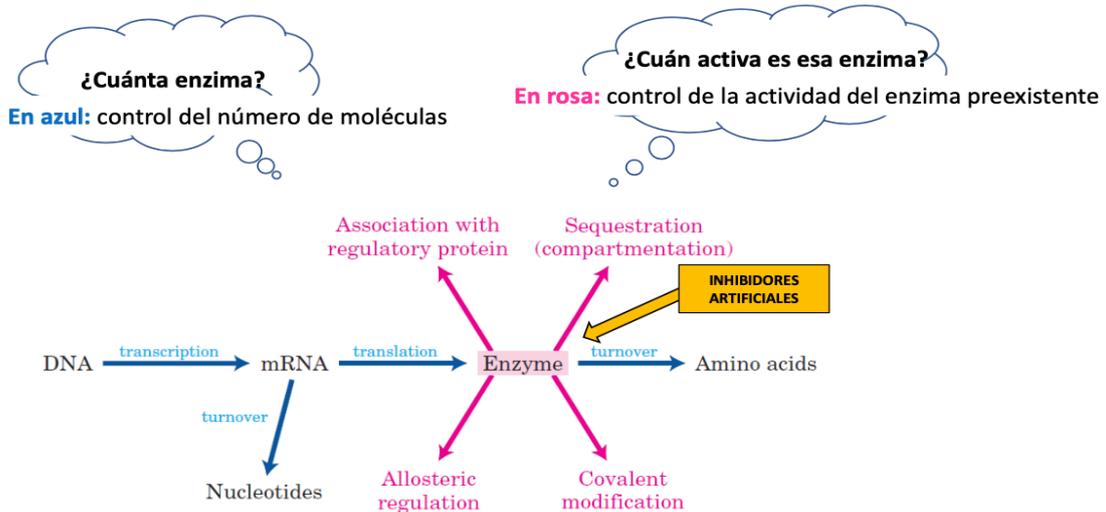


## T8. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### Mecanismos generales de la regulación enzimática



**Factores que afectan a la eficacia de un enzima:**  
pH, temperatura, compartimentalización.

### Efecto de las variaciones fisicoquímicas del entorno

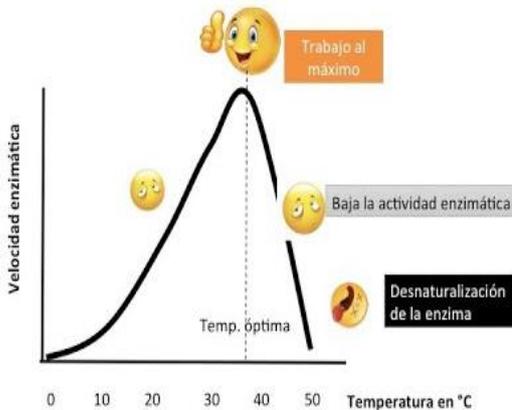
#### Efecto de la temperatura

Existe un incremento de la velocidad con la temperatura: entre 0-40 °C, la  $V_0$  aumenta x2 cada 10 °C.

La temperatura óptima para la mayoría de las enzimas humanas está entre 35-40 °C; por encima de 40 °C se reduce la  $V_0$  y el enzima se desnaturaliza.

**AUMENTO DE LA TEMPERATURA = AUMENTO DE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN**  
(Hasta un límite, cuando se sobrepasa la temperatura de desnaturalización de la enzima/ pérdida de su función)

## Efecto de la temperatura



### Ejemplo clínico en una mutación de la G6PDH:

**Inestabilidad térmica** de la Glucose-6-Phosphate dehydrogenase **produce anemia** por pérdida de hematíes (vida media más corta).

**G6PDH:** Es el enzima regulado/importante en la **ruta de las pentosas de fosfato** que mantiene la homeostasis oxidativa. Los eritrocitos por transporter  $O_2$  requieren especialmente de esta vía. Si está defectuosa los eritrocitos pueden lisarse por estrés oxidativo.

En los eritrocitos, la enzima G6PDH es una enzima importante para el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. Una de las variantes de la anemia hemolítica se produce por una mutación que genera una forma termolábil de esta enzima, incapaz de funcionar a la temperatura corporal habitual. Este problema afecta especialmente a los eritrocitos, ya que son células enucleadas, no poseen la capacidad de renovar las enzimas que se desnaturalizan por el efecto de la temperatura.

## Efecto del pH

Los enzimas tienen **pHs óptimos** (pH=7,4 y algunos tienen pH muy ácido o básico, ej. enzimas digestivas).

**Pequeños cambios de pH:** amortiguados por los tampones fisiológicos organismo.

**Cambios grandes:** producen efectos adversos.

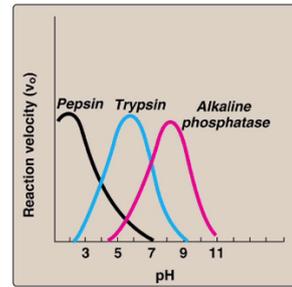
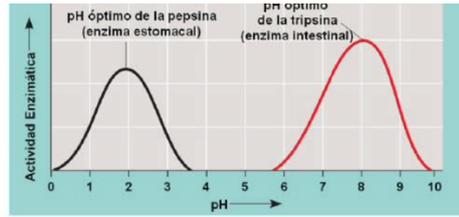
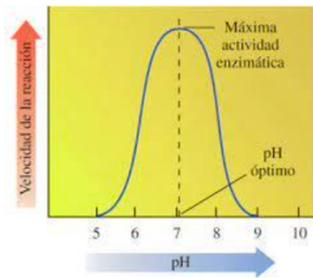
1. Efecto del pH sobre la ionización del sitio activo: El proceso catalítico por lo general requiere que la enzima y el sustrato tengan grupos químicos específicos ya sea en estado ionizado o no ionizado con el fin de interactuar.

2. Efecto del pH sobre la conformación de enzimas: El pH óptimo es en el cual la conformación es la más adecuada para la actividad catalítica.

Conformación: mantenida por cargas de los AAs interacciones en la estructura proteica.

Los pHs extremos puede afectar a la carga de los aminoácidos y desnaturalizar las proteínas.

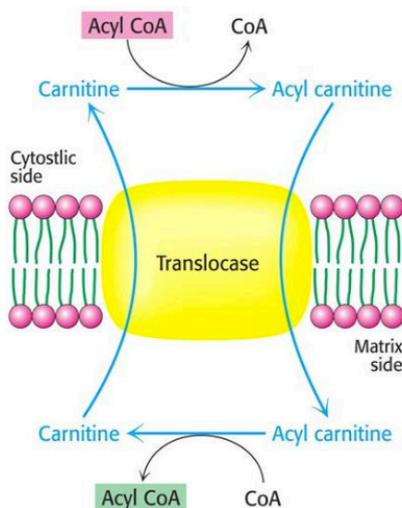
Los cambios en el pH del medio pueden alterar al estado de ionización de las cadenas laterales de los aa ácidos y básicos. Estos cambios pueden afectar a la afinidad de la enzima por el sustrato, si se ven alteradas las cargas de los aa que participan en la formación de interacciones no covalentes entre la enzima y el sustrato para formar el complejo ES. También se puede alterar la etapa de transformación del sustrato en producto, si se modifican los residuos catalíticos.



### Compartimentalización sobre la actividad enzimática

Control de la actividad enzimática por **separación física del sustrato**. Pueden existir orgánulos de almacenamiento de enzimas.

Se requiere de un **transportador del sustrato** en la membrana del orgánulo para que el enzima tenga acceso al sustrato. Se requiere una señal para la liberación del enzima. **Existe una limitación física en la disponibilidad del sustrato.**



**EJEMPLO: las vías/rutas metabólicas OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LA MITOCONDRIA – primer enzima mitocondrial, que es la Acil Coa deshidrogenasa.**

Requiere de **transportadores** en las membranas mitocondriales y de carnitina. **SI NO HAY CARNITINA NO FUNCIONARÁ LA PRIMERA REACCIÓN ENZIMÁTICA POR FALTA DE SUSTRATO.**

## Efecto de los moduladores

**Inhibidor:** cualquier molécula que reduce la velocidad (*ralentizan o detienen*) de una reacción catalizada por enzimas. Son moléculas naturales, artificiales o proteínas.

**Irreversibles:** inactivación permanente por ENLACES COVALENTES.

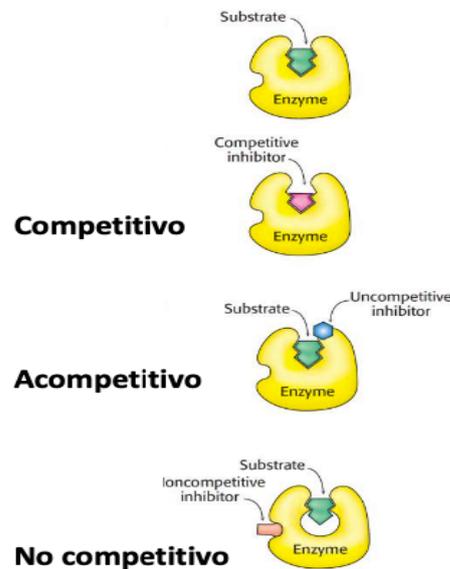
Son comunes en farmacología, tratamiento de patologías muy diversas.

**Reversibles:** unión al enzima por enlaces débiles o no covalentes. El complejo EI (enzima-inhibidor) se encuentra en equilibrio con las formas libres y se rompe por dilución.

Los inhibidores fisiológicos en la REGULACIÓN DEL METABOLISMO son:

- A) Competitivos
- B) No competitivos
- C) Acompetitivos

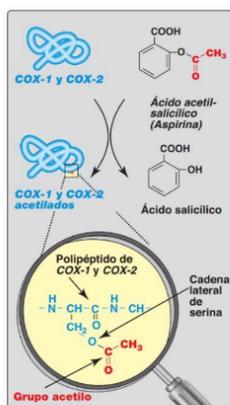
## Enzimas irreversibles



## Inhibidores irreversibles: inhibidores suicidas

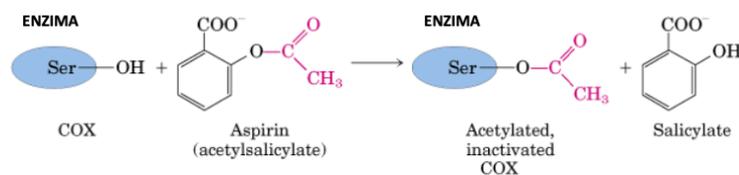
Son moléculas que se suelen unir a la enzima de manera irreversible mediante ENLACES COVALENTES, impidiendo su función. Análogos de sustratos

Su principal utilidad es la creación de fármacos, pero también se utilizan para conocer el mecanismo de reacción de las enzimas inhibidas.



### El ácido acetilsalicílico (aspirina)

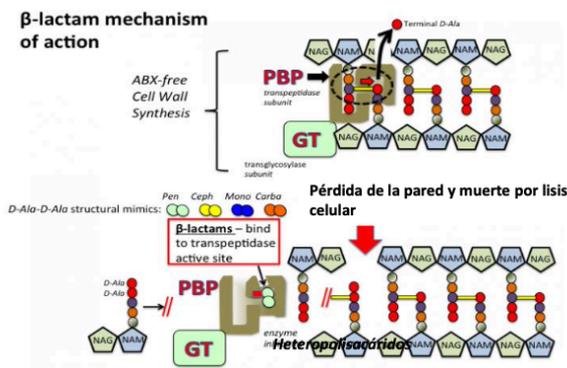
Inhibe de modo irreversible LA ENZIMA CICLOOXIGENASA, COX que sintetiza las prostaglandinas. Se **bloquea la síntesis de prostaglandinas (PG)** y tromboxanos (TXA<sub>2</sub>) a partir del ácido araquidónico de las membranas celulares (liberado por PLA<sub>2</sub> que se activa durante procesos inflamatorios).



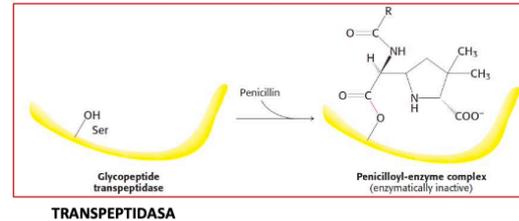
Se acetila la COX en Serina

## Inhibidores $\beta$ -lactámicos

**Penicilina:** peptidomimético que inhibe irreversiblemente la **transpeptidasa** que entrecruza los péptidos que mantienen el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias.



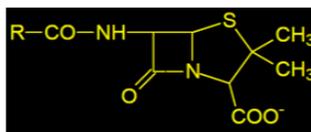
### Unión covalente de la penicilina a la Serina del centro activo



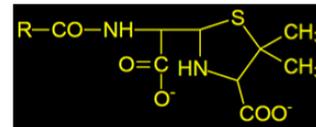
La utilización masiva de **antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilinas y derivados)** ha dado lugar a bacterias con **RESISTENCIA**. Los microorganismos resistente a estos ATB lo son por producir un enzima, la  **$\beta$ -lactamasa**, que inactiva a los ATB  $\beta$ -lactámicos.

La adición de un ácido clavulánico a la peniciina y derivados evita esta resistencia.  
**Ác. Clavulánico:** inhibidor suicida de la  $\beta$ -lactamasa.

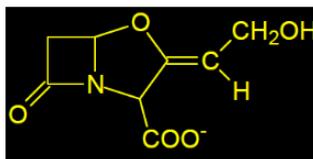
### Inhibidores irreversibles: inhibidores suicidas en el sistema $\beta$ -lactamasa



PENICILINA (ACTIVA)

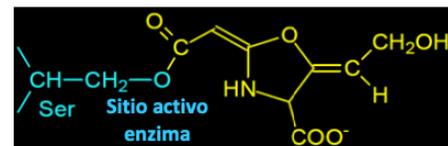
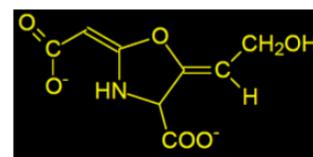


AC. PENICILOICO (INACTIVO)



AC CLAVULÁNICO

Esta molécula reacciona con la serina activa de la  $\beta$ -lactamasa produciendo su inactivación



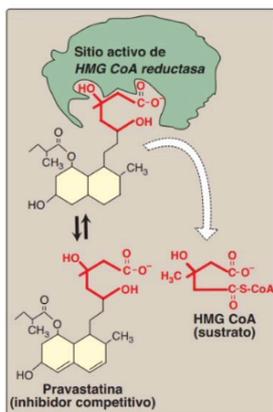
## Inhibidores reversibles

### Inhibición competitiva

Se caracteriza porque el inhibidor se une al mismo sitio que el sustrato, impidiendo la formación del complejo ES y la formación de producto. Suele ser una molécula semejante al sustrato de la reacción, de forma que los dos ligandos compiten por unirse al centro activo, aunque algunos tienen una estructura diferente.

Como la unión es reversible, cuando la [S] es elevada, es muy poco probable que el inhibidor se una a la enzima, por lo que muestra una  $V_{max}$  normal.

#### Inhibición reversible competitiva: ejemplo, las estatinas



Agentes antihiperlipidémicos o hipolipemiantes:

Inhibe de manera competitiva el **paso limitante de velocidad** en la biosíntesis de colesterol: enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa).

Las estatinas, como atorvastatina (Lipitor) y pravastatina (Pravachol): Análogos estructurales del sustrato natural de esta enzima y compiten por la unión en el hígado.

**Inhiben la síntesis *de novo* del colesterol y:**

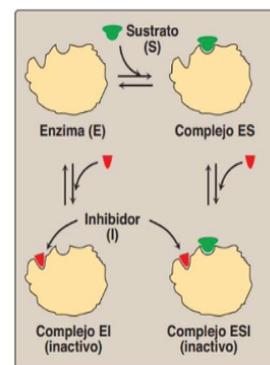
- 1.- reducen los niveles de colesterol en plasma y en hígado.
- 2.- se induce la expresión del receptor de lipoproteínas en el hígado y hace que se reduzca aún más los niveles en el plasma.

### Inhibición no competitiva

La **inhibición no competitiva** se reconoce por su **efecto característico sobre  $V_{max}$** . Su efecto no se puede evitar aumentando la concentración de sustrato y produce una disminución de la  $V_{max}$  ya que el complejo ternario ESI no genera producto.

El **inhibidor y el sustrato se unen en sitios diferentes** en la enzima (lugar distinto al centro activo).

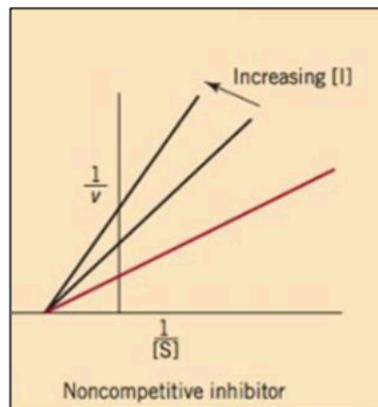
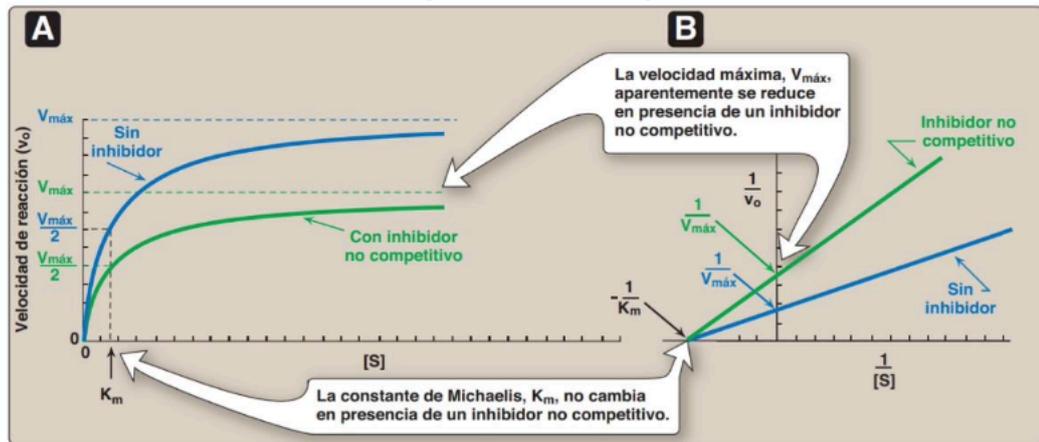
El inhibidor se puede unir al complejo ES



Puede **unirse tanto a la enzima libre como al complejo ES**, y dificulta la reacción enzimática.

1. **Efecto sobre  $V_{máx}$ : REDUCEN la  $V_{max}$**  (aparente de la reacción). La inhibición no puede superarse por medio del aumento de la concentración del sustrato.
2. **Efecto sobre la  $K_m$ : No afectan a la  $K_m$** , ya que no se une al centro activo.
3. **Efecto sobre la gráfica de Lineweaver-Burk:** las rectas con I y sin I **se juntan en la  $-1/K_m$ .  $1/V_{max}$  aumenta.**

## Inhibición reversible no competitiva: comportamiento cinético

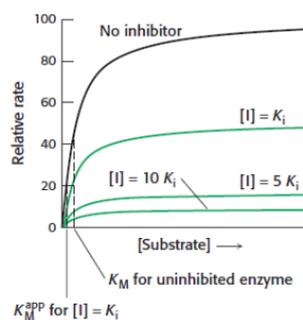
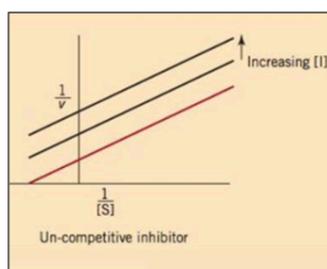


## Inhibición acompetitiva o incompetitiva

Se unen **exclusivamente al complejo ES**, en un lugar diferente al centro activo, formando un **complejo ternario**. El aumento de la  $[S]$  no disminuye la unión del inhibidor.

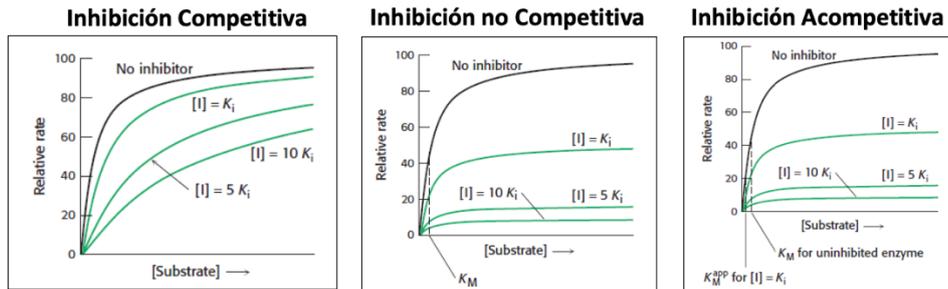
Presenta **afinidad por el enzima unido a S**.

El efecto aparente sobre los parámetros cinéticos en presencia de inhibidor es la **disminución de la  $K_m$  del sustrato y la  $V_{m\acute{a}x}$** .



La  $K_m$  con inhibidor disminuye lo que podría indicar aumento de la afinidad. Sin embargo se debe a que  $K_m = [S]$  a la  $V_{m\acute{a}x}/2$ . Como  $V_{m\acute{a}x}$  se va reduciendo con el inhibidor la  $K_m$  cambia ya que se forma un complejo ternario.

## Resumen inhibidores reversibles



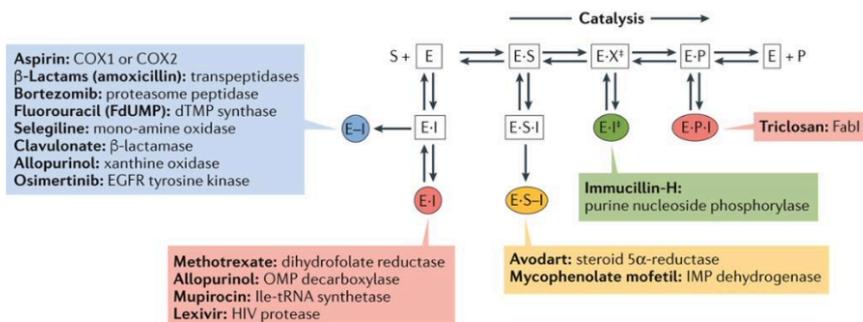
Tipo de Inhibición	Km	Vmax	Km/Vmax
Competitivo	más alto	igual	aumenta
No competitivo	igual	más bajo	aumenta
Acompetitivo	más alto	más bajo	igual

## Ejemplos de inhibidores enzimáticos con utilidad como fármacos

Inhibidor	Condición	Enzima DIANA
Aciclovir	Herpes	DNA polimerasa viral
Alopurinol	Gota	Xantina oxidasa
Fluorouracilo	Cáncer	Timidilato sintasa
DuP450	SIDA	Proteasa HIV
Metotrexato	Cáncer	Dihidrofolato reductasa
Zidovudina	SIDA	Transcriptasa reversa HIV
Omeprazol	Úlcera gástrica	H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPasa
Phenelzine	Depresión	Monoamino oxidasa
Nitecapone	Parkinson	Catecol O-metiltransferasa
Sorbinil	Retinopatía diabética	Aldosa reductasa

Los inhibidores se unen irreversiblemente o no a alguna de las formas enzimáticas durante la catálisis bloqueando la progresión enzimática.

Se pueden diseñar los fármacos si se conocen los mecanismos enzimáticos.



## Regulación de la actividad enzimática en los enzimas alostéricos

Algunos enzimas responden a una regulación más especializada realizada por **EFACTORES**, son los enzimas alostéricos. Tienen comportamiento cinético cooperativo en general y **no siguen la ecuación de Michaelis-Menten**.

### EFACTORES ALOSTÉRICOS: ACTIVADORES (EFACTORES POSITIVOS) O INHIBIDORES (EFACTORES NEGATIVOS)

#### Características de los enzimas alostéricos:

1. Varias subunidades: **OLIGOMÉRICAS O MULTIMÉRICAS**.
2. Sitios de unión/regulador/sitio alostérico para los diferentes efectores con elevada especificidad. La **unión del regulador alostérico al sitio alostérico** del enzima produce un cambio conformacional: **ALTERA LA ACTIVIDAD**
3. **Enzimas que catalizan pasos limitantes e importantes en las rutas metabólica.**
4. Los EFACTORES pueden alterar:
  - a. **V<sub>max</sub>** de la reacción
  - b. **K<sub>m</sub>** la afinidad SUSTRATO-ENZIMA

#### Integración y mecanismos de la regulación metabólica

La regulación metabólica permite la adaptación de la actividad a las necesidades fisiológicas, estados del desarrollo o condiciones ambientales.

#### Objetivos:

- **Adaptar la ruta metabólica** a las necesidades celulares y la integración del metabolismo en el organismo completo.
- **Coordinar vías de síntesis y degradación** de una determinada sustancia para **optimizar el funcionamiento** metabólico y el almacenamiento de sustancias.

#### Generalidades de regulación de vías metabólicas

1. En las rutas habrá **pocos enzimas reguladores** que catalizan reacciones irreversibles y limitantes de la ruta.
2. Existencia de **isoenzimas específicos de cada tejido** o con diferentes características que permiten la **compartimentalización tisular**. La falta de enzimas en determinados tejidos o la existencia de manera exclusiva, determina algunas rutas de degradación y de síntesis.
3. La **regulación hormonal**: permite la **integración metabólica/coordinación** de los distintos tejidos, órganos y sistemas fisiológicos. Permite situar en una posición de gasto o ahorro energético al organismo.
4. **Síntesis y catabolismo** de los metabolitos en orgánulos diferentes dentro de la célula.
5. Podemos hablar de regulación temporal y regulación espacial.

## Regulación temporal: lenta, rápida (irreversible y reversible)

La **regulación temporal** está condicionada por la vida media y la disponibilidad de los enzimas metabólicos. En las células existe un recambio proteico constante que afecta a la vida media de las proteínas y los enzimas. La concentración de los enzimas se encuentra regulada mediante su síntesis y su degradación.

**Respuesta lenta:** (a largo plazo), horas o días

1. A través de la **regulación de su síntesis**: Regulación de la transcripción y de la traducción. Existen hormonas y reguladores génicos que afectan a la expresión génica. Regulación de los genes que codifican esos enzimas por hormonas circadianas o de etapa del desarrollo
2. A través de la **regulación de su degradación**: Mediada por ubiquitina y ejecutada por el proteasoma.

**Respuesta rápida:** (a corto plazo), segundos a minutos:

- Control alostérico (Citrato: PDK1; AMP, ATP, glucosa: Glucógeno fosforilasa).
- Modificaciones covalentes reversibles o irreversibles: fosforilación, síntesis como zimógenos (formas inactivas).

Las hormonas también pueden producir una respuesta rápida

**Respuesta rápida en la regulación del metabolismo:** Modificaciones covalentes reversibles o irreversibles: fosforilación, síntesis como zimógenos (formas inactivas).

### Irreversible

Activación por rotura proteolítica de precursores inactivos (zimógenos).

*Enzimas de la digestión*

*Cascada de coagulación*

*Activación de caspasas en la apoptosis*

### Reversible

Unión covalente de un grupo químico que altera las propiedades catalíticas del enzima.

1. *Fosforilación-desfosforilación*
2. *Oxidación-reducción*
3. *Acetilación-desacetilación*

### Ejemplo de respuesta rápida irreversible

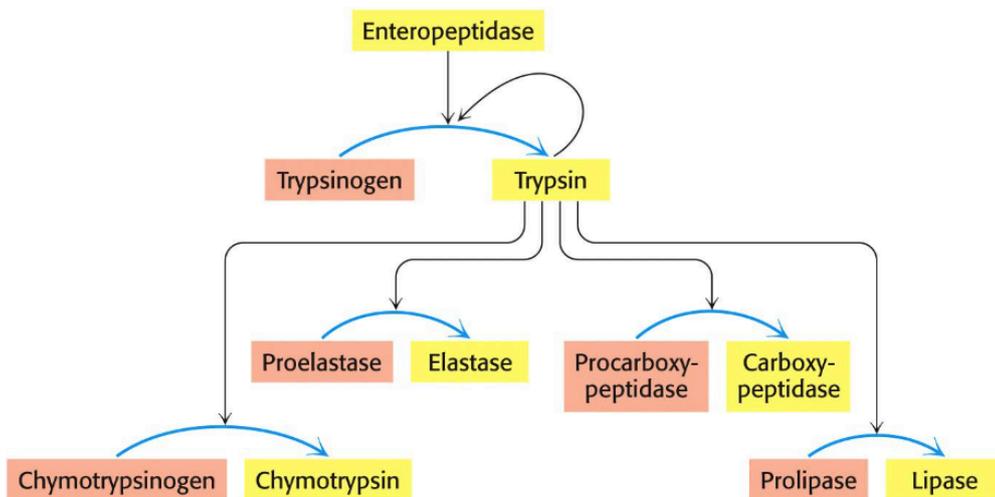
Los **zimógenos** son precursores enzimáticos o enzimas inactivos. Son moléculas proteicas inactivas que necesita a ser activada para convertirse en un enzima activo. Finalidad:

- 1.-Mecanismo de seguridad para evitar la catálisis en un compartimento o momento inadecuado
- 2.-Inmediatez.

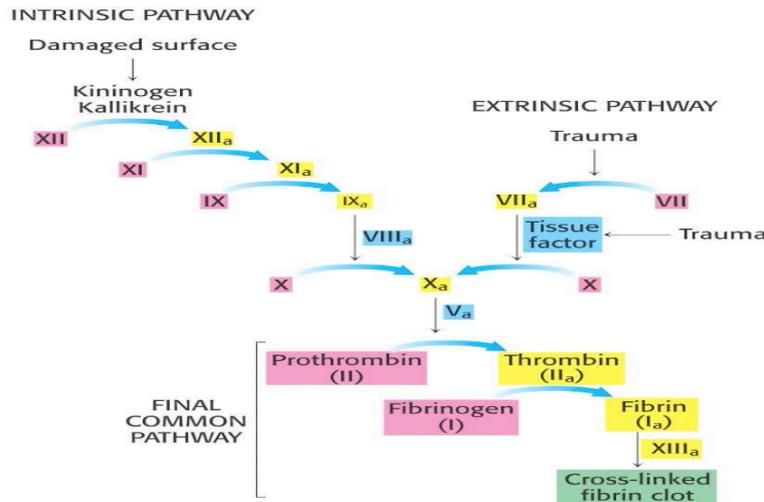
Por ejemplo, la **síntesis de enzimas digestivos** en forma inactiva es un mecanismo de seguridad para las células que sintetizan esos enzimas. No son activados hasta que son secretados al tracto gastrointestinal. Su activación dentro de las células que los producen llevaría a su acción indiscriminada en la célula.

Otro ejemplo son los **factores de coagulación**.

### Ejemplo de respuesta rápida irreversible



### Ejemplo de respuesta rápida irreversible



### Ejemplo de respuesta rápida reversible

MODIFICACIÓN COVALENTE REVERSIBLE son: fosforilación, adenilación, ADP-Ribosilación o metilación.

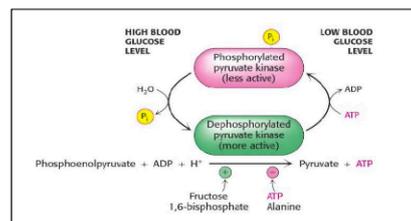
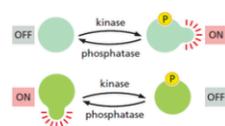
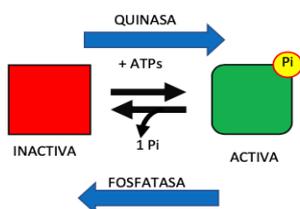
**Table 10.1** Common covalent modifications of protein activity

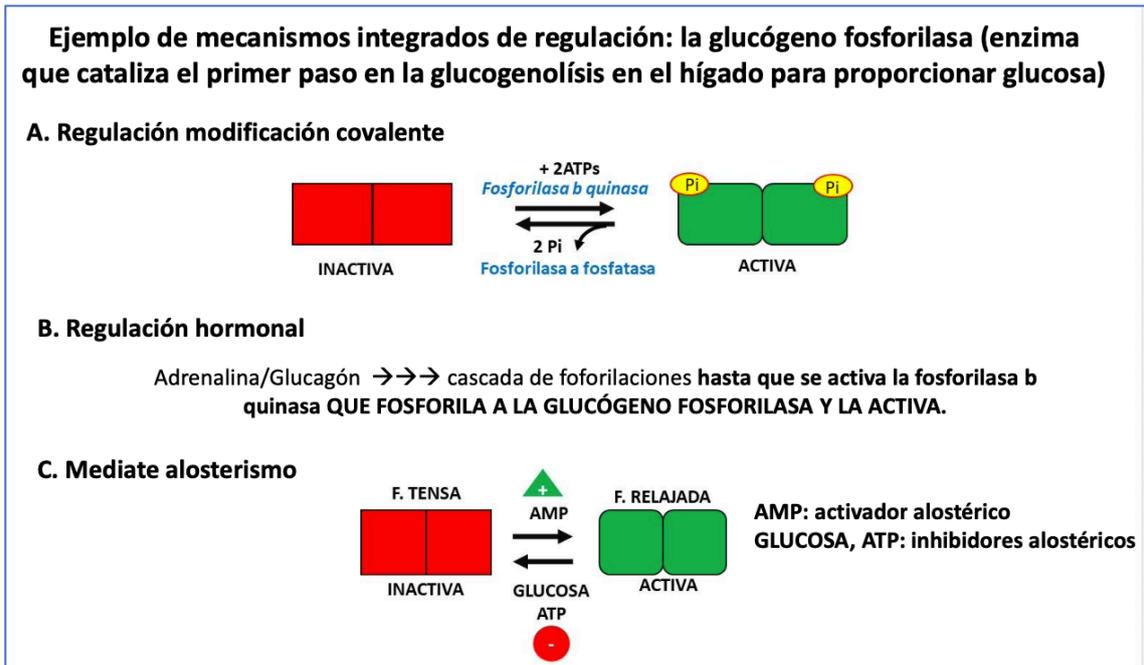
Modification	Donor molecule	Example of modified protein	Protein function
Phosphorylation	ATP	Glycogen phosphorylase	Glucose homeostasis; energy transduction
Acetylation	Acetyl CoA	Histones	DNA packing; transcription
Myristoylation	Myristoyl CoA	Src	Signal transduction
ADP ribosylation	NAD <sup>+</sup>	RNA polymerase	Transcription
Farnesylation	Farnesyl pyrophosphate	Ras	Signal transduction
γ-Carboxylation	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Thrombin	Blood clotting
Sulfation	3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate	Fibrinogen	Blood-clot formation
Ubiquitination	Ubiquitin	Cyclin	Control of cell cycle

### Ejemplo de respuesta rápida reversible

FOSFORILACIÓN/DESFOSFORILACIÓN:

1. Supone activación/inactivación enzimática
2. Transferencia de realizada y catalizada por **PROTEÍNAS QUINASAS** que transfieren grupos fosforilo desde el ATP a grupos OH de os residuos de Ser, Thr o Tyr.
3. A menudo desencadenan **efectos amplificados y en cascada**: una quinasa activa muchos otros enzimas y cada uno de ellos activan muchos otros...
4. La actividad enzimática se revierte desfosforilación mediada por una **PROTEÍNA FOSFATASA** que elimina el grupo fosforilo/FOSFATO





## Regulación espacial

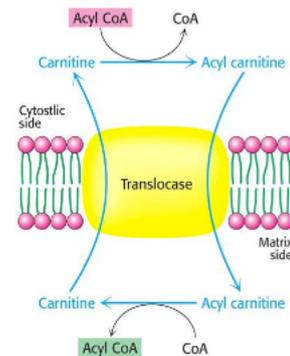
También puede existir una **regulación espacial** gracias a:

Compartimentalización: Enzimas citosólicos, orgánulos: mitocondria, RE.

Isoenzimas en **diferentes tejidos** (lactato deshidrogenasa)

Isoenzimas con **diferente afinidad o condiciones de pH**, actúan diferente sobre un mismo sustrato (Hexoquinasa y glucoquinasa hepáticas; fosfatasa ácida o alcalina).

La regulación por compartimentalización se produce por ejemplo en el caso de enzimas específicos de orgánulos. Limitación física. Ejemplo de la **β-oxidación**.

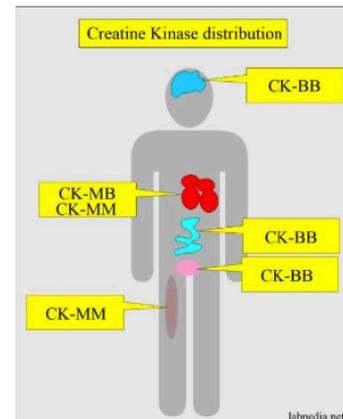


## Isoenzimas de diferentes tejidos

1. Enzimas homólogos de un mismo organismo.
2. Tejido-específicos o de diferentes etapas del desarrollo: satisfacen necesidades metabólicas específicas.
3. Catálisis de la misma reacción con características diferente: Catálisis ácida o básica.
4. Los isoenzimas representan enzimas de diferentes genes cuyos productos catalizan la misma reacción.

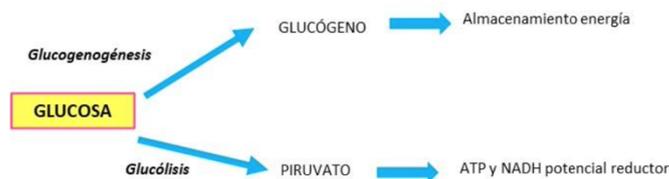
Los **isoenzimas de diferentes tejidos** son enzimas homólogos que realizan la misma reacción química pero presentes en diferentes tejidos: **tejidos específicos**. Proviene de un conjunto o familia de enzimas que **catalizan la misma reacción, pero difieren en estructura y propiedades fisicoquímicas**.

Las isoenzimas, según su procedencia tisular, poseen diferentes características y se pueden diferenciar mediante diferentes metodologías.

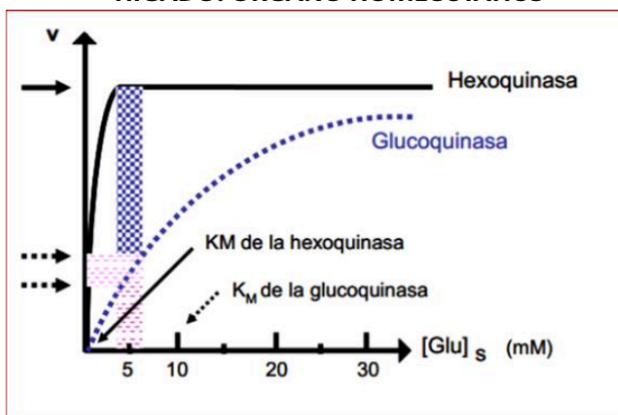


Presentan **ligeras diferencias**: afinidad al sustrato, tipo de sustrato, tamaño, carga, termo-estabilidad, **K<sub>m</sub>**, especificidad sustratos, inmunorreactividad. Suelen ser **variantes estructurales** estrechamente relacionadas de los enzimas.

La existencia de isoenzimas con diferentes K<sub>m</sub> permite el control de flujo metabólico.



### HÍGADO: ÓRGANO HOMEOSTÁTICO



**K<sub>m</sub> de la HEXOQUINASA muy baja 0.1 mM**, funciona con fines glucolíticos cuando la concentración de glucosa es baja.

**K<sub>m</sub> de la GLUCOQUINASA, 5 mM** funcionará a concentraciones altas y con fines GLUCOGÉNICOS (almacenamiento).

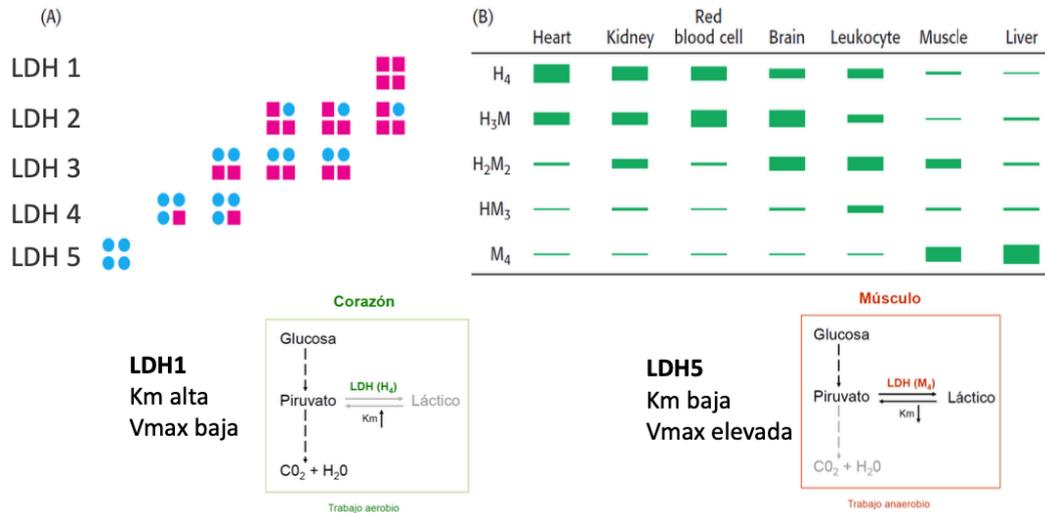
### ISOENZIMA DE HÍGADO Y MÚSCULO

## Isoenzimas de diferentes tejidos. Ejemplo: Lactato deshidrogenasa (LDH)

La LDH está constituida por cuatro subunidades. Presenta 5 isoformas.

Dos subunidades  M  H

Los isoenzimas combinan subunidades con distribución tisular diferente.



### El valor dx de los enzimas plasmáticos en la bioquímica clínica

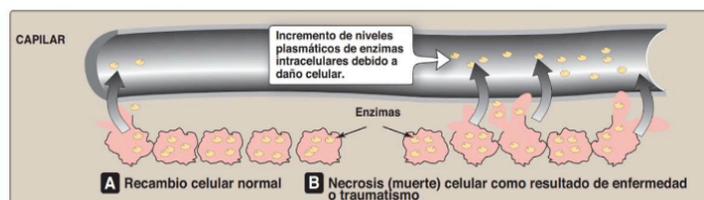
**EL PLASMA:** Es la parte líquida de la sangre que contiene en disolución metabolitos: aminoácidos, glucosa, sales minerales, vitaminas, proteínas y hormonas  
 Entre las proteínas se encuentran ENZIMAS.

**ENZIMAS:** 1) propios del plasma y otros 2) resultantes del recambio celular de los tejidos (hígado).

- 1) PRECURSORES INACTIVOS POR EJEMPLO FACTORES DE COAGULACIÓN
- 2) LDH, FOSFATASA, TRANSAMINASAS: cantidades pequeñas y constantes

Un incremento en los niveles plasmáticos de esta enzima puede indicar daño tisular

La enzima **alanina aminotransferasa** es abundante en hígado. La presencia de niveles elevados de ALT en plasma señalan posible daño en tejido hepático.

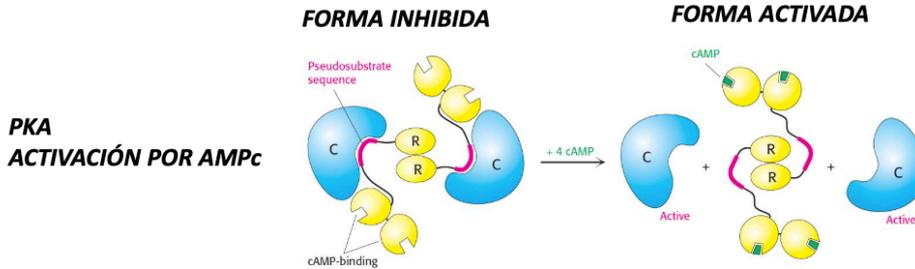


**PKA COMO EJEMPLO DE INTEGRACIÓN DE REGULACIÓN ALOSTÉRICA Y FOSFORILACIÓN**

Hormona: **GLUCAGÓN** → GPCR → AC → cAMP → unión a PKA

**R:** subunidad reguladora  
**C:** subunidad catalítica actividad quinasa

**PKA: Proteína quinasa A**

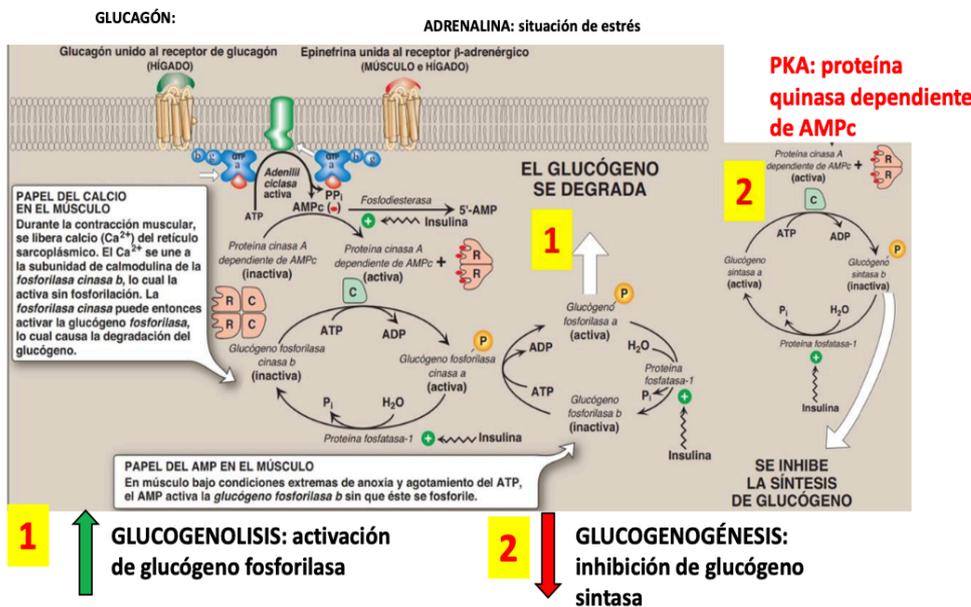


**PKA**  
**ACTIVACIÓN POR AMPc**

Existe una secuencia “**pseudosustrato**” en la subunidad R que oculta el centro activo donde entran los sustratos fosforilables en C. El AMPc libera la subunidad R, la región con actividad quinasa en C se expone y puede aceptar sustratos para poder fosforilarlos.

**MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: RESPUESTA RÁPIDA HORMONAL**

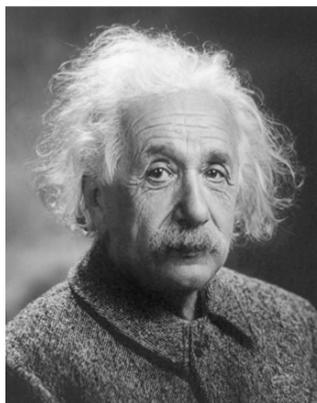
**INTEGRACIÓN HORMONAL: EJEMPLO NECESIDAD DE GLUCOSA EN SANGRE SEÑALIZADA POR GLUCAGÓN/ADRENALINA**



## Resumen de los mecanismos generales de regulación enzimática

- 1) **Variaciones fisicoquímicas del entorno:** permiten la estabilidad y la actividad enzimática en determinados entornos.
  - a. Efecto del pH
  - b. Efecto de la temperatura
  - c. Compartimentalización
  
- 2) **Efecto de inhibidores:** reacciones metabólicas y farmacológicas.
  - a. Inhibidores reversibles
  - b. Inhibidores irreversibles
  - c. Inhibidores alostéricos
  
- 3) **Efecto de activadores:** reacciones metabólicas
  - a. Ligandos de bajo peso molecular
  - b. Interacción proteína-proteína
  - c. Activadores alostéricos
  
- 4) **Regulación por modificación covalente:** reacciones metabólicas
  - a. Modificaciones irreversibles (proteólisis)
  - b. Modificaciones reversibles (fosforilación, acetilación)

Cómo me sentía  
en el instituto



Cómo me siento en la  
Facultad de Medicina

