva. Ambos tipos de inhibición son útiles en los estudios cinéticos de velocidad inicial, pero tienen muy poca aplicación práctica. A continuación se resumen las principales características de estos tipos de inhibidores.

6.4.1 Inhibición no competitiva

Llamamos inhibidores no competitivos a aquellos que no impiden la fijación del sustrato, pero que inhiben su transformación catalítica, y se corresponden con el mecanismo descrito en la figura 6.11. En un sentido cinético, la inhibición no competitiva pura se manifiesta por una disminución de la V_{max} aparente sin modificación de la K_m por los sustratos.



A partir de consideraciones de equilibrio (es decir, en las condiciones de Michaelis-Menten) en las que la formación de producto a partir de **ES** es mucho más lenta que el establecimiento del equilibrio entre **E**, **S** e **I**), la inhibición no competitiva puede describirse por la relación

[9]

$$v = \frac{V_{max} s}{(1 + i/K_i)(K_m + s)}$$

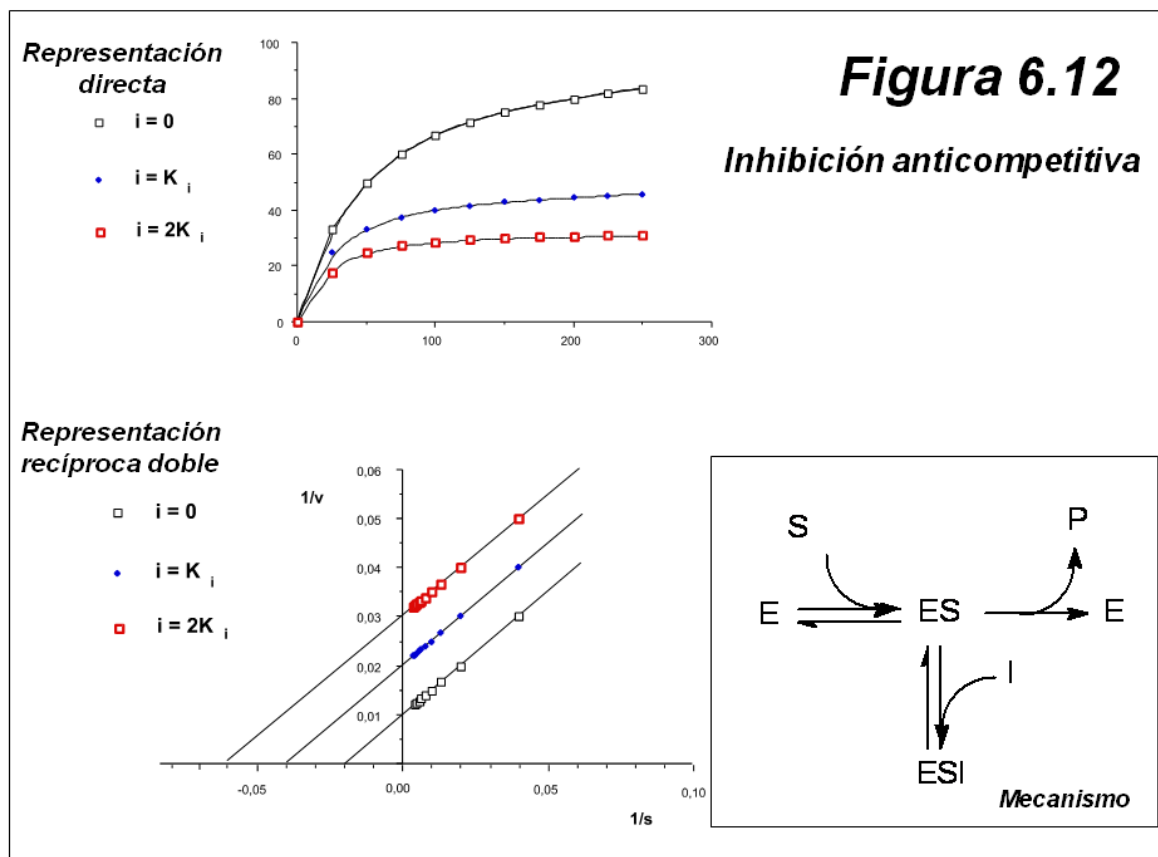
en la que vemos que V_{max} aparece dividida por el factor $(1+i/K_i)$. Esto nos muestra el carácter cinético de la inhibición no competitiva, a saber: un descenso del valor de V_{max} (o más propiamente, de la k_{cat}) sin alteración de la K_m . Por tanto, aun cuando la concentración de sustrato suba indefinidamente, la inhibición no desaparece. Este efecto, como veremos, puede también ser visto en los inhibidores irreversibles, en los que se aprecia una disminución aparente de V_{max} ; pero en este caso, el efecto se realiza sobre e_0 , la enzima total; mientras que el de los inhibidores no competitivos reversibles tiene lugar sobre k_{cat} .

Al representar gráficamente los resultados de una inhibición no competitiva, vemos que en la gráfica directa el valor de V_{max} se hace menor, y la inhibición no desaparece por mucho que aumente la concentración de sustrato. En la gráfica recíproca doble vemos cómo el sistema inhibido se caracteriza por un corte en ordenada y una pendiente mayores en el sistema inhibido que en el sistema control, sin que se modifique el corte en abscisa, que en

esta representación es igual a $-(1/K_m)$ (figura 6.11).

6.4.2 Inhibición acompetitiva o anticompetitiva

Una forma cinética interesante de inhibición mixta es la que llamamos acompetitiva o anticompetitiva. Este nombre pretende ser una traducción del inglés *uncompetitive*. En realidad, la palabra anticompetitiva responde mejor al carácter cinético de esta inhibición. La inhibición competitiva desaparece ante concentraciones altas del sustrato, mientras que este tipo de inhibición que nos ocupa se hace más intensa ante el aumento en la concentración de sustrato. De ahí el nombre de anticompetitiva. Corresponde a un mecanismo en el cual el inhibidor sólo puede fijarse al complejo *ES*, no pudiendo hacerlo a la forma libre de enzima (figura 6.12). La consecuencia del mismo es que la fijación de inhibidor depende de la fijación previa de sustrato, por lo cual una mayor concentración de éste favorecerá la inhibición (y de ahí el nombre de *anticompetitiva*).



Bajo suposiciones de equilibrio, este tipo de inhibición se comporta según la ecuación

[10]

$$v = \frac{\frac{V_{\max} s}{(1 + i/K_i)}}{\frac{K_m}{(1 + i/K_i)} + s}$$

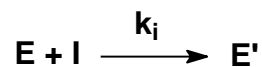
En la que vemos que el efecto de un inhibidor anticompetitivo consiste en reducir K_m y V_{\max} por el mismo factor $(1+i/K_i)$. Las representaciones directa y recíproca doble de este tipo de inhibición se presentan en la figura 6.12. En la gráfica recíproca doble se aprecia que las líneas correspondientes al sistema inhibido tienen la misma pendiente que la del control, con lo cual son rectas paralelas.

6.5 Inhibición irreversible

6.5.1 Generalidades

A diferencia de todos los modos inhibitorios que hemos tratado hasta ahora, la inhibición irreversible consiste en una reacción química entre el inhibidor y la enzima de tal manera que se alteran los grupos funcionales de ésta, bien sean los encargados de la fijación del substrato o de su transformación catalítica, o de ambos. La inhibición irreversible corresponde en general al mecanismo

[11]



En el que la molécula enzimática reacciona con el inhibidor para dar una forma inactiva (o menos activa) E' , dependiendo este proceso de una *constante de velocidad* k_i (y que por ello representamos con k minúscula). Cinéticamente, la inhibición irreversible se describe con una ecuación de segundo orden como

[12]

$$\frac{-de}{dt} = k_i [E][I]$$

Este mecanismo nos muestra la característica más típica de la inhibición irreversible: su *dependencia del tiempo*. Con el paso de éste la inhibición va haciéndose más y más patente hasta que se puede llegar a la desaparición total de la actividad. La efectividad del inhibidor no se mide en términos de una K_i , que corresponde a una constante de equilibrio, sino en términos de una constante de velocidad k_i . A veces los estudios cinéticos de un inhibidor irreversible dan un patrón parecido a la inhibición no competitiva, cuando los ensayamos

sobre tiempos muy cortos de incubación con la enzima. La característica propia de la inhibición no competitiva es una disminución aparente de la V_{max} . Siendo esta constante el producto $k_{cat}e_0$, podemos decir que los inhibidores no competitivos actúan sobre k_{cat} y los irreversibles sobre e_0 , pero la acción de unos y otros puede parecer similar. Para diferenciarlos, no hay más que estudiar la dependencia de la inhibición con respecto al tiempo. La inhibición irreversible aumenta con el paso del tiempo; igualmente, una inhibición reversible no competitiva desaparece cuando sometemos la mezcla de reacción a diálisis u otro procedimiento similar.

Conviene señalar asimismo lo relativo de la denominación "irreversible". Con ello se quiere decir que la reacción de la enzima con el inhibidor es irreversible, estando la posición de equilibrio muy hacia la derecha en [11]. Ahora bien, en muchas ocasiones podemos reactivar a la enzima por otro tratamiento químico. Quizá fuera más adecuado referirse a los inhibidores irreversibles como *inactivadores*.

Otra característica general de los inhibidores irreversibles es que suelen ser sustancias muy tóxicas para los organismos. La especificidad enzimática está sobre todo determinada por los grupos encargados de la fijación del sustrato a la enzima. Los grupos reactivos del centro activo, por su parte, son comunes a muchísimas enzimas. Como tendremos ocasión de ver más adelante, estos grupos son, por ejemplo, el -OH de la serina, el imidazol de la histidina, el -SH de la cisteína, y el ϵ -amino de la lisina, aparte de metales que puedan desempeñar un papel importante en el mecanismo catalítico. Por ello, todos los agentes que puedan reaccionar con estos grupos se comportarán como inhibidores irreversibles no sólo de una enzima (que sería el caso de los inhibidores competitivos) sino de todas las enzimas que tuvieran en su centro activo el grupo en cuestión. Su acción por tanto se extiende a muchas enzimas a la vez; y por eso suelen ser altamente tóxicos *in vivo*. Dentro de este tipo de inhibidores estudiaremos los *reactivos de grupo -SH*, los *metales pesados* y los *agentes quelantes de cationes esenciales*.

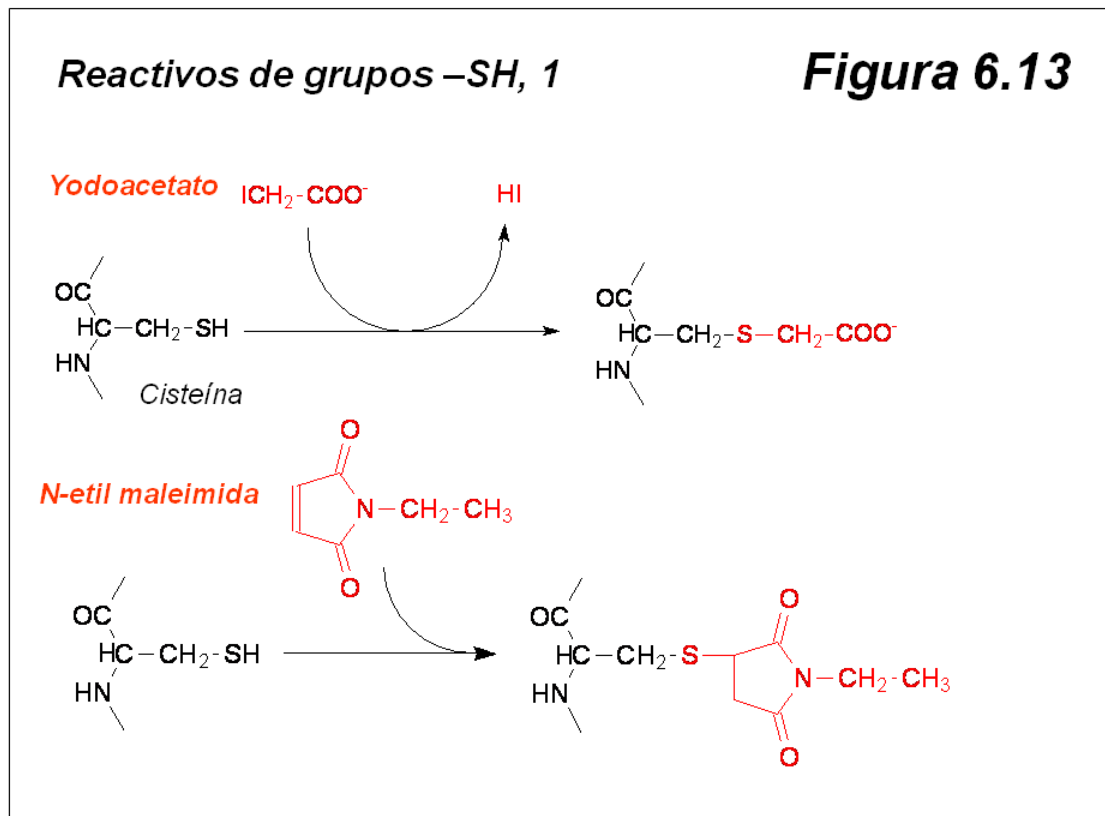
Ahora bien, el concepto de especificidad en la fijación de sustrato o de análogo competitivo puede ser adoptado también en el diseño de inhibidores irreversibles. Se trataría de pseudosustratos capaces de fijarse específicamente al centro activo de una determinada enzima y que son además capaces de reaccionar covalentemente con los grupos cercanos al centro activo. Es así como han surgido potentes inhibidores muy específicos, que encuentran un gran número de aplicaciones tanto en el estudio de los mecanismos enzimáticos como en aplicaciones clínicas o tecnológicas. Dentro de este grupo tenemos los *reactivos específicos de grupo* y los *marcadores de afinidad*, capaces de reaccionar con grupos situados en las cercanías del centro activo o en el mismo centro activo tras una fijación específica.

6.5.2 Reactivos de grupo -SH

La cadena lateral del aminoácido cisteína desempeña un papel muy importante tanto en el mantenimiento de la estructura tridimensional de una proteína, a través del grupo disulfuro

(-S-S-) como en el centro activo de una enzima, a través de las propiedades del grupo -SH. En forma de tiolato $-S^-$ se trata de un nucleófilo potente con propiedades muy parecidas al -OH de la serina. Hay muchos agentes capaces de reaccionar con este grupo. Entre los principales, tenemos:

1. Reactivos que promueven la alquilación de grupos -SH como por ejemplo: *haloácidos* y sus derivados (*yodoacetato*, *yodoacetamida*), *mostazas S y N*, *cloroacetofenona*, *cloropicrina*, *bromobencilcianuro*, *fluoropiruvato*. Estos agentes inducen la formación de un tioléter estable a hidrólisis, y por lo tanto las enzimas no son susceptibles de reactivación. Esta reacción es dependiente de pH, ya que el grupo reaccionante es el ion $-S^-$. En la figura 6.13 se presenta el modo de acción del yodoacetato.



2. Reacción con dobles enlaces, como por ejemplo el *ácido maleico* y la *N-etilmaleimida (NEM)*. Se trata de una reacción parecida a la anterior, dado que se forma un tioléter estable, siendo la reacción dependiente de pH (figura 6.13)

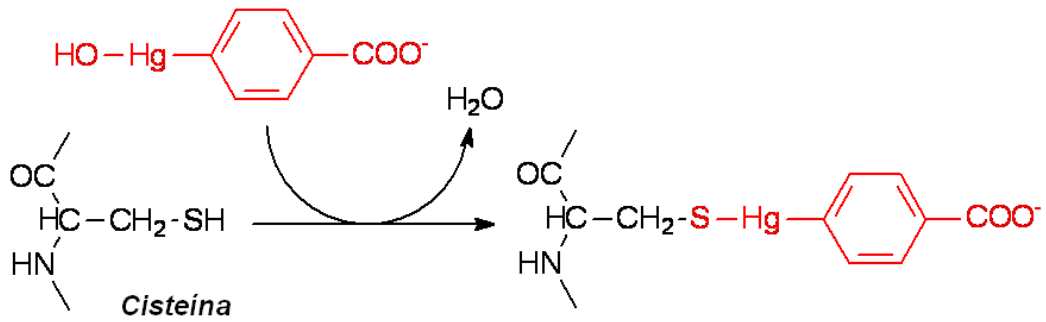
3. Agentes formadores de mercáptidos: $HgCl_2$, *mercuriales*, *arsenito*, *arsenicales trivalentes* y *metales* como Cu, Pb, Cd y Ag. Uno de los agentes más utilizados es el *p-cloromercuribenzoato* (que en solución actúa como *p-hidroximercuribenzoato*) (figura 6.14). La acción de estos agentes puede ser revertida con compuestos -SH como cisteína, ditiotreitól, o mercaptoetanol.

4. Agentes oxidantes, que promueven la oxidación del grupo tiol -SH a disulfuro -S-S- (figura 6.15): *glutation oxidado*, *sulfito*, *tetrationato*, *ác.perfórmico*, *peróxido de hidrógeno*, *aloxana*, *ferricianuro* y *ditio(bis)nitrobenzoico*.

Reactivos de grupos -SH, 2

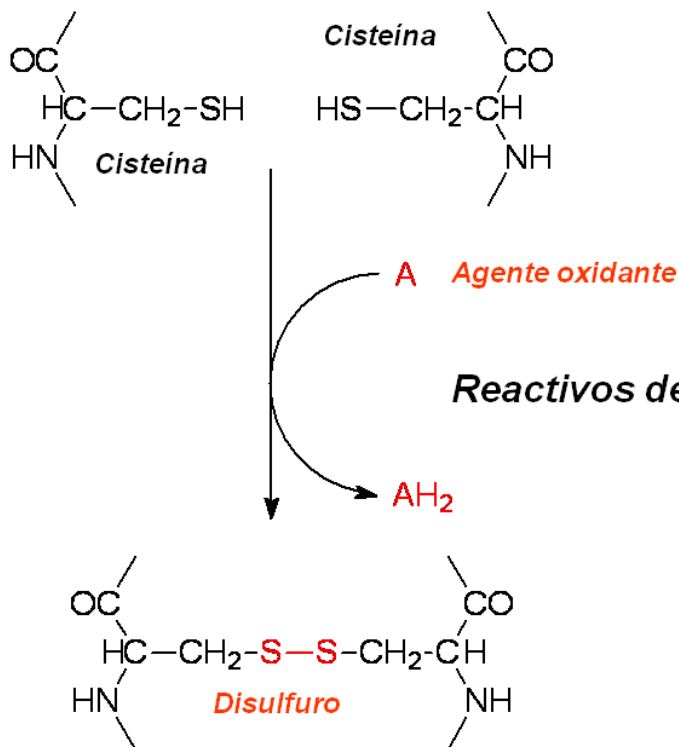
Figura 6.14

p-Hidroxi mercuribenzoato



Formación de mercáptido con *p*-Hidroxiomercuribenzoato

Figura 6.15



Reactivos de grupos -SH, 3

6.5.3 Metales pesados

Además de la formación de mercáptidos que veíamos en un apartado anterior, los metales pesados como Ag, Pb, Tl, Hg y Cd pueden reaccionar con otros grupos de la proteína enzimática: carboxilo de aspartato y glutamato, imidazol, serina, fenol, amino, arginina, indol, etc. A concentraciones superiores a 1 mM los metales pesados se comportan como precipitantes.

6.5.4 Inhibidores que combinan con cationes esenciales

Estos inhibidores ejercen su acción a través de la formación de complejos o quelatos de átomos metálicos indispensables en la acción enzimática y que así son eliminados del centro activo.

1. Los iones *cianuro* (CN^-), *sulfuro* (S^-), las *azidas* y el *monóxido de carbono* deben su acción inhibitoria a la formación de complejos con metales. Por tanto, todas las metaloenzimas son susceptibles de ser inactivados por estos agentes. En particular, es llamativa la inactivación en sistemas que contienen Fe, Cu y Zn; en menor medida, Mn y Co. El efecto tóxico del cianuro se debe a la inactivación de la *citocromo oxidasa* al ocupar la sexta posición de coordinación de un *hemo a*, grupo prostético de los citocromos **a** (ver cap. 4).

2. Los agentes como el *EDTA* (*etilendiamino tetraacético*) tienen la particularidad de formar quelatos con metales de valencia igual o superior a 2; por tanto, pueden inhibir sistemas que dependan de Fe, Cu, Mg, Ca, y Mo (en particular Ca y Mg). El EDTA y compuestos parecidos inhibirán dependiendo de la estabilidad relativa del quelato respecto a la metaloenzima. Por otra parte, los agentes quelantes son bastante sensibles al pH.

6.5.5 Reactivos específicos de grupo y marcadores de afinidad

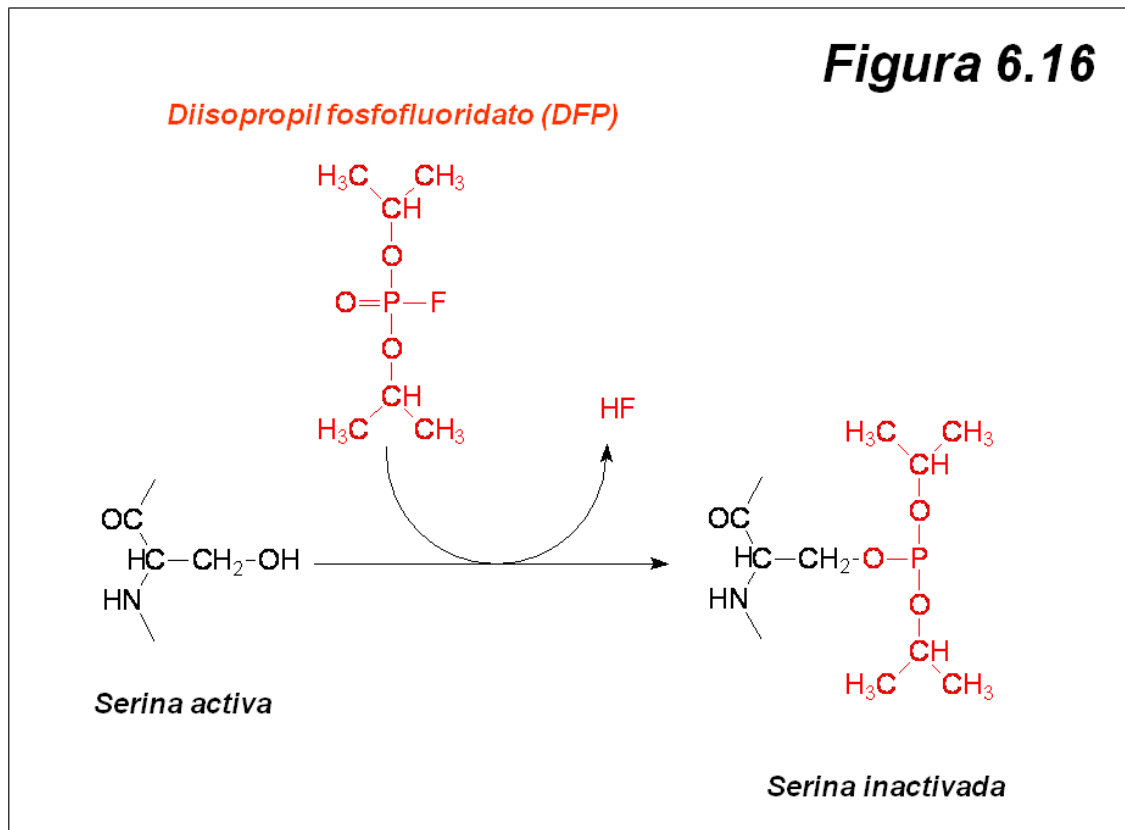
Reaccionan con un grupo específico que está en el centro activo o sus proximidades, sin reaccionar con otros aminoácidos iguales presentes en la misma proteína.

6.5.5.1 Organofosfóricos

Los inhibidores organofosforados forman un grupo muy interesante en el sentido de que son capaces de reaccionar con la *serina activa* de muchas enzimas; es decir, reaccionan con la serina específica encargada de la formación de acil-enzimas en el centro activo (ver capítulo 7), que forma parte de una *tríada catalítica* (Ser-His-Asp, Cap. 7), y no con las demás serinas que pudiera haber en el resto de la cadena polipeptídica. La acción inhibitoria de los organofosfóricos es ejercida a través de una reacción química con el centro activo que remeda enteramente el mecanismo normal de catálisis. En este sentido, los inhibidores

organofosforados podrían ser considerados como *substratos suicidas* (ver más adelante). Si no lo son, se debe a su carácter relativamente inespecífico, ya que actúan sobre un amplísimo grupo de enzimas.

El prototipo de estos inhibidores es el DFP (diisopropilfosfofluoridato), cuyo modo de acción se presenta en la figura 6.16.

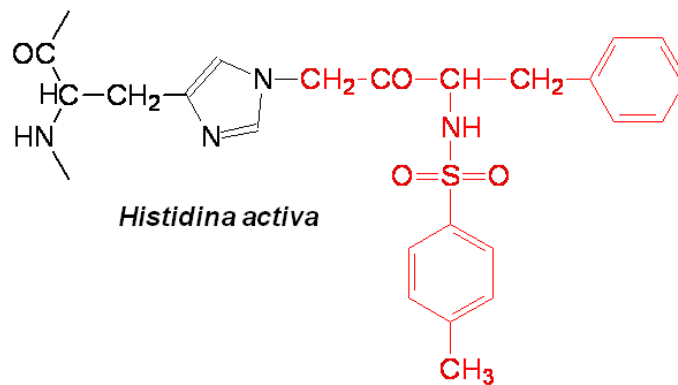


Existe una gran variedad de derivados organofosfóricos, particularmente los empleados como insecticidas (*Parathion, Malathion*) que operan por la inhibición de la *acetilcolinesterasa* de las uniones neuromusculares. Igualmente son derivados organofosfóricos los llamados *neurogases*, desarrollados con fines bélicos y de extrema toxicidad (*Sarin, Soman, Tabun*, etc.).

6.5.5.2 Marcadores de afinidad

Son agentes que en su estructura incluyen grupos químicos susceptibles de reaccionar con los residuos de aminoácidos presentes en las proximidades del centro activo. El prototipo de los marcadores de afinidad son los derivados *clorometilcetona*. Las halometilcetonas reaccionan con los grupos tiol e imidazol cercanos al centro activo y pueden ser fácilmente introducidas en compuestos con estructura análoga a substratos de enzima. En la figura 6.17, la estructura derivada de la reacción de una histidina activa (esto es, perteneciente a una tríada Ser-His-Asp) con el marcador de afinidad *tosil-L-fenilalanina clorometilcetona* (TPCK) (tosil es la abreviatura de *4-toluenosulfonil*)

Figura 6.17



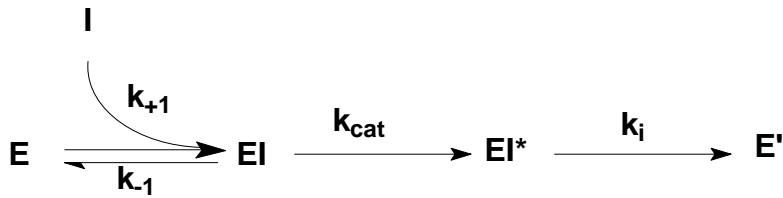
Producto de la reacción entre la histidina activa de una tríada catalítica con TPCK (Toluenosulfonil clorometil cetona)

Los marcadores de afinidad se han empleado sobre todo en estudios estructurales del centro activo.

6.6 Substratos suicidas

En la idea de unir la especificidad de los inhibidores competitivos o análogos de estado de transición con la eficiencia de los inhibidores irreversibles, un paso ulterior es el de los *substratos suicidas* o *inhibidores activados enzimáticamente*. Se trata de substratos que se unen al centro activo enzimático y son transformados por éste en una especie química altamente reactiva que inhibe irreversiblemente a la enzima. La diferencia con los marcadores de afinidad es que en éstos, el grupo reactivo va unido al sustrato; en los substratos suicidas, la especie reactiva es producida por la propia acción catalítica de la enzima, y en ausencia de ésta son totalmente incapaces de reaccionar. Nótese que decimos "sustrato suicida" en el mismo sentido que en "piloto suicida" (es decir, quizá fuera más descriptivo decir "sustrato kamikaze"). El mecanismo cinético de los substratos suicidas puede representarse así:

[13]



En donde:

(a) el inhibidor suicida I se fija a la enzima E con la misma especificidad que un sustrato o un inhibidor competitivo (con constantes k_{+1} y k_{-1} ; la unión es reversible) dando lugar a un complejo EI

(b) El inhibidor I así fijado es transformado a una especie química muy reactiva I^* por acción de la propia enzima, con constante catalítica k_{cat} (igual que un sustrato)

(c) I^* reacciona con los grupos químicos del centro activo con constante de velocidad k_i (como los inhibidores irreversibles) dando paso a una forma inactivada de la enzima E' ,

En resumen: la propia enzima transforma el inhibidor en una especie química que la inactiva irreversiblemente.

Los criterios para definir un compuesto como sustrato suicida serían: (a) Debe fijarse con la misma especificidad que un sustrato o un inhibidor competitivo; (b) el inhibidor no debe ser capaz de reaccionar en ausencia de enzima; (c) debe ser activado específicamente por la enzima; (d) la presencia de sustrato o de un inhibidor competitivo convencional a concentración alta dificulta o suprime la acción del inhibidor.

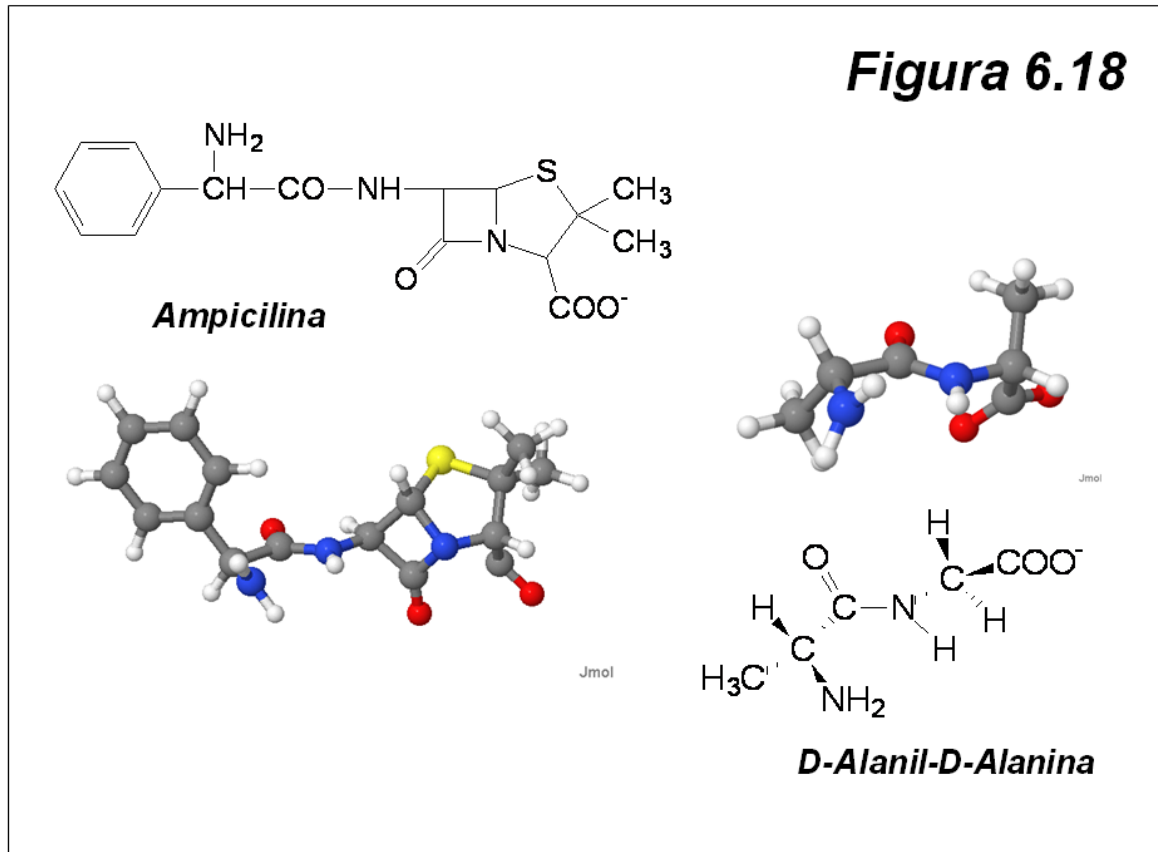
Como ejemplo veremos a continuación la acción de los antibióticos β -lactámicos (*penicilinas* y *cefalosporinas*)

6.6.1 Modo de acción de los antibióticos β -lactámicos

La terapéutica antibacteriana utiliza muy ampliamente los antibióticos β -lactámicos. Desde la introducción en Terapéutica de la penicilina durante la década de 1940, se han sintetizado nuevas moléculas parecidas (*penicilinas semisintéticas*) y se han introducido antibióticos químicamente afines a las penicilinas, las *cefalosporinas*. Las penicilinas semisintéticas eliminan o atenúan varios de los inconvenientes de estos antibióticos (ampliación del espectro antibacteriano, supresión de resistencias, posibilidad de administración por vía oral, etc.).

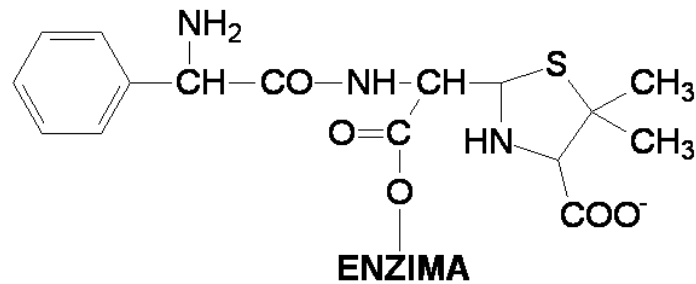
Todos ellos operan inhibiendo la última reacción en la síntesis de peptidoglicano bacteriano,

catalizada por la enzima *transpeptidasa*, y ello es debido a su similitud química con el terminal *D-alanil-D-alanina* del precursor de peptidoglicano. Esta enzima une el pentapéptido al puente pentaglicina convirtiéndose en tetrapéptido y uniendo covalentemente dicho tetrapéptido a la pentaglicina. Se presenta la estructura de una penicilina semisintética, la *ampicilina*, en la figura 6.18.



Los antibióticos β -lactámicos son inhibidores suicidas de la transpeptidasa. Una vez unidos al centro activo, el ciclo β -lactámico es atacado y roto por la enzima y reacciona con la serina del centro activo, inactivando irreversiblemente a la transpeptidasa (figura 6.19). Se impide así la síntesis normal del peptidoglicano. Al no disponer de pared celular, las fuerzas osmóticas del medio destruyen a la bacteria (son, por tanto, antibióticos *bactericidas*).

Figura 6.19



**Complejo covalente inactivo
Ampicilina-Transpeptidasa**

Estos antibióticos solamente operan a través de su unión al centro activo de la transpeptidasa, siendo transformados por ésta en la especie química que inactiva la enzima por reacción con la serina activa. Son, por tanto, inhibidores suicidas.

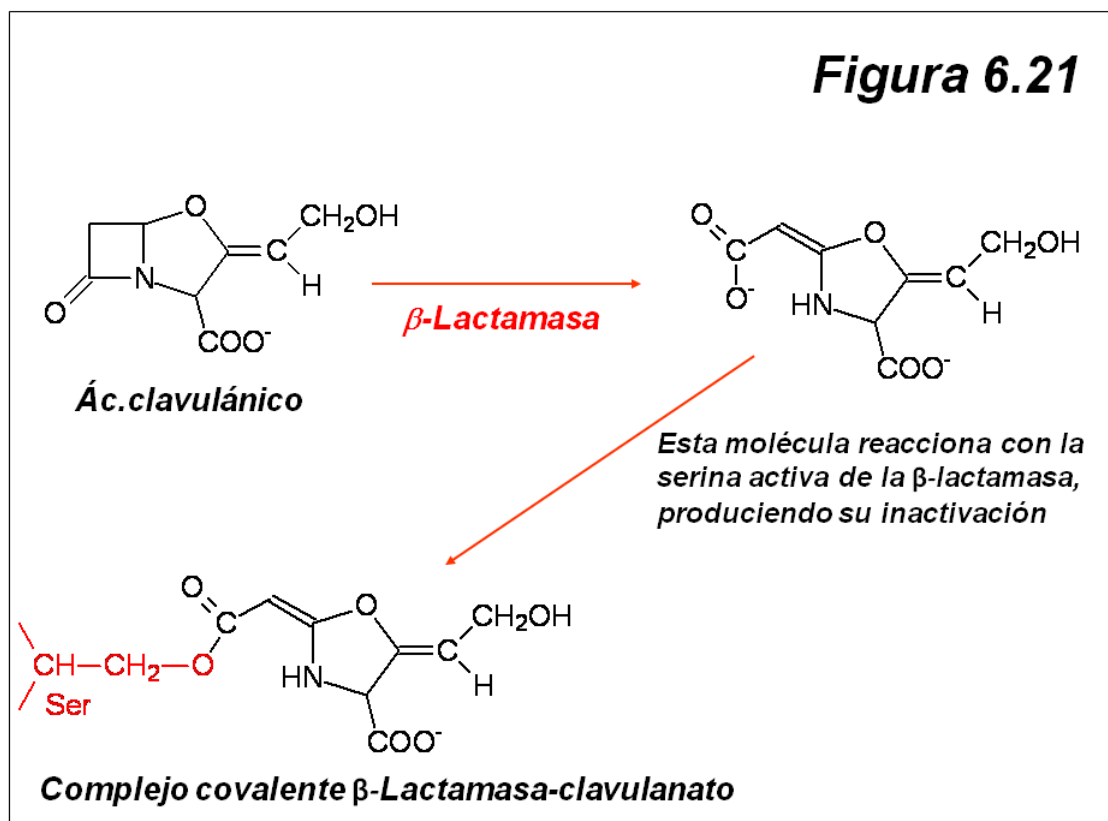
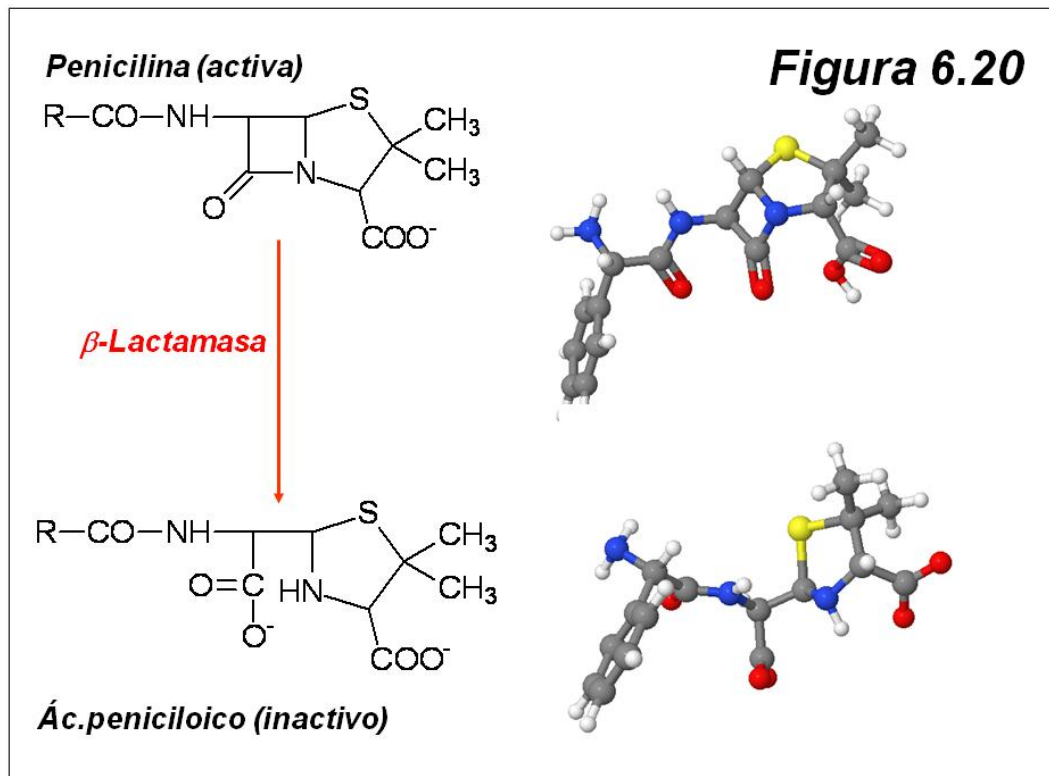
6.6.2 Resistencia a los antibióticos β -lactámicos: la β -lactamasa

Las bacterias han desarrollado progresivamente resistencia a los antibióticos β -lactámicos desde el mismo momento de su introducción en Terapéutica. En principio este inconveniente se eliminó mediante el uso de derivados semisintéticos de la penicilina (como la ampicilina); pero poco a poco las resistencias se han desarrollado también frente a éstas. La razón de la resistencia estriba en la producción por las bacterias de la enzima β -lactamasa, que rompe el anillo β -lactámico para dar lugar a derivados del ácido peniciloico (inactivo), tal como se muestra en la figura 6.20.

Para potenciar el efecto de los antibióticos β -lactámicos se han desarrollado inhibidores suicidas de la β -lactamasa, que añaden a las formulaciones convencionales de penicilinas semisintéticas activas por vía oral. De esta manera se inhibe la enzima inactivadora de los antibióticos β -lactámicos. Un ejemplo de estos inhibidores es el ácido clavulánico, que se fija al centro activo de la β -lactamasa, la cual rompe el anillo lactámico y da lugar a un producto que reacciona covalentemente con la serina activa de la enzima, inactivándola (figura 6.21).

En resumen, hemos visto hasta aquí cómo unos inhibidores suicidas de una serin-enzima

(los antibióticos β -lactámicos sobre la transpeptidasa) son potenciados por otro inhibidor suicida que opera sobre otra serin-enzima (el ácido clavulánico sobre la β -lactamasa).

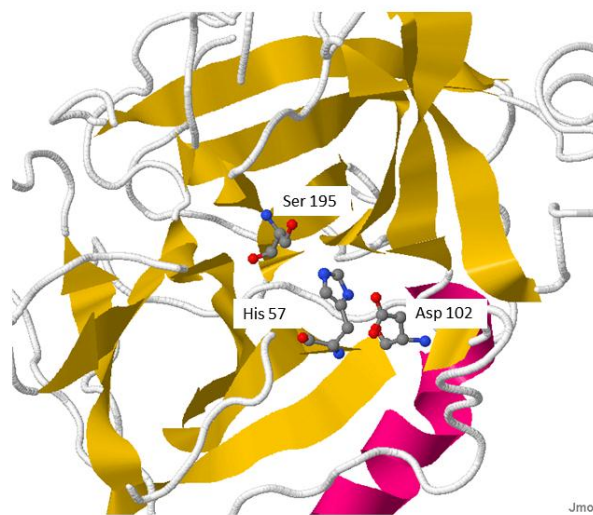


6.6.3 Otros inhibidores suicidas

El principio de la inhibición suicida se utiliza muy ampliamente hoy día tanto en la Terapéutica establecida como en el diseño de nuevos fármacos.

Así, se han desarrollado, entre otros muchos, inhibidores suicidas de la *monoaminoxidasa cerebral* (antidepresivos y antiparkinsonianos); de la *aromatasa* (antiestrogénicos); de las *serin-proteinasas* (como la proteasa del VIH); de la *ornitina descarboxilasa* (antineoplásicos); de las *lipo-* y *ciclooxigenasas* (antiinflamatorios, por ejemplo, los salicilatos); de la *yoduro peroxidasa* (antitiroideos); de la *dopamina β-hidroxisilasa* (neurolépticos). Podemos decir que la investigación actual sobre fármacos parte del principio de la inhibición suicida, unido a métodos informatizados de diseño molecular virtual.

CAPÍTULO 7: El Centro Activo enzimático. Mecanismos de la acción enzimática



7.1 El centro activo

7.1.1 Concepto

Hemos visto en los capítulos anteriores que todos los modelos aceptados hoy día para explicar la acción enzimática dan por sentado que las enzimas ejercen su acción a través de la formación de un complejo **ES** (complejo enzima-substrato), de naturaleza estequiométrica y en muchos casos no covalente. Cuando a esta generalización añadimos el hecho de la especificidad enzimática, se llega a la conclusión de que la fijación del sustrato se hace a un lugar específico de la enzima, cuya configuración espacial, determinada por las cadenas laterales de los aminoácidos que la integran o por la presencia de un grupo prostético, es tal que sólo el sustrato o compuestos análogos del mismo pueden fijarse. Por otra parte, de

esta fijación resulta la transformación catalítica del sustrato. Llamamos *centro activo* a esta zona específica de la molécula enzimática. Hasta este momento hemos tratado del centro activo en un sentido puramente cinético; los datos experimentales apuntan a la existencia de un centro activo. En este capítulo trataremos en primer lugar de la evidencia estructural que nos lleva a esta conclusión. El conocimiento detallado de la estructura de muchos centros activos permite que hoy día conozcamos asimismo multitud de mecanismos de acción enzimática, que también serán estudiados en el presente capítulo.

La existencia del centro activo enzimático presupone que cualquier descripción del mismo deba necesariamente explicar:

- La *configuración específica de los grupos moleculares encargados de la fijación del sustrato*, dando cuenta de los fenómenos de especificidad y competición por análogos estructurales.

- La *configuración específica de los grupos moleculares encargados de la transformación catalítica del mismo*. Estos grupos no coinciden necesariamente con los citados en el párrafo anterior. La descripción de estos grupos ha de ser coherente con el mecanismo cinético conocido de la enzima y debe dar cuenta de los efectos de inhibidores irreversibles, del pH, de la temperatura, etc., observados para la misma.

- Además, cualquier descripción del centro activo debe explicar la *eficiencia catalítica de las enzimas*. Los números de recambio tan enormes que encontramos a veces en la catálisis enzimática no encuentran una explicación satisfactoria hasta que no se llega a conocer en detalle la estructura del centro activo. En este sentido, el conocimiento del mismo puede brindar claves extraordinariamente útiles en el diseño e implementación de *enzimas artificiales*, tema abordado por la moderna Biotecnología.

7.1.2 Pruebas experimentales de la existencia del centro activo

1. El *modelo cinético de Michaelis y Menten* se fundamenta en la formación de un complejo estequiométrico enzima-sustrato, y ello explica la mayor parte de la fenomenología enzimática. De esta interacción resulta la transformación catalítica del sustrato y la formación de producto. Como se dijo más arriba, si a este concepto añadimos el fenómeno de la especificidad, se llega a concebir la existencia de un centro activo con capacidad de fijar y transformar al sustrato. Hasta el momento actual, no se ha descubierto ninguna enzima cuya actividad no esté de acuerdo con este modelo; todas las enzimas conocidas hasta ahora dan lugar a cinéticas saturantes (de orden cero a concentraciones altas del sustrato, de orden uno a bajas concentraciones) y presentan un mayor o menor grado de especificidad.

2. Muchas enzimas son proteínas conjugadas a un *grupo prostético*, y en estos casos puede demostrarse fácilmente que la actividad catalítica está en parte o en su totalidad ligada al

mismo. El grupo prostético ocupa una parte específica de la molécula, y su actividad está condicionada por el entorno de la molécula proteica. Hoy sabemos que en la mayoría de estos casos el grupo prostético no es capaz *per se* de llevar a cabo el proceso catalítico completo. Así, en las *hemoenzimas* (enzimas con grupo prostético de tipo hemo) el entorno proteico es absolutamente fundamental en la acción catalítica, y lo mismo podemos decir de las flavoenzimas y de todas las demás.

3. El fenómeno de la *inhibición competitiva* nos indica que compuestos con estructura análoga al sustrato pueden en ocasiones bloquear la acción enzimática. La asociación de los conceptos "similitud estructural" con "inhibición" lleva intuitivamente a pensar que la acción del inhibidor consiste en que éste ocupa el *lugar* destinado al sustrato, lo que ha sido ampliamente corroborado por la investigación.

4. Muchos de los *inhibidores irreversibles* conocidos (organofosfóricos, reactivos -SH, etc.) deben su actividad a una reactividad específica frente a determinadas cadenas laterales de aminoácidos. El caso de los organofosfóricos es particularmente ilustrativo dado que reacciona con el hidroxilo de la serina, pero no con *todas* las serinas, sino sólo con aquella implicada en la actividad catalítica. Para ello, sabemos que en la vecindad de la serina activa tiene necesariamente que haber una cadena lateral de histidina y una de aspartato (tríada catalítica) con una orientación precisa. Los organofosfóricos reaccionan únicamente con las serinas que presentan esta configuración.

5. El estudio filogenético de las secuencias de aminoácidos de enzimas homólogas (serin proteinasas, por ejemplo) ha permitido ver la existencia de zonas altamente conservadas en la estructura primaria de las mismas. Se muestran a continuación algunos ejemplos de estas secuencias:

Secuencias homólogas en torno a la serina activa en serin proteinasas

Tripsina bovina	Cys.Gln.Gly.Asp.Ser.Gly.Gly.Pro.Val
Quimotripsina bovina A	Cys.Met.Gly.Asp.Ser.Gly.Gly.Pro.Leu
Quimotripsina bovina B	Cys.Met.Gly.Asp.Ser.Gly.Gly.Pro.Leu
Elastasa porcina	Cys.Gln.Gly.Asp.Ser.Gly.Gly.Pro.Leu
Trombina bovina	Cys.Glu.Gly.Asp.Ser.Gly.Gly..Pro.Phe
Plasmina humana	Cys.Gln.Gly.Asp.Ser.Gly.Gly.Ser.Trp
Proteinasa de <i>Sorangium</i>	Gly.Arg.Gly.Asp.Ser.Gly.Gly.Ser.Trp
Proteinasa de <i>St. griseus</i>	Cys.Gln.Gly.Asp.Ser.Gly.Gly.Pro.Val

Secuencias homólogas en torno a la histidina activa en serin proteinasas

Tripsina bovina	Ser.Ala.Ala.His.Cys.Tyr
Quimotripsina bovina A	Thr.Ala.Ala.His.Cys.Gly
Quimotripsina bovina B	Thr.Ala.Ala.His.Cys.Gly
Elastasa porcina	Thr.Ala.Ala.His.Cys.Val

Trombina bovina	Thr.Ala.Ala.His.Cys.Leu
Proteinasa de <i>Sorangium</i>	Thr.Ala.Gly.His.Cys.Gly
Proteinasa de <i>St. griseus</i>	Thr.Ala.Ala.His.Cys.Val

(En rojo, posiciones invariantes; en azul, sustituciones conservadoras)

Esta convergencia estructural en enzimas de muy diversa procedencia habla a favor de una configuración altamente específica de la molécula enzimática que, al conservarse, implica una zona de la molécula fundamental para su actividad catalítica.

6. Los estudios de fijación de sustratos (o más frecuentemente, análogos de sustrato) a enzimas muestran inequívocamente un número entero y limitado de moléculas del mismo que se fijan a la enzima. Si en muchos casos hay más de uno, ello indica la existencia de más de un centro activo, lo que es más bien regla que excepción en la catálisis enzimática, particularmente en lo que se refiere a enzimas intracelulares.

7. Por último, podemos mencionar los estudios físicos, estructurales, realizados sobre complejos enzima-sustrato (o una vez más, análogos de sustrato). Entre ellos los más significativos son los realizados por *cristalografía de rayos X*. En 1965, Phillips publicó sus resultados sobre la cocrystalización de la *lisozima* con su sustrato, y la estructura a alta resolución del complejo. Ya el hecho de que el complejo **ES** (o **EI**, en el caso de un análogo competitivo) pueda co-cristalizar indica que la fijación del sustrato tiene necesariamente que hacerse a un grupo específico, el mismo en todas las moléculas enzimáticas. Pero la estructura resultante de estos estudios va aún más allá; no sólo se demuestra claramente la existencia de un lugar de fijación específico del sustrato, sino que explica con todo detalle los pormenores de la actividad catalítica del mismo. En la actualidad se ha logrado la cocrystalización de muchos complejos **ES** y se ha podido estudiar su estructura por cristalografía de rayos X, con el mismo resultado que en el caso de la lisozima.

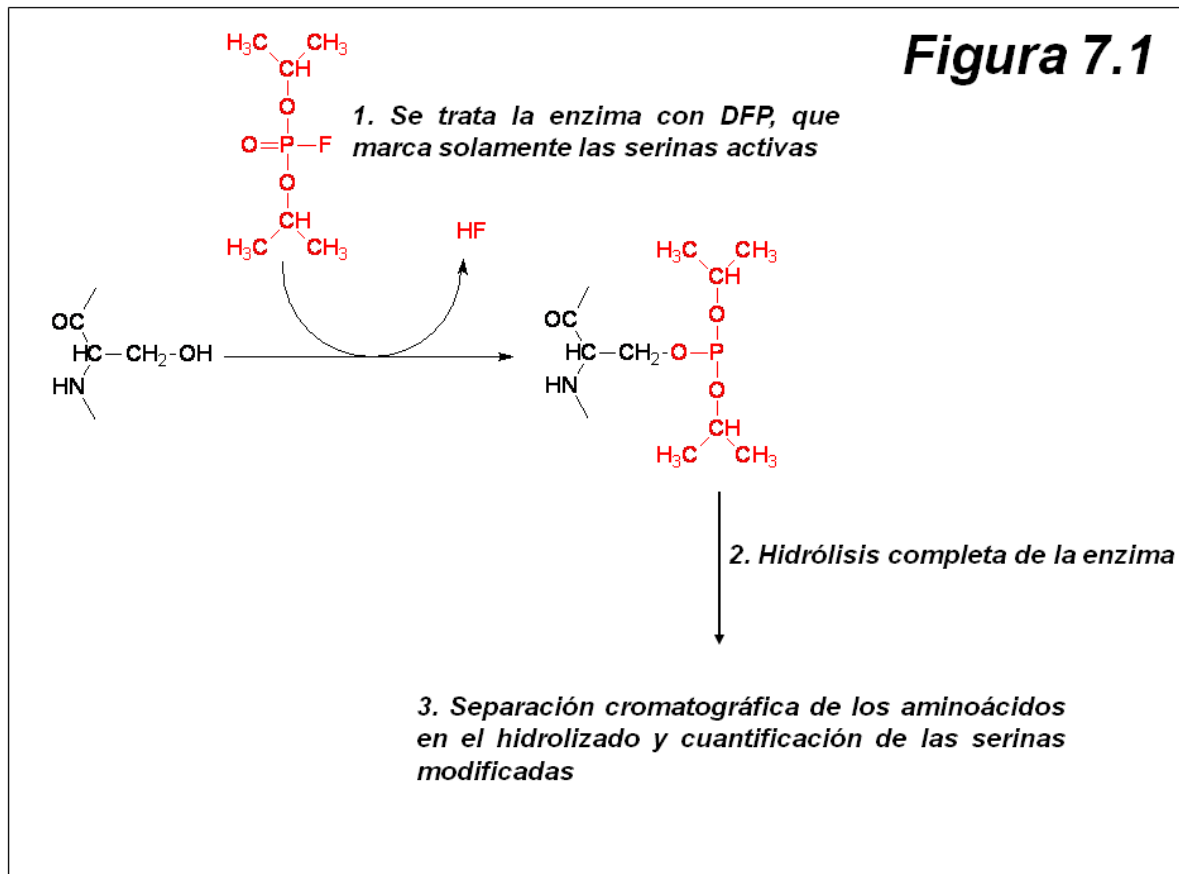
7.1.3 Número de centros activos

1. Cuando la proteína presenta un *grupo prostético* o un *metal* esencial para la actividad catalítica, el número de centro activos equivale obviamente al de éstos. Tal es el caso, por ejemplo, de las flavoenzimas, biotinil-enzimas, hemoenzimas, metaloenzimas, etc.

2. Los estudios convencionales de fijación mediante análogos de sustrato debidamente marcados (por radioactividad, fluorescencia, etc.) nos pueden dar una idea muy exacta del número de moléculas fijadas a la enzima así como de su afinidad intrínseca. En esencia, estos métodos consisten en la incubación de la enzima con el análogo marcado durante un tiempo determinado, a diversas concentraciones del ligando y permaneciendo todas las demás condiciones constantes, seguida de la separación del *ligando libre* del *complejo proteína-ligando* por algún método físico-químico. La determinación cuantitativa de uno y otro nos lleva, a través de diversos procedimientos en los que no vamos a entrar, al conocimiento del número de centros activos.

3. El centro activo de muchas enzimas contiene grupos químicos que pueden reaccionar con reactivos específicos. Por ejemplo:

- En las enzimas que contienen serinas reactivas en el centro activo podemos determinar el número de éstos mediante reacción con organofosfóricos (por ejemplo, DFP, diisopropil fosfofluoridato, figura 7.1). Es obvio, en este caso, que el número de moles de DFP consumidas equivaldrá al número de centros activos de la enzima. En este caso es importante hacer notar que los organofosfóricos reaccionan únicamente con la serina activa, sin hacerlo con las demás serinas que pudiera haber en el resto de la molécula enzimática.



- Lo mismo puede hacerse con otros inhibidores irreversibles, y muy particularmente con *substratos suicidas*.

- En general, todas aquellas enzimas cuya acción proceda a través de la *formación de intermediarios covalentes* (v.más adelante) son susceptibles de este tipo de estudios. Siempre se pueden encontrar condiciones experimentales en las que el intermediario covalente sea suficientemente estable como para ser aislado y cuantificado.

7.1.4 Aminoácidos y grupos químicos implicados en el centro activo

La identificación de las cadenas laterales implicadas en la actividad catalítica de la enzima no

es tarea fácil, aunque hoy día disponemos de métodos cada vez más poderosos que serán tratados de forma general a continuación. Como siempre, son los estudios estructurales, cuyo paradigma es la cristalografía de rayos X, los que tienen por el momento la última palabra en este contexto.

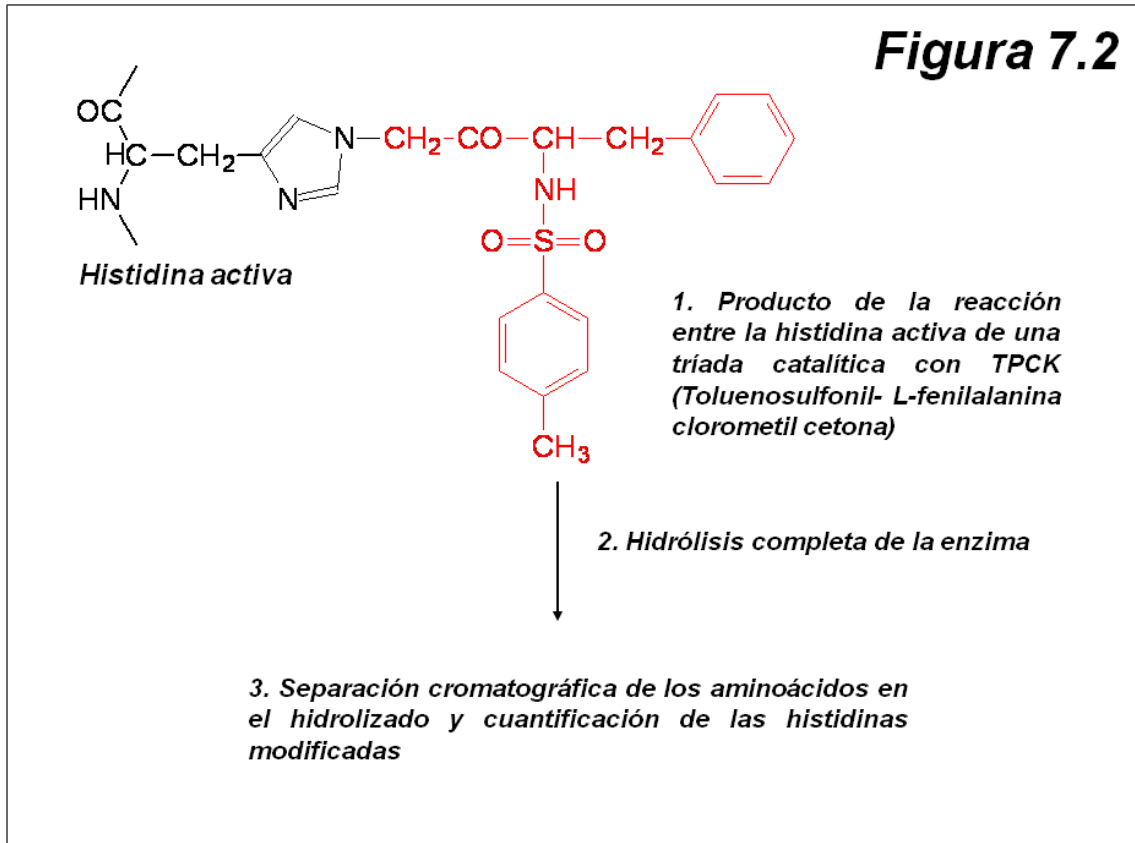
Cuando encontramos en una proteína un aminoácido que es fundamental en la actividad catalítica, se ha de determinar cuidadosamente si lo es por pertenecer realmente al centro activo o bien si su papel estriba en mantener una estructura terciaria o cuaternaria de vital importancia para la correcta configuración del mismo. Igualmente se debe determinar si el aminoácido forma parte del centro activo (a) contribuyendo a la correcta fijación del sustrato; (b) suministrando un grupo reactivo para su transformación catalítica; (c) realizando ambas funciones a la vez. Por lo que sabemos actualmente, los aminoácidos implicados en la fijación del sustrato pueden ser prácticamente todos, a través de interacciones débiles (hidrofóbicas o polares) establecidas entre el sustrato y sus cadenas laterales. Pero los aminoácidos que participan en la transformación catalítica han resultado ser un número mucho más limitado (por ejemplo serina, histidina, cisteína, lisina, aspartato, glutamato) hasta el punto de que muchos mecanismos de acción enzimática han resultado ser muy similares a pesar de que corresponden a reacciones aparentemente muy distintas.

Históricamente, los primeros estudios se hacían observando el efecto del pH sobre la fijación del sustrato o sobre su transformación catalítica, tratando de localizar algún pH específico que diera lugar a un cambio en la actividad catalítica y que se correspondiera con el pK_a conocido de un aminoácido concreto. Ahora bien, estos estudios sólo podían tomarse como orientativos, ya que el pK_a de los grupos disociables presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos varía en función del entorno, y nunca podemos llegar a identificar inequívocamente un aminoácido por este criterio.

1. Efecto de inhibidores irreversibles. Ya hemos visto la utilidad de este tipo de inhibidores en el estudio de número de centros activos. Como es lógico, la acción de este tipo de inhibidores nos informa sobre determinados aminoácidos. Así, la sensibilidad a organofosfóricos es característica de las serin-enzimas (es decir, las que presentan una configuración serina-histidina-aspartato en el centro activo); la sensibilidad a reactivos de grupos -SH informa sobre la presencia de cisteína; el efecto de agentes quelantes (EDTA, EGTA) o de ligandos de coordinación (CN^- , CO, etc.) indica la presencia de iones metálicos.

2. Marcaje de afinidad. Esta técnica, descrita en el capítulo 6, ha sido ampliamente utilizada para determinar los aminoácidos situados en o en las proximidades del centro activo. Consiste en tratar a la enzima con un compuesto formado por la unión del sustrato, o un análogo del mismo, a un grupo químico suficientemente reactivo como para marcar, en el momento de la unión ES, a grupos de la proteína que estén en el entorno del centro activo.

El ejemplo clásico de marcador de afinidad ha sido el marcaje de histidinas activas mediante la *toluenosulfonil-L-fenilalanina clorometil cetona* (TPCK), que vimos en el capítulo 6, y cuya acción se presenta en la figura 7.2. Este marcaje opera sobre las serin-enzimas.



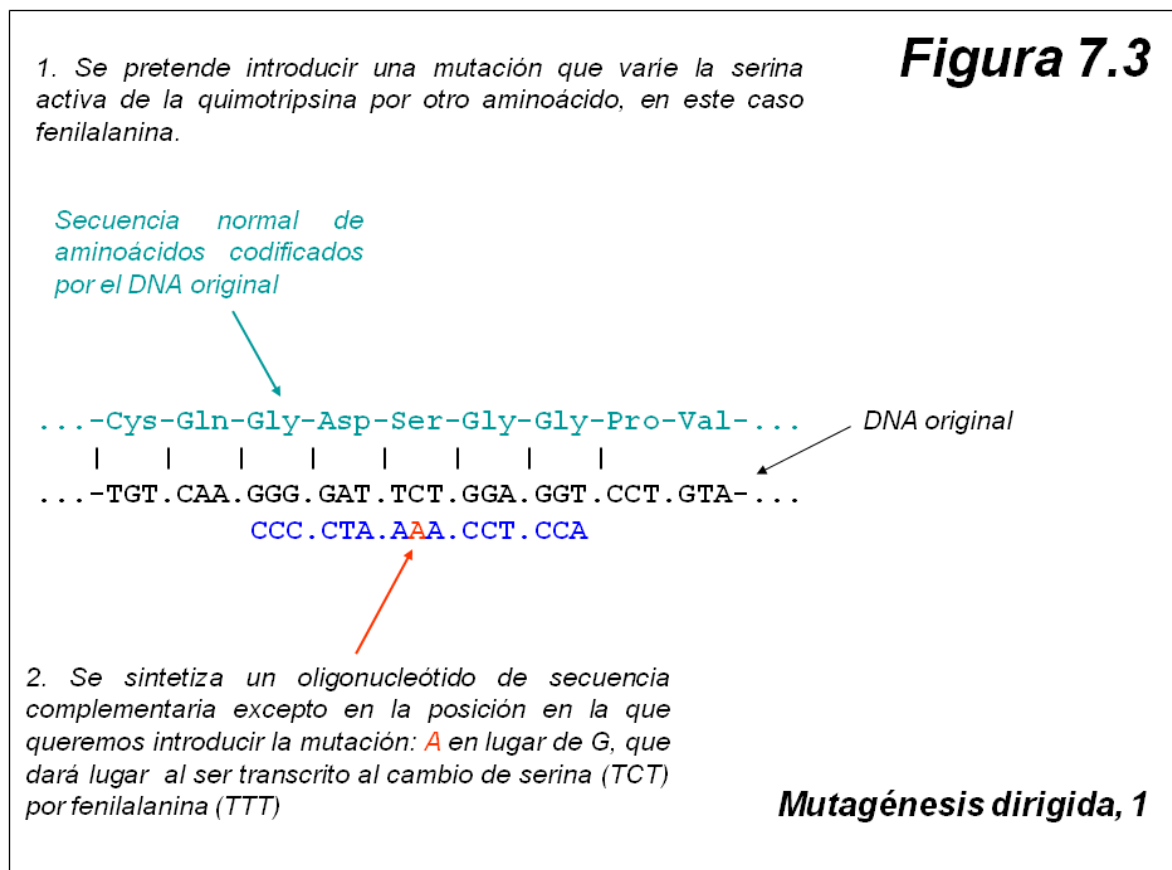
3. Substratos suicidas. El concepto de sustrato suicida, que vimos en el capítulo anterior, vale también para la identificación de residuos presentes en el centro activo. Precisamente, estos inhibidores fueron diseñados por **Konrad Bloch** para estudiar la inactivación de la β -hidroxi decanoil deshidratasa (enzima implicado en la síntesis de ácidos grasos insaturados). Para ello diseñó un derivado que en el curso de la actividad catalítica era transformado a un producto altamente reactivo con la consiguiente modificación e inactivación de la proteína. Desde entonces se han desarrollado una gran cantidad de sustratos suicidas, empleados tanto en Terapéutica como en la identificación de aminoácidos presentes en el centro activo.

4. Estudios filogenéticos. La comparación de estructuras primarias de enzimas, según vimos antes, nos brinda información muy útil en la identificación de aminoácidos presentes en el centro activo (aunque también muchos invariantes están implicados en el mantenimiento de la estructura global de la molécula, y no en el centro activo propiamente dicho).

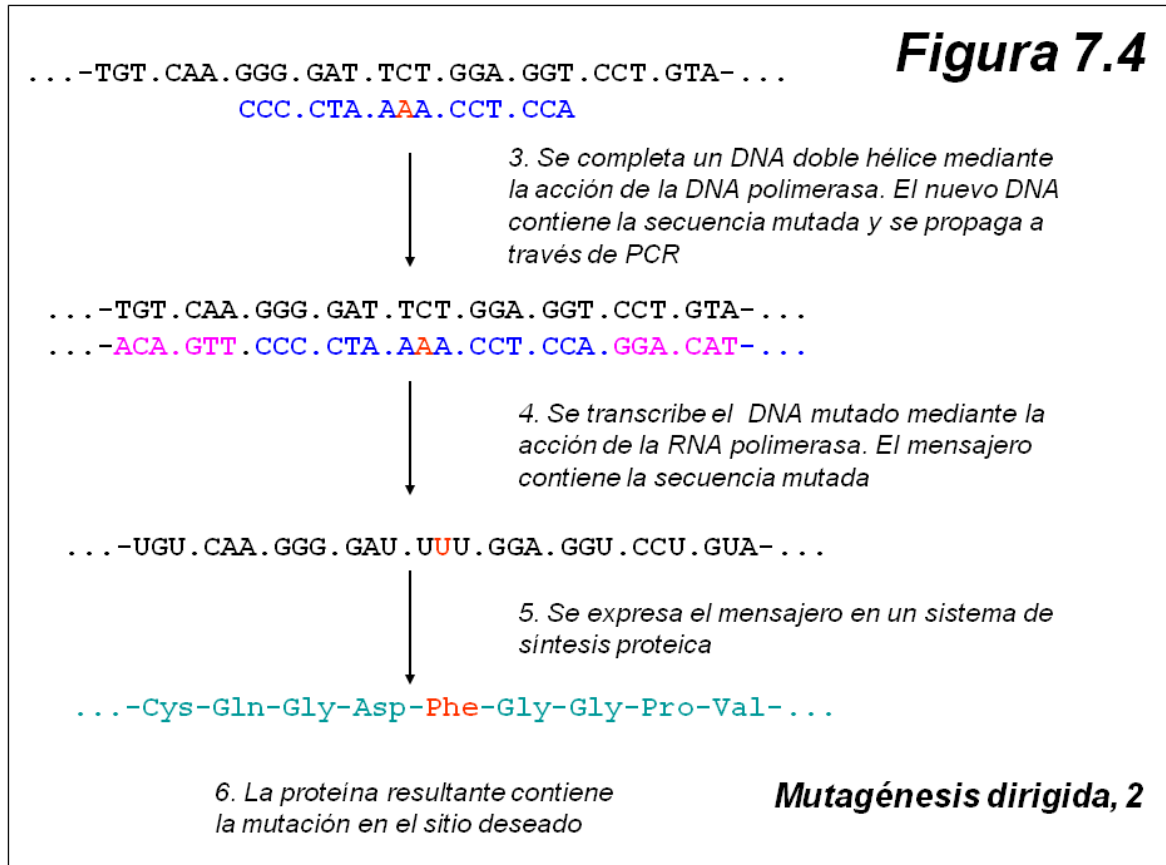
5. Mutagénesis dirigida. Se trata de una poderosísima técnica mediante la cual se pueden introducir mutaciones a voluntad en secuencias peptídicas de enzimas cuyos genes hayan podido ser clonados con anterioridad. Para ello, se sintetiza un oligonucleótido de 10-12 residuos complementarios a la secuencia nucleotídica en torno al codón del aminoácido que se pretende variar. Precisamente en este codón, en lugar del aminoácido que ocupa la posición en la enzima nativa, se introduce el del aminoácido que queremos poner en su lugar. Veamos esta técnica con un ejemplo concreto:

(a) Supongamos que se desea sustituir la serina activa de la quimotripsina por otro

aminoácido. Para ello, se sintetiza un oligonucleótido de unos 15 nucleótidos de secuencia complementaria al DNA original, *excepto en una sola base*, correspondiente a la segunda del codon de serina (TCT, cuyo complementario sería AGA y sin embargo hemos puesto AAA). Por ello, serina (TCT) se verá sustituida por TTT (fenilalanina) (figura 7.3). Es obvio que el apareamiento Watson-Crick entre la secuencia del oligonucleótido y la del gen clonado que se pretende mutar no es perfecto; pero llevando a cabo la hibridación en condiciones de alta concentración salina se obtiene el apareamiento a pesar de la zona imperfecta.



(b) Se procede a entonces a tratar el híbrido con DNA polimerasa, con lo que producimos DNA con la secuencia mutante deseada. Este DNA, propagado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se transcribe a un mRNA que expresado en un sistema de síntesis de proteína dará lugar a la enzima con el aminoácido mutado (figura 7.4).



6. Estudios físicos. Se conoce hoy día la estructura tridimensional de miles de enzimas. En muchos casos se puede obtener la cocrystalización de las mismas con su substrato o un análogo del mismo, con lo que se hace accesible al estudio por difracción de rayos X, lo cual supone el estudio más completo que cabe hacer tanto del centro activo como del mecanismo catalítico de las enzimas. Más adelante en este mismo capítulo estudiaremos a modo de ejemplo una serie de mecanismos determinados por esta y otras técnicas.

7.2 Mecanismos de la acción enzimática

Uno de los problemas más interesantes que plantea la enzimología es determinar las causas de la gran eficiencia catalítica de las enzimas. La catalasa, por ejemplo, transforma substrato en el orden de 10^8 moléculas de substrato por segundo y centro activo. Estas velocidades corresponden a una disminución de la energía de activación (v.cap.1) de varios órdenes de magnitud. La explicación de estas activaciones tan intensas no radica en una sola causa. Muy esquemáticamente podemos cifrar la acción enzimática en los siguientes mecanismos:

(a) Yuxtaposición en un sentido estereoquímicamente correcto de todos los grupos

reactivos sobre una superficie específica: *efectos de proximidad y orientación*

(b) Presentación de grupos con reactividades específicas (ácido, base, nucleófilo, electrófilo, etc.) presentes en la molécula enzimática y que determinan la acción catalítica.

(c) Disminución de la estabilidad del estado basal de las moléculas e incremento de la misma en el estado de transición.

(d) Formación de intermediarios covalentes entre el sustrato y la enzima que favorecen la acción catalítica.

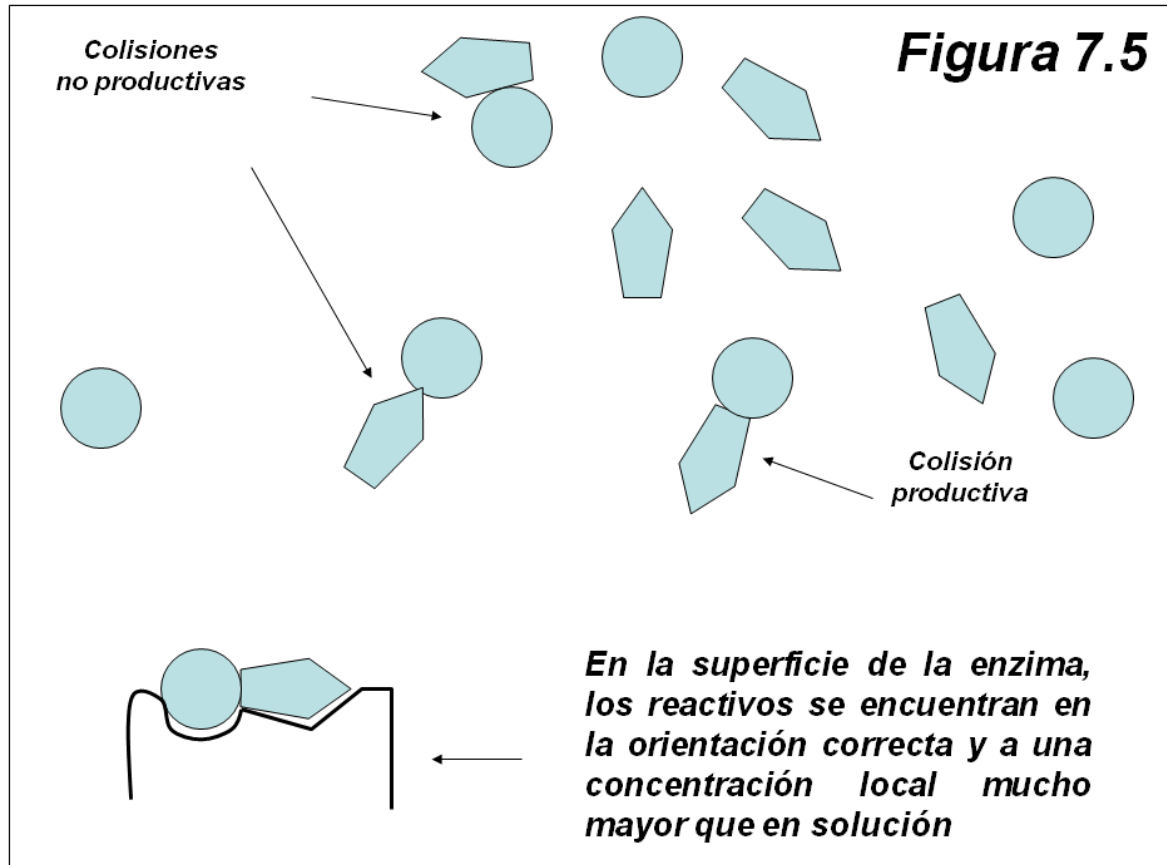
(e) Otros muchos efectos; por ejemplo, efectos *mecanocuánticos*.

Si bien estos efectos, uno por uno, no llegan a explicar las enormes velocidades de la acción enzimática, en conjunto pueden dar una idea relativamente aproximada de los mecanismos intrínsecos de la acción enzimática.

7.3.1 Efectos de proximidad y orientación

La catálisis enzimática tiene en común con la catálisis heterogénea en general el hecho de que los reactivos se reúnen sobre una superficie; en nuestro caso, una zona específica de la molécula proteica conocida como centro activo. Por tanto, lo primero que hemos de suponer es que la acción enzimática tiene lugar (entre otras cosas) por la *proximidad* que se establece entre los distintos reactivos (con el consiguiente aumento de la concentración local de los mismos). Hay cálculos teóricos que cifran la aceleración de una reacción debido a este factor de proximidad en alrededor de un factor de 5 para reacciones monosustrato; pero este factor puede incrementarse enormemente al aumentar la molecularidad de la reacción (reacciones multisustrato).

Igualmente, el factor de aceleración se incrementa de manera notoria si al efecto de proximidad unimos el efecto de *orientación*. En el caso de la reacción en solución libre, sin catalizadores presentes, podemos suponer que la colisión entre moléculas solamente es productiva en el caso de que las moléculas participantes lleguen al choque en una orientación correcta, tal y como se indica en la figura 7.5. En el centro activo de la enzima los sustratos se fijan desde el principio en la orientación correcta.



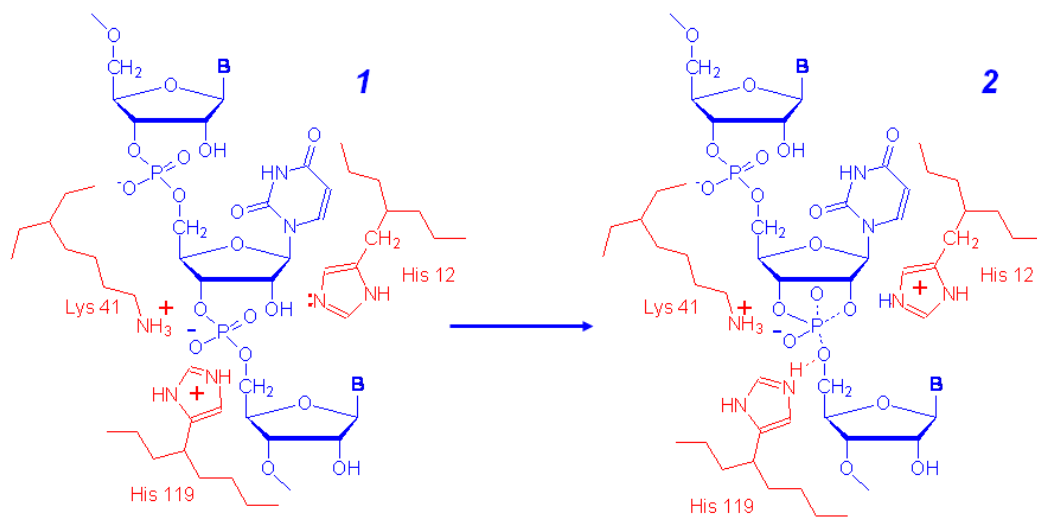
7.3.2 Catálisis ácido-base

Existen muchos aminoácidos en las proteínas cuyas cadenas laterales son susceptibles de disociación ácido-base, pudiendo actuar como catalizadores generales ácidos o básicos. Pero además, el entorno en el interior de la molécula altera el pK_a de los grupos disociables, llevándolos a zonas de pH más cercanas al del interior celular, de forma que grupos químicamente idénticos pueden actuar como ácido y como base en la misma molécula.

En muchas enzimas es habitual el mecanismo de *sustracción protónica* (ingl. *proton abstraction*). Ilustraremos este mecanismo detallando la acción catalítica de la *ribonucleasa pancreática*.

En el mecanismo de la ribonucleasa pancreática, la acción catalítica se desarrolla gracias a los estados alternantes de protonación de dos histidinas presentes el centro activo, la His 12 (libre) y las His 119 (protonada), a cuyo conjunto se une el sustrato, un polirribonucleótido (figura 7.6, 1). La catálisis comienza con la sustracción de un protón del grupo 2'-OH del sustrato por el par electrónico del imidazol de la His 12 y una cesión del protón de la His 119 al sustrato. Esto da lugar a un estado de transición inestable con fosfato pentacovalente, que es estabilizado por otros grupos presentes en el centro activo (figura 7.6, 2).

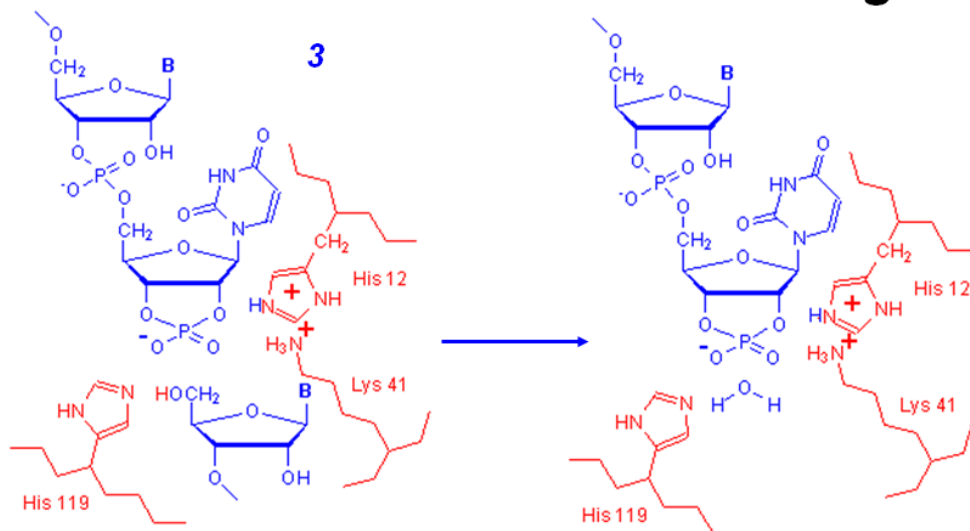
Figura 7.6



Mecanismo de sustracción protónica en la ribonucleasa pancreática. El par electrónico libre de la His 12 de la enzima (en rojo, 1) sustrae un protón del -OH en la posición 2' de la ribosa (en azul) del sustrato, dando lugar a un estado de transición inestable (2)

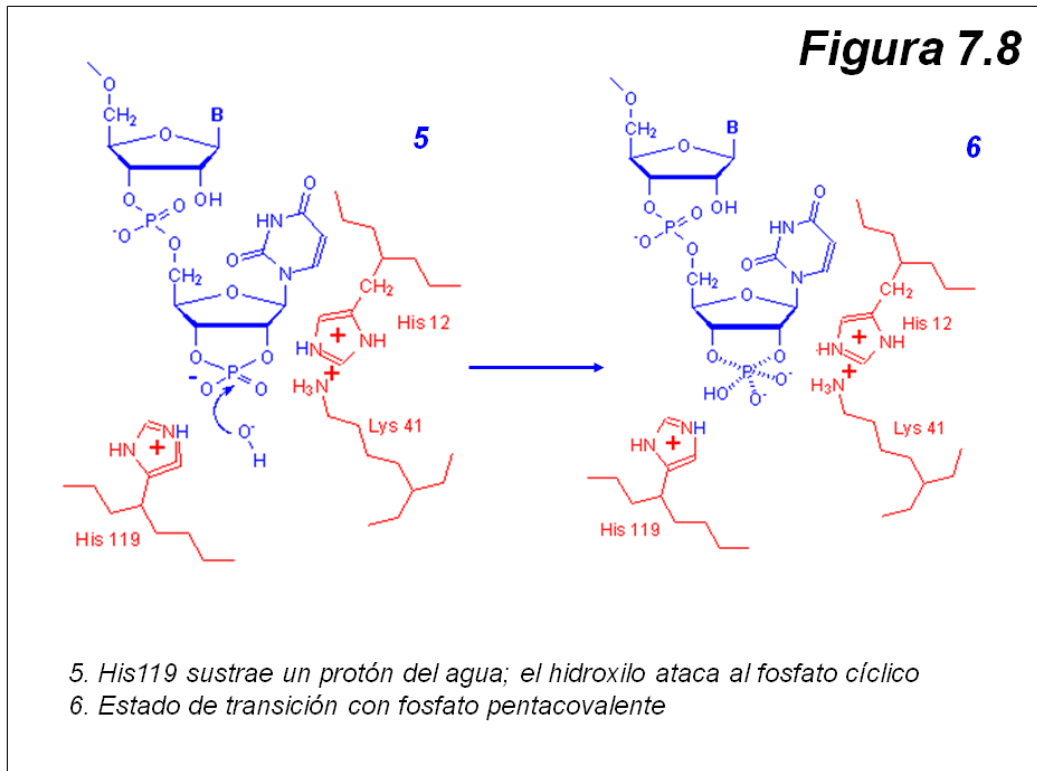
Este estado se resuelve quedando la His 119 libre (no protonada), liberándose el fragmento 3' del polinucleótido y con el fragmento 5' en estado de nucleótido 2',3' cíclico (figura 7.7, 3)

Figura 7.7

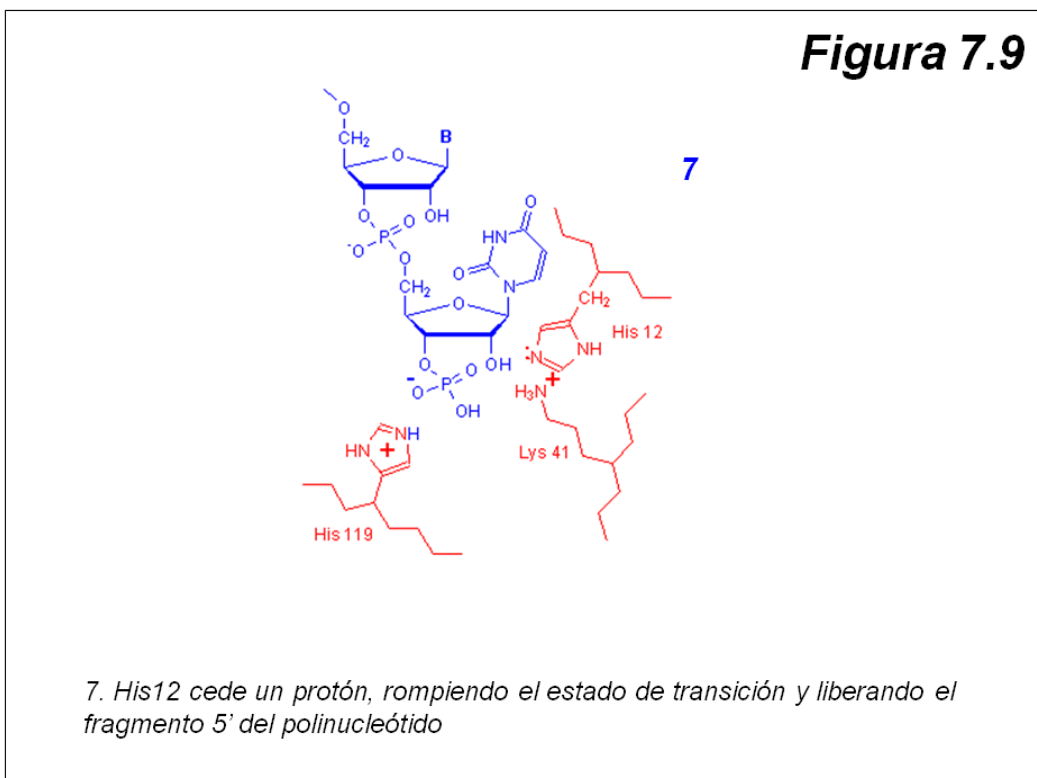


*3. His119 cede el protón al fragmento 3' del polinucleótido que queda libre formándose un nucleótido cíclico
4. Entra una molécula de agua al Centro Activo*

Al centro activo accede una molécula de agua (figura 7.7, **4**) a la que la His 119 sustrae un protón, produciendo un grupo -OH^- libre que ataca al nucleótido cíclico (figura 7.8, **5**). Esto produce un nuevo estado de transición pentacovalente (figura 7.8, **6**)



el cual es roto por el protón de la His 12, liberándose así el fragmento 5' del polinucleótido primitivo y volviendo el centro activo a su configuración original (figura 7.9, **7**)



Reacciones de *sustracción y cesión protónicas* como la citada, llevadas a cabo por bases (generalmente por el par electrónico de la histidina), tienen una enorme importancia no sólo en esta enzima, sino en toda la catálisis enzimática en general.

7.3.3 Grupos nucleófilos y electrófilos

Se llaman grupos *nucleófilos* aquéllos que tienen abundancia de electrones (por ejemplo, grupos con N, O y S) y por lo tanto presentan afinidad hacia los *núcleos* (y de ahí el nombre). Los ataques nucleófilos tienen una gran importancia en multitud de mecanismos enzimáticos. Nucleófilos muy potentes son el -OH de la serina (cuando está en las proximidades de una histidina que tiende a retirar un protón H^+ del grupo alcohólico y se transforma en grupo enolato $-O^-$ de gran reactividad), el N de la histidina (en estado de base conjugada, es decir, con el par electrónico libre) y el -SH de la cisteína (en presencia asimismo de un grupo básico que induzca en ésta una sustracción protónica y lo transforme en tiolato, $-S^-$).

Son grupos *electrófilos* los que con pocos electrones tienen afinidad por éstos; no hay en las proteínas grupos electrófilos potentes; pero sí lo son los átomos e iones metálicos (Zn^{2+} , Cu^{2+} , etc.) que con mucha frecuencia aparecen formando parte en las moléculas enzimáticas con diversas geometrías de coordinación y mucha importancia en el mecanismo de catálisis.

7.3.4 Formación de intermediarios covalentes con la enzima

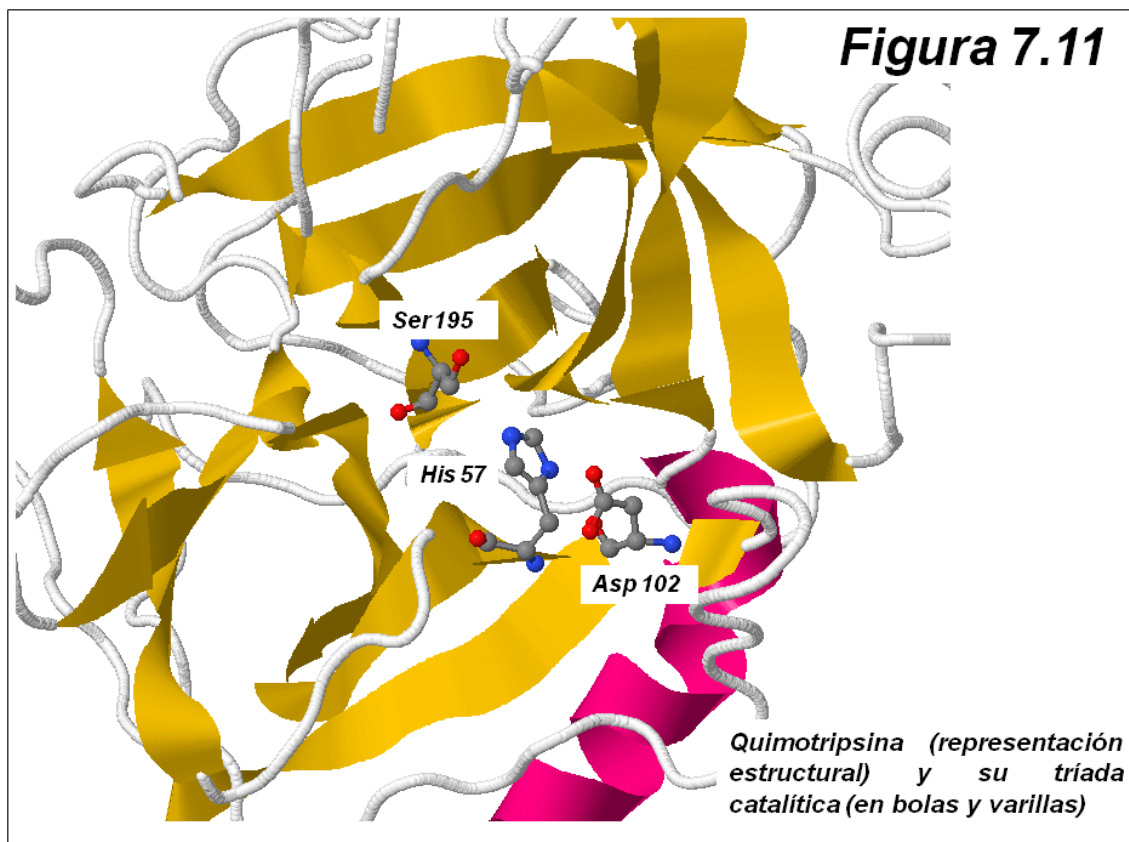
En general, todas las serin-enzimas actúan mediante la formación de un intermediario covalente en el curso del proceso de catálisis. A veces este intermediario es suficientemente estable como para que podamos encontrar condiciones específicas para su aislamiento y caracterización.

El caso mejor estudiado, que ya hemos tenido ocasión de examinar, es el de las serin proteinasas. La acción catalítica en estas enzimas consiste en una sustracción protónica llevada a cabo por la histidina activa y que convierte al -OH serínico en un fuerte nucleófilo que ataca al grupo carbonilo del enlace amida con formación de una *acil-enzima* que puede aislarse fácilmente. Se describe al final de este capítulo el mecanismo detallado de acción de una serinproteína, la quimotripsina.

Los efectos mecanocuánticos son objeto de muy activa investigación en la actualidad.

7.4 Estudio del centro activo de la quimotripsina

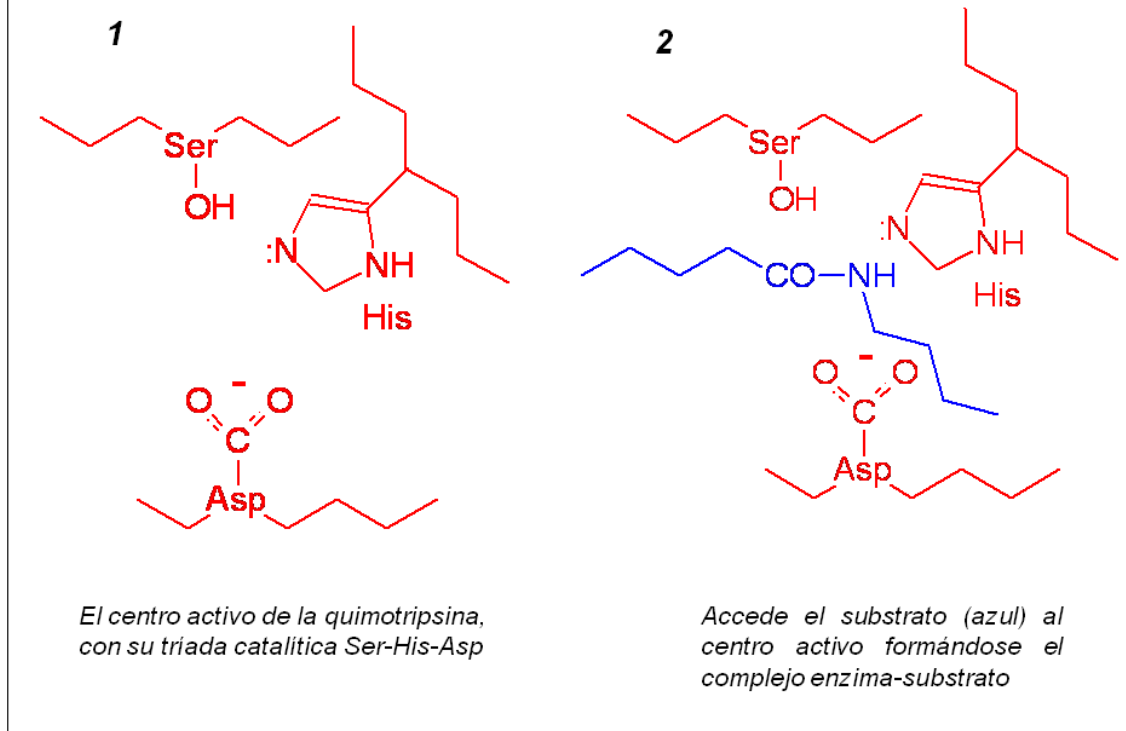
A lo largo de esta discusión hemos podido comprobar que las serin proteinasas son quizá las enzimas cuyo mecanismo conocemos mejor. Para terminar este capítulo, estudiaremos el mecanismo reactivo de la quimotripsina (EC 3.4.21.1), que es el prototipo de las serin proteinasas. Se presenta su estructura en la figura 7.11.



La quimotripsina hidroliza los enlaces peptídicos del interior de una proteína establecidos de la siguiente manera: Tyr-X, Trp-X, Phe-X y Leu-X, siendo X cualquier aminoácido. Es una enzima producida en las células acinares del páncreas en forma de *quimotripsinógeno* (precursor inactivo) y al ser segregada a la luz intestinal se convierte en quimotripsina activa, participando muy activamente en el proceso de digestión de las proteínas.

El centro activo de la quimotripsina está formado por una tríada catalítica serina-histidina-aspartato (figura 7.12, **1**), propio de las serinproteinasas y de muchas otras enzimas. La presencia de esta tríada la hace sensible a inhibidores organofosfóricos, entre otros.

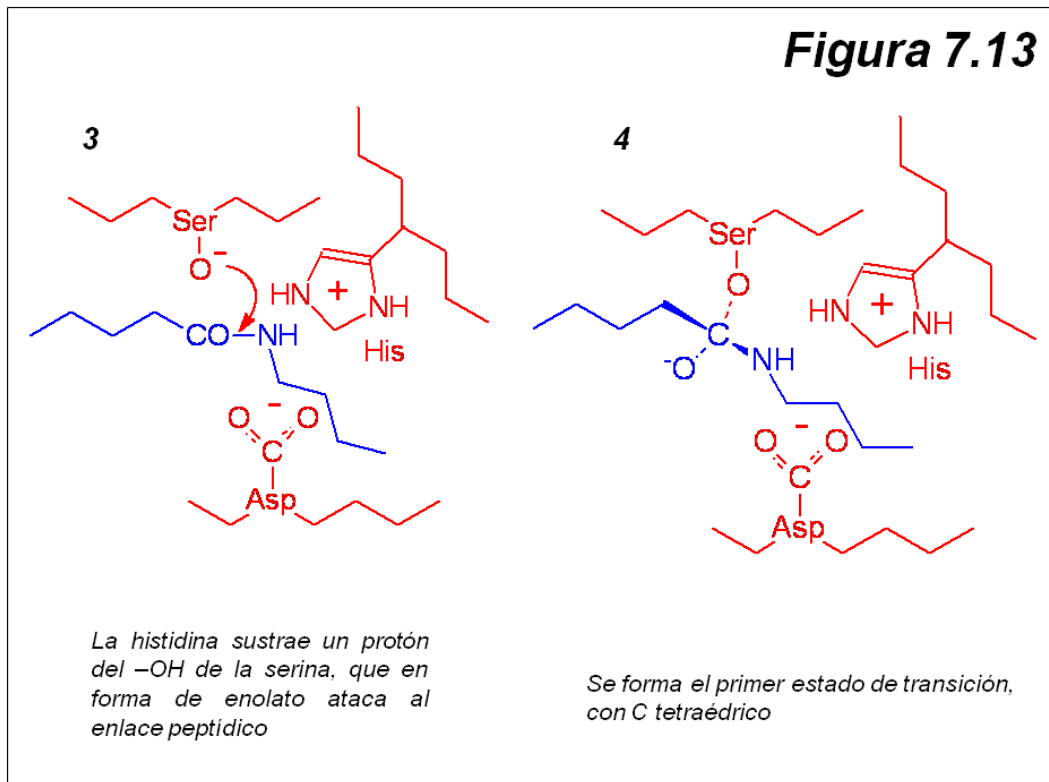
Figura 7.12



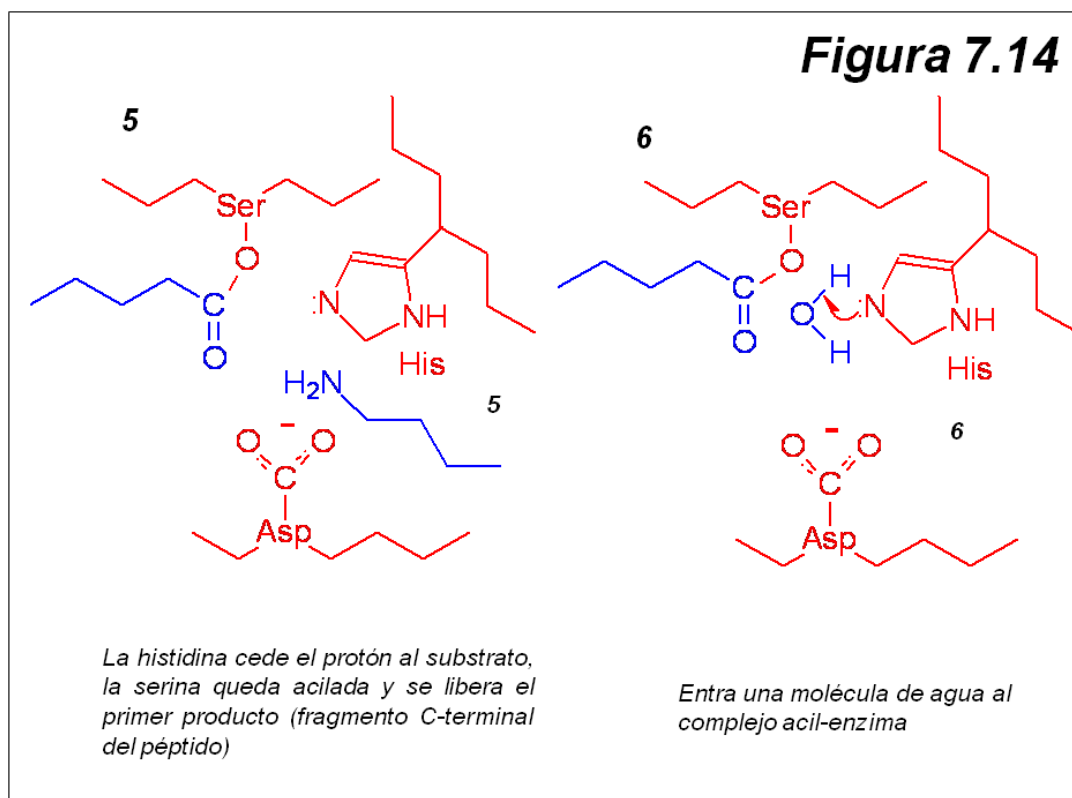
La investigación sobre inhibidores de serin proteinasas es un campo muy activo, dada la importancia que tienen las roturas proteolíticas mediadas por estas enzimas en multitud de procesos celulares y fisiológicos (desde la apoptosis hasta la coagulación de la sangre, pasando por la formación de proteínas de cubierta víricas).

A este centro activo accede el sustrato (figura 7.12, **2**). En el caso de la quimotripsina, se trata del interior de un péptido, fijándose con la especificidad propia de esta enzima (ver más arriba).

La acción catalítica comienza con la sustracción de un protón por parte del par electrónico libre de la histidina activa (figura 7.13, **3**) cuyo grupo imidazol pasa a imidazolio, con carga positiva, y el $-OH$ de la serina se convierte en enolato $-O^-$. El enolato, un nucleófilo potente, ataca al enlace peptídico dando lugar a un primer estado de transición, con el grupo carbonilo $-C=O$ del enlace convertido transitoriamente en un carbono tetraédrico (figura 7.13, **4**). La carga negativa del aspartato estabiliza al grupo imidazolio de la histidina.

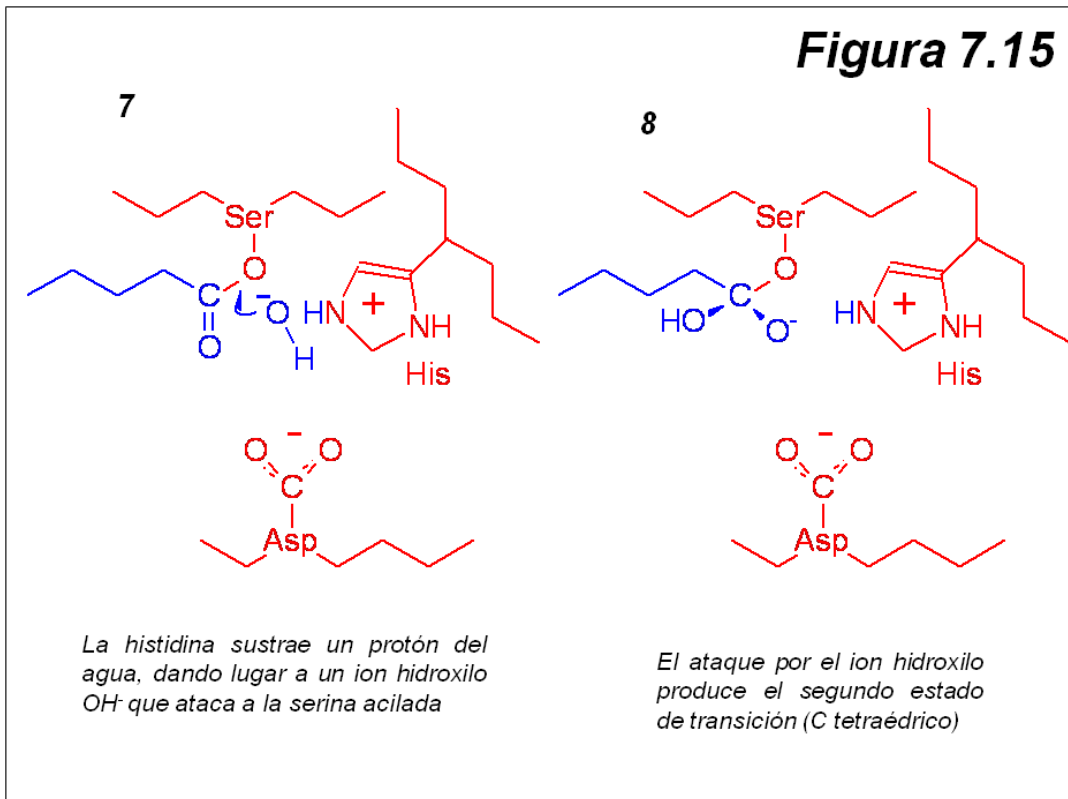


La histidina, a continuación, cede el protón captado previamente al estado de transición, rompiéndose el enlace y liberándose el primer producto (el fragmento C-terminal del péptido atacado), mientras que el fragmento C-terminal queda unido covalentemente a la serina, dando lugar al complejo acil-enzima (figura 7.14, 5).



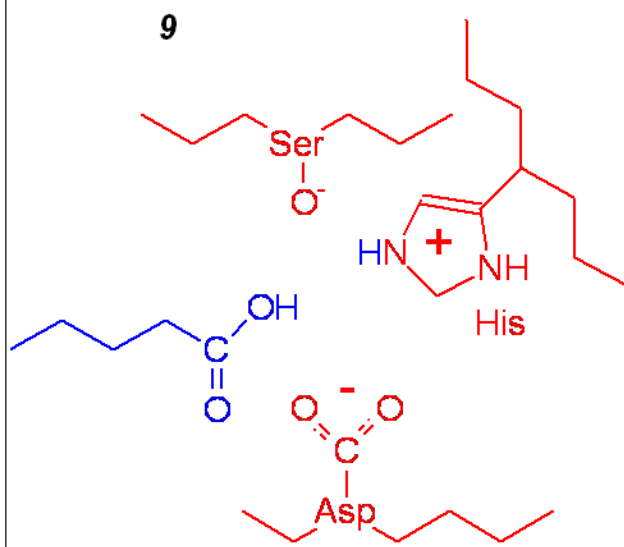
A continuación entra en el centro activo una molécula de agua (figura 7.14, 6) que es

atacada a su vez por el par electrónico de la histidina libre, que sustrae un protón del agua para dar un hidroxilo reactivo (figura 7.15, **7**) y nuevamente un imidazolio, estabilizado por el aspartato. El hidroxilo ataca al enlace acil-enzima. Este ataque produce un segundo estado de transición con carbono tetraédrico (figura 7.15, **8**).

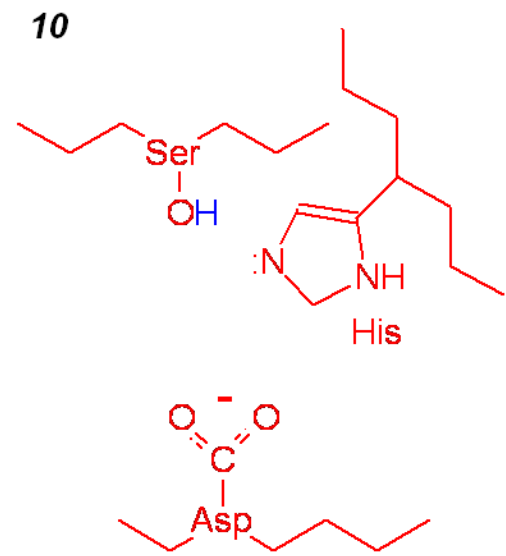


Este estado de transición se resuelve liberándose el segundo producto (figura 7.16, **9**) que es el fragmento N-terminal del péptido. El centro activo vuelve a su estado inicial gracias a la cesión del protón del grupo imidazolio de la histina a la serina (figura 7.16, **10**).

Figura 7.16

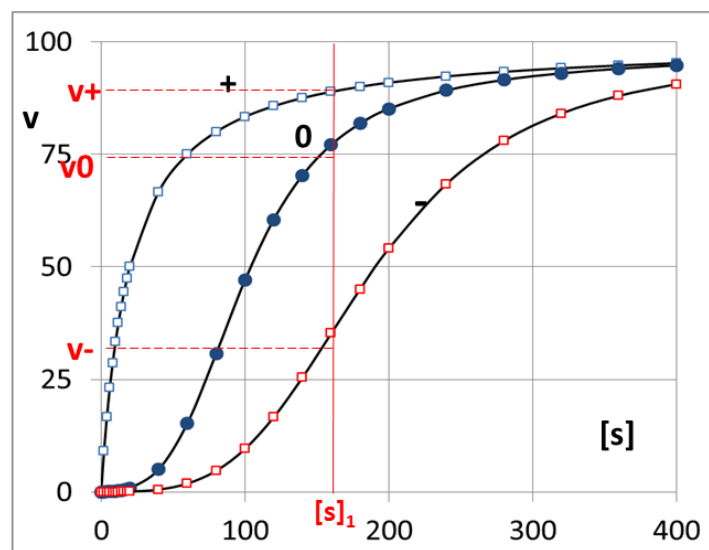


Tras el segundo estado de transición, se libera el segundo producto (fragmento N-terminal del péptido)



La histidina cede el protón a la serina y el centro activo vuelve al estado inicial

CAPITULO 8: Regulación de la actividad enzimática, 1



8.1 Generalidades

Una elemental consideración de las capacidades de los seres vivos nos lleva a admitir sin género de dudas la necesidad de un control de sus funciones, tanto a nivel fisiológico como a nivel celular. El concepto de *homeostasis* de **Cannon**, heredero de la *fixité du milieu intérieur* de **Claude Bernard** lleva implícito la existencia de mecanismos de control que mantengan todas las funciones a un nivel fijo y de referencia. Pero aún hay más: una de las características más notables de los seres vivos es su capacidad de adaptación a circunstancias ambientales cambiantes; y así como determinadas funciones deben mantenerse a su nivel de referencia homeostático, otras deben

necesariamente alterarse en respuesta a un ambiente en cambio y potencialmente hostil. Los varios millares de reacciones metabólicas que pueden tener lugar en un ser vivo no han de estar necesariamente siempre en funcionamiento; es obvio que el escenario ambiental ha de determinar en último término las capacidades metabólicas. No es lo mismo, por ejemplo, un cultivo bacteriano creciendo en un medio mínimo que el mismo cultivo en un medio completo; ni un animal herbívoro paciendo tranquilamente que el mismo animal sometido al ataque de un predador; ni la actividad de una planta iluminada que la misma en la oscuridad. En todos estos casos podemos desentrañar una cadena de acontecimientos fisiológicos que en último término vienen determinados por variaciones en el metabolismo; y como son las enzimas la condición necesaria y suficiente de éste, encontraremos que es precisamente la variación de la actividad y la concentración de enzimas el causante último de todas las adaptaciones fisiológicas. Actividad y concentración enzimáticas, pues, están sometidas a múltiples controles relacionados con la adaptabilidad del ser vivo a su entorno.

8.1.1 Tipos de regulación enzimática

El incremento o disminución de la actividad enzimática puede hacerse de dos maneras distintas, no necesariamente excluyentes entre sí. Por una parte, puede variar la concentración de enzima: estos sistemas de control actuarán, preferentemente, sobre la *biosíntesis o degradación de enzimas*. Pero también existen controles sobre la *actividad intrínseca* de la enzima. A su vez, las variables controladas en este último caso pueden ser la función de fijación del substrato o la de su transformación catalítica, o ambas. En los seres vivos encontramos un amplio repertorio de regulaciones de todos estos tipos.

Podemos intentar una clasificación de los distintos tipos de regulación enzimática de la forma siguiente:

I. Controles sobre la concentración enzimática

(a). Controles sobre la expresión genética

Este tipo de controles se ejerce sobre el aparato de expresión genética de la célula, incrementando o disminuyendo la intensidad de la transcripción del DNA en forma de mRNA en genes y sistemas genéticos específicos.

Las enzimas celulares pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: (a) Enzimas *constitutivas*, que se mantienen siempre al mismo nivel independientemente de las variaciones ambientales. El ejemplo típico de estas enzimas son las de la vía glicolítica. (b) Enzimas *inducibles*, que sólo son producidas en respuesta a estímulos del medio ambiente. A éstas últimas se refiere esencialmente este tipo de control. Por ejemplo, una bacteria puede utilizar varias fuentes de carbono. En un momento dado la bacteria

está creciendo en glucosa y súbitamente se le cambia a un medio con lactosa. Existen sistemas que *inducen* la síntesis de las enzimas implicadas en la degradación de la lactosa. Análogamente, una célula bacteriana creciendo en un medio mínimo debe sintetizar todos los aminoácidos proteicos. Si en un momento dado suplementamos el medio con un determinado aminoácido, por ejemplo, histidina, existen sistemas que *reprimen* la síntesis de enzimas encargadas de la producción de histidina. En los eucariotas existen sistemas de inducción y represión mucho más complejos, pero que ejercen su acción asimismo sobre el aparato de transcripción de la célula. No hay que olvidar que, en este caso, los controles trascienden del ámbito restringido del metabolismo, dando paso a la acción de señales químicas tales como hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc.

(b). Controles sobre la degradación enzimática

Este tipo de controles, mucho peor conocidos que los anteriores, se ejercen acelerando o enlenteciendo el ritmo de degradación proteolítica de las enzimas celulares.

Aquí no vamos a tratar estos tipos de controles, puesto que se suelen estudiar formando parte de la Genética Molecular, ya que están todos ellos íntimamente relacionados con los procesos de expresión genética.

II. Controles sobre la actividad enzimática

Van a ser el objeto principal de estudio en este capítulo y en el siguiente. Este tipo de controles se ejerce sobre la actividad intrínseca de la enzima, e implican por lo general alteraciones conformacionales de la molécula enzimática. Los controles sobre la actividad enzimática pueden a su vez realizarse sobre (a) la función de fijación del sustrato, haciendo variar la K_m aparente hacia el mismo; (b) la función de transformación catalítica del sustrato, lo que lleva a alteraciones en la k_{cat} de la enzima; (c) ambas funciones.

La clasificación de estos controles la hacemos en función del mecanismo molecular de control .

Podemos clasificarlos así:

(a). Control alostérico o alosterismo

Consiste en la regulación de la actividad enzimática a través de cambios conformacionales inducidos en la molécula de enzima por distintos efectores positivos o negativos. No hay en este caso modificación covalente de la enzima. Se trata de un tipo de control de *ajuste fino* de la actividad enzimática, ejercido en el interior de la propia célula. Toma la forma de *retroalimentación negativa*.

(b). Modificación covalente de las enzimas

En muchos casos las enzimas pueden ser modificadas covalentemente por otros sistemas enzimáticos, resultando variaciones en su actividad con significado regulatorio, y que muchas veces son activaciones *on-off*, es decir, *todo o nada*. Se van conociendo cada día más y más modificaciones covalentes de esta naturaleza. Las más generalizadas, aunque ni mucho menos las únicas, consisten en *fosforilación* o *defosforilación* de la proteína enzimática. Las modificaciones covalentes suelen darse en respuesta a señales fisiológicas, y son frecuentes las activaciones "en cascada" de estos sistemas. El cambio en actividad enzimática puede variar en órdenes de magnitud, a diferencia del control alostérico, que induce variaciones relativamente pequeñas en la actividad del sistema.

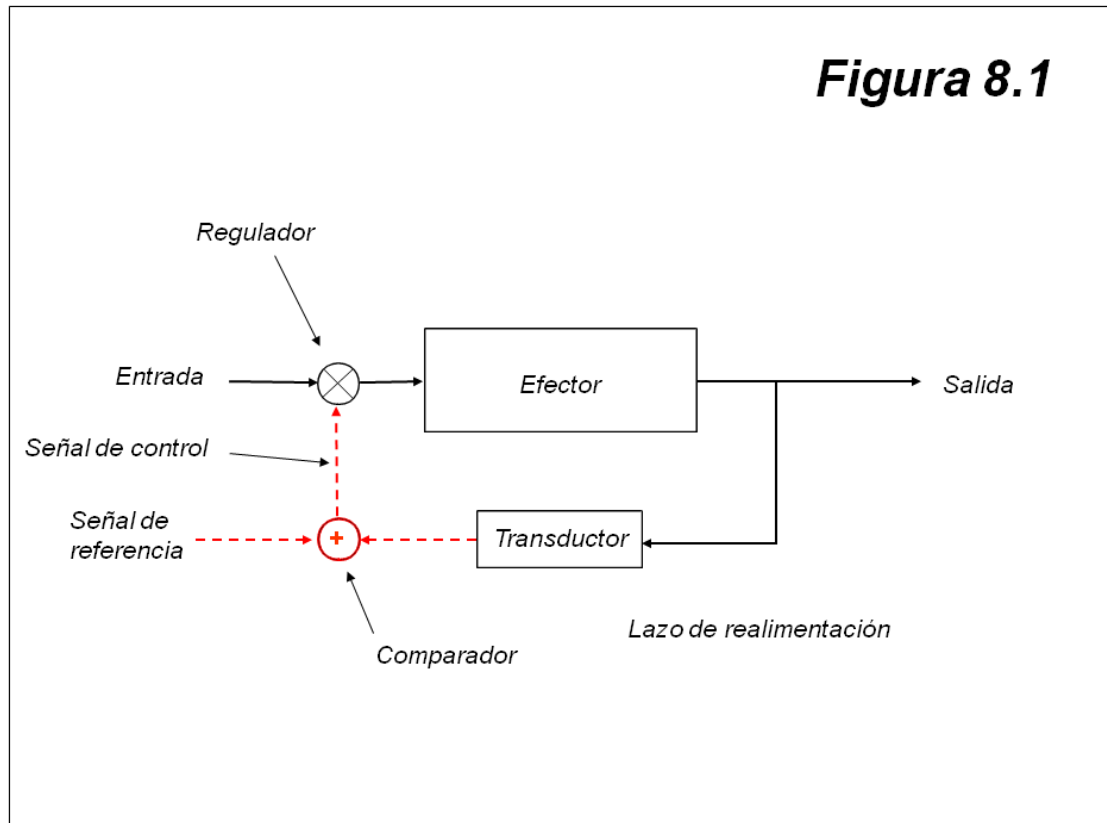
Dentro del control por modificación covalente podemos incluir la *activación por modificación proteolítica*. Algunas enzimas son producidas como *zimógenos*, es decir, precursores inactivos que pueden ser activados por la rotura de un enlace peptídico específico. En estos sistemas es regla la activación o inactivación en cascada, y suelen aparecer en aquellos procesos que en un momento dado deben ponerse en funcionamiento rápida e intensamente, como por ejemplo la coagulación sanguínea.

Estudiaremos en este capítulo la regulación alostérica y en el siguiente la regulación por modificación covalente. Controles que se ejercen todos ellos *sobre la actividad intrínseca de la enzima*.

Antes de pasar a la descripción detallada de los sistemas de control, conviene familiarizarnos con una idea central en este estudio. La ciencia experimental siempre ha tratado de explicar los fenómenos naturales con el mínimo posible de variables y de modelos (principio conocido como *navaja de Occam*). La regulación de la actividad enzimática no ha sido excepción a esta regla y desde siempre se ha tratado de encontrar una explicación unitaria a los fenómenos de regulación. Ya desde ahora debemos saber que estos intentos han sido, hasta el momento, vanos. El panorama que emerge de los estudios actuales sobre regulación enzimática es que hay una gran cantidad de sistemas posibles; no tanto como para llegar a decir que cada enzima tiene su propio y peculiar sistema de regulación, pero sí que podemos constatar una gran variedad entre los mismos. Las grandes ideas que se han vertido con considerable esfuerzo e ingenio sobre el campo de la regulación enzimática, como alosterismo, modificación covalente, cooperatividad, teoría del operon, histéresis enzimática, etc. etc. han resultado ser aspectos parciales del control enzimático. Y en la descripción de los mismos tenemos necesariamente que bajar a los ejemplos concretos. El o los modelos postulados para un determinado sistema de control pierden muchas veces su validez cuando se intentan trasladar a otro. Hay, no obstante, algunos principios generales; pero se trata de principios más cibernéticos que mecánicos, y que son válidos no sólo en el mundo del control enzimático, sino en la teoría de control considerada en abstracto, como hace la Ingeniería. El más general de estos principios es, sin lugar a dudas, el *control por realimentación negativa (negative feedback control)*

8.2 Control por retroalimentación negativa

El mundo tecnológico en el que vivimos es tal gracias al control por retroalimentación negativa (Ingl., *negative feedback*). Con este nombre conocemos sistemas que en abstracto pueden ser descritos mediante el esquema de la figura 8.1.

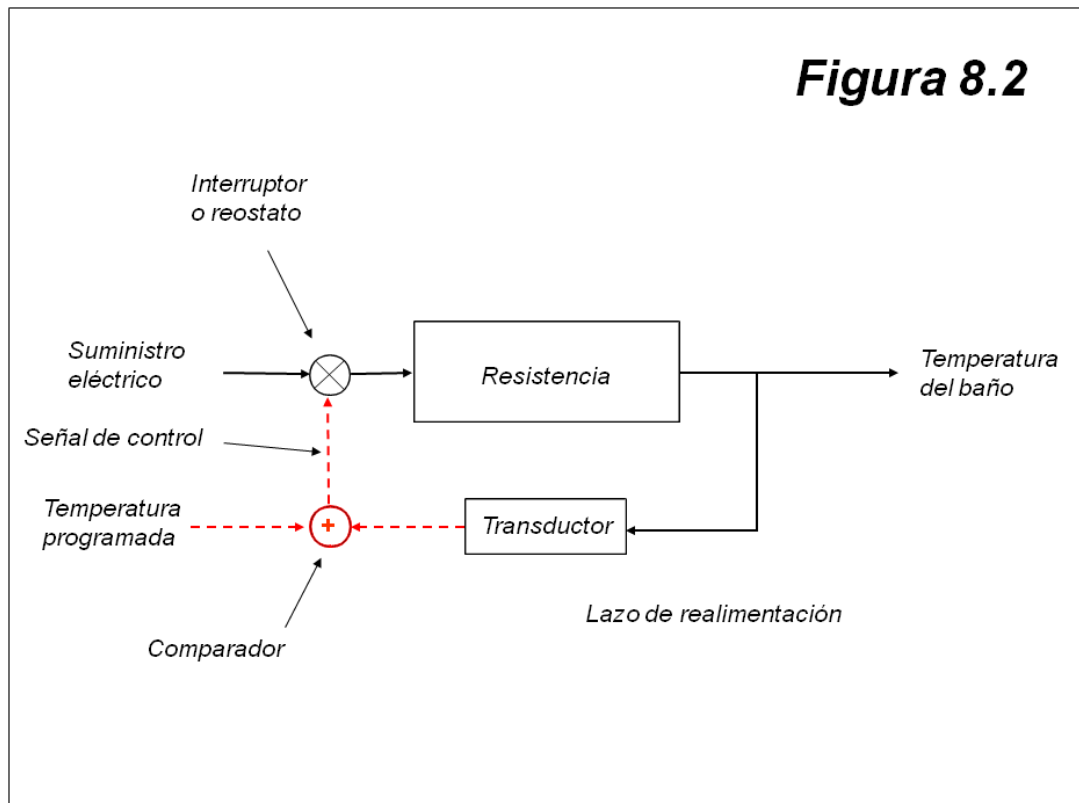


Por ejemplo, la máquina de vapor fue posible cuando James Watt inventó un dispositivo que regulaba la presión del vapor en función de la velocidad de la máquina, y al que dio el nombre de “gobernador” (*governor*). El término “gobernador” o “gobierno” procede de la misma raíz griega (*κυβερνῆτες, kybernetes*, el piloto de una nave) que “Cibernética”, ciencia que estudia el comportamiento de los sistemas de control en abstracto.

En la figura 8.1, vemos que el *efector* o *planta* transforma una *entrada* en una *salida*. Esta salida, a través del *lazo de retroalimentación*, se compara a una *señal de referencia* en el *comparador*. Para ello se requiere que exista un *transductor* que convierta la señal de salida a una magnitud directamente comparable a la señal de referencia. Como resultado de la comparación se envía una señal de control a un regulador que aumenta o disminuye la entrada en respuesta a la señal de control. El trayecto entre la salida y el regulador se conoce como *lazo de retroalimentación* (Ingl., *feedback loop*).

Veamos este mismo esquema con un ejemplo concreto: un baño termostático de laboratorio (figura 8.2).

Figura 8.2



La entrada es el suministro eléctrico. El efector, una resistencia eléctrica que calienta el agua. La salida, la temperatura del agua del baño. La señal de referencia es la propia temperatura. El transductor convierte la temperatura en una señal eléctrica (puede ser, por ejemplo, un par termoeléctrico). El comparador, la señal de control y el regulador, un circuito electrónico que dependiendo de la señal de referencia (el nivel de temperatura previamente programado) corta (mediante un interruptor) o en otros casos modifica (mediante un reostato) la corriente eléctrica que llega a la resistencia.

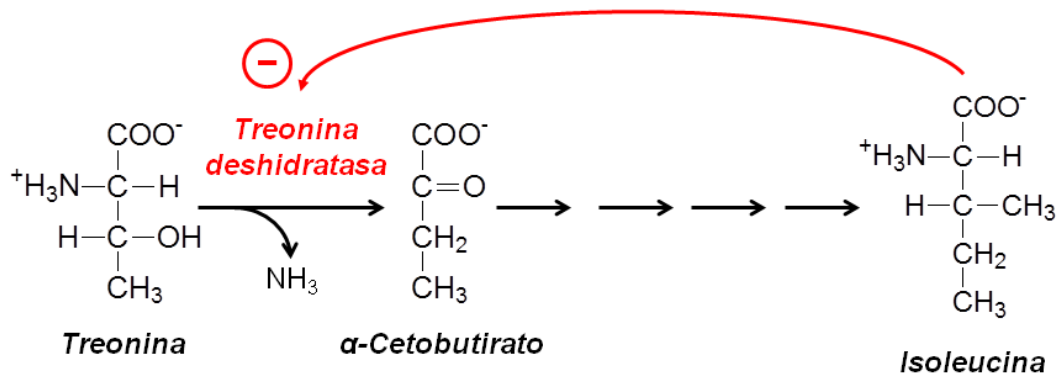
Como veremos, este mismo esquema, con las oportunas modificaciones, puede ser aplicado al control de la actividad enzimática en muchas ocasiones.

8.2.1 Retroalimentación negativa en sistemas enzimáticos

Durante la década de los 50 del siglo pasado se descubrieron diversos sistemas enzimáticos controlados por retroalimentación negativa. **Umbarger**, por una parte, y **Yates y Pardee**, por otra, demostraron la existencia de este tipo de control en cadenas metabólicas.

Un caso bien documentado desde el principio fue la biosíntesis del aminoácido *isoleucina* en bacterias. La isoleucina se produce a través de la vía metabólica que aparece esquematizada en la figura 8.3.

Figura 8.3

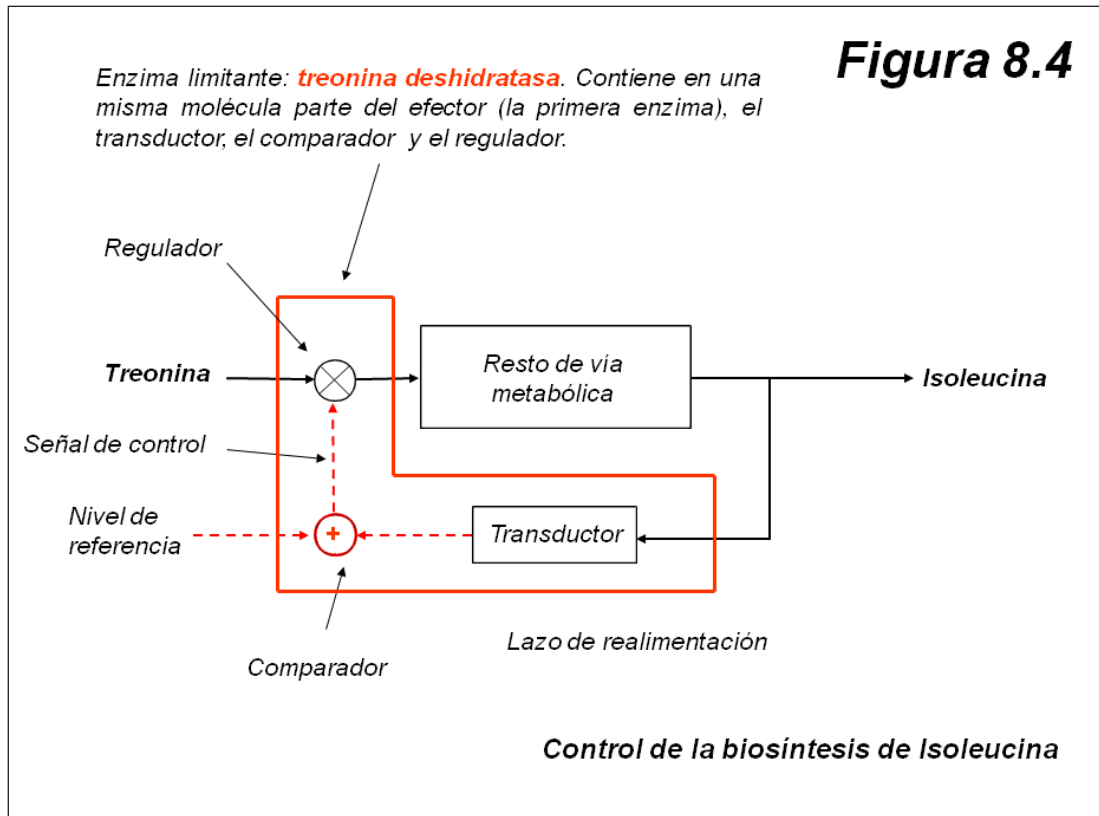


Control de la biosíntesis de isoleucina

Puede observarse que la síntesis de este aminoácido tiene lugar a partir de otro, la *treonina*. La primera enzima de esta transformación es la *treonina deshidratasa* (también llamada *treonina desaminasa*, EC 4.2.1.16) que cataliza la reacción de formación de α -cetobutirato a partir de treonina.

Se observó que esta enzima es fuertemente inhibida por el producto final de la vía metabólica en cuestión, la isoleucina, sin que ningún otro aminoácido se comportara como inhibidor y siendo el fenómeno perfectamente reproducible *in vitro*. El objetivo de esta vía metabólica no es otro que mantener una determinada concentración de isoleucina para que pueda tener lugar la síntesis proteica. Por lo tanto, un aumento en la concentración de isoleucina conduce a la inhibición de la primera enzima de su cadena biosintética; la disminución de la misma retira lógicamente esta inhibición y favorece la síntesis del aminoácido. El control de la síntesis de isoleucina podría describirse como en la figura 8.4 en los mismos términos que hemos señalado en las figuras anteriores.

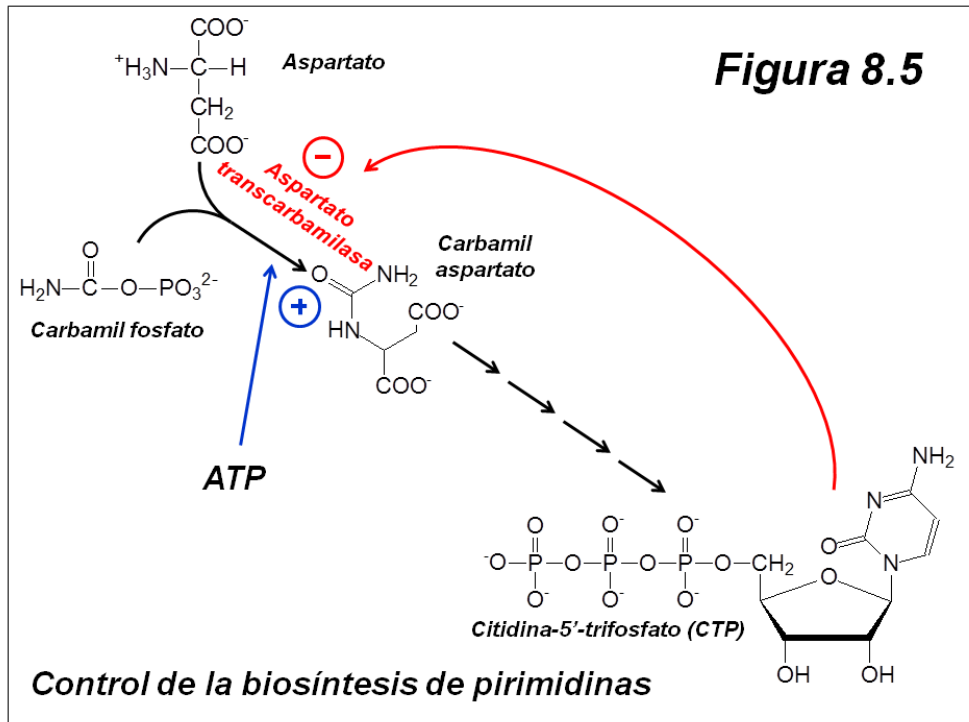
Figura 8.4



Otra de las primeras observaciones de regulación por retroalimentación negativa en vías metabólicas fue la *síntesis de pirimidinas*. Esta vía está sometida a un control similar a través del producto final, el nucleótido *CTP* (*5'-Citidin trifosfato*). En este caso, la primera reacción propia de la biosíntesis de pirimidinas es la unión de carbamilsulfato al aminoácido aspartato para dar lugar a carbamilaspartato, proceso catalizado por la *aspartato transcarbamilasa* (EC 2.1.3.2).

Esta reacción se ve fuertemente inhibida por CTP, nucleótido que bien puede considerarse uno de los productos finales de esta concreta vía metabólica. Nuevamente el nivel de producto final es el determinante último de su biosíntesis (es decir, CTP se comporta como la isoleucina en el caso anterior, inhibiendo su propia biosíntesis). Pero en este caso concreto, hay otro hecho de importancia: el ATP, nucleótido *purínico*, se comporta como un *activador* de esta misma reacción (figura 8.5). El significado fisiológico de este hecho es claro: la síntesis de pirimidinas debe necesariamente estar concertada con la de purinas; en el caso concreto del DNA, conforme a las reglas de Chargaff, la cantidad de purinas debe ser exactamente igual que la de pirimidinas.

Estos descubrimientos fueron los primeros de toda una serie que condujo al establecimiento de ciertas generalizaciones sobre el control enzimático por realimentación, y que veremos seguidamente.



8.2.2 Características generales del control enzimático por retroalimentación negativa

1. En general, la práctica totalidad de las rutas metabólicas están controladas por retroalimentación negativa mediada por el producto final de las mismas. La tabla I muestra algunos ejemplos.

Tabla I

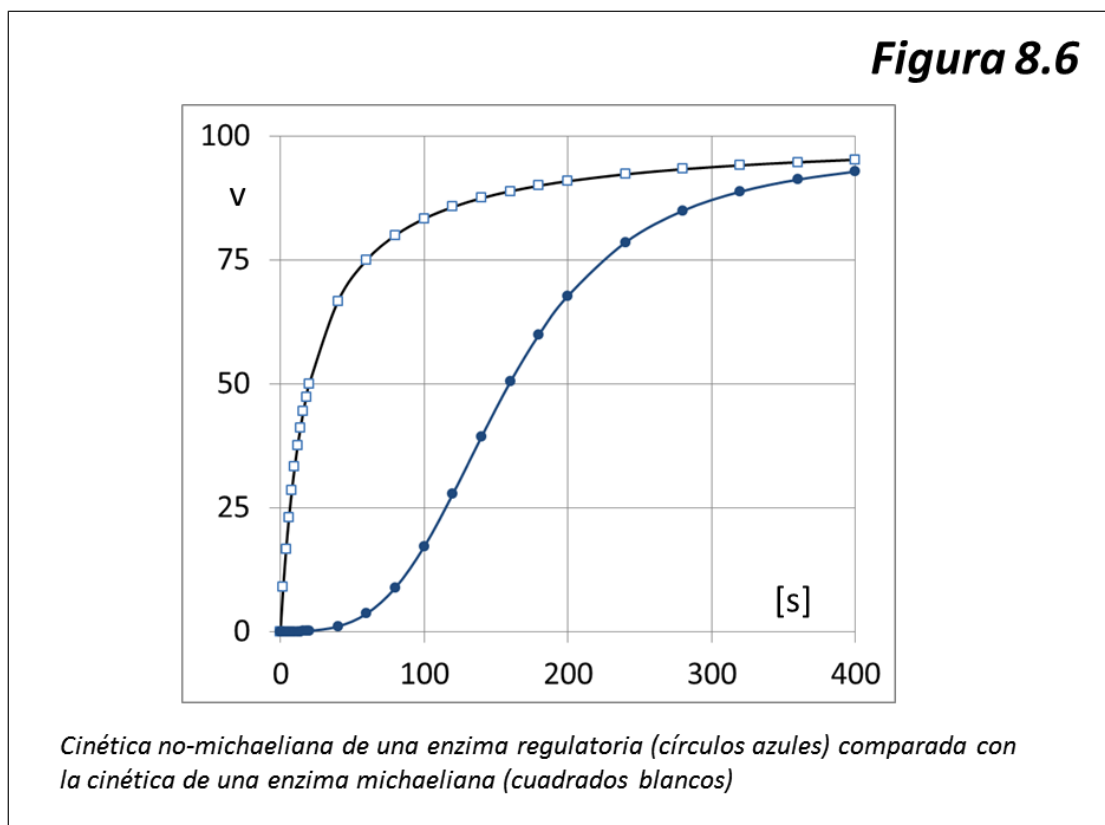
Rutas metabólicas controladas por realimentación negativa

Proceso	Primera enzima	Inhibidor
Glicolisis	Fosfofructokinasa	ATP
Neogluco Génesis	Fructosa bisfosfato fosfatasa	AMP
Biosínt. ácidos grasos	Acetil-CoA carboxilasa	Acil-CoA
Biosínt. colesterol	HMG-CoA reductasa	Colesterol
Biosínt. de isoleucina	Treonina deshidratasa	Isoleucina
Biosínt. de metionina	Homoserina deshidrogenasa	Metionina
Biosínt. de purinas	PRPP sintetasa	AMP, GMP, IMP
AMP	Adenilosuccinato sintetasa	AMP
GMP	IMP deshidrogenasa	GMP
Biosínt. de pirimidinas	Aspartato transcarbamilasa	CTP

2. El control consiste en una inhibición de la *primera enzima* o *enzima limitante* de la vía metabólica, siendo el producto final el inhibidor. Por lo general, las enzimas sometidas a regulación son aquéllas que catalizan pasos limitantes, por lo que el flujo total a través de la vía depende de la velocidad con que funciona dicha enzima.

3. Los tipos de inhibición observados, desde el punto de vista cinético pueden ser competitivos, no competitivos y mixtos, aunque los primeros suelen aparecer con más frecuencia. Por las razones que veremos más adelante, y siguiendo a **Monod, Wyman** y **Changeux**, se prefiere denominar *efectos K* y *efectos V* las inhibiciones de tipo competitivo o no competitivo, respectivamente, en este contexto.

4. En muchos casos, las enzimas sometidas a regulación por retroalimentación negativa exhiben cinéticas no-michaelianas; en muchos casos se trata de cinéticas de tipo *sigmoide*, que sugieren la presencia de *cooperatividad positiva*. En la figura 8.6 puede apreciarse la dependencia sigmoide (círculos azules) de la velocidad de reacción respecto a la concentración de sustrato que aparece en algunas enzimas regulatorias. Compárese con la dependencia hiperbólica de una enzima michaeliana (cuadrados blancos). Ambas curvas son comparables, asimismo, con la saturación de oxígeno en la hemoglobina y en la mioglobina.



5. Al lado de la inhibición por el producto final aparecen asimismo fenómenos de *activación* mediados por otros metabolitos. Por ejemplo, el ATP activa a la aspartato transcarbamilasa (biosíntesis de pirimidinas), o el AMP que activa a la fosfofructokinasa (glicolisis).

La dificultad estriba, a veces, en discernir qué es lo que se entiende por *producto final* de una vía metabólica. Por ejemplo, tal y como estudiamos sistemáticamente la glucólisis en un curso de Bioquímica General, consideramos a la glucosa como producto de partida y al lactato como producto final. Pero no es el lactato el inhibidor fisiológico de la glucólisis, sino el ATP. Aquí la interpretación es obvia; la glucólisis es una vía metabólica productora de energía, en la que el lactato es un producto de desecho; y por lo tanto, es la energía libre utilizable, en forma de ATP, lo que es el verdadero producto final de la glucólisis. En otros casos, sin embargo, el reparto de papeles regulatorios no es tan claro.

Algo parecido ocurre con el concepto de "primera enzima" de una vía metabólica. En el caso de la biosíntesis de isoleucina, la treonina desaminasa abre una ruta que por lo que sabemos está únicamente comprometida en la síntesis de isoleucina. Sin embargo, en otros casos no está tan claro este concepto. En el ya mencionado de la glucólisis, la "primera enzima" tal y como la estudiamos, sería la *hexokinasa*; sin embargo, la enzima regulada por el producto final es la *fosfofructokinasa*. Lo que ocurre es que esta última enzima cataliza el primer paso que de verdad compromete al sustrato a su degradación; los intermediarios anteriores pueden ser origen de otros destinos metabólicos, como por ejemplo, las interconversiones de hexosas. Por ello hay quien prefiere hablar de "punto de ramificación metabólica" en lugar de "primera enzima".

En resumen, muchas vías metabólicas están reguladas por su producto final, que se comporta como inhibidor de una enzima de la misma que por lo general tiene un papel limitante en el flujo a su través, y que muchas veces puede fácilmente etiquetarse como "primera enzima" o como "primer paso comprometido" o como "enzima limitante". A continuación trataremos de estudiar los mecanismos moleculares que determinan estos fenómenos. El mecanismo mejor estudiado y más generalizado en este contexto es el *alosterismo*.

8.3 Alosterismo

8.3.1 Definición

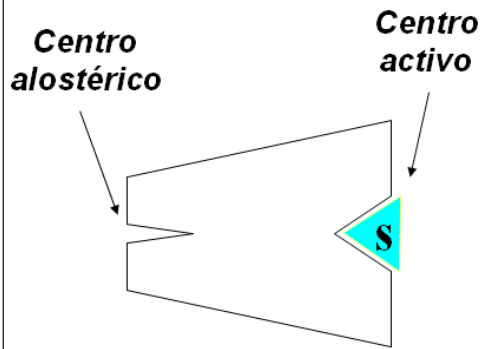
En 1959, **Jacob, Monod** y **Changeux** elaboraron una teoría sobre la regulación enzimática que pretendía explicar con un modelo unitario el tipo de regulación enzimática visto en el apartado anterior. En muchos de los casos estudiados el comportamiento del inhibidor se traducía en un aumento aparente de la K_m . Sin embargo, estos autores constataron que no podía hablarse de inhibición *competitiva* dado que el inhibidor, en muchos casos, no era análogo estructural del sustrato. Tal es el caso, por ejemplo, de la inhibición ejercida por la isoleucina sobre la treonina desaminasa. Estos dos compuestos (treonina e isoleucina) tienen en común el grupo

α -aminoácido, pero este grupo no era obviamente el responsable de la inhibición puesto que ningún otro α -aminoácido producía este efecto; y por lo demás, las cadenas laterales son estructuralmente muy distintas. Aún más acentuada era esta disimilitud en el caso de la aspartato transcarbamilasa; el inhibidor, CTP, se comportaba como competidor del sustrato normal aspartato. Este hecho llevó a la idea de que los efectores negativos (inhibidores), así como los efectores positivos (activadores), se fijaban a un lugar de la molécula enzimática distinta del centro activo, en contraste con los inhibidores competitivos clásicos. Por ello, preferían hablar de un *efecto K* en lugar de una *competición*.

Surgió así el concepto de *efectores alostéricos*, palabra esta última derivada de raíces griegas que dan a entender un significado de "distinto relieve, distinta geometría" en contraposición a los inhibidores convencionales, que al actuar sobre el propio centro activo, serían *efectores isostéricos*. Los efectores alostéricos se fijan, según esta teoría, a un *centro alostérico* distinto del centro activo. Las enzimas sometidas a este tipo de control serían *enzimas alostéricas*, y el conjunto de todos estos fenómenos, *alosterismo*. En resumen, la teoría del alosterismo podría ser expresada así:

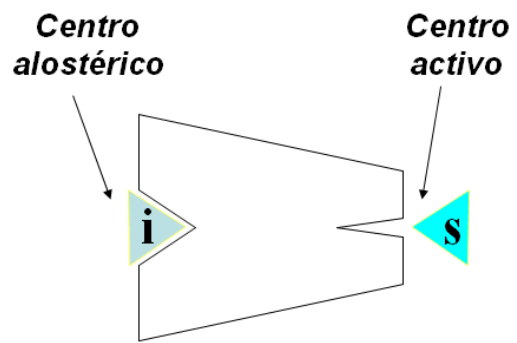
1. Las enzimas sometidas a regulación por producto final poseen dos tipos de sitios para la fijación de sustratos y efectores: el *centro activo*, lugar de la fijación normal de sustratos y efectores isostéricos, y un *centro alostérico* responsable de la fijación de efectores reguladores, como la isoleucina en el caso de la treonina deshidratasa y el CTP en el de la aspartato transcarbamilasa.
2. La fijación del efector alostérico a su correspondiente centro induce un cambio conformacional en la proteína enzimática de tal modo que altera la fijación del sustrato al centro activo, bien sea dificultándola (en el caso de inhibidores) o facilitándola (en el de los activadores). Este efecto se presenta esquemáticamente en la figura 8.7 (inhibición) y en la figura 8.8 (activación).

Inhibición alostérica



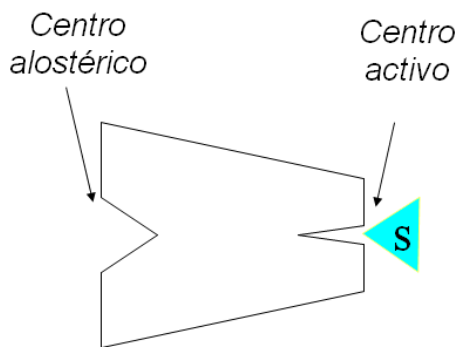
En ausencia de inhibidor, el sustrato se fija normalmente al centro activo

Figura 8.7



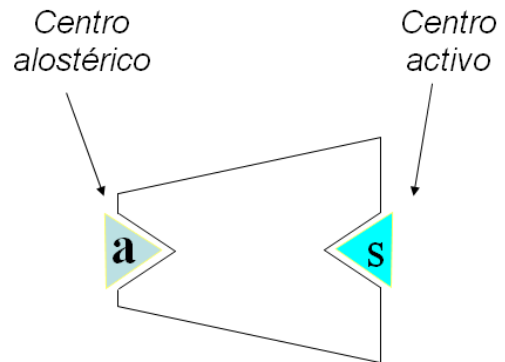
Cuando el inhibidor ocupa el centro alostérico, tiene lugar un cambio conformacional en el centro activo que impide la fijación del sustrato

Activación alostérica



En ausencia de activador, el sustrato no puede fijarse al centro activo

Figura 8.8



Cuando el activador ocupa el centro alostérico, tiene lugar un cambio conformacional en el centro activo que permite la fijación del sustrato

3. Aun cuando la teoría fue postulada sobre el comportamiento "competitivo" de algunos inhibidores alostéricos (es decir, de la presencia de *efectos K*), los autores no excluían la posibilidad de *efectos V*, esto es, que la fijación al centro alostérico y el

cambio conformacional subsiguiente de la proteína enzimática diera lugar a un cambio en la eficiencia catalítica de la enzima, que se traduciría en un efecto "no competitivo" (disminución de la V_{max} aparente) o "mixto" (alteración simultánea de K_m y V_{max}).

8.3.2 Pruebas experimentales

A favor de la teoría del alosterismo estaban los siguientes datos experimentales:

1. Las enzimas alostéricas pueden mediante manipulaciones experimentales "insensibilizarse" a la acción de los efectores sin perder su actividad catalítica. Esto indica que sustrato y efectores alostéricos se fijan a sitios distintos de la enzima.
2. Pueden obtenerse formas mutantes de la enzima en las que se conserva intacta la actividad catalítica de la misma y sin embargo se atenúa o desaparece la sensibilidad a efectores.
3. Las enzimas alostéricas son por lo general difíciles de purificar; en el curso de las maniobras de purificación es bastante frecuente que se pierda la sensibilidad a efectores mientras que la actividad catalítica permanece intacta.
4. Por estudios directos de fijación se ha comprobado en muchos casos que sustrato y efectores se fijan a zonas diferentes de la proteína enzimática. En el caso de la aspartato transcarbamilasa, la fijación de los efectores tiene lugar incluso sobre una subunidad de la enzima distinta de la que porta el centro activo catalítico.
5. En ocasiones, el efector protege a la actividad catalítica frente a la acción de agentes desnaturizantes, indicando este hecho la acción del efector sobre la estructura de la proteína enzimática.

El modelo alostérico así propuesto ha resultado ser una idea muy fecunda en el campo de la regulación de la actividad enzimática y sus extensiones naturales a la regulación de las interacciones proteína-ligando en general. No han tenido la misma suerte los distintos modelos que se han propuesto para explicar el comportamiento alostérico. Ahora bien, la idea de efectores fijándose a un lugar distinto del centro activo e induciendo con ello cambios conformacionales en la proteína enzimática que resultan en variaciones de su actividad sigue siendo un modelo plenamente aceptado por la Enzimología actual.

8.3.3 Alosterismo y cooperatividad

8.3.3.1 Concepto de cooperatividad

Muchas enzimas sometidas a control alostérico presentan *cinéticas no michaelianas* cuando representamos la curva de velocidad en función de la concentración de sustrato. En particular algunos sistemas alostéricos presentan una cinética *sigmoide* (figura 8.6), que traduce la existencia de un fenómeno de *cooperatividad* en la fijación de sustrato. No es ésta la única ocasión en que aparecen cinéticas sigmoides en la Bioquímica. Recordemos, a este respecto, la desnaturalización de proteínas y del DNA; y en un contexto que como veremos está muy próximo al que estamos discutiendo, la fijación de oxígeno a la hemoglobina. En todos estos casos se trata de fenómenos cooperativos. La cooperatividad en la desnaturalización de macromoléculas consiste en que la rotura de una interacción débil que mantiene la estructura de la misma favorece o facilita la rotura de la siguiente, y así de forma sucesiva hasta que llegamos a la rotura de todas las interacciones débiles que conforman la estructura de orden superior.

Cuando hablamos de cooperatividad en la cinética enzimática, nos referimos a que la fijación de una molécula de sustrato al centro activo favorece la fijación de otra molécula del mismo a otro centro activo, lo que facilita aún más la fijación siguiente, y así hasta que la molécula enzimática llega a estar plenamente saturada. En el caso de la hemoglobina, la fijación de oxígeno a uno de los cuatro grupos hemo de la molécula favorece la fijación al siguiente, y así hasta que la molécula presenta sus cuatro sitios ocupados. En otras palabras, la K_m varía en función de las moléculas de sustrato fijadas por la enzima.

La cooperatividad así descrita corresponde a lo que recibe el nombre de *cooperatividad positiva*, es decir, aquélla en la que una fijación favorece a la siguiente. Puede darse el caso (y de hecho se da en algunos sistemas) de *cooperatividad negativa*, en la que la fijación de una molécula de ligando dificulta la fijación del siguiente. En la presente discusión trataremos únicamente de la cooperatividad positiva.

8.3.3.2 Implicaciones estructurales de la existencia de cooperatividad

Tal como lo hemos descrito, el fenómeno de cooperatividad implica, desde el punto de vista molecular, lo siguiente:

1. Que en la misma molécula hay más de un sitio de fijación de sustrato.
2. Que la afinidad de la enzima por el sustrato no puede ser descrita por una simple constante como la K_m en las condiciones de Michaelis-Menten, sino que en todo caso habría que describir tantas constantes como sitios de fijación haya en la molécula; en el caso de la hemoglobina, cuatro.

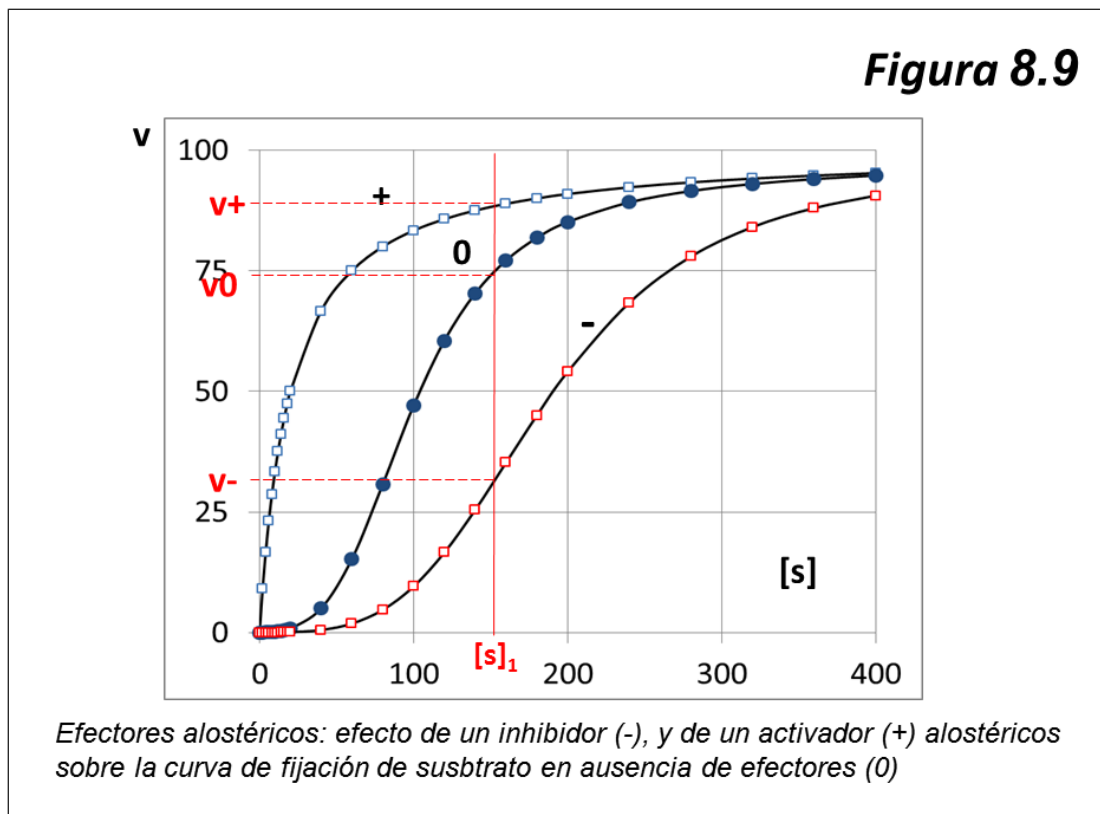
3. Que necesariamente tiene que haber un mecanismo de interacción entre sitios de manera que la fijación a uno de ellos repercuta en la fijación a otro; excluidas las acciones a distancia, hemos de pensar en enzimas con múltiples sitios para el sustrato; y por lo tanto, en enzimas con estructura cuaternaria, es decir, compuestas por varias subunidades.

8.3.3.3 Efectores positivos y negativos y cooperatividad

En los sistemas alostéricos en los que la fijación del sustrato es cooperativa se ha podido constatar que la acción de los efectores (positivos o negativos) consiste en *alterar el grado de cooperatividad en la fijación de sustrato*. Así, tenemos:

- Los *efectores negativos*, o *inhibidores*, **añentan** el grado de cooperatividad en la fijación.

- Los *efectores positivos*, o *activadores*, **disminuyen** dicho grado de cooperatividad, de tal manera que en algunos casos la presencia de un activador a concentraciones saturantes del mismo "normaliza" el comportamiento de la enzima haciéndola plenamente michaeliana (figura 8.9).



En esta figura se ilustran los efectos de inhibidores y activadores alostéricos sobre la dependencia de la velocidad respecto a la concentración de sustrato. La ausencia de efectores (0) muestra la cooperatividad positiva en la fijación de sustrato. La presencia de inhibidor (-) acentúa el carácter sigmoide de la curva. La acción del

activador (+) hace desaparecer este carácter sigmoide, haciendo que la enzima se comporte como michaeliana. Para una misma concentración de sustrato S , la enzima presenta velocidades distintas v_+ , v_0 y v_- según esté en presencia de activador, en ausencia de efectores o en presencia de inhibidor, respectivamente.

De esta manera, a sugerencia de **Monod, Wyman y Changeux**, se distinguen en las enzimas alostéricas con comportamiento cooperativo dos tipos de efectos:

- *Efectos homotrópicos*, que aluden a la influencia que un ligando (sustrato o efector) tiene sobre la fijación *de sí mismo*, y que en el caso del sustrato se traduce en cinéticas sigmoides (caso de cooperatividad positiva).

- *Efectos heterotrópicos*, que son los ejercidos por los distintos ligandos sobre la fijación *de otros* ligandos, y que se traduce en incrementos (inhibidores) o disminuciones (activadores) de la cooperatividad del sistema.

Esta distinción es útil cuando se constata en muchos casos que la fijación es cooperativa no sólo en el caso del sustrato, sino también de los efectores.

8.3.3.4 Modelo alostérico restringido

Teniendo en cuenta los efectos cooperativos en la fijación de ligandos a las enzimas alostéricas, el modelo alostérico restringido (a diferencia del generalizado que se presentó más arriba) queda establecido así:

1. Las enzimas sometidas a regulación alostérica tienen no sólo un centro activo, sino que disponen de otros tantos sitios para la fijación de efectores (centros alostéricos).

2. La fijación de un efector a su centro alostérico altera la conformación tridimensional de la enzima, y por tanto, de su centro activo, facilitando (en el caso de los activadores) o dificultando (en el caso de los inhibidores) la fijación del sustrato al mismo.

3. La fijación de ligandos (sustrato o efectores) a sus sitios respectivos es cooperativa. La fijación cooperativa del sustrato se traduce en cinéticas sigmoides.

4. La cooperatividad en la fijación requiere necesariamente la interacción entre sitios, y por ello, las enzimas alostéricas deben tener más de un centro activo (en el caso de sustrato) y más de un centro alostérico (para cada uno de los efectores). Lo más probable es pensar que todas las enzimas alostéricas poseen subunidades, es decir, tienen estructura cuaternaria. A su vez, esto explica:

- El fenómeno de *desensibilización* que veíamos antes; es obvio que la pérdida de la estructura cuaternaria destruiría las interacciones entre sitios, y por tanto, la cooperatividad en la fijación de ligandos.

- La *dificultad de purificación* de las enzimas alostéricas; al tener estructura cuaternaria, esta puede fácilmente destruirse con las manipulaciones experimentales de la purificación; así el enzima quedaría desensibilizado a los efectores.

5. La acción de los efectores consiste en modificaciones de la cooperatividad en la fijación del sustrato. Los inhibidores alostéricos aumentan este grado de cooperatividad; los activadores alostéricos lo disminuyen; en algunos casos la presencia de activador a concentración alta puede llegar a hacer michaeliana la cinética de fijación del sustrato.

Aunque el modelo así propuesto es bastante restrictivo (excluye la posibilidad de efectos V y no habla para nada de la cooperatividad negativa); y que por otra parte hoy sabemos que no todas las enzimas regulatorias se comportan de esta manera, explica bastante satisfactoriamente el comportamiento de muchas enzimas o sistemas de fijación de ligandos.

8.3.4 Interpretación cuantitativa del alosterismo

Es obvio que toda teoría que trate de dar una interpretación mecánica de los fenómenos alostéricos, en el sentido restringido discutido hasta aquí, debe explicar, por una parte, los fenómenos comunes a todas las enzimas (cinéticas saturantes y efectos isostéricos) al tiempo que por otra parte ha de dar cuenta asimismo de la fenomenología específica de aquéllos (cooperatividad, cinética sigmoide, efectos homotrópicos y heterotrópicos, etc.). Se han propuesto muchos modelos para la explicación del alosterismo; pero el único que ha ofrecido hasta ahora concordancia con los datos experimentales es el que se expone resumidamente a continuación.

8.3.4.1 El modelo de Monod, Wyman y Changeux

El modelo propuesto por estos autores, pretende explicar globalmente el comportamiento de los sistemas alostéricos según las siguientes suposiciones:

1. Las proteínas con comportamiento alostérico son *oligómeros* formados por varios *protómeros*, y existiendo en la estructura cuaternaria resultante al menos un elemento de simetría. La palabra *protómero* alude no estrictamente a subunidad, sino al menor elemento de la estructura que puede fijar sustrato y efectores (nótese que un protómero puede constar de varias subunidades, aunque no necesariamente).

2. El sistema puede estar en dos estados diferentes, llamados **R** (de *relajado*) y **T** (de *tenso*). Entre la proteína en forma **R** y la proteína en forma **T** se establece un equilibrio cuya constante es **L**, definida de esta forma (ec.[1]):

[1]

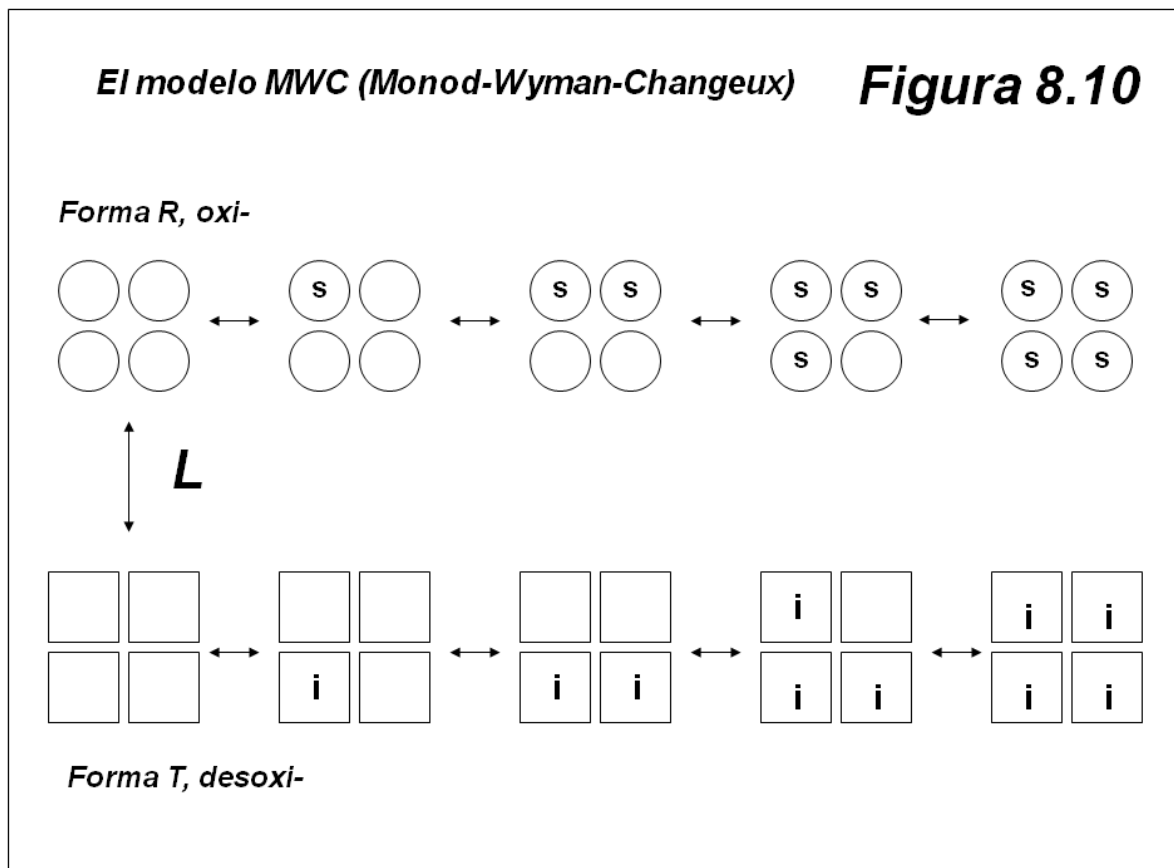
$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

Siendo R_0 y T_0 las concentraciones de enzima en formas R y T , respectivamente, en ausencia de ligandos.

3. Los elementos de simetría que hay en la molécula se conservan en las transiciones entre R y T . La transición es concertada, es decir, *todo o nada*, no existiendo estados intermedios.

4. El substrato y los efectores positivos o activadores tienen afinidad preferente por el estado R , mientras que los efectores negativos o inhibidores tienen afinidad preferente por T . Puede darse el caso de afinidades no sólo preferentes, sino exclusivas.

5. La acción de substratos y efectores tiene lugar a través de los desplazamientos del equilibrio a que dan lugar por su afinidad preferente o exclusiva por los diferentes estados de la proteína. De esta manera, la presencia de substrato o activador hace que el equilibrio se desplace hacia el estado R , mientras que el inhibidor lo desplaza hacia T , según se indica en la figura 8.10. En ella la proteína en forma R se representa mediante círculos; la forma T , como cuadrados. El substrato (s) tiene solamente afinidad por la forma R ; el inhibidor (i) por la forma T .



A partir de estas premisas, llegan a una expresión para la función de saturación \bar{y}

(cociente [sitios ocupados]/[sitios totales]) que es la siguiente (ec. [2]):

[2]

$$\bar{y} = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{L + (1 + \alpha)^n}$$

En la que L es la constante de equilibrio entre los estados R y T que vimos arriba; α es la concentración normalizada de sustrato $[s/K_R]$ (esto es, expresada en unidades de su constante de disociación K_R) y n , el número de protómeros del sistema. Esta ecuación es una forma simplificada en la que suponemos que el sustrato sólo tiene afinidad por el estado R .

Para los efectos heterotrópicos, la constante alostérica L quedaría alterada, en caso de fijación exclusiva, dando lugar a una constante L' cuyo valor sería (ec. [3]):

[3]

$$L' = L \frac{(1 + \beta)^n}{(1 + \gamma)^n}$$

En la que β representa la concentración normalizada de inhibidor, $[i/K_I]$ y γ la concentración normalizada de activador $[a/K_A]$.

De las características del modelo se deduce que el comportamiento del sistema será tanto más cooperativo cuanto mayor sea el valor de la constante alostérica L , lo que indicaría que en ausencia de sustrato y efectores, prácticamente todo el sistema está en forma T . Al calcular los valores de estas constantes para la aspartato transcarbamilasa y la hemoglobina se ha encontrado un acuerdo prácticamente perfecto con los datos experimentales. A continuación veremos con cierto detalle la aplicación del modelo a estos sistemas.

8.3.5 La aspartato transcarbamilasa

La aspartato transcarbamilasa (ATCasa) cataliza el primer paso comprometido de la biosíntesis de pirimidinas (figura 8.5) y el sistema mejor estudiado hasta el momento es el de la enzima de *Escherichia coli*, gracias a los estudios de **Lipscomb** y colaboradores. Como ya vimos más arriba, está sometida a una regulación por retroalimentación negativa mediada por los productos finales de la vía metabólica (UTP y CTP) y otra positiva por ATP, término de la biosíntesis de purinas.

8.3.5.1 Comportamiento alostérico de la aspartato transcarbamilasa

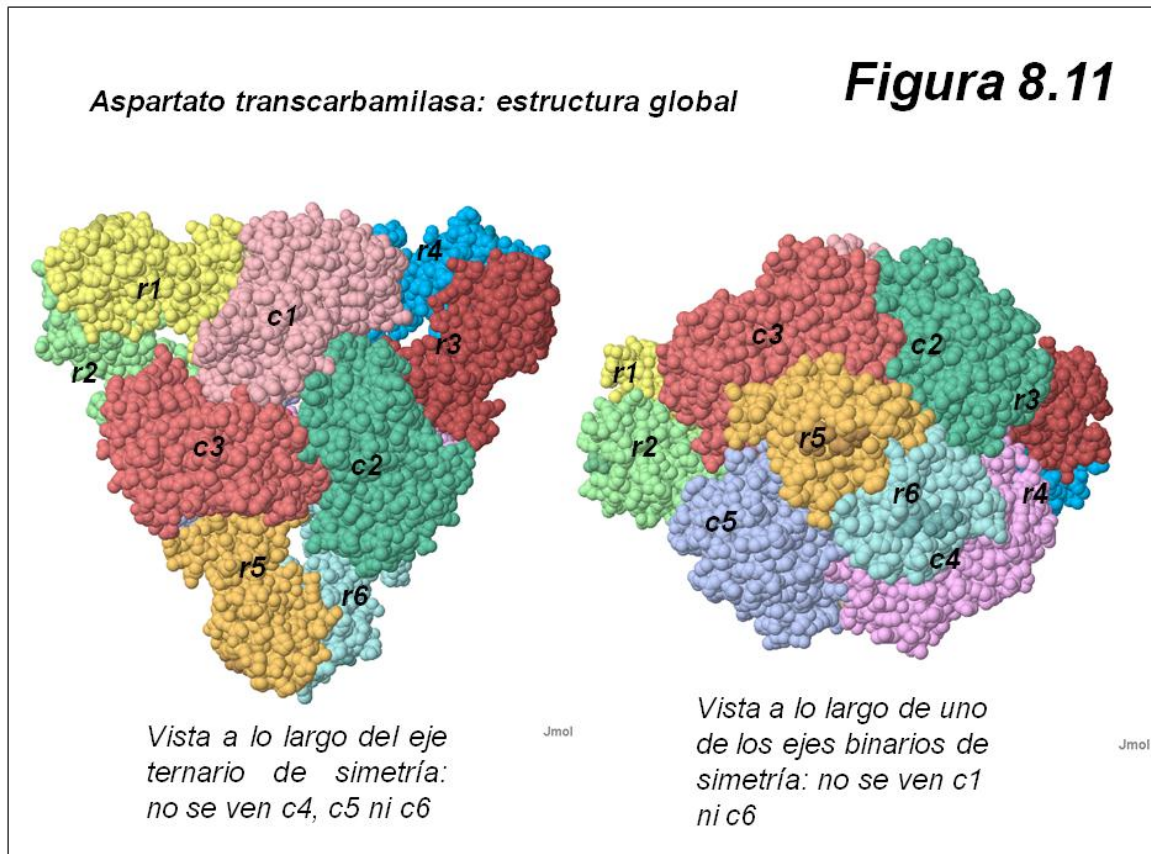
En términos del modelo alostérico restringido antes citado, tenemos para esta enzima los siguientes datos:

1. La enzima muestra una curva sigmoide de saturación para ambos substratos, carbamilsulfato y aspartato, por lo que en los términos definidos más arriba, se trata de un sistema con cooperatividad homotrópica positiva.
2. Por estudios de fijación y por estudios estructurales de la enzima, se sabe que los substratos y los efectores se fijan a sitios distintos. Tiene, pues, centro activo y centros alostéricos.
3. La enzima es asimismo afectada heterotrópicamente por CTP y UTP (productos finales de la biosíntesis de pirimidinas), por una parte, y ATP, producto final de la biosíntesis de purinas. Los nucleótidos pirimidínicos producen una disminución de la velocidad, mientras que el ATP lleva a un aumento de la misma.

8.3.5.2 Adecuación de la aspartato transcarbamilasa al modelo MWC

Gracias a los estudios citados de **Lipscomb** y colaboradores conocemos la estructura de esta enzima a alta resolución mediante cristalografía de rayos X.

1. La holoenzima de la ATCasa tiene un peso molecular de 310 kDa y está compuesta por doce subunidades, 6 catalíticas iguales entre sí (c) y 6 regulatorias también iguales entre sí (r). Las catalíticas se disponen formando dos trímeros ($2c_3$) y las regulatorias forman tres dímeros ($3r_2$), de manera que la estructura cuaternaria puede ser representada como ($3r_2 + 2c_3$). La estructura tridimensional de la enzima se presenta en la figura 8.11 (enzima completa); la estructura global presenta un eje ternario de simetría y tres ejes binarios perpendiculares al ternario.

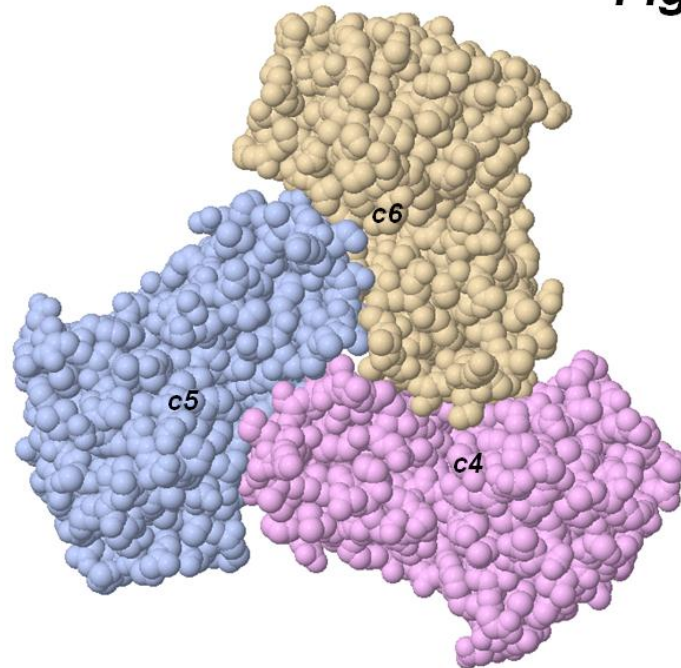


Las figuras 8.12 y 8.13 presentan el trímero catalítico y el dímero regulatorio, respectivamente. En este último se aprecia el lugar de fijación del CTP.

2. Comparando la cinética de las subunidades aisladas con la de la holoenzima, se comprueba que (a) la actividad específica del trímero catalítico aislado es aproximadamente un 50 % superior que la de la holoenzima; (b) la curva de saturación del sustrato en el caso del trímero catalítico aislado es hiperbólica (michaeliana) en lugar de sigmoide.

Aspartato transcarbamilasa: el trimero catalítico

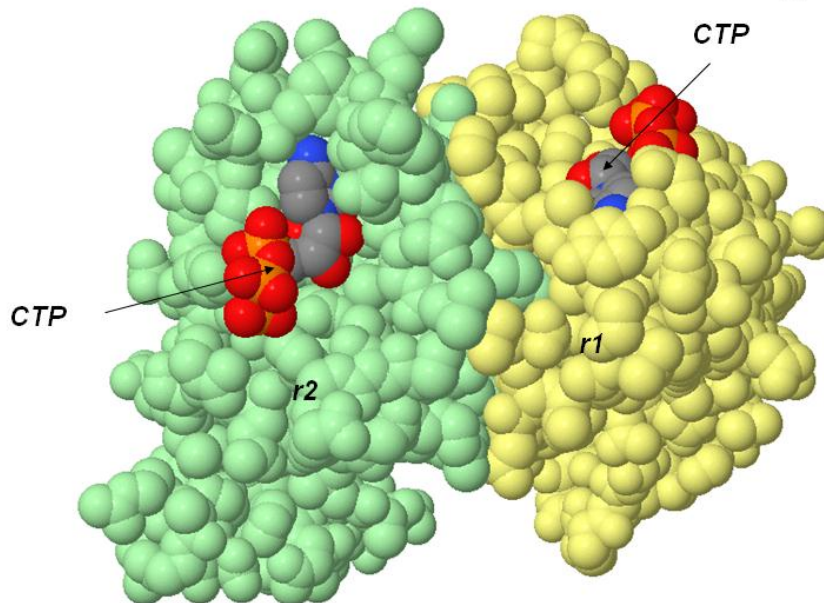
Figura 8.12



Jmol

Aspartato transcarbamilasa: el dímero regulatorio

Figura 8.13

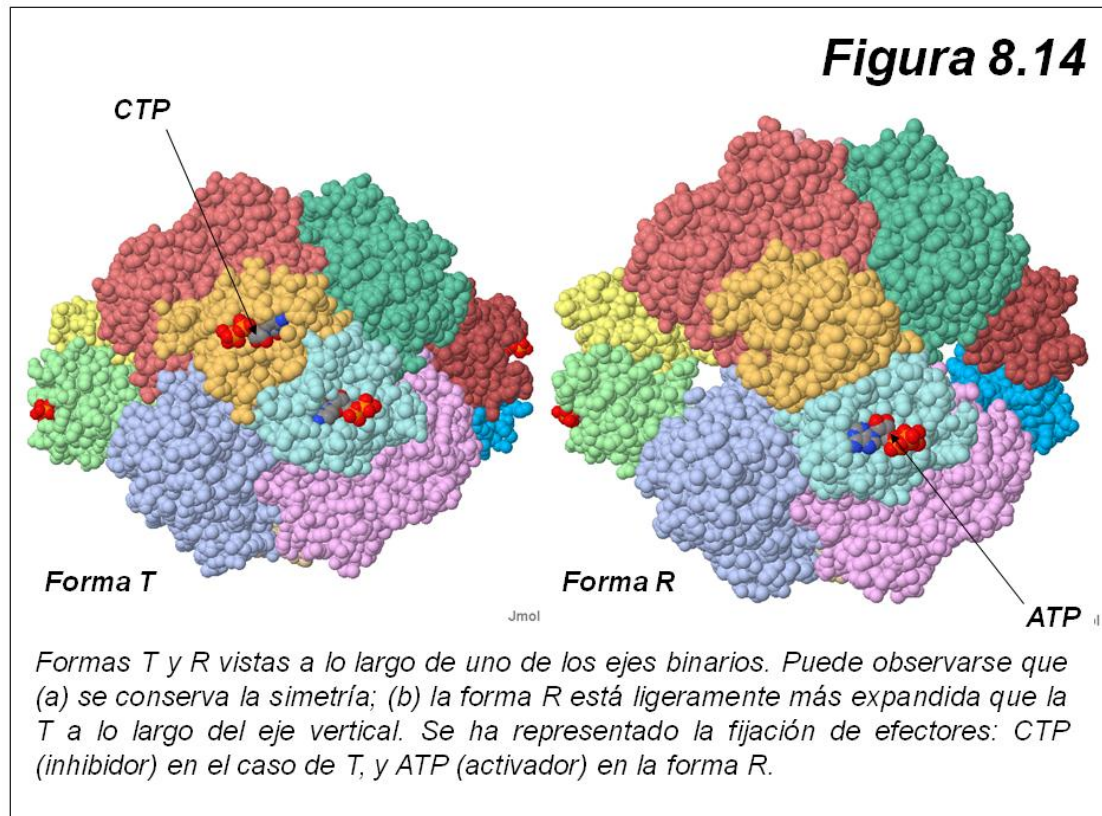


Jmol

3. La ATCasa puede existir en dos conformaciones diferentes. En ausencia de sustrato o en presencia de CTP, la enzima tiene la estructura general que se presenta en la figura 8.11. La unión del análogo de sustrato PALA (fosfonoacetil-L-aspartato) induce

un cambio conformacional en la molécula que se ilustra en la figura 8.14.

- De las dos formas, una de ellas (forma **R**) corresponde a la presencia de un ligando en el centro catalítico (no se ve en la imagen) y un activador (ATP) en el centro alostérico; y la otra a la ausencia de sustrato y a la presencia de CTP en el correspondiente centro alostérico de la subunidad reguladora (forma **T**).
- Todos los elementos de simetría que existen en la molécula (un eje ternario y tres ejes binarios) se conservan en la transición, y no han podido ser detectados estados intermedios.



4. La fijación de sustrato o análogo determina cambios en la disposición de las subunidades reguladoras de tal manera que CTP no puede fijarse a la estructura. De ahí se deduce que el efector alostérico negativo sólo tiene afinidad por el estado **T**.

5. A su vez, la fijación de CTP en ausencia de otros ligandos determina cambios en la disposición de las subunidades catalíticas de manera que impiden la fijación de sustrato.

Por todo ello se considera que este sistema sigue casi al pie de la letra el modelo de Monod, Wyman y Changeux.

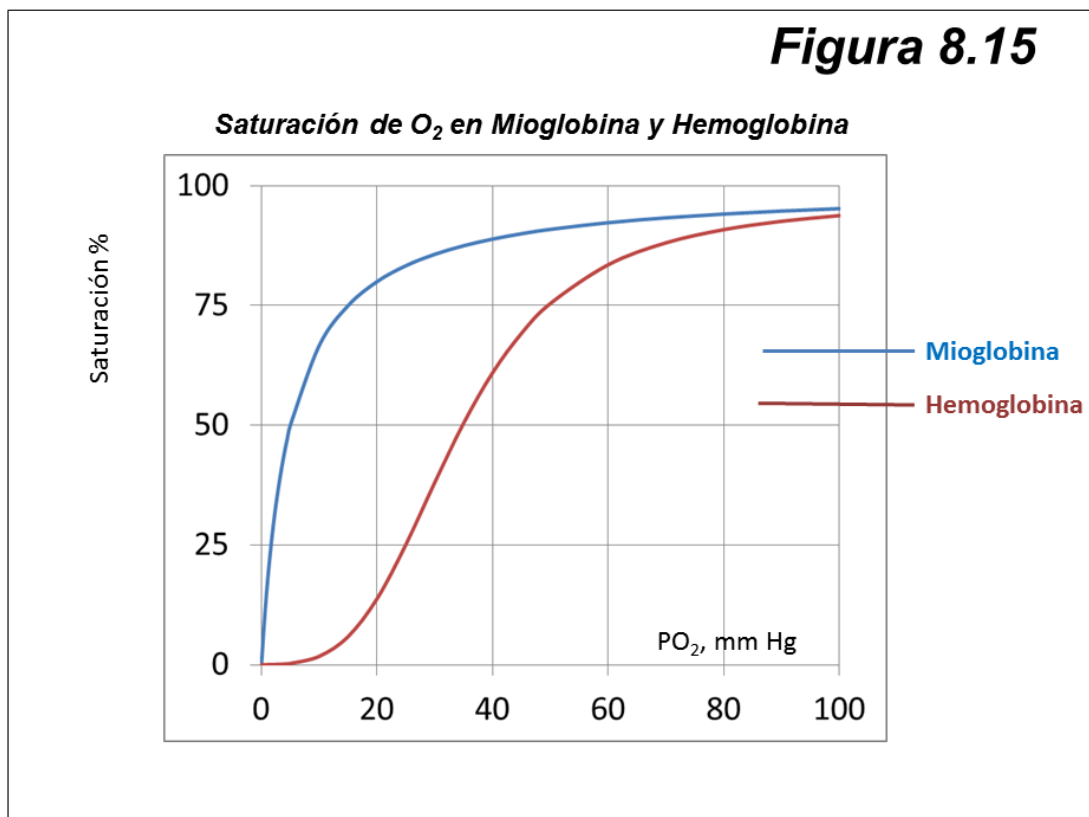
8.3.6 La hemoglobina

La hemoglobina es un transportador de oxígeno que aparece en el interior de células especializadas, los hematíes o glóbulos rojos. Es una de las proteínas mejor estudiadas y presenta un comportamiento alostérico clásico respecto a la fijación de su "substrato", el oxígeno molecular. La afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno se ve afectada por determinados ligandos, particularmente el protón H^+ , el CO_2 y el 2,3 bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Todos ellos producen una disminución en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Gracias a los estudios pioneros de **Max Perutz** conocemos con gran detalle la anatomía molecular de esta proteína y sus relaciones estructura-función.

8.3.6.1 Comportamiento alostérico de la hemoglobina

La hemoglobina es un sistema alostérico clásico, que puede interpretarse según el modelo restringido expresado más arriba de la siguiente forma:

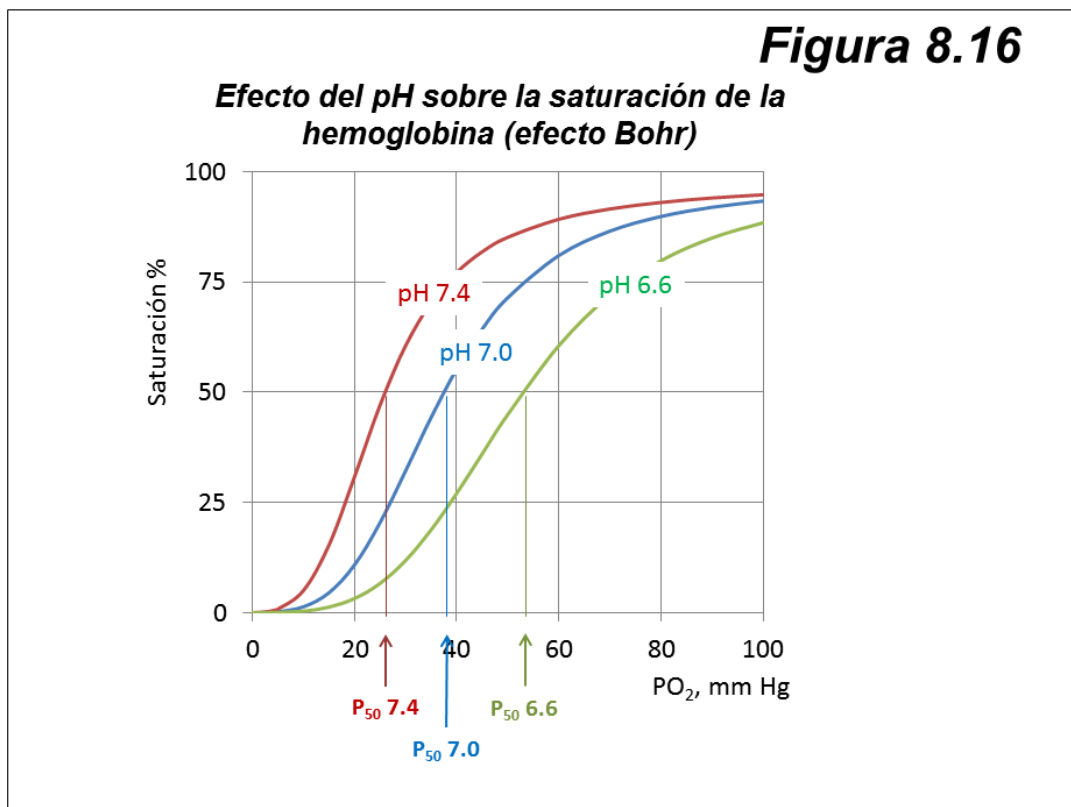
1. Tanto las subunidades aisladas como la mioglobina se diferencian de la molécula completa $\alpha_2\beta_2$ en que la curva de saturación de oxígeno no es sigmoide, sino hiperbólica (figura 8.15).



2. La fijación de oxígeno sigue una curva sigmoide característica de un efecto homotrópico positivo (cooperatividad positiva), y esta curva se afecta por los efectores

negativos en la forma indicada en la figura 8.16. En ella representamos el efecto del pH sobre la curva de disociación de la hemoglobina. (A), pH 7.8; (B), pH 7.2; (C), pH 6.8; el protón es un efector negativo en el sistema de la hemoglobina. Un efecto similar puede ser apreciado con concentraciones crecientes de 2,3 bisfosfoglicerato o de CO₂ (no representados). La acción de dichos efectores consiste en un incremento en el carácter sigmoide de la curva. se trata, pues, de inhibidores alostéricos que incrementan la cooperatividad en la fijación del sustrato (O₂)

3. El "centro activo" de la hemoglobina sería el lugar de fijación del oxígeno molecular, que es la sexta posición de coordinación del ion ferroso que ocupa el centro del grupo hemo. Los efectores H⁺, CO₂ y 2,3-BPG se fijan a sitios distintos de la molécula.



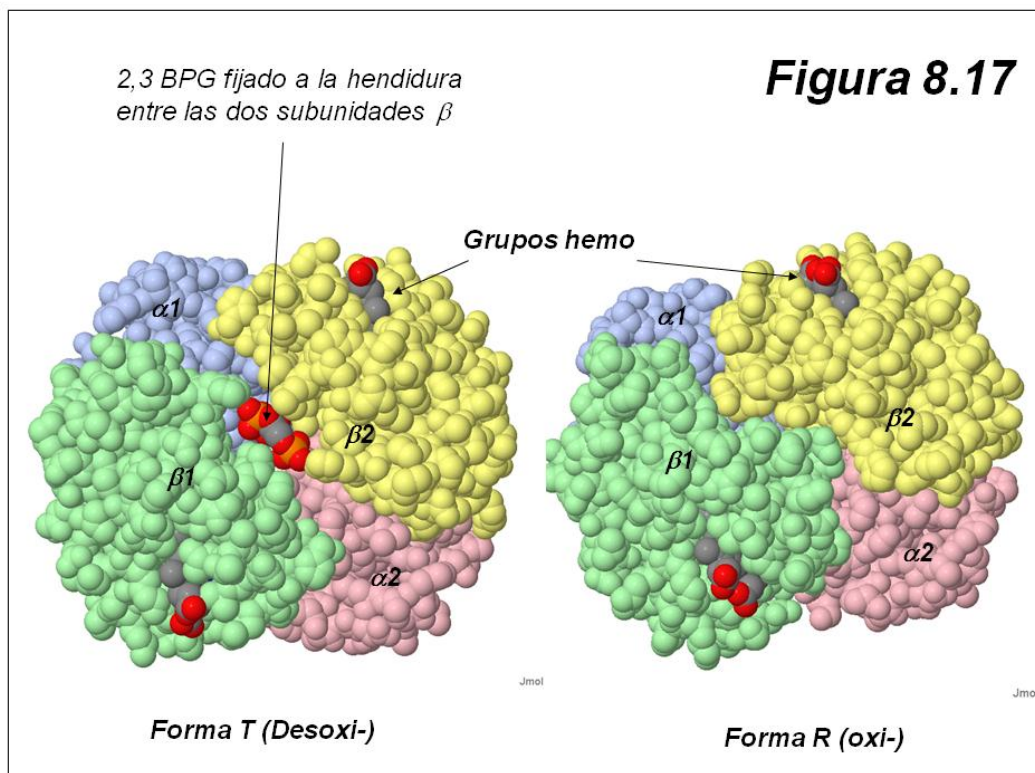
4. Los efectores H⁺, CO₂ y 2,3-BPG afectan heterotrópicamente a la fijación del O₂. Todos ellos se comportan como inhibidores alostéricos, disminuyendo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, provocando un incremento en la P₅₀. Recuérdese que la P₅₀ representa la presión parcial de oxígeno con la que se alcanza un 50 % de saturación de la hemoglobina, siendo por tanto un parámetro comparable a la *K_m* de los sistemas enzimáticos michaelianos.

8.3.6.2 Adecuación de la hemoglobina al modelo MWC

Los estudios de **Perutz** sobre la estructura de la hemoglobina a alta resolución, han mostrado que:

1. La hemoglobina posee estructura cuaternaria. La hemoglobina A₁, la más abundante en el organismo humano adulto, consta de cuatro subunidades, iguales dos a dos, llamadas α y β ; la estructura cuaternaria de la misma se puede representar, pues, como $\alpha_2\beta_2$. Estas subunidades poseen una gran similitud estructural y a los efectos que nos interesan, se pueden considerar idénticas.

2. La hemoglobina presenta dos formas distintas, según la naturaleza del ligando coordinado a la sexta posición del ion ferroso. La forma llamada "oxi" (estado **R**) aparece cuando en esta posición existe un ligando de campo fuerte, como el oxígeno molecular, el ligando fisiológico, o el monóxido de carbono. La forma llamada "desoxi" (estado **T**) se presenta ante la ausencia de ligandos en esta sexta posición de coordinación del ion ferroso o ante ligandos de campo débil. (figura 8.17)

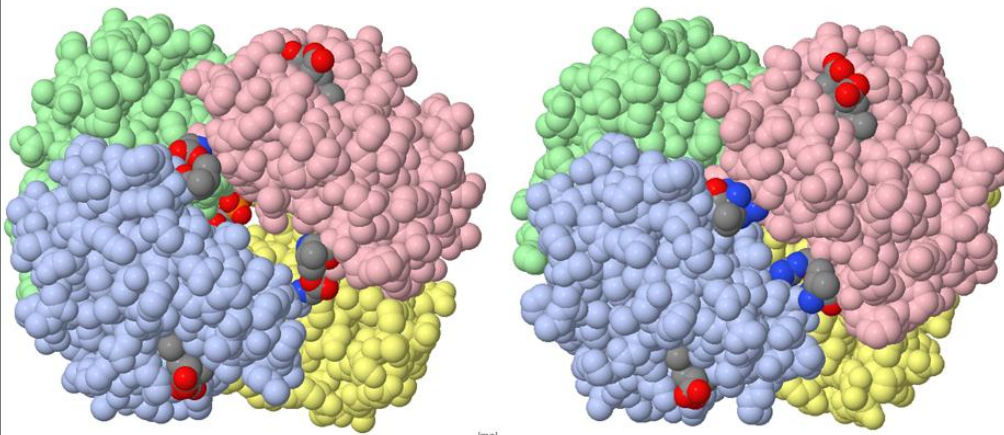


3. Las dos subunidades β están en la forma **T** bastante más separadas que en la forma **R**. Lo contrario, aunque en menor medida, ocurre con las subunidades α . Esta separación entre las subunidades β en la forma **T** permite que se fije el ligando 2,3 BPG (efector negativo) (figura 8.17)

4. Faltan en la forma **R** (oxi-) determinados enlaces iónicos presentes en la forma **T** (desoxi). Estos enlaces se presentan en las figuras 8.18 (contacto α - α), 8.19 (contacto β - β) y 8.20 (contacto α - β). El cambio estructural de la hemoglobina, al pasar de forma desoxi- a oxi-, induce la rotura de todos estos enlaces mostrados.

Contacto $\alpha - \alpha$

Figura 8.18

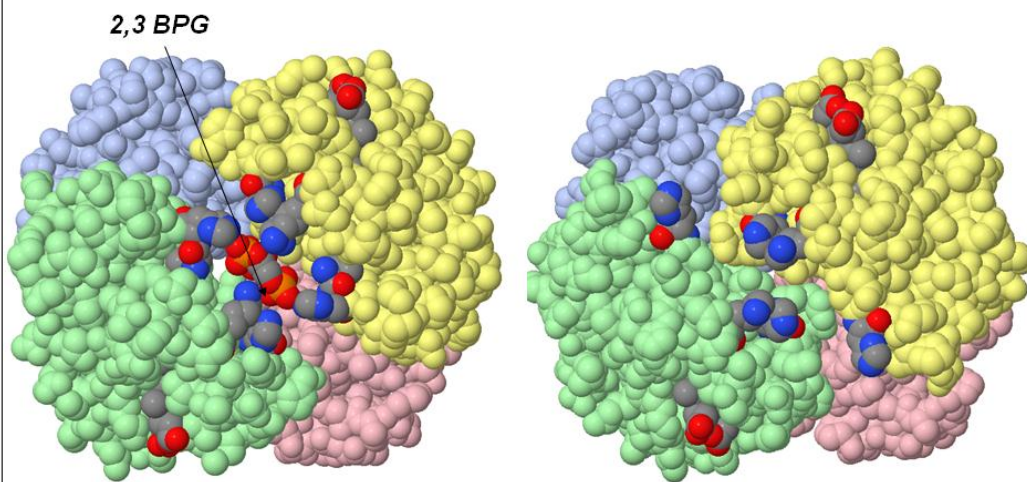


Forma T (desoxi-)

Forma R (oxi-)

Contacto $\beta - \beta$

Figura 8.19



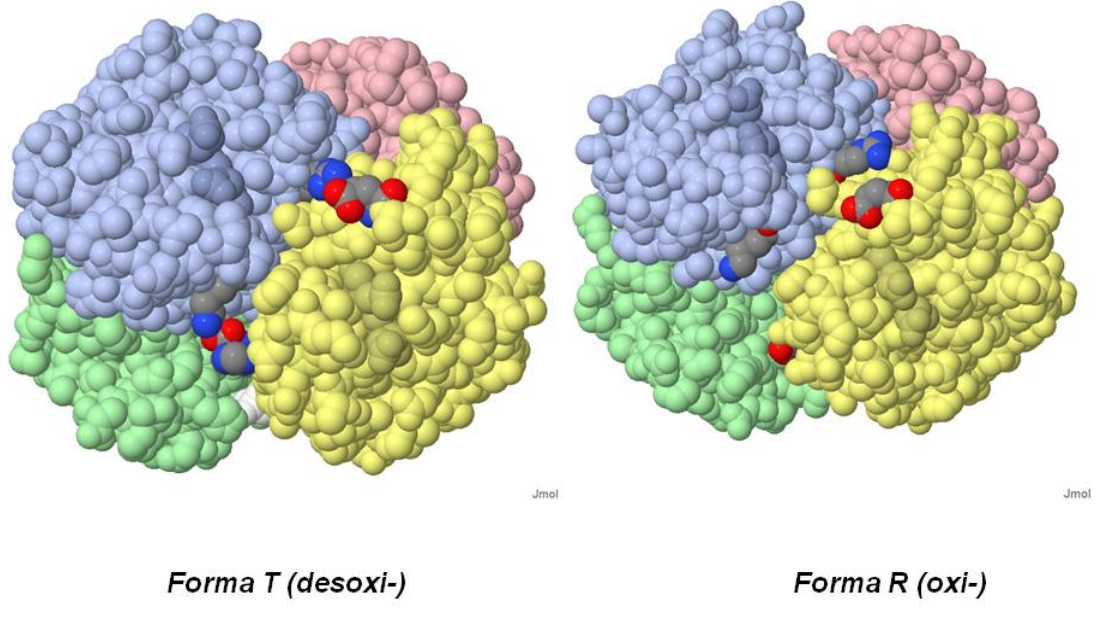
2,3 BPG

Forma T (desoxi-)

Forma R (oxi-)

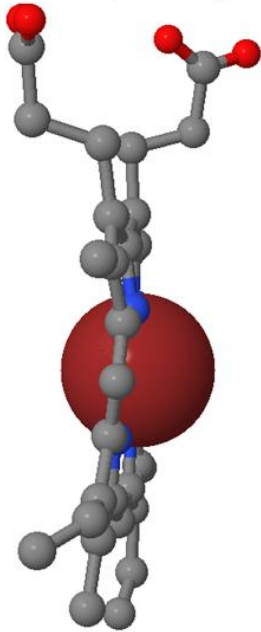
Figura 8.20

Contacto $\alpha - \beta$



5. El ion ferroso ocupa el centro geométrico del plano de la porfirina en la forma **R** (oxi), y aparece ligeramente desplazado del mismo en la forma **T** (desoxi). Este fenómeno tiene que ver con la naturaleza del ligando que ocupa la sexta posición de coordinación: el diámetro del ion es un 20 % mayor en el caso de ligandos de campo débil o ausencia de los mismos (forma **T**, desoxi) que en la forma **R** (oxi), según se puede apreciar en el esquema de la figura 8.21.

Forma T (desoxi-)



Forma R (oxi-)

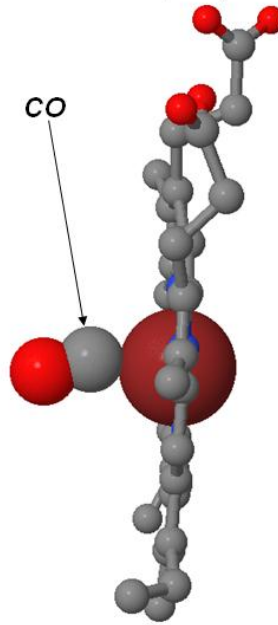
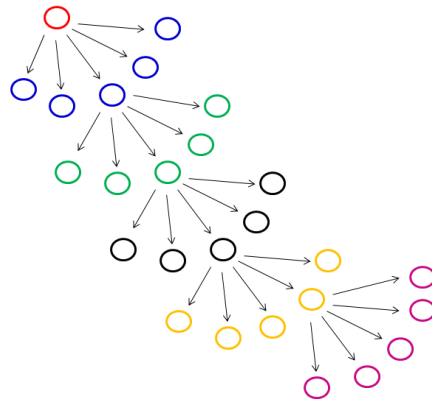


Figura 8.21

El diámetro del ion Fe^{++} es un 20 % mayor en el estado T, de manera que el ion no puede ocupar el centro geométrico del grupo hemo.

CAPÍTULO 9: Regulación de la actividad enzimática, 2. Modificación covalente de las enzimas. Activaciones proteolíticas



9.1 Introducción

9.1.1 Modificación covalente: su importancia biológica

Veíamos en el capítulo anterior que el fenómeno de la regulación de la actividad enzimática se desarrolla a varios niveles. En el nivel intracelular, una gran cantidad de reacciones metabólicas se regulan a través de retroalimentación negativa, mediante mecanismos alostéricos. Esto supone un control de ajuste fino que mantiene las actividades enzimáticas dentro de márgenes relativamente estrechos. Ahora bien, en ocasiones una célula, sobre todo en los sistemas pluricelulares, tiene que responder con la puesta en marcha de una ruta metabólica o la supresión de otra en respuesta a estímulos ambientales cuya magnitud puede perfectamente desbordar los niveles de respuesta obtenida ante estímulos alostéricos. Muy frecuentemente esta respuesta es

de una enorme complejidad y abarca no una sino muchas rutas metabólicas, transcripción y traducción de DNA, interacciones intercelulares, etc. Los procariontes, por lo general, responden en este caso con variaciones en el nivel de síntesis enzimática ejercidos normalmente sobre la transcripción (inducción o represión enzimática); los eucariotes, por su parte, han desarrollado además todo un intrincado sistema de respuestas ante estímulos externos que en su mayor parte se manifiestan como modificaciones covalentes de las enzimas, de lo que resultan sus variaciones en actividad. La investigación actual está comenzando a comprender la extrema *complejidad* de estos sistemas de modificación covalente. A través de la misma, por citar sólo algunos ejemplos, se encuentra la respuesta celular a

1. *Neurotransmisores*. Son sustancias liberadas por los terminales presinápticos de una neurona en respuesta al paso a su través de un potencial de acción. Los neurotransmisores ejercen su función sobre receptores postsinápticos específicos determinando una respuesta en la célula postsináptica. En ocasiones, los neurotransmisores operan asimismo sobre receptores presinápticos, modulando la actividad de la sinapsis. En uno y otro caso la acción puede mediar a través de modificaciones covalentes de enzimas o alteraciones en la permeabilidad de canales iónicos en la membrana.

2. *Hormonas*. Podemos tomar el concepto de hormona en un sentido amplio, en cuyo caso es hormona todo tipo de señal química que ejerce su acción a través de la interacción con un receptor específico. En ese caso, tanto el apartado anterior como todos los siguientes deberían estar refundidos en éste. Pero aquí daremos al término su sentido restringido, denominando hormona a la señal química generada dentro del conjunto de órganos que constituyen el *sistema endocrino*, y que actúan a través de la interacción con un receptor específico. En líneas generales podemos decir que la práctica totalidad de hormonas que operan desde el exterior de la célula ejercen su acción por medio de la modificación covalente de enzimas. Aun cuando no se produzcan en órganos endocrinos concretos, podemos considerar como hormonas a los *mediadores locales*, del tipo de las kininas, eicosanoides, etc., producidos *in situ* ante diversos estímulos y cuya acción se traduce asimismo con mucha frecuencia en la modificación covalente de sistemas enzimáticos.

3. *Factores de crecimiento*. El estudio de los requerimientos de células eucarióticas cultivadas *in vitro* nos ha llevado al conocimiento de multitud de factores de naturaleza proteica o peptídica, llamados factores de crecimiento, que inducen en la célula estímulos de reproducción y diferenciación (o des-diferenciación), operando sobre el ciclo celular y todas las actividades químicas normalmente asociadas al mismo (como por ejemplo, síntesis de DNA); o bien, en algunos casos, induciendo *apoptosis* (muerte regulada y programada de las células). El catálogo de factores de crecimiento aumenta de día en día (p.e., factor de crecimiento neural o NGF; factor de crecimiento epidérmico o EGF; factor de crecimiento plaquetario o PDGF; factores de crecimiento pseudoinsulínicos o ILGF, etc.etc.) y su acción, en términos generales, y en la medida que nos es conocida, se ejerce por modificación covalente de enzimas u otros efectores (receptores, canales iónicos, etc.). En este mismo apartado podemos citar la acción de *mitógenos*, que estimulan la entrada de la célula en ciclos de división (tal es

el caso de determinadas *lectinas*, por ejemplo), así como la acción de determinados efectores celulares como las *citokinas*.

4. *Estímulos morfogénéticos y de diferenciación*. La acción de los llamados *genes homeóticos*, que consiste en la determinación ontogénica de células no diferenciadas hacia formas plenamente diferenciadas constituyendo una forma adulta, consiste en la puesta en marcha de otros genes a nivel transcriptivo. Los factores proteicos que median estas acciones pueden verse modificados covalentemente en respuesta a la acción de estos genes.

5. *Estímulos antigénicos*. La compleja respuesta del sistema inmunitario ante la aparición de un antígeno, con activación de diversas estirpes celulares, diferenciaciones, ciclos de reproducción clonal, producción de mediadores específicos, etc., está en gran parte determinada por la modificación covalente de proteínas efectoras, enzimáticas o no.

6. *Interacciones proteína-proteína o proteína-célula*. Hoy día sabemos que una gran parte de funciones orgánicas se establecen gracias a la interacción entre proteínas, bien sea entre sí o actuando sobre superficies celulares o sobre matrices intercelulares. Todas estas interacciones pueden verse afectadas por la modificación covalente de las mismas.

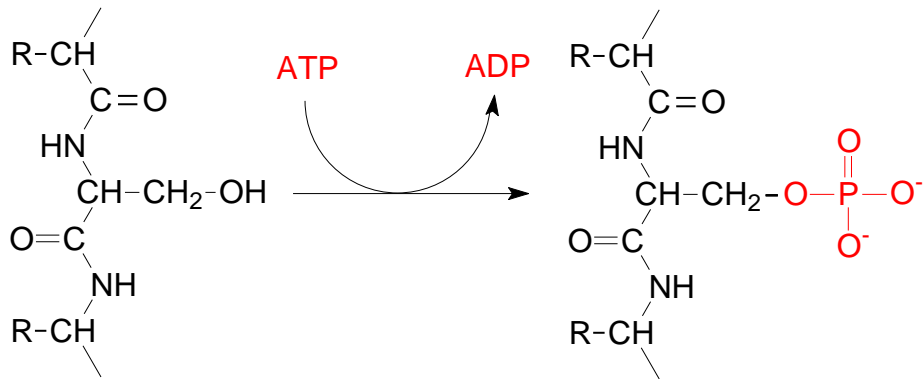
6. *Luz y otros agentes físico-químicos*. La respuesta de los fotorreceptores retinianos al estímulo lumínico se traduce en modificaciones covalentes de determinados canales iónicos. Asimismo tiene lugar modificación covalente de proteínas en la respuesta a estímulos sensoriales olfatorios y gustativos.

Obsérvese que a medida que progresaba esta sucinta descripción, hemos ido abandonando el término enzima para sustituirlo por el de *proteína efectora*. El fenómeno de la modificación covalente se extiende, por lo que sabemos, a todo tipo de interacción entre ligando y proteína, enzimática o no.

Resulta así una trama enormemente intrincada de acciones de unos sistemas sobre otros; pues no sólo cabe la posibilidad de modificación covalente del efector final, sino que el propio receptor a la señal puede ser modificado por el mismo u otros sistemas; y todos los pasos intermedios hasta el efector final pueden ser asimismo asiento de modificaciones covalentes. El conjunto de todos estos fenómenos constituye en sí una disciplina aparte dentro de la Bioquímica, conocida como *Transducción de señales*, en el mismo orden de importancia con el que estudiamos las Biomoléculas, la Enzimología, el Metabolismo y la Información Genética; y que a no dudar, en unos pocos años representará, por su carácter integrador, una disciplina diferenciada cuyas ramificaciones se extenderán a la Clínica y a la Biotecnología. Dentro de los fenómenos de transducción de señales hay una serie de conceptos que requieren un estudio previo y que pasaremos a discutir a continuación: las diversas formas de modificación covalente, el concepto de *segundo mensajero* y el concepto de *activación en cascada*.

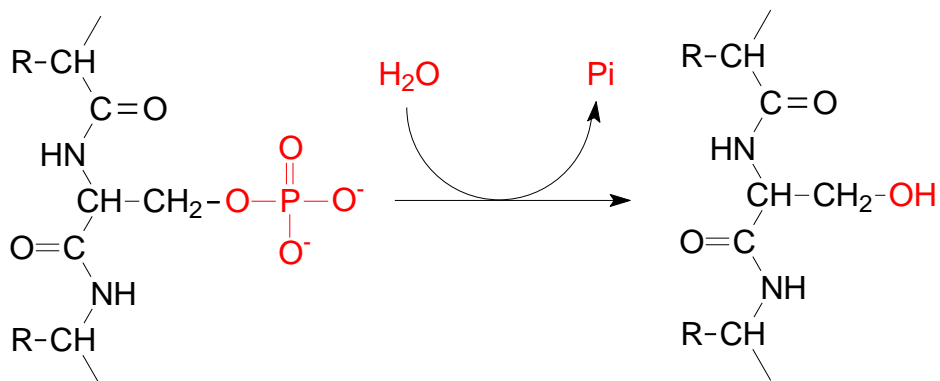
9.1.2 Formas de modificación covalente

En muchos casos, la modificación covalente consiste en la *fosforilación* de residuos hidroxílicos de la proteína: cadenas laterales de serina, treonina, tirosina y al parecer también histidina. Esta fosforilación está catalizada por enzimas específicas, llamadas *protein kinasas*, que catalizan la transferencia del fosfato γ de ATP o GTP al grupo hidroxilo en cuestión. Para el caso de la serina, tenemos:



La fosforilación de estos residuos determina en la proteína cambios conformacionales que alteran, normalmente de forma drástica, su función. Es decir, a diferencia de las interacciones alostéricas, que modulan la respuesta de la enzima de forma gradual y continua, la fosforilación resulta en la activación de una forma previamente inactiva o viceversa, con una respuesta de tipo todo o nada (*on-off*). En otros sistemas hay una cierta gradación puesto que las dos formas (fosforilada o defosforilada) son activas, pero una mucho más que otra.

Como es lógico, tan modificación covalente es la fosforilación como la *defosforilación*. Y existen igualmente enzimas que catalizan este proceso, las *protein fosfatasas*. Catalizan reacciones hidrolíticas del tipo expuesto a continuación:

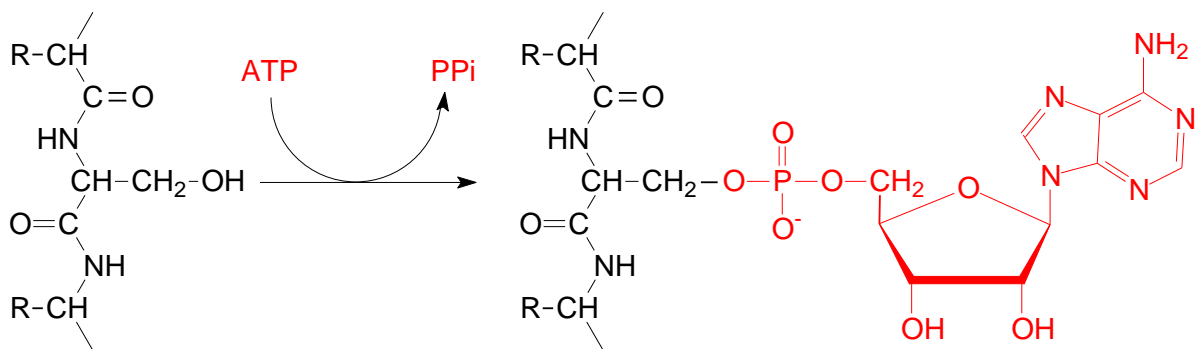


y que son el objeto de influencias de tipo regulatorio de la misma manera que las protein kinasas, por lo que su estudio es tan importante como el de éstas.

La extraordinaria variedad de respuestas mediadas por protein kinasas o protein fosfatasas se refleja en los siguientes hechos: (a) podemos estimar en un 3 % del

genoma las secuencias destinadas a la síntesis de protein kinasas y protein fosfatasas; (b) de los miles de proteínas distintas presentes en la célula, aproximadamente un tercio están sometidas a fosforilación/defosforilación; y (c) en la actualidad conocemos las secuencias de unos miles de protein kinasas y protein fosfatasas, y estos números van constantemente en aumento.

El fenómeno de fosforilación/defosforilación no es la única forma de modificación covalente de la actividad enzimática. Encontramos, por ejemplo, la *adenilación* de residuos de serina, con ATP como donador de adenilo y producción de pirofosfato inorgánico:



o en otros casos, *uridilación* (con UTP como donador) o *ADP-ribosilación* (con NAD⁺ como donador de ADP-ribosa)

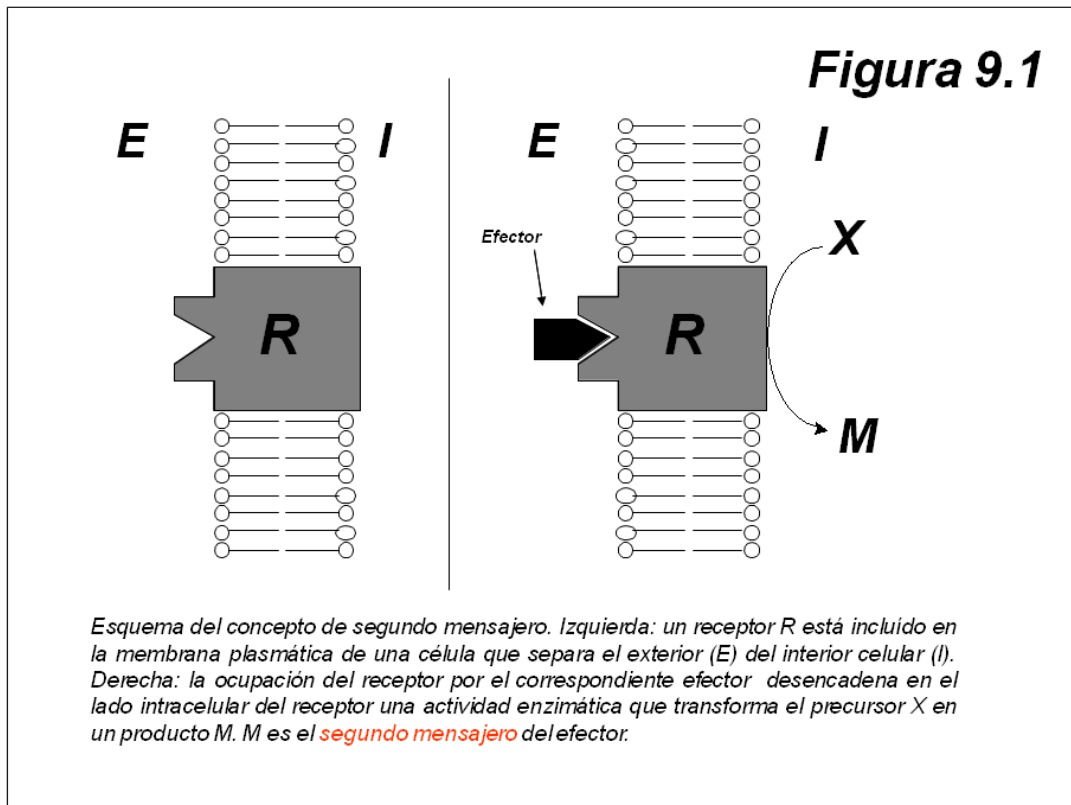
Pero el otro orden de modificaciones covalentes de importancia generalizada es el de *proteolisis específica*. Muchas enzimas son producidas por la célula en estado de *zimógenos*, formas inactivas de las mismas que son activadas por una rotura proteolítica específica. Un caso bien documentado es la producción de enzimas digestivas (*pepsina*, *tripsina*, *quimotripsina*, etc.), que son segregadas por las células productoras en forma de los respectivos *zimógenos*, activándose por proteolisis una vez llegadas a la luz intestinal. La regulación por proteolisis específica se hace especialmente llamativa en fenómenos como la *coagulación de la sangre*, la *fibrinólisis* y la *activación del complemento*, procesos en los que se necesita una activación de varios órdenes de magnitud en tiempos muy cortos, y que tienen lugar a través del fenómeno de *activación en cascada* (v. más adelante).

9.1.3 Concepto de segundo mensajero

La gran mayoría de señales químicas producidas en organismos eucarióticos ejercen su acción a través de la interacción con receptores situados en la cara externa de la membrana celular. La excepción a esta regla general está constituida por la acción de hormonas de tipo poliprenoide (esteroides, calciferoles, retinoides, etc.) y las hormonas tiroideas, que actúan a través de la interacción con receptores intracelulares, citosólicos y/o nucleares, dando lugar a alteraciones en la transcripción

del DNA. En el resto de señales químicas conocidas, dicha señal no entra en la célula sino que desencadena su acción a través de la interacción con un receptor de membrana.

Esta interacción determina en el interior de la célula la alteración en las concentraciones de determinadas moléculas o iones que son las que realmente desencadenan la respuesta *intracelular* a la señal. Estas moléculas reciben el nombre de *segundos mensajeros* (el primer mensajero sería la propia señal química que queda fuera de la célula). El concepto de segundo mensajero se representa esquemáticamente en la figura 9.1.



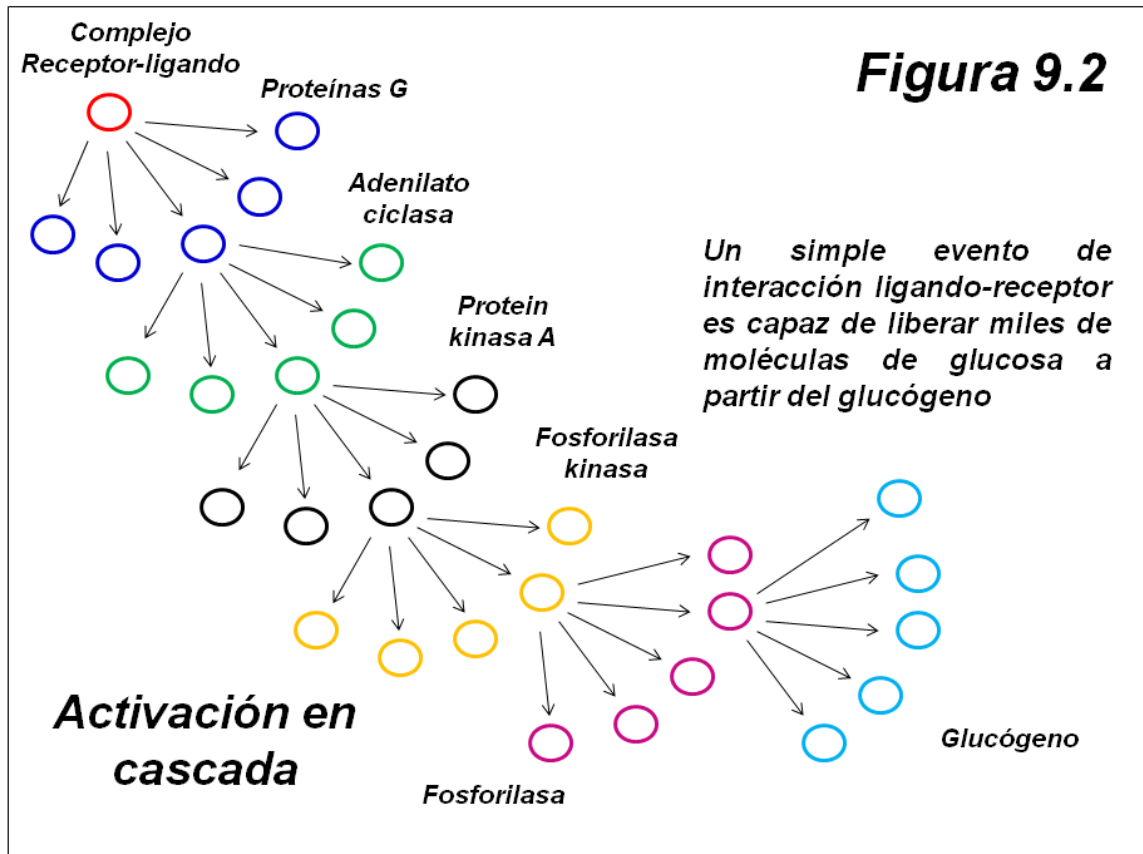
El segundo mensajero representa, por tanto, la señal química *intracelular* producida en respuesta a la señal química extracelular. Los segundos mensajeros determinan la activación de sistemas de modificación covalente, en particular de fosforilación/defosforilación. Conocemos hoy día una serie de segundos mensajeros producidos en respuesta a señales químicas. Los más importantes son los nucleótidos cíclicos (cAMP y en menor medida cGMP), productos de degradación de fosfolípidos de membrana (diacil glicerol, inositol fosfatos y otros), el ion Ca^{2+} e incluso radicales libre como el óxido nítrico (NO^{\cdot}), sin descartar la posibilidad de muchos otros. A su vez, el concepto de segundo mensajero debe matizarse en el sentido de que en determinados casos, la respuesta a una señal química en la célula supone la aparición de varios segundos mensajeros. El panorama se complica cuando se constata que los sistemas enzimáticos de producción de segundos mensajeros pueden ser asimismo asiento de modificaciones covalentes; por lo tanto, la respuesta a señales químicas en la célula eucariótica muestra una intrincadísima red de influencias de unas señales sobre otras, dándose todo tipo de fenómenos de aditividad, sinergismo y antagonismo de señales

que hacen difícil la sistematización de acciones concretas. Asimismo, observamos en estas redes de regulación todo tipo de fenómenos de realimentación negativa y positiva, lo que conduce a sistemas complejos, obviamente no lineales, en los que cabe todo tipo de comportamiento dinámico (estabilidad, estabilidad marginal, metaestabilidad, oscilaciones e incluso dinámica caótica).

9.1.3 Concepto de activación en cascada

En la modificación covalente de las enzimas hay un concepto central: el de activación en cascada. Como tal conocemos la activación producida a través de una serie de pasos enzimáticos sucesivos y encadenados de tal manera que una enzima activa a la siguiente en la cadena, ésta a la siguiente, ésta a la siguiente, etc. Dado que la actividad enzimática presenta una dependencia lineal respecto a la concentración de enzima, cada paso representará, pues, una multiplicación sobre el anterior, dando lugar a una dinámica exponencial (y no lineal) en el proceso de activación.

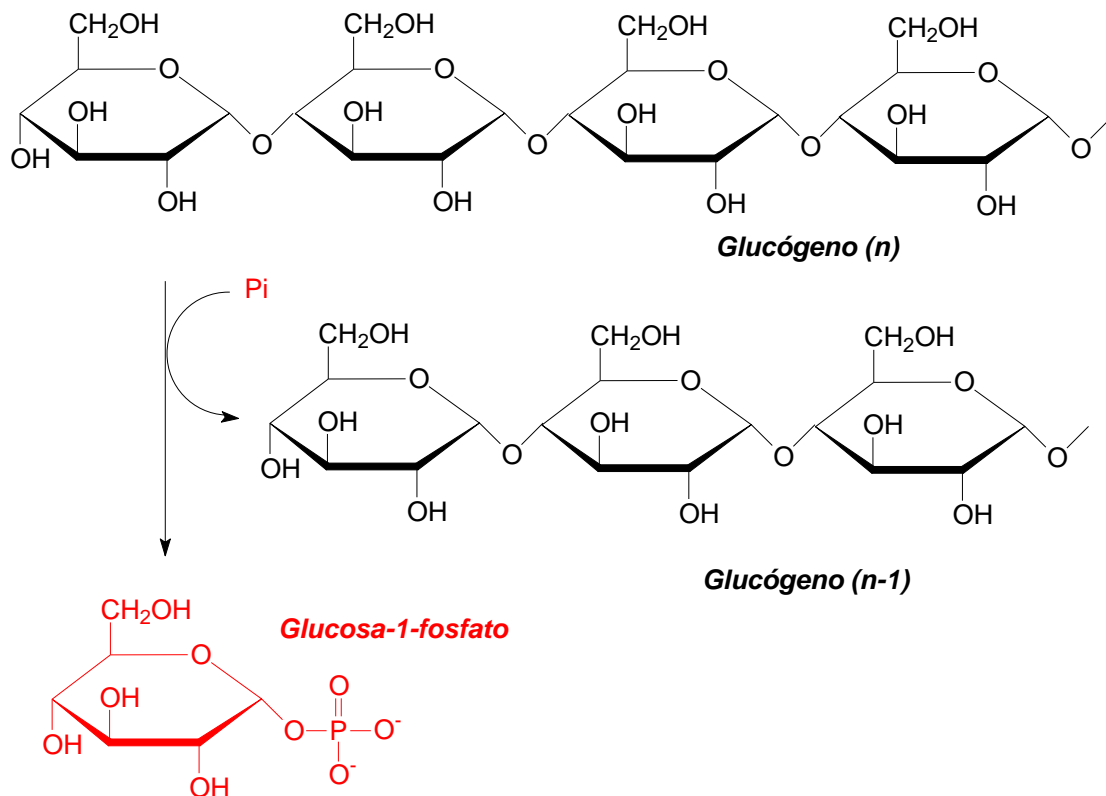
Supongamos que la enzima E1 activa a la E2, ésta a la E3 y así sucesivamente. Una molécula de E1 activará a muchas E2; cada una de éstas a muchas E3; cada E3 a muchas E4 y así sucesivamente. El proceso de activación en cascada es tal que una sola molécula de E1 podrá dar lugar a una activación en órdenes de magnitud; por ejemplo, una molécula de E1, según esta misma dinámica, podría llegar a una activación de 10^7 moléculas de E8 suponiendo un modesto ritmo de activación de 10 a cada paso. Se consigue así una enorme amplificación de la señal primitiva. No es de extrañar, por tanto, que los sistemas de regulación por modificación covalente actúen, por lo general, a escala de *organismo* y no meramente de *célula*. Asimismo ésa es la razón por la cual los sistemas de modificación covalente son de gran complejidad, tal como veremos en el caso de la *glucógeno fosforilasa* y de la *coagulación de la sangre*, que son los ejemplos que estudiaremos más detenidamente en este capítulo (figura 9.2)



9.2 Regulación de la glucógeno fosforilasa

9.2.1 Reacción catalizada y formas moleculares de la glucógeno fosforilasa

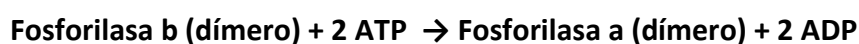
Históricamente, el primer sistema sometido a modificación covalente que se descubrió fue el de la *glucógeno fosforilasa* (EC 2.4.1.1) de hígado y músculo, descubierto por Sutherland en el año 1969. La glucógeno fosforilasa es una enzima esencial en los animales pluricelulares ya que permite un aporte fijo de glucosa según las necesidades de cada momento y en particular en los períodos interalimentarios. Cataliza la fosforólisis de un extremo no reductor de la molécula de glucógeno liberando glucosa-1-fosfato, y requiere como cofactor esencial el piridoxal fosfato:



La enzima es un punto importantísimo del metabolismo, dado que regula la cantidad de glucosa circulante a partir de la reserva hepática de glucógeno, así como la cantidad de glucosa a disposición del músculo esquelético. Ante situaciones de emergencia, el organismo requiere un aporte de glucosa constante para hacer frente a cualquier peligro potencial. Por ello esta enzima ha de ser capaz de activarse en lapsos de tiempo muy cortos, razón por la cual está sometida a una regulación en cascada, como tendremos ocasión de estudiar.

Se trata de una enzima muy grande y muy compleja. Normalmente se presenta como un *homotetrámero* (cuatro subunidades iguales), pero la forma funcional es el *homodímero*: dos subunidades iguales, cada una de 842 aminoácidos y un P.M. de alrededor de 96 kDa. Gracias a los trabajos del grupo de **L.N.Johnson**, de la universidad de Oxford, conocemos muy detalladamente las relaciones estructura-función de esta enzima.

La fosforilasa existe en dos formas diferentes: la **fosforilasa a** y la **fosforilasa b**. La primera es una forma muy activa de la misma y se distingue de la fosforilasa **b** por tener fosforilado el residuo Ser 14. La forma **b**, mucho menos activa, se convierte en forma **a** a través de fosforilación mediada por ATP y una enzima específica, la *fosforilasa kinasa*, que cataliza la siguiente reacción:



Con lo que se consigue un incremento sustancial de actividad. La fosforilasa **a**, a su vez, puede ser convertida en fosforilasa **b** por hidrólisis mediada a través de otra enzima, la *protein fosfatasa 1 (PP1)*:

Fosforilasa a (dímero) + 2 H₂O → Fosforilasa b (dímero) + 2 Pi

De esta forma, la acción de la fosforilasa kinasa equivale a la activación de la enzima y la de la protein fosfatasa 1 a la inactivación.

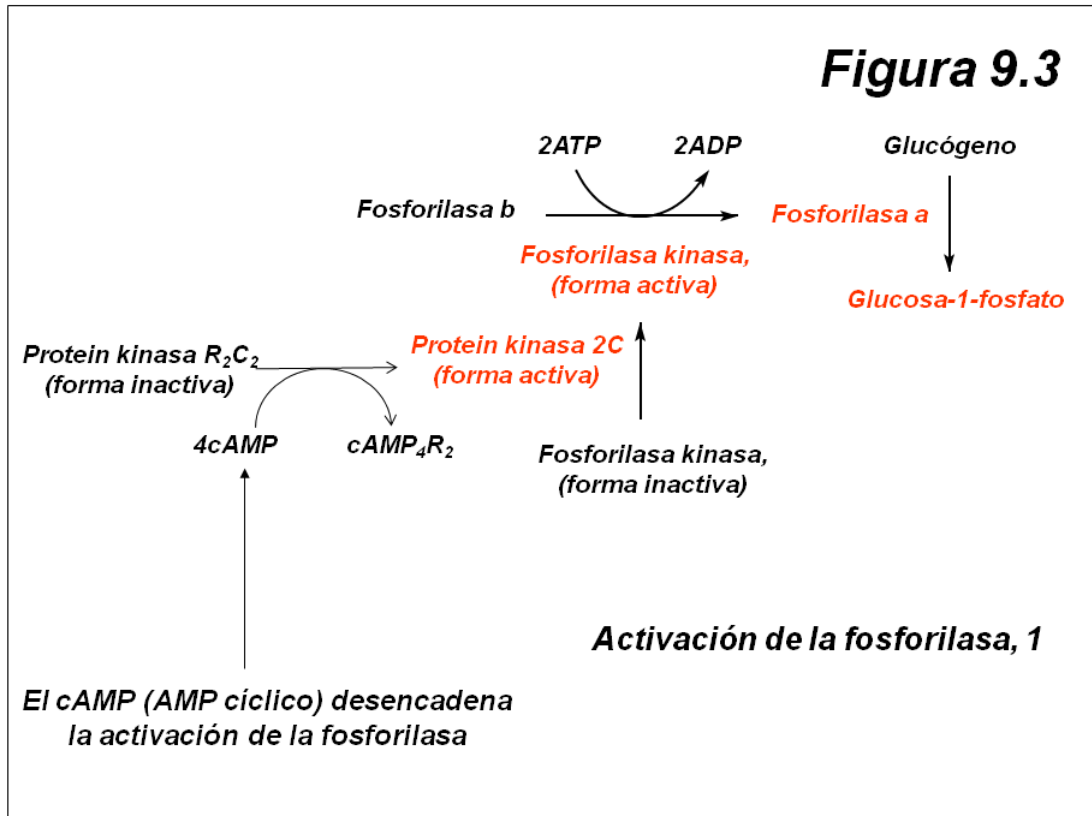
Ahora bien, la forma **b**, que es la forma menos activa, está, además, regulada alostéricamente. Presenta, por una parte, cooperatividad positiva en la fijación de sustratos (glucógeno y fosfato inorgánico). La enzima también presenta efectos heterotrópicos. Así, la enzima muscular es activada por AMP (que a concentración elevada indica que existe un bajo nivel energético en la célula, al ser producto de la hidrólisis de ATP) mientras que es inhibida por indicadores de un alto nivel energético (ATP y glucosa-6-fosfato). El comportamiento de la fosforilasa **b** se aproxima bastante al modelo de Monod-Wyman-Changeux que vimos en el capítulo 8 (con sus estados R y T, como veremos). La fosforilasa **a**, fosforilada en el residuo Ser 14, puede ser considerada como una fosforilasa **b** bloqueada en el estado R (mucho más activo) e insensible a efectores alostéricos.

Pero la fosforilasa es el punto de control del metabolismo energético en todo el organismo, en particular la enzima hepática, y está sometida a controles que regulan su actividad a partir de señales generadas sistémicamente. Así, las hormonas *adrenalina* (producida por la médula adrenal ante estados de alerta del organismo) o *glucagon* (producido por las células A del islote de **Langerhans** en el páncreas ante un descenso de la glucemia) estimulan la actividad de la glucógeno fosforilasa a través de un mecanismo en cascada que concluye con la fosforilación de la enzima, y que analizaremos a continuación.

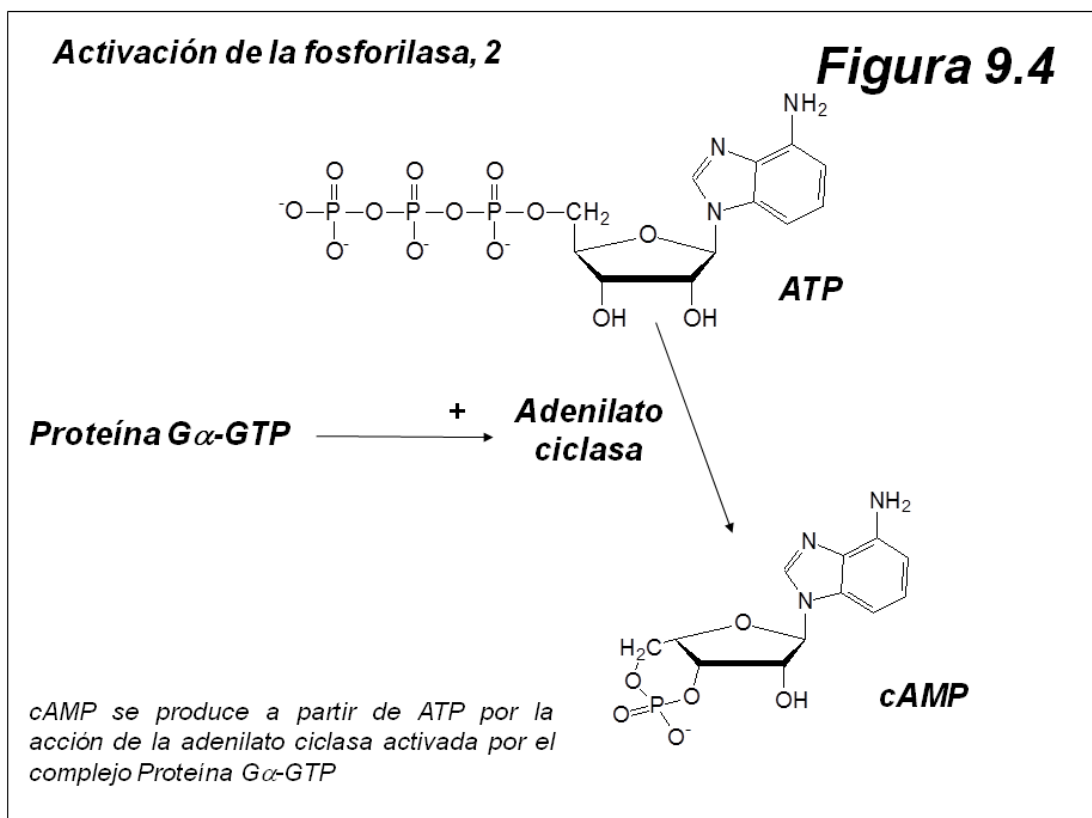
9.2.2 Cascada de activación en la glucógeno fosforilasa

La figura 9.3 ilustra la primera parte de la cascada de activación covalente de la glucógeno fosforilasa. Las primeras etapas de dicha activación son otras tantas fosforilaciones de enzimas. estas etapas son las siguientes:

1. El glucógeno es degradado por la acción de la fosforilasa. En estado fosforilado, es decir, bajo la forma de fosforilasa **a**, degrada activamente al glucógeno.
2. La fosforilasa **a** es el producto de la fosforilación, en el residuo Ser 14, de la fosforilasa **b**. Esta reacción es dependiente de ATP y está catalizada por la forma activa de la *fosforilasa kinasa*, como hemos visto antes.
3. La forma activa de la fosforilasa kinasa se produce asimismo por fosforilación dependiente de ATP de una forma inactiva de misma. La enzima responsable de esta fosforilación es la forma activa de la *protein kinasa A*.



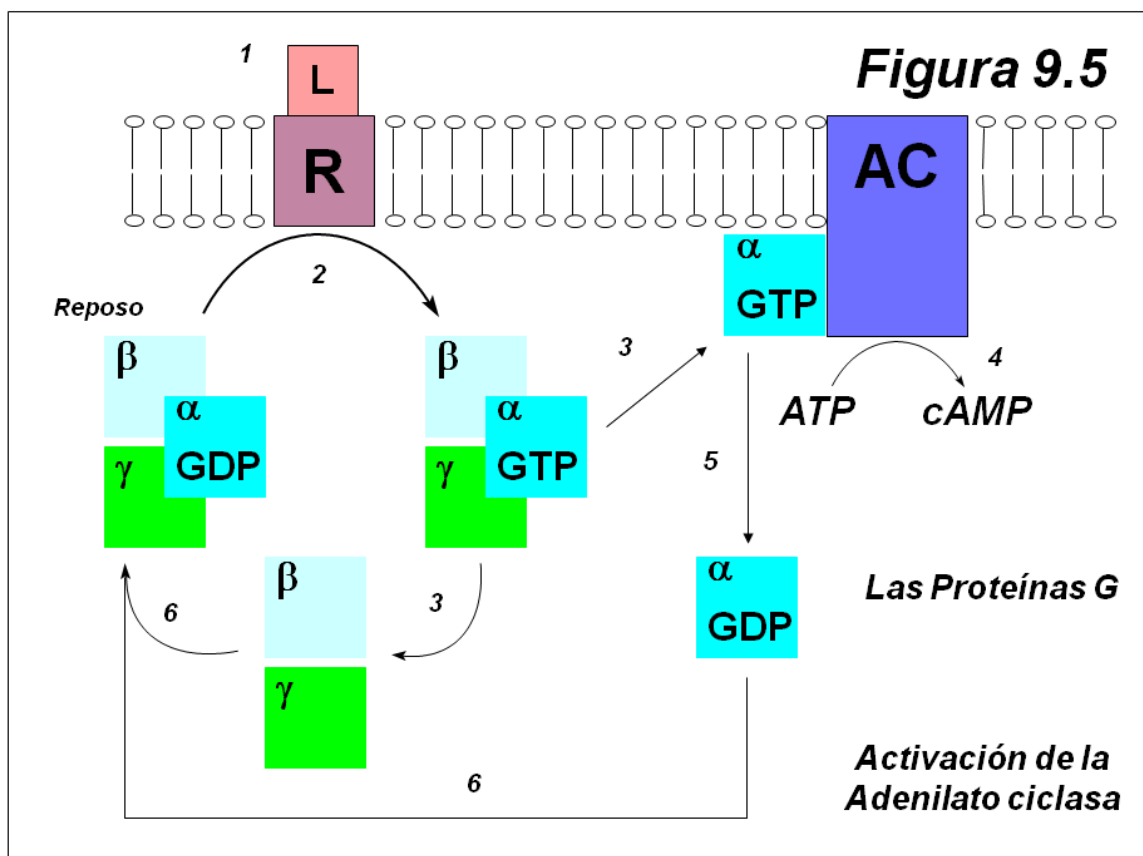
4. La protein kinase A es activada por un segundo mensajero, el AMP cíclico (cAMP), producto a su vez de la *adenilato ciclasa*, enzima que produce cAMP a partir de ATP (figura 9.4).



La activación de la protein quinasa, a diferencia de las tres etapas anteriores, no se produce por fosforilación de la enzima. En estado inactivo, la protein quinasa A consta de cuatro subunidades iguales dos a dos: dos catalíticas (C) y dos regulatorias (R) de modo que la estructura cuaternaria puede ser descrita como R_2C_2 . En presencia de cAMP, éste se une a las subunidades en razón de dos moléculas de cAMP por cada subunidad R, dando lugar al complejo $[(cAMP)_2R]_2$. Esta unión resulta en la disociación de las dos subunidades catalíticas (2C) que son activas en la fosforilación de la fosforilasa quinasa.

5. El cAMP es producido por la forma activada de la adenilato ciclasa, enzima asociada a la membrana celular y que es activada por *proteínas G*. Las proteínas G representan un sistema muy difundido en la transducción de señales (ver más adelante) y que opera como *amplificador y temporizador* de la señal. En el caso del sistema de la fosforilasa, las proteínas G son el puente entre el receptor externo y la adenilato ciclasa.

En la figura 9.5 se esquematiza el funcionamiento de las proteínas G. Se trata de una proteína heterotrimérica compuesta de tres subunidades, α , β y γ . La subunidad α es capaz de fijar nucleótidos de guanina (GDP o GTP) con muy alta afinidad.



En estado de reposo, las tres subunidades están unidas y la subunidad α está ocupada por GDP. Cuando un ligando L se une al receptor R (1), la subunidad α intercambia GDP por GTP (2). Al fijarse el GTP a la subunidad α ésta se disocia de las otras dos, que quedan formando un dímero $\beta\gamma$ (3) mientras que α -GTP se une a la adenilato ciclasa (AC), activándola de manera que convierte ATP en cAMP (4). Esta activación dura

mientras el nucleótido unido a la subunidad α sea GTP. Ahora bien, esta subunidad α tiene actividad GTPasa, de manera que el GTP fijado va convirtiéndose en GDP poco a poco (**5**). Cuando esto ocurre, la subunidad α -GDP se disocia de la adenilato ciclasa y vuelve a unirse al dímero $\beta\gamma$ (**6**), con lo que se restablece la situación de reposo. Si el ligando L persiste unido al receptor R, se produciría un nuevo ciclo de activación.

Recapitulemos ahora la cascada de activación de la glucógeno fosforilasa pero en sentido inverso:

1. El ligando L (puede ser, por ejemplo, adrenalina o glucagon) se une al receptor R.
2. La unión ligando-receptor determina el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G.
3. La subunidad α de la proteína G, unida a GTP, se disocia de las otras dos ($\beta\gamma$). la subunidad α -GTP, por su parte, se une a la adenilato ciclasa (AC) y la activa, produciéndose cAMP a partir de ATP.
4. La adenilato ciclasa funcionará mientras persista el GTP unido a la subunidad α . Ésta tiene actividad GTPasa que va hidrolizando poco a poco el GTP para dar GDP. En ese momento, la subunidad α se disocia de la AC y vuelve a unirse al dímero $\beta\gamma$.
5. El cAMP provoca la disociación de las subunidades regulatorias de las catalíticas en la protein kinasa A. Éstas, una vez separadas, promueven la activación por fosforilación de la fosforilasa kinasa.
6. La fosforilasa kinasa fosforila a la Ser 14 de la fosforilasa, que queda así bloqueada en su estado R, plenamente activada e insensible a efectores alostéricos.

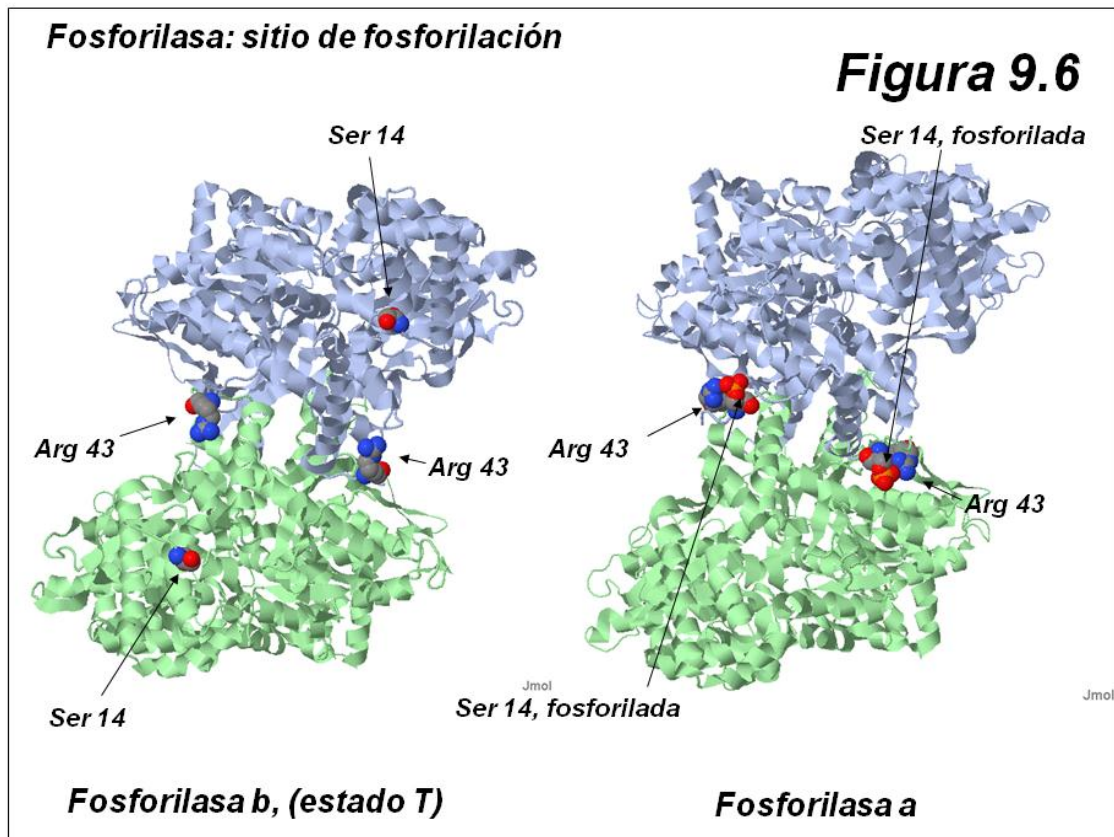
9.2.3 Mecanismos moleculares en el sistema de la glucógeno fosforilasa

9.2.3.1 Glucógeno fosforilasa

Ya vimos antes que cuando la enzima es aislada de fuentes naturales se presenta normalmente en la forma de homotetrámero. Ahora bien, se cree que la forma plenamente activa en la célula es el homodímero, esto es, dos subunidades iguales relacionadas a través de un eje binario de simetría. Cada subunidad tiene 842 aminoácidos y un peso molecular en torno a los 96 kDa. Vimos también que la enzima tiene dos formas: la fosforilasa **a**, fosforilada en el residuo Ser 14, y fosforilasa **b**, defosforilada. Esta última, por su parte, es una enzima alostérica, con cooperatividad en la fijación de sustratos y efectos heterotrópicos mediados por AMP (activador) e así como por ATP y glucosa-6-fosfato (inhibidores). La fosforilasa **b** sigue el modelo de **Monod-Wyman-Changeux** y se presenta por tanto en dos formas: la forma T, inactiva, que fija efectores negativos, y la forma R, activa, capaz de fijar activadores.

Por los estudios del grupo ya citado de **L.N.Johnson**, tenemos una visión bastante clara de la estructura y función de esta enzima. Los resumimos a continuación.

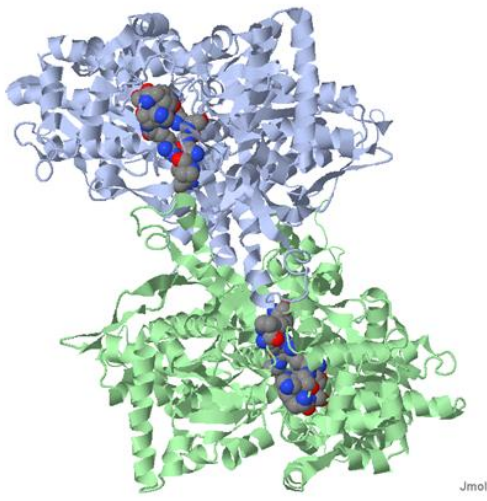
1. La figura 9.6 muestra la comparación entre la fosforilasa **b** al estado T y la fosforilasa **a**. El cambio conformacional se aprecia en la posición de los residuos Ser 14 y Arg 43, muy separados en la fosforilasa **b** (estado T). La fosforilación de la serina introduce un grupo fuertemente electronegativo (el fosfato) y se produce un cambio conformacional de tal manera que Arg 43, con carga electropositiva, pasa a estar adyacente al grupo negativo del fosfato.



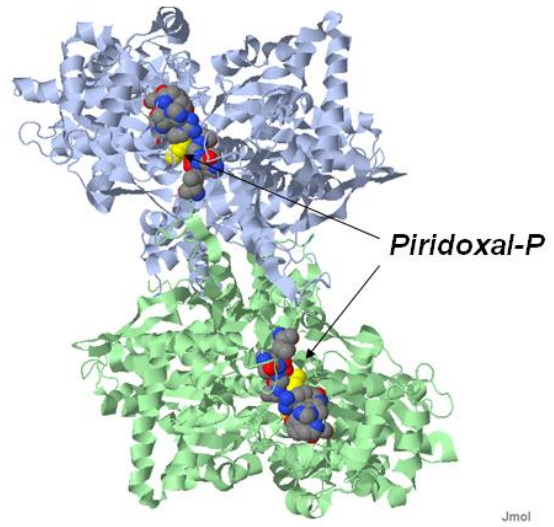
2. Este mismo cambio conformacional se puede apreciar (aunque no entraremos en detalles) en el sitio del sustrato (figura 9.7), con piridoxal fosfato fijado al mismo en la fosforilasa **a**, y sobre todo, en el sitio alostérico (figura 9.8), cuya configuración es completamente distinta en la fosforilasa **b** que en la fosforilasa **a**.

Fosforilasa: sitio del sustrato

Figura 9.7



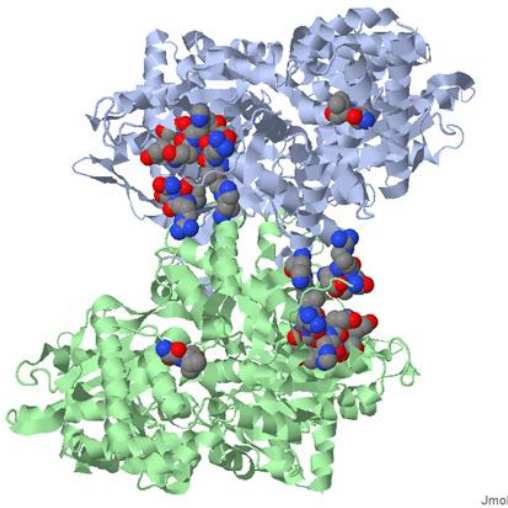
Fosforilasa b, (estado T)



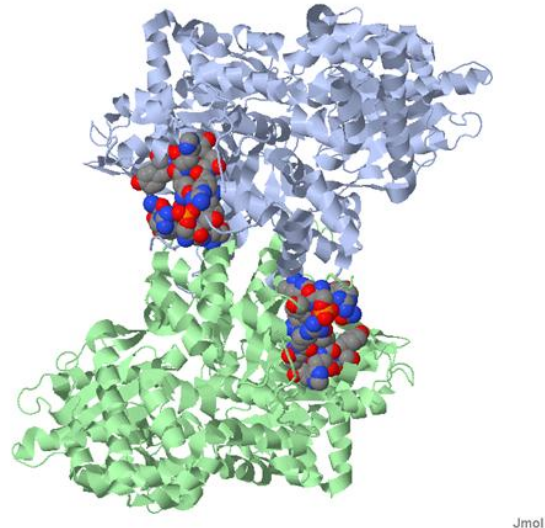
Fosforilasa a

Fosforilasa: sitio alostérico

Figura 9.8



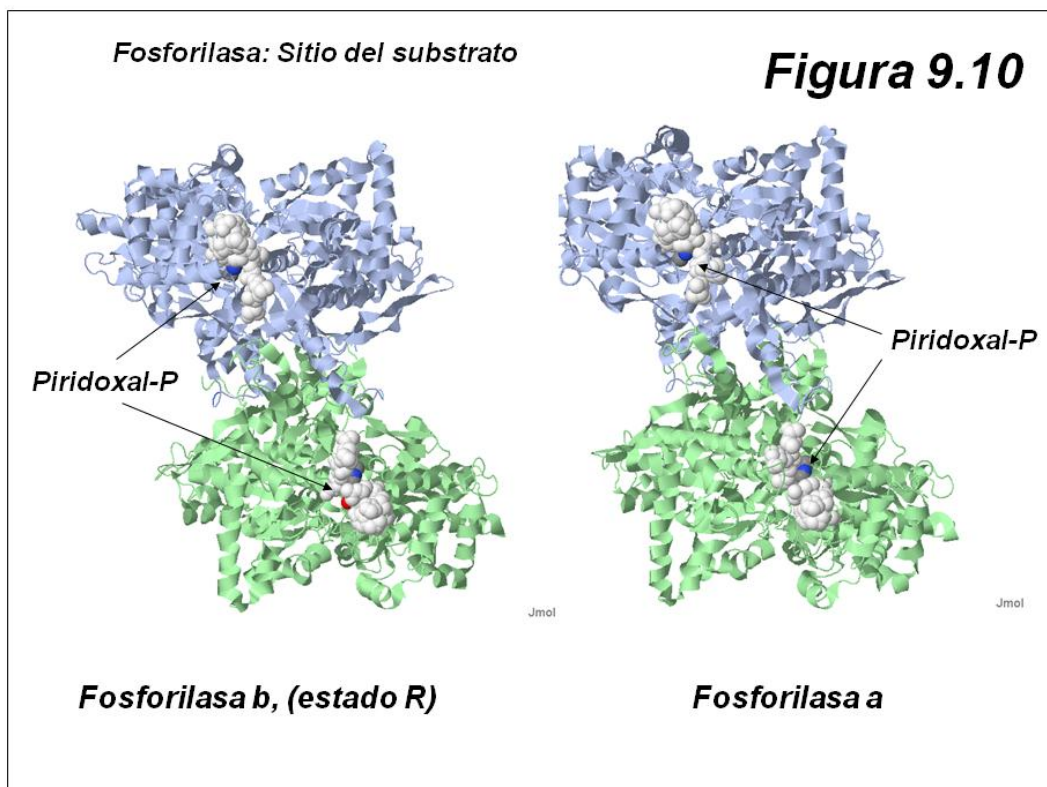
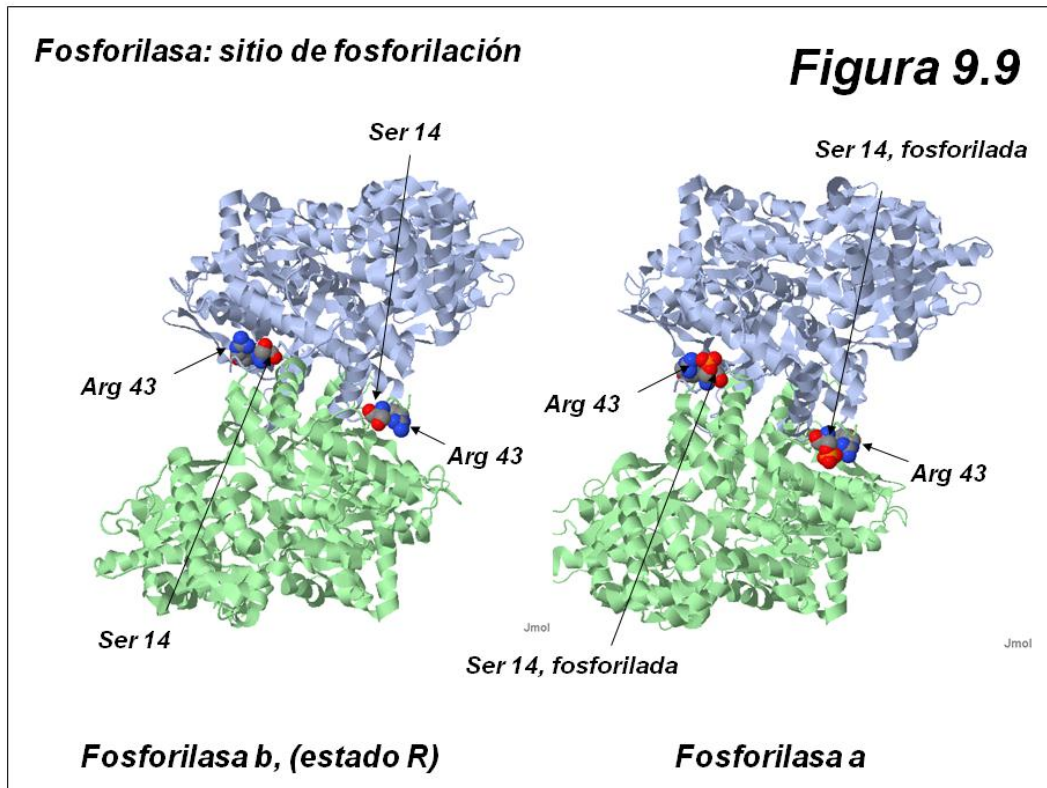
Fosforilasa b, (estado T)

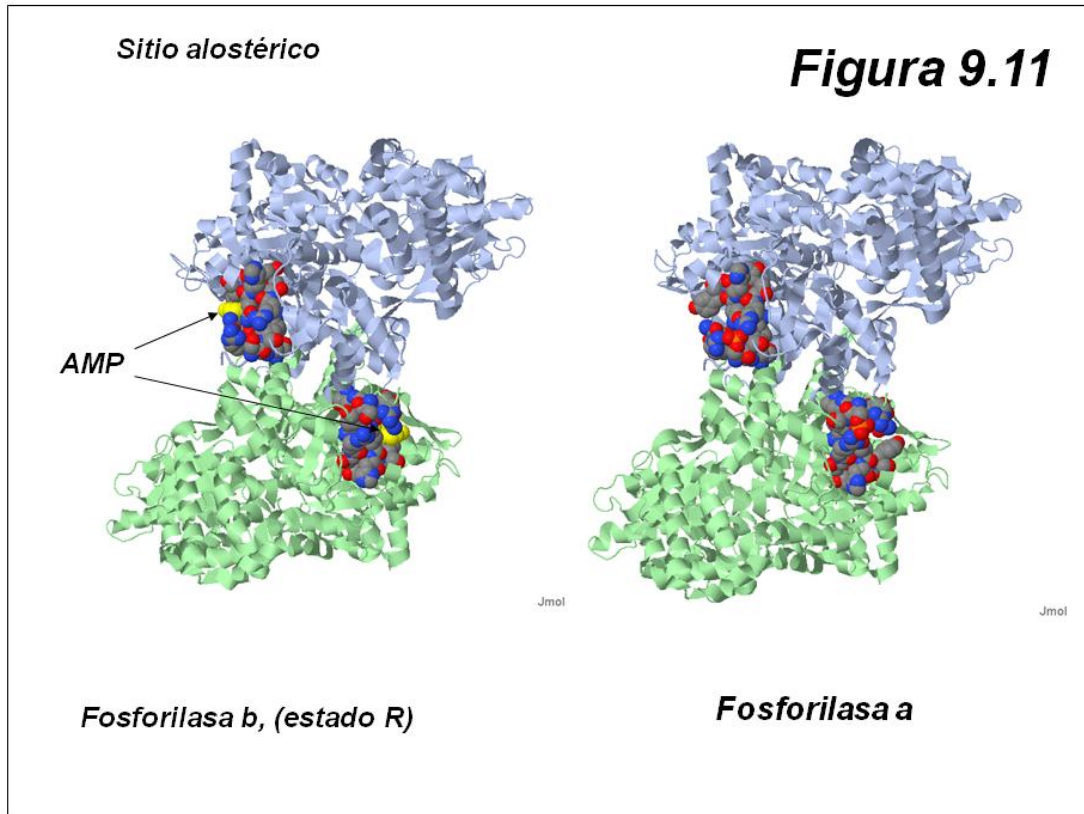


Fosforilasa a

3. Cuando la fosforilasa **b** es activada alostéricamente por AMP, sufre un cambio

conformacional y pasa al estado R. En ese estado, la estructura molecular es prácticamente idéntica a la de la fosforilasa a, tal como se ilustra para el sitio de fosforilación (figura 9.9), para el de fijación de sustrato (figura 9.10) o el sitio alostérico (figura 9.11).

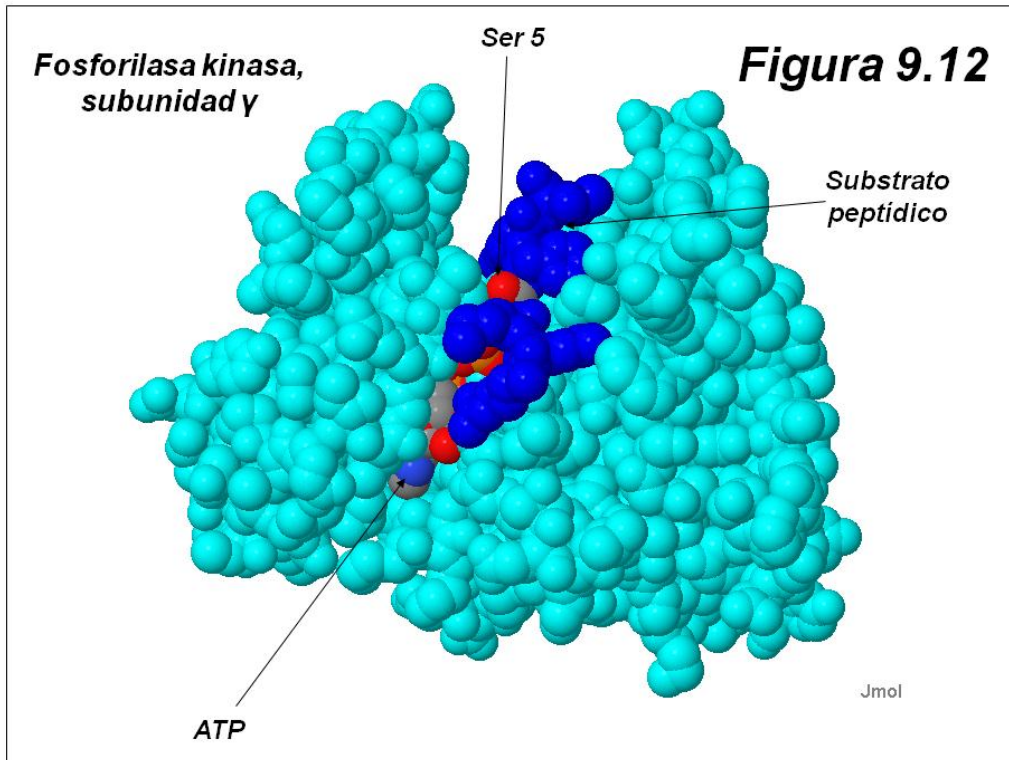




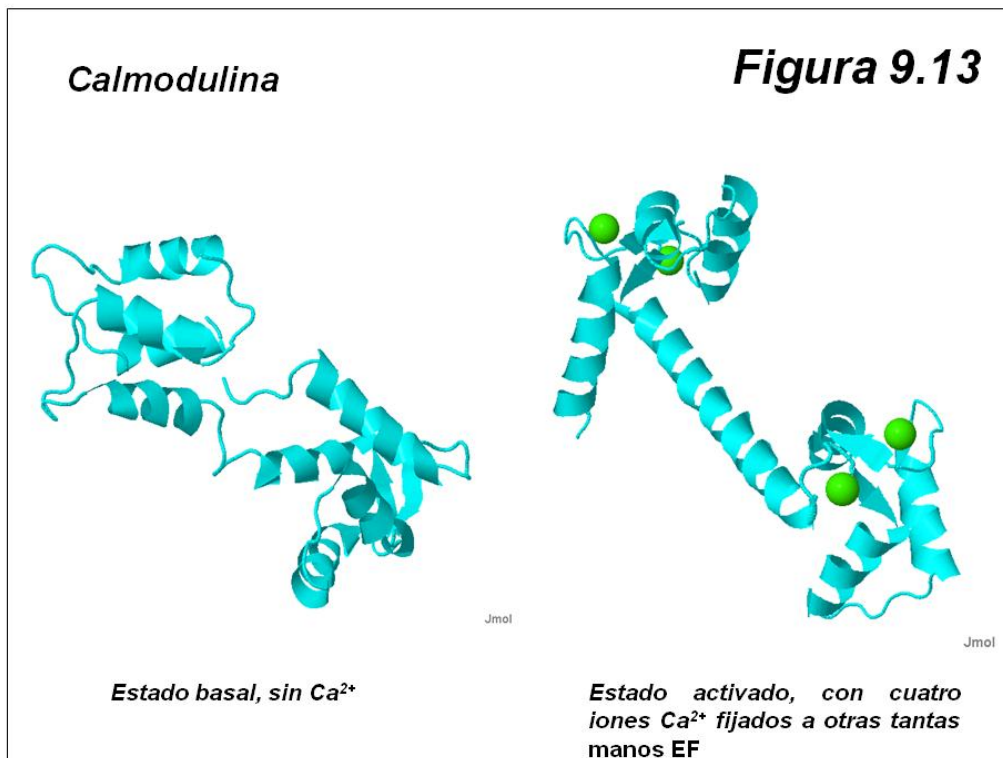
9.2.3.2 Fosforilasa kinasa

La fosforilasa kinasa es una proteína muy grande. La enzima muscular tiene una estructura cuaternaria $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ y está sometida a dos tipos de control:

- Por una parte, la propia fosforilasa kinasa puede ser *fosforilada* por una *proteín kinasa* (proteín kinasa A), siendo esta reacción dependiente de cAMP, como veremos a continuación. La forma fosforilada es de alta actividad frente a la defosforilada.
- La actividad enzimática radica en la subunidad γ (figura 9.12) En condiciones de defosforilación, las subunidades α y β ejercen un efecto inhibitorio sobre la subunidad catalítica γ . Cuando la proteín kinasa fosforila a las subunidades α y β se elimina esta influencia inhibitoria.



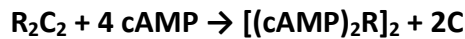
- La enzima puede también ser activada por el sistema Ca^{2+} -calmodulina (en concreto, la subunidad δ es la proteína conocida como *calmodulina*). Esta activación tiene particular importancia en el caso de la enzima muscular (figura 9.13). Recuérdese, a este respecto, que es el Ca^{2+} quien desencadena la contracción muscular a nivel intracelular. Asimismo, el ion Ca^{2+} es segundo mensajero en muchos otros sistemas de transducción de señal.



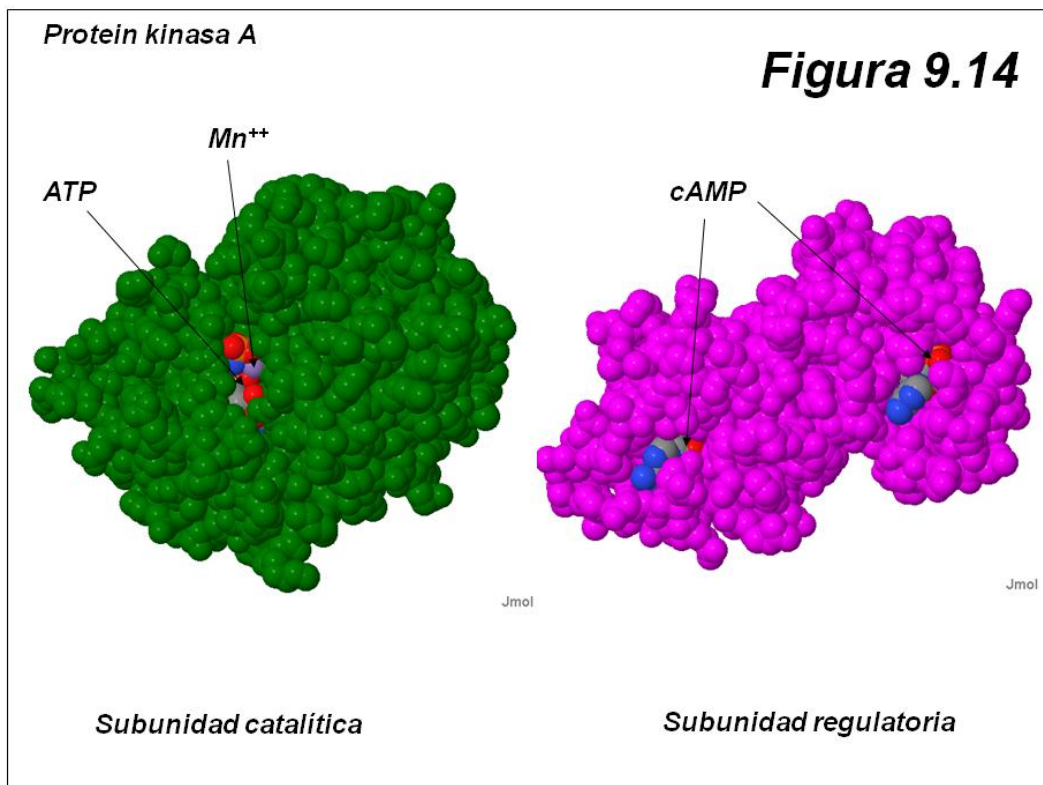
9.2.3.3 Protein kinasa A

De entre las aproximadamente mil protein kinasas conocidas hasta ahora, reciben el nombre de *protein kinasas A* las que son activadas por cAMP (3'5' *adenosin monofosfato cíclico*, figura 9.4).

Esta enzima se mantiene en estado inactivo en ausencia de cAMP. La holoenzima inactiva es un tetrámero que consta de cuatro subunidades, iguales dos a dos, que son las subunidades R (regulatorias) y las subunidades C (catalíticas), por lo que podemos representar su estructura cuaternaria como R_2C_2 . En presencia de cAMP la enzima se disocia según la reacción



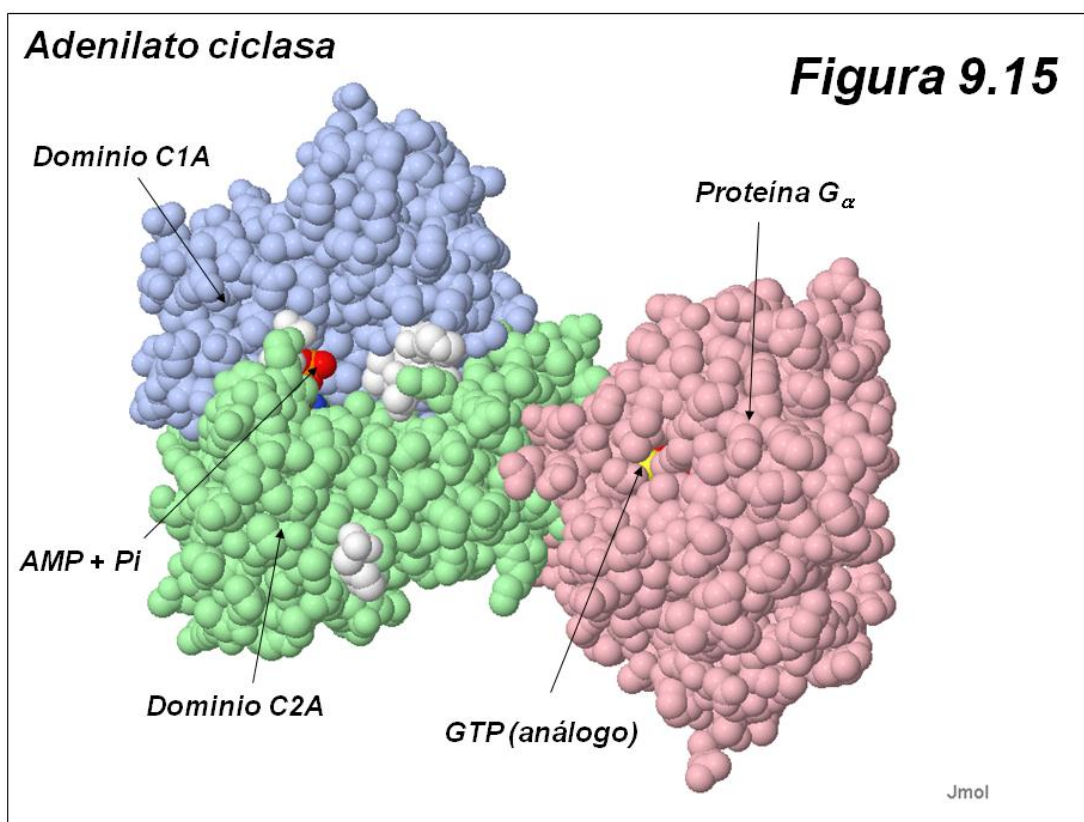
siendo las subunidades C liberadas las formas catalíticamente activas de la enzima. Estas subunidades son capaces de fosforilar, en una reacción dependiente de ATP, a la fosforilasa kinasa. Los estudios cristalográficos de la protein kinasa A nos han permitido conocer su estructura, que se presenta en la figura 9.14. La subunidad C (catalítica) aparece con un sustrato fijado (ATP) y el ion Mn^{2+} . La subunidad R (regulatoria) aparece con dos moléculas de cAMP (activador) fijadas a la misma.



9.2.3.4 Adenilato ciclasa

Cataliza la reacción de formación del nucleótido cíclico cAMP a partir de ATP, tal como se presenta en la figura 9.4.

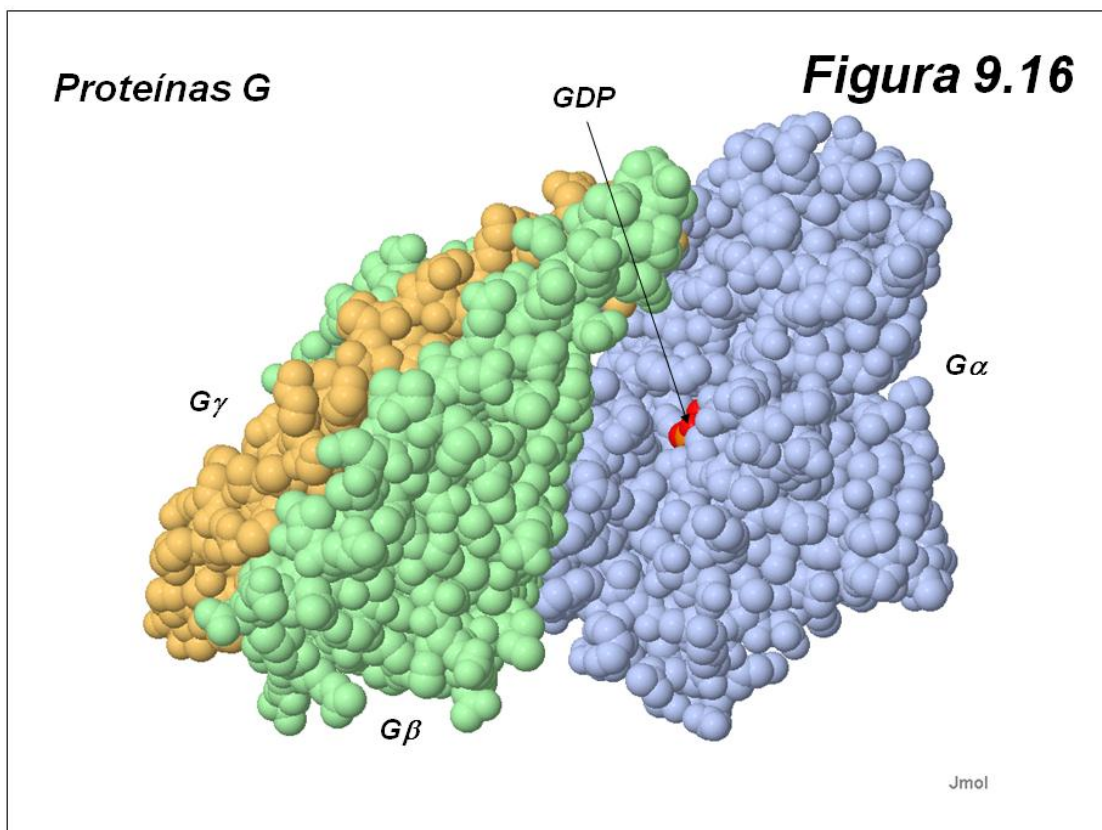
La adenilato ciclasa es una proteína integral de membrana, y se activa a través de la interacción con el sistema de *proteínas G*, en concreto con la subunidad α de las mismas unidas a un GTP, tal y como se describe en el apartado siguiente. Conocemos la estructura molecular de la adenilato ciclasa, que se presenta en la figura 9.15. Consta de dos dominios (C1A y C2A). El centro activo está localizado en la unión de los dos dominios, y se presenta cocrystalizado con AMP y Pi (fosfato inorgánico) y con la subunidad α de las proteínas G con un análogo de GTP fijado (ver a continuación), que es el elemento activador de la enzima.



9.2.3.5 Proteínas G

Las proteínas G son una familia de proteínas heterotriméricas, constituidas por tres subunidades distintas: subunidad α (39-46 kDa), subunidad β (37 kDa) y subunidad γ (8 kDa). La subunidad α puede fijar con gran afinidad nucleótidos de guanina (GDP o GTP). La estructura se presenta en la figura 9.16. Las subunidades β y γ funcionan normalmente como si fueran una sola. El estado inactivo de la proteína G consiste en la asociación de las tres subunidades, hecho que se da cuando el sitio de alta afinidad de la subunidad α está ocupado por GDP. El funcionamiento del sistema está descrito en la figura 9.5.

Se conocen muchas otras proteínas G cuyo funcionamiento es básicamente el mismo, aunque los efectos desencadenados pueden ser muy diferentes (por ejemplo, los impulsos nerviosos ligados a la visión o a la olfacción, la reproducción sexual de las levaduras, los movimientos del hongo *Dyctiostelium*, etc.). En general, suele ser la subunidad α la que determina los diversos tipos conocidos de proteínas G. Entre los sistemas efectores activados o inhibidos por proteínas G, tenemos la adenilato ciclasa (el caso que estamos estudiando), canales iónicos (de Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), fosfolipasas A_2 y C, cGMP fosfodiesterasa, etc. Otras proteínas G caracterizadas hasta la fecha son las G_i (siendo el prototipo la presente en los fotorreceptores retinianos, que recibe el nombre específico de G_t , *transducina*), las G_q (presentes en linfocitos B y T) y las G_{12} (de amplia distribución). Como es lógico, en una misma célula pueden coexistir diversos tipos de proteínas G, asociados al mismo o a distintos receptores de membrana.



De forma característica, la actividad de las proteínas G se ve alterada por ciertas toxinas bacterianas. Así, la *toxina colérica* (de *Vibrio cholerae*, agente productor del cólera) cataliza una ADP-ribosilación de un residuo de Arg específico en la subunidad α . La subunidad modificada queda activada constitutivamente (es decir, de forma continua), puesto que la actividad GTPasa queda inhibida. La *toxina pertussis* (de *Bordetella pertussis*, agente causal de la tosferina) afecta asimismo a las proteínas G promoviendo la ADP-ribosilación de un residuo de Cys, lo cual impide la activación del sistema mediada por el receptor.

Las proteínas G están encuadradas en una superfamilia de proteínas fijadoras de GTP, como por ejemplo el factor de elongación EF- T_u y las proteínas oncogénicas *ras*.

La actividad de las proteínas G está asociada a la ocupación o no de receptores específicos de membrana. En el caso que nos ocupa, existen proteínas G asociadas tanto al receptor de adrenalina (receptor β -adrenérgico) como al receptor de glucagon.

9.2.4 Otras actividades ligadas al sistema de la glucógeno fosforilasa

No daríamos una idea cierta de la verdadera complejidad del mecanismo descrito hasta ahora si no mencionáramos otros sistemas enzimáticos que participan en la regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa. En concreto hemos de estudiar las *protein fosfatasas* y la *cAMP fosfodiesterasa*. Pero además, el sistema de degradación de glucógeno posee muchos puntos de regulación comunes al sistema de síntesis; por tanto, la descripción del sistema sería incompleta si no analizáramos asimismo la regulación de la *glucógeno sintetasa*.

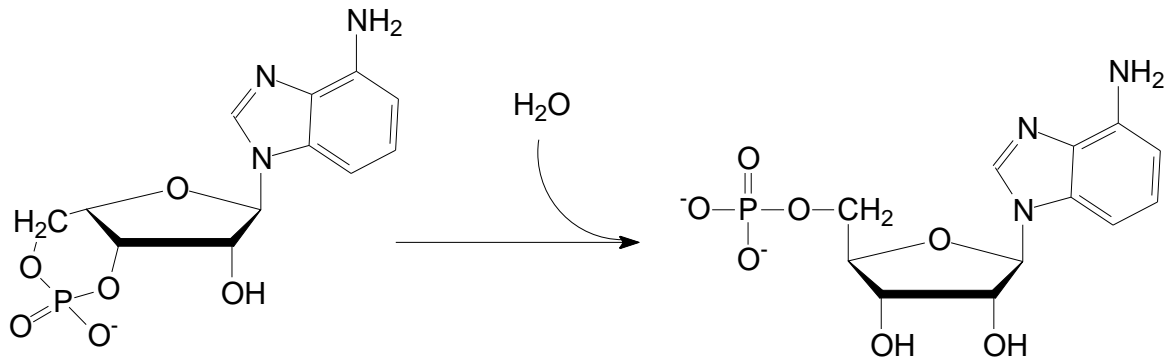
9.2.4.1 Protein fosfatasas

Con niveles de especificidad y respuesta a señales similares a las de las protein kinasas, existen en la célula multitud de *protein fosfatasas* específicas. Las protein fosfatasas catalizan la defosforilación hidrolítica de los residuos hidroxílicos de proteínas fosforiladas por protein kinasas. Se conocen varios tipos de protein fosfatasas (PP1, PP2A, PP2B, PP2C y tirosin fosfatasas) y en el caso que nos ocupa, la glucógeno fosforilasa puede ser defosforilada por la protein fosfatasa propia de este sistema, conocida como PP1. En condiciones de receptores desocupados, la protein fosfatasa es activa y mantiene prácticamente a cero los niveles de fosforilasa activada. Cuando el receptor se ocupa por las señales fisiológicas que hemos visto (adrenalina y glucagon), la propia protein kinasa A inactiva a la PP1.

La PP1, por su parte, es activada por la *insulina*, hormona que a este nivel presenta efectos antagónicos a los de adrenalina y glucagon. Esta activación de la insulina está mediada por protein tirosin kinasas.

9.2.4.2 cAMP fosfodiesterasa

La acción de esta enzima consiste en el ataque hidrolítico al cAMP para dar 5'-AMP:

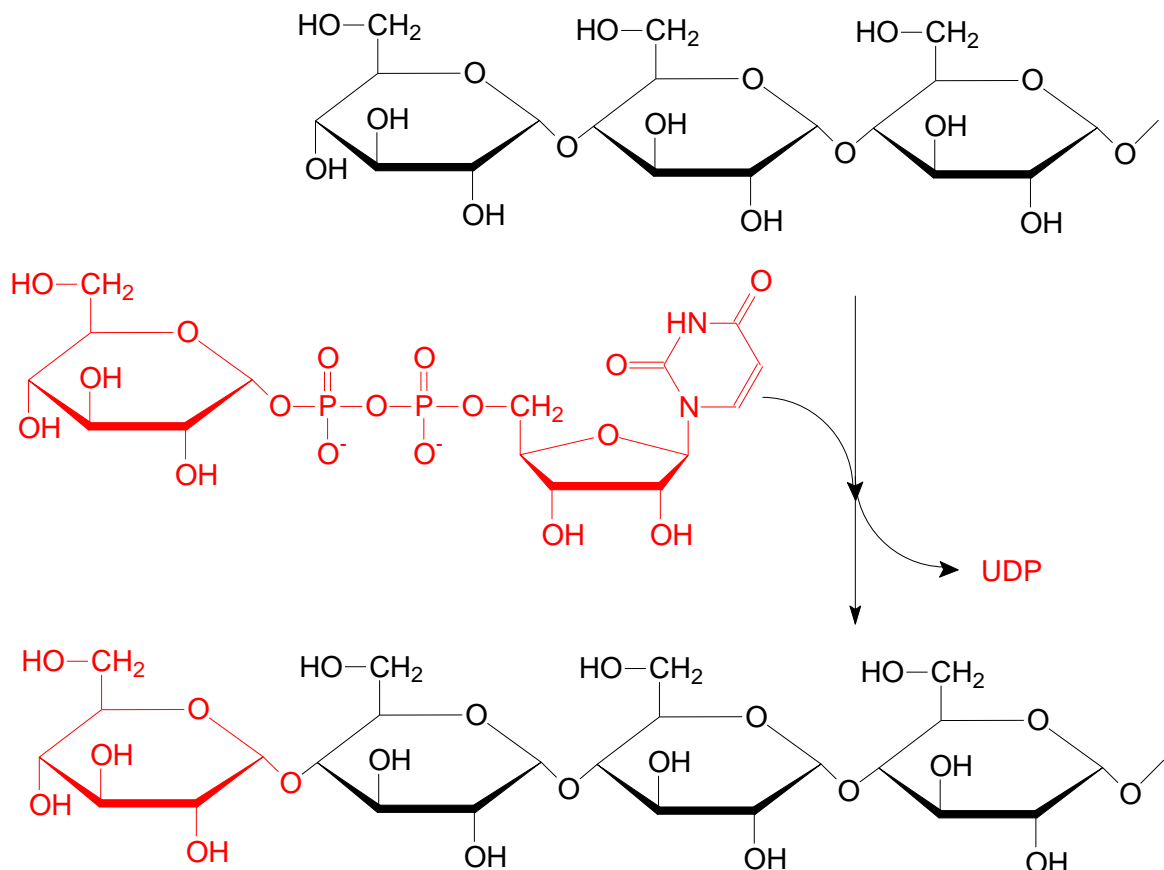


Por lo tanto, el nivel intracelular de cAMP es la resultante de dos acciones enzimáticas contrapuestas: por una parte, la *adenilato ciclasa* que lo sintetiza a partir de ATP; por otra, la *cAMP fosfodiesterasa* que lo degrada a 5'-AMP con la consiguiente pérdida de actividad. A su vez, la fosfodiesterasa puede también ser inhibida a través de fosforilación mediada por *proteín quinasa A (PKA)*.

De manera característica, la *cAMP fosfodiesterasa* es inhibida por las *metil xantinas* (*cafeína*, *teofilina* y *teobromina*), de donde deriva la actividad farmacológica de estos compuestos, consistente en el mantenimiento de niveles altos de cAMP al estar inhibida la *cAMP fosfodiesterasa*, causante de su hidrólisis.

9.2.4.3 Glucógeno sintasa

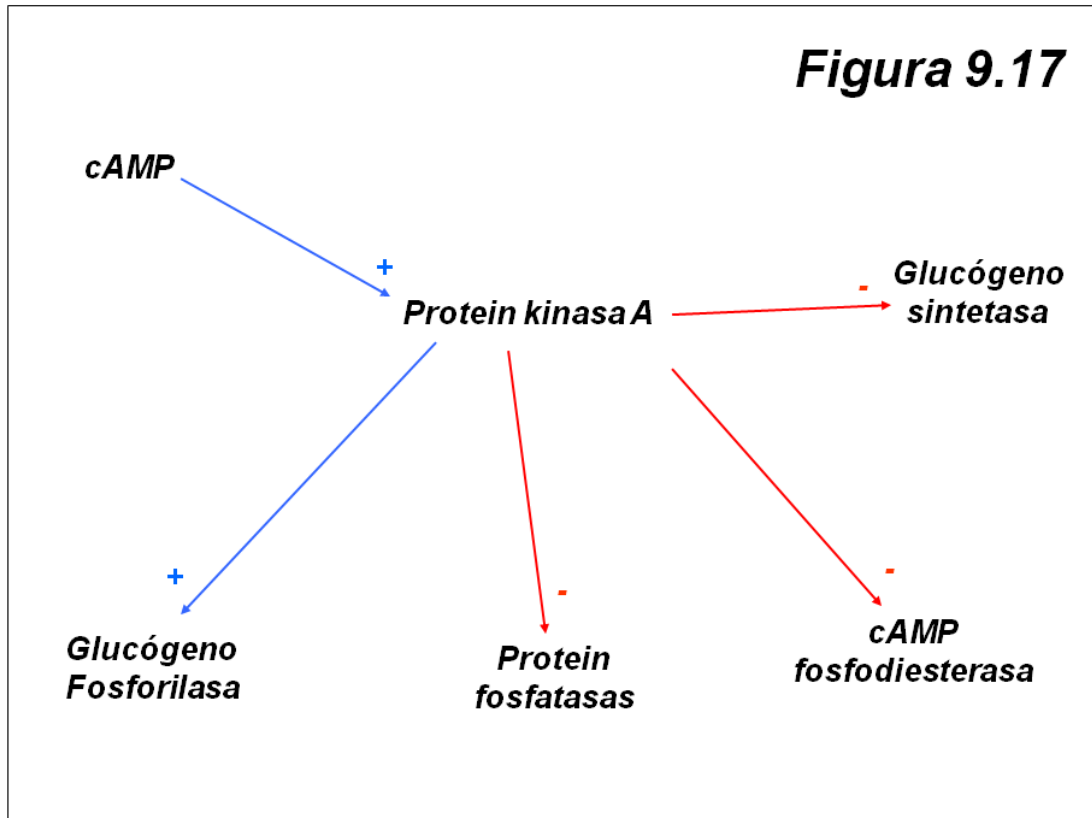
La *glucógeno sintasa* cataliza la transferencia de un residuo de glucosa desde *UDPG* (*uridin difosfato glucosa*) al extremo no reductor de una cadena de glucógeno:



Síntesis de glucógeno mediada por la glucógeno sintasa

Esta enzima se presenta en dos formas, que por analogía con la glucógeno fosforilasa denominamos *glucógeno sintasa a* y *glucógeno sintasa b*. La forma **b** presenta una actividad muy reducida y es activada alostéricamente por glucosa-6-fosfato. Esta forma de la enzima se presenta fosforilada en un residuo de serina, siendo la protein kinasa A la responsable de esta fosforilación. La glucógeno sintasa **a**, por su parte, tiene niveles muy altos de actividad y no está fosforilada. Puede observarse aquí cómo las diferentes señales tienen efectos antagónicos: la fosforilación mediada por protein kinasa A activa a la fosforilasa e inactiva a la sintasa. Esta es la respuesta normal a adrenalina y glucagón; por el contrario, la respuesta a insulina consiste en la inactivación de la fosforilasa y la activación de la sintasa, gracias al efecto estimulador de esta hormona sobre la protein fosfatasa 1 (PP1).

Un resumen de estas actividades coordinadas se presenta en la figura 9.17. La activación por protein kinasa mediada por cAMP activa a la fosforilasa e inhibe a las protein fosfatasas y a la glucógeno sintasa.



9.3 Otros sistemas de fosforilación de proteínas

Como ya se dijo anteriormente, la fosforilación de residuos específicos en la proteína (enzimática o no) es el modo preferente de regulación de actividad por modificación covalente. En el apartado anterior hemos estudiado con cierto detalle el sistema de la glucógeno fosforilasa. Este sistema fue históricamente el primero en ser descrito y nos ha valido para la introducción de muchos conceptos útiles en la regulación por modificación covalente y en la transducción de señales. Ahora bien, no es, ni mucho menos, el único. A lo largo de los apartados que siguen analizaremos los principales sistemas conocidos de fosforilación de proteínas, con la advertencia previa de aunque sean presentados por separado, las interacciones entre los mismos son extremadamente frecuentes y por tanto difíciles de sistematizar.

9.3.1 Protein kinasas A

Las protein kinasas A (PKA) son enzimas que responden característicamente a la acción del cAMP, y la fosforilasa estudiada en el apartado anterior es el ejemplo clásico de las mismas.

9.3.2 Protein kinasas G

Son un tipo de protein kinasas que responden a la elevación intracelular del segundo mensajero cGMP (3',5' Guanosina monofosfato cíclico). El sistema mejor estudiado es el del músculo liso. La guanilato ciclasa existente en el músculo liso (en particular el vascular) es activada por el radical libre óxido nítrico (NO[·]); el cGMP producido entonces induce la relajación muscular (y de ahí el efecto hipotensor del NO[·])

El sistema de la protein kinasa G participa asimismo en la transducción del estímulo visual. En condiciones basales, el cGMP mantiene abierto un canal iónico de Na⁺. La activación por la rodopsina excitada de un sistema de proteínas G (conocida en este caso como *transducina*) da lugar a la activación de una fosfodiesterasa que hidroliza el cGMP a 5'-GMP. De esta manera baja el nivel intracelular de cGMP y se cierra el canal de Na⁺, dando lugar al impulso nervioso. (Ver Biomoléculas, cap. 6, *Retinoides*)

9.3.3 Protein kinasas C

La protein kinasa C es una enzima de 77 kDa, y fosforila residuos de serina y treonina en muchas proteínas diana. Consta de un dominio catalítico y otro regulatorio. Responden a una gran variedad de señales, entre las que destacan el estímulo a la proliferación celular, y de ahí su potencial oncogénico (productor de cáncer). La actividad de la PKC queda enmarcada en un sistema complejo de regulación en el que participan varios segundos mensajeros, especialmente DAG (*diacilglicerol*), *inositolfosfatos* y calcio.

La interacción de la señal primaria con el receptor de membrana extracelular estimula la acción de la fosfolipasa C, que al actuar sobre fosfoinosítidos de membrana libera *diacilglicerol*, por un lado, e *inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃)*, por otro. Este último actúa liberando iones de calcio a partir de sus depósitos intracelulares.

El DAG activa directamente a la protein kinasa C, siendo esta acción mimetizada por los *ésteres de forbol*, compuestos carcinógenos presentes en el aceite de crotón y que se emplean experimentalmente para inducir una activación sostenida de la protein kinasa C, ya que no se degradan con la rapidez del DAG, del que actúan como análogos.

La actividad de la protein kinasa C sobre la diferenciación y proliferación celular se comprende precisamente por la acción de estos compuestos.

9.3.4 Protein kinasas dependientes de calcio-calmodulina

La unión de calcio a la proteína *calmodulina* activa la función de diversas protein kinasas, entre otras muchas enzimas. Las protein kinasas activadas por calcio

fosforilan a un gran número de proteínas intracelulares. Aquí estudiaremos brevemente las funciones de dos sistemas muy relacionados: el sistema calcio-calmodulina y los inositolfosfatos.

9.3.4.1 El sistema calcio-calmodulina

Los niveles intracelulares de calcio iónico (Ca^{2+}) son bajos por la abundancia de ésteres fosfóricos en el interior de la célula, ya que el producto de solubilidad de fosfatos cálcicos tiene un valor muy reducido. Todas las células poseen *bombas de Ca^{2+}* , esto es, sistemas de transporte encargados del mantenimiento del nivel intracelular de este ion. Las bombas de Ca^{2+} operan tanto en la membrana plasmática como en las membranas organelares (mitocondrial, sarcoplásmica, etc.).

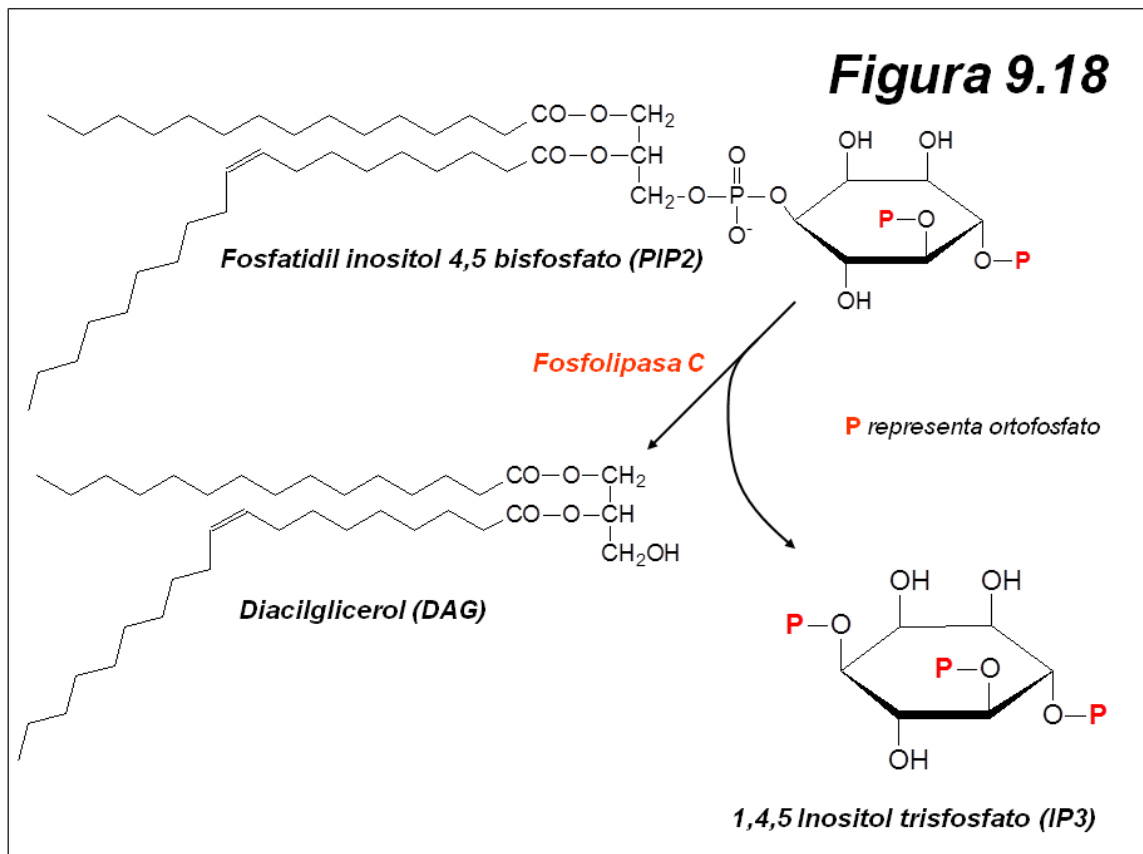
Muchas funciones celulares pueden activarse a través de un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} causado por (a) la apertura de canales en la membrana plasmática o (b) La movilización del calcio secuestrado en las vesículas del retículo endoplásmico. El ejemplo clásico de la modalidad (a) es la liberación de neurotransmisores inducida por Ca^{2+} en los terminales sinápticos de las neuronas. La contracción del músculo esquelético, por su parte, es un ejemplo del segundo de los mecanismos citados.

El Ca^{2+} participa como segundo mensajero en muchos otros procesos: movilización de glucógeno y lípidos, liberación de neurotransmisores, contracción muscular y motilidad de cilios y flagelos. La concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma es del orden de 10^{-7} M; pero unido a lo que está en reservorios sube a 1 mM. Muchos mensajes hormonales inducen la liberación de este calcio secuestrado.

El Ca^{2+} se fija con gran afinidad a grupos de oxígeno cargados (p.e. aniones carboxílicos) y no cargados (carbonilos), lo que le permite inducir cambios conformacionales importantes en las proteínas. Gran parte de las acciones desencadenadas por el Ca^{2+} se deben a su unión con una proteína específica, la *calmodulina* (figura 9.13) Bien sea como entidad aislada o formando parte de proteínas oligoméricas (como el caso ya visto de la fosforilasa kinasa), la calmodulina sufre un importante cambio conformacional al fijar Ca^{2+} del que resultan sus diversas acciones. La calmodulina es una proteína fijadora de calcio de 17 kDa; consiste en dos dominios globulares unidos por un tramo largo en α -helicoide; cada dominio tiene dos *manos EF*, motivo estructural propio de muchas proteínas fijadoras de Ca^{2+} . La mano EF consiste en dos tramos en α -helicoide separados por un tracto de 12 aminoácidos, cinco de los cuales son dicarboxílicos (Asp o Glu). La calmodulina consta de cuatro manos EF, formando dos lóbulos con dos manos cada uno separados de una tracto largo en α -helicoide. La unión del Ca^{2+} a los aminoácidos dicarboxílicos de cada una de las cuatro manos EF induce un importante cambio conformacional en el calmodulina que de esta manera transmite el mensaje a otras proteínas (figura 9.13).

9.3.4.2 Inositolfosfátidos

Los inositolfosfátidos de la membrana plasmática participan de forma muy activa en la transducción de señales hormonales a través de la membrana plasmática. El *fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato (PIP₂)*, que constituye hasta un 8 % de los lípidos de membrana da lugar a través de hidrólisis a tres segundos mensajeros hormonales (figura 9.18): (a) Inositol 1,4,5 trisfosfato (IP₃); (b) diacilglicerol (DAG); y eventualmente también a (c) ácido araquidónico, presente en la posición sn-2, que puede ser sustrato de la ciclooxigenasa (dando lugar a prostaglandinas y tromboxanos) o de la lipooxigenasa (con formación de leucotrienos) (v. *Biomoléculas*, cap. 4).



El IP₃ liberado se une a un receptor específico del retículo endoplásmico, según hemos visto más arriba, lo que conduce a una liberación de iones Ca²⁺ desde el mismo hacia el citoplasma, los cuales llevan a cabo diferentes efectos, entre ellos la activación de protein kinasas calcio-calmodulina dependientes. El DAG, por su parte, activa a la protein kinasa C según hemos visto anteriormente.

9.3.5 Protein tirosin kinasas

Otro tipo de protein kinasas son las protein tirosin kinasas (PTK), que se caracterizan precisamente porque la fosforilación dependiente de ATP se lleva a cabo sobre residuos fenólicos de tirosina y no sobre serina o treonina como los vistos hasta ahora. Una característica distintiva de estas protein kinasas es su capacidad de autofosforilación. Las protein tirosin kinasas son activadas por *factores de crecimiento*

e *insulina*, y responden por autofosforilación en múltiples residuos de Tyr.

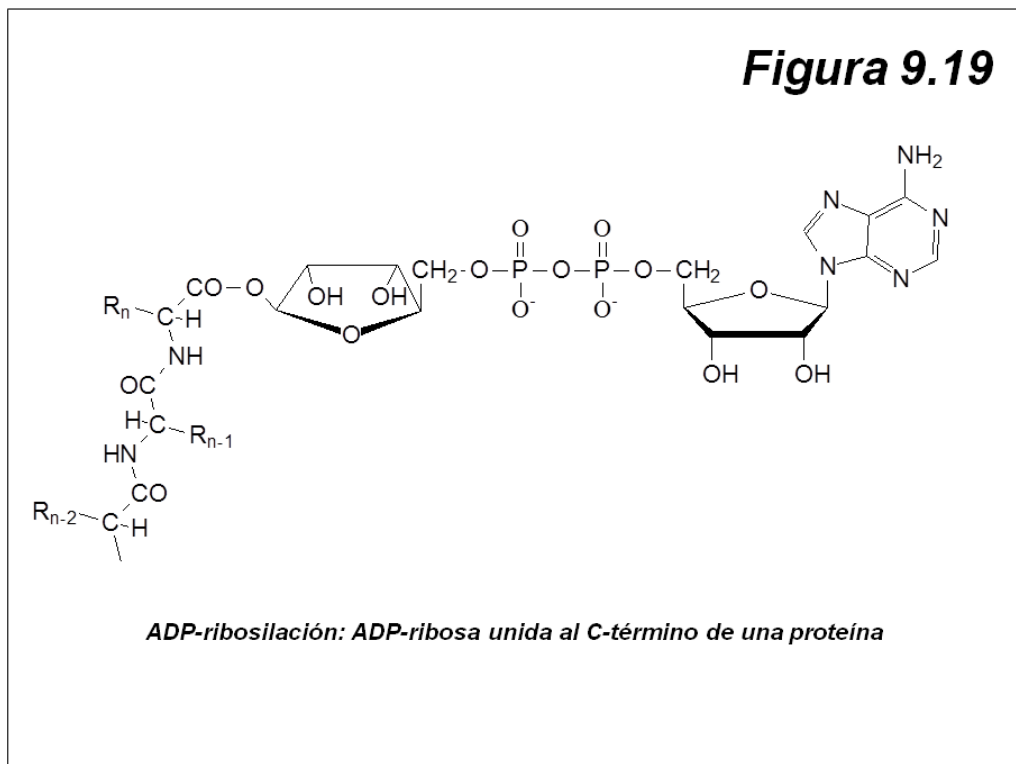
Varios experimentos han demostrado un papel de las proteínas *ras* (producto del protooncogen del mismo nombre) en la transducción de señales ligada a receptores PTK. Se requiere activación de éstas para la mitogénesis inducida por diversos factores de crecimiento (y de ahí su potencial oncogénico)

Son receptores PTK asimismo muchos productos genéticos asociados a la ontogenia de *Drosophila* y del nematodo *Coenorhabditis elegans*.

9.4 Otras formas de modificación covalente

9.4.1 ADP-ribosilación

Se trata de un proceso de modificación covalente de enzimas y proteínas en general que consiste en la transferencia de ADP-ribosa desde NAD^+ a grupos aceptores presentes en las proteínas, liberándose el anillo de nicotinamida en el proceso, y que está catalizada por las llamadas *ADP-ribosil transferasas*, según se indica en la figura 9.19. En el proceso se libera nicotinamida.



El grupo transferido se une a diversos grupos de la proteína: cadenas laterales de glutamato, arginina o cisteína o bien al carboxilo terminal de la proteína, y la

transferencia se hace normalmente de forma múltiple, apareciendo moléculas de poli(ADP-ribosa)-proteína. Parece ser que esta forma polimérica es la habitual; la enzima modificada puede aparecer unida hasta un total de más de 1000 residuos de ADP-ribosa.

Las ADP-ribosil transferasas se encuentran en el núcleo y en el citoplasma de células eucarióticas, como componentes de toxinas bacterianas y como parte de un mecanismo que inactiva la síntesis proteica en ciertas bacterias infectadas por fagos. Los procesos que son objeto de ADP-ribosilación son suficientemente importantes y básicos en la célula como para asignar una gran relevancia al proceso de ADP-ribosilación; no obstante, la significación fisiológica de este proceso, salvo algunas excepciones, es por hoy desconocida. Vamos a ver brevemente alguna de las reacciones modificadas por ADP-ribosilación.

1. La reparación del DNA. Los mecanismos de reparación de anomalías en la molécula de DNA son un proceso importantísimo, que tiene lugar de forma constante en la célula debido a la relativa fragilidad de la molécula. Estos mecanismos tienen que ver también con los procesos de envejecimiento. La ADP-ribosilación forma parte de los mismos.

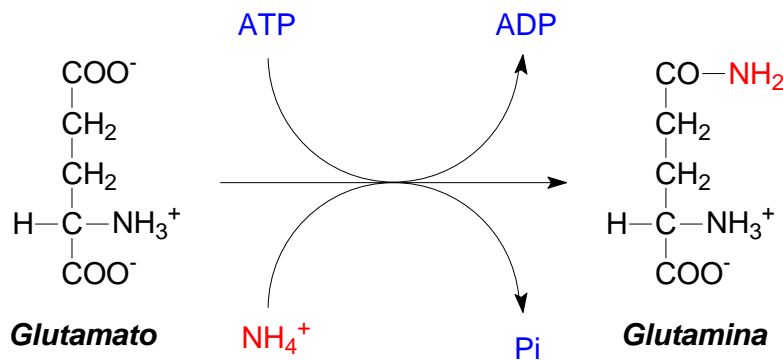
2. Se ha comprobado asimismo que la ADP-ribosilación de histonas produce cambios en el estado de condensación de la cromatina; parece ser que la ADP-ribosilación disminuye el grado de interacción entre histonas y DNA en el nucleosoma, haciendo así que aquél sea accesible a enzimas de reparación u otros procesos.

3. La ADP-ribosilación de proteínas citoplásmicas parece ser un mecanismo más de control de la síntesis proteica ribosómica.

4. La acción de toxinas bacterianas está en muchos casos ligados a procesos de ADP-ribosilación. Así, la toxina diftérica (de *Corynebacterium diphtheriae*) promueve la ADP-ribosilación del factor de elongación EF-2 en eucariotas y EF-G en bacterias, inactivando de esta forma la síntesis proteica en la célula atacada. Ya vimos anteriormente también la acción de la toxina colérica y de la toxina pertussis.

9.4.2 Adenilación y Uridilación

La enzima glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2, Glutamato-amonio ligasa) cataliza la incorporación de amoníaco NH_3 al grupo carboxilo de la cadena lateral de ácido glutámico en una reacción dependiente de ATP, dando lugar a glutamina:



Acción de la Glutamina sintetasa

Esta reacción es central en el metabolismo del nitrógeno, ya que el aminoácido glutamina opera como donador de nitrógeno en una gran cantidad de reacciones metabólicas, por lo que el papel biosintético de esta reacción es importantísimo. A título de ejemplo, y entre otras, la glutamina participa en los siguientes procesos:

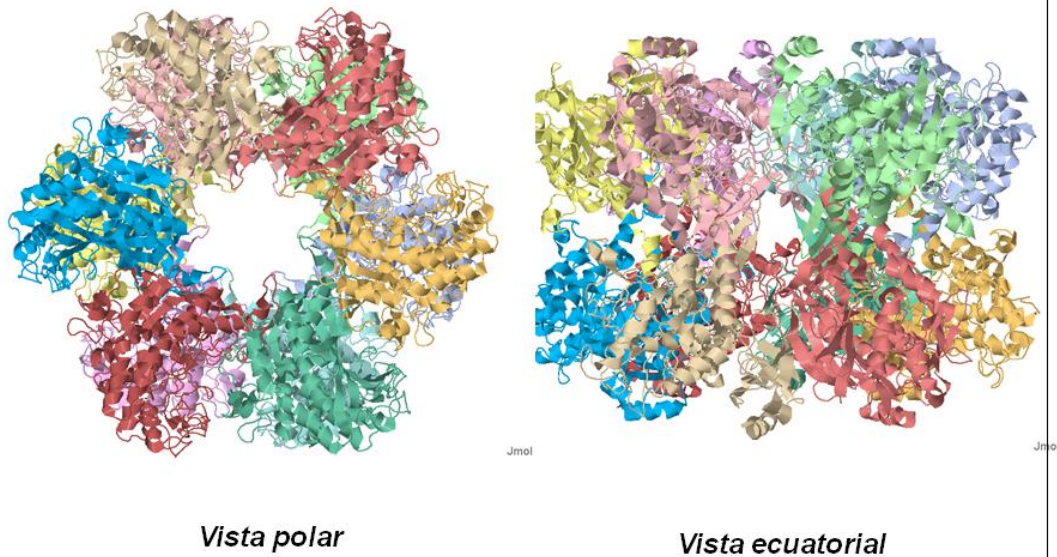
- Biosíntesis del anillo purínico, incorporando el N3 y N9 del anillo.
- Biosíntesis de GMP a partir de IMP, en la vía de síntesis de nucleótidos purínicos.
- Biosíntesis de carbamilo-fosfato en el ciclo de la urea y en la formación del anillo pirimidínico
- Formación de CTP a partir de UMP en la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos.
- Biosíntesis de diversos aminoácidos, en las que participa directa o indirectamente: histidina, triptófano, alanina, serina y glicina.
- Biosíntesis de glucosamina-6-fosfato en el proceso de formación de oligo- y polisacáridos complejos.

Igualmente, la reacción de la glutamina sintetasa tiene un papel fundamental en la detoxificación del NH_3 . El déficit de esta actividad enzimática contribuye de manera decisiva al desarrollo del *coma hepático* en las insuficiencias terminales de este órgano.

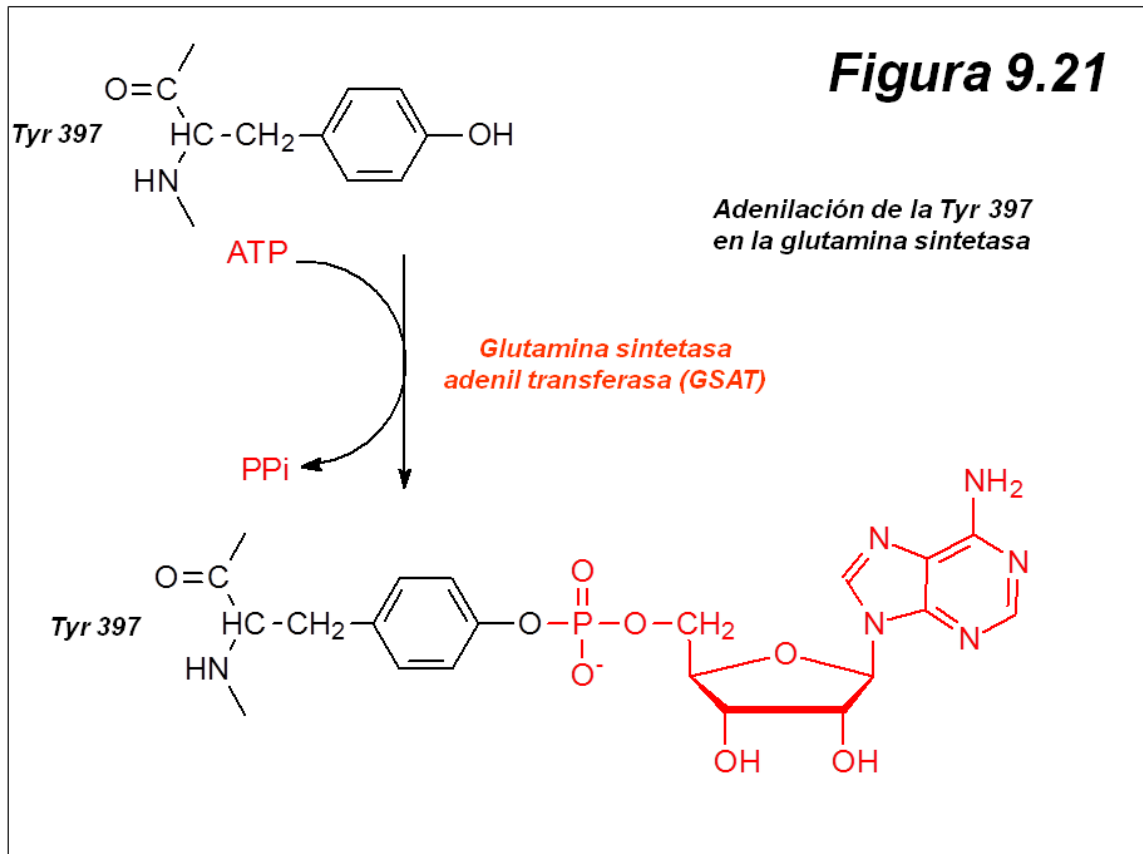
No es de extrañar, pues, que el papel central de esta enzima en el metabolismo nitrogenado requiera un control muy estricto de su actividad. La enzima es muy compleja y está formada por doce subunidades idénticas, cada una con una masa molecular de 51 kDa, que se agrupan en dos hexámeros apilados uno sobre otro (figura 9.20).

Glutamina sintetasa

Figura 9.20



Además de diversos controles alostéricos, la glutamina sintetasa está asimismo sometida a un control covalente de su actividad. Por acción de la enzima *glutamina sintetasa adenil transferasa* (GSATasa) se transfiere el grupo adenil (AMP) desde el ATP al residuo de Tyr 397 presente en cada una de las subunidades, según la reacción que se presenta en la figura 9.21. La enzima adenilada se hace mucho más sensible a los efectores alostéricos, por lo que esta modificación se traduce en un descenso significativo de su actividad.



A su vez, la acción de la GSATasa está controlada por otra proteína, la proteína P, cuya acción está regulada a su vez por modificación covalente. Esta proteína existe en dos estados, P_A y P_D.

La forma P_A estimula la adenilación, y consiguiente inactivación, de la glutamina sintetasa. La diferencia entre las dos formas de esta última proteína estriba en que P_D contiene un residuo de ácido uridílico (UMP) unido a una cadena lateral de Tyr en cada una de sus cuatro subunidades. Es decir, otra modificación covalente que en este caso es una *uridilación*.

9.5 Activaciones proteolíticas: Zimógenos digestivos

Muchos sistemas enzimáticos del organismo deben permanecer en estado de inactividad por diversas razones. Tal es el caso de las *enzimas proteolíticas digestivas* que se producen en el estómago (pepsina) y en el páncreas (tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasas A y B), así como los diversos factores de la coagulación de la sangre. De no ser así se correría el riesgo de una destrucción generalizada de los tejidos, en el primer caso, y de una coagulación intravascular diseminada en el

segundo. Pero al mismo tiempo estos sistemas deben poder ser activados rápidamente ante diversas señales, y a una escala fisiológica, superior en magnitud a la celular. Por ello se trata, particularmente en el segundo caso, de complejos sistemas en cascada capaces de pasar al estado activo en períodos de tiempo muy cortos. En uno y otro sistema las formas inactivas corresponden a *proenzimas* o *zimógenos*, proteínas de mayor tamaño que la enzima activa. El fenómeno de activación consiste en una *rotura proteolítica* del zimógeno, altamente específica, que expone al exterior un centro activo que estaba oculto, y acompañada a veces de un reordenamiento molecular bastante considerable.

9.5.1 Pepsina

La pepsina es una enzima digestiva producida por las células principales de la mucosa gástrica en forma de un zimógeno inactivo, el *pepsinógeno*. La pepsina es el prototipo de las *proteasas ácidas*, caracterizadas por tener varios residuos ácidos en el centro activo y tener óptimos de pH muy bajos. A este respecto, la pepsina es excepcional por cuanto su pH óptimo de acción está alrededor de 2. En su centro activo hay dos residuos de aspartato.

El pepsinógeno, por su parte, contiene toda la secuencia de aminoácidos de la pepsina y un *segmento precursor* N-terminal de 44 aminoácidos. Este segmento debe ser eliminado para dar lugar a la enzima activa. La eliminación es espontánea a pH menor de 5. El centro activo enzimático aparece en la conformación correcta en el pepsinógeno, pero queda oculto por el segmento precursor. En éste encontramos seis cadenas laterales de aminoácidos dibásicos (Lys y Arg) en interacción salina con residuos de aspártico y glutámico presentes en el segmento enzimático de la molécula. Al disminuir el pH los grupos ácidos se protonan, pierden carga y cesan las interacciones salinas; en ese momento, el propio centro activo hidroliza un enlace peptídico específico separando al precursor del segmento enzimático. Este mecanismo explica la activación espontánea de la pepsina a pH ácido.

9.5.2 Tripsina

La tripsina y el resto de las enzimas digestivas pancreáticas se producen en las células acinares de este órgano, muchas de ellas en forma de zimógenos inactivos y almacenados en *gránulos de zimógeno* que se sitúan en la porción apical de la célula acinar. Ante un estímulo adecuado (como la hormona gastrointestinal *colecistoquinina/pancreozimina*), los gránulos son secretados al duodeno, donde se activan los distintos zimógenos. De la necesidad del almacenamiento en forma inactiva de las enzimas proteolíticas da idea la destrucción del páncreas que puede tener lugar en las *pancreatitis agudas*.

La activación de las enzimas pancreáticas corre a cargo de la propia tripsina, para lo

cual ésta debe ser activada previamente por un mecanismo distinto. El tripsinógeno secretado a la luz intestinal sufre un ataque proteolítico por parte de la enzima *enteropeptidasa* que producen las células de la mucosa duodenal. La activación consiste en una rotura altamente específica entre los residuos Lys 6 e Ile 7 del tripsinógeno, con lo cual se libera el hexapéptido N-terminal VDDDDK. Es precisamente la carga negativa de este péptido quien atrae a la enteropeptidasa. La tripsina liberada, por su parte, activa a todos los demás zimógenos pancreáticos, incluido el propio tripsinógeno.

En los tejidos existen asimismo otros mecanismos de defensa contra la proteólisis inducida por serinproteasas. Tal es el caso de la α_1 -antitripsina, proteína de 53 kDa producida por los granulocitos neutrófilos. A pesar de su nombre, esta enzima protege a la elastina de los tejidos conjuntivos de su digestión por elastasa. Se conocen deficiencias genéticas diversas en la molécula de α_1 -antitripsina; una consecuencia característica de todas ellas es la presencia de *enfisema pulmonar* al no poderse prevenir la acción de las elastasa sobre los alvéolos pulmonares. La α_1 -antitripsina pertenece a la superfamilia de las *serpinas*, inhibidores naturales de las serinproteasas.

9.5.3 Quimotripsina

El quimotripsinógeno es una proteína de 245 aminoácidos y cinco disulfuros producida en el páncreas y es activada (como todos los zimógenos pancreáticos) por la tripsina. En este caso, la activación es bastante compleja, en pasos sucesivos que culminan en la forma α -quimotripsina y comprende un importante reagrupamiento de la cadena polipeptídica.

9.6 Activaciones proteolíticas: Coagulación de la sangre

Para terminar este resumen sobre la regulación covalente, consideramos a continuación un proceso de suma importancia para la integridad del organismo, la coagulación de la sangre. Está organizada en gran parte sobre la base de activación en cascada de los llamados factores de la coagulación, que no son sino zimógenos de otras tantas serin proteinasas. En el proceso participan otras proteínas cuya acción por el momento no se conoce con certeza, así como otros factores y unas células especializadas, las *plaquetas*. En esta discusión nos centraremos sobre todo en los aspectos puramente enzimáticos de la coagulación.

Existen en el organismo otros procesos organizados asimismo como cascadas de activación proteolítica, en los que no entraremos: La *fibrinolisis* (proceso de destrucción del coágulo una vez formado) y la *activación del complemento*, proceso desencadenado a partir de reacciones antígeno-anticuerpo cuyo objeto es la destrucción del antígeno.

9.6.1 El proceso de coagulación: generalidades

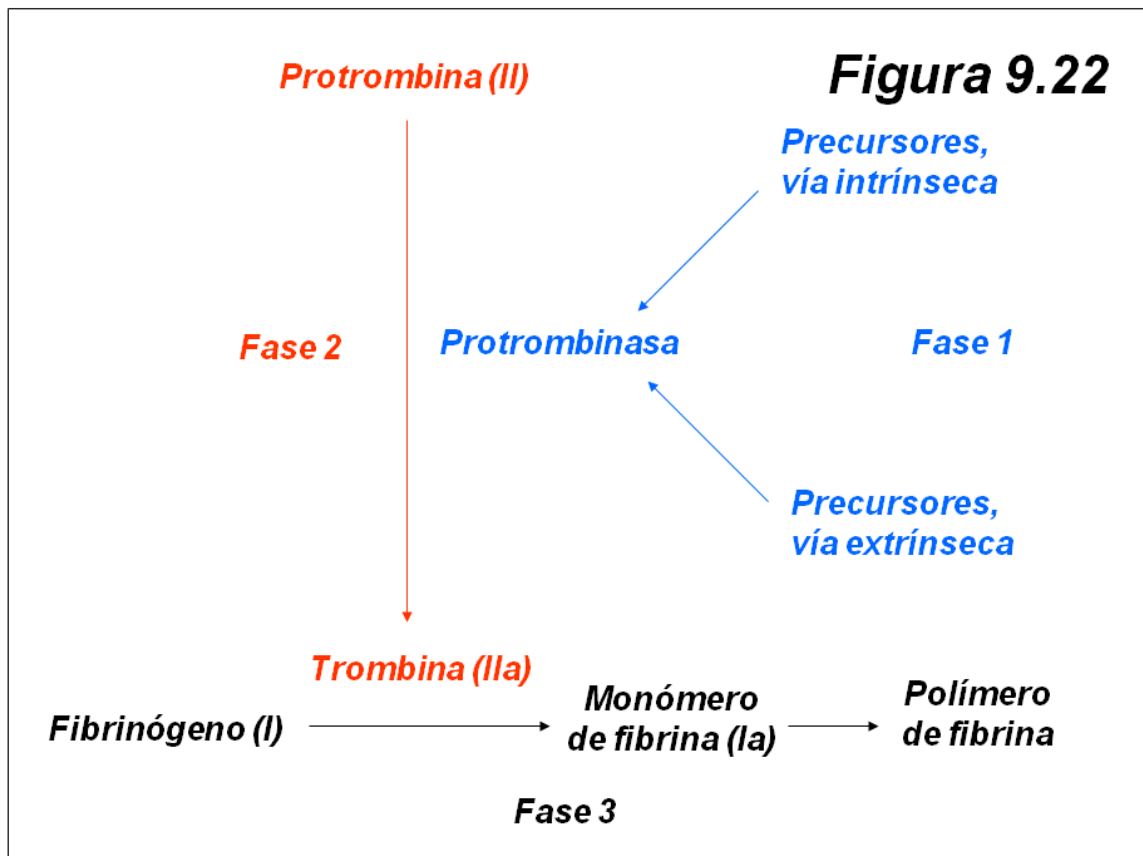
La integridad física del sistema vascular de los animales es una condición indispensable para el mantenimiento de su homeostasis. Tanto las grandes arterias y venas como en particular los capilares están sometidos continuamente a una gran cantidad de traumas mecánicos que de no solventarse darían lugar a una pérdida irreversible de presión en el sistema vascular incompatible con la vida. Pero por otra parte, la formación intravascular de coágulos puede representar asimismo un grave peligro, sobre todo en órganos con vascularización terminal como el miocardio o en órganos que a pesar de poder desarrollar vascularización alternativa tienen funciones tan críticas como para no poder interrumpir su actividad, como es el caso del cerebro y del tejido nervioso en general. Por todo ello, tanto los fenómenos de coagulación de la sangre como de *fibrinolisis* (destrucción del coágulo) son sistemas de modificación covalente (ataque proteolítico) organizados como activaciones en cascada. Ello permite su rápida puesta en marcha y su actuación en dimensiones espaciales muy superiores a las celulares.

Básicamente, la coagulación de la sangre consiste en las siguientes fases (presentadas en sentido cronológico inverso):

1. Formación de una trama polimérica covalente llamada *fibrina* formada por la aposición de *monómeros de fibrina*. A su vez, los monómeros de fibrina se forman por la acción de una serinproteínasa, la *trombina*, que actúa sobre una proteína plasmática denominada *fibrinógeno*, que es incapaz de polimerizarse *per se*.
2. Formación de trombina a partir de su precursor inactivo, la *protrombina*. Este paso está catalizado por el llamado *complejo protrombinasa*, que como veremos no es una única actividad enzimática.
3. Formación del complejo protrombinasa. El complejo protrombinasa puede formarse por dos vías distintas, denominadas *Ruta de Activación por Contacto* (vía intrínseca) y *Ruta del Factor Tisular* (vía extrínseca). La vía intrínseca se produce intravascularmente, cuando la sangre entra en contacto con una superficie anómala. La vía extrínseca se activa cuando la sangre se extravasa, y es significativamente más rápida que la vía intrínseca. Ambas vías convergen en las reacciones finales de esta fase, dando lugar al complejo protrombinasa.

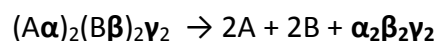
En todas estas fases existen activaciones en cascada de enzimas proteolíticas. En la coagulación de la sangre, los distintos factores proteicos que intervienen se denominan (entre otras formas) con números romanos: factor I, factor II, factor III, etc. Los factores activados proteolíticamente reciben el mismo número con el añadido de la letra **a**; así, el factor XIIa, por ejemplo, representa la forma activada proteolíticamente del factor XII.

Un esquema general del proceso de coagulación se presenta en la figura 9.22. Hay que hacer notar que el esquema completo de la coagulación presenta interacciones entre las tres fases a través de factores comunes. Esta distinción se hace, sobre todo, a efectos didácticos.



9.6.2 Polimerización del fibrinógeno

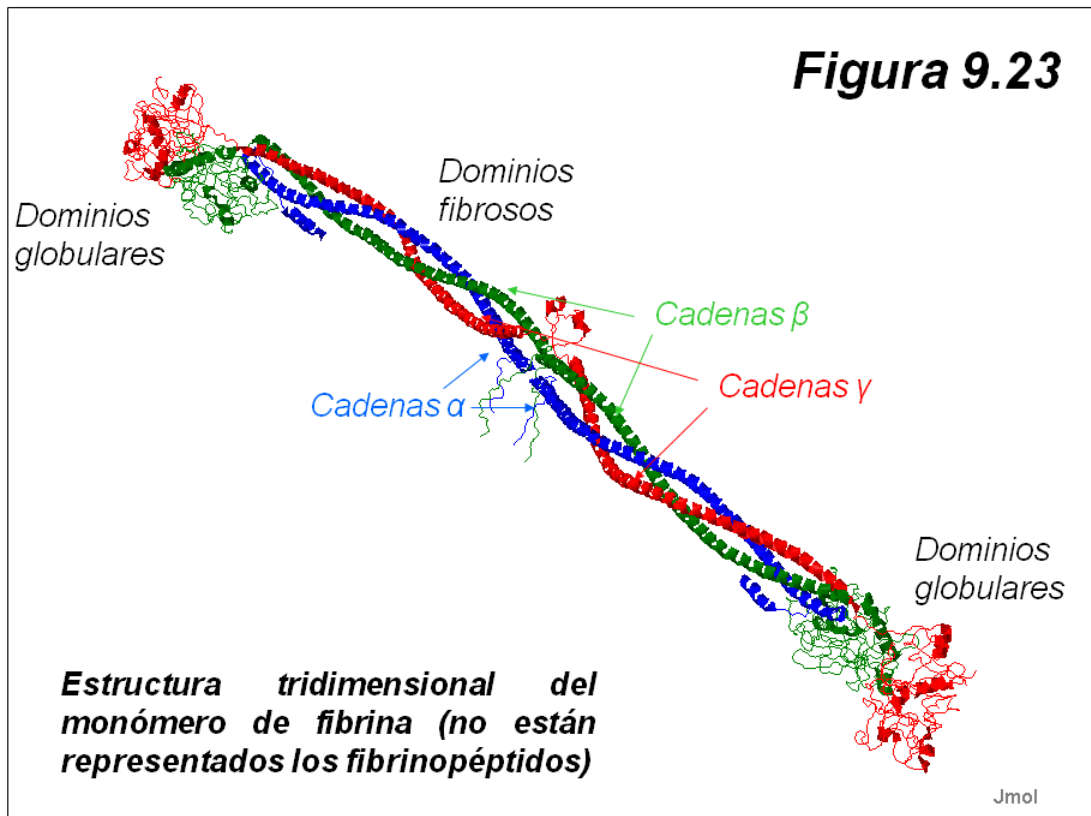
El fibrinógeno (o factor I) es una proteína fibrosa cuyo p.m. es de 340 kDa. Al microscopio electrónico presenta forma de bastón con una longitud de 46 nm. Su estructura cuaternaria consiste en seis subunidades, iguales dos a dos, llamadas $A\alpha$, $B\beta$ y γ ; por ello el fibrinógeno puede representarse como $(A\alpha)_2(B\beta)_2\gamma_2$, estando estas subunidades unidas por puentes disulfuro. La molécula consta de dos dominios globulares en ambos extremos y otros dos en el centro. Estos dominios están unidos por tramos elongados en forma de α -helicoides. Las subunidades $A\alpha$ y $B\beta$ reciben estos nombres porque tras el ataque por la trombina $A\alpha$ da lugar al *fibrinopéptido A* y la subunidad α , mientras que la $B\beta$ rinde *fibrinopéptido B* y subunidad β :



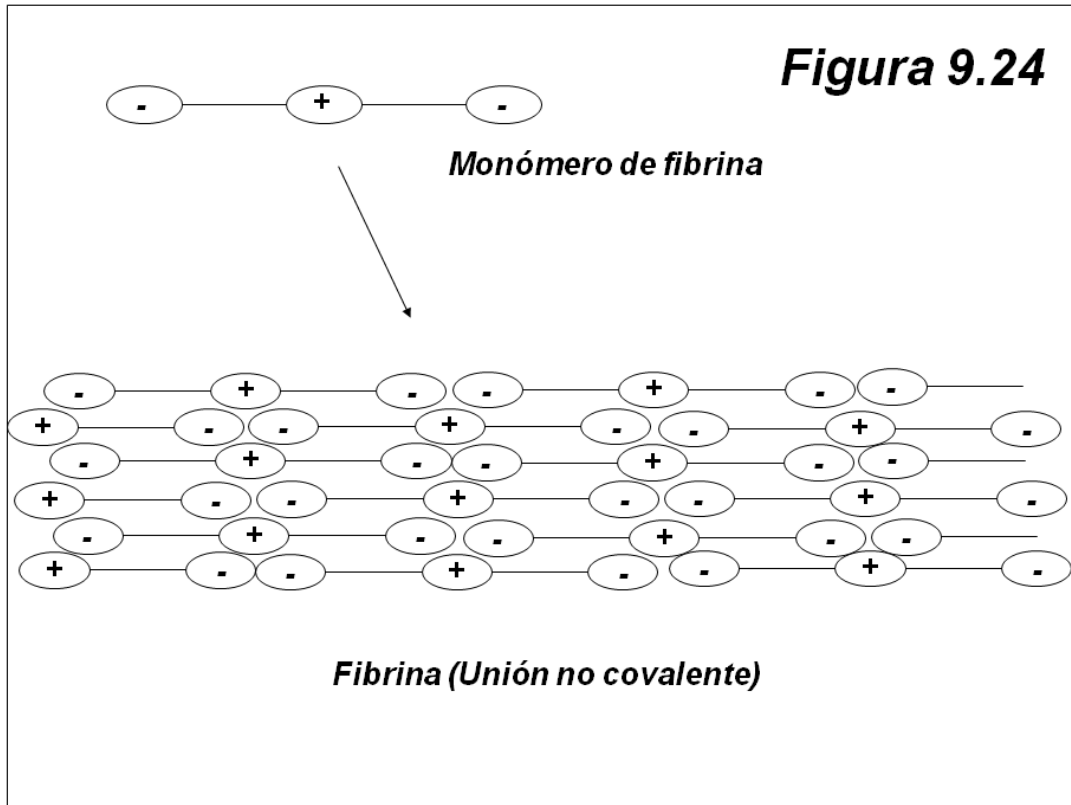
En la molécula intacta, los fibrinopéptidos A y B aparecen en el dominio globular central. Estos dos fibrinopéptidos son ricos en residuos aniónicos (Asp y Glu) así como residuos de tirosina sulfatada, lo que confiere a los mismos una importante densidad de carga electronegativa. Al estado nativo, esta carga negativa del fibrinógeno es la

que impide la agregación intermolecular del mismo por repulsión electrostática de unas moléculas a otras.

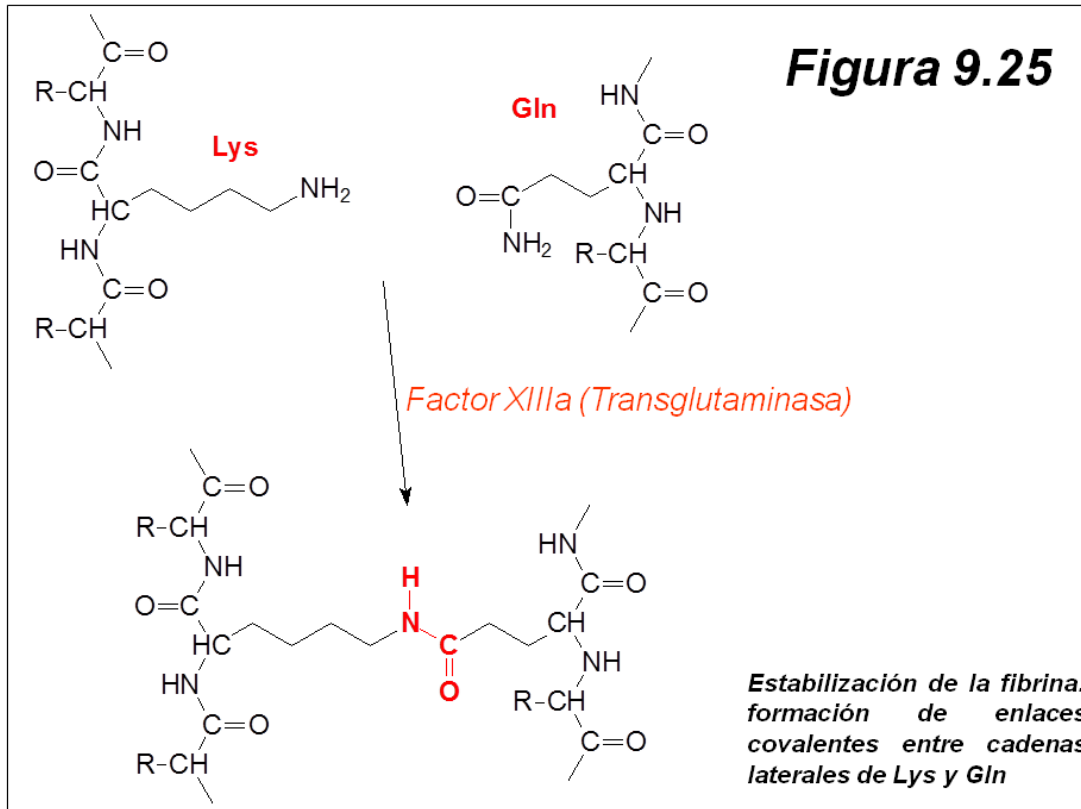
La molécula de fibrinógeno, en el curso del proceso de coagulación, es atacada por la enzima *trombina* (llamada también factor IIa), una serinproteínasa que escinde cuatro enlaces Arg-Gly, situados en las subunidades A α y B β , de manera que se separan dos fibrinopéptidos A (de 18 residuos cada uno) y otros dos fibrinopéptidos B (de 20 residuos cada uno), quedando la molécula de fibrinógeno convertida en *monómero de fibrina* (factor Ia), cuya estructura es $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, y cuya estructura tridimensional (figura 9.23) se ha podido resolver por cristalografía de rayos X.



La separación de los fibrinopéptidos elimina la repulsión electrostática que se da entre las moléculas nativas de fibrinógeno. Los monómeros forman entonces agregados no covalentes, según se indica en la figura 9.24.



La formación definitiva del coágulo de fibrina tiene lugar cuando se establecen enlaces covalentes entre los distintos monómeros de fibrina. Estos enlaces se establecen entre cadenas laterales de Lys y Gln, en un proceso catalizado por la *transglutaminasa*, también llamada factor XIIIa o *factor estabilizador de la fibrina*. La transglutaminasa es asimismo activada por la trombina, que actúa sobre el factor XIII, zimógeno precursor de la transglutaminasa, para dar lugar al factor XIIIa. La estabilización del coágulo se representa en la figura 9.25.

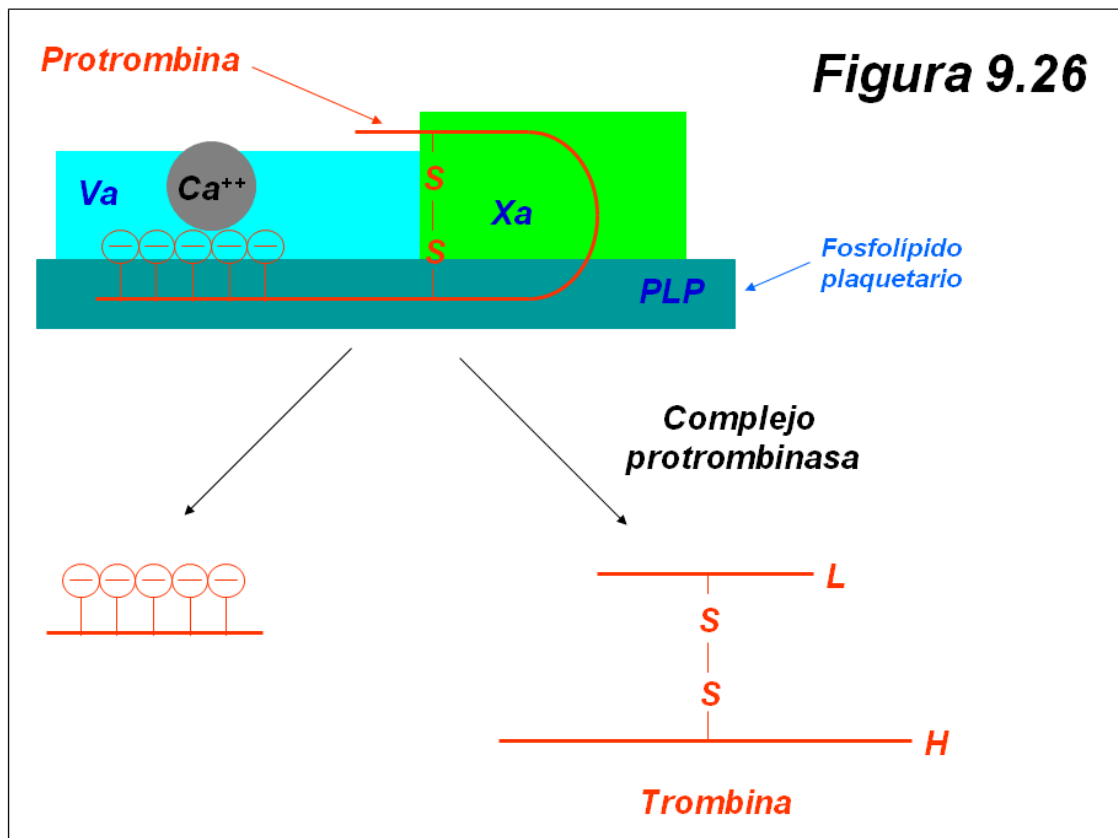


9.6.3 Formación de trombina

La trombina o factor IIa se forma por activación proteolítica de la *protrombina* (factor II) catalizada por el *complejo protrombinasa*. La protrombina es una proteína de 582 aminoácidos y un peso molecular de 66 kDa. 10 de los 33 aminoácidos N-terminales de la protrombina son residuos de *ácido γ -carboxiglutámico*. La presencia de estos residuos permite la fijación de Ca^{2+} a la protrombina, que de esta manera interacciona con el complejo protrombinasa, formado en la superficie de las plaquetas (cuyos fosfolípidos son indispensables en el proceso) y que consta además de los factores Va y Xa. El complejo protrombinasa escinde la molécula de protrombina dando lugar a la trombina (figura 9.26) y exponiendo el centro catalítico. La trombina, de esta forma, activa no sólo al fibrinógeno, sino también a otros factores.

El ácido γ -carboxiglutámico presente en 10 residuos del segmento N-terminal de la protrombina se forma mediante modificación postraduccional de residuos de ácido glutámico presentes en la proteína mediante una reacción compleja, no del todo conocida, en la que participan las *naftoquinonas* o *vitaminas K*. La acción anticoagulante de los *derivados cumarínicos* se debe precisamente a su actuación como análogos competitivos de las vitaminas K. En presencia de estos compuestos, no se forma ácido γ -carboxiglutámico. La falta de éste en la porción N-terminal de la protrombina impide la fijación de calcio, lo que a su vez imposibilita la unión de la protrombina al complejo protrombinasa en la superficie plaquetaria. La presencia de

ácido γ -carboxiglutámico es asimismo esencial para la acción de los factores VII, IX y X.



El complejo protrombinasa se forma en la superficie de las plaquetas y presenta como elementos esenciales el factor Xa, una serinoproteinasa, el factor Va (que no tiene actividad enzimática pero acelera unas 10000 veces la activación de protrombina), los fosfolípidos de la superficie plaquetaria y el complejo protrombina- Ca^{2+} . El factor Va se produce por la activación del factor V catalizada por la trombina y el factor Xa. El factor Xa, a su vez, por los mecanismos que veremos a continuación.

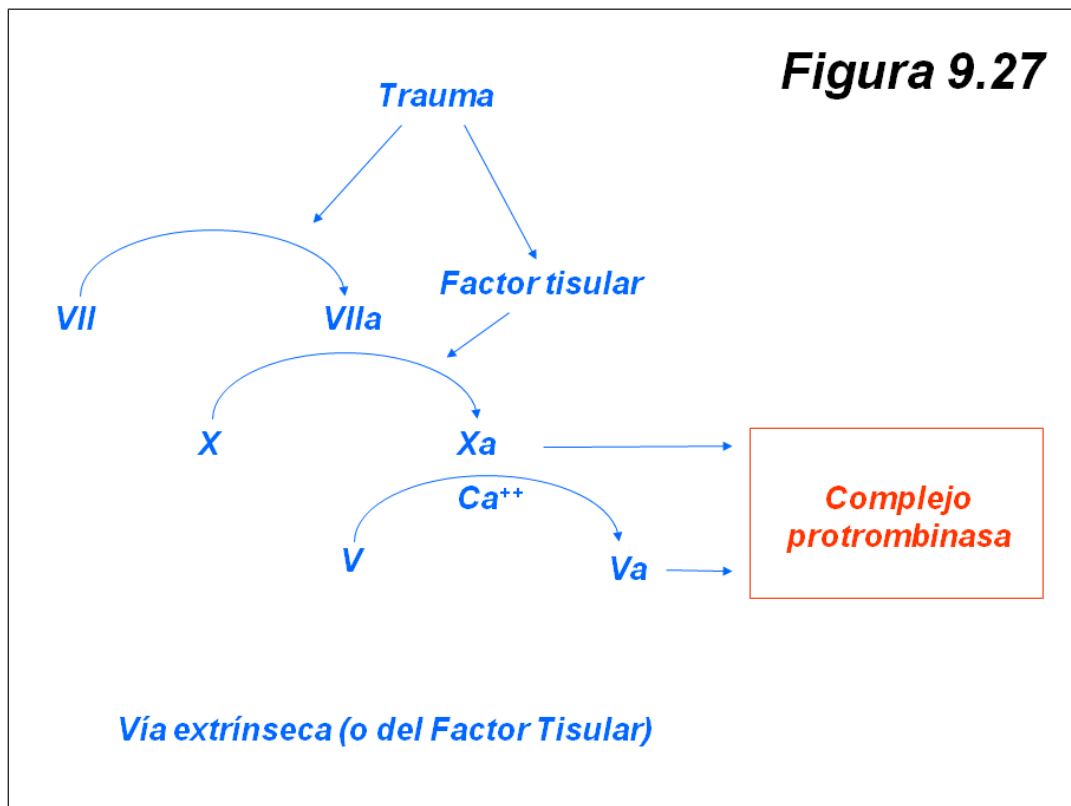
9.6.4 Formación del complejo protrombinasa

El factor Xa, como hemos visto, es un elemento fundamental en la activación de la protrombina. La activación del mismo a partir de su zimógeno, el factor X, puede tener lugar de dos maneras distintas, que son las dos vías a que antes aludíamos, la extrínseca y la intrínseca.

9.6.4.1 La vía extrínseca

Recibe este nombre por desarrollarse fuera de los vasos sanguíneos, y es significativamente más rápida que la vía intrínseca (y en general tiene mayor importancia en el mecanismo hemostático). La activación del factor X tiene lugar mediante el VIIa, Ca^{2+} y el factor III (también llamado *factor tisular*; es una lipoproteína

del endotelio vascular). La activación del factor VII requiere calcio y una superficie fosfolípídica. A este respecto recordemos que también los factores VII y X poseen residuos de ácido γ -carboxiglutámico. Un esquema de la vía extrínseca se presenta en la figura 9.27.



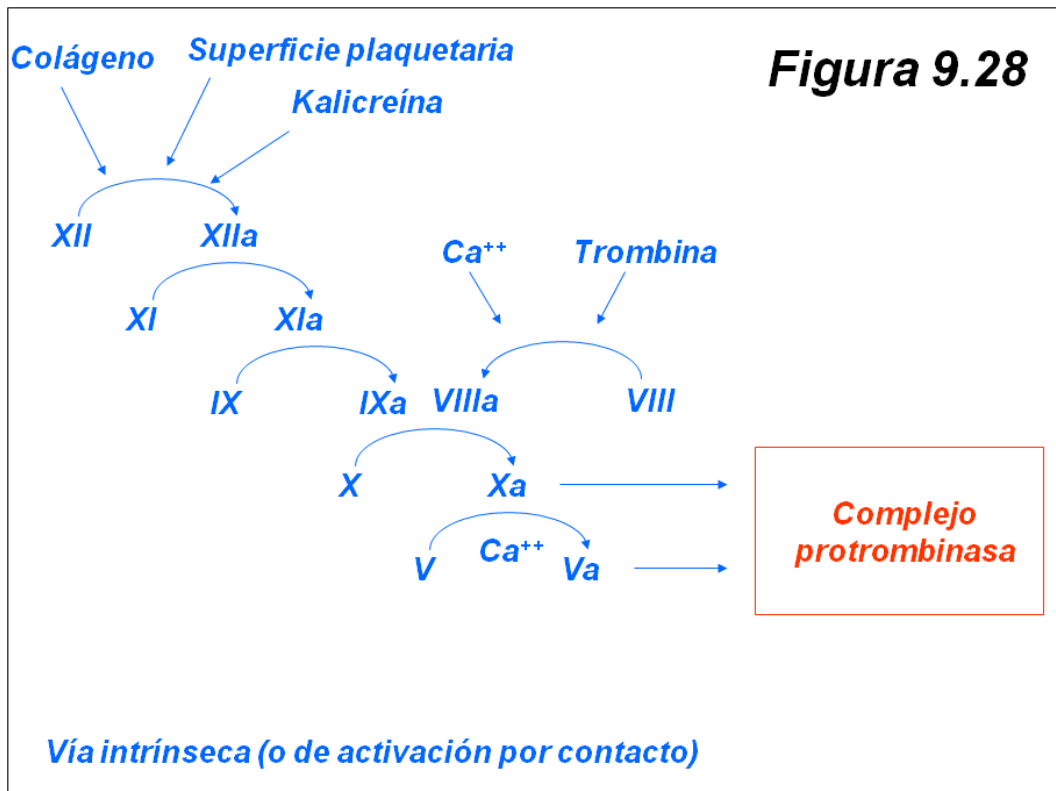
9.6.3.2 La vía intrínseca

Es la que se tiene lugar cuando se producen discontinuidades en el endotelio vascular. Esta discontinuidad expone el colágeno del tejido vascular. El colágeno fija las plaquetas circulantes a través de una glicoproteína específica. La adhesión plaquetaria es a su vez activada por el *factor von Willebrand*, que forma enlaces entre la superficie plaquetaria y el colágeno. Las plaquetas activadas liberan factores que reclutan a otras plaquetas hacia el tapón primario, y exponen su fosfolípido para la formación del complejo protrombinasa. en este complejo formado sobre el colágeno interviene también otra serinproteínasa, la *kalicreína*, y de esta manera se produce la activación del factor XII.

El factor XIIa activa al XI; el XIa al IX; el IXa, junto con el VIIIa, activan al factor X. El factor VIII (o factor antihemofílico), es activado en un proceso que también requiere Ca^{2+} , una superficie plaquetaria y trombina. La carencia congénita de factor VIII da lugar a la enfermedad conocida como *hemofilia A*, que se transmite de forma ligada al sexo. El resumen de la vía intrínseca se presenta en la figura 9.28.

Resumiendo, la coagulación de la sangre presenta las siguientes particularidades:

- Son enzimas proteolíticas la trombina (IIa), y los factores Xa, VIIa, IXa, XIa, XIIa, y kalicreína. Todas ellas son serinproteinasas y activan proteolíticamente a sus substratos.
- Presentan restos de ácido γ -carboxiglutámico los factores II (protrombina), VII, IX y X.
- Se requiere Ca^{2+} y al parecer una superficie fosfolipídica en la activación de la protrombina, del factor VII en la vía extrínseca y del factor VIII en la intrínseca.
- Además de promover la polimerización del fibrinógeno, la trombina (IIa) actúa en la activación del factor XIII (estabilizador de la fibrina), del V y del VIII.



9.6.5 Anticoagulantes fisiológicos

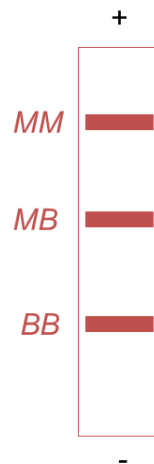
Todos los factores activados tienen una vida media muy corta. Además de las actividades antiserinproteinasas existentes en el medio plasmático (α_1 -antitripsina, etc.), existen otros sistemas anticoagulantes:

1. La *antitrombina III* es una proteína que se une irreversiblemente al sitio catalítico de la trombina tras unos pocos ciclos catalíticos. Tiene una estructura parecida a la α_1 -antitripsina (pertenecen ambas a la superfamilia de las *serpinas*). Inhibe asimismo a los factores IXa, Xa, XIa y XIIa. De manera característica, la antitrombina III es activada por la *heparina*, glicosaminoglicano sulfatado presente en las granulaciones de los mastocitos o células cebadas.

2. La *proteína C* es una proteinasa que ataca específicamente a los factores estimuladores de la coagulación (Va y VIIIa).

3. Existe también todo un sistema de activación en cascada, la *fibrinolisis*, encargada de la destrucción del coágulo una vez formado, en el que no entraremos, pero que presenta una complejidad parecida a la coagulación de la sangre.

CAPÍTULO 10: Enzimas en Medicina



10.1 Las enzimas en el diagnóstico clínico

Los grandes avances en los métodos de determinación de la actividad enzimática que tuvieron lugar en la segunda mitad del siglo pasado permitieron estudiar la presencia de enzimas en una gran cantidad de fluidos biológicos. De todos ellos nos interesan las determinaciones enzimáticas llevadas a cabo en el suero sanguíneo, dada su trascendencia en el diagnóstico de muchas enfermedades. Hasta tal punto que podemos decir que aproximadamente un 20 % de las determinaciones analíticas rutinarias en el laboratorio clínico son determinaciones enzimáticas.

De la relación

$$v = k_{\text{cat}}e$$

vista en el capítulo 5 de este compendio se deduce que la velocidad de una reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración de enzima. Por esta razón, las concentraciones enzimáticas en fluidos biológicos como el suero se miden como

actividad por unidad de volumen, es decir, $\text{UI}\cdot\text{L}^{-1}$ o bien $\mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$. En el suero existe una gran cantidad de actividades enzimáticas, aunque sólo un número limitado de las mismas tiene aplicaciones diagnósticas.

10.1.1 Procedencia de las enzimas séricas

Las enzimas presentes en el suero proceden siempre del interior de las células, donde son sintetizadas. Ahora bien, la diferenciación de células y tejidos hace que la concentración intracelular de enzimas varíe según el tejido de procedencia. Por ejemplo, la fosfatasa ácida es mucho más abundante en la próstata que en otros órganos o tejidos; la creatin kinasa es propia del tejido muscular; la alanina aminotransferasa, aunque presente en muchos tejidos, es francamente abundante en el hepatocito. Por ello, aumentos constatables en suero de dichas enzimas son indicativos de alteraciones en los respectivos tejidos de procedencia, y de ahí el interés general de las determinaciones enzimáticas en suero.

Asimismo, la diferenciación celular se manifiesta muchas veces en diferentes formas moleculares de enzimas (*isoenzimas*, ver cap. 2) lo cual hace que muy a menudo no valga la mera determinación de actividad, sino que son necesarias pruebas ulteriores para ver el patrón de isoenzimas. Así, un aumento en la fosfatasa alcalina puede ser debido, entre otras cosas, a una alteración hepatobiliar o a una alteración ósea. La discriminación de estas actividades ha de hacerse por otros métodos. En este caso, una simple prueba de termolabilidad a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ puede discriminar la procedencia, ya que la isoenzima ósea es mucho más termosensible que la hepática.

10.1.2 Alteraciones en la concentración enzimática en suero

Podemos considerar dos casos: aumentos de la actividad enzimática y disminuciones de la misma (mucho menos frecuentes).

10.1.2.1 Aumentos de la concentración enzimática

Las enzimas pueden estar aumentadas en el suero por alguna de las siguientes razones (en orden de importancia):

(a) Incremento patológico de la permeabilidad de membrana

Cuando existe un daño celular, una de las primeras consecuencias es la alteración de la permeabilidad de la membrana. Ésta, que en condiciones normales es impermeable, ante una alteración, y por diversas causas, puede ver aumentada su permeabilidad de tal manera que componentes como las proteínas pueden abandonar la célula. Tal es el caso, por ejemplo, de la elevación de la alanina aminotransferasa en las hepatitis agudas. El incremento en permeabilidad es anterior a la muerte y destrucción celular (necrosis). Por ello, un aumento en permeabilidad se traduce primeramente en la aparición de enzimas de procedencia citosólica en el suero, no apareciendo las enzimas ligadas a fracciones celulares como mitocondrias, núcleos, etc.

(b) Muerte y destrucción celular

Si el daño celular es grande, la célula puede morir y todo su contenido pasa al medio extracelular y de ahí al plasma. En este caso, a diferencia del anterior, podemos encontrar en el suero enzimas ligadas a fracciones particuladas (mitocondrias, membranas, etc.) a veces ligadas a fracciones de muy alta masa molecular.

Tanto en el caso anterior como en éste, la magnitud del aumento refleja la extensión del daño celular.

(c) Inducción enzimática

Muchas enzimas del organismo son inducibles, esto es, su síntesis aumenta ante determinados estímulos ambientales. Y por ello puede aumentar su concentración en el suero. Tal es el caso de las enzimas hepáticas relacionadas con diversos mecanismos de detoxificación. Así, la γ -glutamil transferasa es inducible por multitud de drogas que han de ser metabolizadas por el hígado, como por ejemplo alcohol, antidepresivos tricíclicos, fenitoína, etc.

(d) Proliferación celular

En algunas circunstancias, tanto fisiológicas como patológicas, la proliferación de un tejido hace que determinadas enzimas específicas del mismo aumenten su concentración en suero. Así en individuos jóvenes en los que tiene lugar un proceso activo de proliferación ósea (actividad osteoblástica) es habitual un valor elevado de fosfatasa alcalina ósea.

Igualmente, en proliferaciones patológicas celulares (neoplasias) pueden aparecer aumentos de la actividad de determinadas enzimas. Por ejemplo, la fosfatasa ácida prostática ve aumentada su actividad en suero ante la presencia de un carcinoma prostático.

10.1.2.2 Disminuciones en la actividad enzimática

Se ven con menor frecuencia que los aumentos. No obstante, en muchos casos tienen interés diagnóstico. Se citan a continuación las principales causas de disminución de la actividad enzimática.

(a) Intoxicaciones

La intoxicación por organofosfóricos (normalmente insecticidas utilizados en Agricultura) produce una disminución de la colinesterasa sérica (también llamada pseudocolinesterasa). Al tener esta enzima un centro activo con la tríada catalítica serina-histidina-aspartato es sensible a los organofosfóricos (ver cap. 6)

(b) Enfermedades crónicas

Muchas enfermedades crónicas cursan con una actividad celular disminuida, lo que se refleja en un descenso en determinadas actividades enzimáticas del suero. Tal es el caso, por ejemplo, de las aminotransferasas en la cirrosis hepática. Estas disminuciones tienen poco valor diagnóstico.

(c) Alteraciones del estado nutricional

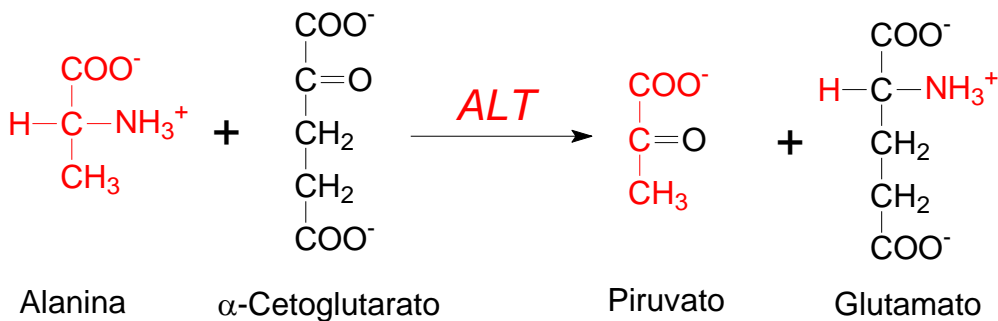
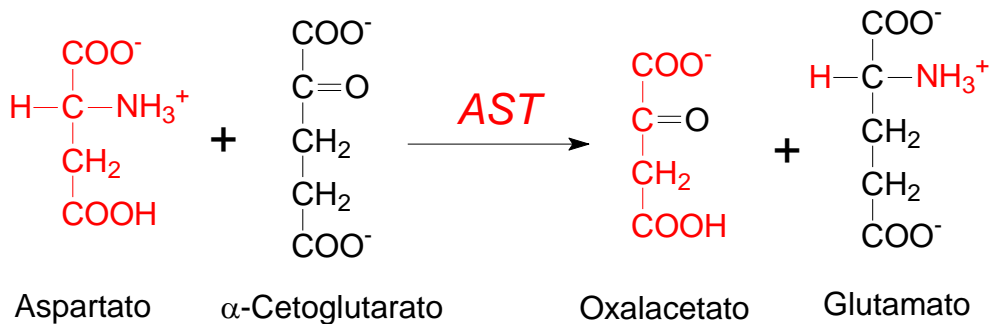
En ocasiones, un descenso en el aporte dietético (ayuno, por ejemplo) o un incremento en las necesidades nutritivas del organismo (crecimiento, embarazo, etc.), causa la disminución de algunas actividades enzimáticas. A veces esto es debido a una disminución en la síntesis (por ejemplo, el descenso en α -amilasa pancreática ante el ayuno) y otras por carencia de coenzimas ante un aumento de necesidades (el caso de la disminución en las aminotransferasas en el embarazo por carencia de piridoxal).

10.1.3 Estudio de las principales enzimas con interés diagnóstico

10.1.3.1 Aminotransferasas

Las *aminotransferasas* (antiguamente llamadas *transaminasas*) catalizan una reacción fácilmente reversible de interconversión entre cetoácidos y aminoácidos. Son enzimas de una extraordinaria importancia metabólica puesto que representan un punto central del metabolismo de aminoácidos y de ahí su amplia distribución en todos los tejidos y células. Utilizan como coenzima el piridoxal fosfato.

Las aminotransferasas que habitualmente se determinan en suero son dos: la *aspartato aminotransferasa* (AST, antiguamente conocida como GOT, o glutamato-oxalacetato transaminasa) y la alanina aminotransferasa (ALT, conocida igualmente como GPT o glutamato-piruvato transaminasa). Las reacciones respectivas son las siguientes:



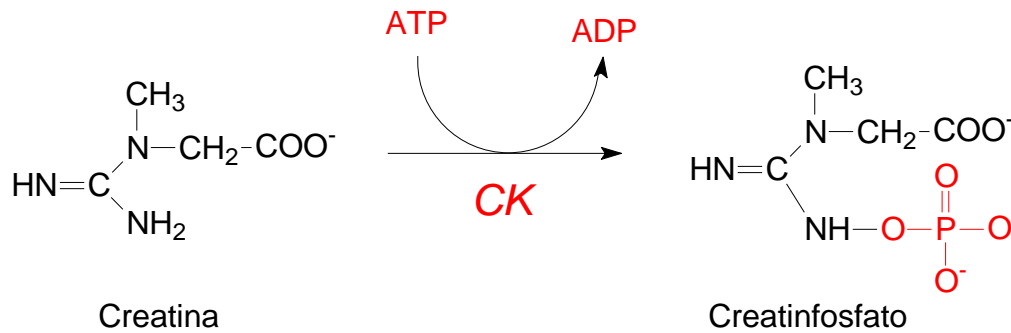
Las aminotransferasas son enzimas abundantes en todos los tejidos, pero lo son particularmente en aquéllos muy activos metabólicamente, como el hígado y el músculo. La AST está repartida indistintamente en los compartimentos citosólico y mitocondrial; la ALT, por su parte, aparece casi exclusivamente en el citosol.

Los aumentos en actividad aminotransferasa del suero aparecen cuando hay alteraciones del parénquima hepático o de las células miocárdicas. En este sentido, suele haber un aumento de AST en el infarto de miocardio y en menor medida, en las hepatitis. La ALT, por su parte, se considera casi específica de la célula hepática. Por ello es un excelente marcador de lesión hepatocelular y su nivel no sólo tiene valor diagnóstico, sino también como índice de seguimiento de la evolución de la enfermedad. No lo es tanto la AST en el infarto de miocardio, puesto que su elevación es bastante más tardía que la de otras enzimas, en especial la creatin kinasa (CK).

Se han descrito (aunque con mucho menos interés diagnóstico) disminuciones en la actividad de las aminotransferasas. Al ser enzimas dependientes de piridoxal fosfato, en casos de alteración del estado nutritivo (embarazo, malnutrición, alcoholismo, etc.) el nivel sérico de estas enzimas puede caer debido a falta relativa del cofactor.

10.1.3.2 Creatinquinasa

La *creatin kinasa* (CK, también llamada creatin fosfoquinasa o CPK) cataliza la fosforilación dependiente de ATP de la creatina para dar lugar a fosfocreatina, un fosfágeno de alta energía utilizado como reservorio energético sobre todo en el tejido muscular. La reacción catalizada es la siguiente:



Se trata de un dímero de dos polipéptidos que pueden pertenecer a dos clases, llamadas M y B (de *muscle*, músculo y *brain*, cerebro). Así, las tres formas moleculares (isoenzimas) de la creatin kinasa podrán ser MM, MB y BB. La forma BB predomina en cerebro e hígado, y la forma MM en el músculo esquelético. En el músculo miocárdico existe la forma MM y la forma MB. Esta última es bastante característica de este tejido.

En los infartos agudos de miocardio, el contenido de las células musculares muertas pasa a la sangre y en ésta se puede detectar la presencia de una actividad creatin kinasa muy aumentada de manera muy precoz (se hace patente entre 2 y 4 horas, y alcanza un máximo a las 24 horas). Además, la presencia de la isoenzima MB (entre un 6 y un 25 % de la actividad CK total) es fuertemente indicativa de lesión miocárdica, y tiene asimismo valor pronóstico (la evolución del infarto es tanto más grave cuanto mayor sea la actividad ligada a la isoenzima MB).

La isoenzima MM aparece asimismo en enfermedades que cursan con afectación de las células musculares esqueléticas (miopatías, traumatismos), pero tiene menor valor diagnóstico que la isoenzima MB en el infarto miocárdico agudo.

10.1.3.3 Fosfatasa alcalina

La *fosfatasa alcalina*, aunque descrita habitualmente como una fosfomonoesterasa de baja especificidad, es en realidad una enzima que cataliza transfosforilaciones entre un dador y un aceptor. Cataliza la siguiente reacción:



Cuando el aceptor es agua, la actividad evidenciada es una hidrólisis de un éster fosfato. Esta enzima posee un óptimo de actividad a un pH alto (aproximadamente 10) y de ahí su nombre, a diferencia de la fosfatasa ácida. Se trata de una enzima de muy amplia distribución en la naturaleza, aunque su función exacta no es del todo clara.

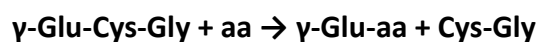
Existen en el organismo humano varias isoenzimas de la misma, conocidas por el nombre de su órgano de procedencia: hepática, ósea, renal, intestinal y placentaria. Estas isoenzimas pueden diferenciarse por electroforesis, por su sensibilidad al calor o por la inhibición ejercida por la fenilalanina.

Desde el punto de vista diagnóstico tienen especial importancia las isoenzimas hepática y ósea. La isoenzima hepática (mejor la llamaríamos *hepatobiliar*) es una enzima ligada a las membranas de las células del árbol biliar, de las que se desprende característicamente en las colestasis u obstrucciones biliares. Por lo tanto, la fosfatasa alcalina aparece aumentada en las ictericias obstructivas; y la elevación de la misma en otras enfermedades hepáticas (como hepatitis) indica el grado de afectación del árbol biliar. La isoenzima hepatobiliar de la fosfatasa alcalina es más termorresistente que la isoenzima ósea. El calentamiento a 56 °C provoca la inactivación de la isoenzima hepática con un semiperíodo de unos 8 minutos, mientras que la isoenzima ósea tiene un semiperíodo de menos de dos minutos.

La isoenzima ósea aparece aumentada (a) de forma fisiológica en los individuos jóvenes, por una actividad osteoblástica aumentada; y (b) en enfermedades del hueso que cursan con neoformación ósea: enfermedad de Paget, metástasis óseas de neoplasias, etc.

10.1.3.4 γ -Glutamil transferasa

La *γ -glutamil transferasa* (γ -GT, GGT, también llamada γ -glutamil transpeptidasa) es una enzima que cataliza la transferencia de restos de glutamilo desde un dador (normalmente glutatión reducido) a un aceptor (normalmente otro aminoácido).



Esta enzima tiene un importante papel en el transporte de aminoácidos a través de membranas. Por ello, al igual que la fosfatasa alcalina hepatobiliar, aparece unida a fracciones de membrana, y en especial a las del árbol biliar, por lo que se presenta elevada, al igual que aquélla, en las colestasis, pero con la ventaja de ser bastante más específica ya que no presenta isoenzimas.

La γ -glutamil transferasa es una enzima inducible, cuya síntesis se ve aumentada en respuesta a xenobióticos (tóxicos externos) como el alcohol y otras drogas (barbitúricos, fenitoína, antidepresivos tricíclicos, clofibrato, gestágenos de síntesis, etc.)

10.1.3.5 α -Amilasa

La α -amilasa es una glicosidasa que hidroliza enlaces α -1,4 situados en el interior de las cadenas polisacáridas de almidón y glucógeno. Se trata de una enzima de gran importancia digestiva, ya que el almidón es uno de los principales contingentes de la dieta, tanto animal como humana. La α -amilasa está presente en la saliva y en el jugo pancreático, dando lugar a dos formas moleculares distintas, S (de saliva) y P (de páncreas), distinguibles por electroforesis. En ambos casos, la α -amilasa es una proteína de pequeño tamaño, y por ello puede fácilmente pasar a la orina, donde es posible detectar actividad amilásica (amilasuria) en enfermedades que cursan con incremento sérico de esta actividad.

De manera característica, la α -amilasa aumenta varios órdenes de magnitud en las pancreatitis agudas, donde su presencia casi puede considerarse diagnóstica de esta afección. Asimismo, vemos aumentos de la amilasemia en la cetoacidosis diabética, en el alcoholismo y en la insuficiencia renal crónica.

Por el contrario, las afecciones crónicas del páncreas, como las pancreatitis crónicas y la fibrosis quística del páncreas cursan con disminuciones de la amilasemia.

Algunas afecciones de las glándulas salivares cursan con aumentos de la isoenzima S.

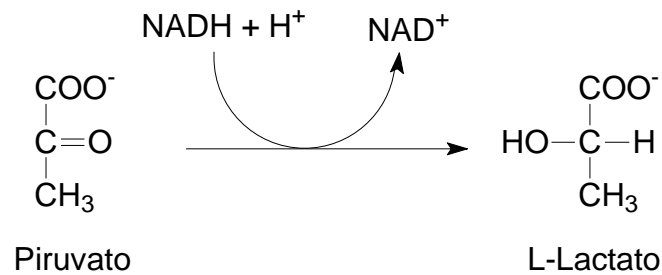
10.1.3.6 Fosfatasa ácida

La *fosfatasa ácida* es una fosfomonoesterasa que cataliza la hidrólisis de fosfomonoésteres de la misma manera que la fosfatasa alcalina; pero, a diferencia de aquella, su pH óptimo de actividad está del lado ácido (pH 5-6). Esta enzima tiene una amplia distribución, ya que aparece típicamente asociada a los lisosomas celulares. No obstante, es muy abundante en hematíes y sobre todo, en la próstata, órgano del que esta enzima puede considerarse como marcador específico, dada la existencia de una isoenzima prostática.

Por ello, la fosfatasa ácida aparece aumentada en las afecciones prostáticas (prostatitis, adenomas y neoplasias malignas de próstata, etc.).

10.1.3.7 Lactato deshidrogenasa

La *lactato deshidrogenasa* (LDH) es una enzima de muy amplia distribución; por ello sus elevaciones son poco específicas de órgano. Cataliza la siguiente reacción:



Esta enzima presenta un interesante patrón isoenzimático. La molécula consta de cuatro polipéptidos que pueden pertenecer a dos tipos, H (de *Heart*, corazón) y M (de *Muscle*, músculo) dando lugar a cinco isoenzimas diferentes llamadas LDH-1 (H₄, LDH-2 (H₃M), LDH-3 (H₂M₂), LDH-4 (HM₃) y LDH-5 (M₄), distribuidas de tal manera que la LDH-1 predomina en el músculo cardíaco y la LDH-5 en el músculo esquelético, teniendo los demás órganos un patrón intermedio. Las isoenzimas pueden ser separadas muy fácilmente por electroforesis.

La LDH-1 puede utilizar como sustrato el ácido 2-hidroxi-butírico además del ácido láctico, por lo que esta isoenzima también recibe el nombre de hidroxibutirato deshidrogenasa o HBDH.

Su valor diagnóstico es relativo, y únicamente ayuda a corroborar los datos puestos de manifiesto por otras enzimas más específicas, como la CK.

10.2 Enzimas en Terapéutica

La reposición o incremento de una actividad metabólica insuficiente puede ser, en muchos casos correctora de una determinada patología o al menos coadyuvante. Por ello se ha intentado el empleo de enzimas en la terapéutica prácticamente desde su mismo descubrimiento. Sin embargo el progreso en este campo ha sido bastante lento debido a las peculiares características de las moléculas enzimáticas. En primer lugar, la enzima que se pretende inyectar puede muy bien ser una proteína extraña al organismo que la recibe, y por lo tanto, antigénica; dado el origen bacteriano o fúngico de muchas de las enzimas que hemos visto en el presente capítulo, y sobre todo al producirse gran cantidad de enzimas por tecnología de DNA recombinante, se puede suscitar en el receptor una reacción inmune que neutraliza la actividad de las mismas. Además, un problema central en la terapéutica enzimática es hacer llegar a la enzima allá donde se necesita, lo cual no siempre es posible. Otro inconveniente radica en la insuficiente purificación de algunas de las enzimas utilizadas. Así, en el tratamiento de la hemofilia por factor VIII "purificado" a partir de plasma humano, una trágica consecuencia fue la infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana causante del SIDA) de una gran número de hemofílicos. Por último, las enzimas inyectadas a un

organismo pierden rápidamente actividad debido, entre otras cosas, a las actividades proteolíticas de enzimas endógenas; y en el caso de proteinasas, a las actividades antienzimáticas de muchas proteínas, y muy abundantes, en el organismo (por ejemplo, la α 1-antitripsina).

Por todo ello, la terapéutica enzimática ha avanzado más lentamente que otras aplicaciones tecnológicas de las enzimas. Quizá una de las aplicaciones más interesantes estriba en las *terapéuticas sustitutivas*, en las que se pretende suministrar un enzima para paliar una actividad defectuosa o inexistente en el organismo. Pero aún así, el porvenir no parece estar en la administración de enzimas, sino en la reposición de los genes encargados de sintetizarlas, por técnicas de ingeniería genética que quedan fuera del contexto de este resumen.

10.2.1 Terapéuticas sustitutivas

La reposición de actividades enzimáticas deficientes es el objetivo básico de las terapéuticas sustitutivas. En ellas se debe hacer una distinción clara consistente en si las enzimas se dirigen al espacio extracelular o bien han de ir al interior de las células. En el primer caso, contamos con algunas enfermedades en las que se han obtenido buenos resultados. En el segundo, los problemas mencionados en el párrafo anterior se hacen particularmente agudos y el resultado de estas terapéuticas no está tan claro, sobre todo por la dificultad de dirigir específicamente las enzimas hacia las células diana. En este apartado veremos fundamentalmente este segundo caso.

Se conocen muchas enfermedades causadas por la deficiencia en determinadas actividades enzimáticas, lo que da lugar a los llamados *errores congénitos del metabolismo*. Existen básicamente dos clases de errores metabólicos: errores *anabólicos*, en los que falta una enzima imprescindible para la síntesis de un determinado compuesto o proceso (hemofilia, albinismo, hipotiroidismos congénitos, etc.) y *catabólicos*, en los que la falta de una enzima perteneciente a una vía degradativa conduce a la acumulación anómala de determinados compuestos que en condiciones normales aparecen a concentraciones mucho menores. En uno y otro caso se ha intentado la terapéutica sustitutiva por enzimas.

La inyección sin más de la enzima deficiente en el sistema vascular del sujeto no tiene aplicación más que en muy contados casos (como la coagulación de la sangre, v.más adelante), debido a los problemas inmunológicos y proteolíticos que vimos más arriba. En la mayoría de los errores congénitos de metabolismo interesa llevar la enzima deficiente a células muy específicas del organismo de tal manera que se sean "invisibles" para el sistema inmunológico o las proteinasas. De forma experimental se han ensayado los siguientes sistemas:

1. Liposomas. Son vesículas mono- o multilamelares de fosfolípidos, de manera que cada vesícula está formada por una estructura en bicapa y que pueden estar

contenidas unas en otras de manera concéntrica.

Los liposomas pueden formarse en presencia de la enzima que queremos dirigir hacia las células afectadas. Una vez inyectados en el organismo, la bicapa del liposoma se funde con la de la célula, liberando al interior de ésta el contenido del mismo. El problema principal en el empleo de liposomas estriba en alcanzar las células específicas a las que va dirigida la enzima. Una línea muy prometedora en este sentido radica en el estudio de los marcadores de superficie, oligosacáridos complejos presentes como glicolípidos o glicoproteínas en la superficie celular y que en muchos casos son específicos de la célula objetivo. Intercalando en los liposomas ligandos complementarios de estos oligosacáridos (anticuerpos, lectinas, etc.) se puede conseguir la interacción específica de aquéllos con las células diana.

2. Hematíes. Mediante maniobras osmóticas, podemos hacer que la membrana de los hematíes se rompa y libere al medio todo el contenido celular. Aislado las células vaciadas (que reciben el nombre de *ghosts*, espectros) pueden volver a "sellarse" en una solución que contenga la enzima que se pretende dirigir a una célula determinada. La fusión de la membrana del hematíe con estas células liberará su contenido al interior. Como es obvio, en este caso pueden utilizarse también marcadores de superficie como en el caso de los liposomas.

3. Enzimas inmovilizadas. En cepas de ratón *acatalasémicas* (que carecen de actividad catalasa y no detoxifican el H_2O_2) se ha intentado con cierto éxito la inyección en la cavidad peritoneal de microcápsulas conteniendo catalasa.

En cualquier caso, los avances en la manipulación genética permiten prever un gran progreso en el tratamiento de estas enfermedades a través de la reposición del gen, y no de la enzima, como ya señalábamos antes.

Cuando la reposición ha de hacerse en un medio extracelular (como la luz del tubo digestivo, por ejemplo), muchos de los problemas asociados a la terapéutica sustitutiva desaparecen. Por ejemplo, en la insuficiencia pancreática se han empleado preparados de enzimas digestivas en cápsulas entéricas, particularmente amilasa, lipasa, tripsina y quimotripsina. En estos casos se han empleado asimismo enzimas de procedencia vegetal o fúngica: *papaína*, *bromelaína* y extractos de *Aspergillus oryzae* (Taka-diastasa). Todas estas preparaciones están indicadas en la insuficiencia pancreática completa, y no en trastornos digestivos menores.

10.2.2 Enzimas en Cirugía

Se han empleado enzimas proteolíticas (*plasmina bovina*, *tripsina* y *colagenasa*) para el desbridamiento de heridas, combinadas con antibióticos, en preparados de uso tópico.

Son particularmente útiles en la eliminación del tejido necrótico en quemaduras, asiendo muy frecuente de infecciones.

10.2.3 Trastornos de la circulación

El preparado *Ancrod*^R, es una preparación proteolítica obtenida de veneno de serpiente. Su acción consiste en romper la molécula de fibrinógeno, pero de forma diferente a como lo hace la trombina, con lo cual no queda en condiciones de polimerización. Con ello mejora la reología de la sangre. Como es obvio, sus efectos secundarios (hemorragias) pueden llegar a ser graves.

En las enfermedades de las arterias periféricas se emplea *kalicreína*.

10.2.4 Trastornos de la coagulación sanguínea

La *plasmina* es una enzima que degrada proteolíticamente la fibrina, en un proceso fisiológico conocido como *fibrinolisis* o *trombolisis*. Se produce por activación de un zimógeno, el *plasminógeno*. Este sistema se utiliza en aquellos trastornos producidos por una coagulación intravascular, extraordinariamente frecuentes en Patología humana (infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares). Para la trombolisis se emplean generalmente activadores del plasminógeno. Se trata de enzimas naturales con actividad serinproteínasa. Los más utilizados actualmente son la *estreptokinasa*, la *urokinasa* y el *activador tisular del plasminógeno* (PTA) obtenido por ingeniería genética.

La *estreptokinasa* es un activador del plasminógeno obtenido a partir de estreptococos β-hemolíticos. Activa el plasminógeno formando un complejo 1:1 que genera plasmina a partir del plasminógeno residual. El principal inconveniente que plantea es que se trata de un potente antígeno que genera anticuerpos muy rápidamente y su empleo requiere por lo general pretratamiento con corticoides. Es efectivo en infartos de miocardio antes de las tres primeras horas.

La *urokinasa* es un activador de plasminógeno obtenido a partir de orina humana o de cultivos celulares. No presenta, como es obvio, los problemas antigénicos de la estreptokinasa. Hoy día se obtiene también mediante ingeniería genética por células de *Escherichia coli* recombinantes.

En ocasiones la terapéutica ha de ir dirigida en sentido contrario, es decir, a promover la coagulación de la sangre en tratamientos antihemorrágicos o en la terapéutica de enfermedades genéticas de la coagulación como la hemofilia. Para ello se utilizan

trombina y otros factores de la coagulación producidos hoy día casi exclusivamente por ingeniería genética.

10.2.5 Enzimas en terapéutica antineoplásica

En la quimioterapia de la leucemia linfofocítica se emplea *L-asparaginasa*. Esta aplicación se fundamenta en el hecho de que la L-asparagina es un aminoácido esencial para células tumorales de esta estirpe.

10.2.6 Otros usos terapéuticos de enzimas

Hoy día se está intentado el tratamiento incruento de la hernia discal mediante la digestión por *quimopapaína* en inyección directa al núcleo pulposo de los discos intervertebrales.

También se ha utilizado experimentalmente a la *superóxido dismutasa* como antiinflamatorio.