

genoma en donde están los genes estructurales correspondientes a una vía multienzimática. De esta manera se sintetizan o dejan de sintetizarse las moléculas de ácido ribonucleico mensajero que llegan hasta los sitios de síntesis de las proteínas. Si la transcripción del genoma es posible se produce la inducción enzimática, más si se impide su copia el fenómeno se conoce con el nombre de represión enzimática; los metabolitos que participan en el primer proceso se conocen con el nombre de agentes inductores y los que participan en la represión se conocen con el nombre de agentes represores.

Hay también un control eficiente de la síntesis de proteínas al nivel de la traducción de la información genética. En efecto, mediante el uso de agentes como la actinomicina que impide la transcripción de la información genética ha sido posible establecer que, en forma paradójica, algunas enzimas se

producen en mayor cantidad lo cual se ha explicado por la falta de síntesis de otros inhibidores de la traducción que también son proteínas.

Hay que dejar claramente establecido que si bien los fenómenos de inducción y represión enzimática, actúan en forma negativa, es decir, impidiendo o permitiendo la transcripción de la información, se ha demostrado recientemente que hay casos en los cuales el control de la transcripción puede hacerse por estímulos positivos que actúan como activadores.

Asimismo en animales superiores se ha visto que un control eficiente de la actividad enzimática se establece mediante la estabilización de ciertas proteínas al unirse con cofactores y también modificando el catabolismo de las mismas, es decir, alterando la velocidad con la que se destruyen y por lo tanto modificando su vida media.

III

EL MECANISMO DE LA ACCION ENZIMATICA¹

DRES. JOSÉ LAGUNA² Y JESÚS GUZMÁN-GARCÍA²

A LA FECHA se reconoce que la acción de una enzima depende en rigor, del arreglo o disposición en el espacio,

¹ Presentado en el simposio sobre "Biología y patología de las enzimas", durante la sesión ordinaria del 12 de junio de 1968.

² Académico numerario. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

de los aminoácidos que la componen; no todos los aminoácidos, por supuesto, intervienen en la determinación de la especificidad ni en el acomodo del sustrato o de las sustancias atacables por la enzima, sino sólo aquellos que se disponen en lo que se denomina *centro ac-*

yos X. En la figura 3 se muestra el modelo hecho con los datos cristalográficos; los 129 aminoácidos forman una larga, pero plegadísima cadena polipeptídica con cuatro puentes de disulfuro, —SS—. El grupo del cristalógrafo que realizó este brillante trabajo,¹ sobre el sustrato de la lisozima, un azúcar complejo de molécula muy alargada, considera que éste se adapta perfectamente a la hendidura o bolsa que se aprecia, ya llena, en la Fig. 4. El sustrato queda unido a la enzima por una complicada red de puentes de hidrógeno. La enzima es activa cuando parte el sustrato en la zona de la línea punteada de la figura, entre los anillos D y E. Parece ser muy importante que el sustrato sufra una sobretensión, a nivel del anillo marcado D lo que hace que cuatro de sus átomos se acomoden en un plano y se hagan más accesibles a la acción de la enzima.

Como ya es un concepto bien aceptado que las enzimas de alguna manera se combinan al sustrato para formar compuestos intermediarios, tal como lo

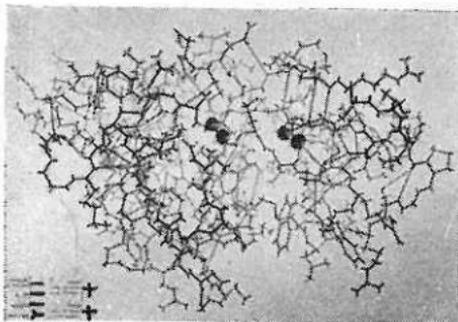


FIG. 3. Modelo, en un plano, de la molécula de lisozima, formada por 129 aminoácidos con cuatro uniones disulfuro. El sustrato de la enzima puede acomodarse en la hendidura formada a lo largo del eje vertical.

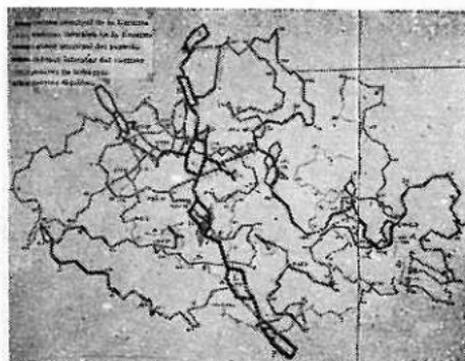


FIG. 4. Modelo que representa, con trazos más fuertes, el sustrato fragmentado entre los anillos D y E. Los anillos superiores, A, B y C son sostenidos por la enzima por medio de seis puentes de hidrógeno. Puede verse la distorsión del anillo D, en la parte inferior, lo que acomoda sus átomos en un plano y hace más fácil el ataque.

señalara Arrhenius a finales del siglo pasado, o de una manera más formal, expresar dicha situación en los términos de la teoría de Michaelis y Menten formulada desde 1913, ante el caso de la lisozima se presenta la posibilidad de entender este hecho en una forma muy objetiva. La teoría en general establece que una molécula de enzima proporciona un sitio en su superficie en el que la molécula del sustrato puede unirse en una forma definida y precisa. Los grupos reaccionantes del centro activo de la enzima se encargan, después, de desencadenar la reacción química que ataque al sustrato en la forma requerida.² En el caso de la lisozima fue posible añadir a la enzima una solución de azúcares del tipo estructural parecido al sustrato, por ejemplo, N-acetilglucosamina, y hacer estudios cristalográficos de la enzima a la que se había unido el sustrato o moléculas muy parecidas que demostraron inequívoca-

mente (Fig. 4) la hendidura donde se une el compuesto. Sin embargo, uno de los aspectos más interesantes de la observación residió en el hecho de que la enzima, al recibir el sustrato, cambia su estructura especial, o dicho de otra manera, su *conformación*, lo que hace que unas partes de la enzima se muevan con respecto a otras. Es en rigor, la parte a la izquierda de la hendidura la que se modifica más, dando la impresión de que tiende a cerrar la hendidura y afirmar más la unión con el sustrato.

Este cambio conformacional es quizás una demostración clara de las modificaciones en la forma de las enzimas que llevaron a Daniel E. Koshland Jr. de la Universidad de California a emitir su teoría del "acomodo inducido",³ para reemplazar a la previamente más aceptada de la "llave y la cerradura". Haremos una ampliación de este concepto que representa un adelanto de gran interés en nuestros conocimientos sobre la actividad enzimática. En efecto, la propiedad catalítica de las enzimas parece depender de la facilidad con la que ayudan a que se pongan en contacto las sustancias reaccionantes. De acuerdo con la teoría de la "llave y de la cerradura" la adaptación sería rígida y precisa y coincidiría o no la estructura de un centro activo con el de su sustrato. En la nueva concepción de Koshland, quien ha aportado datos experimentales del fenómeno y ha hecho además un tratamiento matemático teórico que apoya en su gran totalidad a dicha teoría, las enzimas pueden sufrir cambios en su estructura desde que entran en contacto con los reaccionantes,

sustratos y cofactores; la enzima los puede recibir en un orden determinado y cada uno de ellos, al unirse a la enzima, modifica su estructura. La nueva analogía es la del "guante y la mano": sólo al introducir la mano en el guante y darle forma se hace la adaptación. Esto permite entender mejor el proceso de entrada ordenada de los sustratos y de los cofactores, así por qué un sustrato entra a una enzima y es atacado y uno que no lo es, aún muy parecido a él, puede quedar excluido del centro activo. En la figura 5 se muestra en forma esquemática esta situación.

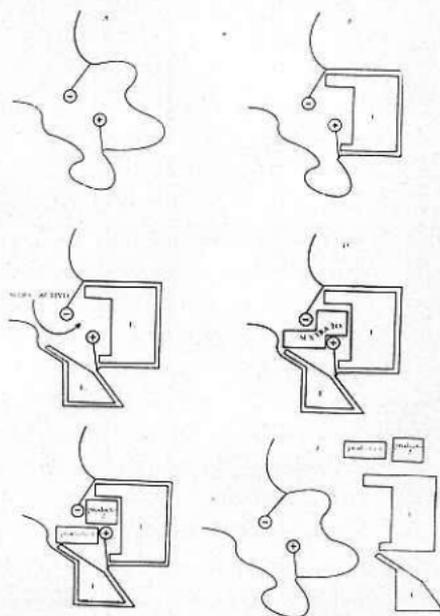


FIG. 5. Modelo de Koshland para explicar el "acomodo inducido" entre la enzima, el sustrato y los cofactores. La entrada de los cofactores (F_1 y F_2) modifica la estructura y estabiliza el centro activo señalado por las dos cargas opuestas, (+) y (-). El sustrato puede ahora entrar y ser fragmentado, dejando la enzima en condiciones basales.

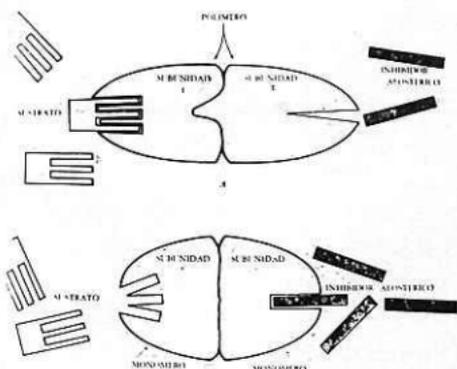


Fig. 6. Esquema del efecto alostérico. A, la enzima, formada por dos subunidades.

FIG. 6. Esquema del efecto alostérico. En A, la mayor concentración del sustrato impide la acción del efector alostérico. En B, predomina éste que ocupa el sitio alostérico, se pierde la simetría y ya no puede entrar el sustrato natural.

Aunque las alteraciones conformacionales provocadas por el sustrato o los cofactores en el centro activo parecieran ser el mejor modo de regular la actividad enzimática, en los últimos años se ha observado que existen otras posibilidades, también basadas en modificaciones estructurales, de tipo conformacional que operan a distancia del centro activo, pero que lo modifican en forma importante. Se trata del fenómeno llamado *alosterismo*⁴ basado en el hecho de que en las proteínas enzimas puedan existir dos (o más) sitios diferentes desde el punto de vista estereoespecífico. Uno de ellos es el centro activo, donde está la actividad funcional propiamente dicha de la enzima. El otro sitio, llamado *sitio alostérico* tiene capacidad para recibir a una sustancia de estructura química diversa llamada efector alostérico. Al efectuarse esta unión, se produce un cambio conformacional dis-

creto en la enzima que cambia sus propiedades y actividad, muy a menudo en sentido de bajar su capacidad de trabajo, la llamada inhibición alostérica.

Las proteínas que muestran efectos alostéricos corresponden a menudo a polímeros, es decir a moléculas compuestas de subunidades idénticas con ejes de simetría definidos, que se alteran con la introducción del efector alostérico, como se muestra en la Fig. 6. En ella se puede ver cómo la enzima formada por dos subunidades recibe al sustrato y ejerce su actividad; la baja concentración del inhibidor alostérico no impide su efecto. Por el contrario, cuando el inhibidor aumenta su concentración, puede entrar en una de las subunidades, lo que modifica la conformación de toda la molécula e impide así que entre el sustrato al centro activo y sea degradado.

Las uniones y desuniones entre las subunidades que integran una enzima completa muy a menudo son la base de la actividad del sistema. Por ejemplo⁵ la deshidrogenasa glutámica, que tiene un peso molecular vecino a un

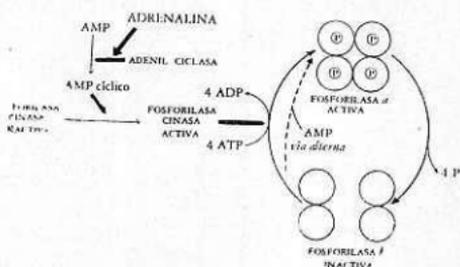


FIG. 7. Activación de la fosforilasa. La adición o la remoción de grupos fosfato, P, conduce a las formas activas o inactivas. En la gráfica se incluye el efecto de una hormona (adrenalina) que influye sobre el proceso.

millón, puede partirse en subunidades de unos 250,000 cuando es tratada por diversos agentes, como el ADP, el DPN, los estrógenos, la tiroxina y ciertos aminoácidos. Un caso muy bien estudiado es el de la fosforilasa (Fig. 7) que pasa de su forma inactiva a la forma activa al fosforilarse; la forma activa está formada por 4 subunidades y la inactiva por dos. Como se aprecia en dicho esquema, el paso del fósforo del ATP a las subunidades sin fósforo tiene dos efectos, por un lado fosforila cada subunidad y por otro, permite que se unan los dos fragmentos de dos subunidades (inactivo) en un fragmento de 4 subunidades (activo). Basta quitar el grupo fosfórico de cada subunidad para que desaparezca la acción enzimática.⁶

Desde el punto de vista de la biología en general, los mecanismos de acción enzimática que dependen de la estructura de la proteína y de su conformación quizás sean los más importantes y los que regulen las actividades metabólicas en estado natural; sin embargo, desde el punto de vista médico, por lo que se refiere a las aplicaciones farmacológicas y terapéuticas, uno de los renglones de las máximas posibilidades es el de las alteraciones de la acción de las enzimas por medio del empleo de bloqueadores o inhibidores de su actividad.

Un tipo de inhibición, quizás el primeramente reconocido por la importancia no sólo teórica sino práctica que tuvo, es el llamado de competencia en el que el inhibidor no permite la formación del complejo enzima-sus-

trato pues, en estas situaciones, forma un complejo enzima-inhibidor más fuerte que el primero; al ocupar el inhibidor el centro activo de la enzima, queda de esa manera bloqueada la actividad de la enzima sobre su sustrato natural. El inhibidor a menudo tiene parecido estructural con el sustrato natural y de hecho, en el primer ejemplo conocido, el del uso de las sulfanilamidas en el control de la infección por gérmenes patógenos, se reconoció que la estructura química de las sulfonamidas corresponde aproximadamente a la del ácido p-aminobenzóico, constituyente importante de un metabolito central en el funcionamiento bacteriano, o sea el ácido fólico; en efecto, la adición de sulfonamidas impide la formación del ácido fólico y de esta manera se bloquea la síntesis de compuestos indispensables para la supervivencia de la bacteria. Este es un ejemplo clásico de inhibición competitiva enzimática que caracteriza al grupo de sustancias químicas reconocidas en la actualidad como *antimetabolitos*. Así, se podría considerar antimetabolito toda sustancia con parecido estructural a un metabolito normal, que impide su aprovechamiento y utilización. Muchos de los antibióticos de empleo terapéutico pertenecen a este grupo de sustancias. Otros de ellos se han diseñado específicamente para bloquear determinadas actividades metabólicas que, en el campo médico, constituyen las circunstancias que propician la aparición de síntomas o enfermedades. Desde el punto de vista de la presentación de estos conceptos, quisiéramos señalar algunos ejemplos escogidos de los cen-

tenares que ofrece la literatura y que año con año se amplían a nivel práctico, para promover la atención más eficaz, en la medicina, de innumerables padecimientos y cuadros patológicos.

Citemos un caso típico, el del allopurinol, potente droga que inhibe de manera selectiva a la enzima xantina oxidasa, cuya función metabólica es la de la conversión de la xantina y de la hipoxantina en ácido úrico, forma habitual de la excreción de las bases púricas en los seres humanos. En casos de gota, cuando el depósito y la formación de ácido úrico excede los límites de tolerancia del individuo, dicho medicamento (antimetabolito) compite con la hipoxantina y la xantina para anular el sitio activo de la enzima xantina oxidasa; la semejanza estructural del allopurinol con la xantina es notable (Fig. 8); la única diferencia es la de que en el anillo de cinco miembros, uno de los N se encuentra vecino al otro, en vez de estar separado, como en el caso de la xantina, por un átomo de carbono. Esta diferencia estructural basta para que la enzima xantina oxidasa quede bloqueada con el allopurinol y no pueda actuar sobre la xantina. Se suprime así la formación de ácido úrico con lo que bajan sus cantidades en el suero e in-

clusivo en la orina de los enfermos gotosos. Se logra así, un efecto adicional, que es el del control muy eficaz de la formación de cálculos de ácido úrico en las vías de excreción renales, complicación frecuente en los gotosos y que hasta la fecha no podía dominarse con ninguno de los tratamientos empleados en la gota.

En un terreno experimental, con posibles aplicaciones prácticas, pero constituyendo en todo caso el camino lógico a la solución de ciertos problemas metabólicos, quisiéramos hacer mención de dos tipos de antimetabolitos, ideados o aprovechados, en nuestro medio, con fines de bloqueo de la formación del colesterol, sobre la base de que alguna medida que afecte la biosíntesis de este esteroide pueda beneficiar, de algún modo, el estado de depósito aumentado de la sustancia en las arterias, en el cuadro de la aterosclerosis.

Un modelo de esta situación ha sido estudiado por nosotros⁷ en animales y se trata de la diosgenina, sustancia obtenida de los tubérculos de diversas plantas tropicales abundantes en nuestro medio, de la familia Dioscoreac, como los conocidos barbasco, cabeza de negro y otras. La diosgenina es, en rigor, la parte de aglicona de la dioscina, sustancia formada por diosgenina y carbohidratos, como se presenta este compuesto en la naturaleza. Una vez separada de los carbohidratos, la diosgenina es objeto de amplias manipulaciones químicas que dan origen, en nuestra industria, a la elaboración de una diversidad de sustancias hormonales de tipo esteroide. La diosgenina (Fig. 9) tiene una estruc-

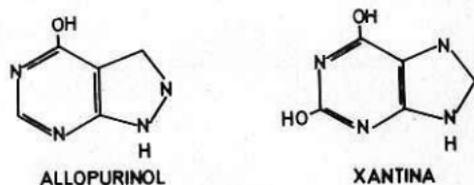


FIG. 8. Antagonismo metabólico entre el allopurinol y la xantina, producido por la similitud estructural.

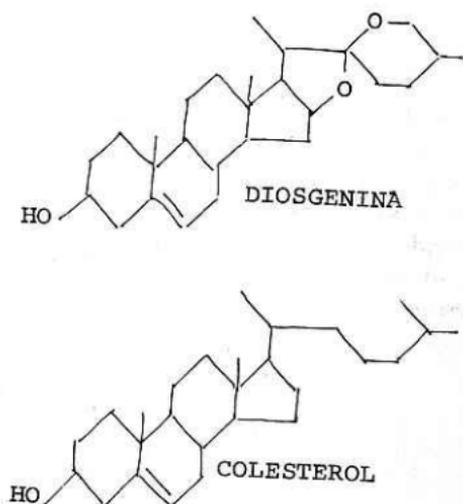


FIG. 9. La diosgenina como antimetabolito del colesterol. Se observa el parecido de la molécula excepto en la cadena lateral que está ciclizada en la diosgenina.

tura con gran parecido a la del colesterol, pues aun en esta representación gráfica en un plano, logra apreciarse la gran similitud que tienen entre sí; el número de carbonos es el mismo; el OH en posición 3 coincide en ambas moléculas, así como la doble ligadura de los C5 al C6. La única diferencia es la estructura de la cadena lateral que en el caso de la diosgenina forma el anillo esteroestérico en que a través de dos puentes de oxígeno, por cierto bastante inertes, da una estructura cíclica en vez de la abierta encontrada en la cadena lateral del colesterol. Al probar esta sustancia en pollos se encontró que actuaba como un inhibidor de la absorción del colesterol a nivel del intestino tanto del colesterol dietético como del reexcretado por el intestino en la circulación enterohepática del colesterol, con lo que la diosgenina se convirtió en un

arma bioquímica que nos ha permitido estudiar el metabolismo del colesterol en condiciones en que no existe ningún aporte o sea cuando se abandona la biosíntesis del colesterol a sus propios recursos sin el freno del aporte externo. En los pollos, los conejos y las ratas estudiados hasta ahora, la diosgenina ha probado ser un agente hipocolesterolemizante siempre que se administre en condiciones de exceso de colesterol dietético y no modifica el metabolismo cuando se da a animales en los que la ingestión de colesterol es normal, lo que refuerza aun más su actividad como bloqueadora de la absorción intestinal. Queda por averiguar si este efecto se debe a un bloqueo de las enzimas involucradas en la absorción intestinal del colesterol como podría ser la propia colesterol esterasa o si se trata de un efecto menos bien definible en la formación de los quilomicrones intestinales o algún otro paso metabólico.

Un último ejemplo de antimetabolito diseñado para bloquear específicamente un paso metabólico es el ideado por

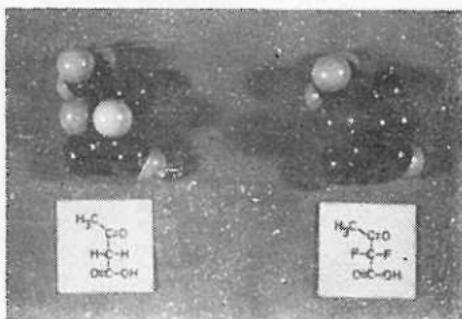


FIG. 10. La sustitución de dos hidrógenos por dos átomos de flúor convierte a la sustancia en el difluoroacetato, poderoso inhibidor de la síntesis de sustancias derivadas del isopreno.

Carvajal⁸ el difluoroacetato, (Fig. 10) producto halogenado obtenido por la sustitución de dos H del acetoacetato por dos átomos de flúor. Por analogía con el caso del fluoroacetato que es manejado por la maquinaria metabólica como si fuera acetato pero que unos pasos más tarde da origen al ácido fluorocítrico que ya no puede degradarse como si fuera el ácido cítrico y bloquea así el ciclo de Krebs y por lo tanto, las capacidades oxidativas y degradativas de las células, se pensó que el fluoroacetato podría impedir de alguna manera ciertos pasos metabólicos en el complicado proceso que llevan el acetoacetato a la formación de las unidades isoprenicas, intermediarios característicos del núcleo esteroide (para formar colesterol, hormonas esteroideas, ácidos biliares, vitamina D, etc.) o de estructuras isoprenoides (carotenos, vitamina A, cadenas laterales, de las vitaminas E y K, etc.) sustancias todas de gran interés biológico o médico.

En estudios con microorganismos, la adición del difluoroacetoacetato al medio de cultivo impedía la formación de los derivados isoprenicos de tipo pigmentario característicos de los gérmenes usados, así como de ciertos compuestos del tipo de los esteroides.

Estos lineamientos y derroteros, analizados con gran brevedad en este trabajo, nos colocan, no obstante, ante el estado de cosas actual y futuro por lo que se refiere a los posibles progresos de la terapéutica basada en el diseño de

sustancias que afectan de manera exclusiva y específica la formación de metabolitos cuya presencia puede ser perjudicial para los seres vivientes y el hombre. Todo este esfuerzo, en principio, concurre a la idea del dominio de la actividad metabólica a través del empleo de sustancias que regulan, en un sentido o en otro, las características más específicas de la acción enzimática.

REFERENCIAS

1. Blake, C.C.F., Joenig, D.F., Mair, G. A., North, A.C.T., Phillips, D.C., y Sarma, V.R.: *Structure of hen egg-white lysozyme: a three dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution*. Nature: 206: 757, 1965.
2. Laguna, J.: *Bioquímica*. 2a. ed. México. La Prensa Médica Mexicana, 1967, p. 39.
3. Koshland, Jr., D.E.: *Catalysis in life and in the test tube*. En: *Horizons in biochemistry*. Eds. M. Kasha y B. Pullman. Nueva York, Academic Press 1962 p. 265.
4. Monod, J., Wyman, J. y Changuex, J. P.: *On the nature of allosteric transitions: a plausible model*. J. Molec. Biol. 12: 88, 1965.
5. Tomkins, G.M., Yielding, K. L., Curran, J. F., Summers, M. R. y Bitensky, M. W.: *The dependence of the substrate specificity in the conformation of crystalline glutamate dehydrogenase*. J. Biol. Chem. 240: 3793, 1965.
6. Krebs, E. G., y Fisher, E. H.: *Molecular properties and transformations of glycogen phosphorylase in animal tissues*. Advances Enzymol. 24: 263, 1962.
7. Laguna, J., Gómez-Puyou, A., Peña, A. y Guzmán-García, J.: *Effect of diosgenin in cholesterol metabolism*. J. Atheroscl. Res. 2: 459, 1962.
8. Carvajal, G. y Carvajal, E. I.: *Ethyl, 2, difluoroacetate, an inhibitor of the biosynthesis of isoprene derivative compounds in microorganisms*. Rev. Latinoamer. Microbiol. 5: 149, 1962.