



PROYECTO DE GRADO

Presentado ante la ilustre UNIVERSIDAD DE LOS ANDES como requisito parcial para
obtener el Título de INGENIERO DE SISTEMAS

MODELADO MATEMÁTICO DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA ALFA AMILASA SALIVAL HUMANA

Por

Br. Jorge Esteban De Mesa Álvarez

Tutor: Prof. Jormany Quintero

Cotutor: Prof. Yuliana Cols G.

Julio 2017

©2017 Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Modelado matemático de la reacción enzimática de la alfa amilasa salival humana

Br. Jorge Esteban De Mesa Álvarez

Proyecto de Grado — Control y Automatización, 53 páginas
Escuela de Ingeniería de Sistemas, Universidad de Los Andes, 2017

Resumen: Desde que se introduce el alimento a la boca, se toma una bocanada de aire o se mueve un músculo, cientos de procesos se ponen en marcha; dentro de los seres humanos hay una inmensa maquinaria funcionando que digiere, absorbe nutrientes y expulsa desechos con el fin de mantener su funcionamiento óptimo. Así se ve la necesidad de representar mediante modelos matemáticos específicos estos procesos fisiológicos, con el fin de entender cómo actúa dicho sistema en condiciones normales y en caso que se genere un trastorno, poder solucionarlos desde otro enfoque. Este estudio se centra en encontrar un modelo matemático para comprender el comportamiento de la concentración de la enzima Alfa Amilasa Salival Humana (AASH), enzima de origen proteico, vital en el proceso digestivo en los seres humanos, para así dejar un precedente validado del comportamiento de la reacción, y servir para futuros estudios en el ámbito fisiológico.

Palabras clave: Modelado, Enzima, Cinética, Bioquímica.

Este trabajo fue procesado en L^AT_EX.

Índice

Índice de Tablas	v
------------------	---

Índice de Figuras	vi
-------------------	----

Agradecimientos	viii
-----------------	------

1 Introducción	1
-----------------------	----------

1.1 Antecedentes	2
----------------------------	---

1.2 Planteamiento del problema	4
--	---

1.3 Justificación	5
-----------------------------	---

1.4 Alcance	5
-----------------------	---

1.5 Objetivos	6
-------------------------	---

1.5.1 Objetivo general	6
----------------------------------	---

1.5.2 Objetivos específicos	6
---------------------------------------	---

1.6 Metodología	6
---------------------------	---

1.7 Estructura del documento	7
--	---

2 Descripción del sistema y conceptos básicos	8
--	----------

2.1 Enzimas	8
-----------------------	---

2.2 Alfa amilasa salival humana	9
---	---

2.2.1 La amilasa salival	10
------------------------------------	----

2.2.2 Variación genética en la amilasa salival humana	11
---	----

2.3 Cinética enzimática	12
-----------------------------------	----

2.3.1 Principios generales	12
--------------------------------------	----

2.3.2 Ensayos enzimáticos	13
-------------------------------------	----

2.3.3	Factores que afectan la reacción	14
2.4	Ley de acción de masas	17
2.5	Cinética de Michaelis-Menten	18
2.6	Cavidad bucal	19
2.7	Modelado Matemático	20
2.8	Descripción del Modelo	21
3	Desarrollo del modelo	24
3.1	Cinética enzimática	24
3.2	Reacción básica de la enzima	25
3.3	La aproximación de equilibrio	28
3.4	Obtención de las constantes	30
3.4.1	Experimentos	30
3.4.2	Cálculo de las constantes	31
4	Validación del modelo	38
4.1	Simulaciones	38
4.2	Validación	42
5	Conclusiones y recomendaciones	45
5.1	Conclusiones	45
5.2	Recomendaciones	46
	Bibliografía	47
A	Experimentos	49
A.1	Experimento 1	51
A.2	Experimento 2	52

Índice de Tablas

3.1	Vectores de velocidad y concentración.	32
4.1	Valores experimentales y simulados del sustrato.	43

www.bdigital.ula.ve

Índice de Figuras

2.1	Estructura atómica de la AASH	10
2.2	Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la pepsina y amilasa. . .	14
2.3	Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en una enzima típica humana y una bacteria termófila.	15
2.4	Desnaturalización de una proteína	16
2.5	Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.	17
2.6	Reacción enzimática típica.	22
2.7	Diagrama de bloques del modelo.	23
3.1	Gráfica de velocidad de reacción y concentración del sustrato	32
3.2	Gráfica de Michaelis Menten aproximada del modelo	33
3.3	Comparación de la gráfica simulada y la experimental de Michaelis Menten	34
3.4	Variando los valores de K_1	35
3.5	Variando los valores de K_{-1}	36
4.1	Comparación del experimento con la simulación del modelo obtenido .	39
4.2	Comportamiento de los estados	40
4.3	Comportamiento de los estados a 1600 segundos	41
4.4	Comportamiento de los estados a 15000 segundos	41
4.5	Simulación del comportamiento de la reacción para cada uno de los pacientes	42
A.1	Muestras de saliva.	49
A.2	Kit para el experimento (Labtest)	50

A.3	Espectrofotómetro StatFax 1904 plus	50
A.4	Tiras de medición	51
A.5	Muestras luego del experimento	51

www.bdigital.ula.ve

Agradecimientos

A mis padres Yginia y Vicente como una muestra de amor y agradecimiento por todo el apoyo brindado.

A mis hermanos Oriana y Juan, por su apoyo brindado durante la elaboración del proyecto.

A toda mi hermosa familia por su apoyo incondicional.

A mis tutores Jormany y Yuliana por su dedicación, disposición, atención, ayuda y colaboración brindada para la realización de este proyecto, muchísimas gracias profe.

Especialmente a la profesora Katusca por su apoyo, consejos, dedicación y disponibilidad para la elaboración y culminación del proyecto.

A mi amigo Daniel por su ayuda, colaboración y consejos brindados durante la elaboración del proyecto.

A mi compañera Paola por su apoyo, consejos, dedicación para la elaboración y culminación del proyecto.

A mis amigas Cristy y Cristina por su apoyo y colaboración durante la elaboración del proyecto y presentación.

A mis amigos Miguelangel, Luis, Hector y Breytner por su apoyo y colaboración durante la elaboración del proyecto.

Y a todos aquellos que de alguna forma ayudaron y participaron en la culminación de este proyecto.

Y especialmente a Dios por acompañarme, ayudarme y bendecirme cada día.

Capítulo 1

Introducción

En los últimos tiempos los avances tecnológicos han hecho posible el diseño de modelos que permiten representar el comportamiento de procesos complejos. Por ejemplo, en el deporte se han desarrollado métodos que han logrado aumentar el desempeño y la precisión de los atletas; en la medicina, se pueden diagnosticar y tratar patologías que en años anteriores eran desconocidas o muy complicadas de abordar por falta de conocimientos tecnológicos, mientras que en otras áreas derivadas de la medicina, como lo son los sistemas fisiológicos, todavía se desconocen características relevantes sobre su funcionamiento que han dificultado su estudio.

Refiriéndose a los sistemas fisiológicos, un punto crucial para el estudio de estos, es el desconocimiento de su funcionamiento no patológico. Se reconocen los síntomas de las enfermedades y cómo tratarlas, pero hasta ahora no se sabe explicar el funcionamiento en condiciones normales del organismo. Se tiene conocimiento de los procesos que tienen lugar, pero hasta ahora no del porqué se dan los mismos, ni qué alteraciones se producirían si se modificaran (Ferrairó, 2005).

Mediante el presente estudio se pretende encontrar un modelo matemático aproximado de la enzima Alfa Amilasa Salival Humana (AASH) que simule su comportamiento para de esta manera comprender los fenómenos que actúan sobre ella, ya que, en el campo de la ingeniería, los sistemas fisiológicos son una gran incógnita debido a la complejidad que presenta el estudio de su comportamiento.

Inicialmente, para organizar la información y validar los conocimientos en el área,

se pretende construir un modelo matemático del sistema a estudiar, en este caso, sobre la reacción de la AASH en la saliva, partiendo de un modelo generalizado del comportamiento de las enzimas. A través de dicho modelo se podrá describir la dinámica, comprobar el correcto funcionamiento y permitir futuros avances en este campo.

1.1 Antecedentes

A finales del siglo XVII y comienzos del siglo XVIII, se conocía la digestión de la carne por las secreciones estomacales y la conversión del almidón en azúcares por extractos de plantas y saliva, pero no se habían identificado los mecanismos por los cuales éstos ocurrían.

El químico francés Anselme Payen fue el primero en descubrir una enzima, diastasa, en 1833. Unas décadas más tarde, al estudiar la fermentación del azúcar con alcohol por levadura, Louis Pasteur concluyó que esta fermentación fue causada por una fuerza vital contenida dentro de las células de levadura llamadas “fermentos”, que se pensaba que funcionaban sólo dentro de los organismos vivos. Escribió que “la fermentación alcohólica es un acto correlacionado con la vida y la organización de las células de levadura, no con la muerte o la putrefacción de las células”.

Berzelius, en 1837, postula que la enzima es un catalizador.

En 1877, el fisiólogo alemán Wilhelm Kühne (1837-1900) utilizó por primera vez el término enzima, que viene del griego “leudado” o “en levadura”, para describir este proceso. La palabra enzima se utilizó más tarde para referirse a sustancias no vivas como la pepsina, y la palabra fermento se utilizó para referirse a la actividad química producida por los organismos vivos.

De esta manera, en 1882 se introdujo el concepto del complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis enzimática. Varias teorías fueron establecidas en esta época y se desarrollaron conceptos que resultaron decisivos en la evolución del campo de la bioquímica.

En 1902, Víctor Henri propuso una teoría cuantitativa de la cinética enzimática, pero en el momento no se conocía todavía la importancia experimental de la concentración de iones hidrógeno.

Después de que Peter Lauritz Sorensen definiera la escala logarítmica del pH e introdujera el concepto de amortiguación en 1909, la química alemana Leonor Michaelis y su posdoctor canadiense Maud Leonora Menten repitieron los experimentos de Henri y confirmaron su ecuación, Minent cinética o como famosamente se conoce cinética de Henri-Michaelis-Menten. Su trabajo fue desarrollado posteriormente por G. E. Briggs y J. B. S. Haldane, quienes derivaron ecuaciones cinéticas que todavía se consideran ampliamente hoy en día como un punto de partida en el modelado de la actividad enzimática.

La principal contribución del enfoque de Henri-Michaelis-Menten fue pensar en las reacciones enzimáticas en dos etapas. En la primera, el sustrato se une de forma reversible a la enzima, formando el complejo enzima-sustrato. Esto a veces se llama el complejo de Michaelis. La enzima luego cataliza la etapa química en la reacción y libera el producto. La cinética de muchas enzimas es descrita adecuadamente por el modelo simple de Michaelis-Menten, pero todas las enzimas tienen movimientos internos que no se explican en el modelo y pueden tener contribuciones significativas a la cinética de reacción total. Esto puede ser modelado introduciendo varias vías de Michaelis-Menten que están conectadas con las tasas fluctuantes, que es una extensión matemática del mecanismo básico de Michaelis Menten.

En 1913 los estudios de Michaelis-Menten describen como varía la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas de acuerdo a la concentración de sustrato. A partir de ese momento se construyen las bases para que las nuevas generaciones de investigadores realizarán importantes aportes, lo cual contribuye a la consolidación definitiva de la cinética enzimática.

La identidad bioquímica de las enzimas era aún desconocida a principios del siglo XX. Muchos científicos observaron que la actividad enzimática estaba asociada con proteínas, pero otros, como el premio Nobel Richard Willstätter, argumentaron que las proteínas eran simplemente portadoras de las verdaderas enzimas y que las proteínas en sí eran incapaces de catálisis. En 1926, James B. Sumner demostró que la enzima ureasa era una proteína pura y la cristalizó; lo mismo hizo para la enzima catalasa en 1937. La conclusión de que las proteínas puras pueden ser enzimas fue demostrada definitivamente por John Howard Northrop y Wendell Meredith Stanley, que trabajó

en las enzimas digestivas pepsina (1930), tripsina y quimotripsina. Estos tres científicos recibieron el Premio Nobel de Química en 1946.

El descubrimiento de que las enzimas podrían ser cristalizadas eventualmente permitió que sus estructuras fueran resueltas por cristalografía de rayos X. Esto se hizo primero para la lisozima, una enzima que se encuentra en las lágrimas, la saliva y las claras de huevo que digiere el recubrimiento de algunas bacterias; la estructura fue resuelta por un grupo dirigido por David Chilton Phillips y publicado en 1965. Esta estructura de alta resolución de la lisozima marcó el comienzo del campo de la biología estructural y el esfuerzo para entender cómo funcionan las enzimas a un nivel atómico de detalle.

Para el año 2006 Jennifer McDowall realizó estudios sobre la estructura, usos y potencial de la AASH, en campos como la medicina, agricultura y fabricación de alimentos.

En la actualidad se han tratado de desarrollar modelos para explicar los distintos procesos bioquímicos del organismo, dentro de estos estudios destacan los modelos matemáticos de la cinética de reacción enzimática (Vazquez, 2008), en el cual se describen en forma general el modelo matemático de cualquier reacción enzimática.

Las últimas investigaciones con respecto a esta enzima fueron realizadas en el 2013 por Claudia Lamby, en las que ella declaró las propiedades beneficiosas del AASH sobre la salud humana, su papel protector de las superficies dentales, cuando su concentración es alta y su implicación en la formación de una placa dentobacteriana.

Sin embargo hay pocos estudios especializados sobre los distintos tipos de enzimas existentes.

1.2 Planteamiento del problema

Es posible representar todo proceso que se lleva a cabo en el organismo mediante modelos matemáticos aproximados o específicos. Todo proceso que se lleva a cabo en el organismo se pudiera representar mediante modelos matemáticos específicos, con el fin de entender cómo actúa normalmente dicho sistema. El proceso de la digestión empieza por la acción de la AASH degradando los alimentos que generalmente están

formados por compuestos que no se asimilan y que se deben transformar en cuerpos solubles en el agua para poder ser ingeridos y absorbidos en el tubo digestivo.

La AASH no solo es importante en el proceso digestivo, es la enzima de origen proteico de mayor abundancia en la saliva, además de que cumple funciones biológicas relevantes. A pesar de que se han hecho muchos estudios en dicha enzima, aún no se tiene claro su rol protector en el proceso de caries dental así como el mantenimiento de la inmunidad de las mucosas. Sin embargo, el presente estudio tiene la finalidad de obtener un modelo matemático que permita entender la fisiología de la enzima, dada que en investigaciones recientes no se han realizado modelos de este tipo sobre la reacción de la AASH.

Es por esta razón que se pretende desarrollar y validar un modelo matemático de la reacción enzimática de la AASH, para contribuir con un estudio en el ámbito médico, bioquímico y odontológico.

1.3 Justificación

Se han encontrado numerosos trabajos que describen el comportamiento de las enzimas en general, aunque son muy escasas las investigaciones que se traten de la AASH, por ello, se desea realizar un modelo matemático que pretende describir de manera más precisa el funcionamiento de la AASH, dado su importante papel en el proceso, su comportamiento en la reacción enzimática. La obtención de un modelo de este tipo, deja un precedente validado del comportamiento de la reacción, servirá para establecer la importancia de la relación entre la AASH y las caries, además de servir para futuros estudios en el ámbito bioquímico, a través de la conexión entre la ingeniería de sistemas y la bioquímica. Los temas de estudio que se abordan para realizar esta investigación fueron la fisiología, la cinética enzimática y la ingeniería de control.

1.4 Alcance

Obtener un modelo matemático lo más cercano posible a la reacción de la AASH dentro de la cavidad bucal.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Desarrollar y validar el modelo matemático de la reacción de la alfa amilasa salival humana (AASH).

1.5.2 Objetivos específicos

1. Realizar una revisión del funcionamiento fisiológico y químico de la AASH.
2. Comprender la teoría cinética de las enzimas.
3. Entender la teoría dinámica de las enzimas.
4. Describir detalladamente el sistema.
5. Identificar las variables físicas y químicas que se encuentran en la reacción enzimática.
6. Desarrollar el modelo.
7. Realizar pruebas para validar el modelo.
8. Analizar los resultados obtenidos y establecer las conclusiones.

1.6 Metodología

Para el cumplimiento de los objetivos establecidos se ejecutaron las siguientes fases:

- Investigar mediante lectura de material bibliográfico, impreso o digital, entrevistas, las características de la AASH.
- Estudiar a través de la literatura especializada y estudios realizados, los métodos potenciales a utilizar.
- Identificar las variables físicas y químicas que se encuentran en la reacción enzimática.

- Desarrollar el modelo matemático de la AASH.
- Realizar pruebas para validar el modelo.
- Analizar los resultados obtenidos y establecer las conclusiones.

1.7 Estructura del documento

El desarrollo del proyecto se llevará a cabo a través de cinco (5) capítulos, desglosados de la siguiente forma: Capítulo 1, en el cuál se desarrolla el planteamiento del problema, justificación, objetivos, alcances, limitaciones y antecedentes; Capítulo 2, “Descripción del sistema y conceptos”, donde se explican brevemente los términos a utilizar; Capítulo 3, “Desarrollo del modelo” en este capítulo se describen todos los pasos necesarios para obtener el modelo matemático; el Capítulo 4, “Validación del Modelo” se comparan las simulaciones con los experimentos para validar el comportamiento de la enzima; el Capítulo 5, donde se redactan las conclusiones y recomendaciones de la investigación.

Capítulo 2

Descripción del sistema y conceptos básicos

En este capítulo se presenta un conjunto de conceptos teóricos, los cuales son necesarios para comprender los principios básicos de las reacciones enzimáticas. Primeramente se debe comprender el entorno en el que se desarrolla dicha reacción, luego los factores que intervienen, las propiedades de la enzima estudiada y finalmente las variables involucradas. Por lo tanto se comienza desde los conceptos más importantes que engloban la reacción, como lo son las enzimas.

2.1 Enzimas

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, siempre que sean termodinámicamente posibles. Las enzimas son catalizadores, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. Ello hace posible que en condiciones fisiológicas normales tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH, Blass (1989).

En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. Debido a que las enzimas son extremadamente selectivas con sus sustratos y su velocidad crece

solo con algunas reacciones, el conjunto de enzimas presentes en una célula determina el tipo de metabolismo que tiene esa célula. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas.

Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación de una reacción, de forma que la presencia de la enzima acelera sustancialmente la tasa de reacción. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, pero consiguen acelerar el proceso incluso en escalas de millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más deprisa que la correspondiente reacción no catalizada, Bairoch A. (2000).

2.2 Alfa amilasa salival humana

La alfa-amilasa salival humana (AASH), es un componente principal de la saliva humana, juega un papel en la digestión inicial del almidón y puede estar implicada en la colonización de bacterias implicadas en la formación temprana de la placa dental. La estructura atómica tridimensional de la amilasa salival ha sido determinada para comprender las relaciones estructura-función de esta enzima, (figura 2.1). Esta estructura se refinó hasta un valor R de 18,4% con 496 restos aminoácidos, un ion calcio, un ion cloruro y 170 moléculas de agua.

La amilasa salival se pliega en una estructura multidominio que consta de tres dominios, A, B y C. El dominio A tiene una estructura de 8 barriles, el dominio B no tiene topología definida y el dominio C tiene una clave griega Barril. El ion Ca^{2+} está unido a *Asn*¹⁰⁰, *Arg*¹⁵⁸, *Asp*¹⁶⁷, *His*²⁰¹ y tres moléculas de agua. El ion de *Cl* está unido a *Arg*¹⁹⁵, *Asn*²⁹⁸ y *Arg*³³⁷ y una molécula de agua. El bucle 304-310 rico en glicina, altamente móvil, puede actuar como una puerta de enlace para la unión del sustrato y estar implicado en un mecanismo de “liberación de trampa” en la hidrólisis de los sustratos.

La colocación estratégica de iones de calcio y cloruro, así como residuos de histidina y triptófano puede desempeñar un papel en la diferenciación entre los extremos de glicona y aglicona de los sustratos de polisacárido. La AASH también posee un sitio

adecuado para la unión a superficies de esmalte y proporciona sitios potenciales para la unión de adhesinas bacterianas.

La AASH es una enzima proteica *EC3.2.1.1* que hidroliza enlaces alfa de polisacáridos grandes ligados alfa, tales como almidón y glucógeno, que producen glucosa y maltosa. Es la forma principal de la amilasa encontrada en seres humanos y otros mamíferos. También está presente en semillas que contienen almidón como reserva alimentaria, y es secretada por muchos hongos, (BRENDA-ENZIMES, enero 2017).



Figura 2.1: Estructura atómica de la AASH

Aunque se encuentra en muchos tejidos, la alfa amilasa es más prominente en el jugo pancreático y la saliva, cada uno de los cuales tiene su propia isoforma. Se comportan de manera diferente en el enfoque isoelectrico, y también pueden separarse en las pruebas mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos. En los seres humanos, todas las isoformas de amilasa se unen al cromosoma 1p2.

2.2.1 La amilasa salival

La amilasa se encuentra en la saliva y rompe el almidón en maltosa y dextrina. Esta forma de amilasa también se llama ptalina. Se rompen grandes moléculas de almidón insoluble en almidones solubles (amilodextrina, eritrodextrina y achrodextrina) que producen almidones sucesivamente más pequeños y en última instancia maltosa. La

ptalina actúa sobre enlaces (1,4) glicosídicos lineales, pero la hidrólisis del compuesto requiere una enzima que actúa sobre productos ramificados. La amilasa salivar es inactivada en el estómago por ácido gástrico. En el jugo gástrico ajustado a pH 3,3, la ptalina se inactivó totalmente en 20 minutos a 37°C. Por el contrario, el 50% de la actividad amilasa permanecía después de 150 minutos de exposición al jugo gástrico a pH 4,3. Tanto el almidón, el sustrato para ptalina, como el producto (cadenas cortas de glucosa) son capaces de protegerlo parcialmente contra la inactivación por ácido gástrico, (BRENDA-ENZIMES, enero 2017).

En resumen el pH óptimo para la AASH es 7.0 a temperatura del cuerpo humano 37°C, con una presencia de ciertos aniones y activadores como el cloruro que la hacen más eficaz, a diferencia del ioduro, sulfato y fosfato que hacen menos efectiva la acción de la enzima.

2.2.2 Variación genética en la amilasa salival humana

El gen de la amilasa salival ha sufrido duplicación durante la evolución, y los estudios de hibridación de ADN indican que muchos individuos tienen múltiples repeticiones del gen. El número de copias del gen se correlacionan con los niveles de amilasa salival, medido mediante ensayos de transferencia de proteína usando anticuerpos contra la amilasa humana. El número de copias génicas se asocia con una aparente exposición evolutiva a dietas de alto contenido de almidón. Por ejemplo, un individuo japonés tenía 14 copias del gen de la amilasa (un alelo con 10 copias, y un segundo alelo con cuatro copias). La dieta japonesa ha contenido tradicionalmente grandes cantidades de almidón de arroz. En contraste, un individuo de Biaka llevaba seis copias (tres copias en cada alelo). Los Biaka son cazadores-recolectores de selva tropical que tradicionalmente han consumido una dieta baja en almidón. Perry y sus colegas especularon que el aumento del número de copias del gen de la amilasa salival puede tener supervivencia mejorada coincidiendo con un cambio a una dieta almidonada durante la evolución humana, Perry (2007).

2.3 Cinética enzimática

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas. El estudio de la cinética y de la dinámica química de una enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por fármacos o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas.

Las enzimas, en su mayoría, son proteínas con la capacidad de manipular otras moléculas sin ser alterados por la reacción, esas moléculas son denominadas sustratos. Un sustrato es capaz de unirse al sitio activo de la enzima que lo reconozca y transformarse en un producto a lo largo de una serie de pasos denominados mecanismo enzimático. Aunque todos estos mecanismos suelen seguir una compleja serie de pasos, también suelen presentar una etapa limitante que determina la velocidad final de toda la reacción.

El conocimiento adquirido acerca de la estructura de las enzimas ha sido de gran ayuda en la visualización e interpretación de los datos cinéticos. Por ejemplo, la estructura puede sugerir cómo permanecen unidos sustrato y producto durante la catálisis, qué cambios conformacionales ocurren durante la reacción. Algunas enzimas modifican su conformación significativamente durante la reacción, en cuyo caso, puede ser crucial saber la estructura molecular de la enzima con y sin sustrato unido.

2.3.1 Principios generales

La reacción química catalizada por una enzima utiliza la misma cantidad de sustrato y genera la misma cantidad de producto que una reacción no catalizada. Al igual que ocurre en otros tipos de catálisis, las enzimas no alteran en absoluto el equilibrio de la reacción entre sustrato y producto. La eficiencia de la reacción, hasta el momento en que todos los sitios posibles estén ocupados. En ese momento se habrá alcanzado el punto de saturación de la enzima y, aunque se añada más sustrato, no aumentará más la eficiencia, Ebbing (1997).

2.3.2 Ensayos enzimáticos

Un ensayo enzimático es un procedimiento, llevado a cabo en un laboratorio, mediante el cual se puede medir la velocidad de una reacción enzimática. Como las enzimas no se consumen en la reacción que catalizan, los ensayos enzimáticos suelen medir los cambios experimentados bien en la concentración de sustrato (que va decreciendo), bien en la concentración de producto (que va aumentando).

Existen diversos métodos para realizar estas medidas. La espectrofotometría permite detectar cambios en la absorbancia de luz por parte del sustrato o del producto (según la concentración de estos) y la radiometría implica incorporación o liberación de radiactividad para medir la cantidad de producto obtenido por tiempo.

Los ensayos espectrofotométricos son los más utilizados, ya que permiten medir la velocidad de la reacción de forma continua. Por el contrario, los ensayos radiométricos requieren retirar las muestras para medirlas, por lo que son ensayos discontinuos. Sin embargo, estos ensayos son extremadamente sensibles y permiten detectar niveles muy bajos de actividad enzimática. También se puede utilizar la espectrometría de masas para detectar la incorporación o liberación de isótopos estables cuando el sustrato es convertido en producto.

Los ensayos enzimáticos más sensibles utilizan láseres dirigidos a través de un microscopio para observar los cambios producidos en enzimas individuales cuando catalizan una reacción. Estas medidas pueden utilizar cambios producidos en la fluorescencia de cofactores que intervienen en el mecanismo de catálisis o bien unir moléculas fluorescentes en lugares específicos de la enzima, que permitan detectar movimientos ocurridos durante la catálisis. Estos estudios están dando una nueva visión de la cinética y la dinámica de las moléculas individuales, en oposición a los estudios de cinética enzimática tradicionales, en los que se observa y se mide el comportamiento de una población de millones de moléculas de enzima.

Inicialmente, la enzima transforma el sustrato en producto siguiendo un comportamiento lineal. A medida que avanza la reacción, se va agotando la cantidad de sustrato y va disminuyendo la cantidad de producto que se genera por unidad de tiempo (disminuye la velocidad de la reacción), lo que se manifiesta en forma de curva asintótica en la gráfica. Dependiendo de las condiciones del ensayo y del tipo de enzima,

el período inicial puede durar desde milisegundos hasta horas. Los ensayos enzimáticos suelen estar estandarizados para que el período inicial dure en torno a un minuto, para llevar a cabo las medidas más fácilmente. Sin embargo, los modernos equipos de mezcla rápida de líquidos permiten llevar a cabo medidas cinéticas de períodos iniciales cuya duración puede llegar a ser inferior a un segundo.

La mayoría de los estudios de cinética enzimática se centran en el período inicial, es decir, en la zona lineal de la reacción enzimática. Sin embargo, también es posible medir toda la curva de la reacción y ajustar estos datos a una ecuación no lineal. Esta forma de medir las reacciones enzimáticas es denominada análisis de la curva de progreso. Esta aproximación es muy útil como alternativa a las cinéticas rápidas, cuando el período inicial es demasiado rápido para ser medido con precisión.

2.3.3 Factores que afectan la reacción

Efecto del pH

La intensidad máxima de la actividad de la enzima, ocurre en el pH óptimo, con rápida disminución de la actividad a cada lado de este valor de pH. La actividad óptima generalmente se observa entre los valores de 5 y 9, (figura 2.2). Recuperado de <http://blogdebiologia.com>

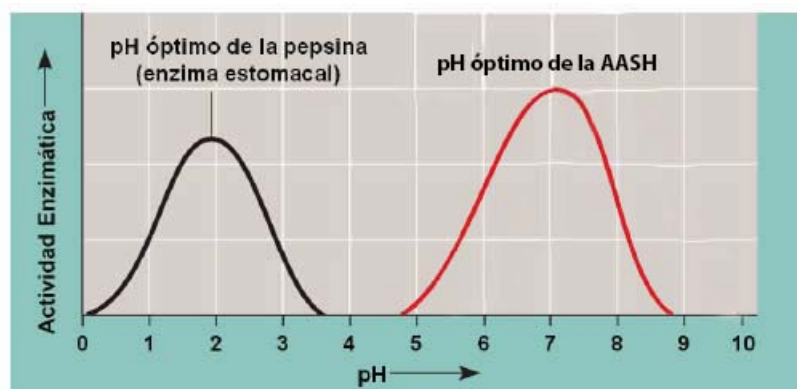


Figura 2.2: Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la pepsina y amilasa.

El pH óptimo de una enzima puede guardar relación con cierta carga eléctrica de la superficie, o con condiciones óptimas para la fijación de la enzima a su sustrato. Cuando

hay un exceso de iones hidrógeno, las enzimas los unen a sus moléculas y ante un déficit los ceden. Este cambio tiene una doble consecuencia sobre la molécula. Como todas las proteínas, las enzimas desempeñan su función por los residuos de aminoácidos; algunos confieren a su superficie una distribución de cargas eléctricas.

Cuando la concentración de iones hidrógeno es muy baja en comparación con la concentración óptima, la molécula los cede desapareciendo cargas positivas o apareciendo cargas negativas en su superficie. Ante una concentración elevada de iones hidrógeno, algunos se fijan a la molécula desapareciendo cargas (-) o poniendo cargas (+) que no existían.

Así mismo al cambiar las cargas eléctricas en los residuos de aminoácidos se alteran los lazos de unión dentro de la molécula variando su acomodo tridimensional con recuperación de la actividad de la enzima. Las enzimas actúan dentro de límites estrechos de pH. En medios muy ácidos o muy alcalinos, la enzima se desnaturaliza y se inactiva. La mayoría de los enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad.

Temperatura

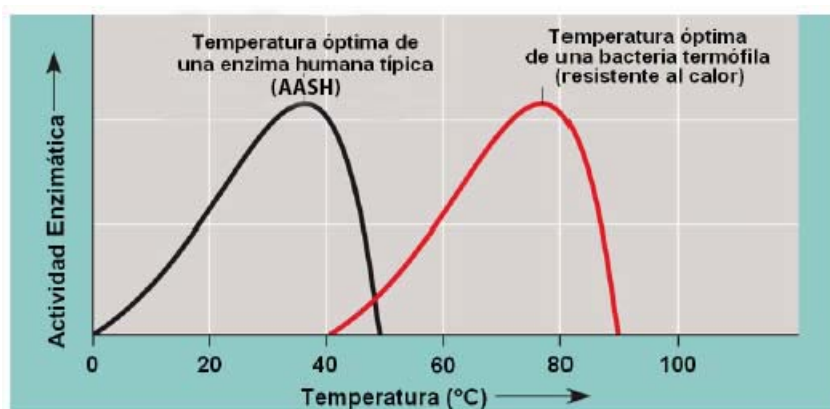


Figura 2.3: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en una enzima típica humana y una bacteria termófila.

La velocidad de las reacciones enzimáticas aumenta, por lo general, con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y activa. La velocidad por lo general se duplica por cada 10°C de aumento térmico. La actividad enzimática máxima se alcanza a una temperatura óptima, luego la actividad decrece y finalmente cesa por completo a causa de la desnaturalización progresiva de la enzima por acción de la temperatura, (figura 2.3). Recuperado de <http://blogdebiologia.com>

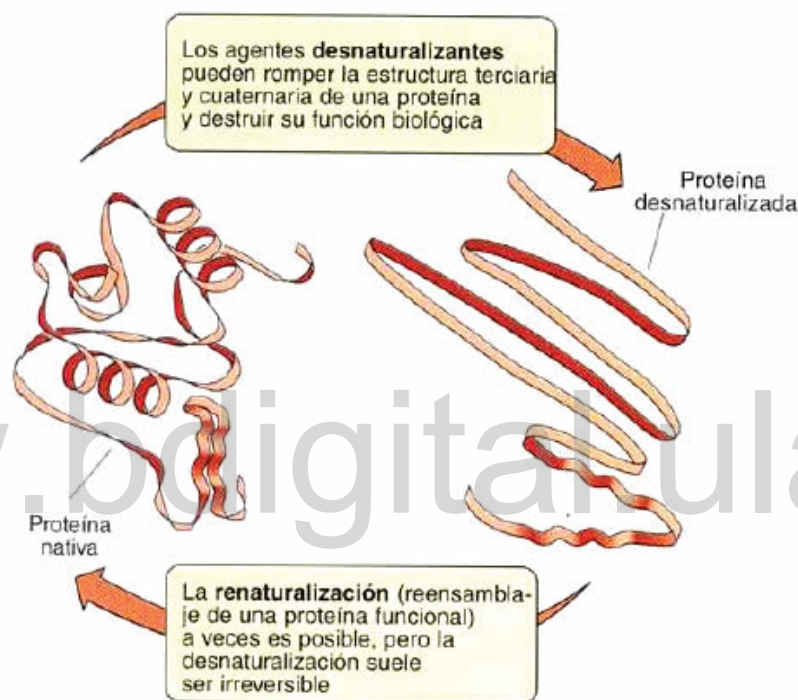


Figura 2.4: Desnaturalización de una proteína

A bajas temperaturas, las reacciones disminuyen mucho o se detienen porque decrece la cinética molecular, pero la acción catalítica reaparece cuando la temperatura se eleva a valores normales para la enzima. Es preciso recordar que una enzima humana típica posee su óptimo a 37 ° C. Los agentes desnaturalizantes pueden romper la estructura de una proteína, la renaturalización a veces es posible, pero la desnaturalización es irreversible, (figura 2.4). Recuperado de <http://blogdebiologia.com>

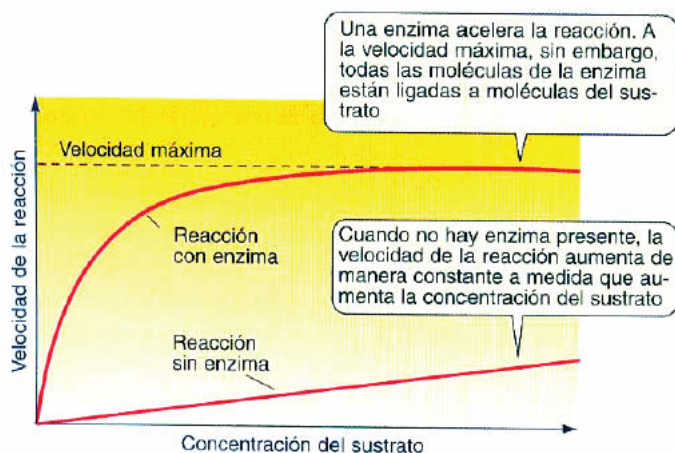


Figura 2.5: Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.

Concentración de sustrato

Principalmente, la velocidad de la reacción o catálisis varía de acuerdo a la concentración del sustrato. Al aumentar la concentración de sustrato, la actividad enzimática aumenta, hasta alcanzar la velocidad máxima, punto donde la enzima se satura, debido a que las enzimas tienen todos sus sitios activos ocupados (Figura 2.5). Recuperado de <http://blogdebiologia.com>

2.4 Ley de acción de masas

La ley de acción de masas es una generalización de la expresión de la constante de equilibrio K_1 para cualquier tipo de reacciones. La expresión de esta ley fundamental fue propuesta en 1864 por los químicos noruegos Cato Maximillian Guldberg (1836-1902) y Peter Waage (1833-1900), basándose en el estudio experimental de numerosas reacciones reversibles y en los trabajos del químico francés Claude Louis Berthelot (1748-1822) sobre la cinética de las reacciones químicas. Consideremos una reacción reversible general:



donde A y B son los reactivos, C y D son los productos a , b , c y d son los coeficientes estequiométricos en la ecuación química balanceada.

Según ley del equilibrio químico o la ley de acción de masas o las concentraciones en una mezcla en equilibrio están relacionadas por la siguiente ecuación del equilibrio:

$$K_c = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} . \quad (2.2)$$

Esta expresión permite determinar las concentraciones molares de los reactivos y productos en el equilibrio. Esta constante es característica de cada reacción y es independiente de las cantidades iniciales de reactivos y productos. Con independencia de las concentraciones individuales en el equilibrio en un particular experimento químico, la constante de equilibrio para una reacción química a una temperatura particular siempre tiene el mismo valor.

2.5 Cinética de Michaelis-Menten

En bioquímica, la cinética “Michaelis-Menten” es uno de los modelos más conocidos de cinética enzimática. Se nombra después de la bioquímica alemana Leonor Michaelis y del médico canadiense Maud Menten. El modelo toma la forma de una ecuación que describe la tasa de reacciones enzimáticas, al relacionar la velocidad de reacción v con $[S]$, la concentración de un sustrato S . Su fórmula esta dada por:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} . \quad (2.3)$$

Esta ecuación se llama la ecuación de Michaelis-Menten. En este caso, V_{max} representa la velocidad máxima alcanzada por el sistema, a la saturación de la concentración del sustrato. La constante de Michaelis K_M es la concentración de sustrato en la que la velocidad de reacción es la mitad de V_{max} . A menudo se supone que las reacciones bioquímicas que implican un solo sustrato siguen la cinética de Michaelis-Menten, sin tener en cuenta los supuestos subyacentes del modelo (Bennett, 1969).

La concentración de sustrato que le da una velocidad que está a la mitad de la V_{max} , se llama K_M y es una medida útil sobre la rapidez con que aumenta la velocidad de reacción respecto a la concentración del sustrato. La K_M , también es una medida

de la afinidad de una enzima (tendencia a unirse) a su sustrato. Una K_M más baja corresponde a una mayor afinidad por el sustrato, mientras que una K_M más alta corresponde a una menor afinidad por el sustrato. A diferencia de la V_{max} que depende de la concentración de enzima, K_M siempre es la misma para una enzima particular en una reacción determinada.

2.6 Cavidad bucal

La boca o cavidad oral es una cavidad de nuestro cuerpo que nos permite ingerir alimentos, proporcionar la función del habla, poder saborear la materia y/o sustancias.

La cavidad oral desde el punto de vista fisiológico se presenta como una de las características más importantes del cuerpo humano, ya que por medio de la digestión se pueden aprovechar los nutrientes y elementos necesarios para el organismo, mientras que en la bioquímica representa un necesario amortiguador capaz de neutralizar los ácidos presentes en la boca.

La saliva lubrica el alimento y contribuye a transformarlo en un bolo alimenticio. La misma es secretada en grandes cantidades (1-1,5 L/d) por tres pares de glándulas salivales (parótida, submaxilar y sublingual) y es mezclada por la lengua, con la comida masticada.

La misma mantiene la homeostasis en la cavidad oral, es un medio perfecto para monitorear la salud en general (Spiellmann, 2011), debido a que está compuesta de una variedad de proteínas, enzimas, hormonas, anticuerpos, constituyentes antimicrobianos y citocinas, muchos de los cuales pasan de la sangre a la saliva, a través de sistemas de transporte intra y extra celular. Dentro del contenido proteico de la saliva, el componente de mayor concentración es la AASH, la cual es secretada en mayor proporción por la glándula parótida.

La AASH tiene múltiples funciones biológicas: como enzima cumple un papel importante en la digestión inicial de almidón, el glucógeno y otros polisacáridos, porque cataliza la hidrólisis de los enlaces alfa-1,4-glucosídicos (Lamby, 2013).

Al ser la proteína de mayor abundancia en la saliva, hace parte de la película adquirida y de la placa dentobacteriana.

2.7 Modelado Matemático

Una de las herramientas más interesantes que actualmente disponemos para analizar y predecir el comportamiento de un sistema biológico es la construcción y posterior simulación de un modelo matemático, pero se debe de destacar, en primer lugar, el mejor conocimiento de los procesos biológicos, y en segundo lugar, el espectacular avance de los ordenadores y el software matemático. Con frecuencia la palabra modelo tiene distintas interpretaciones, aplicando el sentido dado por el profesor Sixto Ros: “un modelo es un objeto, concepto o conjunto de relaciones, que se utiliza para representar y estudiar de forma simple y comprensible una porción de la realidad empírica”. Por tanto, un modelo es la representación de un proceso.

Si en un fenómeno biológico se conocen los procesos internos y las relaciones entre ellos, entonces es posible conocer las ecuaciones (que dependerán de si el modelo es discreto o continuo) que lo describan y a las que llamarán un modelo matemático del fenómeno biológico. Como es natural, de un mismo fenómeno biológico se pueden construir muchos modelos matemáticos diferentes entre sí, cuyo grado de eficacia dependerá del conocimiento de los procesos que se investigan y de las posibilidades de experimentación.

Generalmente los métodos que se utilizan para estudiar un fenómeno biológico son la construcción de un modelo matemático o bien el uso del método científico, el cual está basado en:

1. La observación y en la descripción;
2. El desarrollo de hipótesis o explicaciones;
3. La comprobación por experimentación de dichas hipótesis;
4. La aplicación de estos conocimientos en la resolución de problemas similares;

Se puede hacer uso de una herramienta estadística y proponer un resultado más o menos acertado según la complejidad de la técnica empleada. Pero si el problema que se aborda es tal, que apenas se dispone de datos actuales o pasados, se debe de elaborar un modelo que sea capaz de dar solución al problema planteado y además aporte información, de tal manera que la actuación en el futuro sea la más acertada.

Esta última situación es la que se presenta con más frecuencia cuando se estudia un fenómeno biológico. Es evidente, que una de las ventajas del uso de los modelos matemáticos es su bajo costo.

Los modelos y la realidad están relacionados a través de dos procesos: la abstracción y la interpretación. El primero de ellos obliga a encontrar cuales son los elementos más importantes del problema y cuáles son los accesorios. Para saber si un elemento es o no importante se tendrá que ver su efecto relativo en la evolución del sistema.

En cuanto a la interpretación, se debe entender como la manera en que las componentes del modelo (parámetros, variables) y su comportamiento pueden estar relacionadas con las componentes, características y comportamiento del sistema real que se quiere modelar, (Dym and Ivey, 1980).

Por tanto, la primera de las fases necesaria para construir un modelo matemático es la abstracción, para ello se tiene que establecer ciertas hipótesis, definir las variables y desarrollar las matemáticas adecuadas para poder resolver el problema. La siguiente fase es tratar de simplificar las herramientas matemáticas utilizadas. Los resultados que se deducen del modelo matemático deberían llevar a poder efectuar algunas predicciones sobre el mundo real. El paso siguiente sería recoger datos de la situación de la que se ha extraído el modelo y compararlos con las predicciones.

Si no coinciden, los datos que ya poseemos nos pueden servir para modificar las hipótesis.

Si las predicciones coinciden con la realidad, entonces las hipótesis son correctas y también lo son las variables definidas. En caso contrario, si se observan discrepancias será necesario construir otro modelo más aproximado y fiable. Como se puede ver, la creación de un modelo matemático es un proceso progresivo, (E. Carson, 2001).

2.8 Descripción del Modelo

Se comienza por el modelo cinético más característico de una reacción bioquímica, el modelo de Michaelis-Menten para cinética enzimática. Todas las reacciones bioquímicas, así sean llevadas a cabo en un bioreactor industrial, dentro de una célula o fuera de ella, dentro de el cuerpo humano o en un tejido animal o vegetal, son mediadas

por enzimas, en este caso en particular por la AASH.

La figura (2.6), esquematiza en forma muy simplista como actúa una enzima. Este modelo o mecanismo fue propuesto a principios del siglo XX. Está compuesto por tres etapas. En la primera etapa la enzima y el sustrato se encuentran, uno a uno, y se realiza un acoplamiento. Nótese que esta etapa del mecanismo es reversible, y está mediada entonces por una constante de velocidad en cada dirección, se denotarán como k_1 , constante de asociación y k_{-1} constante de disociación. La segunda etapa es aquella en donde se realiza la transformación química.

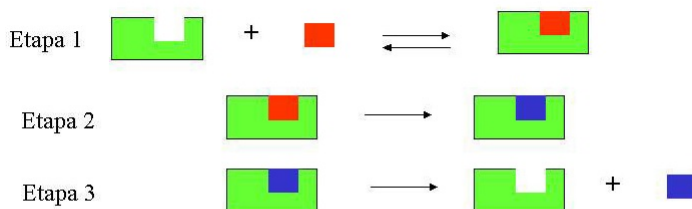


Figura 2.6: Reacción enzimática típica.

El sustrato pasa a producto en el seno de la enzima, en el sitio activo. En la tercera etapa, la enzima libera al producto, quedando disponible para un posterior encuentro con otra molécula de sustrato (figura 2.6).

Simplificando las etapas antes descritas de la reacción y asumiendo que la segunda y tercera etapa pueden ser sintetizadas en una sola. Se formula entonces que todo el proceso puede ser descrito por los dos pasos ilustrados en la figura (2.6). Ya con esta simplificación, se deriva un modelo matemático consistente con ciertas observaciones experimentales.

En la figura (2.7) se muestra de forma simplificada el diagrama de bloques del modelo, como variables de entrada se presentan las concentraciones de la AASH y el sustrato, en este caso el almidón. Las mismas se mezclan en la boca (planta o biorreactor) que posee una temperatura y pH que se asumen constantes en 37 °C y 7 respectivamente. En este punto se forma el complejo enzima sustrato y se produce la



Figura 2.7: Diagrama de bloques del modelo.

reacción. Las variables de salida son, la misma enzima que es liberada, la glucosa que representa el producto de la reacción y el sustrato que no reaccionó con la enzima.

Hasta ahora se han presentado los conceptos básicos que describen el sistema, es necesario entender el nivel de abstracción que un modelo matemático de este tipo y particularmente en esta área implica. En el siguiente capítulo se aplicaran dichos conceptos para lograr la abstracción necesaria del proceso fisiológico estudiado y así obtener el modelo matemático propuesto.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 3

Desarrollo del modelo

Usar el lenguaje matemático para describir un sistema es lo que constituye un modelo matemático. No solo las ciencias naturales y las disciplinas de la ingeniería usan modelos matemáticos, sino también la biología, la economía y la sociología. Los modelos matemáticos pueden ir desde lo simple hasta lo complejo (Carson, 2001).

Es evidente que una de las ventajas del uso de los modelos matemáticos es su bajo costo, si se compara con los modelos físicos. Por ejemplo, es mucho más económico y rápido elaborar un modelo matemático que describa la evolución de la población de conejos que empezar con un determinado número de conejos y esperar cierto tiempo para poder experimentar con ellos.

3.1 Cinética enzimática

Las reacciones bioquímicas se están produciendo continuamente en todos los organismos vivos y ellas implican proteínas llamadas enzimas, que actúan como catalizadores notablemente eficientes. Las enzimas reaccionan muy selectivamente sobre compuestos definidos llamados sustratos. Por ejemplo, la hemoglobina en los glóbulos rojos es una enzima y el oxígeno, con el que se combina, es un sustrato. Las enzimas son importantes en la regulación de procesos biológicos, por ejemplo, como activadores o inhibidores en una reacción. Para entender su papel se tiene que estudiar la cinética enzimática, que es principalmente el estudio de las tasas de reacciones, el comportamiento temporal

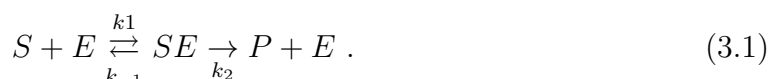
diversos reactivos y las condiciones que los influyen.

La complejidad de los procesos biológicos y bioquímicos es tal que el desarrollo de un modelo simplificador es a menudo esencial para tratar de comprender el fenómeno bajo consideración. Para tales modelos se debe utilizar mecanismos de reacción que sean palpables bioquímicamente. Con frecuencia el primer modelo a estudiar puede ser un modelo de un modelo bioquímico más realista, pero aún demasiado complicado.

Modelos a partir de otros modelos son a menudo los primeros pasos ya que es un entendimiento cualitativo que se quiere inicialmente. Basándose en algunos modelos que reflejan un gran número de reacciones reales y algunos tipos generales de fenómenos y sus correspondientes realizaciones matemáticas; un conocimiento de éstos es esencial en la construcción de modelos para reflejar las propiedades bioquímicas conocidas y además muy específicas de un mecanismo.

3.2 Reacción básica de la enzima

Una de las reacciones enzimáticas más básicas, propuesta por primera vez en 1913 por Michaelis y Menten, implica un sustrato S que reacciona con una enzima E para formar un complejo SE que a su vez, se convierte en un producto P y la enzima. Esquemáticamente:



Aquí k_1 , k_{-1} y k_2 son parámetros constantes asociados con las tasas de reacción; ellas se definen a continuación. El símbolo de doble flecha indica que la reacción es reversible mientras que la flecha única indica que la reacción puede ir de una sola manera. En general es una conversión del sustrato S , a través de la enzima catalizador E , en un producto P .

En detalle se dice que una molécula de S se combina con una molécula de E para formar uno de SE , que finalmente produce una molécula de P y una molécula de E nuevamente.

La ley de acción de masas dice que la tasa de una reacción es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos. Denotamos las concentraciones de los

reactivos en (3.1) por letras minúsculas:

$$s = [S], \quad e = [E], \quad c = [SE], \quad p = [P] . \quad (3.2)$$

donde $[\]$ tradicionalmente denota la concentración. Entonces la Ley de Acción de Masas se aplicó a la reacción típica (3.1) que conduce a una ecuación para cada reactivo y por lo tanto el sistema de ecuaciones de reacción es no lineal:

$$\begin{aligned} \frac{d[s]}{dt} &= -k_1 es + k_{-1}c \\ \frac{d[e]}{dt} &= -k_1 es + (k_{-1} + k_2)c \\ \frac{d[c]}{dt} &= k_1 es - (k_{-1} + k_2)c \end{aligned} \quad (3.3)$$

$$\frac{d[p]}{dt} = k_2 c$$

Las k_i , denominadas constantes de velocidad, son constantes de proporcionalidad en la aplicación de la ley de acción de masas. Por ejemplo, la primera ecuación para s es simplemente la afirmación de que la tasa de cambio de la concentración $[S]$ se compone de una tasa de pérdidas proporcional a $[S][E]$ y una tasa de ganancia proporcional a $[SE]$. Para completar la formulación matemática se requieren condiciones iniciales, las cuales se denotarán de la siguiente manera:

$$s(0) = s_0, \quad e(0) = e_0, \quad c(0) = 0, \quad p(0) = 0 . \quad (3.4)$$

Las soluciones de (3.3) con (3.4) luego dan las concentraciones, y por lo tanto las velocidades de las reacciones, como funciones del tiempo. Por supuesto, en cualquier problema de cinética de reacción, sólo se refiere a las concentraciones no negativas. La última ecuación en (3.3) está desacoplada de las tres primeras; y su expresión en función del tiempo se describe por:

$$p(t) = k_2 \int_0^t c(t') dt' . \quad (3.5)$$

En la reacción (3.1) la enzima E es un catalizador, que sólo facilita la reacción, por lo que su concentración total, libre y combinada, es una constante. Esta ley de conservación para la enzima también viene inmediatamente de (3.3) en la adición de la segunda y tercera ecuaciones, para las concentraciones de enzima libre e y combinada c respectivamente, para obtener:

$$\frac{de}{dt} + \frac{dc}{dt} = 0 \quad \Rightarrow \quad e(t) + c(t) = 0 . \quad (3.6)$$

En el uso de las condiciones iniciales (3.4). Con esto, el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias se reduce a sólo dos, para s y c , es decir,

$$\frac{ds}{dt} = -k_1 e_0 s + (k_1 s + k_{-1}) c . \quad (3.7)$$

$$\frac{dc}{dt} = k_1 e_0 s - (k_1 s + k_{-1} + k_2) c .$$

con condiciones iniciales

$$s(0) = s_0, \quad c(0) = 0 \quad (3.8)$$

El enfoque habitual de estas ecuaciones es asumir que la etapa inicial del complejo, c , la formación es muy rápida después de lo cual está esencialmente en equilibrio, es decir, $\frac{dc}{dt} \approx 0$, en cuyo caso a partir de la segunda ecuación (3.7) que describe al complejo, obtenemos c en términos de s ,

$$c(t) = \frac{e_0 s(t)}{s(t) + K_m}, \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} . \quad (3.9)$$

cuando se sustituye en la primera de las ecuaciones (3.7), tenemos:

$$\frac{ds}{dt} = \frac{k_2 e_0 s}{s + K_m} . \quad (3.10)$$

donde K_m se llama la constante de Michaelis. Dado que la enzima se considera tradicionalmente para estar presente en pequeñas cantidades en comparación con el sustrato se supone que la concentración de sustrato efectivamente no cambia durante esta etapa transitoria inicial. En este caso la dinámica (aproximada) se rige por (3.10)

con la condición inicial $S = s_0$. Esto se conoce como la aproximación pseudo- o cuasi-estacionaria.

3.3 La aproximación de equilibrio

En su análisis original, Michaelis y Menten asumieron que el sustrato está en equilibrio instantáneo con el complejo, por tanto,

$$K_1 c = k_{-1} c. \quad (3.11)$$

Dado que $e + c = e_0$, encontramos que

$$c = \frac{e_0 s}{K_1 + s}. \quad (3.12)$$

donde $K_1 = k_{-1}/k_1$. Por lo tanto, la velocidad V de la reacción, es decir, la velocidad a la que producto está formado, está dado por:

$$V = \frac{dp}{dt} = K_2 c = \frac{k_2 e_0 s}{K_1 + s} = \frac{V_{max} s}{K_1 + s}. \quad (3.13)$$

donde V_{max} es la velocidad de reacción máxima, alcanzada cuando toda la enzima esta acoplada con el sustrato.

A pequeñas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción es lineal, a una velocidad proporcional a la cantidad de enzima disponible e_0 . Por tanto V_{max} se puede representar de la siguiente forma:

$$V_{max} = k_2 e_0. \quad (3.14)$$

A grandes concentraciones, sin embargo, la reacción es saturada, de modo que la velocidad máxima V_{max} de la reacción está limitada por la cantidad de enzima presente y la constante de velocidad de disociación k_2 . Por esta razón, se dice que la reacción de disociación $C \xrightarrow{k_2} P + E$ es limitante de la velocidad. En $s = K_1$, la velocidad de reacción es la mitad del máximo. Es importante notar que el término (3.12) no puede ser exactamente correcto en todo momento; si fuera, entonces de acuerdo con la ecuación del sustrato en el sistema de ecuaciones (3.3) no se consumiría y el producto no sería formado.

Esto señala el hecho de que el término (3.12) es una aproximación. También ilustra la necesidad de una manera sistemática de hacer declaraciones aproximadas, para que se tenga una idea de la magnitud y naturaleza de los errores introducidos al hacer tal aproximación. Es un error común con la aproximación de equilibrio concluir que el término (3.12) tiene, debe ser que $\frac{ds}{dt} = 0$, que si esto es cierto, implica que ningún sustrato es agotado, ni producido.

Además, parece que si el término (3.12) se cumple, entonces debe ser que en el sistema de ecuaciones (3.3) donde dc/dt , se tiene que $\frac{dc}{dt} = -k_2c$, cosa que también es falsa. Esto es debido a que se tiene que tener en cuenta que la aproximación de equilibrio es equivalente a la suposición de que el sistema de ecuaciones (3.3) donde ds/dt es una reacción muy rápida, más rápida que otras, o más precisamente, que $k_{-1} \gg k_2$. Añadiendo ds/dt y dc/dt del sistema de ecuaciones (3.3), se tiene que:

$$\frac{ds}{dt} + \frac{dc}{dt} = -k_2c . \quad (3.15)$$

Expresando el hecho de que la cantidad total $s + c$ cambia en una escala de tiempo más lenta. Ahora si $c = \frac{e_0s}{K_1 + s}$, sustituyendo en la ecuación (3.15) tenemos que:

$$\frac{d}{dt}\left(s + \frac{e_0s}{K_1 + s}\right) = -k_2 \frac{e_0s}{K_1 + s}, \quad (3.16)$$

y que

$$\frac{d}{dt}\left(1 + \frac{e_0s}{K_1 + s^2}\right) = -k_2 \frac{e_0s}{K_1 + s}, \quad (3.17)$$

que especifica la velocidad a la que s se consume.

Por lo tanto el modelo a utilizar es:

$$\begin{aligned}
\frac{d[s]}{dt} &= -k_1es + k_{-1}c \\
\frac{d[e]}{dt} &= -k_1es + (k_{-1} + k_2)c \\
\frac{d[c]}{dt} &= k_1es - (k_{-1} + k_2)c \\
\frac{d[p]}{dt} &= k_2c
\end{aligned}
\tag{3.18}$$

Físicamente, las constantes k_1 , y k_{-1} (adimensionales), representan la velocidad en que el sustrato es convertido en producto y la enzima se libera, respectivamente. Los valores de los estados S y P son medidos en particular por millón (ppm).

3.4 Obtención de las constantes

Como se introdujo en el capítulo anterior, la búsqueda de un modelo matemático permite valorar la reacción enzimática de la AASH. En esta etapa de la investigación se realizaron una serie de experimentos que involucraban la acción de la enzima en un ambiente controlado, para luego hallar las constantes necesarias para definir el modelo. En dichos experimentos se controlaran parámetros como temperatura, humedad, intensidad luminosa y presión, así como también la aplicación de los criterios, normas y seguridad en el ámbito de la bioquímica y manipulación de equipos.

3.4.1 Experimentos

Cabe destacar que se realizó esta parte experimental porque a pesar de que existe mucha documentación a cerca de las enzimas en general y varias enzimas en particular, no se encontró ninguna donde se desarrollara la AASH, por lo tanto no se conocen los valores específicos de las constantes para ésta, así se hace necesario la realización experimental de éstos experimentos.

Se realizaron dos tipos de experimentos: el primero, para 80 pacientes, inicialmente se toma una muestra de saliva del paciente, a dicha muestra se le agrega sustrato

en condiciones controladas, se espera un tiempo previamente establecido y se mide la concentración de sustrato presente en la muestra. Por lo tanto, de dicho experimento se obtiene concentración inicial y concentración final del sustrato presente en la muestra, véase apéndice A.

El segundo experimento se plantea para obtener datos más específicos sobre el comportamiento transitorio de la enzima. De esta manera se tomó la muestra del paciente y se midió la concentración en intervalos de 120 segundos, obteniendo así una curva decreciente, representada por más puntos y que confirmará y demostrará el comportamiento michaeliano de la enzima estudiada AASH. Dichos experimentos se desarrollan detalladamente en el apéndice A del documento, véase apéndice A.

3.4.2 Cálculo de las constantes

Una vez obtenidos los datos experimentales se procede a realizar los respectivos cálculos que se desarrollarán en esta sección, necesarios para encontrar los valores de las constantes requeridas por el modelo escogido. Primeramente se busca la velocidad de reacción del experimento, que simplemente es la tasa de desaparición o transformación del sustrato, en la muestra por acción directa de la enzima, como se muestra en la ecuación (3.19). Por lo tanto conociendo el comportamiento del sustrato en el tiempo se procede a conseguir la velocidad. Se toman los datos del comportamiento del sustrato a través del tiempo, haciendo uso del vector Tiempo (segundos) y el vector Sustrato (Almidón).

$$VR = \frac{Sustrato(i+1) - Sustrato(i)}{tiempo(i+1) - tiempo(i)} \quad (3.19)$$

En la ecuación (3.19) se denota la velocidad de reacción como VR . Esta operación se realiza para cada punto de los datos experimentales. Obteniendo el vector velocidad de reacción mostrado en la tabla (3.1) junto a los valores correspondientes de la concentración de sustrato.

Luego de obtener la velocidad para cada uno de los puntos se procede a graficar el vector de la concentración del sustrato $[S]$ con respecto a la velocidad ya conseguida, figura (3.1). Aunque por la falta de muestras en el experimento no se visualiza el

VR (ppm/s)	[S] (ppm)
0,001130	0,990
0,001125	0,880
0,001100	0,820
0,001075	0,720
0,001050	0,650
0,001025	0,555
0,001000	0,445
0,000425	0,310
0,000425	0,259
0,000925	0,148
0,000125	0,133
0,000233	0,104
8,3e-06	0,084
4,16e-05	0,083
1,67e-05	0,083
2,5e-05	0,082
8,33e-06	0,080
8,33e-06	0,079
5,83e-05	0,078
0	0,076

Tabla 3.1: Vectores de velocidad y concentración.

comportamiento suave de la curva, esta representa la curva de Michaelis Menten de la enzima estudiada, por lo tanto siguiendo la teoría michaeliana se encuentra los valores de V_{max} , K_m necesarios para definir el modelo propuesto. También es necesario destacar que en dicha gráfica se nota que no hay datos suficientes para obtener una buena curva. Este problema se presentó debido a la falta de recursos para la realización de los experimentos.

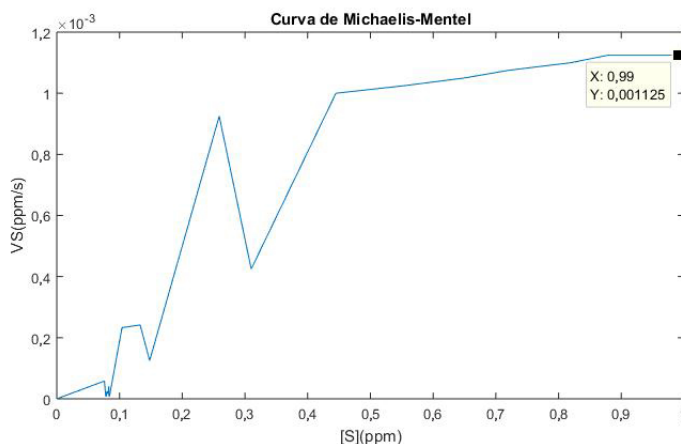


Figura 3.1: Gráfica de velocidad de reacción y concentración del sustrato

V_{max} es el valor de velocidad del punto con mayor magnitud de la figura (3.1),

este valor es la capacidad que tiene la enzima AASH para transformar el sustrato en producto en un tiempo determinado. Luego de que se tiene claro el valor de $V_{max} = 0.001125 \text{ ppm/s}$, se procede a hallar K_m que se define como la mitad de V_{max} .

$$K_m = \frac{V_{max}}{2} . \quad (3.20)$$

Por lo tanto $K_m = 0.0005625 \text{ ppm}$. Así la ecuación aproximada de Michaelis Menten de la AASH es

$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m} = \frac{0.001125[S]}{[S] + 0.0005625} \quad (3.21)$$

La gráfica correspondiente a la ecuación (3.21) es la mostrada en la figura (3.2). Nótese que el comportamiento, el valor final y K_m deben ser los mismos de la figura (3.1), o bien, bastante aproximados.

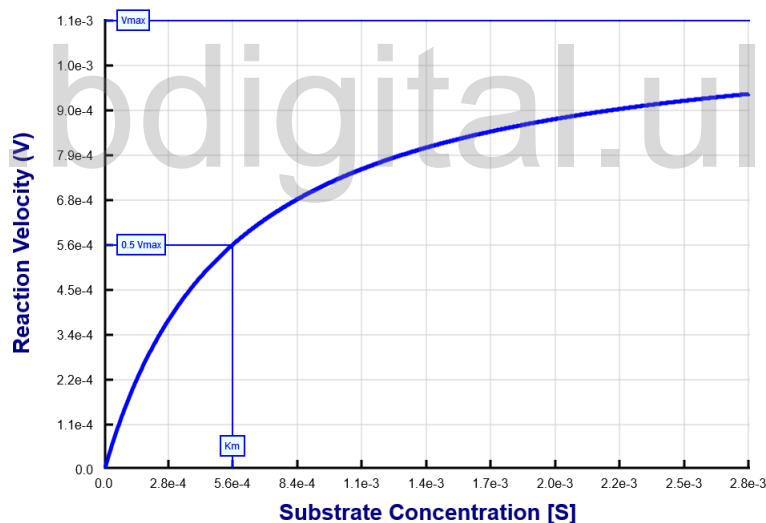


Figura 3.2: Gráfica de Michaelis Menten aproximada del modelo

Luego se presenta la figura (3.3) que muestra la gráfica experimental y la simulada, con esto se puede notar la consistencia del modelo, a pesar de la falta de recursos para adquirir más muestras. La diferencia que existe entre la curva experimental y la simulada se debe a varios factores entre los mas destacados son, la cantidad limitada de muestras en el experimento y la mayor importancia que experimentalmente se otorga

al valor final. Note que la figura (3.3) el valor final es bastante aproximado, mientras que el error en el transitorio es mas notable o de mayor magnitud.

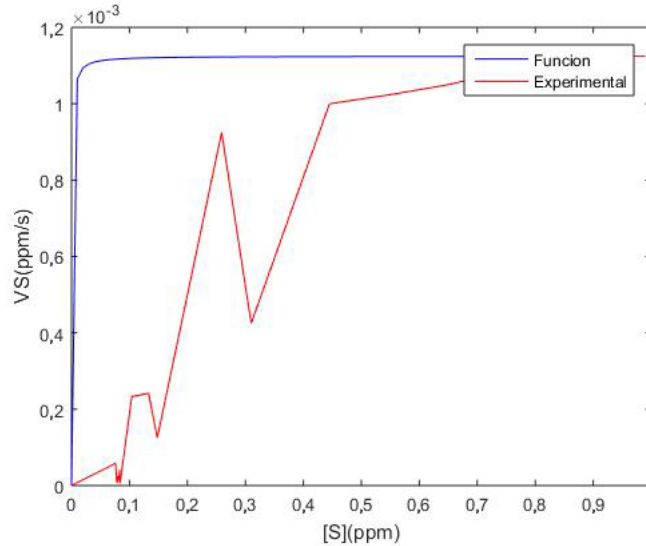


Figura 3.3: Comparación de la gráfica simulada y la experimental de Michaelis Menten

Se debe hallar la concentración inicial de la enzima $[E_0]$. Como se conoce el valor inicial de la concentración de sustrato $[S]$ y se sabe que existe una relación lineal entre la concentración de sustrato y la de enzima, ecuación (3.4). Esta relación se encuentra en la descripción del experimento Amilase laptest, apéndice A. La absorbancia del control se denotará como AC , la absorbancia medida será AM por lo tanto.

La relación de $[E_0]$ es:

$$[E_0] = \frac{AC - AM}{AC} \times 8 \quad (3.22)$$

Sustituyendo los valores encontrados se tiene.

$$[E_0] = \frac{0,45 - 0,31}{0,45} \times 8 = 2,488 \text{ ppm} \quad (3.23)$$

Una vez conocido el valor de la concentración inicial de la AASH $[E_0]$ y el valor de Km , se procede a buscar el valor de K_2 . Ya conocido $Vmax$ y $[E_0]$, de la ecuación (3.15) se despeja K_2 .

$$[K_2] = \frac{V_{max}}{[E_0]} \quad (3.24)$$

$$[K_2] = \frac{0,001125}{2,488} = 4,5202 \times 10^{-4} \text{ ppm}$$

Notemos que A continuación se procede a buscar las constantes K_1 y K_{-1} . Para ello se partirá de las siguientes premisas,

$$k_{-1} \gg k_2 \quad (3.25)$$

y

$$K_m \gg [S] \quad (3.26)$$

Por lo tanto se fija el valor de $k_{-1} = 0,001$ constante adimensional y se procede a obtener numéricamente el valor de K_1 . A continuación se muestra en la figura (3.4) el comportamiento del sustrato en el modelo, con K_{-1} y K_2 fijos y variando K_1 . En la siguiente figura (3.5), se muestra la variación de k_{-1} .

Ajustando las constantes se obtiene el valor de $K_1 = 0,0278$, donde las gráficas experimental y simulada son más parecidas.

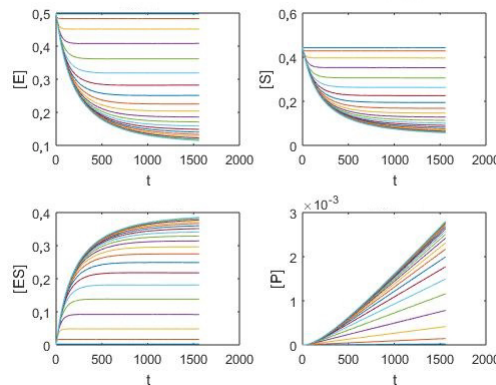
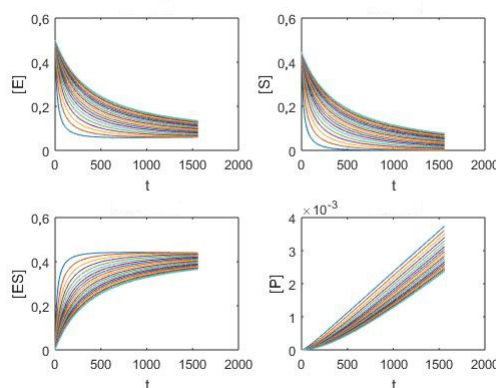


Figura 3.4: Variando los valores de K_1

Una vez obtenidos los valores de las constantes K_1 , K_{-1} y K_2 el modelo planteado

Figura 3.5: Variando los valores de K_{-1}

es:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[s]}{dt} &= -0,0278es + 0,001c \\
 \frac{d[e]}{dt} &= -0,0278es + (0,001 + 4,5202 \times 10^{-4})c \\
 \frac{d[c]}{dt} &= 0,0278es - (0,001 + 4,5202 \times 10^{-4})c \\
 \frac{d[p]}{dt} &= 0,0278c
 \end{aligned}
 \tag{3.27}$$

Siendo este el modelo matemático aproximado de la reacción de la AASH para descomponer o transformar el almidón en azúcares.

La ecuación de Michaelis-Menten se ha utilizado para predecir la tasa de formación de productos en reacciones enzimáticas durante más de un siglo. Específicamente, indica que la velocidad de una reacción enzimática aumentará a medida que aumenta la concentración del sustrato, y que el aumento de la separación de complejos enzima-sustrato disminuirá la velocidad de reacción. Mientras que la primera predicción está bien establecida, la segunda nunca ha sido probada experimentalmente. Para determinar si una tasa aumentada de desvinculación realmente disminuye la velocidad de reacción, Shlomi Reuveni (1998).

Analizaron matemáticamente el efecto de la desvinculación enzima-sustrato sobre reacciones enzimáticas a nivel de una sola molécula. Según el estudio, desvincular una

enzima de un sustrato puede reducir la velocidad de formación del producto en algunas condiciones, pero también puede tener el efecto opuesto. A medida que aumentan las concentraciones de sustrato, puede alcanzarse un punto de inflexión cuando un aumento en la velocidad de desacoplamiento da como resultado un aumento, en lugar de una disminución, de la velocidad de reacción. Los resultados indican que las reacciones enzimáticas pueden comportarse de manera que violan la ecuación clásica de Michaelis-Menten y que el papel de la desvinculación en la catálisis enzimática aún debe determinarse experimentalmente, Joseph (2014).

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 4

Validación del modelo

En el capítulo anterior se plantea el modelo matemático aproximado de la AASH, un sistema no lineal de cuatro estados que depende del tiempo. Ahora se procede a simular el mismo con respecto a un tiempo establecido, para luego proceder a validarlo con muestras experimentales del comportamiento de dicha enzima que fueron recopiladas en la investigación.

4.1 Simulaciones

Como primer paso se usará la muestra número uno para realizar la simulación, la misma tiene como condiciones iniciales $[E_0] = 0,500 \text{ ppm}$ y $[S] = 0,445 \text{ ppm}$. En la figura (4.1) muestra la comparación del experimento numero 2 con la simulación del modelo, específicamente del estado que representa el sustrato $[S]$, véase apéndice A.

Nótese que el estado transitorio el error es mucho mayor que en el estacionario, evidenciando una vez mas lo acotado en el capitulo anterior. En este punto es importante destacar que luego de la obtención de los resultados de este estudio, se presentaron los mismos al equipo de trabajo del laboratorio donde se procesaron las muestras y se tomaron las medidas.

Debido a que no existen valores normales establecidos para la AASH, se acordó junto con los expertos del laboratorio en el área de la bioquímica aplicada, que para este primer estudio establecer un error aceptable de 30% sobre la medida esperada.

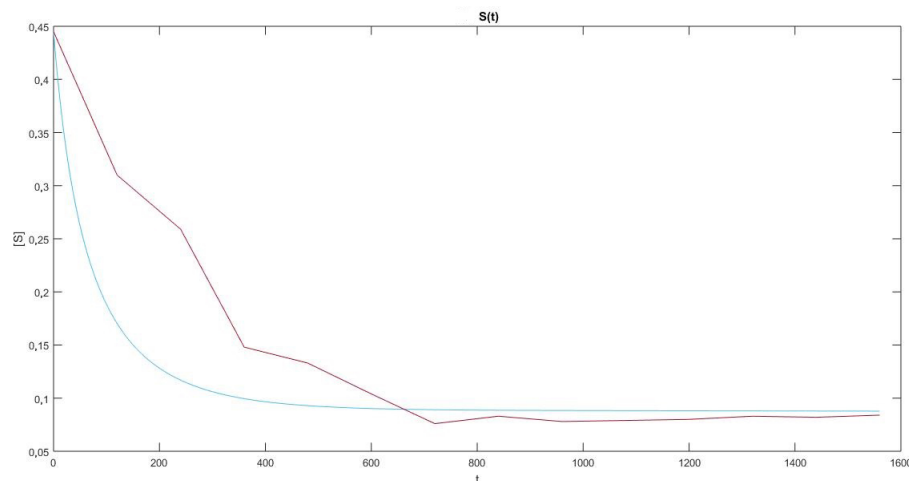


Figura 4.1: Comparación del experimento con la simulación del modelo obtenido

También se llegó a la conclusión que la importancia del modelo radicara en el valor final de los estados, debido a que experimentalmente solo se toman medidas al principio y al final de la reacción.

Nótese en la figura (4.2) que muestra el comportamiento de la enzima $[E]$, sustrato $[S]$, el complejo enzima sustrato $[ES]$ y el producto $[P]$ con el tiempo respectivamente.

En esta simulación se tiene que $[E_0] = 0,500 \text{ ppm}$, fundiéndose al instante en el que la enzima entra en contacto con el sustrato específico (Almidón), la reacción comienza a producirse, por consiguiente la AASH se empieza a adherir al sustrato para formar el complejo $[ES]$. Por lo tanto la presencia de la enzima en su estado puro comienza a disminuir como se nota en la gráfica. Este comportamiento se sigue presentando hasta encontrar el punto de equilibrio o la velocidad máxima de la enzima.

Si se observa las gráficas de la figura (4.2), en la referente al estado $[es]$ se nota que el valor del complejo en principio es cero. El valor es cero debido a que se asume desde el principio que en la muestra, la enzima ha pasado suficientemente tiempo en la solución para procesar todo el almidón que podría estar presente en la misma. Cuando la reacción comienza la enzima se adhiere rápidamente al sustrato para formar el complejo, como se muestra en la figura.

El comportamiento del sustrato, en este estado es el único que podemos medir experimentalmente, por lo tanto es de mucha importancia. Al igual que en el valor

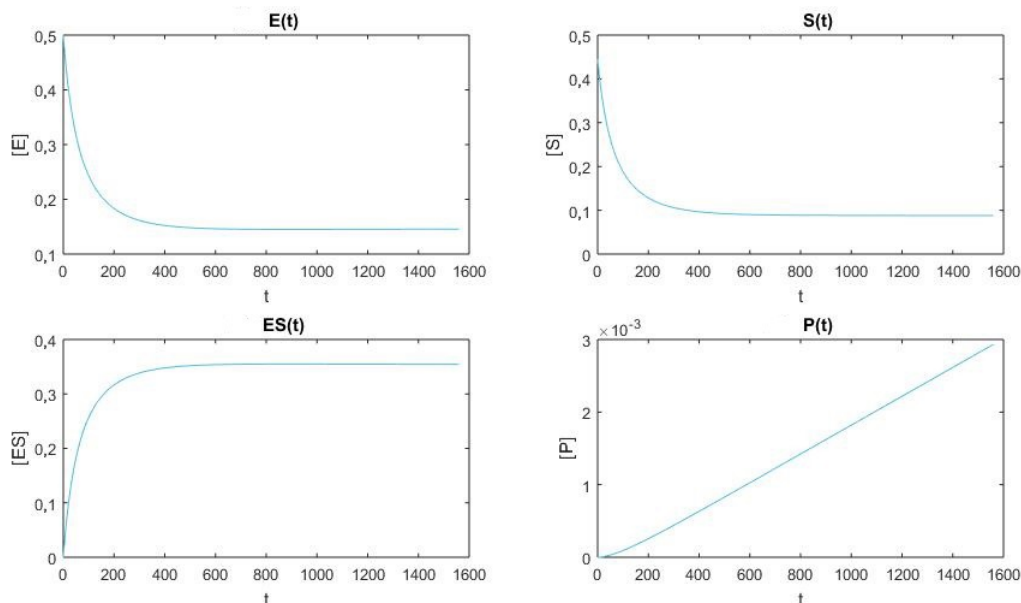


Figura 4.2: Comportamiento de los estados

de la enzima, el sustrato es conocido debido a que se establece antes de mezclarlo en la solución, $[S_0] = 0,445 \text{ ppm}$. El comportamiento de este estado es similar al de la enzima, a medida que el tiempo va transcurriendo el sustrato es procesado por la enzima y transformado en glucosa. Es importante destacar que el sustrato llega a un estado cuasi estacionario debido a que las enzimas están completamente ocupadas procesando el sustrato en el que están acopladas, este estado también es representado como la velocidad máxima de reacción.

El comportamiento en la gráfica correspondiente a la generación del producto, en este caso en particular, la producción de glucosa. Es de notar que en este experimento la generación del producto no cesa a pesar de la terminación del tiempo de simulación, esto es debido a que la reacción no ha culminado. Existen aún partículas de almidón que no han sido procesadas por la enzima, por lo tanto el proceso se mantendrá hasta que cada una de ellas se haya transformado.

Es relevante destacar que la reacción a pesar de que experimentalmente ya se considera culminada, aún está reaccionando la muestra. Es claro que experimentalmente lo que se busca es la concentración de la enzima y este valor es obtenido una vez se llega

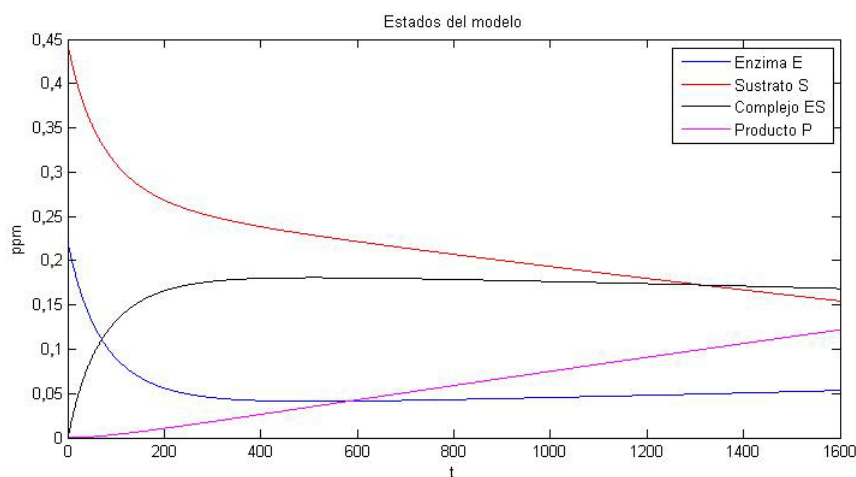


Figura 4.3: Comportamiento de los estados a 1600 segundos

a la velocidad máxima, por lo tanto la representación del producto o el comportamiento del mismo no es relevante para este tipo de pruebas.

A continuación se procede a mostrar todos los estados en una misma gráfica, figura (4.3). En la misma se muestra un tiempo de simulación de 1600 segundos, con una concentración de sustrato inicial $[S_0] = 0,445 \text{ ppm}$ y de enzima inicial $[E_0] = 0,231 \text{ ppm}$. Véase que le único estado que llega al valor estacionario es el correspondiente al com-

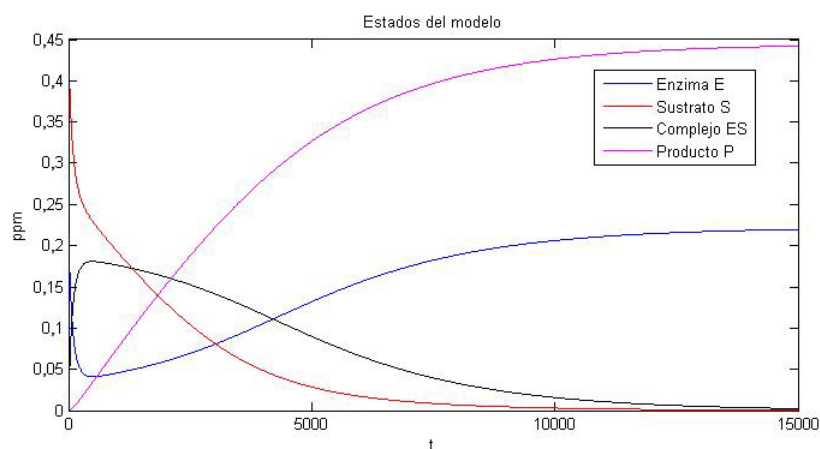


Figura 4.4: Comportamiento de los estados a 15000 segundos

plejo $[ES]$ representado por el color negro en la figura (4.3), por lo tanto, esto evidencia que para estos valores de concentración iniciales se necesita indudablemente más tiempo

para que la reacción culmine en su totalidad.

Así en la siguiente figura (4.4), se establece un tiempo de simulación mayor (15000 segundos). Nótese que a diferencia de la gráfica anterior, en este caso, todos los estados han llegado a su valor final en un tiempo de aproximadamente de 1500 segundos.

4.2 Validación

Para el proceso de validación del modelo fue necesario tomar las medidas de concentración inicial de la enzima.

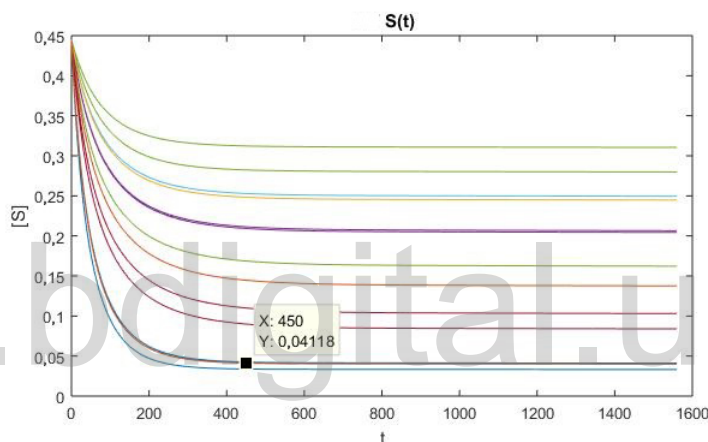


Figura 4.5: Simulación del comportamiento de la reacción para cada uno de los pacientes

Por lo tanto se procesaron muestras a un tiempo $t = 0$ s para encontrar el valor de $[E_0]$, este procedimiento es análogo al descrito en el experimento 1, véase apéndice A. Una vez obtenido estos valores y estableciendo una medida inicial de sustrato $[S_0] = 0,445$ ppm, valor constante para todas las muestras del experimento se procede a simular cada una de las 20 muestras del proceso de validación del modelo, tomando en cuenta el numero de paciente.

En la tabla (4.1) se puede observar las 20 muestras utilizadas, en ella se puede ver el numero de paciente junto con el valor de concentración de sustrato inicial obtenido experimentalmente, también se muestra el valor de la muestra experimentalmente a los 450 segundos, este valor en segundos es establecido por lo que sugiere el experimento

Paciente	Condiciones Iniciales (ppm)	Valor experimental a los 450 s (ppm)	Valor simulado a los 450 s (ppm)	Error absoluto (ppm)	Error relativo (ppm)	Error porcentual
1	0,222	0,3204	0,2988	0,022	0,072	7,23%
2	0,343	0,2896	0,2529	0,037	0,145	14,51%
3	0,848	0,0801	0,0641	0,016	0,251	25,05%
4	0,281	0,2650	0,2095	0,055	0,265	26,47%
5	0,385	0,2588	0,1692	0,090	0,530	52,95%
6	0,852	0,1294	0,0938	0,036	0,380	37,98%
7	0,426	0,1418	0,1269	0,015	0,118	11,76%
8	0,512	0,2524	0,1598	0,093	0,579	57,95%
9	0,185	0,3346	0,2824	0,052	0,185	18,47%
10	0,278	0,2819	0,2111	0,071	0,335	33,54%
11	0,253	0,2171	0,2318	0,015	0,063	6,32%
12	0,145	0,3580	0,3156	0,042	0,134	13,45%
13	0,228	0,1705	0,2482	0,078	0,313	31,30%
14	0,763	0,1057	0,0814	0,024	0,298	29,80%
15	0,751	0,0998	0,0624	0,037	0,599	59,86%
16	0,156	0,3522	0,3047	0,047	0,156	15,58%
17	0,458	0,1291	0,0837	0,045	0,542	54,23%
18	0,149	0,2759	0,3121	0,036	0,116	11,61%
19	0,158	0,3111	0,3047	0,006	0,021	2,10%
20	0,852	0,0880	0,0809	0,007	0,088	8,83%
Promedio	0,312	0,2556	0,2103	0,037	0,218	21,76%

Tabla 4.1: Valores experimentales y simulados del sustrato.

Amilase laptest, en donde se considera que ese es el tiempo suficiente para la enzima obtener su velocidad máxima. También se muestra el valor obtenido luego de simular el modelo en el mismo tiempo establecido experimentalmente. Finalmente en las ultimas tres columnas de la tabla se muestran los errores absoluto, relativo y porcentual que existe entre los valores simulados y los experimentales.

Nótese que en algunas muestras el valor de error es muy alto, esto puede atribuirse a varias razones. Primero, en algún punto del experimento, la muestra sufrió una alteración en su composición natural. Segundo, el espectrofotómetro pudo en algún punto perder la calibración, adicionalmente el tubo de ensayo utilizado en la muestra pudo estar manchado o rayado, no permitiendo la lectura correcta de la muestra. Estas son las razones más comunes de obtención de errores cuando se realizan este tipo de experimentos, además el modelo desarrollado, es un modelo aproximado de la reacción.

En la figura (4.5) se muestra la gráfica de los experimentos utilizados para validar el

modelo. Recordemos que todo el modelo desarrollado se basa en la medida experimental de los valores de concentración del sustrato en la reacción. Por lo tanto la validación se basa en la comparación de la concentración sustrato medido, con la concentración del sustrato simulado. Así la figura (4.5) muestra las simulaciones para cada una de las muestras utilizadas para la validación del modelo.

La figura muestra el comportamiento de la enzima bajo ciertas condiciones que hacen que la reacción sea bastante rápida comparada con las presentadas en la sección anterior, nótese que el estado estable se logra a escasos 400 segundos de iniciada la reacción, esto no necesariamente indica que la reacción ha terminado.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El objetivo de la investigación fue obtener un modelo matemático de la reacción de la enzima AASH, para de esta manera dar los primeros pasos en la comprensión del comportamiento de dicha enzima y su papel fundamental en el proceso digestivo.

Se partió del modelo generalizado de Michaelis-Menten para reacciones simples, en donde establece que cada sustrato reacciona a una enzima específica y que adicionalmente no tenga la acción de inhibidores. La ley de acción de masas, estipula que la velocidad de una reacción es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos. Se obtuvo un sistema de cuatro ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales que definen la tasa de cambio de reactivos con el tiempo. El modelo incluye tres constantes, la constante de velocidad de asociación, de disociación y catalítica. Dichas constantes se hallaron gracias a la combinación de métodos experimentales y teóricos, estableciendo las condiciones ideales para que esta enzima reaccionara adecuadamente.

El proceso de validación comienza a partir de muestras de pacientes, que fueron procesadas en el laboratorio de Bioquímica aplicada de la facultad de medicina de la Universidad de los Andes, siguiendo las indicaciones del experimento correspondiente a esta enzima. Para luego ser comparadas con los resultados que arrojó el modelo de este estudio. Con un error promedio porcentual menor al 30%, establecido por el equipo de laboratorio, se logra llegar a un modelo que satisface los requerimientos del

experimento.

Este estudio no solo logró obtener un modelo matemático aproximado de la reacción de la AASH, sino también verificar que la AASH es una enzima michaeliana y que esta tiene una reacción más lenta de lo que establecía el experimento utilizado. También se logra decretar las bases para un estudio más profundo de dicha enzima mediante razonamientos matemáticos e incluso el control de producción de la misma en la saliva humana.

5.2 Recomendaciones

Utilizar las investigaciones de este proyecto de grado para ahondar en el estudio de esta enzima en los campos de desarrollo de nuevas tecnologías para el bienestar y salud del organismo.

Hacer estudios pertinentes para establecer relación entre AASH y la producción de caries y deterioro del esmalte dental.

Realizar el experimento número dos con más puntos de medición, precisando el comportamiento de la enzima en estado estacionario.

Sugerir a los estudiosos de la AASH aumentar el tiempo de espera antes de tomar la medida de la muestra, debido a que el modelo de este estudio arrojó que la reacción no ha terminado para el tiempo en que se realiza la medida de forma tradicional.

Bibliografía

Jorge Carlos Vazquez Sanchez, (2008). Modelos matemáticos de la cinética de la reacción enzimática. Instituto tecnológico de Mérida, México.

Kevin Alonso Cruz Ruiz,(2012). Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Minas, Escuela de Procesos y Energía, Medellín, Colombia.

Carolina González Restrepo y Andres Felipe Tascon, (2013). Estudio cinético de la enzima alfa amilasa. Universidad ICESI, Facultad de Ciencias Naturales, Programas de Biología y Química farmacéutica Bioquímica Y Laboratorio.

Lamby CP, Gómez OL, Jaramillo L (2013). La a-amilasa salival: relación con la caries dental y la salud en general Universidad de Odontologica, Colombia.

E. Carson and C. Cobelli (Eds.) (2001). Modelling Methodology for Physiology and Medicine. San Diego, CA.

Bennett, T. P., and Frieden, E. (1969). Modern Topics in Biochemistry. Macmillan, London.

Holum, J. (1968). Elements of General and Biological Chemistry, 2nd ed. Wiley, NY.

Harrow, B. (1958). Textbook of Biochemistry. Saunders, Philadelphia.

Pfeiffer, J. (1958). Enzymes, the Physics and Chemistry of Life. Simon and Schuster, NY.

JD Murray (1989). Mathematical Biology I: An introduction. Third Edition. Volume 17.

- James Keener, James Sneyd (1989). *Mathematical Physiology I: Cellular Physiology* Springer. Second Edition. Volume 8/I.
- Bravo, I.G., Barrallo, S., Ferrero, M. A., Rodríguez-Aparicio, L. B., Martínez-Blanco H., Reglero, A. (2001). Kinetic properties of the Acylneuraminate Cytidylyltransferase from *Pasteurella haemolytica* A2. *Biochem. J.* 358, 585-598.
- Kraut J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem.* 46:331-58. PMID 332063
- Helmstaedt K, Krappmann S, Braus GH. (2001) Allosteric regulation of catalytic activity: *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase versus yeast chorismate mutase. *Microbiol. Mol. Biol.*
- Schirmer T, Evans PR. (1990) Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. PMID 2136935
- Ward WH, Fersht AR. (1988) Tyrosyl-tRNA synthetase acts as an asymmetric dimer in charging ARNt. A rationale for half-of-the-sites activity. *Biochemistry.* PMID 3179266
- Hill, A. V. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. 40, iv-vii.
- Hartley B.S. and Kilby B.A. (1954) The reaction of p-nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin. *Biochem J.* 56(2):288-97. PMID 13140189
- Bender ML, Begue-Canton ML, Blakeley RL, Brubacher LJ, Feder J, Gunter CR, Kezdy FJ, Killheffer JV Jr, Marshall TH, Miller CG, Roeske RW, Stoops JK. (1966) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* ISBN 0-7167-3268-8
- Cleland WW. (2005) The Determination of the Concentration of Hydrolytic Enzyme Solutions: a-Chymotrypsin, Trypsin, Papain, Elastase, Subtilisin, and Acetylcholinesterase. PMID 5980876

Apéndice A

Experimentos

Es importante destacar la dificultad presentada al momento de realizar este tipo de experimento, no solo por lo costoso de los reactivos, los instrumentos utilizados, sino también por la experiencia necesaria para llevarlos a cabo. En todo momento se contó con la presencia de un especialista en el área que asesoró el procedimiento, ajustó los instrumentos y realizó las mediciones correspondientes. En primer lugar se realizaron 80 experimentos, dichos experimentos formaban parte de una investigación científica que buscaba la relación entre la AASH y las caries, dicha investigación esta a cargo de la Dra. Yuliana Cols.



Figura A.1: Muestras de saliva.

Las muestras se recopilaban en el servicio de Odontología del Hospital Alberto



Figura A.2: Kit para el experimento (Labtest)



Figura A.3: Espectrofotómetro StatFax 1904 plus

Carnevali Seguro Social IVSS del municipio libertador del estado Mérida. Dicho estudio recopiló 80 muestras de saliva de pacientes entre 18 y 60 años, así como, una recopilación de datos de cada paciente, tales como antecedentes personales y familiares, etc. Dichas muestras luego de ser tomadas fueron llevadas al laboratorio de Bioquímica aplicada de la facultad de Medicina de la Universidad de los Andes, las muestras se procesaron una vez recolectadas. Posteriormente se realizó el procedimiento siguiente El kit que se utilizó para realizar todos los experimentos es el AMILASE ref. 11 de Labtest, que contiene todos los reactivos e instrucciones necesarias para realizar un buen desempeño. Dicho kit tiene como principio que la muestra incubada con un sustrato de almidón y la disminución del color azul, después de la añadidura de yodo, se



Figura A.4: Tiras de medición

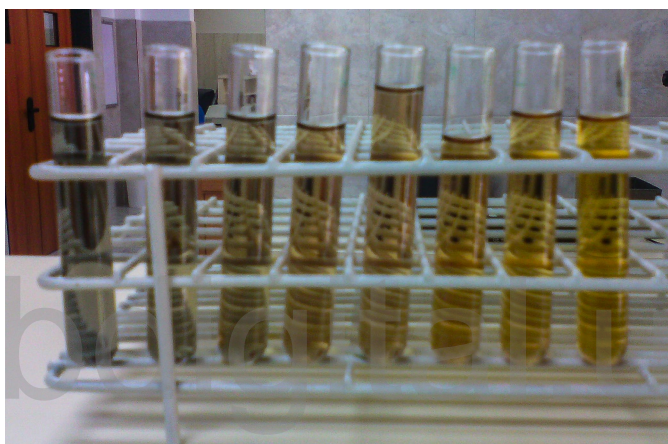


Figura A.5: Muestras luego del experimento

compara con un control, siendo proporcional a la actividad de la amilasa en la muestra. Cabe destacar antes de continuar, que todos estos experimentos miden la absorbancia de la luz del sustrato que se encuentra en la muestra, y además del hecho de que la enzima AASH no se puede medir directamente debido a que sus partículas no reflejan la luz, por lo tanto, el espectrofotómetro no es capaz de cuantificar la concentración en la muestra.

A.1 Experimento 1

En primer lugar, se tomó una muestra y se mezcló con agua destilada en proporción de 1-100, luego se procede a centrifugar la misma, se usó una Table top centrifuge plc-05,

durante 10 min a 3500 rpm o 1789,87 ATM. A parte, se incuba 0.5 mm de sustrato a 37 °C (STAT FAX 1904 plus) en un baño de maría. Seguidamente, el control se establece con agua destilada. Luego la muestra de saliva ya diluida se coloca en el tubo de ensayo donde se encuentra el sustrato ya incubado a 37 °C y se espera el tiempo establecido, en este caso 800 seg. Una vez cumplido el tiempo establecido, se extrae la muestra y se paraliza con 0.5 ml de una solución yodal, inmediatamente después de este proceso, se le agrega 4 ml de agua destilada y se mezcla bien. Seguidamente se colocan las muestras en el espectrofotómetro y se mide la concentración del sustrato, y se dispone a tomar la siguiente muestra en intervalos de 0 a 240 segundos y se repite el procedimiento desde la enzima diluida en el tubo de ensayo, se deja reposar el tiempo establecido, se le agregan los 4ml de agua destilada y luego de mezclar se coloca en el espectrofotómetro para medir a concentración de la enzima, así, hasta culminar con las muestras.

A.2 Experimento 2

En primer lugar, se tomó una muestra y se mezcló con agua destilada en proporción de 1-100, luego se procede a centrifugar la misma, se usó una Table top centrifuge plc-05, durante 10 min a 3500 rpm o 1789.87 ATM. Por otro lado, se incuba 0,5 mililitros de sustrato a 37 °C (STAT FAX 1904 plus) en un baño de maría. Para llevar un orden y mayor control de las muestras se reparten en 16 tubos de ensayo marcados que serán los intervalos en que se medirá la concentración del sustrato. A continuación, el control se establece con agua en uno de los tubos de ensayo. Seguidamente la muestra ya diluida anteriormente es colocada en el primer tubo de ensayo donde se encuentra el sustrato ya incubado a 37 °C para luego proceder a realizar la prueba de los primeros 120 segundos. Cuando se cumple el tiempo se extrae la muestra y se paraliza con 0.5 ml de una solución yodal, inmediatamente después de este proceso se le agrega 4 ml de agua destilada y se procede a mezclar bien. Luego se coloca la misma en el espectrofotómetro y se mide la concentración del sustrato, al concluir con este proceso se dispone a tomar la siguiente muestra de 0 a 240 segundos y se repiten el procedimiento desde la enzima diluida en el tubo de ensayo, se deja reposar el tiempo establecido, se le agregan los

4ml de agua destilada y luego de mezclar se coloca en el espectrofotómetro para medir a concentración de la enzima, hasta culminar con las muestras.

www.bdigital.ula.ve