

25 MAR 1973
DEPOSITO LEGAL

REV. MED. CHILE. VOL. 100, 1972

REVISTA MEDICA DE CHILE

Fundada en 1872

Drs. Germán Schneider, Rodolfo A. Philippi, Adolfo Thévenot, Adolfo Murillo, Pablo Zorrilla y Adolfo Valderrama.

PUBLICACION OFICIAL DE LA SOCIEDAD MEDICA DE SANTIAGO Y DE SUS FILIALES:

Sociedad Chilena de Biología y Medicina Nuclear, Sociedad Chilena de Cancerología, Sociedad Chilena de Cardiología, Sociedad Chilena de Dermatología, Sociedad Chilena de Diabetes y Enfermedades Metabólicas, Sociedad Chilena de Endocrinología y Metabolismo, Sociedad Chilena de Gastroenterología, Sociedad Chilena de Hematología, Sociedad Chilena de Medicina Psicosomática, Sociedad Chilena de Neurología, Sociedad Chilena de Neurología, Psiquiatría y Neurocirugía, Sociedad Chilena de Reumatología y Sociedad Chilena de Tórax y Tuberculosis.

Directorio de la Sociedad Médica de Santiago:

- PRESIDENTE Camilo Larraín A.
- VICE-PRESIDENTE Pedro Schüller H.
- SECRETARIO Italo Zanzi C.
- TESORERO Marta Velasco R.
- PAST-PRESIDENTE Luis Hervé L.

Directores: Hugo Claire S., Luis Costamaillère A., Alberto Daiber E., Manuel Dávila S.C., Germán G., Rafael del Río de la T., Carlos Jünemann B., Eduardo Katz C., Fernando Lazcano A., Litvak L., Andrés Riesco U., Oscar Román A., Fernando Rufin D., Eduardo Urrutia G. y Aníbal Varela del C.

Comité de Honor: Hernán Alessandri R., Alejandro Garretón S., Rodolfo Armas Cruz, Gregorio Lira S., Oscar Avendaño M., Gonzalo Corbalán T., Eduardo Cruz-Coke L.

EDITOR

Alejandro Goic

EDITORES ASOCIADOS

Humberto Reyes, Oke France, Ricardo Cruz-Coke

Editor Academia de Medicina: Hernán Romero

Secretaria: Lucía Rosales

Revista Médica de Chile es publicada mensualmente por la Sociedad Médica de Santiago.

Edición: Esmeralda 678 - Casilla 23-D - Santiago de Chile. Teléfono 392944.

de Suscripciones: El valor de la suscripción anual es de E\$ 840 y el número suelto es de E\$ 70. A los estudiantes de Medicina se les concede una tarifa especial de E\$ 360 por la suscripción anual. Toda suscripción debe hacerse medianamente adelantado a la Dirección de la Revista. Para los suscriptores extranjeros el valor es de US\$ 25 al año.

de dirección: Todo cambio de dirección deberá comunicarse oportunamente, no responsabilizándose la Revista por falta de ejemplares debido al no cumplimiento de esta disposición.

de Trabajos: Los trabajos enviados para su publicación en la Revista Médica de Chile deben ceñirse a las normas que aparecen bajo el título de INSTRUCCIONES A LOS AUTORES.

CIENCIAS BÁSICAS

ESPECIFICIDAD EN LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS*

AIDA TRAVERSO-CORI² y OSVALDO CORI²

ESPECIFICIDAD Y NIVELES DE ORGANIZACIÓN

La especificidad de los fenómenos biológicos se manifiesta bajo aspectos tan diversos como la identidad celular expresada en la mantención de un fenotipo, la capacidad de un anticuerpo de reconocer sólo con un determinado antígeno o la reacción de un tejido frente a un determinado fármaco. Los fenómenos celulares se explican, de acuerdo con el estado de nuestro conocimiento, en función de reacciones químicas. Estas son catalizadas por enzimas, en las que la especificidad puede ser estudiada en forma más directa que en el organismo o en la célula. El conocimiento de la especificidad a este nivel relativamente simple de organización, como es la enzima (en comparación con la célula), puede ayudarnos a interpretar fenómenos biológicos mucho más complejos.

En su aspecto más básico, la especificidad se reduce a un fenómeno químico: según su forma y carga eléctrica, una determinada molécula **A** reacciona con otra molécula **B** a mayor velocidad que con una tercera molécula **C**, pudiendo incluso no haber reacción de **A** con **C**. ¿Diremos que en este caso la molécula **A** es específica para **B** y no para **C**? Si **A** fuera un anticuerpo y **B** y **C** fueran dos antígenos diferentes, el biólogo no vacilaría en aceptar esta afirmación. ¿Pero, qué diríamos si las **A** son moléculas orgánicas simples, ó aún iones orgánicos? La afirmación sigue siendo válida para el químico, que suele hablar de "reacciones es-

pecíficas". Intentaremos salvar la distancia que existe entre el concepto biológico y la base química de la especificidad enzimática, al establecer paralelos entre reacciones enzimáticas y reacciones no enzimáticas.

En el curso de esta discusión nos referiremos con frecuencia a conceptos de la estructura molecular y de mecanismo de acción de las enzimas. Por ello hemos creído necesario esquematizar las principales características de la estructura molecular de las enzimas^{1, 2, 3} en la medida que sean necesarias para una ulterior discusión.

2. ESTRUCTURA PROTEICA DE LAS ENZIMAS

Una enzima es un catalizador (Ver Sección 3) de estructura proteica. Todo lo que se diga sobre proteínas y sobre catalizadores se aplica "a fortiori" a las enzimas, que son proteínas globulares.

a) **Aminoácidos y quiralidad.** Una proteína es una cadena polipeptídica lineal, más o menos larga, constituida por la condensación de 100 a varios miles de aminoácidos. Los aminoácidos que se encuentran en las proteínas son ácidos α amino y α carboxílicos. De esto resulta que el átomo de carbono α lleva cuatro substituyentes diferentes: el H, el NH_3^+ , el COO^- , y un grupo X o cadena lateral, que caracteriza a cada uno de los 20 aminoácidos integrantes de las proteínas. En el ejemplo de la Figura 1, X es un grupo bencilo ($\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$). Como los cuatro substituyentes son diferentes (a excepción de la glicina, en que $\text{X}=\text{H}$) el carbono α constituye un centro asimétrico o quiral (de $\chi\epsilon\iota\rho$, mano). Cuando, al igual que nuestras manos, un objeto no es idéntico a su imagen en el espejo por carecer de ejes o planos de simetría, se dice que es "quiral"⁴. Las moléculas quirales tienen la capacidad de rotar el plano de polarización de la luz, y esta propiedad se usa para reconocerlas y medirlas (Actividad óptica).

Una pareja de moléculas quirales que guardan entre sí la relación que existe entre un objeto y su imagen en el espejo se designa con el término

Abreviaturas: ATP=Trifosfato de adenosina.
ADP=Difosfato de adenosina
AMP=Monofosfato de adenosina o ácido adenílico.

Parte de los miembros de este Laboratorio citados en la bibliografía, han participado en los experimentos mencionados en esta revisión los siguientes colaboradores: Emilio Cardemil, Guillermo del Campo, Pilar Durruty, Eugenio Marin, Jaime Rabi y Pablo Valenzuela. Las investigaciones han sido subsidiadas en distintas etapas por CONICYT (Chile), Forge, U.S. Department of Agriculture, Comisión de Investigación Científica de la Universidad de Chile — Universidad de California.

Trabajo enviado directamente para su publicación.

Laboratorio de Bioquímica General, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile, Santiago de Chile.

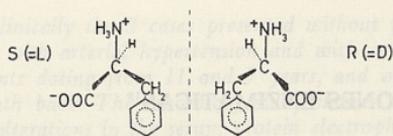


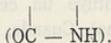
Figura 1. Estructura espacial de los dos enantiómeros de un aminoácido (Fenilalanina). El átomo de carbono central es el carbono α con sus cuatro sustituyentes diferentes. El $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ representa el grupo X a que se refiere el texto. La relación entre ambos enantiómeros es la de un cuerpo con su imagen especular, estando el plano del espejo representado por la línea punteada. Por ser el objeto diferente de su imagen especular, se designa a este tipo de molécula como un compuesto quiral.

de enantiómeros o enantiómeros (Figura 1). Nuestras manos o pies serían enantiómeros. Según la disposición espacial de los grupos sustituyentes se designa a los enantiómeros como **D** ó **L**. Más recientemente^{4, 5} se ha usado una nomenclatura más racional, designando a los enantiómeros como **R** (de *rectus*) o **S** (de *sinistrus*). Todos los aminoácidos que forman parte de las proteínas de organismos superiores son enantiómeros **L** (ó **S**). Las nomenclaturas dejan de coincidir únicamente en el caso de la **L** cisteína, que es designada por el prefijo **R**.

Una mezcla de cantidades equivalentes de dos enantiómeros se denomina "mezcla racémica" y carece de actividad óptica.

Por estar las moléculas proteicas formadas por aminoácidos, que son unidades quirales, el total de la proteína o su sitio activo (Párrafo d) son a su vez quirales. Esto les confiere ciertas características espaciales que condicionan el fenómeno de la estereoespecificidad, que se analizará más adelante.

b) **El enlace peptídico.** Para formar la cadena polipeptídica, el α COO^- de un aminoácido se condensa con el α NH_3^+ del siguiente, formando un enlace peptídico



El conjunto CO (CHX) NH se denomina "residuo". Se ha demostrado que el enlace peptídico tiene caracteres de doble enlace, por lo cual los átomos **C** y **N** no pueden girar un respecto al otro^{1, 2}. Además los cuatro átomos del enlace peptídico y los dos carbonos de los (CH-X) adyacentes se encuentran en un mismo plano (Figura 2). En cambio cada uno de estos planos está unido por los enlaces simples del

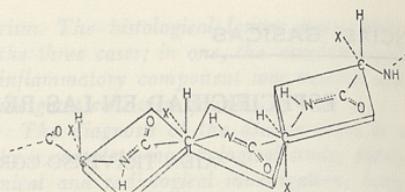


Figura 2. Representación esquemática de una cadena peptídica. Todos los átomos de un enlace peptídico, más los dos carbonos α adyacentes se encuentran en un plano. Cada plano puede rotar respecto a los planos adyacentes, dando así infinitas posibilidades de cambios de conformación. Los ángulos de Ramachandran están representados por los ángulos en que un plano se une al siguiente a través de un carbono tetraédrico.

al plano siguiente y puede rotar libremente. Los cambios que resultan de estas rotaciones se denominan cambios de "conformación", y son los que confieren flexibilidad a la molécula proteica. Podría compararse ésta a la plegabilidad que tiene una cadena: está formada por eslabones rígidos (los planos del enlace peptídico) unidos entre sí en forma flexible. No es comparable a un hilo o a un alambre, con infinitos puntos de posibles inflexiones.

c) **Niveles de organización en la estructura proteica.** El orden o secuencia en que se encuentran los residuos de aminoácidos en una cadena proteica es totalmente definido y característico para cada proteína. Se denomina **estructura primaria** de la proteína y está determinado genéticamente².

La flexibilidad de la cadena proteica tiene limitaciones. Numerosas interacciones químicas entre los residuos "X" de la cadena y de ésta con su medio, hacen que los valores posibles de los ángulos que forma cada par adyacente de residuos aminoácidos (ángulos de Ramachandran)² sean bastante restringidos. Esto da a las proteínas una conformación definida. De esto resultan otros dos niveles de organización, la estructura secundaria y terciaria, que definen la forma tridimensional de una proteína. La secundaria está dada por la sucesión de ángulos iguales entre sí, como una hélice o los peldaños de una escalera de caracol. En cambio en la estructura terciaria cada ángulo de Ramachandran es diferente de los adyacentes. Ambas estructuras suelen coexistir en diferentes segmentos de una proteína. Cabe señalar el error relativamente frecuente, que aparece en algunos textos, de señalar la estructura helicoidal como única o predominante en las enzimas. Dos enzimas proteolíticas, la quimotripsina y la tripsina tienen 43% y 14% respectivamente de porción helicoidal. En el resto de la molécula no hay estructura heli-

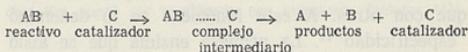
side³. La modificación de la estructura secundaria o terciaria (cambio conformacional) induce alteraciones de las propiedades físicas o catalíticas de una proteína. En la mayoría de las proteínas las cadenas laterales (X) se orientan de manera tal que las cadenas hidrofóbicas (alanina, leucina, metilalanina, triptófano) se dirigen hacia el interior de la molécula, en tanto que las cadenas polares (aspártico, tirosina, lisina, serina) se orientan hacia el exterior, o sea hacia el solvente, con el que interactúan.

(d) **Sitio activo de la enzima.** Si se compara el tamaño de la molécula de enzima con la de substrato, es obvio que aquella es mucho más grande, y por lo tanto sólo algunos de los residuos de la cadena proteica podrán tomar contacto físico directo con el substrato. Esta hipótesis ha sido confirmada ampliamente^{4, 6, 7} y se usa el término "sitio activo" o "centro activo" para designar aquellos residuos o cadenas laterales de la molécula de enzima que ligan al substrato (sitio de unión) y los que son responsables de la actividad catalítica (sitio catalítico). Siguiendo la idea de Emil Fischer, se creyó durante mucho tiempo que la enzima era un molde rígido en el que se acomodaba el substrato (teoría de la llave y la cerradura), pero numerosos datos cinéticos y cambios de propiedades físicas de la enzima al combinarse con el substrato han llevado a una teoría mucho más amplia, del "encaje inducido"⁷. La enzima, dotada de flexibilidad por su estructura proteica, sufriría pequeños cambios de conformación que le permitirían acomodarse en su sitio activo envolviéndola, por así decirlo, a la molécula de substrato. Esto se ha demostrado directamente por medio de cristalografía de rayos X, no sólo para las enzimas¹, sino que también para la hemoglobina, cuya conformación se modifica al combinarse con el oxígeno^{2, 8}.

Es importante destacar que cambios de conformación bastante alejados del sitio activo pueden facilitar o impedir que éste se pueda amoldar al substrato⁸. Este es el probable mecanismo del fenómeno de regulación enzimática que se discutirá más adelante (Párrafo 6).

3. LA CATALISIS ENZIMATICA

Un catalizador es una substancia que aumenta la velocidad de una reacción química. Forma con los reactivos un complejo intermediario, pero al final del ciclo el catalizador se desliga de los productos y se liga a nuevas moléculas de reactivo. De ahí que su concentración total (el catalizador libre más el combinado en forma de complejo) no se modifique en todo el curso de la reacción.



Dos características de la catálisis enzimática la diferencian en forma cuantitativa y no cualitativa de la catálisis no enzimática: la alta eficiencia del proceso catalítico y la especificidad.

La eficiencia catalítica es la capacidad de un catalizador de acelerar una reacción química, tomando como punto de comparación la velocidad de reacción observada en ausencia del catalizador. A veces esta última velocidad es tan baja, que puede decirse que no es dable observar reacción en ausencia del catalizador o enzima.

Es corriente observar que una enzima acelere una reacción química unas 10^6 a 10^{12} veces (Tabla 1) por sobre la velocidad de la reacción no catalizada o acelerada por catalizadores no enzimáticos⁹.

TABLA 1

CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS O POR OTROS CATALIZADORES.

Reacción	Catalizador	Constante de velocidad	Enzima	Catálisis enzimática	
				Constante de velocidad	Eficiencia catalítica V. enz. V. no enz.
Hidrólisis de péptidos	Acido	10^{-6}	Peptidasa	3×10^4	3×10^{10}
Hidrólisis de esterres	Acido	2×10^{-6}	Quimotripsina	7×10^3	$3,5 \times 10^9$
Hidrólisis de urea	Acido	7×10^{-7}	Ureasa	5×10^6	7×10^{12}
Hidrólisis de ATP	Acido	5×10^{-6}	Miosina	8×10^6	$1,6 \times 10^{12}$
$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	Ion ferroso	56	Catalasa	$3,5 \times 10^7$	6×10^5

Es importante destacar, sin embargo, que la Tabla I compara catálisis intermolecular (ácido o ion) con el efecto de enzimas especialmente eficientes. Cuando sustrato y catalizador están ligados en una sola estructura molecular relativamente rígida^{1, 3, 10}, la catálisis es intramolecular y la proximidad aumenta la eficiencia catalítica. Los efectos de aceleración logrados en estos casos alcanzan a valores de 10^5 veces la velocidad de la reacción no catalizada. Si se compara esto con el valor de 10^6 para algunas reacciones enzimáticas, se puede decir que la diferencia entre catálisis enzimática y no enzimática es sólo moderada, y que el estudio de la catálisis intramolecular es un modelo muy promisor para lograr comprender el mecanismo de acción de las enzimas.

Al estudiar la catálisis enzimática con criterio químico se observó que muchas enzimas reaccionaban con ciertos sustratos a mayor velocidad que con otros. A este fenómeno se lo denominó "especificidad"¹¹. La primera enzima que se aisló y purificó completamente fue la ureasa y resultó ser altamente específica, es decir reaccionaba sólo con la urea¹². Su descubridor, Summer, ensayó varios cientos de sustratos y de ellos sólo la urea es atacada por esta enzima.

Se ha insistido mucho, sobre todo en textos de Bioquímica, en la especificidad de las enzimas, definiéndola como la capacidad de actuar sólo sobre determinado sustrato o grupo de sustratos estructuralmente muy parecidos. Este concepto es bastante más complejo de como lo enunciara Emil Fischer en 1894⁷.

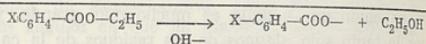
Si se piensa que tanto el catalizador como la enzima se unen con el sustrato y que este compuesto catalizador-reactivo o bien enzima-sustrato se desdobra dando catalizador o enzima más él o los productos, parece previsible que ciertos sustratos reaccionen a mayor velocidad que otros. El químico estudia el mecanismo de las reacciones orgánicas analizando la velocidad de reacción de moléculas que se asemejan entre sí, pero que difieren por la presencia de sustituyentes de diversa naturaleza. La Tabla II muestra la velocidad de hidrólisis de diversos benzoatos de etilo en presencia de base¹³.

Si se toma como punto de referencia la velocidad de hidrólisis del compuesto que tiene un anillo bencénico no sustituido ($X = H$), se ve que la sustitución del H por grupos que ceden (a, b) o que captan electrones (d, e, f) conduce a cambios en la velocidad de hidrólisis (Tabla II). Los grupos captadores de electrones aceleran y los dadores retardan la velocidad de reacción. Como un captador de electrones aumenta la carga positiva del anillo bencénico y del grupo COO- unido a él, pue-

TABLA 2

EFFECTO DE SUSTITUYENTES (X) SOBRE LA VELOCIDAD DE HIDROLISIS DE BENZOATOS DE ETILO PARA SUSTITUIDOS, CATALIZADA POR ALCALI.

Substituyente X	Velocidad relativa de reacción
a) —O—CH ₃	0.22
b) —CH ₃	0.46
c) —H (anillo bencénico no sustituido)	1.0
d) —F	3.1
e) —Cl	4.3
f) —NO ₂	103.0



de concluirse que el mecanismo de la hidrólisis alcalina de ésteres es un ataque del OH⁻ (carga negativa) al



(carga positiva). Cuanto mayor sea esta última, mayor será la velocidad de reacción. Lo contrario ocurre si se ceden electrones al anillo y por ende, se hace menos positiva la carga del grupo



Esto sería un modelo simple de la especificidad enzimática.

Más recientemente, el bioquímico está aprendiendo a usar este mismo enfoque químico y logra establecer que la mayoría de las enzimas tienen un grado muy variable de especificidad^{9, 10, 11}. En forma análoga al ejemplo citado, de la relación entre estructura del sustrato y velocidad de reacción pueden sacarse conclusiones sobre el mecanismo de la reacción enzimática y tener ciertos atisbos sobre la estructura de la porción de la molécula de enzima que constituye su sitio activo¹.

Pese a su mayor grado de complejidad, la catálisis enzimática no es otra cosa que una serie de reacciones químicas en las que uno de los reactivos es una proteína, la enzima. Es fundamental destacar que para cada reacción enzimática conocida se ha descrito una reacción química análoga¹⁴. Esto disipa totalmente la idea de que las reacciones enzimáticas sean cualitativamente distintas de las demás reacciones químicas y hace especialmente importante el estudio de modelos químicos para la comprensión de la catálisis enzimática^{1, 10, 15}. A medida que conocemos mejor su mecanismo, nos damos cuenta de que hay más semejanzas que diferencias entre reacciones no enzimáticas y enzimáticas.

Pero el fenómeno de la especificidad no se presenta sólo en la reacción de la enzima con el substrato, o sea en la catálisis propiamente tal. Un inhibidor que desplaza al substrato y retarda el proceso catalítico, puede tener un alto grado de especificidad, como en el clásico ejemplo de la inhibición de la succinohidrogenasa por el malonato¹¹. En contraposición a éste, un bloqueador de grupos SH (paracloromercuribenzoato) inhibirá a todas las enzimas en las que este grupo participe en la catálisis o en las que sea necesario para mantener la conformación catalíticamente más activa de la molécula de enzima. La especificidad de los inhibidores enzimáticos viene a ser en último término la base de la Farmacología, de la acción de los antibióticos y de gran parte de la Terapéutica. Un agente farmacológico ideal sería aquel que logra modificar una función celular sin afectar las demás funciones. Traducido al lenguaje del enzimólogo, esto equivaldría a actuar en forma específica sobre uno o más sistemas enzimáticos.

Otro aspecto interesante de la especificidad enzimática se refiere a la acción de ciertos metabolitos que aceleran o retardan una reacción enzimática en la célula y regulan de este modo la formación de los productos finales en las cadenas metabólicas. Este proceso recibe el nombre de regulación metabólica¹⁶.

La interacción entre enzima y agua puede ser modificada por compuestos del tipo de los detergentes. También en este fenómeno hay un grado de especificidad hasta ahora poco explorada y que discutiremos brevemente, ya que puede guardar relación con el paso de metabolitos o iones a través de membranas biológicas, que es otro mecanismo para poder comprender la acción de fármacos o de hormonas.

Queremos dejar en claro que hay muchos otros aspectos de la especificidad enzimática y biológica, pero que nos limitaremos a discutir sólo especificidad catalítica, regulatoria y de agentes tensioactivos.

ESPECIFICIDAD EN LA ACTIVIDAD CATALITICA

a) **Conceptos operacionales.** La velocidad de una reacción enzimática es función de numerosas variables, entre las que merecen destacarse la concentración de enzima, la concentración de substrato, la temperatura, el pH, etc.¹¹. Del descuido de estos hechos resultan algunos errores en la apreciación de la especificidad de una enzima frente a diversos substratos.

El método habitual para analizar la especificidad de una enzima frente a varios substratos

consiste en medir la velocidad de reacción de una misma cantidad de enzima con cada uno de los diversos substratos, en condiciones rigurosamente controladas de pH, temperatura, tiempo de reacción, etc. Se dice que una enzima es muy específica cuando actúa sobre un número muy reducido de substratos¹². Por el contrario, se dice que tiene un bajo grado de especificidad cuando es capaz de atacar una muy amplia gama de substratos^{11, 14}.

La dependencia de la velocidad de reacción como función de la concentración de substrato suele manifestarse en curvas del tipo A o B de la Figura 3, llamadas curvas de Michaelis. La velocidad alcanza un valor máximo ($V_{\text{máx.}}$), más allá del cual no hay aumento de la velocidad de reacción al aumentar la concentración del substrato. La concentración de substrato a la cual se alcanza 50% de la velocidad máxima. Se denomina constante de Michaelis (K_m) y es característica para una enzima y substratos determinados en circunstancias bien especificadas. K_m puede ser modificada por numerosos factores (11).

Para comparar la velocidad de una reacción enzimática frente a distintos substratos será necesario hacer el ensayo usando una amplia gama de concentraciones de cada uno de ellos. Sin embargo, no es raro encontrar en la literatura^{17, 18} que se estudie especificidad ensayando la actividad enzimática con una sola concentración de substrato a veces bastante baja.

La interpretación de estos datos incompletos puede llevar a conclusiones erradas, como se puede apreciar en la Figura 3. En ella se esquematiza el ensayo de una misma concentración de una enzima con 3 substratos diferentes, A, B, y C. Si la

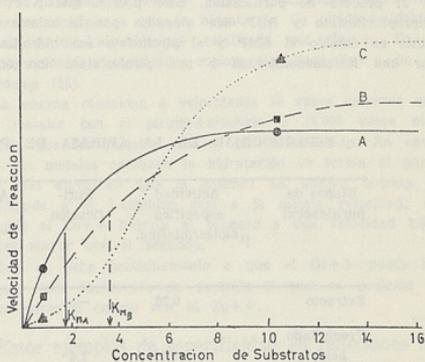


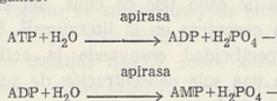
Figura 3. Velocidad de una reacción enzimática en función de la concentración de substrato. Las curvas A y B representan curvas típicas de Michaelis, con su K_m y $V_{\text{máx}}$ para cada una. La curva C es de tipo sigmoideo. Los símbolos indican lo que sucedería si se ensayara la actividad enzimática a una sola concentración de substrato.

Km de la enzima es diferente para los substratos A y B o bien si la cinética no es del tipo clásico de Michaelis (C) es obvio que a valores de concentración de 10 los substratos B o C serán atacados a mayor velocidad que el substrato A. Este último, en cambio como consecuencia de su Km más baja, mostrará mayor velocidad de reacción a una concentración de 1.

Es comprensible que cuando el substrato o la enzima son de difícil obtención, el experimentador abandone ciertas precauciones, pero entonces las conclusiones sobre la especificidad de la enzima deben ser muy cautelosas.

Otro punto que no debe olvidarse es que una enzima puede aparecer como poco específica cuando su grado de pureza es bajo (Extracto crudo) y aparezca como más específica a medida que se la purifica. Esto se debe a que se han logrado separar dos distintas enzimas que atacan substratos semejantes, pero a distintas velocidades.

La Tabla 3 ilustra este punto con datos obtenidos en nuestro Laboratorio con apirasa de papa (19) (20), enzima que cataliza la hidrólisis de ATP, ADP y otros pirofosfatos orgánicos liberando fosfomonoésteres y ortofosfato inorgánico.



Se puede apreciar que el cociente entre las velocidades de hidrólisis de ATP y fenilpropiltrifosfato, o entre las de ATP y ADP (actividad específica relativa) permanecen prácticamente constantes a pesar que se ha purificado 51 veces la actividad ATPásica, como se ve en la primera y segunda columnas de la Tabla 3. En cambio, el cociente AMP/ATP o pirofosfato/ATP decrece paralelamente al proceso de purificación. Esto prueba que ATP, fenilpropiltrifosfato y ADP son atacados por la misma enzima, en cambio el AMP y el pirofosfato son hidrolizados por una fosfomonoesterasa y una pirofosfatasa inorgánica

respectivamente, que se van eliminando en el proceso de aislamiento, dirigido hacia la obtención de apirasa pura (21).

b) **Especificidad relativa de las enzimas.** La apirasa cuando está pura se caracteriza por ser muy específica para una determinada porción del substrato e inespecífica para la otra parte del mismo. Esto se ajusta muy bien al comentario que Koshland⁶ hace sobre especificidad enzimática: "las enzimas no son específicas, ni inespecíficas. Una enzima con una alta especificidad de substrato tolera grandes variaciones en otras porciones del mismo".

La apirasa no tolera cambios en la parte más polar del substrato, vale decir, en la cadena pirofosfórica. Los compuestos llamados ATP-fosfonatos (Figura 4f), en cuyo grupo pirofosfato un oxígeno ha sido reemplazado por un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), no puede ser hidrolizado por la apirasa. Además los ATP-fosfonatos inhiben la hidrólisis de ATP y ADP. La interpretación de este hecho podría ser que el ATP-fosfonato se combinaría con la enzima modificando el sitio activo y por lo tanto impidiendo su acción normal sobre el substrato (22).

Otra exigencia de la apirasa, relacionada con la estructura de la cadena pirofosfórica, es que ésta debe estar esterificada por un extremo y libre por el otro. Prueba de esto es que no hidroliza compuestos como el pirofosfato inorgánico o trifosfato inorgánico (Figura 4d), como tampoco substratos cuya cadena pirofosforada está esterificada por ambos extremos (Figura 4g). Estas características de especificidad indicarían que en el sitio activo de la apirasa habría una porción polar que ligaría la cadena pirofosfórica y otra porción bastante menos polar a la que se uniría la porción orgánica del substrato, siendo esta unión indispensable para un enfrentamiento adecuado de la cadena pirofosfórica con los residuos aminoácidos polares del sitio catalítico. Un substrato cuya cadena pirofosfórica esté esterificada por ambos extremos no reacciona con la apirasa, como de hecho ocurre con compuestos como la ADP-glucosa (Figura 4g), nicotinamida-adenina dinucleótido, etc., en los cuales la cadena pirofosforada está esterificada por ambos extremos. El pirofosfato inorgánico (Figura 4h), que tiene dos extremos polares libres, es además un fuerte inhibidor de la hidrólisis de los substratos como ATP o ADP (23).

TABLA 3

ESPECIFICIDAD DE LA APIRASA DE PAPA EN DIVERSOS ESTADOS DE PURIFICACION.

Etapas de purificación	Actividad específica $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg.}$	Purificación	Actividad específica relativa para otros substratos, referida en forma relativa a ATP=1.0			
			ADP	Fenilpropil trifosfato	AMP	Pirofosfato inorgánico
Extracto	0.36	—	0.31	0.77	0.18	0.43
Precipitado ácido	0.50	1.4	0.18	0.88	0.01	0.03
Sulfato de amonio	4.0	11.1	0.21	0.69	0.002	0.02
Calentamiento + sulfato de amonio	18,5	51.0	0.25	0.69	0,0005	0,015

La actividad específica indica el grado de pureza de la enzima

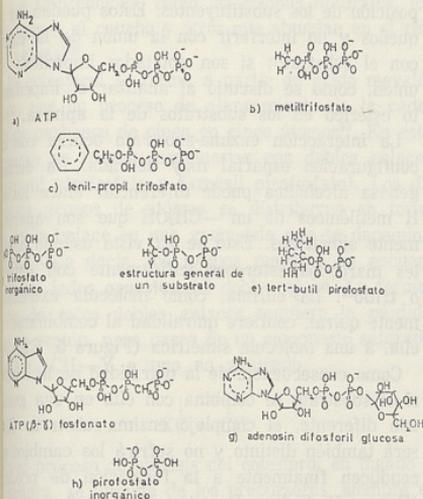


Figura 4. Substratos y no substratos de la apirasa de papa (*solanum tuberosum*). Las estructuras a, b y c son substratos; d, e, f y h son inhibidores y el compuesto g no es ni inhibidor ni substrato. La estructura que aparece en el centro de la figura resume los requerimientos estructurales mínimos que debe tener una molécula para ser substrato de la apirasa. Compárese el tamaño del substrato orgánico en b y en e.

El hecho que el adenosintetrafosfato (18), sólo sea hidrolizado con apenas un 5% de la velocidad de hidrólisis del ATP, sugiere que la tolerancia de la zona polar del sitio activo frente a cambios de la porción polar del substrato es bastante restringida, o dicho en otros términos, que la apirasa es específica tanto para el largo como la polaridad de la cadena pirofosforada. Hidroliza preferentemente difosforatos, mucho menos los tetrafosforatos y no actúa sobre los monofosforatos.

En cambio, las modificaciones que se pueden hacer al grupo orgánico que esterifica un extremo de la cadena pirofosforada, pueden ser muy drásticas, ya que no hay ninguna similitud estructural entre un grupo adenosina y un metilo (Figura 4a y 4b), pero los derivados pirofosforados de ambos compuestos son hidrolizados por la apirasa, con variaciones en la Km y Velocidad máxima. Incluso la velocidad de hidrólisis del metildifosfato es casi 100 veces mayor que la del correspondiente substrato "natural", el ADP (22).

Es importante hacer mención del tert-butilpirofosfato (Figura 4e) que por el hecho de poseer un grupo tan voluminoso como es el butilo terciario, en alguna forma obstaculiza la hidrólisis del grupo pirofosfórico, ya que ésta efectivamente no se efectúa (24). Este fenómeno, llamado impedimento estérico, se produce cuando el tamaño de un grupo o átomo impide que la molécula reaccione. La existencia de impedimento estérico para los substratos de la apirasa hace pensar que el sitio activo tenga una geometría análoga a una "zanja", en la que no pueden adaptarse moléculas globulosas, como el tert-butilpirofosfato, en tanto que caben otras más planas, como el fenilpropiltrifosfato (Figura 4c). Además, el tert-butilpirofosfato inhibe la hidrólisis del ADP (24).

En tanto que ATP y fenil-propiltrifosfatos son substratos equivalentes para la apirasa de papa (21), se ha vis-

to, en cambio, que el fenilpropiltrifosfato no puede sustituir al ATP como substrato desencadenante de la producción enzimática de luz en el sistema luciferina-luciferasa de la luciérnaga, ni tampoco el fenilpropiltrifosfato es inhibidor de esta emisión de luz (25). La estructura del núcleo adenilico es fundamental para que el ATP sea substrato de la luciferasa, en tanto que no lo es para el substrato de la apirasa.

c) Especificidad en reacciones no enzimáticas.

La hidrólisis no enzimática del ATP no difiere mucho de la enzimática. La curva de pH de la hidrólisis no enzimática de ATP a 95° se asemeja a la del fenilpropiltrifosfato y la de ADP al difosfato correspondiente, con una meseta entre pH 4 y 6, un descenso hasta pH 9 y una estabilización hasta pH 10. En cambio, la hidrólisis de di (fenilpropil) pirofosfato, molécula análoga a la de adenosin difosforilglucosa (Figura 4g), que no tiene grupos pirofosfóricos terminales, es 2.000 veces más lenta que la de los di o trifosforatos²⁶.

Esto hace pensar que la "especificidad" de la apirasa pueda explicarse en función de la susceptibilidad del substrato a un ataque por ácido, condicionado por un grupo dador de protones en el sitio activo de la enzima, que tomaría contacto con los grupos P—O—P terminales sólo si el resto de la molécula de proteína tiene la conformación adecuada.

En la hidrólisis no enzimática de ATP, catalizada a pH 5,0 se ha encontrado que el Cu⁺⁺, que forma complejos con los grupos fosforilo α y β es mejor catalizador que los demás iones metálicos, como Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ o Zn⁺⁺, que forman con los fosforilos β y γ. Además la hidrólisis de ATP es más rápida que la de ADP, lo que se explica porque posiblemente el pirofosfato, por ser un ácido más fuerte, tiene más tendencia a salir del resto de la molécula que el ortofosfato (27).

Otro paralelo interesante entre especificidad enzimática y no enzimática es que la hidratación de piridin-2-aldehído y de piridin-4-aldehído es catalizada por Zn⁺⁺, Co⁺⁺ o por anhídrido carbónico, enzima que tiene Zn⁺⁺ en su molécula (28).

La enzima reacciona a velocidades 10 veces mayores que los metales con el piridin-2-aldehído y 10.000 veces más rápido que los metales con el piridin-4-aldehído. En cambio, los metales catalizan la hidratación en forma al parecer más específica que la enzima: La enzima hidrata el 2-aldehído y el 4-aldehído casi a la misma velocidad; en cambio el Co⁺⁺ hidrata al primero a una velocidad 1.000 veces mayor que el segundo.

Esto se debe probablemente a que el Co⁺⁺ puede hidratar más fácilmente en posición 2 que en posición 4. Algo parecido ocurre con el Zn⁺⁺.

Estos ejemplos de especificidad en reacciones no enzimáticas recalcan que la especificidad en la catálisis no es una propiedad exclusiva de las enzimas, sino que es posible explicarla en función de las propiedades (forma y carga) de las moléculas de catalizador y substrato.

La enzima, por su mayor complejidad, puede tener una estructura tal, que pueda en ciertos ca-

sos catalizar sólo la reacción con una forma molecular única, como es el caso de la especificidad absoluta de la ureasa. Es lo más frecuente, sin embargo, que la especificidad enzimática se refiera sólo a ciertas porciones de la molécula de sustrato, y que la enzima sea indiferente a modificaciones de otras partes de la molécula, como la apirasa o las peptidasas⁸.

d) **Especificidad de enlaces.** Las esterases y peptidasas tienen grados intermedios de especificidad, llamada "de enlace"¹¹. En general para muchas esterases basta que una molécula tenga una estructura del tipo $X-CO-O-Y$ para que ésta sea hidrolizada dando el ácido $X-COO^-$ y el alcohol $HO-Y$. Para las peptidasas el fenómeno es semejante, y muchos compuestos de estructura $X-CO-NH-Y$ son sustratos de las distintas peptidasas. Más aún, algunas peptidasas (quimotripsina, tripsina) hidrolizan ésteres¹¹. De hecho, la estructura del enlace hidrolizado no difiere mucho en un éster $—CO—O—$ de la de un péptido $—CO—NH—$. En ambos casos la enzima podrá atacar un carbonilo (CO) unido a un átomo que tiene electrones no compartidos ($-O-$ o bien $-NH-$). Precisamente estas enzimas que atacan una gran variedad de sustratos han sido las más adecuadas para estudiar mecanismos de reacción²⁹.

5) ESTEREOESPECIFICIDAD

Ciertas formas de levaduras fermentan sólo uno de los enantiómeros del ácido tártrico, el dextrorrotatorio, en tanto que no atacan al compuesto levorrotatorio. Esta observación hecha por Pasteur en 1858 es la primera noticia que se tiene de una catálisis enzimática estereoespecífica.

Dakin observó en 1904 que una esterasa de hígado de cerdo hidrolizaba ésteres racémicos (Ver Párrafo 2º) del ácido mandélico, formando ácido (+) mandélico, en tanto que en la hidrólisis no enzimática, catalizada por HCl se formaba el ácido ópticamente inactivo, mezcla de dos enantiómeros³⁰.

a) **Ejemplos y posible mecanismo.** Son muchas las enzimas descritas que, o bien reaccionan exclusivamente con un solo miembro de un par de enantiómeros (el otro puede incluso ser inhibidor, como en la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa), o reaccionan preferentemente con uno de los dos⁴. Las enzimas estereoespecíficas pueden reaccionar con el enantiómero opuesto sólo si la estructura de la molécula de sustrato no ofrece impedimento estérico. Algunas peptidasas³⁰ y la glutamina sintetasa³¹ son específicas para enantiómeros S. Pueden, sin embargo, utilizar algunos derivados del enantiómero opuesto (R), según sea el tamaño y

posición de los substituyentes. Estos pueden ser pequeños y no interferir con la unión de la enzima con el sustrato; si son abultados impedirán esta unión, como se discutió al analizar el impedimento estérico en los sustratos de la apirasa.

La interacción enzima-sustrato ocurre con una configuración espacial muy definida. La dehidrogenasa alcohólica puede diferenciar entre los dos H metilénicos de un $-CH_2OH$ que son aparentemente simétricos. Esto se ha visto usando alcoholes marcados estereoespecíficamente con deuterio o tritio³². La enzima, como molécula extremadamente quiral, confiere quiralidad al combinarse con ella, a una molécula simétrica (Figura 5, ES_a).

Como consecuencia de la quiralidad de la enzima, si el sustrato se combina con ella en una geometría diferente, el complejo enzima-sustrato (ES_b) será también distinto y no sufrirá los cambios que conducen finalmente a la formación de producto (Figura 5). Si bien los sitios h' y h'' de la enzima son equivalentes, y los H' y H'' del sustrato pueden reaccionar indiferentemente con uno u otro, el total de la molécula ES_b es geoméricamente muy diferente de ES_a , como puede verse por la posición diferente de los grupos OH e Y. Por lo tanto habrá reacción (deshidrogenación) sólo si la configuración es la de la Figura 5A⁴.

b) **Esteroespecificidad en la biosíntesis de esteroles.** La capacidad de las enzimas para distinguir entre átomos de hidrógeno (protones) aparentemente iguales, ya que están situados a ambos lados de un plano de simetría, tiene importantes consecuencias en la biosíntesis de colesterol^{33, 34, 35} y en compuestos homólogos denominados terpeno-

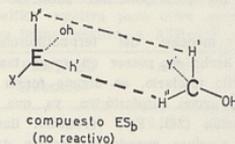
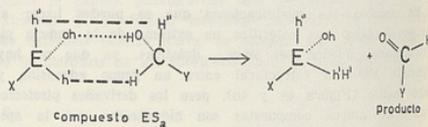


Figura 5. Diferentes geometrías de combinación de un sustrato simétrico con una enzima. En el compuesto enzima-sustrato ES_a , hay correspondencia entre los grupos h' , h'' y oh con H' , H'' y OH . Este compuesto es reactivo y se transforma en Enzima más Producto. En el compuesto ES_b esta correspondencia no existe, ya que oh y OH no se enfrentan. Este compuesto es químicamente diferente de ES_a y no reacciona.

es o isoprenoides, como las resinas naturales, los terpenos, el caucho y otros que abundan en el reino vegetal³⁶.

El colesterol se forma a partir de ácido mevalónico, por un proceso de alargamiento de la cadena de carbonos de cinco en cinco átomos³³. En este proceso se forman compuestos con dobles enlaces (geranyl pirofosfato y farnesil pirofosfato). Los diversos grupos de átomos se distribuyen en torno al doble enlace en una geometría que se denomina *trans*, vale decir, los grupos mayores se encuentran en lados opuestos del doble enlace. La formación de estos dobles enlaces requiere la pérdida de un protón, para pasar de un compuesto saturado $\text{XC}-\text{CH}_2-\text{Y}$ a uno no saturado



En el proceso de síntesis del colesterol en hígado o levadura, se elimina de los precursores, siempre el mismo protón, el designado por la configuración *W*. En cambio, el caucho tiene la geometría opuesta a la de los precursores del colesterol³⁷, vale decir, los sustituyentes mayores están al mismo lado del doble enlace (geometría *cis*). En este organismo, el protón eliminado es el del "otro lado de la molécula" del precursor, vale decir, el protón *R*. En resumen, la salida del protón de uno u otro lado de la molécula define la geometría del producto final³⁵. Esto es un fenómeno condicionado por la quiralidad de la enzima, y no por la estructura o reactividad del sustrato. Prueba de esto son datos recientemente obtenidos en nuestro laboratorio^{38, 39}, que muestran que en sistemas enzimáticos de *Pinus* o de *Citrus* la salida de un protón *S* conduce a la formación tanto de productos *cis* como *trans*. Las relaciones espaciales entre enzima y sustrato no son universales, y bien puede haber diferencias entre las que catalizan las mismas reacciones en el hígado, la levadura, la araña o el pino.

c) **Proyecciones farmacológicas.** Estas características estereoquímicas de las enzimas podrían parecer filigranas muy alejadas de la práctica médica. Pero no nos dejemos engañar: ningún principio médico deja de tener importancia para quien usa la ciencia. Bien saben los farmacólogos que con frecuencia sólo uno de los dos enantiómeros de un fármaco tiene actividad biológica.

Si se prepara oxitocina sintética, cuyos S-aminoácidos han sido totalmente substituidos por sus enantiómeros *R*, la hormona carece totalmente de actividad. Substituciones parciales producen hormonas con actividades parciales y diferentes para distintas actividades de la hormona. Por ejemplo, reemplazo de la S tirosina por R tirosina en

el 8º lugar de la cadena polipeptídica de la oxitocina disminuye la actividad de eyección de leche a 8% de la hormona natural, en tanto que la actividad oxitócica baja a 1.4%⁴⁰. Sólo el enantiómero *R* del pipradrol (α hidroxy α (2-piperidil) difenil metano) es estimulante del sistema nervioso central. En cambio ambos enantiómeros poseen actividad anticonvulsivante⁴.

Los ejemplos podrían multiplicarse. Basten estos pocos para recordar que todo fármaco reacciona en último término con una proteína celular, y que por ser ésta una molécula quiral, es evidente que la estructura espacial del fármaco no puede ser indiferente para su efectividad⁴.

d) **Estereoselectividad en reacciones no enzimáticas.** Los fenómenos químicos no enzimáticos también presentan cierto grado de discriminación frente a la estructura espacial de los reactivos. Cuando hay diferencias de reactividad, se habla de estereoselectividad, para diferenciar este fenómeno del caso más absoluto, en el que sólo uno de los enantiómeros reacciona. Se han descrito numerosas síntesis quiróticas en las que predomina en mayor o menor grado uno de los dos enantiómeros en el producto final^{41, 42}. Se han logrado sintetizar alcoholes primarios en los que uno sólo de los hidrógenos del CH_2OH es substituído por deuterio. Estos alcoholes son quirales y presentan actividad óptica⁴³.

Los mecanismos de la estereoselectividad son muy diversos. Si uno de los reactivos es quiral, y el otro tiene un sólo plano de simetría, la situación es muy semejante a la que ocurre con las enzimas (Figura 5). En general, los mecanismos para explicar la estereoselectividad química se basan en el efecto orientador que tiene una parte de la molécula de un reactivo sobre el curso de la reacción. Un grupo voluminoso puede condicionar un impedimento estérico para la entrada de un substituyente por un lado de la molécula. El substituyente entra preferentemente por el otro lado, dando así un producto quiral⁴². Esto vuelve a ilustrar la semejanza entre reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Esta similitud permite al bioquímico conocer el mecanismo de acción enzimática y al químico orgánico usar estos principios para sintetizar fármacos con la estructura espacial que tenga mayor actividad biológica.

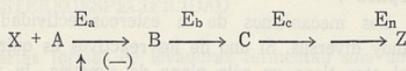
6) ESPECIFICIDAD EN EL CONTROL ENZIMÁTICO

La velocidad de una reacción enzimática depende de variables como la concentración de sustrato, temperatura, pH, etc.¹¹. Sin embargo, la poca sensibilidad de las enzimas frente a fluctuaciones

de estas variables hacen difícil explicar sólo en función de ellas la notable constancia de la composición química de la célula. El concepto de control o regulación enzimática ha surgido del estudio del comportamiento de enzimas frente a moléculas que son estructuralmente muy distintas de los substratos, pero que forman parte de una misma secuencia metabólica.

a) **Efectores alostéricos.** La glucosa es transformada en ácido pirúvico en una gran variedad de células. En este proceso, llamado glicolisis, se forman más de una docena de compuestos intermedios fosforilados. En 1942, Z. Dische demostró que uno de estos intermediarios, el ácido 3-fosfoglicérico, inhibía la utilización de la glucosa en levadura, e interpretó este efecto como un mecanismo de regulación del proceso glicolítico⁴⁴. Esta idea pasó desapercibida y más de 15 años después volvió a reactualizarse con el concepto de regulación por retroalimentación^{44, 45, 46}.

El concepto puede esquematizarse como sigue: Supongamos que un producto Z se biosintetiza a partir de los substratos A y X por una serie de reacciones catalizadas por las enzimas E_a, E_b, E_c, etc. Si Z inhibe algunas de las enzimas que inicia la secuencia (por ejemplo, E_a) esto frenará la producción de un exceso de Z y el total del proceso contará con un mecanismo de regulación.



En este proceso de control por retroalimentación la estructura de Z generalmente es muy distinta de A y de X, substratos de la enzima E_a. Por ello Monod ha designado este tipo de inhibición con el nombre de "alostérica" (de *αλλοσ* distinto, diferente, y *στροσο* sólido, estructural). Estas moléculas capaces de producir este tipo de inhibición o activación se han designado con el nombre de "efectores alostéricos". Se ha demostrado que su unión con la molécula de enzima ocurre en una región de ésta totalmente diferente del sitio activo o sitio catalítico donde reaccionan los substratos para transformarse en productos. Esta porción de la molécula, llamada "sitio alostérico", puede encontrarse en una distinta sub-unidad dentro de la estructura cuaternaria de la enzima (Ver Párrafo 2c), y se ha logrado incluso separar físicamente las subunidades catalíticas de las subunidades reguladoras de la enzima⁴⁷.

En el fenómeno de control alostérico puede haber tanto inhibiciones como activaciones. Muchas enzimas que indirectamente conducen a la formación de ATP (glicólisis, ciclo de Krebs), pero para las cuales éste no es sustrato, son inhibidas por el ATP y activadas por el ácido adenil-

lico (AMP). Por el contrario, las enzimas que consumen directa o indirectamente ATP (síntesis de componentes celulares) son activadas por ATP e inhibidas por AMP (16).

b) **Especificidad del efector alostérico.** Cabe preguntarse cuán específica es la repuesta de la enzima frente a un efector alostérico. También en este caso nos encontramos frente a diversos matices de especificidad, pero en términos generales puede decirse que la gama no es tan vasta como la que se observa en la especificidad catalítica. No se han descrito en este caso enzimas con el tipo de la especificidad de enlace de las peptidasas o esterasas, y las moléculas de efectores alostéricos se asemejan bastante entre sí⁴⁷.

La síntesis de compuestos tan diversos como el triptófano, el citosintrifosfato, la histidina, el AMP o el carbamilsulfato en la *Escherichia coli* se inicia en una etapa común: la glutamina sintetasa que transforma el glutamato en glutamina, en presencia de ATP y NH₄⁺. La glutamina sintetasa es relativamente poco específica en lo que se refiere al sustrato (31). En cambio, el efecto de los productos finales como inhibidores es altamente específico. Compuestos cuyo nitrógeno no proviene metabólicamente de la glutamina no son inhibidores. Por otra parte, ninguno de los productos finales aislados es capaz de inhibir totalmente la enzima, ni se observa acción potenciadora de uno de ellos sobre el otro. En cambio, la suma de todos los productos finales produce un 93% de inhibición (44). Esta gran complejidad en la regulación se interpreta como debida a la existencia de varios sitios alostéricos. De hecho, la enzima se ha podido clisocar en 14 subunidades (48).

Otro ejemplo de especificidad para el efector alostérico es el de la hexoquinasa, que es inhibida por su producto, la glucosa 6-fosfato y no por otros ésteres (44) (49), estructuralmente semejantes.

La fosfofructoquinasa, enzima clave de la glicólisis y cuyo sustrato es la fructosa 6-fosfato, puede fosforilar también otras cetosas como la tagatosa-6-fosfato o la sedoheptulosa-7-fosfato usando ATP, ITP, GTP o CTP como dadores de fosforilo. Su especificidad catalítica no es demasiado rígida. El ATP, a la vez que sustrato es un inhibidor alostérico. En cambio, ninguno de los otros dadores de fosforilo mencionados actúa como inhibidor. El 5'AMP suprime la inhibición por ATP, pero no así el 3' o 2'AMP, el 3'5'AMP cíclico, ADP u otras bases (50).

Algo parecido ocurre con la fructosa 1,6 difosfatasa que es inhibida en forma absoluta por el AMP (51) a pesar de que la enzima hidroliza otras cetosas, mostrando así una especificidad catalítica re'ativa.

La lista de ejemplos en los que la especificidad de la regulación es más estricta que la de la catalisis podría prolongarse. Hay enzimas en las que la especificidad del sitio alostérico es algo menos rigurosa, como la aspartato transcarbamilasa (47), que es inhibida por trifosfato de citidina o de deoxicitidina y en menor grado por los correspondientes nucleótidos de guanina. En general, la literatura sobre especificidad del sitio alostérico es bastante menos abundante y explícita que la que se refiere al sitio catalítico.

c) **Comparación entre especificidad catalítica y de regulación.** Los ejemplos presentados sugieren

que la respuesta de una enzima frente a un efector alostérico presenta en muchos casos un mayor grado de especificidad que su acción catalítica sobre el sustrato. Dado que sustrato y efector se unen con distintos sitios de la molécula de enzima⁴⁷ podemos pensar que esta diferencia de especificidad podría tener interpretación evolutiva.

Un alto grado de especificidad frente a un efector alostérico parecería ser un requisito importante para que una enzima pueda ser regulada eficientemente por los productos finales de una determinada secuencia metabólica. Contrariamente con lo que ocurriría con la catálisis, una baja especificidad haría el mecanismo menos eficiente. Una enzima que fuera poco específica frente a efectores alostéricos respondería a "mensajes" desde puntos metabólicos muy distintos. Las cadenas biosintéticas se verían frenadas o activadas por compuestos totalmente ajenos a un determinado camino metabólico, y sería imposible un funcionamiento coordinado de la maquinaria celular. La respuesta alostérica altamente específica en este caso tendría valor adaptativo y la evolución la habría conservado.

En cambio habría ventaja evolutiva en una menor especificidad del proceso catalítico. La catálisis por una enzima no es sino el refinamiento de un proceso que ocurre en la catálisis no enzimática¹⁵. La adecuada complementación entre forma y carga de catalizador y sustrato permite la formación del complejo activado y su desdoblamiento en productos. Importa en este caso la estructura de la molécula cerca del enlace atacado (Tabla I). Esta interacción es, por decirlo así, poco exigente en el catalizador de estructura simple. La complejidad de la molécula de enzima impone más impedimentos de forma y carga en porciones de la molécula de sustrato alejadas del enlace atacado. Estos impedimentos excluyen a muchas moléculas de posibles sustratos, con lo que la catálisis se hace más específica (Sección 46). Podría pensarse, sin embargo, que la conservación de una cierta inespecificidad en el fenómeno de la catálisis enzimática mantiene un mayor grado de adaptabilidad del sistema biológico y podría ser una ventaja evolutiva. Esta relativa tolerancia en la utilización de sustratos permitiría a la célula explotar un espectro más amplio de ellos para obtener materias primas.

La baja especificidad de muchas enzimas digestivas (Párrafo 4d) parece apoyar esta interpretación.

Es difícil en este momento poner a prueba esta hipótesis. No se han descrito para la regulación alostérica modelos no-enzimáticos adecuados, como se ha hecho para la actividad catalítica. Los

principales estudios sobre el mecanismo del control alostérico son hasta ahora cinéticos^{14, 46}. Es posible, que como la regulación alostérica requiere de varios puntos de acción en la molécula, sea necesario para que ésta se manifieste, de un grado de complejidad molecular que se puede obtener sólo en la molécula proteica y no en un modelo¹⁶. Atkinson ha comparado la enzima a un sistema electrónico miniaturizado, en el que se pueden obtener funciones muy diversas (catálisis, regulación) gracias a una adecuada distribución espacial de diversos elementos funcionales o circuitos.

7) ESPECIFICIDAD DE MODIFICADORES DE LAS INTERFASES

Se ha descrito el efecto inhibitorio de acil derivados (palmitílico, oleílico) de la coenzima A sobre muy diversos sistemas enzimáticos⁴⁴. Por esta baja especificidad se les asigna escaso valor como mensajeros de regulación (Ver Párrafo 6c). Estos compuestos intermediarios de la biosíntesis y de la degradación de ácidos grasos tienen una extensa porción hidrofóbica en el grupo acilo (palmitilo u otro) y una porción polar en el enlace pirofosfórico entre ribosa y ácido pantoténico y en el fosfomonoéster del carbono 3' de la ribosa^{1, 3} de la coenzima A. Esto les confiere carácter de detergente, y posiblemente deba a esta propiedad sus efectos inhibitorios inespecíficos.

Esto nos lleva a considerar un último tipo de especificidad: sustancias que puedan modificar la interfase, y con ello modificar la conformación de proteínas y, por ende, la actividad enzimática (Ver Párrafo 2c).

Se sabe que las porciones polares de las proteínas (Mioglobina, Hemoglobina) están orientadas hacia el exterior y las hidrofóbicas hacia el interior de la molécula^{1, 2, 8}. ¿Puede un detergente cambiar esto, y de este modo cambiar la actividad enzimática?

Se han descrito varias enzimas, en especial particuladas, que son activadas por detergentes⁵². Entre los detergentes naturales estudiados se encuentran los fosfolípidos y se sabe desde tiempos de Morawitz que las "cefalinas" activan la transformación de protrombina en trombina. Rouser⁵³ ha reestudiado este problema y ha visto que la capacidad de la fosfatidiletanolamina para activar la transformación de protrombina en trombina depende de la integridad de la molécula de fosfolípido, de su grado de insaturación y de la presencia de NH₂. Muchos análogos de este fosfatido no son capaces de activar la protrombina.

Muchas enzimas son activadas específicamente por fosfolípidos. En nuestro Laboratorio se ha po-

dido activar con fosfatidil-Serina una ATPasa de cerebro. En cambio, el agregado de detergentes sintéticos la inhibe⁵⁴.

Hemos estudiado también en nuestro Laboratorio el efecto de fosfolípidos sobre un sistema enzimático hidrosoluble de *Pinus radiata* que transforma ácido mevalónico en prenoles e hidrocarburos. Este sistema multienzimático es activado hasta en un 100% por la fosfatidiletanolamina extraída de cerebro de vacuno (55). El efecto es bastante específico. Hay activación sólo si la base del fosfatido es etanolamina y si hay por lo menos un ácido graso no saturado en su molécula. Los lisoderivados, los ácidos fosfatídicos o los triglicéridos carecen de efecto activador o son inhibidores. Detergentes sintéticos como los laurilsulfatos, cloruros de benzalkilamonio o deoxicolato son inhibidores; detergentes neutros (Tween, Triton) son inactivos. Finalmente, hemos observado que fosfolípidos bacterianos o vegetales, que tienen ácidos grasos con menos de 14 o más de 20 átomos de carbono son inactivos (55).

Nos encontramos ante un nuevo aspecto del fenómeno de la especificidad: un activador, cuyo efecto físico-químico como detergente no cambia mucho con su estructura, se comporta frente a un sistema enzimático en forma bastante específica.

La especificidad de compuestos detergentes en la modulación de procesos enzimáticos, si bien conocida desde antiguo en la coagulación de la sangre, aún no se ha analizado desde el punto de vista químico. Tal vez los estudios de la catálisis micelar puedan ofrecer un camino promisor⁵⁷.

Puede pensarse que la interacción proteína-fosfolípido también requiere de una adecuada distribución espacial de cargas y zonas hidrofóbicas para producir la forma más activa de enzima. ¿Podría ser éste un mecanismo más de mantención de la estructura terciaria de la enzima en la célula?

Los primeros estudios enzimológicos hicieron pensar que la catálisis enzimática era un fenómeno muy específico. La comparación con modelos de catálisis no enzimática indica que hay entre ambas sólo una diferencia de grado. Un mejor conocimiento de la estructura y función de las enzimas alostéricas o de las interacciones solvente-enzima nos llevarán a comprender mejor estas formas de especificidad.

No quisiéramos dejar la impresión de que la especificidad enzimática es la única explicación de los fenómenos biológicos. No menos importante que ella es la distribución espacial de enzimas, sustratos, productos e iones. La separación y transporte por membranas biológicas, la compartimentalización de actividades enzimáticas en partículas subcelulares, pueden muchas veces explicar fenómenos fisiológicos o farmacológicos que no obedecen a la acción directa de la substancia efectora sobre una enzima. Pero aún así, la formación

de membranas y de organelos celulares es producto de la acción organizada de enzimas. ¿No será acaso dable suponer que esta acción pueda ser afectada específicamente por determinadas moléculas? El avance de la bioquímica de los procesos de citogénesis podrá algún día contestar esta pregunta.

Se ha procurado presentar un panorama de diversos aspectos de la especificidad enzimática. La revisión dista mucho de ser completa, ya que no hemos discutido problemas como la especificidad de compuestos que inducen la síntesis de enzima o la especificidad de bases en la duplicación de los ácidos nucleicos⁵⁸. Las razones de esta limitación han sido por una parte el procurar discutir aspectos de la especificidad en los que tenemos experiencia personal, y por otra analizar aquellos en los que hay cierto grado de paralelismo entre sistemas enzimáticos y modelos químicos.

Esperamos que esta esquemática revisión sirva para presentar los aspectos químicos de la especificidad a quienes manejan a diario este concepto desde el punto de vista biológico.

RESUMEN

Las enzimas son proteínas que presentan actividad catalítica. Por la complejidad de su estructura molecular reaccionan con diferentes velocidades frente a distintos sustratos, fenómeno conocido con el nombre de especificidad.

Se discuten distintos grados y tipos de especificidad, sobre la base de la experiencia de los autores y de la literatura existente. Muchas enzimas pueden tolerar grandes cambios en una porción de la molécula de sustrato, en tanto que pequeñas modificaciones de carga o forma de otra porción del sustrato hacen que éste pierda su calidad de tal, como se ilustra con el ejemplo de la apirasa de *Solanum tuberosum*.

Hay enzimas capaces de distinguir entre distintas caras de una molécula, lo que lleva al fenómeno de la estereoespecificidad. Se presentan modelos no enzimáticos con el objeto de analizar el mecanismo de acción catalítica de las enzimas desde el punto de vista estrictamente químico.

La velocidad de reacción de una enzima puede estar sujeta a un tipo de regulación llamada alostérica. En esta interacción suele aparecer la especificidad para el efector alostérico como más rigurosa que en la catálisis. Se discute una posible ventaja evolutiva en la alta especificidad de regulación y en la menor especificidad de catálisis.

Detergentes naturales, como los fosfolípidos, modifican la actividad enzimática en forma más o menos específica, lo que se discute en base a ob-

servaciones en la coagulación de la sangre o en la síntesis de isoprenoides.

Se recalca la importancia de la especificidad enzimática en la comprensión de fenómenos como la inmunidad o la acción de fármacos.

Referencias

1. BERNHARD, S.— The Structure and Function of Enzymes. New York, W.A. Benjamin, 1968.
2. DICKERSON, R. and GEIS, O.— The structure and action proteins. New York, Harper and Row, 19.9.
3. MAHLER, M. R. and CORDES, E. H.— Biological Chemistry. New York, Harper and Row, 1968.
4. BENTLEY, R.— Molecular asymmetry in Biology. New York, Academic Press, 1969.
5. CAHN, R.S.; INGOLD, C.K. and PRELOG, V.— The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. *Experientia* 7: 81, 1956.
6. KOSHLAND, D.E.— Mechanism of transfer enzymes, en *The Enzymes* 2a. Ed. (P.D. Boyer, H.; Lardy and K. Myrback, eds). Vol. I. New York, Academic, p. 311, 1959.
7. KOSHLAND, D.E.— The active site and enzyme action. *Advances Enzymol.* 22: 45, 1960.
8. PERUTZ, M.F.— Some molecular controls in Biology. *Endeavour* 26 (97): 3, 1967.
9. LADLER, K.— The chemical kinetics of enzyme action. London, Oxford University Press, p. 165, 1958.
10. BRUCE, T.C. and BENKOVIC, S.— Bioorganic mechanisms New York, W. A. Benjamin, 1966.
11. DIXON, M. and WEBB, E.C.— *Enzymes*. Londres, Longmans, 1955.
12. VARNER, J.E.— Urease en *The Enzymes*, 2a. Ed. (P.D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, eds.) Vol. IV. New York, Academic Press, p. 247, 1960.
13. ROBERTS, J. D. and CASERIO, M. C.— Basic principles of organic Chemistry. New York, W.A. Benjamin Inc.: p. 955, 1965.
14. KOSHLAND, D.E. and NEET, K.E.— The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 37: 359, 1968.
15. BENDER, M.L. Mechanisms of homogeneous catalysis from protons to proteins. New York, J. Wiley and Sons, 1971.
16. ATKINSON, D.E.— Enzymes as control elements in metabolic regulation, en *The Enzymes*, 3a. Ed. (P.D. Boyer Ed.) New York, Academic Press, 1970.
17. STOLL, E.; RYDER, E.; EDWARDS, J.B. and LANE, M.D.— Liver acetyl CoA carboxylase. Activation of model partial reactions by tricarboxylic acids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60: 986, 1968.
18. LIEBECO, C.; LALLEMAND, A. and DEGUELDRE-GUILLAUME, M.J.— The apyrase activity of potato extract. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 610, 1969.
19. TRAVERSO CORI, A.; CHAIMOVICH, H. and CORI, O.— Kinetic studies and properties of potato apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.* 109: 173, 1965.
20. TRAVERSO-CORI, A.; TRAVERSO, S. and REYES, H.— Different molecular forms of potato apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 133, 1970.
21. CORI, O.; TRAVERSO-CORI, A.; TETAS, M. and CHAIMOVICH, H.— Substrate specificity and inhibition studies on potato apyrase. *Biochemische Z.* 342: 345, 1965.
22. ARON, L.; VALENZUELA, M.A. y TRAVERSO CORI, A.— Efecto de substratos sintéticos sobre la actividad de la apyrasa. XI Congreso Latinoamericano de Química. Resúmenes VI: 55, 1972.
23. CORI, O.— Specificity of potato apyrase (Discussion). International Symposium on Enzymatic aspects of Metabolic regulation (M.P. Stulberg, ed.). Bethesda, Monograph 27, National Cancer Institute, p. 166, 1967.
24. ZUNZA, F.; VALENZUELA, M.A. y TRAVERSO CORI, A.— Substratos sintéticos de la apyrasa de papa (*Solanum tuberosum*). *Arch. Biol. y Méd. Experiment.* 7: 849, 1971.
25. MILLER, D.L. and WESTHEIMER, F.H.— The enzymic hydrolysis of γ Phenyl-propyl di and triphosphates. *J. Amer. Chem. Soc.* 88: 1511, 1966.
26. MILLER, D. L. and WESTHEIMER, F. H.— The hydrolysis of γ Phenyl-propyl di and triphosphates. *J. Amer. Chem. Soc.* 88: 1507, 1966.
27. LOWENSTEIN, J. M. and TETAS, M.— The effect of bivalent metal ions on the hydrolysis of adenosine di and triphosphate. *Biochemistry* 2: 302, 1963.
28. POCKER, Y. and MEANY, J.E.— A comparative study of enzymatic and metal ion catalyzed hydration of pyridine aldehydes. *J. Amer. Chem. Soc.* 89: 631, 1967.
29. BENDER, M.; KEZDY, F. and GUNTER, C.R.— The anatomy of enzymatic catalysis: α chymotrypsin. *J. Amer. Chem. Soc.* 86: 3714, 1964.
30. HELFERICH, B.— Enzyme specificity, en *The Enzymes*, 1a. Ed. (J.B. Sumner and K. Myrback, eds.). Vol. I. part 1. New York, Academic Press, p. 101, 1950.
31. MEISTER, A.— The specificity of glutamine synthetase and its relationship to substrate conformation at the active site. *Advances in Enzymol.* 31: 183, 1968.
32. VENNESLAND, B. and WESTHEIMER, F.H.— Hydrogen transport and steric specificity in reactions catalyzed by pyridine nucleotide dehydrogenases, en *Mechanism of Enzyme action* (W. McElroy and B. G'ass, eds.). Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 367, 1954.
33. POPJAK, C. and CORNFORTH, J. W.— The biosynthesis of cholesterol. *Advan. Enzymol.* 22: 281, 1960.
34. POPJAK, G. and CORNFORTH, J. W.— Substrate stereoregistry in squalene biosynthesis. *Biochem. J.* 101: 553, 1966.
35. POPJAK, G.— Stereospecificity of enzymic reactions, en *The Enzymes*, 3a. Ed. (P.D. Boyer, ed.), New York, Academic Press, p. 115, 1970.
36. CORI, O.— Bioquímica de las resinas naturales. *Bol. Academia Ciencias, Chile*, 1: 57, 1968.
37. ARCHER, B.L.; BARNARD, D.; COCKBAIN, E.G.; CORNFORTH, J.W.; CORNFORTH, R. and POPJAK, G.— The stereochemistry of rubber biosynthesis. *Proc. Royal Soc. B.* 193: 519, 1966.
38. CHAYET, L.; PONT LEZICA, R.; GEORGE NASCIMEN-TO, C. y CORI O.— Biosynthesis of sesquiterpene alcohols and aldehydes by cell free extracts from orange flavedo. *Phytochemistry*, en prensa, 1972.
39. JEDLICKI, E.; JACOB, G.; FAINI, F.; CORI, O. and BUNTON, C. A.— Stereospecificity of isopentenylpyrophosphate isomerase and prenyl transferase from Pinus and Citrus. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 550, 1972.
40. DRABAREK, S. and DU VIGNEAUD, V. 2-d tyrosine-oxytocin and 2-d tyrosine-deamino-oxytocin, diastereoisomers of oxytocin and deamino-oxytocin. *J. Amer. Chem. Soc.* 87: 3974, 1965.
41. BOYD, D.R. and MCKERVEY, M.A.— Asymmetric synthesis. *Quart. Review* p. 95, 1968.
42. MORRISON, J.D. and MOSHER, H.S.— Asymmetric organic reactions. Englewood Cliffs, N.J. Prentice Hall Inc., 1971.
43. STREITWIESER, A.; WOLFE, J.R. and SCHAEFFER, W. D.— Stereochemistry of the primary carbon. X. Stereochemical configurations of some optically active deuterium compounds. *Tetrahedron* 6: 338, 1959.
44. STADTMAN, E.R.— Allosteric regulation of enzyme activity. *Advances Enzymol.* 28: 41, 1966.
45. UMBARGER, H.E.— Feedback control by end product inhibition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25: 301, 1968. *Science* 123: 848, 1956.
46. MONOD, J.; WYMAN, J. and CHANGEUX, J.P.— On the nature of allosteric transitions. A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12: 88, 1965.
47. GERHART, J. C. and PARDEE, A. B.— The enzymology of control by feedback inhibitions. *J. Biol. Chem.* 236: 891, 1962.
48. STADTMAN, E.R.— Mechanism of enzyme regulation in metabolism. en *The Enzymes*, 3a. Ed. (P.D. Boyer, ed.). New York, Academic Press, p. 398, 1970.
49. SOLS, A.— Regulation of liver glucokinase and muscle hexokinase. *Proc. V Congress Internat. Diabetes Feder.* Toronto, Chapter 9, p. 118, 1965.
50. RAMAIAH, A.; HATHAWAY, J.A. and ATKINSON, D. E.— Adenylyate, a metabolic regulator. Effect on yeast phosphofructokinase kinetics. *J. Biol. Chem.* 239: 3619, 1964.
51. TAKETA, K. and POGELL, B.M.— Reversible inactivation and inhibition of Fructose-1,6-diphosphatase by adenosine nucleotides. *Biochem. and Biophys. Research Commun.* 12: 229, 1963.
52. DUTTERA, S.— Studies of the phospholipid requirement of glucose 6 phosphatase. *Duke University, Ph. D. Thesis* 1968. University Microfilms 68-14 303, Ann Arbor, 1968.
53. ROUSER, G.— Phospholipids and Blood coagulation. *Amer. J. Clin. Nutr.* 6: 681, 1958.
54. ROSEMAN, E. and ISRAEL, Y.— Phospholipid activation of Na⁺ + K⁺ ATPase en *Molecular Basis of Membrane Function* (D.C. Tosteson, ed) Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1969.

- 55.—GEORGE-NASCIMENTO, C.; BEYTIA, E.; AEDO, A.R. and CORI, O.— Transformation of mevalonic acid into isoprenoid compounds by enzymes from *P. radiata*, Activation of the over-all reaction by phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 132: 470, 1969.
- 56.—JACOB, G.; GEORGE-NASCIMENTO, C.; AEDO, A.R. y CORI, O.— Acción de la fosfatidiletanolamina sobre la transformación de ácido mevalónico 2—14C en preneles e hidrocarburos. Soc. Biol. de Chile, XII Reunión Anual. Resúmenes, p. 127, 1969.
- 57.—BUNTON, C.A.; FENDLER, E.J.; SEPULVEDA, L. and YANG, K.U.— Micellar catalyzed hydrolysis of nitrophenyl phosphates. J. Amer. Chem. Soc. 90: 5512, 1968.

ABSTRACT

SOME ASPECTS OF ENZYME SPECIFICITY

Some aspects of enzyme specificity are reviewed. Specificity in enzyme catalysis covers a wide spectrum, ranging from bond specificity to the absolute specificity of urease. Potato pyruvate exhibits an intermediate degree of specificity. Parallels are drawn between the specificity of enzymic and non-enzymic reactions,

and some stereochemical aspects of enzyme action are discussed.

The more stringent specificity of the allosteric site is presented for several enzymes. This may be considered advantageous from the evolutionary point of view, since a low specificity in catalysis may allow an organism to exploit a wider variety of substrates. On the other hand, regulation is better achieved if the enzyme responds to a unique allosteric signal.

A certain degree of specificity has been observed in the enhancing effect of surface active substances, such as phospholipids. Examples are given from the fields of blood coagulation and isoprenoid biosynthesis.

The importance of enzyme specificity in our understanding of immunity, drug action and other biological phenomena is stressed.

Reprint Requests: **Dra. AIDA TRAVERSO-CORI**
Facultad de Ciencias Químicas
Casilla 233
Santiago de Chile

*

*