

## Artículos Especiales

**Mecanismo de acción de las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular**Emilio Guija <sup>1</sup>, Mercedes Soberón <sup>2</sup>, Hielke Haak-Mares <sup>†</sup>**Resumen**

Las fosfatasas ácidas son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y tienen la propiedad de hidrolizar fosfomonoésteres a pH 5,0, liberando como productos de la reacción un alcohol y fosfato inorgánico. Cuando se compara los valores de  $k_{cat}/K_m$  de las fosfatasas de hígado, de bovino, alpaca y porcino, nos permite sugerir que estas enzimas tienen elevada afinidad por el sustrato *p*-nitrofenil fosfato. Los productos que se liberan durante la catálisis por fosfatasa ácida, muestran que el fenol o el *p*-nitrofenol se comportan como inhibidores de tipo no competitivo, mientras que el fosfato inorgánico muestra una inhibición de tipo competitiva. Para evidenciar la probable formación de un complejo covalente en la secuencia catalítica, se utilizó diversos nucleófilos más eficientes que el agua, tales como metanol, etanol y glicerol. Las modificaciones que produjeron en los valores  $K_m$ ,  $V_{max}$  y los productos liberados en la reacción sugieren la formación de un complejo enzima-fosfato. El pH afecta los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  de las fosfatasas ácidas, un análisis del comportamiento de estas enzimas en un rango de pH comprendido entre 3,8 y 6,8 sugieren que en el sitio activo existe un residuo de aminoácido con un valor  $pK_a$  de 6,0. El uso del dietilpirocarbonato, un compuesto que selectivamente reacciona con el residuo histidina en las proteínas, inhibe completamente a estas fosfatasas. Así mismo, un experimento de cinética de inhibición múltiple realizado en presencia de fosfato inorgánico y dietilpirocarbonato permite calcular un valor  $K_i$  que es igual al obtenido en otras condiciones experimentales. En tal sentido, las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular catalizarían las reacciones a través de un modelo de tipo uni biordenado, con la formación de un complejo covalente intermedio, y que el residuo histidina participaría directamente en la catálisis.

**Palabras clave** Fosfatasa ácida; catálisis; mecanismo de acción.

**Mechanism of action of low molecular weight acid phosphatases****Abstract**

Acid phosphatases are enzymes widespread in nature that hydrolyze phosphomonoesters at pH 5,0; this reaction yields alcohol and inorganic phosphate. Comparison of bovine, alpaca and porcine liver phosphatases  $k_{cat}/K_m$  values suggests these enzymes have a high affinity for

*p*-nitrophenyl phosphate substrate. Products that are released during acid phosphatase catalysis show that phenol or *p*-nitrophenol behave as non competitive inhibitors, whereas inorganic phosphate shows competitive inhibition. Different nucleophiles more efficient than water have been used, such as methanol, ethanol and glycerol, showing the probable formation of a covalent complex in the catalytic sequence. Modifications produced in  $K_m$  and  $V_{max}$  values as well as in the reaction released products suggest the development of an enzyme-phosphate complex. pH affects acid phosphatases  $K_m$  and  $V_{max}$  values. Behavioral analysis of these enzymes at 3,8 to 6,8 pH range suggests the location of a  $pK_a$  6,0 aminoacid residue in the active site. The use of a diethylpyrocarbonate compound which selectively reacts with protein histidine residues completely inhibits this kind of phosphatases. Also,

<sup>1</sup> Profesor Emérito del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Perú.

<sup>2</sup> Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>†</sup> El presente artículo se publica como un homenaje póstumo al Dr. Hielke Haak Mares, Profesor Principal de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

*multiple inhibition kinetic survey performed in presence of inorganic phosphate and diethylpyrocarbonate allows a  $K_i$  value calculation equal to that obtained in other experimental conditions. In this respect, low molecular weight acid phosphatases would catalyze reactions through a uni biordered model, forming an intermediate covalent complex; histidine residues would directly participate in the catalysis.*

*Key words: Acid phosphatase; catalysis; action mechanism.*

Las enzimas son proteínas que tienen la propiedad de acelerar las reacciones químicas sin modificar la constante de equilibrio del sistema, siendo una de sus características más importantes y notables catalizar reacciones de muy diferente naturaleza en los seres vivientes, a una determinada velocidad, en un medio cuya composición, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica, pH, etc. son prácticamente constantes<sup>(1,2)</sup>. Los procesos metabólicos que ocurren en una célula son catalizados por enzimas, por cuyo motivo, el estudio de los procesos mecanísticos de éstas reviste particular importancia, ya que es poco probable que pueda concebirse una teoría que explique la regulación metabólica en una célula o pueda diseñarse un medicamento, sin un adecuado conocimiento del mecanismo de acción de las enzimas involucradas<sup>(3)</sup>.

El conocimiento del mecanismo de acción que permite a una enzima realizar transformaciones químicas a velocidades inmensamente grandes ha conitado desde hace muchos años el interés de muchos grupos de investigación, motivados por el interés de incrementar la producción de diversos compuestos para uso industrial, como ocurre con la producción de enzimas, tales como la  $\alpha$ -amilasa, pectinasa, proteasas, lipasas, catalasa, glucosa oxidasa, peroxidasa, celulasa, glucosa isomerasa, etc.<sup>(4)</sup>.

La secuencia catalítica utilizada por una enzima para transformar un sustrato en producto se realiza a través de interacciones, diferente para cada enzima, y ello ocurre como una expresión de la elevada especificidad que poseen, por cuyo motivo, el estudio de dichos procesos en enzimas que catalizan una misma reacción, pero de origen distinto, ofrece la posibilidad de obtener información adicional y, por lo tanto, una comprensión más precisa sobre la catálisis por enzimas<sup>(1,2)</sup>.

En el presente trabajo se describe las propiedades cinéticas de la enzima fosfatasa ácida de bajo peso molecular (fosfohidrolasa de ésteres ortofosfóricos E.C. 3.1.3.2), de hígados de alpaca<sup>(5)</sup>, bovino<sup>(6)</sup> y porcino<sup>(7)</sup>. Las fosfatasa ácidas son enzimas que en pH ácido (aproximadamente 5,0) tienen la propiedad de catalizar la hidrólisis de fosfomonoésteres, liberando como productos de la reacción fosfato inorgánico y un alcohol, cuya naturaleza depende del sustrato utilizado. La utilización de diversos métodos de purificación ha permitido obtener fosfatasa ácidas de múltiples fuentes, con un elevado grado de pureza; en tal sentido, se ha descrito la purificación de estas enzimas procedentes de *Aspergillus niger*<sup>(8)</sup>, *Spirodela oligorrhiza*<sup>(9)</sup>, camote<sup>(10)</sup>, placenta humana<sup>(11)</sup>, próstata humana<sup>(12)</sup>, hígado de rata<sup>(13)</sup>, hígado de pollo<sup>(14)</sup>, hígado de cobayo<sup>(15)</sup>, hígado de bovino<sup>(16)</sup>, etc.

Uno de los parámetros cinéticos motivo de análisis fue la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), determinada utilizando dos sustratos distintos, el fenil fosfato y el p-nitrofenil fosfato, habiéndose observado que frente al primer sustrato las fosfatasa tienen un valor que aproximadamente es de dos órdenes de magnitud superior al mostrado para el p-nitrofenil fosfato. Consideramos que no resulta apropiado sugerir que estos valores, ostensiblemente distintos, guarden estrecha vinculación con la afinidad que la enzima muestra por uno de los sustratos antes citados; en cambio, cuando se compara las relaciones  $k_{cat}/K_m$ , que vincula la velocidad de reacción en función de la concentración de enzima libre, es posible concluir que las tres enzimas (fosfatasa ácida de hígado de alpaca, fosfatasa ácida de hígado de bovino y fosfatasa ácida de hígado de porcino) tienen mayor afinidad por el sustrato p-nitrofenil fosfato que por el fenil fosfato, conforme se aprecia en la Tabla 1. El uso de algunos sustratos de origen biológico permite observar que las enzimas antes mencionadas exhiben muy poca acción hidrolítica sobre ellos, en las condiciones de ensayo utilizadas, es decir, tampón acetato o maleato 0,05M pH 5,0. Particularmente, el valor  $K_m$  para el sustrato p-nitrofenil fosfato es similar al publicado para fosfatasa ácidas de otras fuentes, como las de cerebro de bovino<sup>(17)</sup>, hígado de rata<sup>(18)</sup>, etc.

Tabla 1. Valores kcat/Km ( $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) de las fosfatasa ácidas de bajo peso molecular de hígado.

Sustrato	Alpaca	Bovino	Porcino
p-nitrofenil fosfato	$7,4 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
Fenil fosfato	$2,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$

Generalmente, los productos que se liberan en una reacción catalizada por enzimas se comportan como inhibidores de las enzimas que los forman, propiedad que es aprovechada con la finalidad de vincularlos al modo de acción de éstas. Con dicho propósito, se dirigió la atención a estudiar los efectos que ejercerían los productos fosfato inorgánico, fenol o p-nitrofenol, que se liberan cuando se usa como sustratos fenil fosfato y p-nitrofenil fosfato, respectivamente.

El fosfato inorgánico se comportó como un inhibidor de tipo competitivo con ambos sustratos, mostrando valores de  $K_i$  que difieren en un orden de magnitud para las enzimas estudiadas, tal como se observa en la Tabla 2. La regraficación de las pendientes de la doble recíproca de Lineweaver-Burk (<sup>19</sup>) permite obtener una recta, lo que nos estaría indicando que la interacción se produce exclusivamente entre el fosfato inorgánico y la enzima libre, así mismo, puede calcularse el valor de  $K_i$  (<sup>5-7</sup>).

Cuando se observa el comportamiento del fenol frente al sustrato fenil fosfato o el p-nitrofenol frente al sustrato p-nitrofenil fosfato, es posible apreciar que ambos productos tienen un comportamiento identificado con una inhibición de tipo no competitiva, cuya regraficación de la doble recíproca

Tabla 2. Constantes de inhibición [M] de los productos de reacción.

Fuente de enzima	Sustrato	Fosfato inorgánico	Fenol	p-nitrofenol
Alpaca	p-nitrofenil fosfato	$1,1 \times 10^{-4}$	-	$3,4 \times 10^{-4}$
	Fenil fosfato	$1,2 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-4}$	-
Porcino	p-nitrofenil fosfato	$4,0 \times 10^{-3}$	-	$1,0 \times 10^{-3}$
	Fenil fosfato	$4,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	-
Bovino	p-nitrofenil fosfato	$1,0 \times 10^{-3}$	-	$1,0 \times 10^{-2}$
	Fenil fosfato	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	-

de Lineweaver-Burk (<sup>19</sup>) es lineal, interpretándose estos resultados en el sentido de que los complejos enzima-inhibidor o enzima-inhibidor-sustrato no son capaces de formar productos, comportamiento que ocurre con las tres enzimas motivo del estudio, percibiéndose diferencias solamente desde el punto de vista cuantitativo, como puede observarse en la Tabla 2. Un comportamiento al previamente descrito ha sido evidenciado con la fosfatasa ácida de papa (<sup>20</sup>) y la de cerebro de bovino (<sup>21</sup>).

Un hecho inusitado fue el comportamiento mostrado por la fosfatasa ácida de bajo peso molecular de hígado de bovino, enzima que es inhibida por el fosfato inorgánico a través de un mecanismo ligeramente distinto al mostrado por las fosfatasas de alpaca y porcino. Este proceso ocurre cuando la reacción se realiza en tampón acetato; en cambio, no sucede cuando se utiliza los tampones citrato o maleato. La inhibición en las condiciones antes anotadas es de tipo competitiva lineal, pero de regraficación hiperbólica, resultado que podría interpretarse en el sentido de que la inhibición observada es de tipo mixta. Experimentos ulteriores permitieron mostrar que el acetato se comportaba como un activador de tipo no esencial, lo que motivó que no se utilizara al acetato como tampón y fuese reemplazado por maleato o citrato en los experimentos cinéticos. Estos resultados sugieren que los productos de la reacción se liberen de una manera ordenada y que en la secuencia catalítica se formaría un complejo enzima-fosfato, que por hidrólisis liberaría fosfato inorgánico (<sup>5-7</sup>).

Con el propósito de verificar cinéticamente la probable formación del complejo enzima-fosfato, se utilizó varios nucleófilos más eficientes que el agua, como el metanol, etanol y glicerol. Cuando se incorpora uno de los reactivos nucleófilos antes citados al medio de reacción, se observa un incremento en la velocidad de hidrólisis del p-nitrofenil fosfato. Este efecto de aparente activación enzimática puede haber sido ocasionado por la directa participación del nucleófilo en la secuencia catalítica. Con la finalidad de elucidar de una manera más precisa la naturaleza de estas interacciones, se evaluó los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  y la relación que se establece entre los productos de reacción liberados en función del tiempo.

Desde el punto de vista cinético, se ha observado algunas diferencias entre las fosfatasa ácidas de bovino con respecto a las de porcino y de alpaca. La presencia de glicerol ocasiona una modificación hiperbólica en los valores de  $K_m$ , cuando la reacción es catalizada por la fosfatasa ácida de hígado de bovino. Así mismo, la velocidad de liberación del primer producto de la reacción, que es el p-nitrofenol, mantiene una dependencia igualmente hiperbólica con relación a la concentración de glicerol. En cambio, la liberación de fosfato inorgánico disminuye. Estos resultados sugieren que en la secuencia catalítica los valores de las constantes de velocidad de las diversas etapas tienen valores muy similares (<sup>22</sup>). En cambio, cuando se observa el comportamiento de las fosfatasa de hígado de alpaca y porcino sometidas a condiciones similares a las de bovino, las variaciones de los valores de  $K_m$  así como la liberación del primer producto es directamente proporcional a la concentración de glicerol, no apreciándose modificación alguna en la liberación del fosfato inorgánico. Los resultados anteriormente citados nos sugieren que el valor de la constante de velocidad de liberación del primer producto (p-nitrofenol) es mucho mayor que los valores de las constantes de velocidad de liberación de fosfato inorgánico y la del nucleófilo fosforilado (<sup>23</sup>).

Un aspecto que es fundamental en los comportamientos ligeramente distintos de las fosfatasa ácidas, es el hecho de que en la secuencia catalítica debe necesariamente existir un complejo enzima-fosfato ligado covalentemente, lo que explicaría las variaciones tanto en los valores de  $K_m$ , así como, las velocidades de liberación de los productos, y ello naturalmente se explica a través de una competición que se establece entre las moléculas de agua y el nucleófilo (glicerol), para escindir el complejo intermedio enzima-fosfato, con la consiguiente formación de fosfato inorgánico y el nucleófilo fosforilado. Como es lógico suponer, la ausencia de un intermediario covalente enzima-fosfato durante la catálisis no podría explicar de manera alguna los incrementos en los valores de los parámetros antes mencionados (<sup>5,22,23</sup>). También, es necesario destacar las ligeras modificaciones en los valores de las constantes de velocidad de las etapas intermedias durante la catálisis, lo que nos estaría indicando que las tres enzimas no tendrían un comportamiento cinético

idéntico, por cuyo motivo, puede descartarse los mecanismos donde el agua y el nucleófilo actuarían sobre isómeros de los complejos enzima-fosfato, o aquel donde la enzima se presenta en dos formas isoméricas distintas, cuyos complejos intermediarios sean ligeramente diferentes. También, es posible descartar aquellos mecanismos donde el agua o el nucleófilo posean lugares específicos de interacción. Análogamente, no es posible considerar mecanismos donde la liberación de los productos se realice en forma simultánea, ya que sería incongruente con los efectos inhibitorios que ejercen los productos de la reacción descritos anteriormente (<sup>5,22,23</sup>). La fosfatasa ácida de bajo peso molecular de cerebro de bovino muestra un comportamiento similar al descrito anteladamente (<sup>21</sup>).

Siendo las enzimas de naturaleza proteica cuya conformación tridimensional y reactividad frente a diversos ligandos está influenciada por el pH del medio de reacción, resulta valiosa la información que podría obtenerse al estudiar el efecto que sobre la catálisis ejerce la concentración de iones hidronio. La información que es posible obtener al realizar un estudio de esta naturaleza nos brinda la posibilidad de tener un conocimiento más preciso sobre el tipo de interacción que ocurre a nivel del sitio activo de la enzima o del complejo enzima-sustrato. El pH puede influir de manera diversa sobre los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ , efecto que debe estar acorde con un determinado modelo mecanístico. El uso de dos sustratos diferentes cuyos valores  $pK_a$  también sean distintos ofrece la posibilidad de descartar ciertos mecanismos (<sup>1,2</sup>).

El hecho de considerar el uso de tampones de naturaleza distinta permite evitar el probable efecto tampón, conforme sucede cuando se realiza el experimento utilizando el tampón acetato, compuesto que distorsiona ciertos resultados experimentales, particularmente cuando se observa el efecto del pH sobre  $K_m$  usando como sustrato el p-nitrofenil fosfato, reacción catalizada por la fosfatasa ácida de hígado de bovino. En cambio, cuando se usa el fenil fosfato como sustrato, no se produce el efecto activador del acetato, por cuyo motivo, estos resultados permiten sugerir que el acetato se comportaría como un activador no esencial, efecto que lo ejercería interaccionando con el sustrato.

De tal manera que, la enzima dispondría de dos sustratos distintos para hidrolizar: el p-nitrofenil fosfato y el p-nitrofenil-acetato fosfato. Este efecto no ha sido observado con las fosfatasa de alpaca y porcino. Existe la posibilidad de que la interacción se produzca entre la enzima libre o el complejo enzima-sustrato con el acetato, pero el hecho de no evidenciar efecto activador alguno cuando el acetato está presente durante la hidrólisis del fenil fosfato descarta estas posibilidades mecanísticas.

Las variaciones de los valores de  $K_m$  en función del pH utilizando el p-nitrofenil fosfato en tampón acetato sugiere que la fosfatasa ácida de bovino aparentemente tendría un residuo de aminoácido ionizable en el sitio activo, con un  $pK_a$  de 4,7, valor que corresponde a la ionización del anión acetato y no a la enzima libre o al sustrato, como otros autores sugieren <sup>(24)</sup>. Esta aseveración está sustentada por experimentos donde el mencionado valor  $K_m$  no se modifica al variar el pH, manteniendo constante la concentración del acetato. Efectos similares se ha observado en fosfatasa ácidas de próstata <sup>(24)</sup> e hígado humano <sup>(25)</sup>. Cuando se grafica  $-\log K_m$  en función del pH, cualquier modificación en la pendiente, en el sentido de incrementarse, se interpreta admitiendo que es debido a la ionización de un residuo de aminoácido en el complejo enzima-sustrato, mientras que toda variación en el sentido de disminuir el valor de la pendiente, se produce originada por la ionización de un residuo de aminoácido responsable de la catálisis, localizado en el sitio activo de la enzima, o podría corresponder al sustrato <sup>(1,2)</sup>.

Un análisis de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  utilizando los sustratos fenil fosfato y p-nitrofenil fosfato en tampón maleato o citrato en un rango de pH comprendido entre 3,8 y 6,8 indican que en el sitio activo de las fosfatasa ácidas existe un residuo de aminoácido con un valor  $pK_a$  de 6,0, que probablemente correspondería a la histidina. Es improbable que la ionización observada a pH 6,0 corresponda a uno de los sustratos utilizados, ya que el p-nitrofenil fosfato tiene un  $pK_a$  de 5,7 y el fenil fosfato un valor de 9,2, por cuyo motivo, las modificaciones en los valores de las pendientes ocasionadas por el pH deben estar localizadas en la enzima libre <sup>(26,27)</sup>.

Las fosfatasa ácidas motivo de la presente revisión son muy susceptibles a la presencia de metales pesados como el mercurio, el cual en concentraciones prácticamente estequiométricas, con relación a la enzima, tienen la propiedad de inhibirla completamente. Se tiene conocimiento que el mercurio reacciona muy rápidamente con los grupos sulfidrilo de las proteínas. En tal sentido, se consideró la posibilidad de que esta interacción podría ser la causante de la inhibición observada, lo que indujo a realizar algunos experimentos, para cuya finalidad se usó un reactivo que a pH 8,0 bloquea selectivamente los grupos sulfidrilo de las proteínas. La reacción de las fosfatasa ácidas con el reactivo ácido 5-5' ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) produce una completa inhibición de la enzima. La presencia del fosfato inorgánico en el medio de reacción ofrece cierta protección contra el efecto inhibitorio del DTNB <sup>(28)</sup>.

Cuando se mide la velocidad de reacción de los grupos sulfidrilo de la enzima, puede observarse que el primer grupo de los dos que posee la fosfatasa ácida de hígado de bovino reacciona con una velocidad mayor que la velocidad con que la enzima es inhibida por el DTNB. En cambio, el segundo grupo reacciona a una velocidad menor. Resultados similares fueron observados con la fosfatasa ácida de porcino <sup>(29)</sup>, lo que nos indica que los grupos sulfidrilo de estas fosfatasa son muy importantes para la actividad de la enzima, pero que no participarían directamente en el proceso de catálisis. La probable presencia de un grupo ionizable con un valor  $pK_a$  de 6,0 en el sitio activo de estas enzimas, induce a considerar que la histidina estaría implicada directamente en catálisis. Existen diversas formas de bloquear este residuo de aminoácido cuando se encuentra en una proteína, siendo el método más apropiado aquel que hace uso del dietilpirocarbonato (DEP), reactivo que a pH 6,0 reacciona selectivamente con el residuo histidina <sup>(30)</sup>.

De una manera análoga a los resultados obtenidos al estudiar el efecto inhibitorio del fosfato inorgánico o el efecto del pH sobre los valores de  $K_m$ , los cuales eran distorsionados por el tampón acetato, la interacción de la enzima con el DEP es afectada ostensiblemente por el tampón cacodilato, lo que motivó la necesidad de utilizar un tampón

distinto que no interfiriese con las reacciones que se pretendía analizar. La inhibición de las fosfatasa ácidas de bovino y porcino por el DEP obedece a una cinética de pseudo primer orden y es dependiente de la concentración del inhibidor. Un resultado poco frecuente es la desviación positiva que se obtiene al graficar los valores de las constantes aparentes de inhibición en función de la concentración del DEP, resultado que nos estaría indicando que la reacción es de un orden superior a una reacción de primer orden <sup>(31)</sup>.

La reacción anteriormente descrita es dependiente del pH. En tal sentido, si un residuo de histidina es requerido para la interacción de la enzima con el sustrato, entonces la velocidad de inhibición dependerá del estado de ionización de la histidina, residuo que estaría localizado en el sitio activo de la enzima. Un análisis de los resultados experimentales permite calcular un valor pKa de 6,7 para la enzima, que es coincidente con el valor pKa de los residuos de histidina en diversas enzimas. La presencia del fosfato inorgánico en el medio de reacción impide que el DEP inhiba a la enzima, efecto que es dependiente de la concentración del fosfato inorgánico, lo que permite calcular un valor  $K_i$  que es similar al obtenido bajo condiciones experimentales distintas. Estos resultados son corroborados por un experimento denominado cinética de inhibición múltiple, que consiste en observar la acción inhibitoria conjunta del fosfato inorgánico y del DEP <sup>(32)</sup>. Los resultados experimentales indican de una manera inobjetable que ambos compuestos interactúan en un mismo lugar: el sitio activo de la enzima. Finalmente, existe la posibilidad de que el sustrato proteja a la enzima del efecto inhibitor del DEP; la presencia del p-nitrofenil fosfato ejerce un efecto protector frente a la acción inhibitoria del DEP, experimento que permitió calcular un valor  $K_i$  para el DEP, que es coincidente al obtenido en otras condiciones experimentales <sup>(32)</sup>.

Los resultados descritos inducen a proponer un comportamiento cinético que puede hacerse extensivo para las fosfatasa ácidas de bajo peso molecular, el cual corresponde a un mecanismo uni biordenado, donde el sustrato se ligaría a la enzima originando un complejo intermedio de Michaelis-Menten, que sufriría un reordenamiento intramolecular,

liberando el primer producto que es de naturaleza alcohólica (fenol o p-nitrofenol) y la formación de un compuesto intermedio covalente enzima-fosfato, el que por hidrólisis se escindiría liberando el fosfato inorgánico y la enzima libre (Figura 1).

Los experimentos destinados a observar el efecto del pH sobre la catálisis sugieren que en el sitio activo de la enzima existe un residuo de aminoácido con un pKa de 6,2 que correspondería a la histidina, la que se encontraría en su forma protonada, hecho que le permitiría ceder su protón al sustrato, quedando de esta manera desprotonada, lo que facilitaría el ataque nucleofílico al sustrato, así como, la liberación del fenol o p-nitrofenol y la formación del intermedio covalente enzima-fosfato. Esta propuesta está sustentada por los resultados experimentales sobre la inhibición por productos, así como, aquellos relacionados con los nucleófilos y con la inhibición con DEP <sup>(5-7,22,23,32)</sup>. La formación del complejo covalente enzima-fosfato está sustentado por el efecto que tienen los nucleófilos metanol, etanol y glicerol sobre la catálisis, descartándose la probable formación de metafosfato, compuesto que reaccionaría de una manera no selectiva con los nucleófilos, originando productos con una relación de concentración similar a la mezcla utilizada. En una etapa ulterior, una molécula de agua escindiría el complejo enzima-fosfato, con la consiguiente liberación de fosfato inorgánico y enzima libre. Es necesario elucidar con mayor precisión la naturaleza íntima de estos procesos, cuyo conocimiento permitirá comprender mejor los mecanismos implicados en las reacciones químicas catalizadas por enzimas.

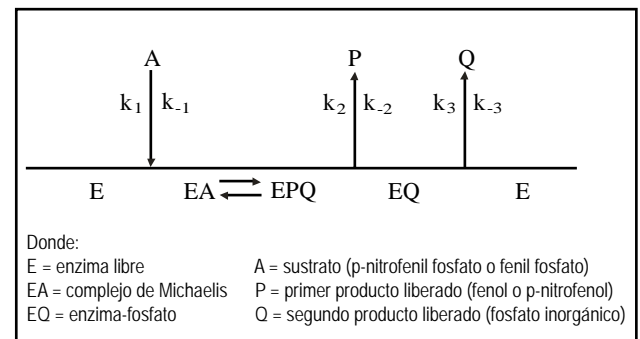


Figura 1. Modelo mecanístico de tipo uni-biordenado para la fosfatasa ácida de bajo peso molecular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Segel I. Enzyme kinetics. New York: John Wiley & Sons; 1975.
2. Fersht A. Estructura y mecanismo de los enzimas. Barcelona: Ed. Reverté SA; 1980.
3. Mathews C, van Holde KE, Ahorn K. Bioquímica. Madrid: Addison Wesley; 2002.
4. Ghose TK, Fiechter. Advances in Biochemical Engineering. Berlin: Spring-Verlag; 1971.
5. Arauco F. Fosfatasa ácida de bajo peso molecular de hígado de alpaca. Purificación y caracterización. Tesis para optar el grado de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 1992.
6. Haak H, Guija E, Soberón M. Mecanismo de acción de la fosfatasa ácida de hígado de bovino. Bol Soc Quím Perú. 1989;55(4):209-19.
7. Haak H, Guija E, Soberón M. Purificación y propiedades de la fosfatasa ácida de bajo peso molecular de hígado de cerdo. Bol Soc Quím Perú. 1993;59(3):149-57.
8. Shimada Y, Shinmyo A, Enatsu T. Purification and properties of one component of acid phosphatase produced by *Aspergillus niger*. Biochim Biophys Acta. 1977;480:417-27.
9. Hoehamer C, Mazur C, Wolfe N. Purification and partial characterization of an acid phosphatase from *Spirodela oligorrhiza* and its affinity for selected organophosphate pesticides. J Agric Food Chem. 2005;53(1):90-7.
10. Uehara H, Fujimoto S, Taniguchi T, Nakai H. Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato II. Enzymatic properties and amine acid composition. J Biochem. 1974;75:639-49.
11. Dipietro DL. Purification and properties of human placental acid phosphatase III. Biochim Biophys Acta. 1971;235:458-65.
12. Ostrowski W, Barnard E. Evidence for a phosphoryl-enzyme intermediate in the catalytic reaction of prostatic acid phosphatase. Biochemistry. 1973;12:3893-7.
13. Shibko S, Tappel AL. Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of the rat liver. Biochim Biophys Acta. 1963;73:76-86.
14. Strittmattes CF. Phosphatase activities of chicken liver and duodenum, characteristics level during development and hydrocortisone induced changes. Biochim Biophys Acta. 1972;284:183-95.
15. Nell MW, Horner MW. Studies on acid hydrolases in adult and foetal tissues. Acid p-nitrophenyl phosphate phosphohydrolases of adult guinea. Biochem J. 1964;92:217-24.
16. Heinrikson RL. Purification and characterization of low molecular weight acid phosphatase from bovine liver. J Biol Chem. 1969;244:299-318.
17. Chaimovich H, Nome F. Purification and properties of three acid phosphatases from bovine brain. Arch Biochem Biophys. 1970;139:9-16.
18. Igarashi M, Hollander VP. Acid phosphatase from rat liver. Purification characterization and properties. J Biol Chem. 1968;243:6084-9.
19. Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. J Am Chem Soc. 1934;56:658-66.
20. Hsu YR, Cleland WW, Anderson L. Mechanism of action of non specific phosphomonoesterase from potatoes. Biochemistry. 1966;5:799-807.
21. Baldijao CE, Guija E, Bittencourt HMS, Chaimovich H. Steady state kinetics and effect of SH inhibitors on acid phosphatase from bovine brain. Biochim Biophys Acta. 1975;391:316-25.
22. Haak H, Guija E. Efecto del glicerol sobre la catálisis por la fosfatasa ácida de hígado de bovino. Bol Soc Quím Perú. 1993;59(1):31-7.
23. Guija E, Haak H, Soberón M. Efecto de nucleófilos sobre la catálisis por fosfatasa ácida de hígado de porcino. Rev Acad Per Farm. 1994;9(1):7-14.
24. Van Etten RL, Mc Tighe J. pH dependence and solvent isotope effects in the hydrolysis of phosphomonoesters by human prostatic acid phosphatase. Biochim Biophys Acta. 1977;484:386-97.
25. Saini M, Van Etten RL. A homogeneous isoenzyme of human liver acid phosphatase. Arch Biochem Biophys. 1978;191:613-24.
26. Guija E, Haak H, Soberón M. Efecto del pH sobre la catálisis por fosfatasa ácida de hígado de bovino. Anal Acad Per Farm. 1993;8(1):14-7.
27. Soberón M, Haak H, Guija E. Influencia del pH sobre la hidrólisis de fosfomonoésteres, catalizada por fosfatasa ácida de hígado de porcino. Bol Soc Quím Perú. 1995;61(1):13-9.
28. Haak H, Ochoa V, Guija E. Reactividad y función de los grupos sulfhidrilos de la fosfatasa ácida de hígado de bovino. Bol Soc Quím Perú. 1991;57(3):160-4.
29. Haak H, Guija E, Soberón M. Modificación química de la fosfatasa ácida de hígado de porcino por el DTNB. Bol Soc Quím Perú. 1996;62(2):57-65.
30. Taga E, Van Etten RL. Human liver acid phosphatases: Purification and properties of a low molecular weight isoenzyme. Arch Biochem Biophys. 1982;214:505-15.
31. Haak H, Guija E, Soberón M. Reactividad de la histidina de la fosfatasa ácida de bajo peso molecular de hígado de porcino. Bol Soc Quím Perú. 1997;63(3):162-70.
32. Soberón M. Acción de la histidina en el mecanismo catalítico de la fosfatasa ácida de bajo peso molecular de hígado de bovino. Tesis para optar el título de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 1987.

Manuscrito recibido el 17 de octubre de 2007 y aceptado para publicación el 13 de diciembre de 2007.

Correspondencia:  
Dr. Emilio Guija Poma  
Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición.  
Facultad de Medicina, UNMSM  
Av. Grau 755. Lima 1, Perú  
Correo-e: eguijap@hotmail.com