



Memoria del XLIX Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Consideraciones para la realización de un ensayo enzimático.

Considerations for to carry out an enzyme assay.

Rendón Gómez, Juan Luis^{1*}.

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

* Correspondencia: Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Laboratorio 8. Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510, CDMX, México. Tel. +52(55)56232169, jrendon@bq.unam.mx

Resumen

En el presente trabajo se discuten los diferentes tipos de metodologías disponibles para llevar a cabo un ensayo de actividad enzimática, así como todos aquellos factores que es necesario considerar en el diseño de un protocolo válido. Se enfatiza la importancia de evaluar la velocidad inicial y la razón de su empleo en todo tipo de estudio de cinética enzimática. Adicionalmente, se describen los principios en que se fundamentan los ensayos de actividad directos, indirectos, así como los ensayos acoplados. Finalmente, se presenta el enfoque utilizado para analizar aquellas enzimas que muestran una conducta cinética atípica.

Palabras claves: enzima, velocidad inicial, curso temporal

Abstract

In the present work the various methods available to perform an enzyme activity assay, as well as all those factors needed to be considered in the design of a valid protocol, are discussed. The importance of initial velocity determination and their use in all kind of enzyme kinetic study is stressed. Furthermore, the principles on which the direct, indirect and coupled assays of enzyme activity determination are based are discussed. Finally, the approach used to analyze the behavior of those enzymes showing an atypical kinetic behavior is described.

Keywords: enzyme, initial velocity, time course

Introducción

Las enzimas constituyen un grupo especial de proteínas con la capacidad de catalizar una reacción química particular. Su actividad es esencial en el mantenimiento de los procesos metabólicos de los seres vivos. En el laboratorio, la determinación de la actividad catalítica de una enzima constituye el aspecto más fundamental en su caracterización. Los datos obtenidos representan la base para el conocimiento de sus propiedades cinéticas, así como para el análisis de su mecanismo. Asimismo, en la

industria farmacéutica el ensayo de compuestos con el potencial de inhibir enzimas de interés clínico depende de tener un protocolo correctamente diseñado. Si bien las condiciones particulares para medir la actividad de una enzima determinada serán específicas de la misma, existen una serie de factores que deben ser considerados y que son aplicables para el diseño y realización de cualquier ensayo enzimático. Por otra parte, se conocen enzimas cuyas propiedades particulares requieren un protocolo que se desvíe de los métodos comúnmente utilizados en cinética enzimática. El objetivo del presente trabajo es

el de analizar los aspectos mencionados; pretende ser de utilidad para todos aquellos investigadores – así como estudiantes – que no son expertos en el campo de la cinética enzimática y que se enfrentan a la necesidad de medir la actividad catalítica de una enzima particular.

Importancia de medir la velocidad inicial

En la caracterización cinética de cualquier enzima, es esencial conocer de manera cuantitativa la actividad catalítica de la misma, y ello se logra determinando la velocidad inicial de la reacción (1,2,3). La necesidad de utilizar dicho parámetro está dada por el hecho de que bajo dichas condiciones el funcionamiento de la enzima será óptimo. La velocidad inicial corresponde a la pendiente de un gráfico de concentración versus tiempo, evaluada en los primeros estadios de la reacción (1,2,3). Es importante mencionar que la velocidad de una reacción catalizada por una enzima dependerá de la concentración del complejo enzima-sustrato, y que la fracción de la población total de la enzima que se encuentre en dicho estado dependerá, tanto de la concentración del o los sustratos, así como de la afinidad de la enzima por los mismos (1,4). Debido a que en el transcurso de la reacción la concentración del o los sustratos irá decreciendo gradualmente como resultado de su conversión en productos, así también irá disminuyendo la cantidad de la enzima en forma del complejo enzima-sustrato (4,5); adicionalmente, el producto de la reacción pudiera actuar potencialmente como inhibidor de la enzima (5). Aunque en un curso temporal puede obtenerse una velocidad en cada punto de un gráfico de concentración versus tiempo (recuérdese que la velocidad de una reacción química es la derivada de la concentración con respecto al tiempo), la concentración de sustrato irá disminuyendo gradualmente respecto de su valor inicial; de este modo, si se desea calcular la velocidad de reacción a un cierto tiempo después del comienzo de la misma, sería necesario evaluar de manera precisa la concentración de sustrato o producto – según sea el caso – en el tiempo en cuestión. La figura 1a muestra el progreso de dos reacciones catalizadas enzimáticamente representada como el incremento en la concentración de producto. Se muestran los datos correspondientes a dos concentraciones iniciales de sustrato.

A partir de la pendiente de los trazos se obtiene la velocidad de la reacción a cada uno de los tiempos; dicha velocidad se muestra en la figura 1b. para los dos cursos temporales. En ambos casos, es evidente que la velocidad calculada al comienzo de la reacción será la de mayor magnitud, ya que bajo dichas

condiciones la concentración del complejo enzima-sustrato también tendrá el valor máximo posible bajo las condiciones particulares del ensayo; incluso en los primeros instantes después de iniciada la reacción, la velocidad ya comienza a decrecer.

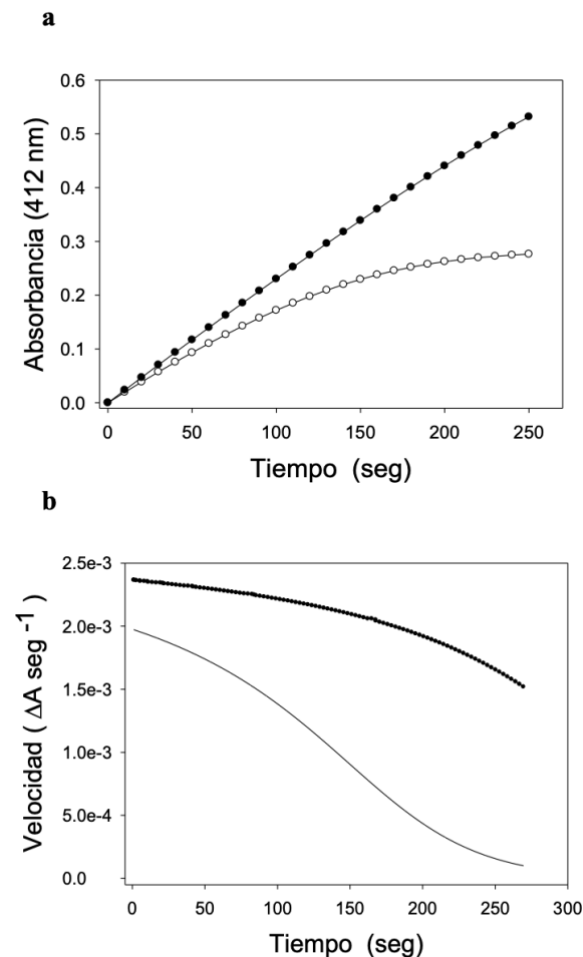


Figura 1. Curso temporal y velocidades de una reacción catalizada por enzima. a) Aparición de producto en función del tiempo para un modelo de reacción irreversible simple tal como $E + S \rightarrow EP \rightarrow E + P$. Los trazos representan dos concentraciones iniciales diferentes de sustrato (\circ) $20 \mu\text{M}$; (\bullet) $50 \mu\text{M}$. b) Variación de la velocidad de reacción en función del tiempo. Las velocidades se obtienen a partir de las pendientes de los gráficos mostrados en el panel “a”. La línea delgada corresponde a la velocidad para una $[S] = 20 \mu\text{M}$, mientras que la línea gruesa corresponde a una $[S] = 50 \mu\text{M}$.

Debe tenerse presente que la formación del complejo enzima-sustrato es un evento que ocurre mucho más rápidamente que la reacción catalizada por la enzima, y típicamente se da en un lapso que va de microsegundos a milisegundos (5,6); dicho estadio es conocido como la fase pre-estacionaria (1,3-6). En la figura 2 se muestra la concentración de las distintas formas de la enzima, tanto en la etapa del estadio pre-

estacionario (Fig. 2a), así como durante el progreso de la reacción catalizada (Fig. 2b).

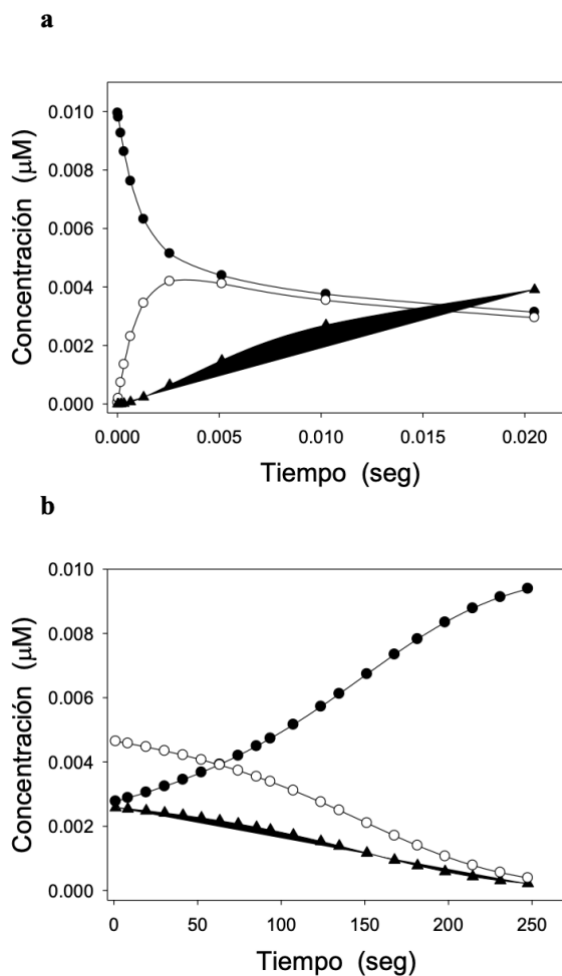
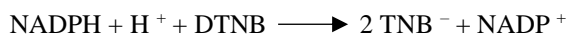


Figura 2. Variación en la concentración de las diferentes formas de la enzima durante el estadio pre-estacionario (a) y durante el transcurso de la reacción (b). Los gráficos muestran la concentración de las diferentes formas de la enzima para una reacción como la ejemplificada en la Figura 1 correspondientes a una concentración inicial de sustrato de 20 μM. (●) enzima libre; (○) complejo enzima-sustrato; (▲) complejo enzima-producto.

Por otra parte, es importante destacar que para aquellas reacciones donde los coeficientes estequiométricos entre sustratos y productos son diferentes, es necesario tener presente que la velocidad dependerá del compuesto elegido para monitorear la actividad enzimática. Para ilustrar este punto, consideremos el caso particular de la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), una enzima con la capacidad de llevar a cabo la reducción, tanto del disulfuro de glutatión (GSSG) como de la tiorredoxina, utilizando como agente reductor al NADPH (7). En el laboratorio, la actividad de tiorredoxina reductasa de la TGR puede monitorearse siguiendo la reducción del sustrato artificial 5,5'-

ditio-bis-2 nitrobenzoato (DTNB) (8). Las dos reacciones catalizadas son:



Aunque en principio ambas reacciones podrían monitorearse siguiendo el decremento de absorción de luz a 340 nm dado por la oxidación del NADPH, los cambios de absorción del anión tionitrobenzoato (TNB^-) en el transcurso de la reacción interfieren con aquellos del NADPH, por lo que la reducción del DTNB se rastrea siguiendo el incremento de absorción a 412 nm debido a la formación del TNB^- (8). Con base en lo anterior, es claro que si se desea comparar la capacidad catalítica de la enzima para catalizar ambas reacciones, deberá considerarse la estequiometría de estas últimas, que muestra que la velocidad de formación del producto TNB^- será el doble de aquella correspondiente a la oxidación del NADPH. A fin de obtener resultados válidos y consistentes, los datos de velocidad inicial, para el ejemplo particular señalado, deben ser normalizados de acuerdo con la siguiente igualdad:

$$V_{\text{NADPH}} = V_{\text{TNB}^-}/2$$

es decir, la velocidad de oxidación del NADPH será la mitad de aquella de la formación del TNB^- . Estas consideraciones son aplicables cuando se desea comparar actividades evaluadas a partir del consumo o producción de compuestos con diferente coeficiente estequiométrico.

Determinación experimental de la velocidad inicial

La metodología utilizada para monitorear el curso de una reacción catalizada enzimáticamente dependerá de las propiedades fisicoquímicas de reactivos y productos. En una situación ideal, la reacción podrá seguirse de manera continua – es decir, con un solo ensayo de actividad – monitoreando la formación de algún producto de la reacción o bien la desaparición de alguno de los sustratos (3). El compuesto de elección dependerá de que variable pueda monitorearse de manera continua (p. ej. absorción de luz a cierta longitud de onda). El ejemplo mejor conocido es el de aquellas enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción utilizando como sustrato la forma reducida u oxidada del NAD o del NADP. Las propiedades espectrales de estos compuestos hacen posible que la reducción o la oxidación de los mismos pueda rastrearse espectrofotométricamente siguiendo los cambios en la absorción de luz a una longitud de onda de 340 nm (9).

Un ejemplo ilustrativo de lo anterior es la reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa:



Ya que la reacción es reversible, la velocidad en la dirección de formación de piruvato podrá obtenerse siguiendo el incremento en la absorción de luz a 340 nm – dado por la reducción del NAD^+ - mientras que la velocidad de la reacción en la dirección de formación de lactato estará dada por una disminución en la absorción de luz a la misma longitud de onda debido a la oxidación del NADH. En ambos casos, la mezcla de reacción correspondiente se preparará añadiendo todos los sustratos involucrados y la reacción se iniciará añadiendo una pequeña alícuota conteniendo la enzima.

Factores a considerar para la realización de un ensayo de actividad enzimática

Independientemente de la enzima cuya actividad se desee evaluar, existen una serie de factores importantes que es necesario considerar antes de llevar a cabo un ensayo de actividad; brevemente, estos son:

Amortiguador y pH

Las enzimas, al igual que todas las proteínas, poseen en su estructura un número variable de grupos disociables, cuyo grado de ionización es fuertemente dependiente de la concentración de iones hidronio (H_3O^+) en el medio, es decir, del pH (1,4,10). En muchos casos, tales grupos participan en la unión del o los sustratos, así como en el mecanismo catalítico, por lo que es importante conocer el pH óptimo al cuál trabaja la enzima a fin de mantenerlo constante.

El amortiguador de elección a utilizar en los ensayos debe reunir las siguientes condiciones:

- 1) el pKa deberá estar lo más cercano al pH óptimo de la enzima; en una situación ideal, el pKa del amortiguador deberá coincidir con el pH óptimo de la enzima;
- 2) ninguna de las formas iónicas del amortiguador deberá ser inhibidor de la enzima en cuestión;
- 3) Si se desea determinar el pH óptimo al cuál trabaja la enzima, será necesario utilizar una mezcla de amortiguadores con valores de pKa que abarquen el intervalo de pH que se desea analizar; además,

cada uno de ellos deberá cumplir la condición del inciso 2.

Fuerza iónica

Como se mencionó en el párrafo anterior, la participación de grupos disociables en la catálisis es importante para muchas enzimas, por lo que la fuerza iónica del medio es un factor que debe considerarse al realizar un ensayo de actividad (1,2). Por consiguiente, es importante determinar el efecto de dicha variable sobre la actividad de la enzima de interés. Usualmente se sugiere adicionar una sal tal como cloruro de sodio a una concentración de 100 mM; sin embargo, será necesario evaluar si dicha condición no afecta la actividad enzimática.

Es importante mencionar que, en el cálculo de la fuerza iónica de un amortiguador particular, únicamente deberán incluirse aquellas formas que porten carga neta al pH de elección. Así, en el caso del sistema de fosfatos en torno a un pH de 7, tanto el ácido conjugado (H_2PO_4^-), como la base conjugada (HPO_4^{2-}) contribuirán a la fuerza iónica de la solución, mientras que para el sistema del amortiguador Tris, únicamente la forma protonada lleva carga neta (Tris^+), mientras que la base conjugada carece de carga, por lo que no deberá considerarse en el cálculo de la fuerza iónica.

Temperatura

Al igual que cualquier reacción química, las reacciones catalizadas por enzimas muestran una sensibilidad notable frente a cambios en la temperatura (11), por lo que es necesario realizar los ensayos de actividad a temperatura constante. Ello requiere disponer de un dispositivo – por ejemplo, un baño con circulación de agua – que permita controlar de manera precisa dicha variable. Por otra parte, si se pretende analizar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (1,4), es necesario ajustar el pH de los amortiguadores a la temperatura a la cuál serán utilizados, por lo que es imperativo conocer la variación del pKa del o los amortiguadores a utilizar respecto de la temperatura (1).

Concentración de sustrato(s)

Durante el seguimiento de la enzima en un proceso de purificación, es ideal utilizar concentraciones del o los sustratos lo suficientemente alta como para obtener datos de velocidad cercanos a la velocidad máxima; sin embargo, es necesario considerar la posibilidad de que pueda existir inhibición por sustrato, que generalmente se observará – cuando está presente – a concentraciones elevadas del mismo (1,4,12). Este

punto es de vital importancia, ya que en un estudio donde se pretenda detectar la presencia de una enzima en un extracto obtenido a partir de un organismo particular, la presencia del fenómeno de inhibición por sustrato a concentraciones elevadas del mismo puede llevar al investigador a concluir que dicha enzima está ausente en dicho organismo.

Tipos de ensayos de actividad enzimática

Ensayos directos continuos

En este tipo de ensayo, la actividad de la enzima es monitoreada en tiempo real siguiendo la aparición de alguno de los productos o la desaparición de alguno de los sustratos; ello dependerá de la posibilidad de que la transformación química vaya acompañada de cambios en alguna propiedad cuya magnitud sea proporcional a la concentración del ligando en cuestión. El caso ideal en un ensayo directo continuo – tanto desde el punto de vista de la información proporcionada, así como de la infraestructura requerida –, es el de monitorear la absorción o la emisión de luz a determinada longitud de onda. Así, como se mencionó anteriormente, en el caso de las deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de piridina (NAD^+ y NADP^+), la reacción en cuestión puede ser seguida mediante el cambio en la absorción de luz a 340 nm gracias a la propiedad de dichos compuestos de absorber luz de manera diferencial dependiendo de su estado de oxidación (1,13). Una ventaja importante de poder seguir el curso de la reacción mediante métodos ópticos (espectrofotometría o fluorimetría) es que ello permite determinar la velocidad inicial con gran precisión. En el caso particular de los ensayos espectrofotométricos, los cambios de absorción pueden traducirse fácilmente en cambios de concentración mediante el uso del coeficiente de extinción molar – también llamado de absorptividad molar – del compuesto específico siendo monitoreado.

Por otra parte, en aquellas reacciones que impliquen la captación o liberación de iones hidrógeno, también existe la posibilidad de monitorear su progreso siguiendo los cambios en el pH mediante un electrodo de vidrio (14). En este caso, los ensayos deberán estar restringidos a un intervalo de pH que no altere de manera significativa la actividad de la enzima en cuestión, y la reacción deberá llevarse a cabo en agua. Un ejemplo ilustrativo de la aplicación de este enfoque es el de la Dihidrofolato reductasa (15), cuya actividad puede seguirse manteniendo constante el pH de la mezcla de reacción por titulación con una solución diluida de ácido fuerte.

Las condiciones generales para llevar a cabo un ensayo de actividad directo y continuo pueden resumirse de la siguiente manera:

1. Los sustratos de la enzima se pre-incuban en el amortiguador a la temperatura y pH adecuados y la señal a monitorear (p. ej. absorción de luz a una longitud de onda determinada) se registra durante un intervalo de tiempo adecuado a fin de obtener la línea de base. Dicha línea representa la variación de la señal en ausencia de la enzima y deberá obtenerse la pendiente de la misma a fin de restarla de la pendiente correspondiente a la velocidad inicial.
2. Una vez obtenida la línea de base, se adiciona una pequeña alícuota conteniendo la enzima y se continúa registrando la señal durante un tiempo adecuado, que típicamente no debe exceder de un minuto o dos, a menos que se desee obtener el registro completo del curso temporal.
3. Terminado el ensayo, se calculan las pendientes correspondientes a la línea basal y a la velocidad inicial y a esta última se le resta la línea de base, obteniendo así la velocidad inicial neta. Con base en el coeficiente de absorptividad molar del compuesto elegido para monitorear la reacción, el cambio de absorbancia es transformado en una velocidad de reacción en unidades de concentración por unidad de tiempo (p. ej. mM/min, $\mu\text{M}/\text{seg}$).

Ensayos directos

Existen enzimas para las cuales no es posible llevar a cabo una determinación directa de su actividad, ya que ninguno de los sustratos o productos de la reacción catalizada exhibe alguna propiedad que pueda ser monitoreada de manera continua en tiempo real asociada al consumo de algún sustrato o a la formación de algún producto. Tal es el caso de la transferencia de grupos fosfato por las cinasas de proteínas (16). Para estas enzimas hay la posibilidad de cuantificar la actividad catalítica de manera indirecta, aunque el procedimiento puede llegar a ser engorroso. En el caso más simple, la reacción de interés puede monitorearse derivando químicamente alguno de sus productos en un compuesto cuyo incremento será proporcional a la actividad de la enzima y puede monitorearse en tiempo real (ensayo indirecto continuo). En la situación más complicada, será necesario detener la reacción de interés a distintos tiempos y evaluar posteriormente la producción de alguno de los productos (ensayo indirecto

discontinuo). Se describen a continuación estos dos procedimientos.

a) Ensayos Indirectos Continuos

En este tipo de ensayo, la reacción catalizada por la enzima de interés puede monitorearse en tiempo real, si bien de manera indirecta siguiendo la formación de un derivado de alguno de los productos. A diferencia de un ensayo discontinuo, el curso temporal que se obtiene proporciona la información detallada necesaria para evaluar la velocidad inicial de la reacción. La enzima AcilCoA-carnitina acil transferasa ejemplifica muy bien este tipo de ensayo (17); la reacción catalizada es:



En este caso, la reacción va acompañada por la generación de un grupo tiol libre en uno de los productos (coenzima A), lo que permite titularlo mediante el empleo del reactivo 5,5'-ditiobis-2 nitrobenzoato (DTNB), que reacciona rápida y estequiométricamente con grupos tioles libres proporcionando un disulfuro mixto (en este caso formado por coenzima A y tionitrobenzoato) y el anión tionitrobenzoato (TNB), cuya liberación puede seguirse espectrofotométricamente a 412 nm, como se mencionó en una sección anterior. De este modo, el reactivo auxiliar – en este caso el DTNB – debe mezclarse con los sustratos de la enzima. Para ello será necesario que se cumplan dos condiciones: 1) el reactivo auxiliar no debe interferir con la reacción de interés ni actuar como inhibidor de la enzima; 2) la reacción del reactivo auxiliar con el producto cuya formación va a seguirse no debe ser limitante de la velocidad.

b) Ensayos Indirectos Discontinuos

En este tipo de ensayo de actividad enzimática, la reacción de interés no puede seguirse en tiempo real y es necesario utilizar una estrategia para evaluar la actividad de la enzima de interés. El ejemplo más ilustrativo de un ensayo indirecto discontinuo está representado por las enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP a una proteína particular – es decir, las proteínas cinasas – de acuerdo con la reacción general:



En este caso, el ensayo de actividad requiere utilizar un derivado radiactivo de alguno de los sustratos (en el caso de las proteínas cinasas se suele utilizar ATP con fósforo 35 en el fosfato gama) y la reacción se monitorea determinando la transferencia de la marca radiactiva al sustrato peptídico después de un tiempo de iniciada la reacción.

Brevemente, el protocolo a seguir es el siguiente:

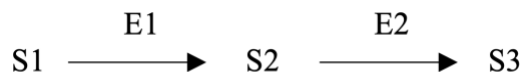
1. Preparar una mezcla de reacción conteniendo el o los sustratos y todos aquellos cofactores esenciales para la enzima de interés (por ejemplo, iones metálicos). En el caso particular de las cinasas de proteínas, uno de los sustratos (ATP) deberá estar marcado radiactivamente.
2. A tiempo cero añadir la enzima o el extracto de interés para iniciar la reacción.
3. A un tiempo determinado detener la reacción añadiendo una alícuota de ácido fuerte (p. ej. HCl). El tiempo requerido dependerá de que tan activa sea la enzima que se esté monitoreando, pudiendo variar desde segundos hasta horas si la enzima en cuestión es muy poco activa o se va a medir en un extracto crudo (si se desea seguir la reacción durante 10 tiempos diferentes, será necesario haber preparado 10 mezclas de reacción).
4. Neutralizar el pH de las mezclas de reacción con una base fuerte.
5. Analizar la mezcla de reacción a fin de determinar la concentración de alguno de los productos; el procedimiento requerido dependerá de la naturaleza particular del compuesto por analizar. En muchos casos, será necesario el empleo de sistemas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (18) para separar y cuantificar el compuesto de interés (p. ej. En el caso de la Uroporfirinogeno descarboxilasa (19), cuya actividad se monitorea cuantificando la producción de porfirina libre). Si se utilizó un sustrato marcado radiactivamente – como en el caso de las proteínas cinasas – será necesario seguir el protocolo establecido para determinar el grado de marcaje, lo que obviamente requerirá equipo sofisticado (contador de centelleo). Si alguno de los productos puede derivarse hacia un cromóforo, entonces el procedimiento será mucho más simple. Por ejemplo, la actividad de la fosfatasa ácida puede determinarse ajustando el pH de la mezcla a valores alcalinos una vez detenida la reacción a fin de cuantificar la

concentración del *p*-nitrofenol producido por la enzima (20).

Debido a lo laborioso de este tipo de ensayo, raramente se emplea para evaluar los parámetros cinéticos de la enzima; si ese fuera el caso, sería necesario construir un curso temporal para cada concentración de sustrato, lo que implicaría repetir el procedimiento anterior utilizando una mayor cantidad de mezclas de reacción a fin de poder parar la reacción a diferentes tiempos.

Ensayos acoplados

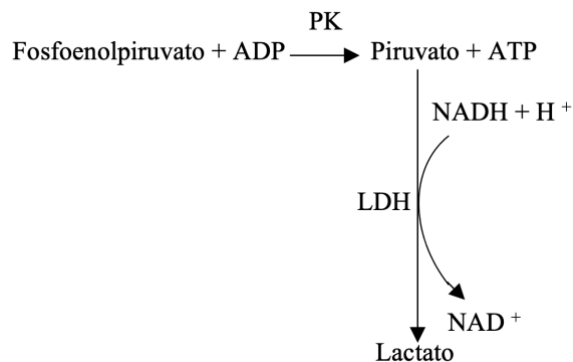
En este tipo de ensayo, uno de los productos de la reacción catalizada por la enzima de interés es utilizado como sustrato por otra enzima cuya actividad permite el monitoreo continuo de la reacción (1,4,21). Esta última enzima recibe el nombre de enzima auxiliar. En el caso más sencillo posible donde ambas enzimas catalizan reacciones uni-uni, el sistema de reacción puede ejemplificarse de la siguiente manera:



Donde E1 y E2 representan a la enzima de interés y a la enzima auxiliar, respectivamente, mientras que S3 corresponde al producto de la enzima auxiliar alguna de cuyas propiedades será utilizada para monitorear la reacción.

Algunos ejemplos bien caracterizados de enzimas cuya actividad se determina mediante un ensayo acoplado son las reacciones catalizadas por la piruvato cinasa y la glucocinasa (22,23). En el primer caso, el piruvato producido es utilizado por la lactato deshidrogenasa – que actuará como la enzima auxiliar – para generar lactato a expensas de la oxidación del NADH, cuyo decremento en concentración podrá seguirse a 340 nm espectrofotométricamente (22).

Para el caso de la glucocinasa la glucosa 6-fosfato, uno de los productos de la enzima, será utilizada por la enzima auxiliar – glucosa 6-fosfato deshidrogenasa – para producir 6-fosfogluconato utilizando NAD como agente oxidante, cuya reducción también podrá seguirse a 340 nm (23). El siguiente esquema ilustra el caso de la piruvato cinasa:



Aunque conceptualmente simple, este tipo de ensayo debe cumplir ciertas condiciones a fin de obtener resultados válidos; estas pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) El pH al cuál se llevará a cabo el ensayo acoplado debe ser elegido de modo que tanto la enzima de interés como la enzima auxiliar muestren una actividad razonable. En una situación ideal, el pH deberá corresponder al pH óptimo de la enzima que se está estudiando y la enzima auxiliar debe mostrar una actividad razonable en esas condiciones.
- 2) La actividad de la enzima de interés debe ser el factor limitante de la reacción, lo que requiere que debe trabajar en condiciones de saturación, ya que de ese modo se estará garantizando que cualquier cambio de actividad será el resultado de una mayor cantidad de dicha enzima. Aunque en principio la utilización de una concentración elevada del o los sustratos de la enzima bajo investigación podría garantizar esta condición, debe tenerse presente la posibilidad de no observar actividad debido a inhibición por sustrato. Por otra parte, si la enzima de interés ya ha sido caracterizada en otras fuentes biológicas, el valor de la K_m reportada podría utilizarse como guía.
- 3) La enzima auxiliar (Lactato deshidrogenasa en el caso del ejemplo ilustrado) debe trabajar en condiciones de primer orden; es decir, la concentración del compuesto acoplante en el estado estacionario debe estar en el rango de la K_m de dicha enzima, de tal manera que su actividad dependerá de la velocidad con la cuál la enzima de interés genere dicho compuesto. Además, la concentración de la enzima auxiliar debe ser lo suficientemente alta como para evitar la aparición de un tiempo de retraso en el ensayo (periodo lag), que se manifestará como una curva de perfil sigmoide al monitorear la aparición del producto final de la secuencia. Este último fenómeno es

consecuencia del tiempo que se requiere para que la velocidad de ambas enzimas se iguale, de tal manera que se alcance el estado estacionario en el cual la concentración del compuesto intermediario – piruvato en el caso de la reacción catalizada por la piruvato cinasa – permanecerá constante. Una vez determinada la concentración mínima de la enzima auxiliar que se requiere para eliminar el tiempo de retraso, la pendiente del estado estacionario será proporcional a la concentración de la enzima de interés, lo que permitirá calcular su velocidad. La figura 3 muestra los cursos temporales para un esquema de reacción como aquel mostrado al inicio de esta subsección, ilustrando el efecto de añadir diferentes concentraciones de la enzima auxiliar sobre el tiempo de retraso y, por consiguiente, el tiempo requerido para alcanzar el estado estacionario. Es evidente que a mayor concentración de la enzima auxiliar, menor será el tiempo de retraso.

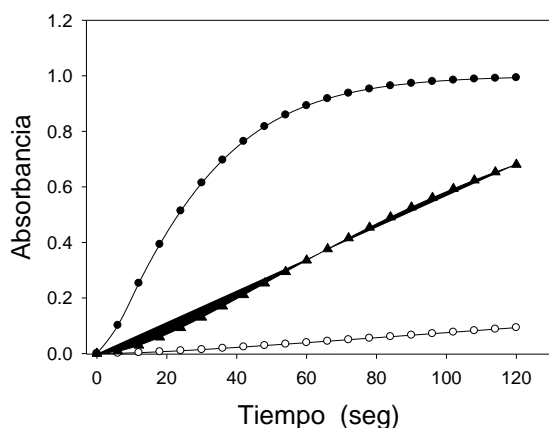


Figura 3. Cursos temporales de una reacción acoplada mostrando el efecto de diferentes concentraciones de la enzima auxiliar sobre el periodo de retraso. Los gráficos representan simulaciones realizadas para mostrar la formación del producto final S3, así como la magnitud del periodo lag cuando se utilizan diferentes concentraciones de enzima auxiliar. En la simulación se utilizaron las siguientes concentraciones de enzima de interés (E) y de enzima auxiliar (F): (○) [E] = 10 nM, [F] = 1 nM; (Δ) [E] = [F] = 10 nM; (●) [E] = 10 nM, [F] = 200 nM.

- 4) Es necesario determinar que ninguno de los sustratos o productos de la mezcla de reacción actúe como inhibidor, ni de la enzima de interés ni de la enzima auxiliar.

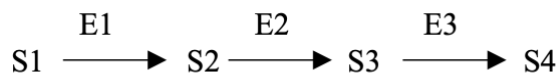
Desde el punto de vista experimental, la realización de un ensayo acoplado debe seguir las siguientes etapas:

- A. Mezclar las dos enzimas en el amortiguador de elección, así como todos los compuestos y

cofactores requeridos para ambas reacciones, excepto el sustrato o alguno de los sustratos de la enzima de interés, así como el compuesto que actuará como intermediario entre ambas reacciones (en el ejemplo mostrado de la piruvato cinasa, el compuesto a omitir será el piruvato).

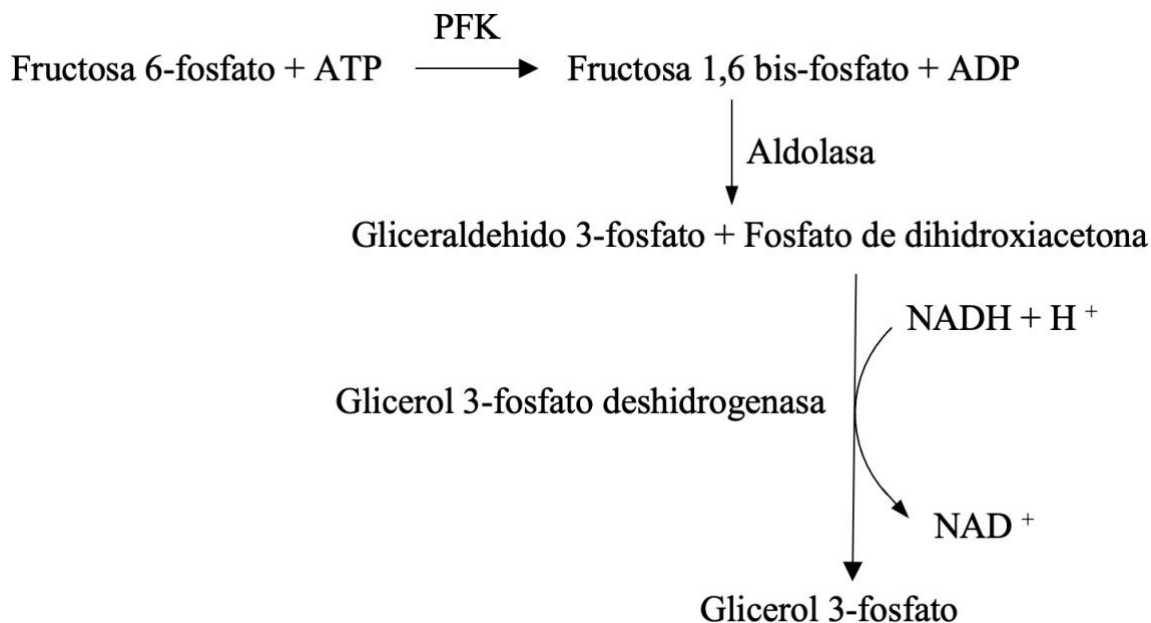
- B. Determinar la producción basal del producto o el consumo de sustrato, según sea el caso, para obtener la línea de base en ausencia de reacción.
- C. Añadir una alícuota conteniendo la enzima de interés y seguir el curso de la reacción. Para el caso de la piruvato cinasa, esto se llevará a cabo siguiendo el decremento de absorbancia a 340 nm como resultado de la oxidación de NADH por la enzima auxiliar.

Por otra parte, existen enzimas para las cuales la determinación de actividad requiere el uso de dos enzimas auxiliares, lo que genera un sistema de ensayo más complejo que puede representarse mediante el siguiente esquema:



En este modelo, E2 y E3 representan las enzimas auxiliares y S4 corresponde al producto final de la secuencia cuyo aumento de concentración servirá para determinar la actividad de la enzima de interés (E1). Las enzimas Fosfofructocinasa (PFK) y Glucógeno fosforilasa representan dos ejemplos cuya determinación de actividad en el laboratorio requiere el empleo de dos enzimas auxiliares (24,25).

Para estos sistemas, la mezcla de reacción inicial deberá omitir los sustratos intermediarios (en el ejemplo mostrado Fructosa 1,6 bis-fosfato y Fosfato de dihidroxiacetona), ya que estos serán producidos en el transcurso de la reacción por la enzima en estudio y por la primera enzima auxiliar, y la reacción deberá iniciarse añadiendo uno de los sustratos de la enzima de interés (Fructosa 6-fosfato o ATP para el caso de la PFK). Todos los requisitos mencionados anteriormente para enzimas que requieren una sola enzima auxiliar son también aplicables en estos casos más complejos. Particularmente importante es que la concentración de las dos enzimas auxiliares deberá ser lo suficientemente grande para evitar la aparición de un tiempo de retraso. Un análisis matemático riguroso de este tipo de sistemas puede encontrarse en las referencias 4 y 21. El siguiente esquema ilustra el caso de la primera de ellas:



Análisis de cursos temporales

En la presente revisión se ha enfatizado la importancia de la velocidad inicial en los estudios de cinética enzimática; sin embargo, existen enzimas que exhiben una conducta cinética que se desvía del patrón general esperado y cuyas características particulares requieren de un análisis distinto de aquel empleado para la gran mayoría de ellas.

Tal es el caso de las enzimas histeréticas, llamadas así por la presencia de un tiempo de retraso antes de que se alcance el estado estacionario (26) (en este caso, la observación de un tiempo de retraso tiene un origen completamente distinto a aquel mencionado en el caso de los ensayos acoplados). Para estos sistemas el análisis de las velocidades iniciales, si bien puede proporcionar información acerca de la enzima en cuestión, no es suficiente para una caracterización completa, por lo que es necesario disponer del curso temporal completo de la reacción.

Ejemplos adicionales con una cinética atípica incluyen los inhibidores enzimáticos de unión lenta (27), la histéresis oscilatoria atenuante (28) y la inhibición por sustrato seguida por reactivación gradual debido a alguno de los productos de la

reacción (29). La figura 4 ejemplifica los cursos temporales atípicos exhibidos por este tipo de enzimas.

En todos estos casos, es necesario llevar a cabo un análisis del curso temporal completo de la reacción bajo diferentes condiciones (p. ej. variando la concentración del sustrato o la enzima) a fin de obtener la información necesaria, lo que requerirá disponer de un modelo teórico.

Dicho modelo teórico deberá estar basado en un conocimiento del mecanismo cinético seguido por la enzima en cuestión – es decir, el orden de adición de los sustratos a la enzima y de la liberación de los productos – así como la presencia de etapas reversibles o irreversibles.

El análisis de dichas situaciones requerirá el uso de algún programa de computación con la capacidad de realizar el ajuste de los datos experimentales a un modelo que potencialmente pueda explicar la conducta observada.

Existen diversos softwares disponibles para llevar a cabo este tipo de análisis (30,31,32); en particular, el programa DYNAFIT es bastante práctico y está disponible de forma gratuita (30).

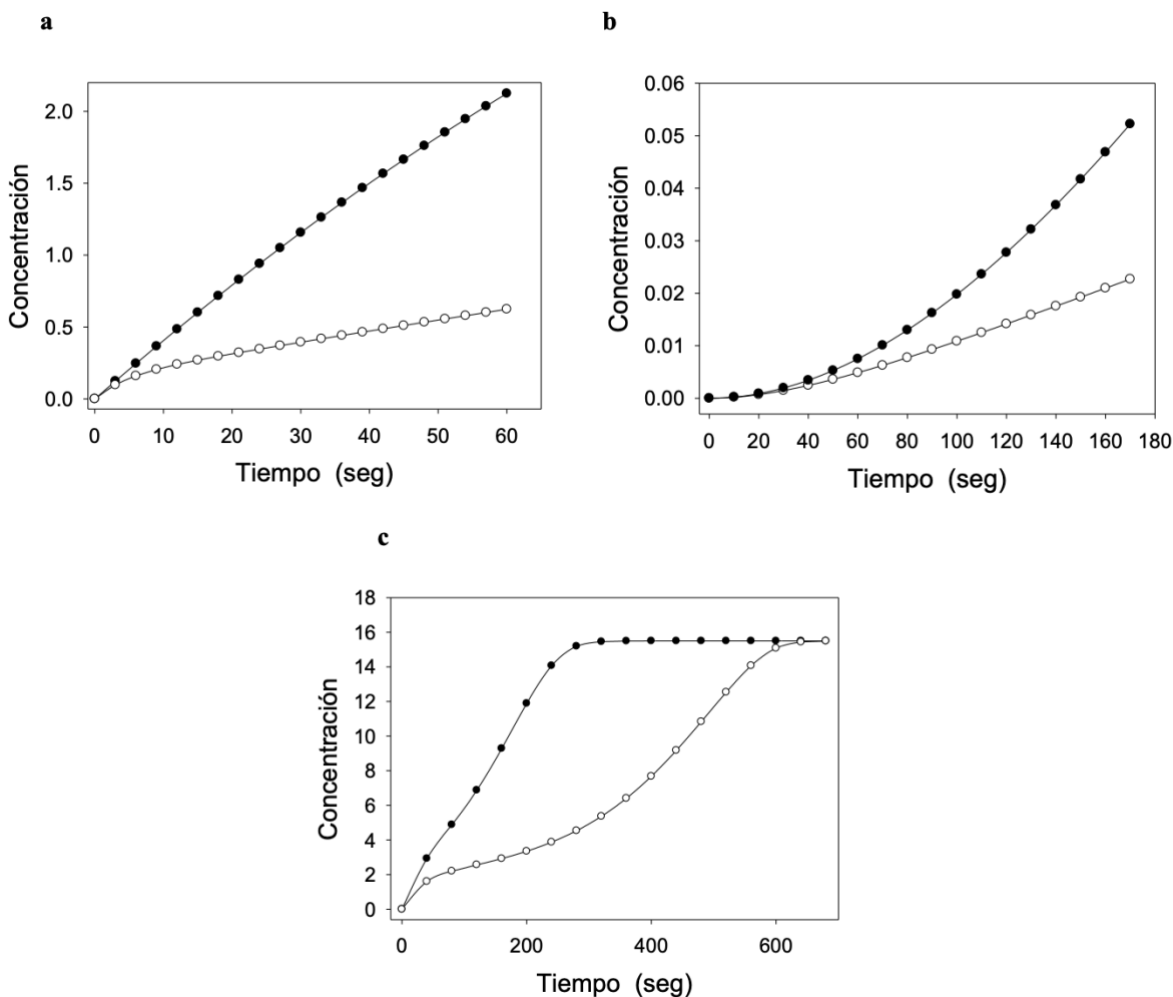
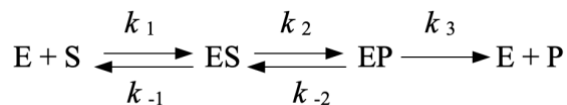


Figura 4. Cursos temporales ejemplificando conductas cinéticas atípicas. Los trazos muestran la formación de producto para enzimas que exhiben algún tipo de complejidad cinética. **a)** Inhibidor de unión lenta. Para ambas curvas se utilizó una concentración $5 \mu\text{M}$ de sustrato. (●) Curso temporal en ausencia de inhibidor; (○) Curso temporal en presencia de $1 \mu\text{M}$ de inhibidor. **b)** Enzima histerética con un tiempo de retraso tipo “lag”. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron: (○) $50 \mu\text{M}$; (●) $300 \mu\text{M}$. **c)** Inhibición por sustrato seguido de reactivación por uno de los productos de la reacción. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron (●) $60 \mu\text{M}$; (○) $200 \mu\text{M}$.

Brevemente, la secuencia de etapas a seguir es la siguiente:

1. Para enzimas que catalizan reacciones uni-uni (es decir, que actúan sobre un solo sustrato y generan un solo producto) será necesario añadir al esquema de reacción una etapa que represente el origen de la conducta cinética atípica. Dicha etapa puede ser una transición lenta o rápida entre dos conformaciones de la enzima, entre dos estados de agregación o bien la unión o liberación lenta del sustrato o el producto, respectivamente. La Figura 4a ejemplifica esta situación sencilla con una enzima que cataliza una reacción reversible y sufre una transición conformacional lenta en la cual ambos estados de la enzima poseen propiedades cinéticas diferentes.

2. Representar de manera individual cada una de las reacciones del modelo, indicando si la etapa en cuestión es reversible o irreversible y diferenciando, mediante subíndices, las constantes de velocidad asociadas a las reacciones hacia adelante y reversa. Utilizando como ejemplo el caso de una reacción simple uni-uni irreversible, las reacciones individuales podrían representarse de la siguiente manera:



Donde los subíndices con signo negativo representan la reacción reversa correspondiente.

3. Asignar valores numéricos a cada una de las constantes de velocidad del modelo. Esta es la etapa crítica del análisis, ya que el resultado de la simulación del modelo estará basado en la magnitud de cada una de dichas constantes. En una situación ideal, deben estar disponibles los valores exactos de todas las constantes de velocidad involucradas en la reacción catalizada – es decir, los valores determinados experimentalmente – de modo que únicamente sería necesario obtener, *In silico*, el valor de las constantes asociadas con la transición lenta o rápida. Cuando los valores exactos de las constantes de velocidad no han sido determinados, el análisis únicamente permitirá determinar si el modelo planteado puede reproducir la conducta observada experimentalmente. En este caso, las constantes de velocidad que se obtengan sólo serán aproximadas.
4. Si se trata de una enzima que utiliza dos o más sustratos, es esencial conocer su mecanismo cinético particular – es decir, el orden de adición de los sustratos a la enzima y de la liberación de los productos – así como si la enzima en cuestión trabaja en condiciones de equilibrio rápido o estado estacionario. En estos casos el número de constantes de velocidad involucradas en el modelo se incrementará de manera significativa.
5. Escribir las ecuaciones diferenciales que representen, para cada una de las especies involucradas en el modelo, la velocidad de cambio en su concentración en función del tiempo. En la mayoría de los programas de computadora que llevan a cabo este tipo de análisis, las ecuaciones diferenciales se generan automáticamente una vez que el investigador ha escrito el modelo.

En el caso de que fuese necesario hacerlo, la tarea no es tan complicada como pudiera parecer; sólo es necesario observar en el modelo la o las reacciones que conducen directamente a una especie particular, así como aquellas que utilizan a la misma especie. Por ejemplo, para el caso de la enzima libre que aparece al inicio del esquema anterior, su concentración se verá disminuida como consecuencia de la formación del complejo

enzima-sustrato, por lo que en la ecuación diferencial correspondiente deberá escribirse un término con signo negativo que refleje este hecho. Para la misma especie, puede verse que su concentración aumentará como resultado de la disociación del complejo enzima-sustrato, así como debido a la reacción química que genera el producto, generando dos términos positivos; cada uno de los términos consta del producto de una concentración por la constante de velocidad correspondiente; de este modo, la ecuación diferencial que define la variación en el tiempo de la enzima libre quedará de la siguiente manera:

$$\frac{d[E]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_3[EP] - k_1[E][S]$$

Siguiendo el mismo procedimiento, las ecuaciones diferenciales para el resto de las especies involucradas en el modelo serán:

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1[E][S]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] + k_{-2}[EP] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[EP] - k_3[EP]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[EP]$$

6. Llevar a cabo el ajuste de los datos experimentales al modelo planteado con el programa de elección. El análisis se llevará a cabo mediante integración numérica de cada una de las ecuaciones diferenciales, y el programa mostrará los resultados con los valores numéricos de las constantes de velocidad que mejor ajusten al modelo planteado.

En el caso particular de DYNAFIT existe la posibilidad de realizar un análisis estadístico bastante detallado que permite determinar la bondad del ajuste.

Referencias

1. Purich, D.L. (2010) *Enzyme kinetics. Catalysis & control*. Academic Press, London, UK
2. Núñez de Castro, I. (2001) *Enzimología*. Ediciones Pirámide. Madrid, España
3. Tipton, K.F. (2002) *Principles of enzyme assay and kinetic studies*. In: *Enzyme Assays. A Practical Approach* (Eisenthal, R. and Danson, M.J. Eds.) Oxford University Press. 1-47
4. Segel, I.H. (1975) *Enzyme kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley-Interscience, New York
5. Ainsworth, S. (1977) *Steady-State Enzyme Kinetics*. University Park Press
6. Hammes, G.G. and Schimmel, P.R. (1970) *Rapid Reactions and Transient States*. In: *The Enzymes Vol II* (Boyer, P.D. Ed.) Academic Press, New York

© 2022 Mensaje Bioquímico. Todos los derechos reservados. ISSN-0188-137X

Comité Editorial: González Andrade, M.; Hernández Alcántara, G.; Martínez González, J.J.;

Meraz Cruz, N.; Ramírez Silva, L.H. y Vilchis Landeros, M.M.

Publicado por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina; UNAM.

7. Rendón, J.L., del Arenal, I.P., Guevara-Flores, A., Uribe, A., Plancarte, A. and Mendoza-Hernández, G. (2004) Purification, Characterization, and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Mol. Biochem. Parasitol.* 133: 61-69
8. Holmgren, A. and Björnstedt, M. (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* 252: 199-208
9. John, R.A. (2002) *Photometric Assays. Enzyme Assays. A Practical Approach* (Eisenthal, R. and Danson, M.J. Eds.) Oxford University Press. 49-78
10. Tipton, K.F. and Dixon, H.B.F. (1979) Effects of pH on Enzymes. *Methods in Enzymology* 63: 183-234
11. Laidler, K.J. and Peterman, B.F. (1979) Temperature effects in enzyme kinetics. *Methods in Enzymology* 63: 234-257
12. Cleland, W.W. (1979) Substrate inhibition. *Methods in Enzymology* 63: 500-513
13. Cook, P.F. and Cleland, W.W. (2007) *Enzyme Kinetics and Mechanism*. Garland Science, London
14. Brocklehurst, K. (2002) *Electrochemical assays: the pH-stat*. In: *Enzyme Assays. A Practical Approach* (Eisenthal, R. and Danson, M.J. Eds.) Oxford University Press. 157-170
15. Gilli, R., Sari, J.C., Sica, L., Bourdeaux, M. and Briand, C. (1986) pH-Stat titration method for dihydrofolate reductase activity measurements: Application to determination of substrate Michaelis constant and antifolate inhibition constant. *Anal. Biochem.* 152: 1-5
16. Corbin, J.D. (1983) Determination of the cAMP-dependent protein kinase activity ratio in intact tissues. *Methods in Enzymology* 99: 227-232
17. Fritz, I.B., Schultz, S.K. and Srere, P.A. (1963) Properties of partially purified carnitine acetyl transferase. *J. Biol. Chem.* 238: 2509-2517
18. Syed, S.E.H. (2002) *High Performance Liquid Chromatographic Assays*. In: *Enzyme Assays. A Practical Approach* (Eisenthal, R. and Danson, M.J. Eds.) Oxford University Press. 103-140
19. Smith, A.G., Francis, J.E., Kay, S.J., Greig, J.B., and Stewart, F.P. (1983) Mechanistic studies of the inhibition of hepatic Urophorfinogen decarboxylase in C57BL mice by iron-hexachlorobenzene synergism. *Biochem. J.* 238: 871-878
20. Lebel, D., Poirier, G.G. and Beaudoin, A.R. (1978) A convenient method for the ATPase assay. *Anal. Biochem.* 85: 86-89
21. McClure, W.R. (1969) A kinetic analysis of coupled enzyme assays. *Biochemistry* 8: 2782-2786
22. Büchner, T., Pleiderer, G. (1955) Pyruvate kinase from muscle. *Methods in Enzymology* 1: 435-440
23. Neet, K.E., Keenan, R.P., and Tippett, P.S. (1990) Observation of a kinetic slow transition in monomeric glucokinase. *Biochemistry* 29: 770-777
24. Fernandes, P.M., Kinkead, J., McNae, I.W., Vasquez-Valdivieso, M., Wear, M.A., Michels, P.A.M., and Walkinshaw, M.D. (2020) Kinetic and structural studies of *Trypanosoma* and *Leishmania* phosphofructokinases show evolutionary divergence and identify AMP as a switch regulating glycolysis versus gluconeogenesis. *FEBS J* 287: 2847-2861
25. Maddaiah, V.T., and Madsen, N.B. (1966) Kinetics of purified liver phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 241: 3873-3881
26. Frieden, C. (1970) Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept. *J. Biol. Chem.* 245: 5788-5799
27. Morrison, J.F. and Walsh, C.T. (1988) The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv. Enzymol. & Related Areas Mol. Biol.* 59: 201-301
28. Masson, P., Goldstein, B.N., Debouzy, J.C., Froment, M.T., Lockridge, O. and Schopfer, L.M. (2004) Damped oscillatory hysteretic behavior of butyrylcholinesterase with benzoylcholine as substrate. *Eur. J. Biochem.* 271: 220-234
29. Rendón, J.L., Miranda-Leyva, M., Guevara-Flores, A., Martínez-González, J.J., del Arenal, I.P., Flores-Herrera, O. and Pardo, J.P. (2018) Insight into the mechanistic basis of the hysteretic-like kinetic behavior of thioredoxin-glutathione reductase. *Enzyme Research* DOI.ORG/10.1155/2018/3215462
30. Kuzmic, P. (2009) Dynafit. A software package for enzymology. *Methods in Enzymology* 467: 247-2



DR. JUAN LUIS RENDON GOMEZ
ORCID: 0000-0001-6866-4768

Biólogo egresado de la Facultad de Ciencias de la UNAM (1981). Estudió la Maestría en Ciencias en la Facultad de Medicina (1987) y el Doctorado en Investigación Biomédica Básica (1997) en el Instituto de Fisiología Celular, ambas de la UNAM.

Desde 1990 es profesor titular de tiempo completo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, donde ha participado de manera ininterrumpida en la docencia de pregrado y de posgrado. En el área de la investigación, su interés se ha centrado en la Físicoquímica de proteínas y en la Enzimología. Recientemente trabaja en las enzimas del metabolismo redox de parásitos.

Es autor de 38 artículos publicados en revistas de circulación internacional, de los cuales 13 son de autor de correspondencia. Sus publicaciones han sido citadas 400 veces en la literatura internacional. Asimismo, ha publicado 11 artículos en revistas nacionales y 2 capítulos de libro.

Pertenece a la Sociedad Mexicana de Bioquímica como socio numerario. Fue miembro del Sistema Nacional de Investigadores de 1987 a 2003. Ha sido tutor de estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado y ha participado como miembro de comités tutorales y en jurados de examen de licenciatura, maestría y doctorado.