

LAS ENZIMAS, MAGOS DEL CAMBIO QUIMICO

Dr. Carlos del Río E.

Departamento de Microbiología
FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

Las proteínas con propiedades misteriosas cristalizadas por Sumner en 1926 (1), resultaban una maquinaria química difícil de aceptar por los químicos razonables. Muchos años fueron necesarios y muchas otras cristalizaciones, como la de la pepsina por Northrop en 1930 (2), las de la tripsina, quimotripsina, enzima amarilla, carboxipeptidasa, ficina, catalasa (por el mismo Sumner), mexicaína (del látex de *Pileus mexicanus*) por Castañeda y colaboradores (3) en 1943 y muchas otras, para que al fin fuese aceptado el hecho de que una proteína, capaz de cristalizarse, tuviera la capacidad de llevar a cabo una reacción química muy específica, al romper, como en el caso de la ureasa, sólo a la urea en un proceso catalítico notable. Esta especificidad es tan extraordinaria, que ni la butil-urea resulta atacada (4).

Para estudiar el mecanismo de acción de las enzimas, el investigador Quastel inventó el arte de bloquear el centro activo de las enzimas con sustancias semejantes a las acostumbradas en la función normal de la enzima, pero con ligeras modificaciones químicas que "engañarían" a la proteína con poderes catalíticos. Logró éxito al emplear ácido malónico que al poseer dos grupos carboxilo no muy lejanos entre sí, semejan la molécula del ácido succínico, que por tener también dos grupos carboxilo, alejados una distancia de un $-CH_2$ más, realmente quedan a igual distancia que en el ácido anterior si suponemos cierta movilidad y torsión a las valencias que unen a los carbonos. Se logró el envenenamiento de la enzima deshidrogenasa succínica, la cual adsorbe dos grupos idénticos a los rutinarios y al no haber modificación química del compuesto, éste permanece unido impidiendo las funciones normales de la enzima. El esquema de esta inhibición por competencia se observa en la Fig. 1.

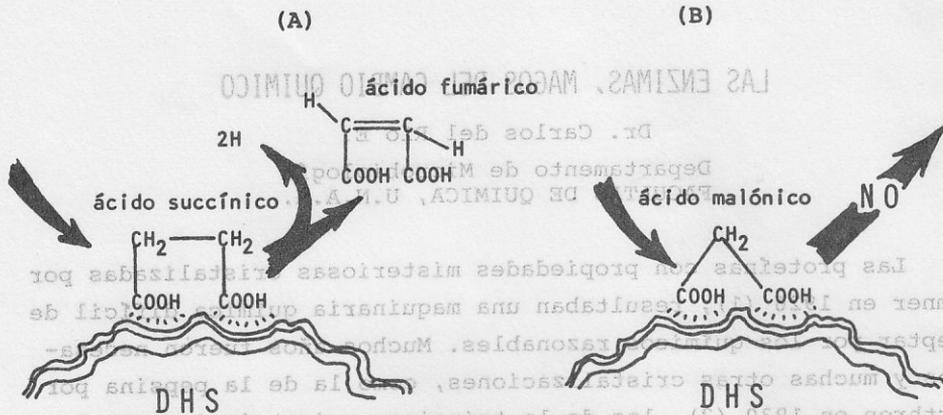


Fig.1 Acción de la Deshidrogenasa succínica frente al ácido succínico (A) y envenenamiento de la misma con el ácido malónico. El centro activo permanece ocupado, al no ser modificado el sustrato y no separarse. (B).

Este mecanismo de engañar a una enzima con moléculas similares abrió caminos amplísimos en el campo de la quimioterapia y la consecuencia más conocida ha sido el descubrimiento de las drogas derivadas de la sulfanilamida, molécula química semejante al ácido p-amino benzoico que sirve para confundir a la fóllico sintetasa de las bacterias patógenas. En general la receta es simple: seleccionar una enzima que no exista en el hombre y sí esté presente en la bacteria que se desee eliminar; fabricar una molécula de dimensiones y grupos semejantes al sustrato ordinario para esa enzima, pero que tenga un cambio químico que la convierta en molécula no utilizable. Esto se logra substituyendo un N por un S o viceversa, un carboxilo por un oximetilo, un oxígeno por un azufre, un tiazol por una piridina, una amida por un acetilo, un grupo sulfónico por un carboxilo, etc. La introducción de un átomo de fluor causará problemas por su electronegatividad y el punto final de la investigación será el verificar si la nueva droga o molécula sintetizada en el laboratorio no resulta tóxica para el organismo animal. Así se han preparado diversas moléculas novedosas, aunque algunas son perjudiciales al humano, por lo que

ha quedado restringido en forma exclusiva para la investigación científica.

He mencionado en esta última parte, a aquellas enzimas que por formar parte del organismo de seres vivos indeseables, deseamos perjudicar y a las que en forma indirecta tratamos de usar como ayudantes o colaboradores. Es decir, al eliminar una bacteria con sulfatiazol, estamos empleando a la enzima bacteriana como nuestro cómplice para atacar el interior del germen invasor.

Las enzimas son valiosos colaboradores nuestros, pues además de que la vida no es sino el funcionamiento sincronizado y regulado de nuestra confederación enzimática, las podemos utilizar además en un sinnúmero de actividades.

Recordaré aquí en forma breve el empleo de determinadas enzimas microbianas con fines industriales: Una enzima que se localiza en bacterias del género *Acetobacter* es capaz de oxidar al carbono 2 del sorbitol y producir sorbosa. La reacción no es muy notable en apariencia, pero ningún químico del mundo puede realizar este cambio en el laboratorio. El sorbitol tiene 6 grupos -OH (uno por cada carbono) y se trata de oxidar sólo al segundo para formar el correspondiente carbonilo. ¿Cómo se puede oxidar al 2 sin tocar los otros cinco? La bacteria efectúa esta modificación que es muy específica y cuya consecuencia práctica es enorme. La glucosa se puede reducir con facilidad a sorbitol y la sorbosa obtenida de la acción bacteriana es un precursor indispensable en la actualidad para la síntesis del ácido ascórbico que se produce en un 100% por este método.

Los productos comerciales que se anuncian como detergentes biológicos, capaces de lavar proteínas coaguladas de telas y ropas de vestir y que eliminan en forma rápida huevo, sangre y otros materiales, no son sino simples detergentes (moléculas con grupos polares en un extremo y no polares por el otro), del tipo de los alquil aril sulfonatos alcalinos, pero mezclados con enzimas bacterianas, fundamentalmente proteasas activas en medio alcalino, extraídas de gérmenes como *Bacillus subtilis* y otros.

La conversión de esteroides para la obtención de hormonas, necesita la presencia de enzimas, a veces de origen animal y las más de origen microbiano. El cambio de progesterona en cortisona oxidando el carbono 11 es una curiosidad carísima y con muy poco rendimiento en el laboratorio de química orgánica. Mejores resultados se lograron por perfusiones en glándulas suprarrenales de bovino, empleando sangre adicionada de anticoagulantes, antibióticos, vitaminas, azúcares, sustancias minerales y reguladores del pH y de la presión osmótica, empleando como vías aferentes los vasos sanguíneos de las glándulas y como caminos de salida, abundantes cortes con navaja de rasurar por toda la glándula. Las gotas que aparecen en toda la superficie se colectan en embudos para ser recicladas muchas veces en espera de una mejor conversión. Esta fue la vía de elección que muchos laboratorios emplearon y estuve en contacto con la técnica cuando trabajaba en los Laboratorios de Investigación de Syntex, S.A.

La efectividad de los hongos microscópicos eliminó este complicado método y se obtuvo una excelente conversión disolviendo la progesterona en etanol, precipitándola en forma coloidal al vaciar la solución alcohólica en agua destilada, agregando algunas sales minerales y al final el hongo convertidor que era en muchas ocasiones *Cunninghamella blakesleana* o *Curvularia lunata*.

Al cabo de 24 horas de agitación para proveer el material oxidante (oxígeno atmosférico) había transformaciones excelentes, a veces del 80%, contrastando con el método químico de escasísimo rendimiento y que requería de 14 pasos sucesivos!

¿Por qué un microorganismo transforma a la progesterona en cortisona, si aparentemente no posee adrenales ni requiere glucocorticoides para realizar procesos de gluconeogénesis? La realidad es muy sencilla: la explicación es el hecho de que la cortisona (ya oxidada en posición 11) es menos tóxica que la progesterona para el hongo y además con la oxidación es muy probable que el metabolismo microbiano tenga una ganancia de hidrógenos utilizables para oxidaciones fosforilantes y se logre la biosíntesis de ATP.

En todo laboratorio de bioquímica clínica donde soliciten una

dosificación de urea sanguínea, conocen el procedimiento de emplear una pildorita y determinar el cambio de color del indicador, síntoma de la concentración de amoníaco liberado por la enzima ureasa, presente en la pequeña grajea. Pocos químicos saben que la pildorita es la enzima parcialmente cristalizada del frijol "jack" (*Canavalia ensiformis*) empleando una extracción del frijol molido con acetona al 30% en agua y recogiendo el sedimento que se forma en frío durante 12 horas, tal como lo sugirió Sumner en 1926.

También la dosificación de glucosa se ha facilitado en tal forma, que el propio paciente puede dosificar la glucosa que existe en su orina y deducir su situación diabética con solo estudiar el color que varía del amarillo al café, en una tira de papel impregnada en glucosa oxidasa y otros sistemas enzimáticos acoplados al transporte de electrones. La enzima fundamental se extrae generalmente del hongo *Penicillium notatum*.

Desearía hacer mención especial y con más detalle, a dos aspectos muy ilustrativos sobre la importancia que reviste la investigación sobre las enzimas.

Hace algunos años participé en un proyecto muy ambicioso, en el Laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Duke (Durham, Carolina del Norte, EE.UU.A.), donde se iba a aclarar una pregunta clave: ¿Son las enzimas catalizadores que obran de presencia, o realmente participan en la reacción como tantos otros reactivos y sufren modificaciones químicas?

Para contestar a esta pregunta el material de trabajo seleccionado fué la enzima fosfoglucomutasa (FGM) que convierte la glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato ($G-1-P \rightarrow G-6-P$), usando como coenzima (dato sorpresivo!) a la G-1,6-diP.

Pensando en el mecanismo de la reacción, lo primero que viene a la mente es una mudanza o traslado del grupo fosfato del C_1 al C_6 en la molécula del sustrato, lo cual no queda aclarado ni se comprende el proceder de la enzima. La verdadera transformación es la siguiente: La enzima FGM posee 2 centros activos, semejantes a moldes específicos en donde se acomodan, en el primer sitio

la coenzima (la glucosa-1,6-difosfato), que en la Figura 2 corresponde al lado izquierdo; y en el sitio vecino, el sustrato que acaba de llegar, colocándose en este esquema en la zona derecha y precisamente en dirección contraria. Para entendernos dentro de esta similitud diríamos que uno se acuesta con la cabeza donde el otro pone los pies. Es decir, dentro de esta simbología el C₁ que dará cerca del C₆ de la otra molécula. En la parte B de la Figura 2 se observa el cambio efectuado: simplemente la valencia que unía al grupo fosfato cambió de una molécula a la vecina y la esterificación con el oxhidrilo en la coenzima, ahora se efectúa con el oxhidrilo de otra molécula que automáticamente pasa a ser una nueva coenzima al poseer dos fosfatos. La coenzima original nos queda como G-6-P o sea el producto final de la reacción, el cual se irá, dando la impresión de ser la misma molécula de sustrato que llegó, pero con el grupo fosfato unido en otro carbono.

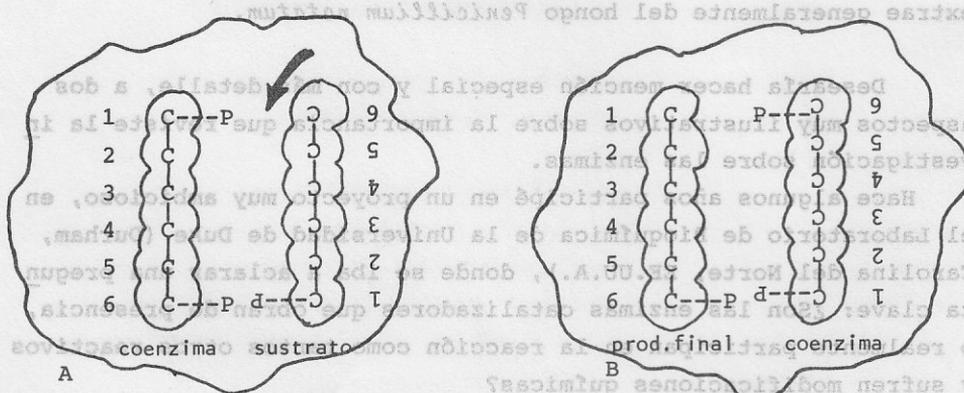


Fig. 2 Mecanismo de conversión de la G-1-P a G-6-P por acción de la Fosfoglucomutasa, usando como coenzima a la glucosa-1,6-difosfato.

Esta explicación aclara que estas enzimas denominadas mutasas debido a que cambian un grupo de lugar dentro de la misma molécula, realmente son transferasas en el sentido estricto de la palabra y de su denominación bioquímica, ya que el grupo transportado viaja en realidad de una molécula A a una molécula B. Igual será la manera de actuar de la fosfoglicéridomutasa, en

zima importante en glucólisis, especializada en la conversión del ácido 3-fosfoglicérico en el ácido 2-fosfoglicérico, utilizando como ya todos hemos adivinado, al ácido 2,3-difosfoglicérico como coenzima.

Estos mecanismos se pueden resumir así: La última molécula de sustrato que entra a la superficie de la enzima no es la misma que sale como producto final; sino la que sale es la penúltima. Además, como el sustrato a veces se adsorbe del lado "izquierdo" de la enzima y a veces del lado "derecho" en forma alternada, los bioquímicos han denominado a esto, mecanismo "ping-pong".

Regresando a lo que indicábamos sobre el Laboratorio de Bioquímica en el Departamento del mismo nombre en la Universidad de Duke, la investigación sobre las fosfoglucomutasa de diverso origen fué repartida a tres investigadores, coordinados por el Jefe del Departamento y actual Presidente de la Academia de Ciencias de los EE.UU.A., el Dr. Philip Handler. Las enzimas de peces fueron estudiadas por el Dr. Takashi Hashimoto (japonés); la enzima del músculo de conejo por el Dr. Jay Joshi (hindú) y al que habla le fueron asignadas las enzimas de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Micrococcus lysodeikticus*.

En mi caso, con varios kilogramos de células bacterianas hubo que purificar la enzima casi a punto de cristalización en un proceso que implicaba: trabajar a 0°C, rompimientos celulares con vibración ultrasónica, precipitación de los ácidos nucleicos con protamina, fraccionamiento con diferentes saturaciones de sulfato de amonio, centrifugación y diálisis hasta lograr una altísima actividad, con poquísima proteína. Con esta enzima se efectuaban incubaciones con G-1-P* radioactiva usando como marcador p³² y suficiente coenzima (G-1,6-DP) durante un minuto, paralizando la reacción con ácido tricloracético.

La enzima muerta fué sometida a dos degradaciones hidrolíticas, primero con pepsina en medio clorhídrico, cromatografiando en papel los péptidos resultantes y seleccionando las fracciones radioactivas. Estas fueron sometidas a otra degradación con tripsina a sus valores óptimos de pH para la segunda hidrólisis. Los péptidos radioactivos, ahora más pequeños, se guardaron y cada

uno de ellos se sometió por un lado a hidrólisis total, para conocer todos sus aminoácidos constituyentes, y en forma simultánea a la degradación de Edman para determinar la secuencia de los mismos.

Los resultados obtenidos por este procedimiento fueron sorprendentes.

1° Algunos péptidos contenían de 6 a 15 aminoácidos pero todos poseían una serina, o sea un aminoácido con -OH capaz de ser esterificado con ácido fosfórico (P^{32}), causa de su radioactividad.

2° Al estudiar la secuencia de aminoácidos en cada uno de los péptidos, apareció siempre un quinteto de aminoácidos (pentapéptido) constante:

---TREO-ALA-SER-HIS-ASP---

3° El mismo pentapéptido apareció en colibacilo, en trucha de río o en músculo de conejo (5).

De lo anterior resultan las siguientes conclusiones:

a) El centro activo de la enzima es idéntico en todas las fosfoglucomutasas sea cual fuere su origen y contiene una serina cuyo oxhidrilo resulta esterificado durante el traslado de fosfato de una glucosa a otra. La investigación había tenido éxito en demostrar que en cierto momento la enzima intervenía en forma activa formándose "fosfato de enzima", ya que la habíamos encontrado con las manos en la masa. Por esto podemos escribir la reacción así:



b) Aunque cada fosfoglucomutasa aislada de diferentes organismos constituye una proteína diferente considerando su peso molecular, su pH óptimo de actividad, su punto isoeléctrico, sus propiedades inmunológicas, etc.; esto se debe a que rodeando al centro activo de estructura común, se agrupan diferentes aminoácidos que dependen del origen de la enzima.

c) Finalmente, la deducción más importante que derivó de estas investigaciones fué el establecer el concepto filosófico de que no se trata de una coincidencia el hecho de que una enzima vegetal, animal o microbiana, hayan inventado el mismo centro activo pentapeptidal para la reacción de acarreo de fosfatos; sino que todas las fosfoglucomutasas derivan de un antecesor común. Los antiquísimos antepasados de las bacterias, animales y plantas fueron los mismos: células que inventaron la fosfoglucomutasa hace algunos millones de años y que desde entonces tenía: (6).

..aminoácidos-TREO-ALA-SER-HIS-ASP-otros aminoácidos...

Algun día, el laboratorio de bioquímica logrará, por síntesis química, reunir el quinteto constante, quizá con algunos otros aminoácidos acompañantes y probablemente tengamos así a esta enzima fabricada por el hombre en el tubo de ensaye, si es capaz de transformar, aunque sea en minúsculas proporciones la glucosa-1-fosfato en la glucosa-6-fosfato.

Conviene mencionar aquí, otro dato interesante. También estudiamos las FGM de *Bacillus cereus* y de *Micrococcus lysodeikticus*, las cuales mostraron ciertas diferencias en su mecanismo de acción, sobre todo al estudiar su cinética enzimática graficando según las técnicas de Lineweaver-Burk (7) y mostrando variación al tratar de inactivarlas con iones berilio, competidor del magnesio y que debería interferir en el manejo de grupos fosfato (8).

Estos datos indican que no hay mecanismo de "ping-pong" y por lo tanto existe una mayor diferencia evolutiva entre estas dos bacterias y colibacilo, que el que existe entre colibacilo y los seres superiores.

Creo que con esto termino el tema de las fosfoglucomutasas y mencionaré el otro tema que encuentro muy interesante:

Las enzimas en bioquímica humana están resultando cada vez de mayor interés, pues ahora se efectúan en forma rutinaria muchas dosificaciones de enzimas como las transaminasas séricas al saberse que sus variaciones son valiosos índices del funcionamiento hepático. Las alteraciones en la presencia de la deshidrogenasa láctica permiten asegurar en forma bioquímica, la existencia de un infarto del miocardio. Estos datos indican que en el futuro el médico, a pesar de su gran experiencia y fantástico ojo clínico dependerá cada vez más de la investigación cualitativa y cuantitativa del panorama enzimático del enfermo.

En la parte final de este trabajo quiero referirme a una línea de investigación muy importante en la actualidad y es la que se refiere a las "enzimas inmóviles".

El nombre de por sí resulta molesto, ya que como sabemos estas proteínas no poseen movilidad ni órganos de desplazamiento. Su designación obedece al hecho de que en vez de utilizarse en soluciones coloidales, en las cuales pueden ocupar una ubicación indefinida dentro del líquido, se fijan en materiales sólidos y aún allí continúan con sus capacidades catalíticas.

El método es simple: Se toma un tubo de vidrio de determinada longitud, se vacía en su interior un material plástico al estado líquido y a punto de polimerizarse. Cuando faltan pocos segundos para que esto ocurra y siempre girando el tubo con la inclinación adecuada, se hace recorrer dentro del tubo una suspensión enzimática concentrada, la cual por supuesto quedará atrapada en las "garras" del polímero. Muchas moléculas enzimáticas resultarán atrapadas aunque serán inactivas por haber quedado unidas por su "cara activa", mientras que otras estarán en posibilidades de atraer, adsorber y modificar al sustrato. La solución de sustrato efectuará el mismo recorrido que el plástico líquido y que la suspensión enzimática y según la inclinación y velocidad de rotación que se aplique al tubo, se conseguirá la salida de los productos finales por la parte inferior. Este método equivale a la aplicación del ensamblado de automóviles a las modificaciones bioquímicas.

Se puede además conectar el "tubo enzimático" a un segundo o

tercer tubo para efectuar varias modificaciones químicas en serie, con grandes ahorros de tiempo y de efectividad ya que se ha contribuido a acercar más el sustrato al catalizador.

Las aplicaciones de este método son muy numerosas y se ha logrado combinar esta técnica con procedimientos inmunológicos para diagnosticar en forma muy indirecta, la existencia de ciertas parasitosis y otros trastornos.

El procedimiento llega casi a los límites de la ciencia ficción: El Dr. Lemuel Wingard, de la Universidad de Pittsburgh, en Pennsylvania nos ha comunicado sus últimas experiencias en este terreno (9) : Un mamífero se encuentra con un grave trastorno hepático que ameritaría un transplante de hígado (algo que por ahora resultaría imposible). Imaginemos que es una cirrosis y este hígado no efectúa en forma adecuada el ciclo de la urea y el organismo está siendo intoxicado por las cantidades excesivas de amoniaco circulante. Esta hiperamonemia provocará delirium tremens y otros síntomas semejantes a los de un alcohólico.

Se toma un hígado sano, incluso de un animal totalmente diferente, cuyas proteínas serían rechazadas pronto por el primer animal, y se rompe con algún procedimiento que permita desgarrar el tejido y reunir células rotas e intactas. Se prepara entonces una suspensión hepática y se vacía en el tubo de vidrio con el material polimerizante en el momento oportuno y se logra un "tubo hepático". Se selecciona una vena del animal para conectar el flujo sanguíneo en una circulación extracorpórea que recorra al tubo enzimático y regrese al animal, sin haber sufrido ninguna adición de proteínas extrañas, ya que todas están "inmovilizadas". El hígado sano, desintegrado, realiza aún sus funciones vitales y detoxifica a la sangre, removiendo el amoniaco y formando urea, la cual se filtra fácilmente por el riñón y terminando con el síndrome al eliminar la causa. Esta técnica equivale a un "transplante externo" del órgano vital, incluso de especie diferente; pero sin las posibilidades de un rechazo inmunológico.

De manera que en el laboratorio bioquímico, algunos de nuestros mejores colaboradores y ayudantes, aunque con dimensiones submicroscópicas, son las enzimas, que si participan en el mecanismo íntimo de la reacción, como cualquier compuesto químico activo y serán muy valiosas e insustituibles si las entendemos y consentimos, por lo cual les hemos llamado los "magos del cambio químico".

REFERENCIAS

1. Sumner, J.B. (1926) J. Biol. Chem. 69,435
2. Northrop, J.H. (1929-1930) J. Gen. Physiol. 13, 739
3. Castañeda, M., Balcázar, M.R. y Gavarrón, F.F. (1942) Science 96, 365.
4. Sumner, J.B. y Somers, G.F. (1947) "Chemistry and Methods of Enzymes" Academic Press, New York, p.156-157.
5. Hashimoto, T., del Río, C. y Handler, P. (1966) Fed. Proc. 25, 408.
6. Handler, P., Hashimoto, T., Joshi, J.G., Dougherty, H., Hanabusa, K. y del Río, C. (1965) Israel J. Med. Sci. 1, 1173-1186.
7. Hanabusa, K., Dougherty, H.W., del Río, C., Hashimoto, T. y Handler, P. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3930-3939
8. Hashimoto, T., Joshi J.G., del Río, C. y Handler, P. (1967) J. Biol. Chem. 242, 1671-1679.
9. Wingard, L. (1977) Comunicación personal. Universidad de Pittsburgh, Pa.