

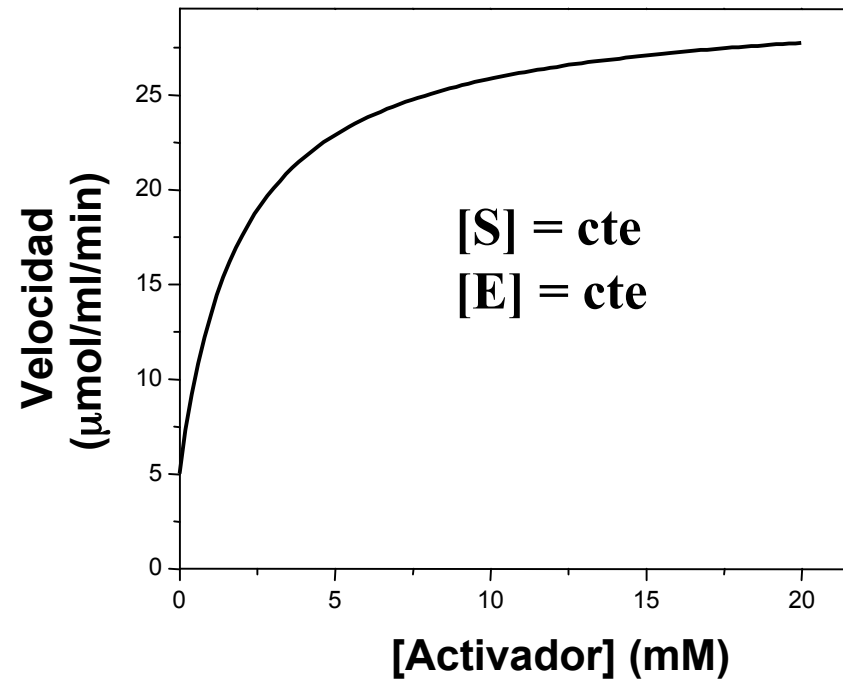
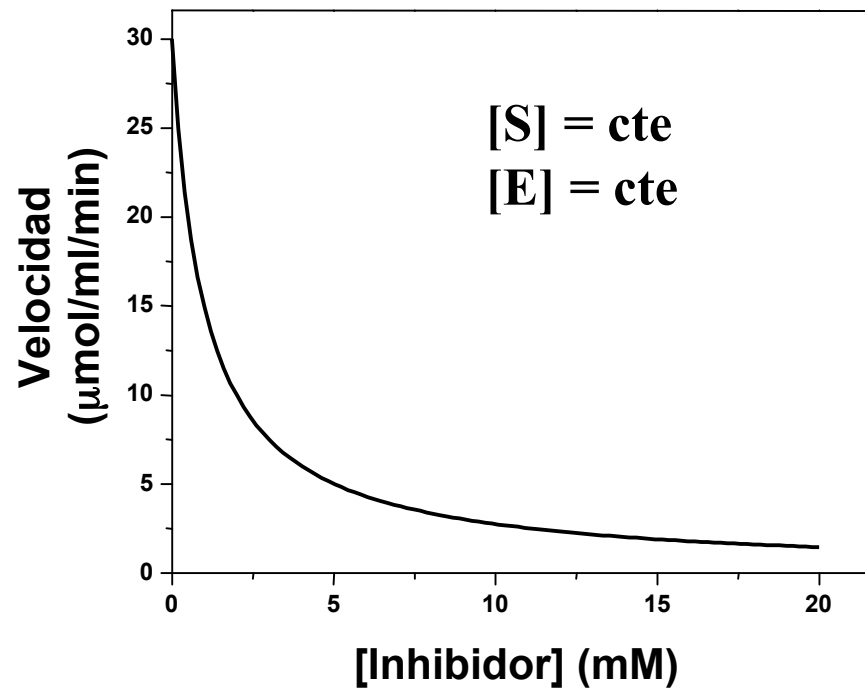
Factores que afectan la velocidad de una reacción catalizada por enzimas

- *Concentración de sustrato o sustratos (cofactores)*
- *Concentración de enzima*
- *Inhibidores*
- *Activadores*
- *pH*
- *Temperatura*

Regulación de la actividad enzimática por unión a la enzima de ligandos que no son sustrato

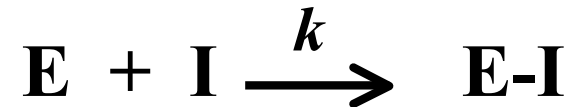
- ***INHIBIDOR*** : Molécula o ion que al unirse a la enzima produce una disminución en la velocidad de la reacción catalizada.
- ***ACTIVADOR***: Molécula o ion que al unirse a la enzima produce un aumento en la velocidad de la reacción catalizada.

SATURACIÓN POR INHIBIDORES Y ACTIVADORES REVERSIBLES



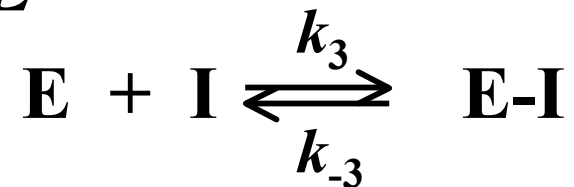
TIPOS DE INHIBIDORES

- ***IRREVERSIBLE***



k = cte de velocidad de inactivación de segundo orden

- ***REVERSIBLE***



K_i = cte de disociación = k_{-3}/k_3

TIPOS DE INHIBIDORES

- ***ISOSTÉRICO***

El inhibidor se une al mismo sitio que el sustrato (sitio activo).

- ***ALOSTÉRICO***

El inhibidor se une a un sitio diferente al que se une el sustrato (sitio alostérico).

TIPOS DE INHIBIDORES REVERSIBLES

PRODUCTOS

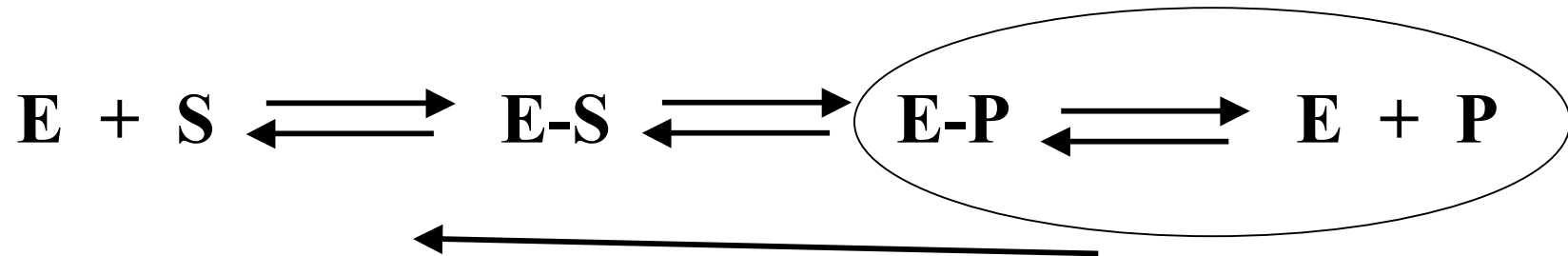
- **Inhiben porque: (1) al unirse a la especie de la enzima por la que tienen afinidad, disminuyen la proporción de la enzima disponible para unir el sustrato, y (2) porque revierten la reacción (en el caso de reacciones reversibles).**

SIN SALIDA

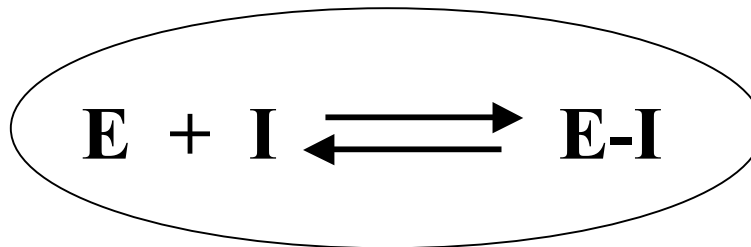
- **Inhiben porque secuestran formas de la enzima, que ya no están disponibles para que se una el sustrato. Forman complejos con la enzima que no pueden participar en la reacción. Estos inhibidores sólo pueden unirse y despegarse de la especie de la enzima por la que tengan afinidad.**
 - **Pueden ser productos, sustratos o análogos de sustratos o productos.**

TIPOS DE INHIBIDORES REVERSIBLES

- *PRODUCTO*



- *SIN SALIDA*



TIPOS DE INHIBIDORES

– *TOTAL*

Si todas las moléculas de enzima tienen unido al inhibidor la velocidad de la reacción catalizada es cero.

– *PARCIAL*

Aun cuando todas las moléculas de enzima tengan unido al inhibidor la velocidad de la reacción catalizada no es cero.

TIPOS DE INHIBIDORES

– *LINEAL (Total)*

Si los regráficos de los intersechos o pendientes de las gráficas de dobles recíprocos dependen linealmente de la concentración de inhibidor

– *HIPERBÓLICO (Parcial)*

Si los regráficos de los intersechos o pendientes de las gráficas de dobles recíprocos dependen hiperbólicamente de la concentración de inhibidor

– *PARABÓLICO (Total)*

Si los regráficos de los intersechos o pendientes de las gráficas de dobles recíprocos dependen parabólicamente de la concentración de inhibidor

TIPOS DE INHIBIDORES REVERSIBLES

- ***COMPETITIVO***
 - El inhibidor se une a la *enzima libre* interfiriendo con la unión del sustrato
- ***INCOMPETITIVO***
 - El inhibidor se une al complejo *enzima-sustrato* interfiriendo con la formación de producto
- ***MIXTO***
 - El inhibidor se une tanto a la *enzima libre* como al complejo *enzima-sustrato*, por tanto interfiriendo la unión del sustrato y la formación del producto
- ***NO COMPETITIVO***
 - Es un tipo especial de inhibidor mixto que se une con *igual afinidad* a la enzima libre y al complejo enzima-sustrato

Nomenclatura de las constantes de inhibición

- ***Competitiva:*** Constante de disociación del complejo *EI*



$$K_d = [E][I]/[EI]$$

$$K_{ic} \text{ ó } K_{is}$$

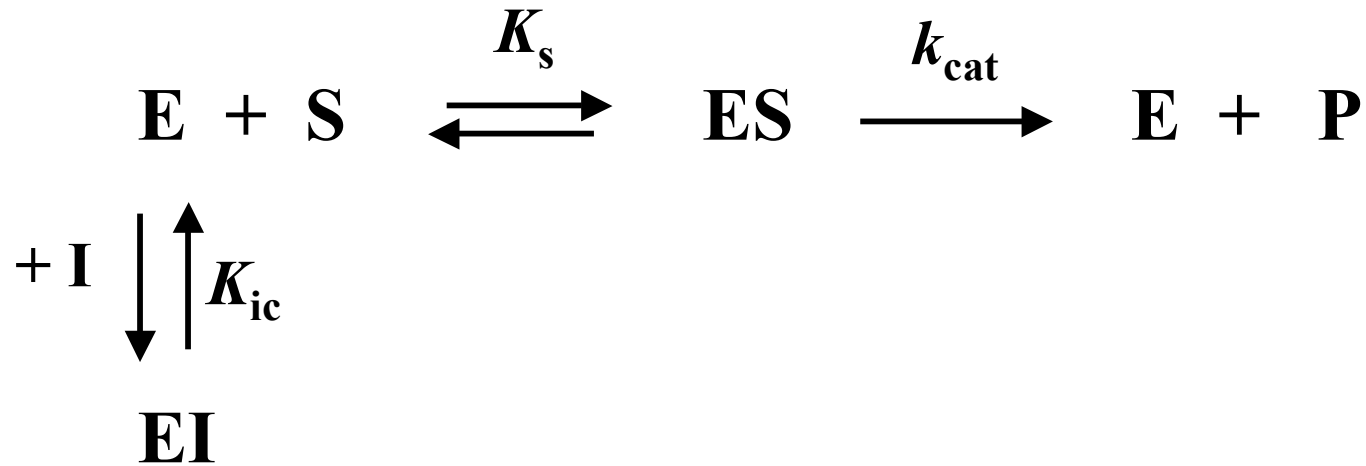
- ***Incompetitiva:*** Constante de disociación del complejo *ESI*



$$K_d = [ES][I]/[ESI]$$

$$K_{iu} \text{ ó } K_{ii} \text{ ó } \alpha K_i$$

Inhibición competitiva lineal



INHIBICIÓN COMPETITIVA LINEAL

$$v = k_{cat}[ES]$$

$$[E_{total}] = [E] + [ES] + [EI]$$

$$K_s = [E][S]/[ES] \quad K_{ic} = [E][I]/[EI]$$

$$[ES]/[E_{total}] = \frac{[E][S]/K_s}{[E] + [E][S]/K_s + [E][I]/K_{ic}} = [S]/\{K_s(1 + [I]/K_{ic}) + [S]\}$$

$$v = k_{cat}[E_{total}][S] / \{K_s(1 + [I]/K_{ic}) + [S]\}$$

$$v = V_{max}[S] / \{K_s(1 + [I]/K_{ic}) + [S]\}$$

ECUACIÓN DE VELOCIDAD EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR COMPETITIVO

- *Ecuación hiperbólica*

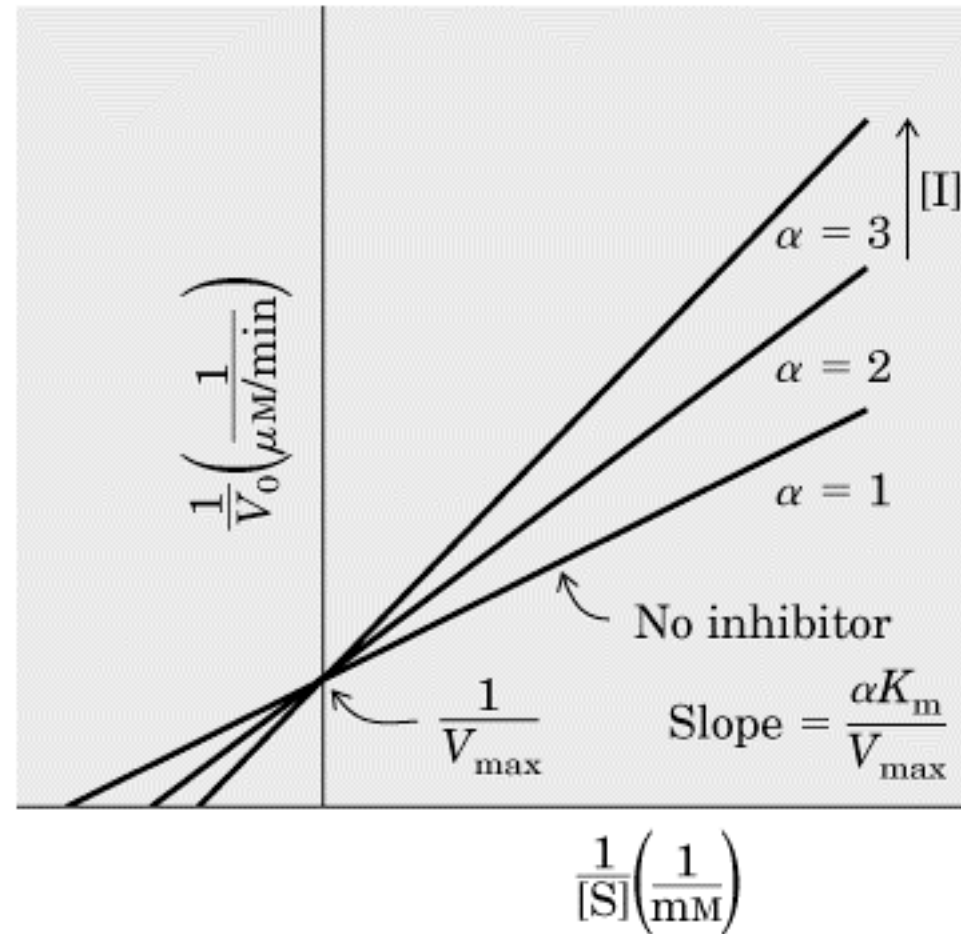
$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

- *Ecuación lineal*

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}$$

Patrones de inhibición competitiva

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \alpha = 1 + [I]/K_{ic}$$



INHIBICIÓN INCOMPETITIVA LINEAL

$$v = k_{cat}[ES]$$

$$[E_{total}] = [E] + [ES] + [ESI]$$

$$K_s = [E][S]/[ES]$$

$$K_{iu} = [ES][I]/[ESI] = [E][S][I]/[ESI]K_s$$

$$[ES]/[E_{total}] = \frac{[E][S]/K_s}{[E] + [E][S]/K_s + [E][S][I]/K_{iu}K_s} = [S]/\{K_s + [S](1 + [I]/K_{iu})\}$$

$$v = k_{cat}[E_{total}][S]/\{K_s + [S](1 + [I]/K_{iu})\}$$

$$v = V_{max}[S]/(1 + [I]/K_{iu}) / \{(K_s/(1 + [I]/K_{iu}) + [S])\}$$

ECUACIÓN DE VELOCIDAD EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR INCOMPETITIVO

- *Ecuación hiperbólica*

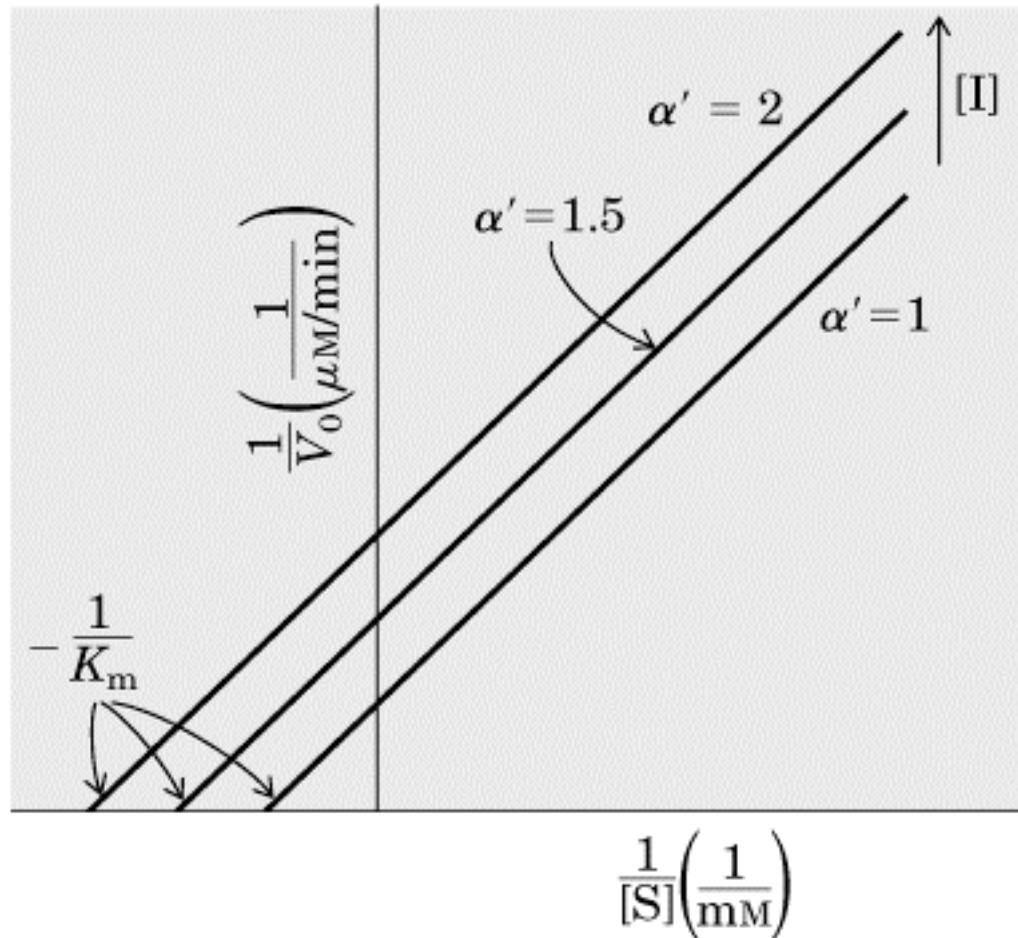
$$v = \frac{{}_{ap}V_{max} [S]}{{}_{ap}K_m + [S]}$$

- *Ecuación lineal*

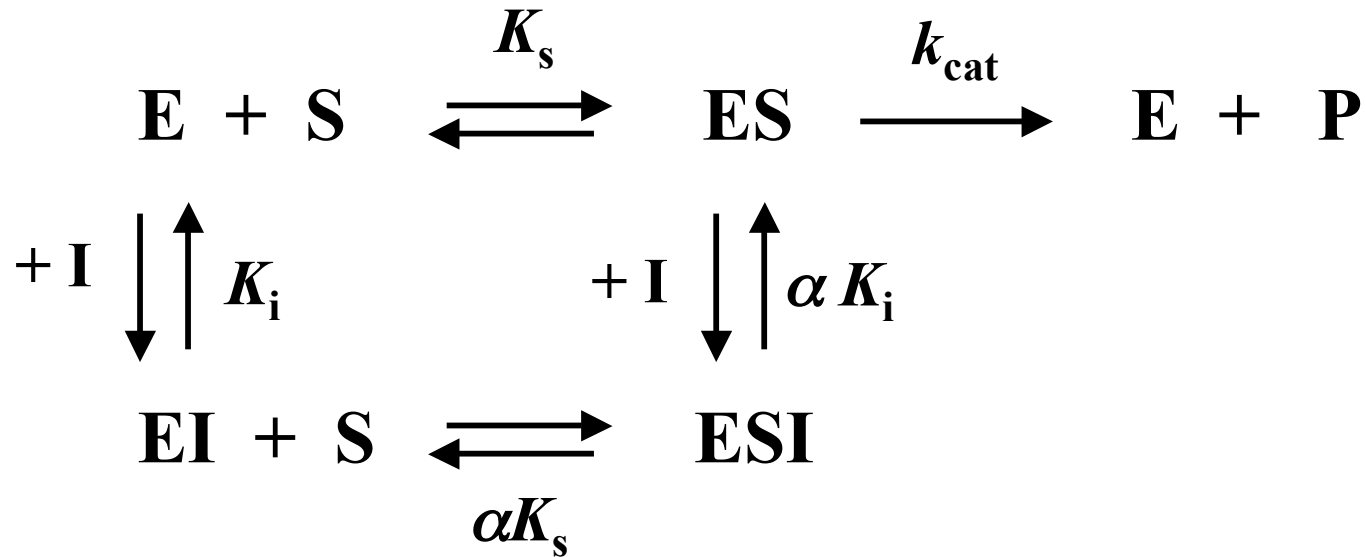
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{{}_{ap}V_{max}}$$

Patrones de inhibición incompetitiva

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}} \quad \alpha = 1 + [I]/K_{ii}$$



Inhibición mixta lineal



INHIBICIÓN MIXTA LINEAL

$$v = k_{cat}[ES]$$

$$[E_{total}] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$v = k_{cat}[E_{total}][S]/\{K_s(1 + [I]/K_{ic}) + [S](1 + [I]/K_{iu})\}$$

$$v = V_{max}[S]/(1 + [I]/K_{iu})/\{K_s[(1 + [I]/K_{ic})/(1 + [I]/K_{iu})] + [S]\}$$

ECUACIÓN DE VELOCIDAD EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR MIXTO

- *Ecuación hiperbólica*

$$v = \frac{apV_{max} [S]}{apK_m + [S]}$$

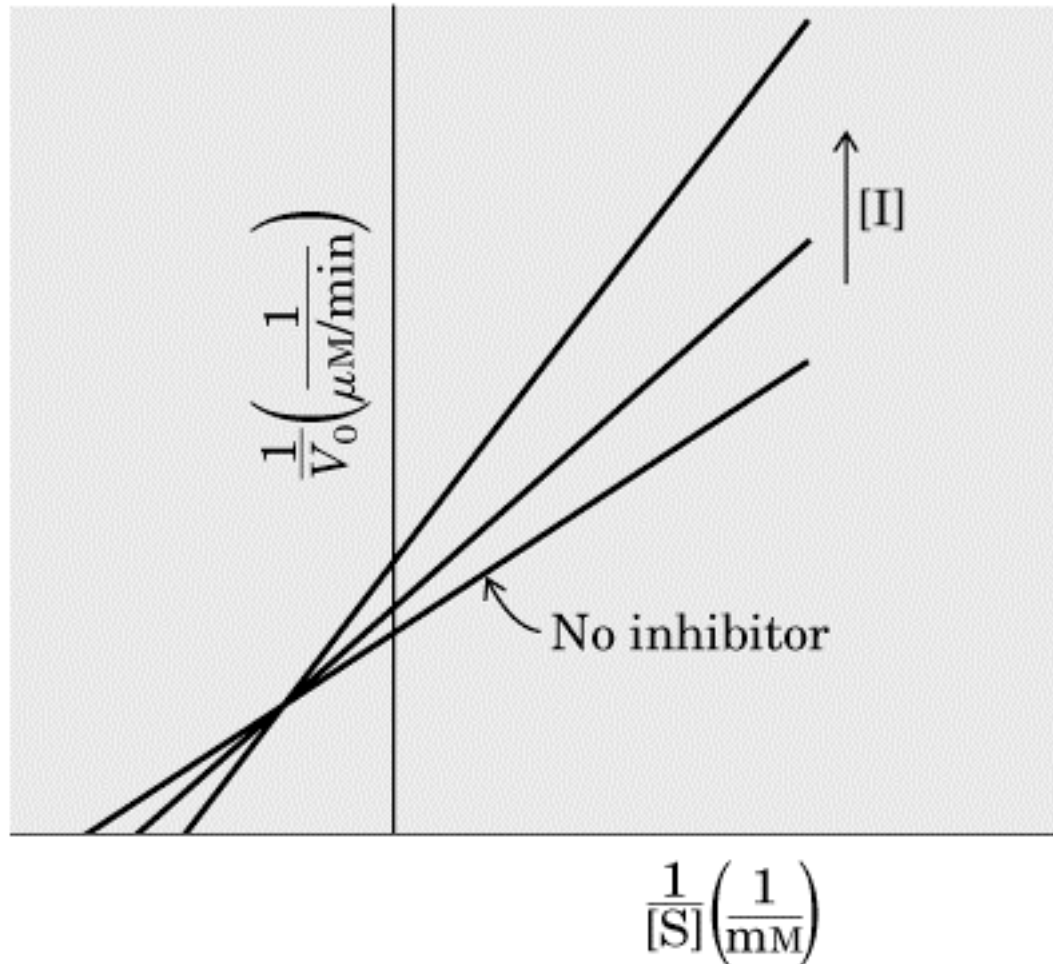
- *Ecuación lineal*

$$1/v = \frac{apK_m}{apV_{max}} + \frac{1}{apV_{max}}$$

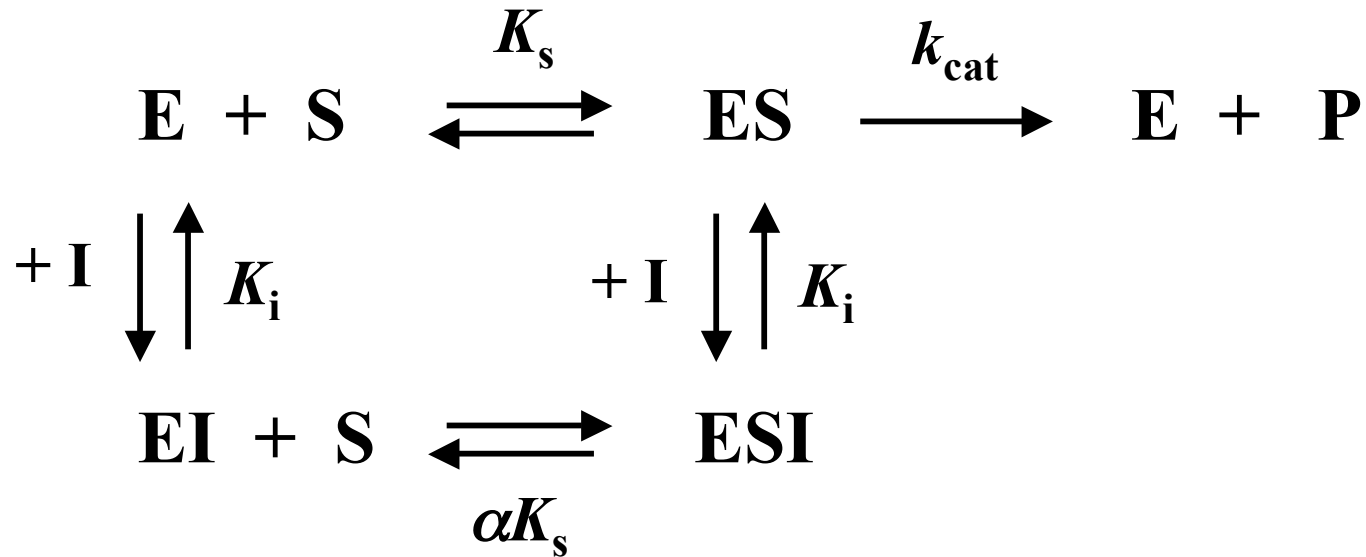
Patrones de inhibición mixta

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

$$\alpha = 1 + [I]/K_{ic}$$
$$\alpha' = 1 + [I]/K_{ii}$$



Inhibición no competitiva lineal



INHIBICIÓN NO COMPETITIVA LINEAL

$$v = k_{cat}[ES]$$

$$[E_{total}] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$K_i = K_{ic} = K_{iu}$$

$$v = k_{cat}[E_{total}][S]/\{K_s(1 + [I]/K_i) + [S](1 + [I]/K_i)\}$$

$$v = V_{max}[S]/(1 + [I]/K_i)/(K_s + [S])$$

ECUACIÓN DE VELOCIDAD EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR NO COMPETITIVO LINEAL

- *Ecuación hiperbólica*

$$v = \frac{ap V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

- *Ecuación lineal*

$$1/v = \frac{K_m}{ap V_{max}} + \frac{1}{ap V_{max}}$$

Patrones de inhibición n competitiva (mixta)

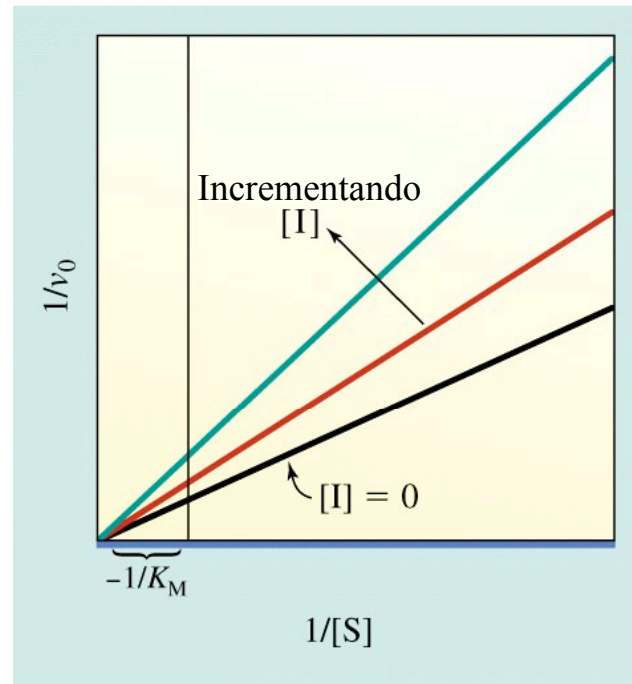


Figure 5-18 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

PATRONES DE INHIBICIÓN

Tipo

Patrón

COMPETITIVA

Líneas que se cruzan en el eje de ordenadas ($1/v$)

INCOMPETITIVA

Líneas paralelas

MIXTA

**Líneas que se cruzan en el segundo cuadrante
(a la izquierda del eje de ordenadas ($1/v$))**

NO COMPETITIVA

**Líneas que se cruzan en el eje de abscisas ($1/[S]$)
(a la izquierda del eje de ordenadas ($1/v$))**

Ecuación de velocidad inicial en presencia de inhibidores lineales

Reacción monosustrato

$$v = V_{\max}[S]/(K_s + [S])$$

Inhibición competitiva lineal

$$v = V_{\max}[S]/\{K_s(1 + [I]/K_{ic}) + [S]\}$$

Inhibición incompetitiva lineal

$$v = V_{\max}[S]/\{K_s + [S](1 + [I]/K_{iu})\}$$

Inhibición mixta lineal

$$v = V_{\max}[S]/\{K_s(1 + [I]/K_{ic}) + [S](1 + [I]/K_{iu})\}$$

Inhibición no competitiva lineal

$$v = V_{\max}[S]/\{K_s(1 + [I]/K_i) + [S](1 + [I]/K_i)\}$$

Efecto de los inhibidores lineales sobre los parámetros cinéticos

Inhibición	Parámetro	Parámetro aparente
<i>Competitiva</i>	V_{\max}	V_{\max}
	V_{\max}/K_m	$(V_{\max}/K_m) / (1 + [I]/K_{ic})$
	K_m	$K_m(1 + [I]/K_{ic})$
<i>Incompetitiva</i>	V_{\max}	$V_{\max} / (1 + [I]/K_{iu})$
	V_{\max}/K_m	(V_{\max}/K_m)
	K_m	$K_m / (1 + [I]/K_{iu})$
<i>Mixta</i>	V_{\max}	$V_{\max} / (1 + [I]/K_{iu})$
	V_{\max}/K_m	$(V_{\max}/K_m) / (1 + [I]/K_{ic})$
	K_m	$K_m(1 + [I]/K_{ic}) / (1 + [I]/K_{iu})$
<i>No competitiva</i>	V_{\max}	$V_{\max} / (1 + [I]/K_i)$
	V_{\max}/K_m	$(V_{\max}/K_m) / (1 + [I]/K_i)$
	K_m	K_m

DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES PRODUCTIVAS DE LA ENZIMA (ES) EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR LINEAL (REACCIONES MONOSUSTRATO)

- *Sin inhibidor*

- $[ES] / [E]_{\text{total}} = [S] / (K_s + [S])$

- *Inhibidor competitivo*

- $[ES] / [E]_{\text{total}} = [S] / \{K_s (1 + [I]/K_{ic}) + [S]\}$

- *Inhibidor incompetitivo*

- $[ES] / [E]_{\text{total}} = [S] / \{K_s + [S] (1 + [I]/K_{iu})\}$

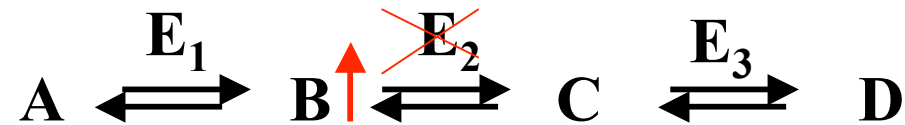
- *Inhibidor mixto*

- $[ES] / [E]_{\text{total}} = [S] / \{K_s (1 + [I]/K_{ic}) + [S] (1 + [I]/K_{iu})\}$

DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE LA ENZIMA EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR MIXTO LINEAL (REACCIÓN MONOSUSTRATO)

- $[E] / [E]_{\text{total}} = K_s / \{K_s(1 + [I]/K_i) + [S](1 + [I]/\alpha K_i)\}$
- $[ES] / [E]_{\text{total}} = [S] / \{K_s(1 + [I]/K_i) + [S](1 + [I]/\alpha K_i)\}$
- $[EI] / [E]_{\text{total}} = [I] / \{K_i(1 + [S]/K_s) + [I](1 + [S]/\alpha K_s)\}$
- $[ESI] / [E]_{\text{total}} = [I] / \{\alpha K_i(1 + K_s/[S]) + [I](1 + \alpha K_s/[S])\}$

Efecto de los inhibidores sobre la velocidad de flujo de una ruta metabólica



La inhibición de cualquiera de las enzimas lleva a un aumento en la concentración de su sustrato. Por tanto,

- *Si el inhibidor es COMPETITIVO se contrarresta la inhibición*
- *Si el inhibidor es es INCOMPETITIVO se favorece la inhibición*
- *Si el inhibidor es MIXTO se contrarresta o favorece la inhibición dependiendo de cual de los dos componentes, competitivo o incompetitivo, predomine*

Determinación de K_i

Inhibición lineal

- *Regraficar los valores del parámetro cinético aparente frente a la concentración de inhibidor (hipérbola)*

$$C_{ap} = C/(1 + [I]/K_i) = CK_i / (K_i + [I])$$

- *Regraficar el inverso de los valores del parámetro cinético aparente frente a la concentración de inhibidor (línea recta)*

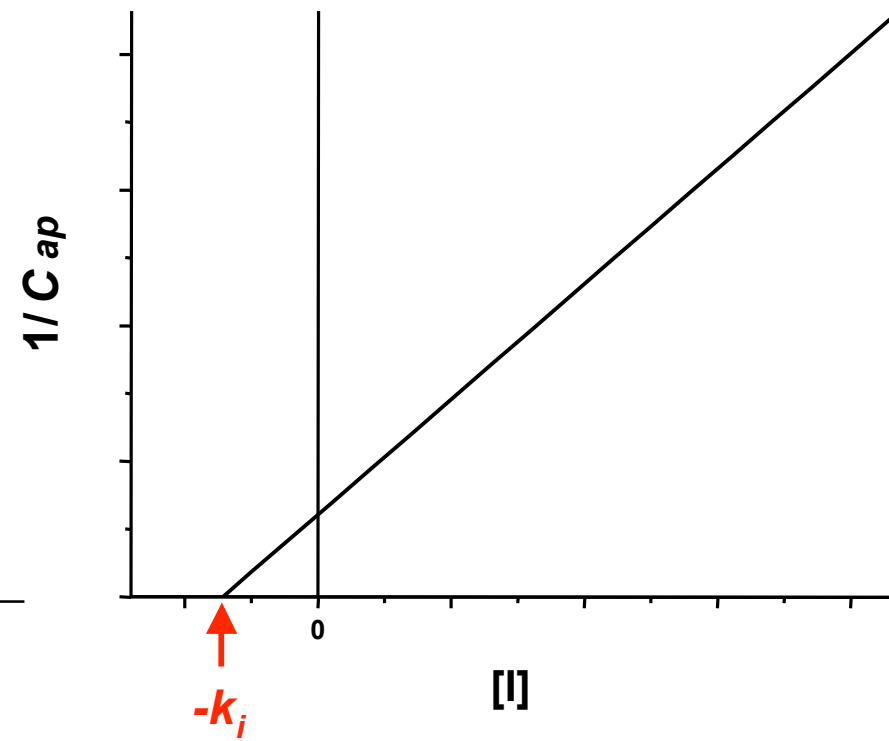
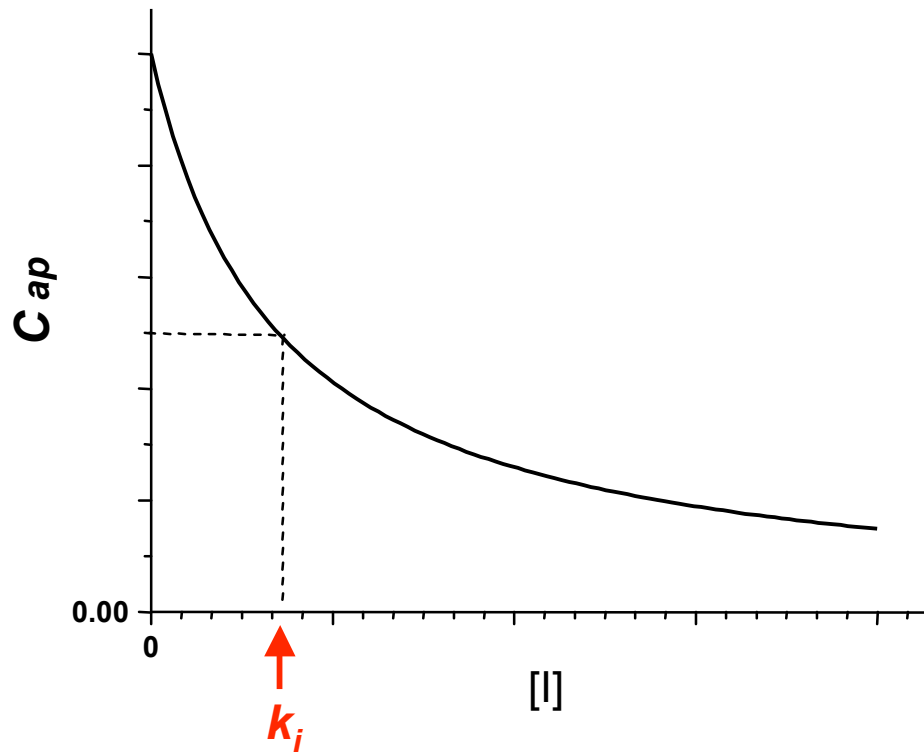
$$1/C_{ap} = (1 + [I]/K_i)/C = 1/C + [I]/K_i C$$

Determinación de K_i

Inhibición lineal

$$C_{ap} = CK_i / (K_i + [I])$$

$$1/C_{ap} = 1/C + [I]/K_i C$$



Constante de inhibición aparente (I_{50}) en inhibición lineal

I_{50} es la concentración de inhibidor que reduce la velocidad de la reacción a la mitad de la que existe en ausencia del inhibidor

Es una K_i aparente

Inhibición competitiva

$$I_{50} = K_{ic} (1 + [S]/K_s)$$

Inhibición incompetitiva

$$I_{50} = K_{iu} (1 + K_s/[S])$$

Inhibición mixta

$$I_{50} = \alpha K_i (1 + K_s/[S]) / (1 + \alpha K_s/[S])$$

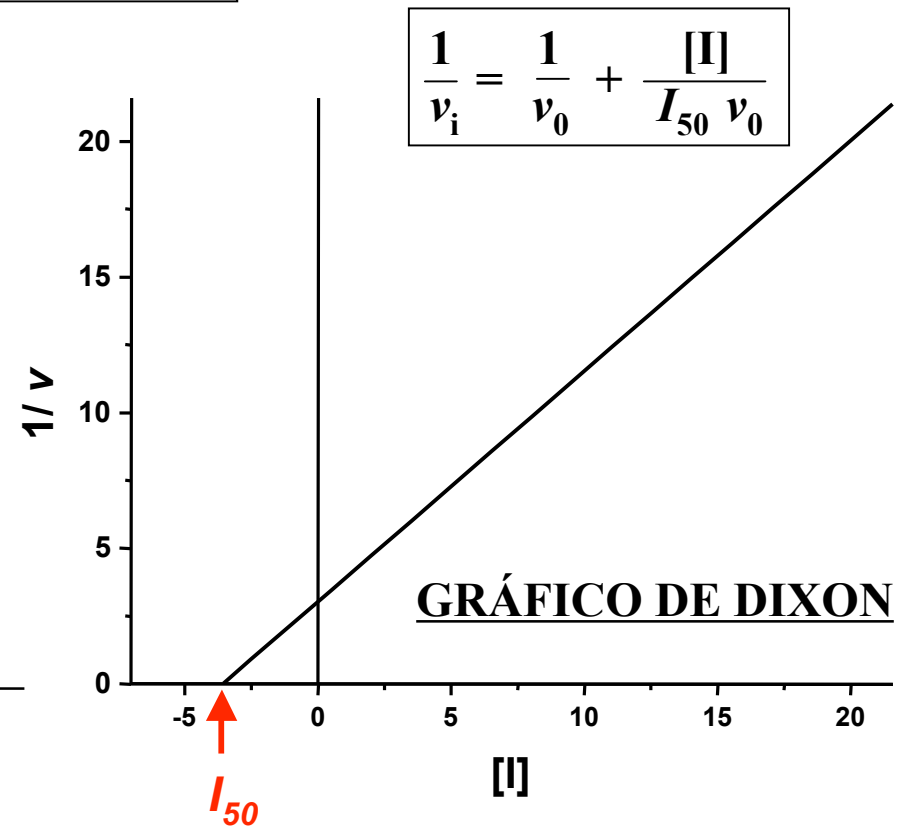
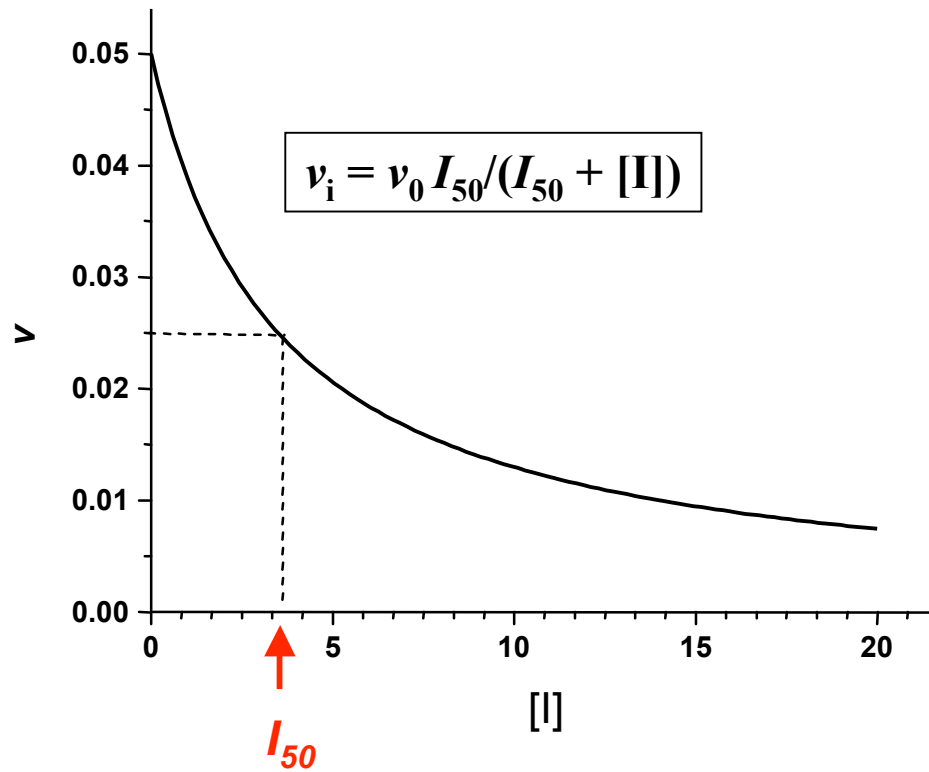
Inhibición no competitiva

$$I_{50} = K_i$$

Determinación de I_{50} en inhibición total

[S] = constante

[E] = constante

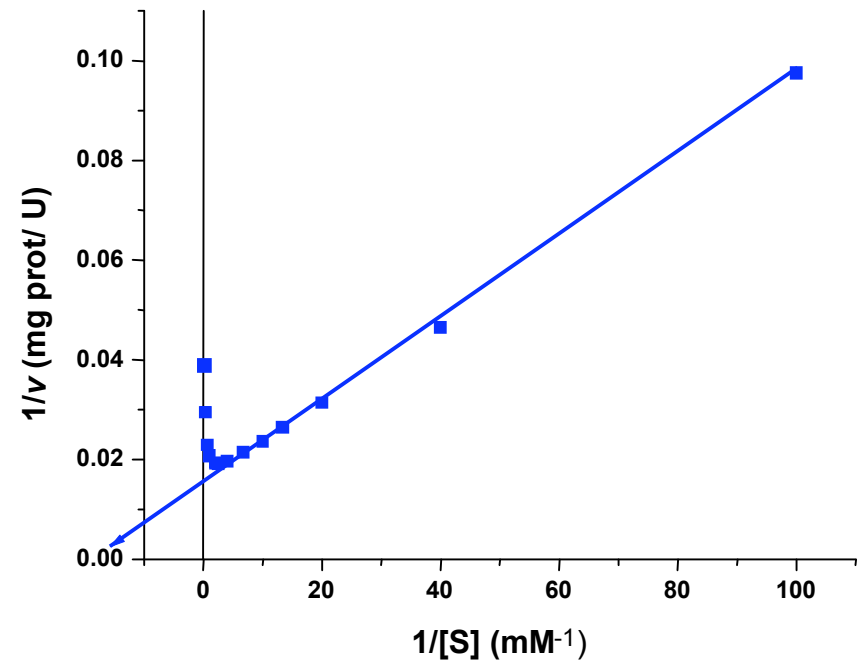
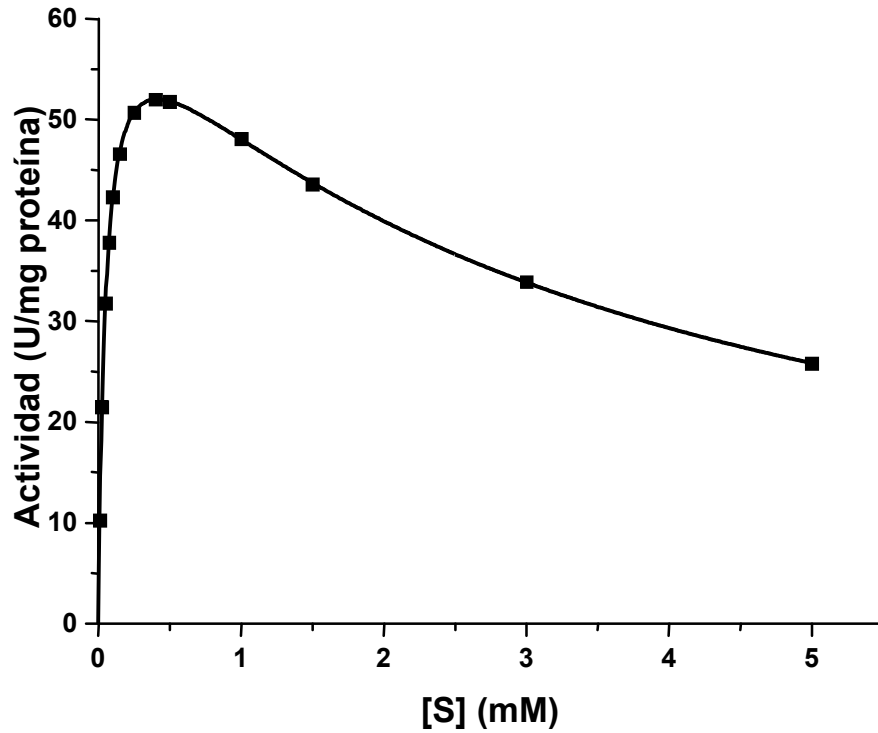


K_i versus I_{50}

- **K_i es el valor de concentración de inhibidor al que el parámetro cinético afectado (V_{\max} o V_{\max}/K_m) se reduce a la mitad del determinado en ausencia de inhibidor.**
 - No depende de la concentración de sustrato.
- **I_{50} es el valor de concentración de inhibidor que reduce la velocidad de la reacción a la mitad de la que existe en ausencia del inhibidor.**
 - Depende de la concentración de sustrato a la que se determina.

Inhibición por sustrato

$$v = V_{\max} [A] / \{K_{mA} + [A](1 + [A]/K_{siA})\}$$



TIPOS DE INHIBIDORES REVERSIBLES

- *Lineales*
- *Hiperbólicos*
- *Parabólicos*

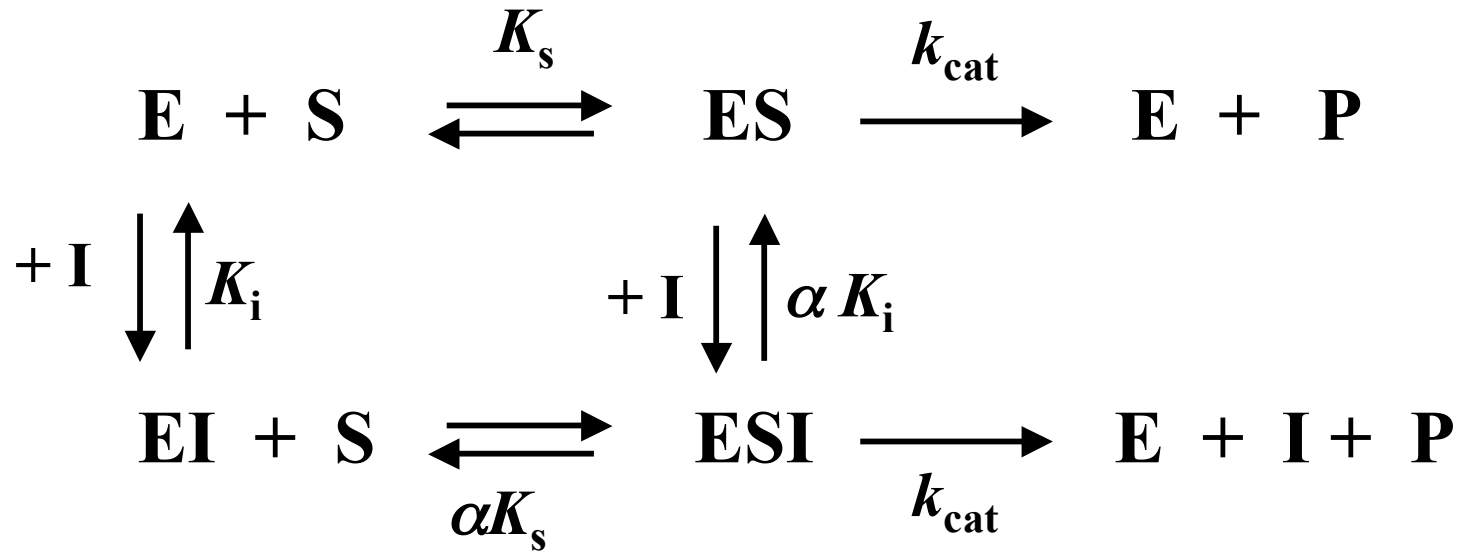
INHIBIDORES LINEALES

- Aparecen términos en el denominador de la ecuación de velocidad proporcionales a la concentración de inhibidor**
- Los regráficos de los parámetros cinéticos aparentes vs la concentración de inhibidor son lineales**
- Producen una inhibición total**

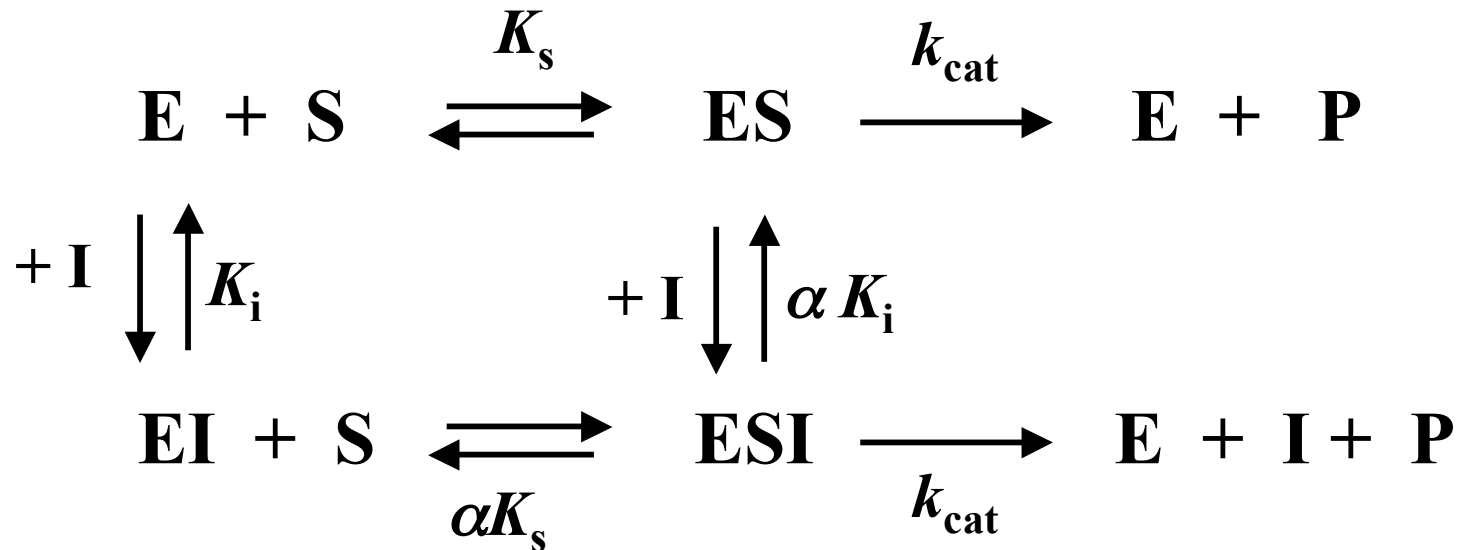
INHIBIDORES HIPERBÓLICOS

- Aparecen términos en el denominador y en el numerador de la ecuación de velocidad proporcionales a la concentración de inhibidor**
- Los regráficos de los parámetros cinéticos aparentes vs la concentración de inhibidor son hiperbólicos**
- Producen una inhibición parcial**

Inhibición competitiva hiperbólica (parcial)



Inhibición competitiva hiperbólica (parcial)



$$v = \frac{V_{\text{max}} [\text{S}]}{\alpha K_s (K_i + [\text{I}] / (\alpha K_i + [\text{I}]) + [\text{S}]}$$

A [I] infinita la reacción ocurre a través de la ruta ESI. Todos los términos del denominador que no contengan [I] son despreciables. Por tanto

$$v = V_{\text{max}} [\text{S}] / (\alpha K_s + [\text{S}])$$

Efecto de los inhibidores competitivos hiperbólicos sobre los parámetros cinéticos

$${}_{ap}V_{max} = V_{max}$$

$${}_{ap}K_s = \alpha K_s (K_i + [I]) / (\alpha K_i + [I])$$

$${}_{ap}(V_{max}/K_s) = (V_{max}/\alpha K_s) (\alpha K_i + [I]) / (K_i + [I])$$

A [I] cero los parámetros son los reales. A [I] infinita,

$${}_{ap}K_s = \alpha K_s$$

$${}_{ap}(V_{max}/K_s) = V_{max}/\alpha K_s$$

Efecto de los inhibidores incompetitivos hiperbólicos sobre los parámetros cinéticos

$${}_{ap}V_{max} = V_{max} (K_i + \beta[I]) / (K_i + [I])$$

$${}_{ap}K_s = K_s K_i / (K_i + [I])$$

$${}_{ap}(V_{max}/K_s) = (V_{max}/K_s) (K_i + \beta[I]) / K_i$$

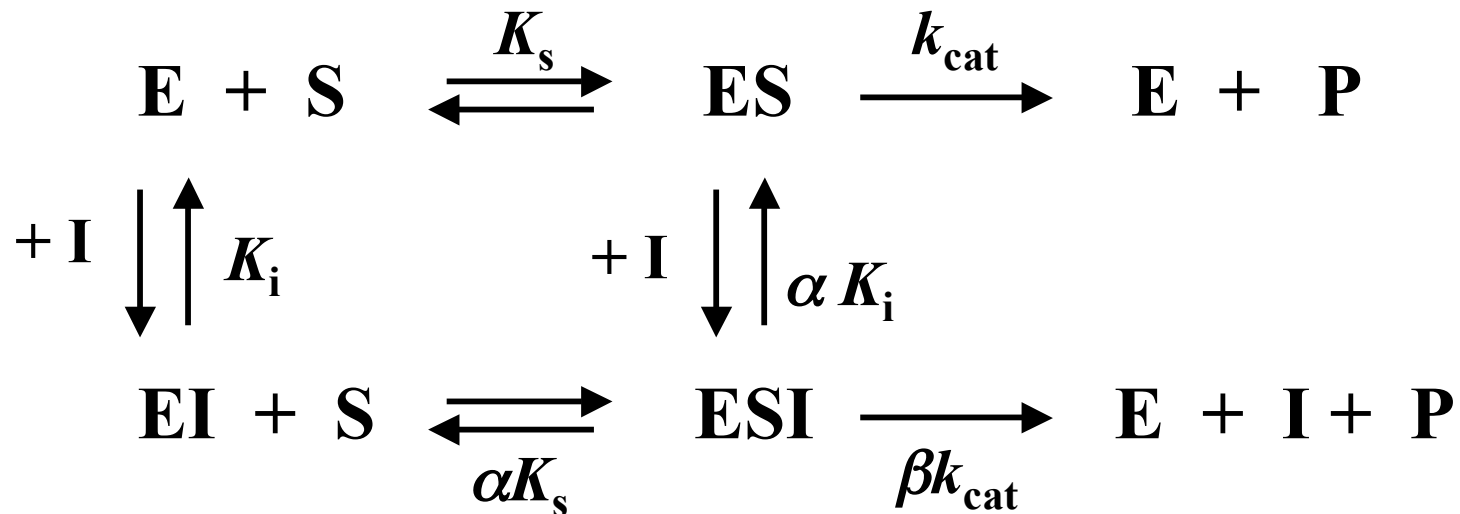
A [I] cero los parámetros son los reales. A [I] infinita,

$${}_{ap}V_{max} = \beta V_{max}$$

$${}_{ap}K_s = 0$$

$${}_{ap}(V_{max}/K_s) = \infty$$

Inhibición mixta hiperbólica (parcial)



$$v = \frac{V_{\text{max}} [\text{S}] (\alpha K_i + \beta [\text{I}] / (\alpha K_i + [\text{I}]))}{\alpha K_s (K_i + [\text{I}] / (\alpha K_i + [\text{I}])) + [\text{S}]}$$

A [I] infinita la reacción ocurre a través de la ruta ESI. Todos los términos que no contengan [I] son despreciables. Por tanto

$$v = \beta V_{\text{max}} [\text{S}] / (\alpha K_s + [\text{S}])$$

Efecto de los inhibidores mixtos hiperbólicos sobre los parámetros cinéticos

$${}_{ap}V_{max} = V_{max} (\alpha K_i + \beta [I]) / (\alpha K_i + [I])$$

$${}_{ap}K_s = \alpha K_s (K_i + [I]) / (\alpha K_i + [I])$$

$${}_{ap}(V_{max}/K_s) = (V_{max}/\alpha K_s) (\alpha K_i + \beta [I]) / (K_i + [I])$$

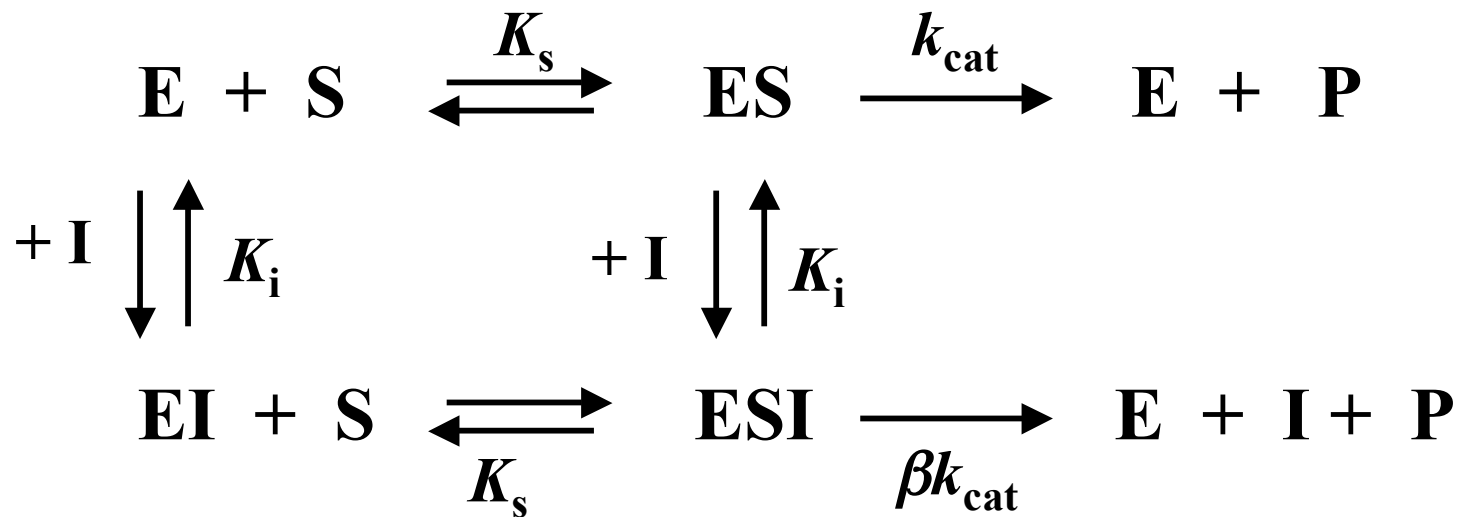
A [I] cero los parámetros son los reales. A [I] infinita,

$${}_{ap}V_{max} = \beta V_{max}$$

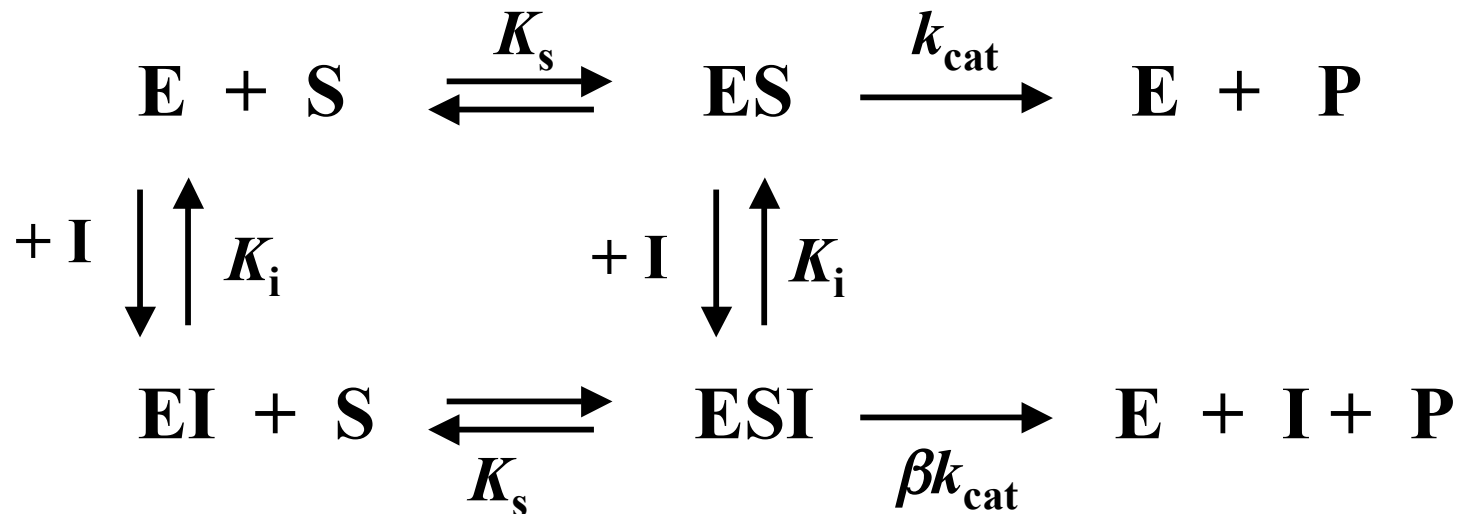
$${}_{ap}K_s = \alpha K_s$$

$${}_{ap}(V_{max}/K_s) = \beta V_{max} / \alpha K_s$$

Inhibición no competitiva hiperbólica (parcial)



Inhibición no competitiva hiperbólica (parcial)



$$v = \frac{V_{\max} [S] (K_i + \beta[I]) / (K_i + [I])}{K_s + [S]}$$

A [I] infinita la reacción ocurre a través de la ruta ESI. Todos los términos que no contengan [I] son despreciables. Por tanto

$$v = \beta V_{\max} [S] / (K_s + [S])$$

Efecto de los inhibidores no competitivos hiperbólicos sobre los parámetros cinéticos

$${}_{ap}V_{max} = V_{max} (K_i + \beta[I]) / (K_i + [I])$$

$${}_{ap}K_s = K_s$$

$${}_{ap}(V_{max}/K_s) = (V_{max}/K_s) (K_i + \beta[I]) / (K_i + [I])$$

A [I] cero los parámetros son los reales. A [I] infinita,

$${}_{ap}V_{max} = \beta V_{max}$$

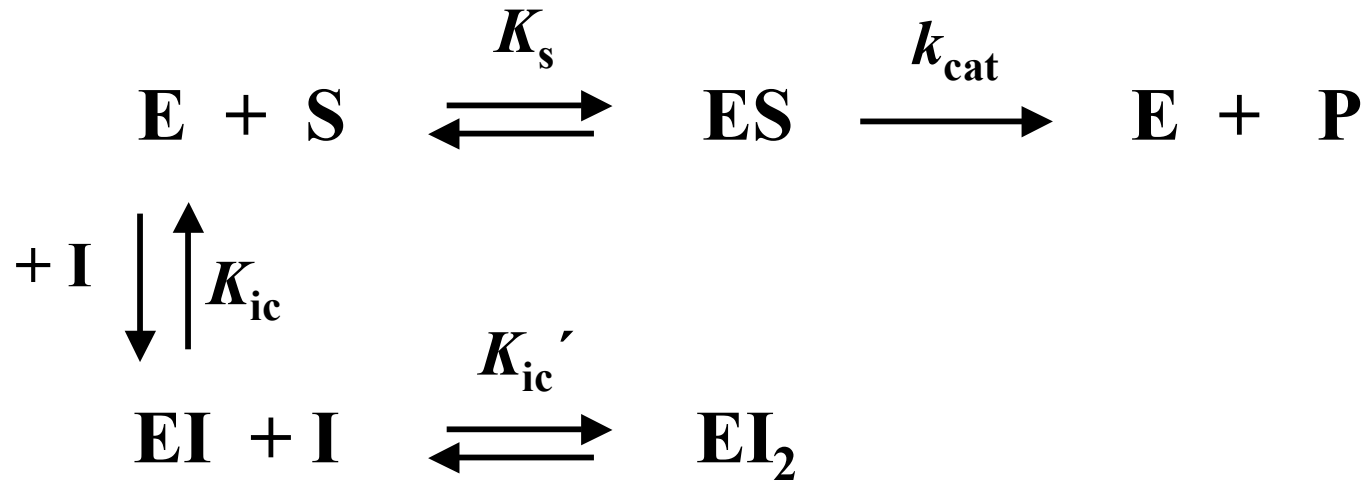
$${}_{ap}K_s = K_s$$

$${}_{ap}(V_{max}/K_s) = \beta V_{max}/K_s$$

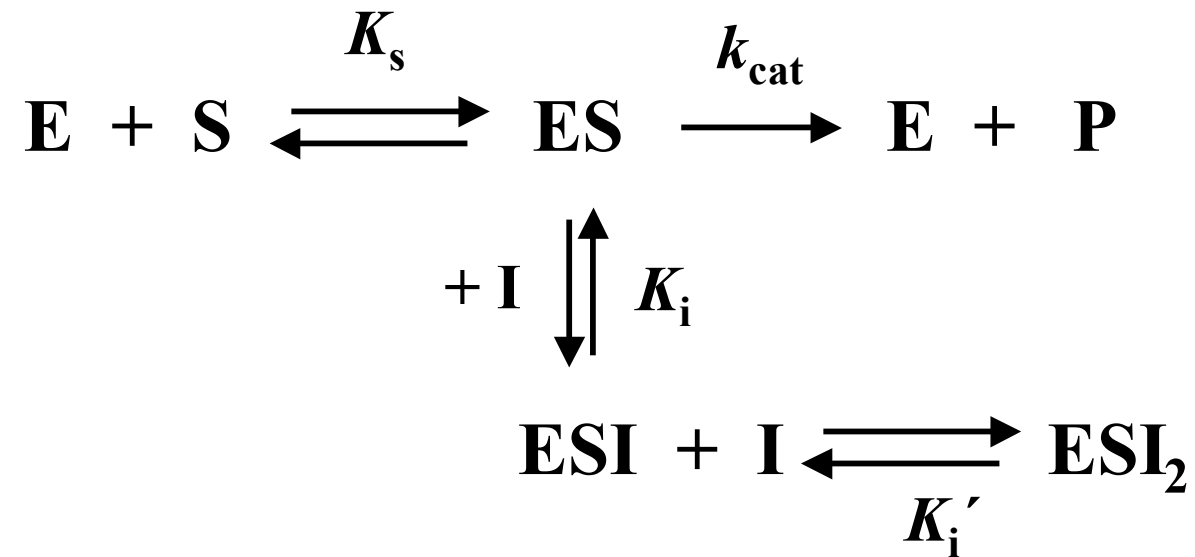
INHIBIDORES PARABÓLICOS

- **Más de una molécula de inhibidor se une a una sola especie enzimática, o una sola molécula de inhibidor a varias especies de la enzima cuyos niveles de estado estacionario dependen una de la otra**
- **Aparecen términos en el denominador de la ecuación de velocidad proporcionales al cuadrado de la concentración de inhibidor**
- **Los regráficos de los parámetros cinéticos aparentes *versus* la concentración de inhibidor son parabólicos**
- **Producen una inhibición total**

Inhibición competitiva parabólica

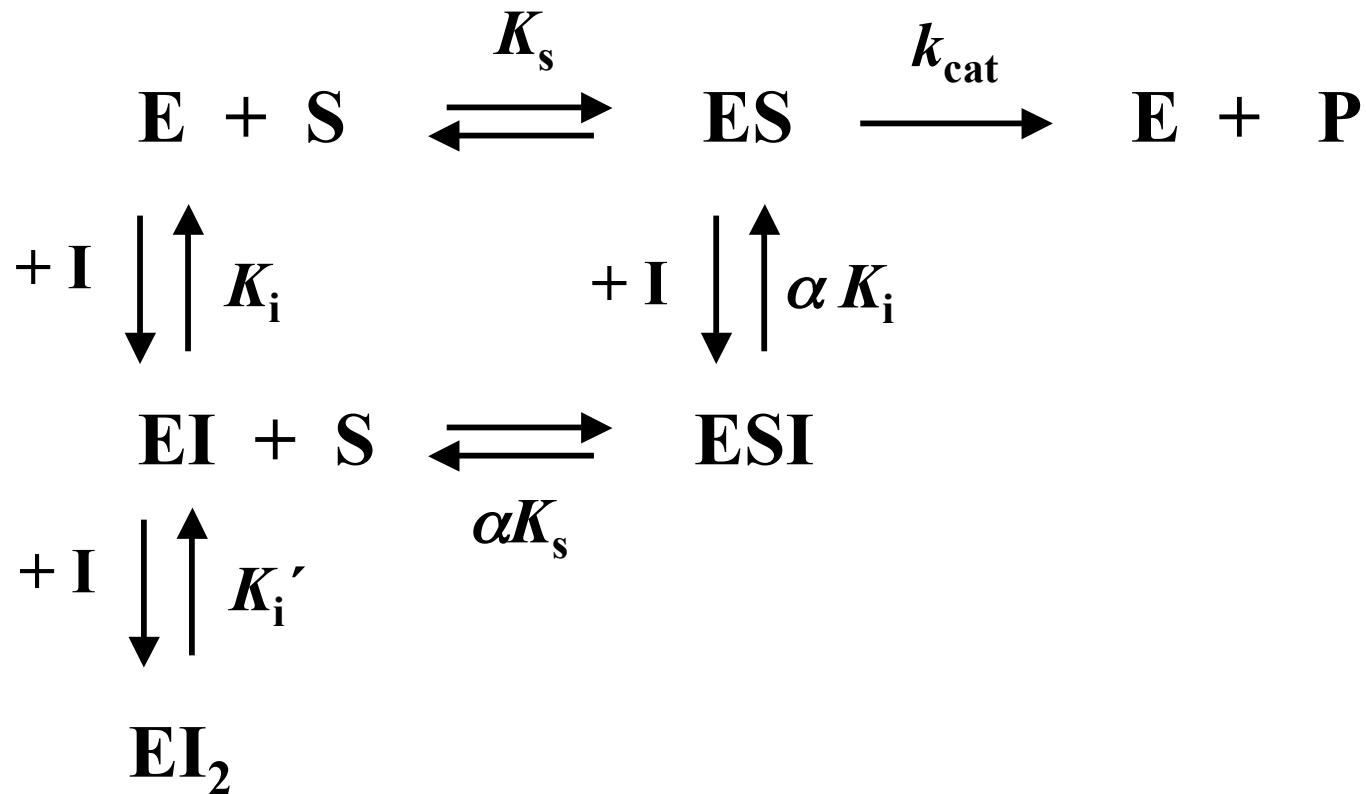


Inhibición incompetitiva parabólica



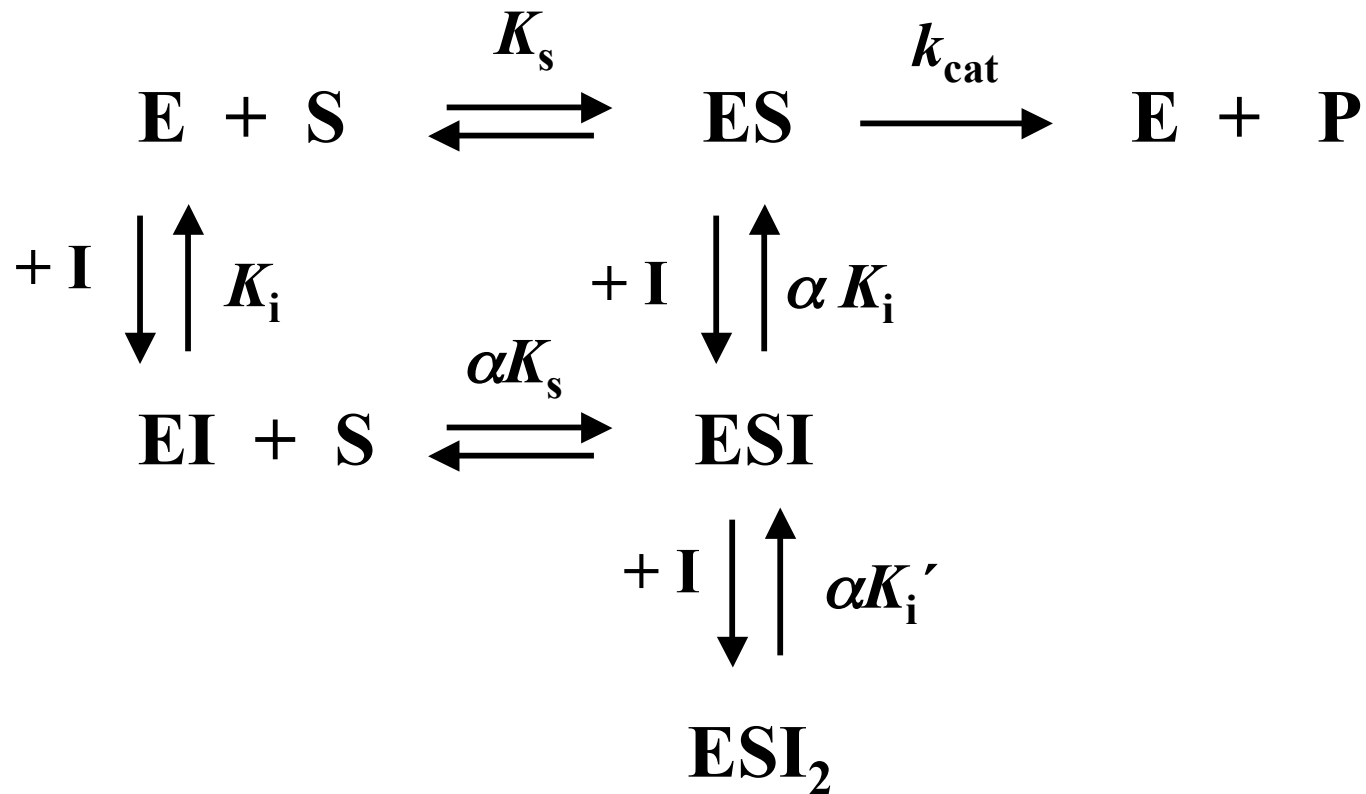
Inhibición mixta parabólica

(a)



Inhibición mixta parabólica

(b)



Efecto de los inhibidores parabólicos sobre los parámetros cinéticos

$$C_{ap} = C / (1 + [I]/K_i + [I]^2/K_i K'_i)$$

Siendo $C_{ap} = V_{max\ ap} / (V_{max}/K_m)_{ap}$

Efecto de los inhibidores lineales sobre la ecuación de velocidad inicial

Un inhibidor sin salida total introduce un factor $(1 + [I]/K_i)$ al término en el denominador de la ecuación de velocidad que representa la especie de la enzima a la que se une el inhibidor

Reglas para predecir patrones de inhibición **(Equilibrio Rápido)**

- **Un inhibidor afecta la pendiente de la gráfica de dobles recíprocos (inhibición competitiva) si él y el sustrato variable se combinan reversiblemente con la misma especie de la enzima, es decir, inhibidor y sustrato son mutuamente excluyentes, o si se une antes en la secuencia que el sustrato dando una especie enzimática que no une al sustrato**
- **Un inhibidor afecta la intersección en el eje $1/v$ de la gráfica de dobles recíprocos (inhibición incompetitiva) si él y el sustrato variable se combinan reversiblemente con especies diferentes de la enzima, y el sustrato se une antes que el inhibidor**
- **Un inhibidor afecta tanto la pendiente como la intersección en el eje $1/v$ de la gráfica de dobles recíprocos (inhibición mixta) si él y el sustrato variable se combinan reversiblemente con especies diferentes de la enzima, y el inhibidor se une antes que el sustrato variable y promueve la unión de éste mimetizando al sustrato fijo variable**
- **La inhibición se anula si es saturante el sustrato que se une a la misma especie de la enzima que el inhibidor**

Patrones de Inhibición por Producto

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio rápido

- *Formación de complejos sin salida (dead-end)*
 - EP o EQ
 - Ambos productos son inhibidores competitivos con respecto al sustrato variable
 - EAP o EBQ
 - El producto es un inhibidor competitivo con respecto al sustrato del cual deriva (P con respecto a B, Q con respecto a A) y un inhibidor mixto con respecto al otro sustrato (P con respecto a A y Q con respecto a B)
- *No formación de complejos sin salida (dead-end)*
 - Ambos productos son inhibidores competitivos con respecto al sustrato variable

Mecanismos de Inhibición por Sustrato

Mecanismos Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido

- *Formación de complejos sin salida (dead-end)*
 - BE y BEB o AE y AEA
 - El sustrato fijo variable se une al subsitio del sustrato variable sin impedir la unión a su propio subsitio.
 - BE o AE
 - El sustrato fijo variable se une al subsitio del sustrato variable impidiendo la unión a su propio subsitio. En este caso no hay aparentemente inhibición por sustrato

TIPOS DE INHIBIDORES

- *Clásicos*
 - $[I]_t \gg [E]_t$ El equilibrio $E + I \longleftrightarrow EI$ se alcanza rápidamente
- *Firmemente unidos*
 - $[I]_t \approx [E]_t$ El equilibrio $E + I \longleftrightarrow EI$ se alcanza rápidamente
- *De unión lenta*
 - $[I]_t \gg [E]_t$ El equilibrio $E + I \longleftrightarrow EI$ se alcanza lentamente
- *De unión lenta y firmemente unidos*
 - $[I]_t \approx [E]_t$ El equilibrio $E + I \longleftrightarrow EI$ se alcanza lentamente

TIPOS DE INHIBIDORES

- *Clásicos*

- El equilibrio $E \xrightleftharpoons[k_{-3}]{Ik_3} EI$ se alcanza rápidamente,

por lo que $[I]k_3$ y k_{-3} deben ser altos

- El valor máximo que puede alcanzar k_3 es $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

- Para que haya una unión razonable $k_{-3} < [I]k_3$, de manera que $K_i \approx 10^{-6}-10^{-2} \text{ M}$

- Por tanto, $[I]$ debe estar en el intervalo $10^{-6}-10^{-2} \text{ M}$ y entonces $[I]_t \gg [E]_t$

INHIBIDORES FIRMEMENTE UNIDOS

– El equilibrio $E \xrightleftharpoons[k_{-3}]{Ik_3} EI$ se alcanza rápidamente,

por lo que los valores de $[I]k_3$ y k_{-3} no pueden ser muy bajos

– El valor máximo que puede alcanzar k_3 es $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

– Para que haya una unión fuerte k_{-3} debe ser pequeño, de manera que $K_i \approx 10^{-7}-10^{-9} \text{ M}$

– Por tanto, $[I]$ debe estar en el intervalo $10^{-7}-10^{-9} \text{ M}$ y entonces $[I]_t \approx [E]_t$

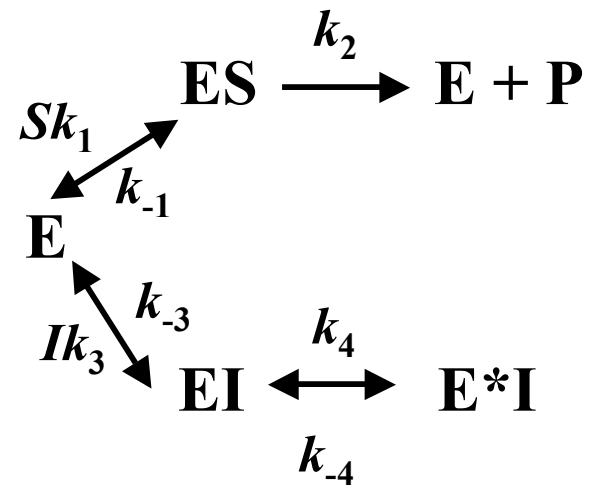
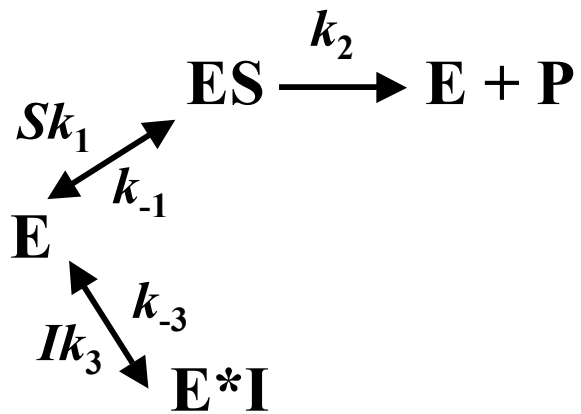
INHIBIDORES DE UNIÓN LENTA

– El equilibrio $E \xrightleftharpoons[k_{-3}]{Ik_3} EI$ se alcanza lentamente porque k_3

tiene un valor bajo

- Existen impedimentos para la unión del inhibidor a la enzima o una isomerización lenta del complejo EI
- Si $k_{-3} \ll [I]k_3$ la reacción aparecerá como irreversible, aunque no hay formación de enlaces covalentes
- Si $K_i = 10^{-2}-10^{-7}$, entonces $[I]_t \gg [E]_t$

INHIBIDORES DE UNIÓN LENTA Y FIRMEMENTE UNIDOS



INHIBIDORES DE UNIÓN LENTA Y FIRMEMENTE UNIDOS

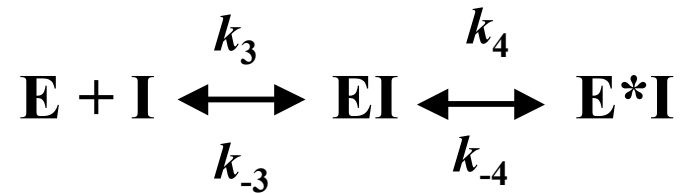
- *De unión lenta y fuertemente unidos*

– El equilibrio $E \xrightleftharpoons[k_{-3}]{Ik_3} EI$ se alcanza lentamente porque $[I]$

es muy baja, aunque el valor de k_3 esté cercano al límite impuesto por la difusión

– Si $K_i = 10^{-7}$ - 10^{-9} , entonces $[I]_t = [E]_t$

INHIBIDORES DE UNIÓN LENTA Y FIRMEMENTE UNIDOS



$$K_i = k_{-3}/k_3$$

$$K_i^* = k_{-4}/k_4 = [\text{EI}]/[\text{E}^*\text{I}]$$

$$K_{i, \text{ap}} = k_{-3} k_{-4}/k_3 k_4$$

- Si $k_{-4} \ll k_4$, $K_i^* \ll K_i$, el equilibrio estará desplazado hacia la formación de E^*I
- Si $k_4 \ll k_{-4}$, $K_i^* \approx K_i$, la formación de E^*I será despreciable. El inhibidor aparecerá como competitivo clásico
- Si ambos k_4 y k_{-4} son altos no se observará unión lenta (el equilibrio entre EI y E^*I se alcanzará rápidamente)
- Si ambos k_4 y k_{-4} son relativamente bajos no se observará formación de E^*I antes de que el sustrato se consuma

Caracterización cinética de los inhibidores

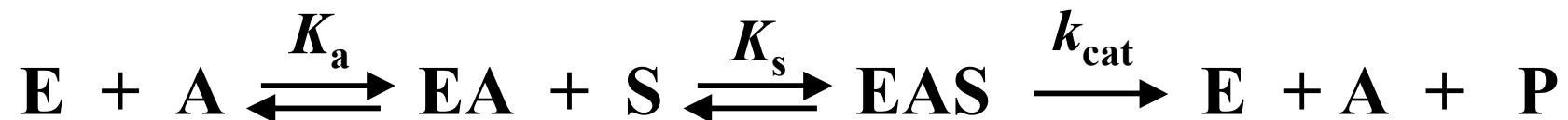
- ***Determinar la velocidad inicial de la reacción catalizada***
 - variando la concentración de sustrato y manteniendo constante la concentración de enzima, en ausencia y presencia de varias concentraciones fijas de inhibidor.
- ***Determinar el tipo de inhibición:***
 - Comprobando cuál es el parámetro cinético (V_{\max} , V_{\max}/K_m o ambos) que disminuye en presencia del inhibidor
 - Determinando si a concentración saturante del inhibidor la velocidad de la reacción es o no es cero, por medio de regráficos o I_{50}
 - Determinado si la velocidad de la reacción se recupera cuando se elimina el inhibidor del medio en que está la enzima
 - Determinando si la reacción no permanece lineal en el periodo de tiempo en que aún no hay agotamiento del sustrato
- ***Determinar la constante de inhibición (K_i):***
 - Graficando la inversa del parámetro cinético que cambia frente a la concentración de inhibidor, o mediante ajuste por regresión no lineal a la ecuación correspondiente

TIPOS DE ACTIVADORES

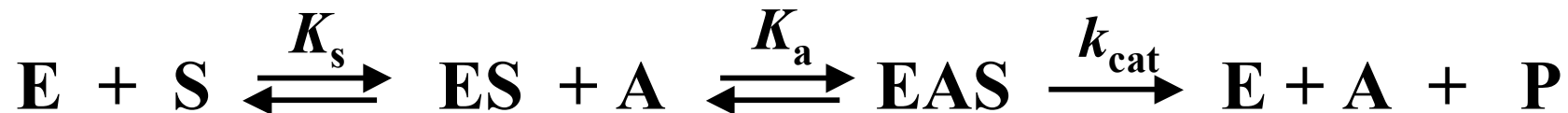
- ***ESENCIAL***: Se requiere para que ocurra la reacción
- ***NO ESENCIAL***: No se requiere para que ocurra la reacción

ACTIVADORES ESENCIALES

- *Se requieren para la unión del sustrato*

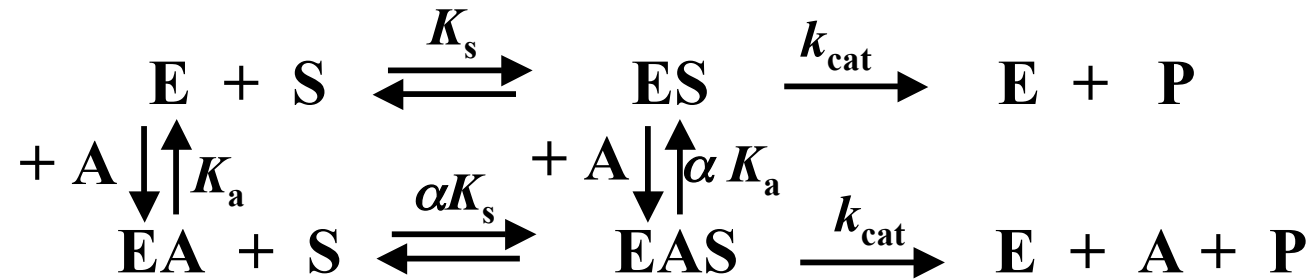


- *Se requieren para el (los) paso(s) catalíticos*

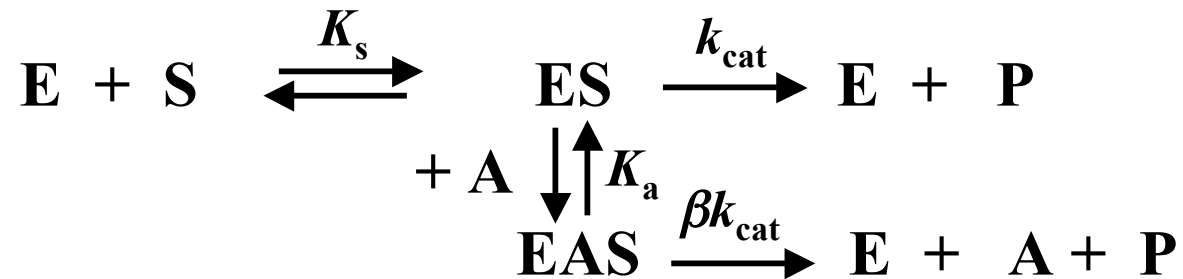


ACTIVADORES NO ESENCIALES

- *Favorecen la unión del sustrato*



- *Favorecen el (los) paso(s) catalíticos*



Valores de α y β

- *Inhibidores*

$$\alpha > 1 \quad \beta < 1$$

- *Activadores*

$$\alpha < 1 \quad \beta > 1$$

- *Efectores*

$$\alpha > 1 \quad \beta > 1$$

$$\alpha < 1 \quad \beta < 1$$

Determinación de K_a

Activación esencial

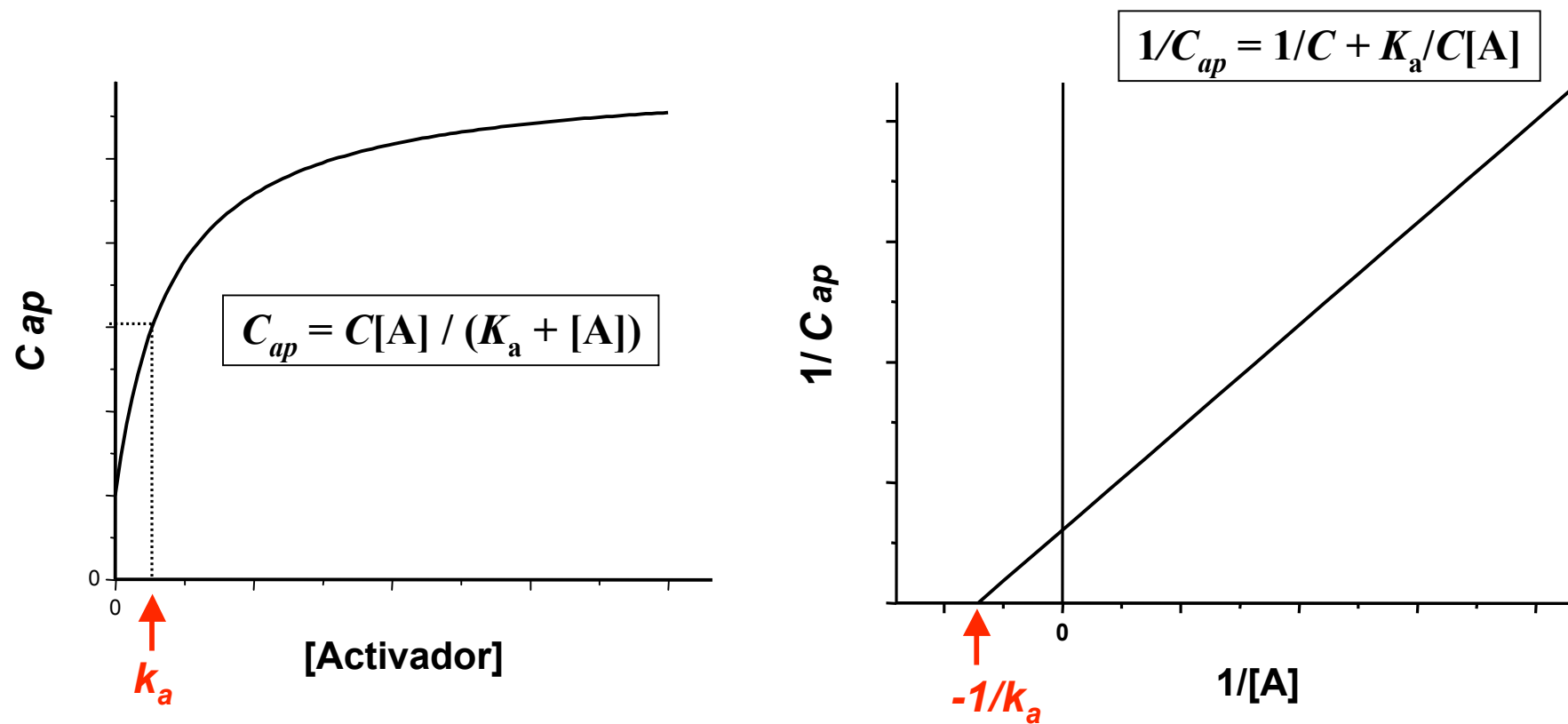
- *Regraficar los valores del parámetro cinético aparente frente a la concentración de activador (hipérbola)*

$$C_{ap} = C / (1 + K_a/[A]) = C[A] / (K_a + [A])$$

- *Regraficar el inverso de los valores del parámetro cinético aparente frente al inverso de la concentración de activador (línea recta)*

$$1/C_{ap} = (1 + K_a/[A]) / C = 1/C + K_a/C[A]$$

Determinación de K_a Activación esencial



Efecto de los inhibidores totales y activadores esenciales sobre los parámetros cinéticos

- *Inhibidores*

$$C_{ap} = C / (1 + [I] / K_i)$$

- *Activadores*

$$C_{ap} = C / (1 + K_a / [A])$$

Siendo $C_{ap} = V_{max\ ap} / (V_{max} / K_m)_{ap}$

Diseño y análisis de los experimentos de inhibición o activación de una enzima

- **Determinar los parámetros cinéticos reales de la enzima** (V_{\max} , V_{\max}/K_m), haciendo una cinética de saturación por su sustrato en ausencia del inhibidor o del activador.
- **Determinar los parámetros cinéticos aparentes** (apV_{\max} , apV_{\max}/K_m), haciendo una cinética de saturación por su sustrato en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor o del activador.
- **Determinar el tipo de inhibición o de activación**, viendo cuál de estos parámetros cinéticos es el que cambia por la presencia del inhibidor o del activador. Para ello:
 - Comparar los valores de los parámetros cinéticos aparentes con los reales.
 - Hacer un gráfico de dobles recíprocos incluyendo los datos obtenidos en ausencia y presencia del inhibidor o del activador y ver si las líneas obtenidas en su presencia muestran cambios en las pendientes y/o intersecciones en el eje de ordenadas.
- **Determinar la constante de inhibición o de activación**. Para ello:
 - Usando la ecuación que relaciona el valor aparente del parámetro cinético con el real, la concentración del inhibidor o del activador y su constante de disociación despejar el valor de ésta última.
 - Regraficar aquel(los) parámetro(s) cinético(s) que cambien frente a las diferentes concentraciones del inhibidor o del activador. Cuando se grafica el inverso del parámetro cinético, la K_i o la K_a es el valor absoluto del intersección de la línea en el eje de abscisas.

Diseño y análisis de los experimentos de inhibición o activación de una enzima

- **Determinar los parámetros cinéticos reales de la enzima** (V_{\max} , V_{\max}/K_m), haciendo una cinética de saturación por su sustrato en ausencia del inhibidor o del activador.
- **Determinar los parámetros cinéticos aparentes** (apV_{\max} , apV_{\max}/K_m), haciendo una cinética de saturación por su sustrato en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor o del activador.
- **Determinar el tipo de inhibición o de activación**, viendo cuál de estos parámetros cinéticos es el que cambia por la presencia del inhibidor o del activador. Para ello:
 - Comparar los valores de los parámetros cinéticos aparentes con los reales.
 - Hacer un gráfico de dobles recíprocos incluyendo los datos obtenidos en ausencia y presencia del inhibidor o del activador y ver si las líneas obtenidas en su presencia muestran cambios en las pendientes y/o intersecciones en el eje de ordenadas.
- **Determinar la constante de inhibición o de activación**. Para ello:
 - Usando la ecuación que relaciona el valor aparente del parámetro cinético con el real, la concentración del inhibidor o del activador y su constante de disociación despejar el valor de ésta última.
 - Regraficar aquel(los) parámetro(s) cinético(s) que cambien frente a las diferentes concentraciones del inhibidor o del activador. Cuando se grafica el inverso del parámetro cinético, la K_i o la K_a es el valor absoluto del intersección de la línea en el eje de abscisas.