

CAPÍTULO 3

Fundamentos de Cinética Enzimática

Aníbal R. Lodeiro

El ser es; el no-ser no es

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

Uno de los pilares del paradigma de la Biología actual sostiene que **es posible describir todo lo que ocurre en los seres vivos usando solamente principios fisicoquímicos**. Sí, también el amor, la alegría, el entusiasmo y el gol del Diego a los ingleses. Lo que pasa es que describir los detalles fisicoquímicos de esos fenómenos sería un poco largo, pero eso no significa que no se pueda. Hace no tanto tiempo –150 años, más o menos– los biólogos pensaban que **no se podía**. Que existía una *fuera vital* propia de los seres vivos, ausente en la materia inanimada, que era responsable por los fenómenos biológicos. Esa hipótesis fue descartada por varias evidencias, entre las cuales la más importante fue la constatación de que ciertos procesos biológicos que se consideraba que dependían de la fuerza vital, como por ejemplo la fermentación, podían ser observados **fuera de las células**. Esto condujo al descubrimiento y posterior aislamiento de los *fermentos* responsables de llevar a cabo estos procesos, los cuales luego se reconoció que eran proteínas a las que se llamó enzimas¹.

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

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

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

El Complejo Enzima-Sustrato

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



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

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

La Aproximación del Equilibrio Rápido

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

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

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

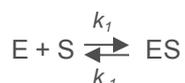
de productos era 2y, al tiempo $t = 3x$ la concentración de productos era 3y, etc. (Fig. 3.1). Sin embargo, sabían que si dejaban transcurrir la reacción hasta un tiempo lo suficientemente largo, al cual podríamos llamar t_{∞} , en ese momento la velocidad de reacción sería cero ya que se habría alcanzado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

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

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

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

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



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

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



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

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

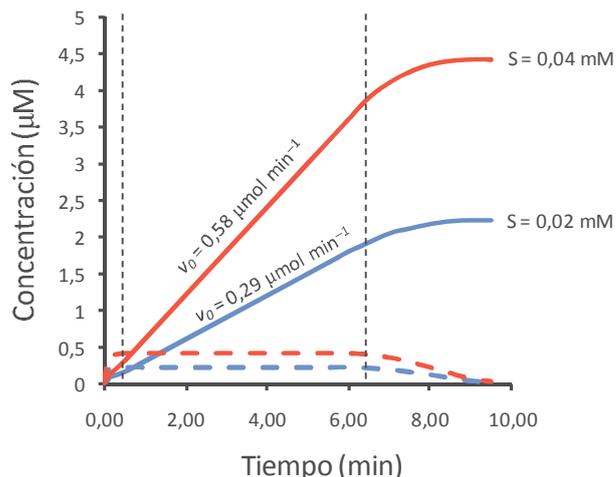


Fig. 3.1. Representación esquemática de la producción de P (líneas llenas) y la formación de complejo ES (líneas discontinuas). Entre las líneas de puntos la tasa de producción de P es constante debido a que se mantiene constante la [ES]. Las velocidades iniciales (v_0) se calcularon como las pendientes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

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

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

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

Una primera cuestión es tratar de expresar [ES] en términos de la concentración de sustrato inicial [S], que nosotros conocemos porque es lo que agregamos en la mezcla de reacción², y de la concentración total de enzima, $[E_T]$, que podríamos llegar a medir, aunque no sepamos cuánta de ella está libre (E) y cuánta complejada con sustrato (ES). Para eso, podemos partir de la idea de que $[E_T] = [E] + [ES]$ y dividir la ecuación 3.3 por estos valores:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

y reordenando, podemos expresar la ecuación 3.8 como:

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

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

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

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

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

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

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

La Aproximación del Estado Estacionario

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



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

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

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

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

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

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

Agrupando los términos en [ES]:

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

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

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

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

Dividiendo numerador y denominador por k_1 y simplificando:

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

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

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

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

Significado de los Parámetros de la Ecuación de Michaelis-Menten

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

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

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

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

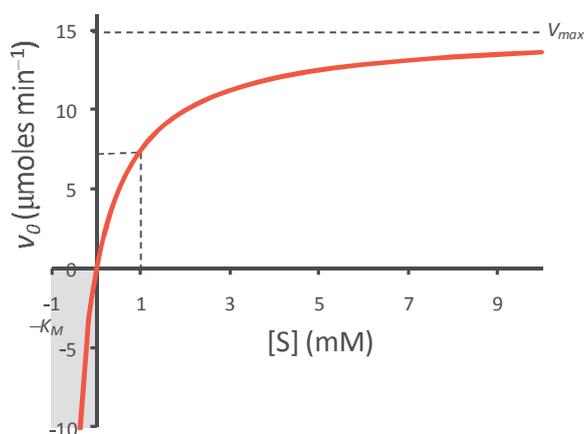


Fig. 3.2. Representación gráfica de la relación entre la v_0 y la $[S]$ para una enzima que sigue la cinética de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos son los mismos que en la Fig. 3.1. La línea de puntos trazada en el valor $v_0 = 15 \mu\text{moles min}^{-1}$ indica la V_{max} . Las líneas que marcan el punto de coordenadas $(1; 7,5)$ indican los valores de $[S] = K_M$ y $0,5V_{max}$ respectivamente. El recuadro gris indica una zona que no tiene sentido físico, pero permite visualizar que $-K_M$ es la otra asíntota de esta hipérbola.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

o bien empleando k_A y k_p sin usar K_M :

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

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

Cálculo de los Parámetros Cinéticos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

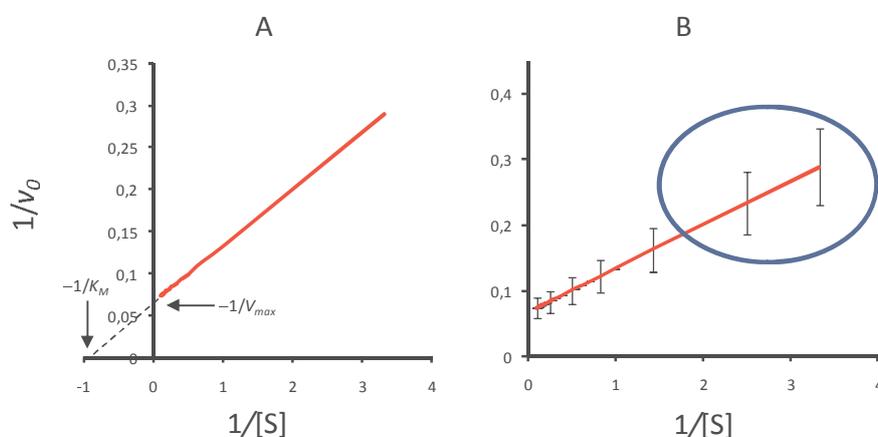


Fig. 3.3. Representación doble recíproca de Lineweaver-Burk de los datos de la Fig. 3.2. En **A** se muestra la línea que une los puntos experimentales (rojo) y su prolongación sobre los ejes. El corte del eje $1/v_0$ se produce en el valor $1/V_{max}$ y el corte del eje $1/[S]$ se produce en el valor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

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

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

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