

ENZIMAS

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son el grupo más variado y especializado de las proteínas, su función es actuar como catalizadores, permitiendo que las reacciones que transcurren en los seres vivos puedan desarrollarse a un ritmo adecuado. Un catalizador, por definición, es un compuesto que con su sola presencia aumenta la velocidad de la reacción sin experimentar ninguna modificación. Las enzimas son capaces de acelerar reacciones químicas específicas en un medio acuoso, y en condiciones en las que los catalizadores no biológicos, serían incapaces de realizar iguales funciones.

Su capacidad catalizadora depende de su conformación, la supresión de alguno de sus niveles de estructuración, causa la pérdida de funcionamiento. Gran parte de sus propiedades catalíticas radica en el alto grado de especialización que presentan respecto a las sustancias reaccionantes o sustratos.

Al igual que las proteínas, les hay de muy diferentes tamaños y requerimientos; algunas necesitan para desarrollar su actividad tan sólo su estructura aminoacídica, mientras que otras requieren la presencia de un cofactor. Este compuesto puede ser, sencillamente un ión inorgánico, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} ; o una molécula orgánica más o menos compleja, que si se encuentra unida covalentemente se denomina *grupo prostético*, y si establece uniones de naturaleza débil y reversible se denomina *coenzima*. Muchas vitaminas, o derivados de las mismas, funcionan como coenzimas. La enzima completa junto a su cofactor se denomina *holoenzima* y su parte exclusivamente proteica *apoenzima*.

CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

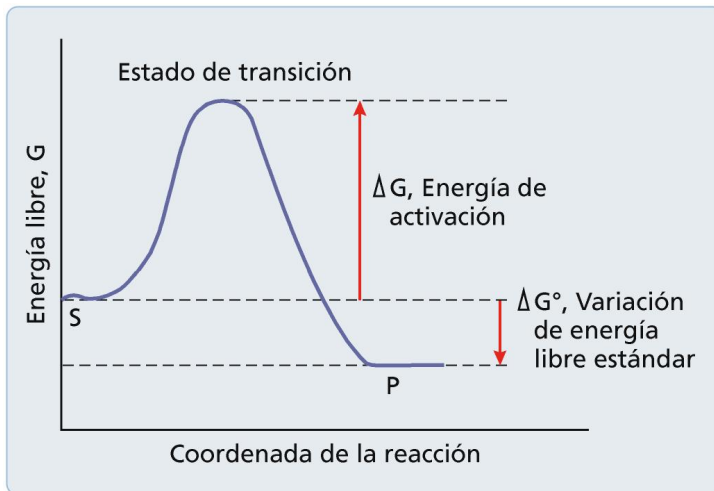
En el origen del estudio de las enzimas se utilizaron nombres referentes al órgano o tejido dónde se descubrieron (así la pepsina, de péptico o relativo a la digestión), o bien al sustrato o a la actividad desarrollada por la enzima, añadiéndole el sufijo -asa para darle un nombre (el caso de la "ureasa", que cataliza la hidrólisis de la urea). Desde 1961, la Unión Internacional de Bioquímica, utiliza un sistema de clasificación y denominación, adoptado por convenio, que clasifica las enzimas en seis grandes grupos:

Número	Clase	Reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones
2	Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
3	Hidrolasas	Rotura de enlaces incorporando una molécula de agua
4	Liasas	Rotura de enlaces covalentes por adición o eliminación de grupos
5	Isomerasas	Reacciones de isomerización: transferencia de grupos dentro de la misma molécula
6	Ligasas	Formación de enlaces covalentes mediante reacciones de condensación

A cada enzima se le asigna un número formado por cuatro dígitos, el primero de los cuales corresponde a la clasificación anterior y un nombre sistemático, que permite caracterizar al sustrato y a la reacción catalizada. Ejemplo: glicerolfosfato deshidrogenasa (1.1.1.8), enzima que cataliza una reacción de óxido-reducción (1), mediante transferencia de H (1), siendo el aceptor el coenzima NAD^+ (1) y el dador el sustrato glicerolfosfato (8).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La acción de las enzimas es absolutamente necesaria para los sistemas vivos, ya que las reacciones sin catalizar tienden a ser lentas y las posibilidades que tiene una molécula de cambiar en un ambiente estable como es el medio biológico, son muy bajas, de ahí que las enzimas proporcionen el medio adecuado para contrarrestar la lentitud en la realización del cambio.



Las reacciones sean catalizadas o no, dependen para su desarrollo de las leyes termodinámicas. El principal parámetro que desde el punto de vista termodinámico, permite deducir si una reacción se desarrolla o no de forma espontánea, es el cambio en la **energía libre de Gibbs, (ΔG)** deducido de la segunda ley de la termodinámica (una reacción es espontánea si la entropía global del universo aumenta), que mide la capacidad de un sistema para desar-

rollar trabajo. Para que se realice la transformación de una molécula, que denominamos sustrato (S), en otra que denominamos producto (P), el cambio de energía libre de Gibbs ha de ser negativo, lo que implica que la energía libre del producto ha de ser menor que la del sustrato.

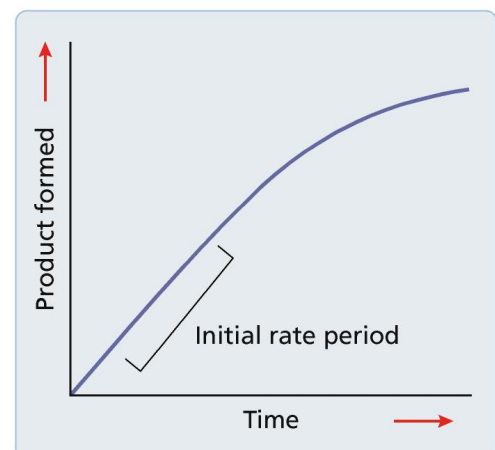
Esquemáticamente, el desarrollo de una reacción enzimática sencilla consistiría en:



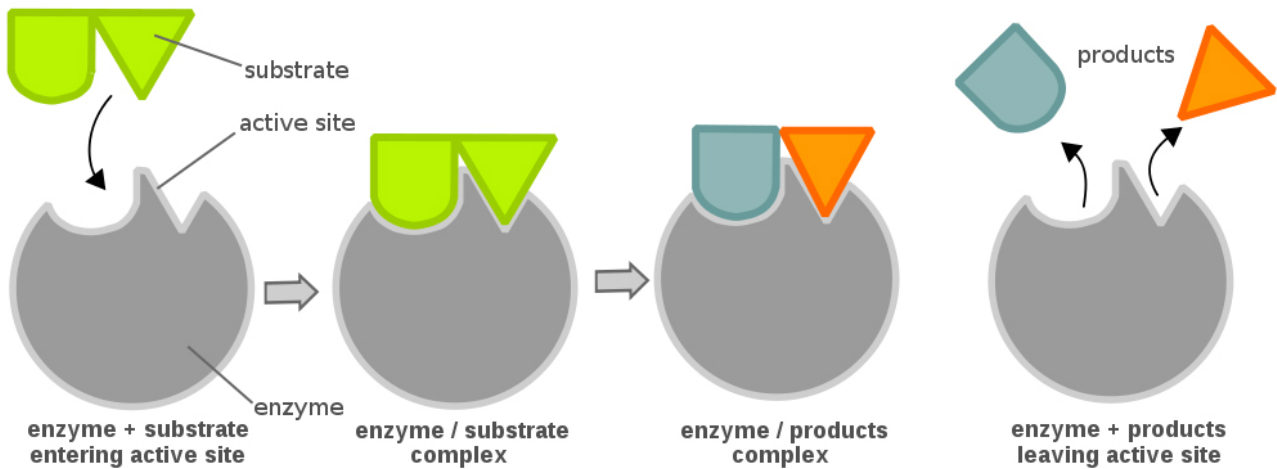
En una reacción química la conversión de sustrato en producto requiere una situación energética intermedia que se denomina **estado de transición**, donde el nivel de energía es superior al del sustrato o del producto. La diferencia entre el nivel de energía basal y la correspondiente al estado de transición se denomina **energía de activación** y cuanto más alta sea menor será la velocidad de reacción. La presencia del catalizador provoca una disminución en la energía de activación requerida, y de esta forma aumenta la velocidad con que se desarrolla la misma.

Un detalle importante a la hora de analizar la actividad enzimática, es que en las reacciones catalizadas enzimáticamente, se incrementa la velocidad de la reacción; pero lo que no se modifica es el equilibrio de la misma, que sigue las leyes termodinámicas independientemente de la presencia o ausencia del catalizador.

La forma que tiene la enzima de realizar su actividad catalítica será en primer lugar unirse con el sustrato, y en segundo lugar facilitar la modificación del mismo para su cambio a producto.



Unión de la enzima con el sustrato



Two substrates (©IMEowbot y Jerry Crimson Mann).

La molécula o moléculas a modificar se sitúan en una región concreta de la enzima denominada **centro o sitio activo**. Esta zona de la enzima es responsable de las dos propiedades básicas de la molécula: la *especificidad* y la *acción catalizadora* de la proteína.

Dentro de todo el conjunto de enzimas les hay que presentan una alta especificidad, aceptando tan sólo un tipo de moléculas sobre las que realizar la catalización, y siendo capaces de discriminar incluso entre moléculas isoméricas; por otro lado, otras enzimas con un menor nivel de especificidad catalizan reacciones utilizando como sustratos moléculas que presenten una cierta similitud.

La interacción entre enzima y sustrato se realiza a través de enlaces de naturaleza débil entre la molécula de sustrato y el centro activo. Cuanto mayor sea el número de estos enlaces, mayor será la especificidad de la enzima, y mayor también su capacidad de discriminar entre dos sustratos estructuralmente próximos.

La especificidad de las enzimas fue estudiada ya en 1890 por *Fischer* mediante el modelo de la llave y la cerradura, según el cual centro activo y sustrato presentaban morfologías complementarias que les hacían encajar como una llave y su cerradura.

Actualmente, se conoce que al unirse el sustrato al centro activo, pueden desarrollarse interacciones entre ambos que producen cambios en la morfología tanto del sustrato como del centro activo, pasando a considerarse un segundo modelo (*Koshland y Neet*) que se denomina modelo del guante y la mano o teoría del ajuste inducido.

A través de este segundo modelo se afirma que los enlaces no sólo servirían para enlazar sustrato y centro activo, sino para facilitar la transformación del sustrato en producto.

Catálisis enzimática

Las enzimas son catalizadores con una eficacia muy alta comparados con los catalizadores no biológicos, ya que pueden incrementar la velocidad 10^{20} veces. La forma de llevar a cabo esta aceleración se apoya en diversos mecanismos, de los cuales los mejor estudiados son:

- 1)** Disminución de la entropía: Las colisiones de las moléculas en disolución pueden ser escasas, la existencia y acción de una molécula más grande con tendencia a unir y colocar correctamente los sustratos facilita la transformación.
- 2)** Facilitación del medio ambiente de la reacción: El centro activo de la enzima dispone de grupos funcionales que pueden modificar el medio ambiente del sustrato, por ejemplo situándolo en un medio hidrofóbico que produzca su desolvatación, y que este cambio en su entorno posibilite la reacción.
- 3)** Introducción de tensión o distorsión sobre el sustrato: La complementariedad entre el centro activo y el sustrato provoca tensiones sobre la molécula de sustrato favoreciendo la aparición, o desaparición de enlaces que facilita su transformación en producto.
- 4)** Existencia de grupos catalíticos específicos: El centro activo puede disponer de grupos funcionales catalíticos que colaboren de forma directa, en la formación o rotura de enlaces. Dentro de estos sistemas existen dos variedades: grupos catalíticos ácido-básicos, que participan dando o aceptando protones y permiten el desarrollo de la reacción hacia la formación del producto; y grupos catalíticos covalentes, que mediante la creación de enlaces covalentes transitorios con el sustrato, direccionan la reacción en el mismo sentido que los anteriores.

CINÉTICA ENZIMÁTICA

El estudio de la actividad enzimática implica el análisis de la velocidad de actuación de la enzima, lo cual se conoce con el nombre de cinética enzimática.

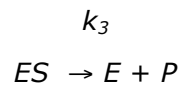
La velocidad de catálisis de una enzima podría determinarse bien como velocidad a la que se forma el producto, o bien como velocidad a la que desaparece el sustrato.

La concentración de sustrato afecta de manera muy importante a la velocidad de la enzima. Cuando se mantiene constante la concentración del enzima, se comprueba que al aumentar la concentración de sustrato la velocidad de la enzima crece linealmente, disminuyendo el incremento paulatinamente hasta alcanzar una meseta que corresponde a un valor de velocidad que es la velocidad máxima.

Modelo de Michaelis-Menten

L. Michaelis y M. Menten en 1913, diseñaron un modelo o teoría general de la acción enzimática que explica el comportamiento hiperbólico de la velocidad con respecto a la concentración de sustrato.

En el modelo postularon que la enzima (E) se combina en primer lugar con el sustrato (S), de forma reversible, formando el complejo enzima-sustrato (ES), que se descompone en un segundo paso dando la enzima libre (E) y el producto (P). La velocidad de la última reacción es baja, y el modelo supone que la probabilidad de que la enzima reaccione con el producto para volver a formar ES, es tan ínfima que resulta despreciable, quedando simplificado este último paso en una reacción prácticamente irreversible.



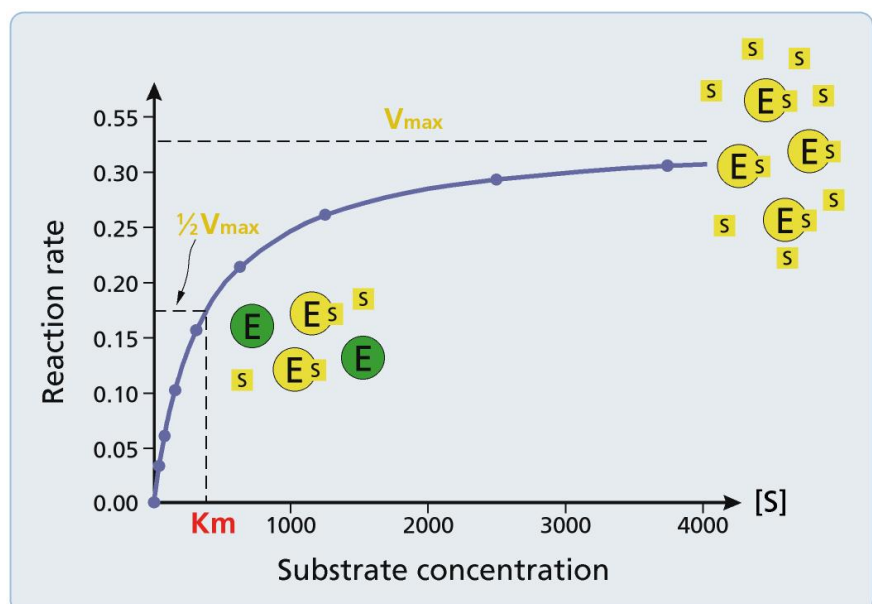
La enzima puede existir en dos formas, en forma libre (E) o combinada como ES, cuando la [S] es baja la mayoría de la enzima estará libre y se verá favorecida la formación de ES, cuando se va incrementando la [S] la velocidad aumenta linealmente. La [E] libre será la diferencia entre la [E] total o inicial y la [ES] o enzima combinado con el sustrato, y la velocidad máxima se alcanzará cuando toda la enzima se encuentre en forma de ES, llegándose a la saturación de la enzima por su sustrato, situación responsable de la meseta que aparece en la gráfica.

Al disponer de una concentración de sustrato saturante, la reacción alcanza rápidamente un estado estacionario en el que la [ES] se mantiene prácticamente constante y la velocidad medida durante este estado es la velocidad analizada por el modelo de Michaelis-Menten que también se denomina **modelo del estado estacionario**.

La expresión más habitual de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Cuando la velocidad es la mitad de la velocidad máxima ($v = V_{\max}/2$), se obtiene una equivalencia de la concentración de sustrato a la constante de Michaelis ($[S] = K_m$), lo que representa una medida más sencilla de determinar que la relación de constantes de equilibrio, y permite expresar este parámetro cinético en unidades de concentración.



La ecuación de *Michaelis-Menten* puede transformarse algebraicamente para obtener representaciones rectilíneas en las que las medidas de V_{max} y K_m resulten más precisas. Una de las transformaciones se denomina de "doble recíproco" o ecuación de *Lineweaver-Burk*, y sería:

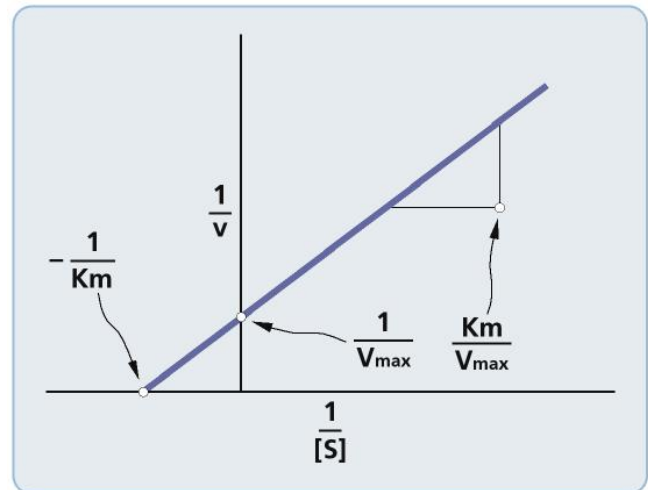
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Su representación gráfica será una línea recta.

Otra linearización de la ecuación de *Michaelis*

es la obtenida por el método de *Eadie-Hofstee*, donde en el eje de abscisas se representa v y en el de ordenadas v/S .

Los parámetros $V_{m\acute{a}xima}$ y K_m caracterizan cinéticamente a las enzimas denominadas michaelianas, (las enzimas no michaelianas son las denominadas reguladoras o alostéricas). La K_m se relaciona con la afinidad de la enzima por el sustrato que será tanto más alta cuanto más baja sea la constante de *Michaelis*; sin embargo, para muchas enzimas el conocimiento de estos datos no proporciona mucha información respecto a los pasos de la reacción, la velocidad o el mecanismo de la misma.



Unidades de medida de la actividad enzimática

La actividad catalítica de las enzimas se mide en condiciones estándares, con concentración saturante, y temperatura de 37°C. La **unidad de actividad enzimática (U)** se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μM de producto por minuto. Las medidas de concentración de enzima que en medios naturales son del orden de 10^{-8} a 10^{-12} M pueden también expresarse como unidades enzimáticas por unidad de volumen (U/ml).

La utilización del Sistema Internacional ha dado lugar a una unidad que se conoce con el nombre de **katal (kat)** que es la cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo, al ser una unidad excesivamente grande no tiene una aplicación muy extendida.

En último término, y aunque no sea una unidad de medida directa, la actividad específica, se define como el número de unidades de actividad enzimática que hay por miligramo de proteína (U)/ mg de proteína, y sirve para cuantificar la pureza de una preparación enzimática.

Isozimas

Existen enzimas que catalizando la misma reacción presentan distintas cinéticas. Estas enzimas reciben el nombre de isozimas o isoenzimas (iso significa igual), y se caracterizan por presentar diferencias estructurales entre ellas que justifican su cinética variable.

Estas variaciones en la conformación se traducen en modificaciones de funcionamiento, que hacen que cada isozima sea la más adecuada para la función de la célula a la que pertenece; así una misma enzima puede existir bajo formas de isoenzimas diferentes en el músculo, hígado, corazón o sistema nervioso, catalizando siempre la misma reacción.

Un ejemplo lo constituye la lactato deshidrogenasa, enzima oligomérica formada por cuatro subunidades o cadenas peptídicas. Hay dos tipos de subunidades, la M (abundante en la enzima del músculo) y la H (abundante en la enzima cardíaca (hheart, corazón en inglés)), que combinadas dan lugar a 5 variedades moleculares denominadas M_4 , M_3H , M_2H_2 , MH_3 y H_4 . Estas variedades se distribuyen en diferentes tipos celulares, dependiendo de los requerimientos de velocidad para esta reacción que exista en dichas células, o incluso se reparten en distintos compartimentos celulares, existiendo una isozima en el citoplasma y otra en la mitocondria.

Además de esta distribución regional comentada, puede existir también una distribución temporal, encontrándose por ejemplo, isozimas que funcionan durante el periodo fetal y otras durante la vida adulta. En todos los casos, la presencia de una isozima determinada, garantiza su perfecta idoneidad para una célula o tejido determinado, en un tiempo también concreto.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las enzimas son proteínas que funcionan en un determinado medio, bien sea intra o extracelular, donde las condiciones pueden variar, y por lo tanto el nivel de actividad de la molécula puede verse modificado a lo largo del tiempo. Dentro de los factores que afectan a la actividad enzimática merecen destacarse:

1) El pH: Todas las enzimas tienen en su estructura primaria aminoácidos con grupos radicales ionizables. Dependiendo del pH del medio en el que se encuentren pueden no tener carga, o por el contrario estar cargados, bien positiva o negativamente. Estas cargas sirven para estabilizar la conformación natural de la proteína y cuando el pH las cambia, también se modifica la estructura, llevando en último extremo a la desnaturalización de la proteína, y en el caso de las enzimas a la pérdida de actividad.

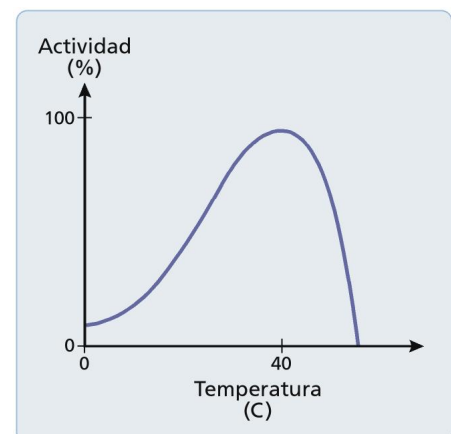
Dependiendo del medio dónde deba ejercer su acción catalítica, cada enzima tendrá su conformación más adecuada, y por lo tanto su máxima actividad, alrededor de un valor concreto de pH, que recibe el nombre de **pH óptimo**. El cambio, bien sea hacia valores más altos o más bajos provocará una disminución de la actividad.

En el caso de la pepsina gástrica, una enzima digestiva, su pH óptimo está alrededor de 2 ya que el medio estomacal es un medio de gran acidez; mientras que otra enzima digestiva como la tripsina, cuyo lugar de acción catalítica es el intestino delgado, presenta su pH óptimo aproximadamente a 8.

La mayor parte de las enzimas son muy sensibles a las variaciones de pH, con algunas excepciones, como es el caso de la amilasa salival, capaces de mantener la actividad en un amplio rango de valores de pH. Esta adaptación garantiza su funcionamiento independientemente del valor del pH del alimento ingerido.

El medio interno de los seres vivos está siempre tamponado, lo cual hace que los pH fisiológicos de las soluciones corporales varíen poco, el plasma sanguíneo presenta valores próximos a la neutralidad (7,4), y la desviación de unas pocas décimas provoca alteraciones muy graves. Tan sólo existen algunas zonas del organismo que se mueven en valores muy alejados de la neutralidad, como el caso descrito de las soluciones digestivas; o, ya en el interior celular, los lisosomas, que contienen enzimas cuyo pH óptimo se encuentra en valores muy ácidos.

2) La temperatura: Este factor presenta dos efectos contrapuestos, por un lado el aumento de temperatura produce, de forma general, un aumento en la velocidad de cualquier reacción química; pero por otro lado, las enzimas experimentan desnaturalización y pérdida de actividad al superar una determinada temperatura. En este caso resulta más difícil determinar como en el pH una temperatura óptima, y las curvas de actividad presentan un incremento inicial de actividad más pronunciado para posteriormente al irse desnaturalizando, decrecer la velocidad de reacción.



INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Una forma de influir sobre la actividad de los enzimas, aparte de los factores de pH y temperatura descritos anteriormente, estriba en los efectos que tienen algunas moléculas al unirse a las enzimas. Al conjunto de moléculas que disminuyen la actividad enzimática se les denomina **inhibidores**, y en las reacciones químicas del organismo *in vivo* son utilizados para controlar el grado de actividad de una enzima concreta. Parte de esta utilidad puede estudiarse en muchas de las acciones de los fármacos, cuyos efectos se fundamentan en su acción como inhibidores de mayor o menor potencia de algunas enzimas, tal es el caso de un fármaco como la aspirina (ácido acetilsalicílico) que inhibe la primera enzima de la síntesis de las prostaglandinas.

Dependiendo del tipo de unión que establezcan con la enzima hay dos grandes grupos de inhibidores:

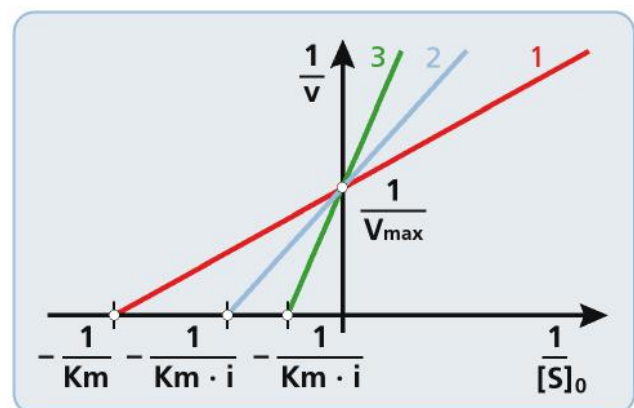
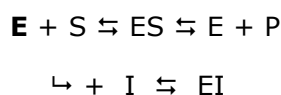
- Inhibidores reversibles, unidos por enlaces no covalentes y reversibles.
- Inhibidores irreversibles, unidos por fuertes enlaces covalentes irreversibles.

1) Inhibición reversible

Dentro de los inhibidores reversibles hay tres grupos dependiendo del lugar y forma de unión a la enzima:

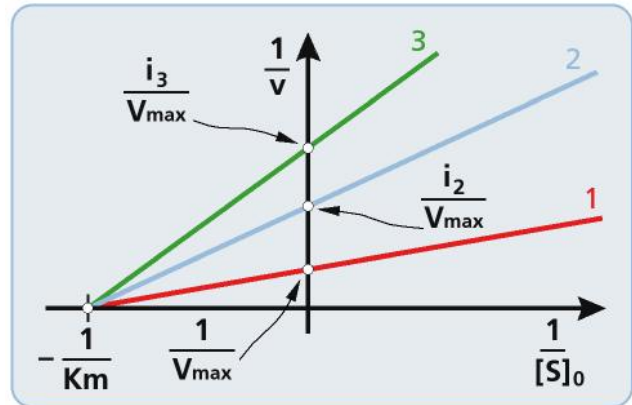
- Los **inhibidores competitivos**, denominados así porque compiten con el sustrato por ocupar el centro activo. Estas moléculas presentan una semejanza estructural con el sustrato que les permite situarse en el centro activo y bloquear la catalización enzimática, lo que desde el punto de vista cinético supone un descenso en la velocidad de reacción.

La reacción enzimática se desarrolla de la siguiente forma: parte de las moléculas enzimáticas están ocupadas por inhibidor (no funcionantes, o inhibidas) y otra parte están unidas al sustrato y formando producto (funcionantes).



Sin embargo, si la concentración de inhibidor se mantiene fija, es posible revertir la inhibición incrementando la concentración de sustrato, de tal forma que aumente la probabilidad de que el centro activo esté ocupado por el sustrato y no por el inhibidor. En suma, los inhibidores competitivos aumentan la K_m de la enzima pero no modifican su $V_{m\acute{a}xima}$.

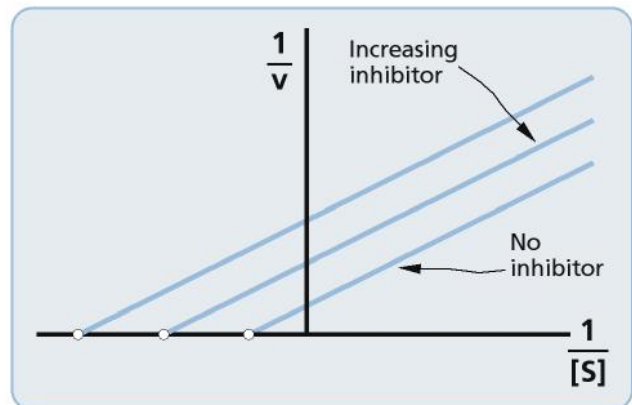
- Los inhibidores **no competitivos** se unen a la enzima en puntos distintos al centro activo, su unión incapacita a la enzima para desarrollar su acción catalítica, y en este caso, el aumento en la concentración de sustrato no revierte la inhibición. Su capacidad de unirse a la enzima esté ésta en solitario o esté unida al sustrato, da lugar a que la $V_{m\acute{a}xima}$ se encuentre disminuida, mientras que la K_m no se modifica ya que la afinidad de la enzima por el sustrato y su capacidad de unirse a él no se ve disminuida.



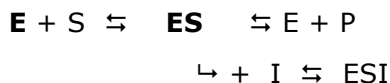
La reacción que tendrá lugar será como sigue:



- Los inhibidores **acompetitivos o incompetitivos**, no presentan afinidad por la molécula de enzima libre, sino que se unen a la enzima cuando ésta se encuentra formando el complejo enzima-sustrato (ES), inhabilitándole para continuar el proceso y formar producto.



La reacción será:



La $V_{m\acute{a}xima}$ se verá disminuida ya que la formación del complejo inactivo ESI, disminuye la concentración de ES y la aparición de producto. Sin embargo la K_m aparece inocrementada, debido al hecho de que en esta situación la más rápida desaparición del complejo ES, desplaza el equilibrio de la reacción hacia la derecha, aparentando un aumento de la afinidad de la enzima por el sustrato.

2) Inhibición irreversible

Los inhibidores irreversibles son los que se unen a la enzima mediante enlaces covalentes, bien en el centro activo o en cualquier otro lugar, causando una inactivación permanente. Muchos fármacos presentan este mecanismo de acción, como por ejemplo la penicilina, y otros antibacterianos que bloquean enzimas claves bacterianos, impidiendo en este caso la actividad de síntesis de la pared bacteriana.

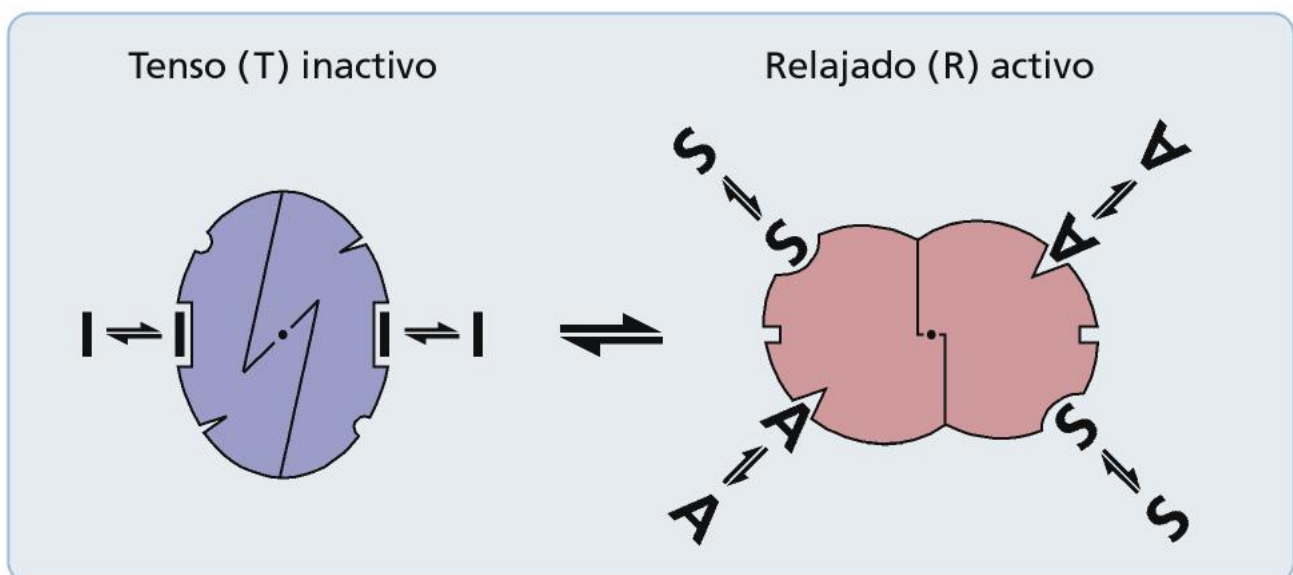
ENZIMAS REGULADORAS

En la mayor parte de los procesos metabólicos que serán objeto de estudio en los temas siguientes, aparece un tipo de enzimas que controlan la velocidad de toda la secuencia de reacciones que componen una ruta metabólica, a través del control que ejercen sobre la reacción más lenta. Estas enzimas reguladoras responden aumentando o disminuyendo su actividad catalítica en respuesta a determinados moduladores o moléculas señal.

Si la unión del modulador se realiza de forma reversible, no covalente, las enzimas se denominan enzimas alostéricas, que significa "otra forma", ya que son capaces de modificar su conformación por la unión de los moduladores.

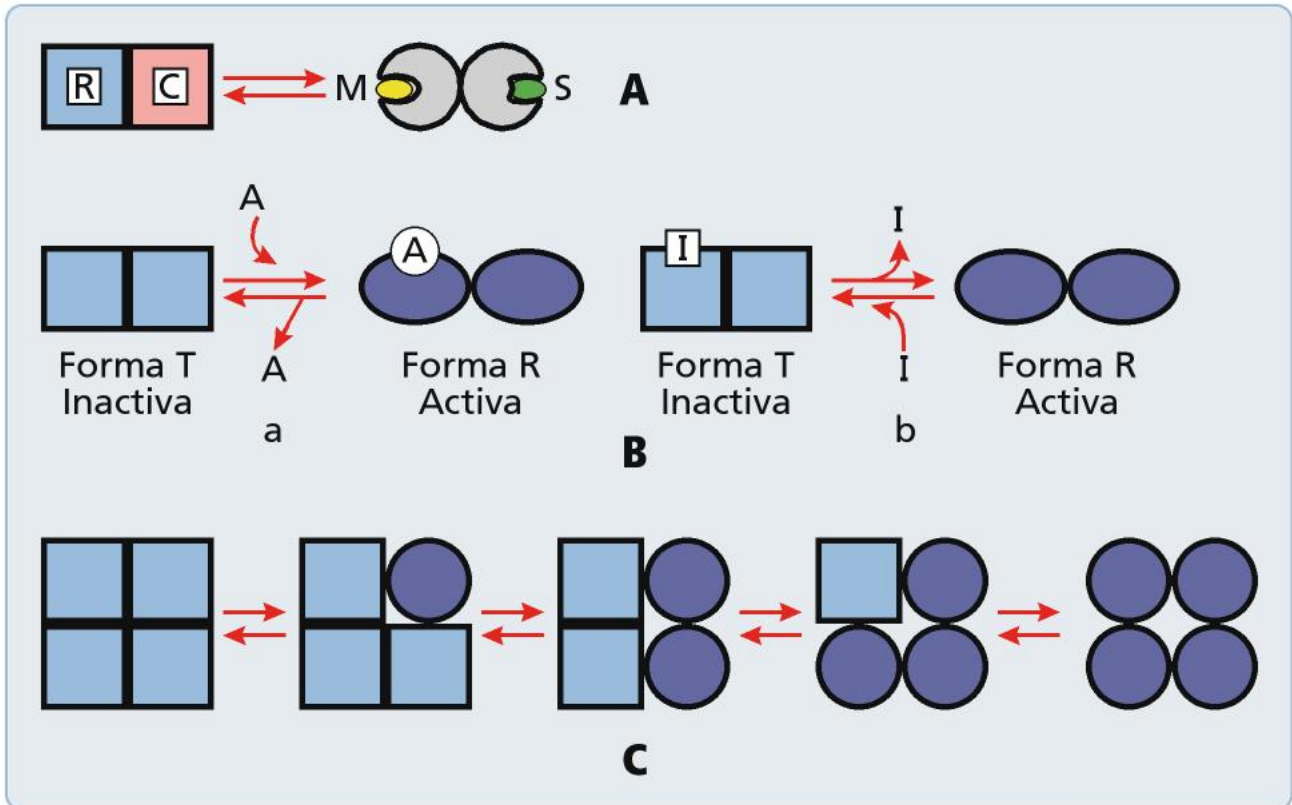
Este tipo de enzimas no sigue la cinética michaeliana, en ellas la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la enzima presenta un trazado sigmoideo, y la K_m se denomina $S_{0,5}$. Este comportamiento cinético indica cooperatividad en la unión del sustrato al centro activo de la enzima, lo que significa que la unión de una molécula de sustrato facilita la unión de las siguientes.

La cinética de la enzima se modifica dependiendo del tipo de modulador con el que se una. Existen dos variedades de moduladores, los que aumentan la actividad de la enzima o activadores y los que la disminuyen, inhibidores.



La estructura de estas enzimas es, en general, más compleja que la del resto de las enzimas, ya que suelen estar formados por varias subunidades, disponiendo de un centro activo en la subunidad denominada catalítica y un **centro alostérico o regulador**, donde se une el modulador, situado en la subunidad reguladora.

Se les clasifica en **homotrópicos** cuando el propio sustrato actúa también de modulador y **heterotrópicos** cuando el modulador y el sustrato son moléculas diferentes.



Si la unión del modulador es una unión de tipo covalente, las enzimas pertenecerían a un grupo específico de enzimas reguladoras, las **reguladas por modificación covalente**. El ejemplo más interesante lo constituyen las enzimas que son activadas o inactivadas por fosforilación o defosforilación. La incorporación de un grupo fosfato altera la conformación de la enzima modificando su actividad y permitiendo su regulación para controlar un proceso más general. La incorporación o eliminación de un grupo fosfato se desarrolla a su vez de forma catalítica, de tal manera que existen grupos de enzimas, las cinasas y fosfatasas que realizan ambos procesos respectivamente.

Un sistema diferente de regulación lo constituye el sistema de activación de zimógenos. Algunas enzimas se sintetizan en forma de precursores inactivos denominados **proenzimas** o **zimógenos**, y sólo en determinadas circunstancias se produce la activación. El proceso de activación consiste en la rotura proteolítica de la enzima, que permitirá los cambios de conformación adecuados para la correcta configuración de la molécula. Este tipo de regulación activadora la presentan las enzimas digestivas como la quimotripsina o la tripsina que se sintetizan como tripsinógeno y quimotripsinógeno.

Los sistemas de regulación expuestos constituyen algunas de las estrategias para poder cambiar el ritmo con que se realizan ciertos procesos metabólicos; sin embargo a lo largo del estudio de los mismos podrán apreciarse las múltiples y variadas posibilidades que la evolución ha ido desarrollando para controlar de la manera más precisa posible la química de los organismos.