

001045

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Química

ELABORACION DE UN ALGORITMO PARA LA DETERMINACION
DE PARAMETROS CINETICOS DE UNA ENZIMA QUE PRESENTA
INHIBICION POR SUSTRATO


SILVIA JUDITH QUAN CHAN

Handwritten:
P. 10
C. 1. 1. 1.
C. III. 95

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

GUATEMALA

Vo. Bo.

(f) 


Doctor Omar Dary
Asesor

Vo. Bo.

(f) 

Doctor Raúl González
Asesor

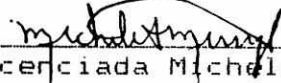
Tribunal

(f) 

Doctor Omar Dary

(f) 

Doctor Raúl González

(f) 

Licenciada Michele Mury de Guzmán

Fecha de Aprobación: 26 de julio de 1993.

**ELABORACION DE UN ALGORITMO PARA LA DETERMINACIÓN
DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE UNA ENZIMA QUE PRESENTA
INHIBICIÓN POR SUSTRATO**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Química

**ELABORACIÓN DE UN ALGORITMO PARA LA DETERMINACIÓN
DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE UNA ENZIMA QUE PRESENTA
INHIBICIÓN POR SUSTRATO**

SILVIA JUDITH QUAN CHAN

Trabajo de investigación presentado para optar
Al grado académico de Licenciatura en Química

GUATEMALA

1993

DEDICATORIA

A mis padres, Antonio René Quan y Chiu Chong de Quan, quienes me dieron el apoyo y la guía necesaria para poder realizar mis anhelos, y cuya motivación y ejemplo persistirán por siempre.

A mis hermanos, Héctor David, Victor Manuel, Ana Patricia y Mónica Elizabeth, quienes me motivaron y alentaron para seguir adelante con mis estudios y en mi vida.

A mis amigos y compañeros que surgieron debido a mi estancia en el C.R.I.: Jorge Cifuentes, Rudy Morán, Vilma de Rodas, Juan Carlos Gálvez, Annabella Pashell, Teresa Rodríguez, Adolfo Pérez, Karla Rivas, Cecilio Del Valle, José Alberto Arriaga, Patricia Ochoa y muy especialmente a Michael Derbes; quienes fueron mi fuente principal de inspiración, perseverancia y ejemplos extraordinarios y admirables de superación y de carácter.

A todos mis tíos y primos, compañeros y amigos, quienes siempre me brindaron su apoyo incondicional y su amistad.

AGRADECIMIENTO

Agradecimientos al Centro de Investigaciones y Estadística de la Universidad del Valle de Guatemala, en especial al Lic. Juan Pablo Pira y al Ing. Luis Furlán, por permitirme el uso del SPSS/PC+. Al Lic. Juan Pablo Pira por haberme brindado su ayuda en la utilización de dicho programa y por su asesoría en la realización de la parte experimental matemática de esta investigación.

Muchos agradecimientos a los Doctores Omar Dary y Raúl González, por haberme prestado su asesoría en este trabajo de investigación. Gracias al Doctor Omar Dary por haberme dado la oportunidad de realizar una investigación teórica y haberme introducido al complejo estudio de la cinética enzimática.

Un agradecimiento especial al Ing. Miguel Angel Canga, por su ayuda en el cierre de mi curriculum en Química, iniciando así este trabajo de investigación.

Gratitud especial a Silvia Chuy Quan por haberme brindado su ayuda en mis visitas al INCAP y otras instituciones y un agradecimiento infinito a Mrs. Ruth Grau y Mónica Quan por su colaboración incondicional en la lectura y grabación de textos y en la búsqueda de literatura.

Agradecimientos a la Universidad del Valle de Guatemala y a sus catedráticos, por haberme brindado la oportunidad de realizar estudios en dicha institución y por darme la preparación necesaria para seguir adelante en mi vida profesional.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. FUNDAMENTACION TEORICA	4
A. La Enzima Acetilcolinesterasa	4
1. Generalidades	4
2. Propiedades Fisiológicas	6
3. Cinética de la Acetilcolinesterasa	7
4. Inhibidores	7
B. Métodos matemáticos para analizar la cinética enzimática	9
1. Determinaciones enzimáticas	10
a. Cinética enzimática clásica	10
b. Tipos de inhibición	11
c. Inhibición por sustrato	13
2. Ajustes de curvas	15
a. Regresiones lineales de datos transformados	15
b. Regresión polinomial	16
c. Aproximación cúbica	17
3. Regresión no lineal	17
a. Escalando los datos	20
b. Selección de la ecuación	20
c. Estimaciones iniciales	21
d. Selección de factores de ponderación	22
e. Criterios de convergencia	23

f.	Interpretación de los resultados	23
f.1	Asegurando la calidad del ajuste	23
f.2	Incertidumbres en los valores de los parámetros	24
f.3	Comparando el ajuste a un grupo de datos	26
f.4	Comparando dos grupos de datos	26
f.5	Linealizaciones aplicadas a modelos no lineales	27
g.	Problemas de la regresión no lineal	27
g.1	No convergencia	27
g.2	Convergencia lenta	28
g.3	Variables redundantes	28
g.4	Mínimos locales	28
h.	Modificaciones a la regresión no lineal	29
i.	Recapitulación de regresión no lineal	30
III.	OBJETIVOS	31
IV.	EXPERIMENTO	32
A.	Investigación experimental (Dary, 1989)	32
B.	Investigación matemática	33
V.	RESULTADOS	37
VI.	DISCUSIÓN	39
VII.	CONCLUSIONES	48
VIII.	RECOMENDACIONES	50
IX.	BIBLIOGRAFIA	51

ANEXOS	54
A. Anexo de ecuaciones	54
B. Anexo de símbolos	57
C. Anexo de procedimiento	58
D. Anexo de resultados	62
E. Anexo de gráficas	70

I. INTRODUCCIÓN

La caracterización de una reacción catalizada por una enzima puede hacerse por medio de un estudio cinético de dicha enzima. La caracterización básica y clásica de una enzima consiste en la determinación de la ecuación de velocidad por la que se rige y, consecuentemente, de las constantes de velocidad, equilibrio y de inhibición (K_m , V_{max} y K_i , principalmente).

La cinética más sencilla se reduce al presupuesto de que las reacciones catalizadas por enzimas se rigen por la ecuación de Michaelis y Menten (ver anexo de ecuaciones), la cual representa una reacción de saturación, las que producen el gráfico de una hipérbola rectangular. En el pasado, para determinar las constantes cinéticas deseadas, las mediciones experimentales se transformaban de tal manera que se obtenía una linealización de dicha ecuación. Las ecuaciones de Lineweaver-Burk y de Eadie-Hofstee son transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten, que son comúnmente utilizadas para determinar K_m y V_{max} (ver anexo de ecuaciones). Estas linealizaciones, sin embargo, conllevan mucho error, ya que al transformar los datos no se está tomando en cuenta la transformación que están sufriendo las incertidumbres, por lo que los resultados de tales gráficas son muy inexactos.

Al hacer el gráfico de una reacción catalizada por una enzima que presenta un mecanismo de inhibición por sustrato, tal como la acetilcolinesterasa, se observa claramente que ésta no cumple con la ecuación de Michaelis-Menten, pues la curva tiene una forma acampanada cuando se grafica velocidad versus logaritmo de la concentración del sustrato. Las ecuaciones simples utilizadas en cinética clásica son de poca utilidad en estos casos. Para determinar los parámetros cinéticos de dicha enzima, es necesario recurrir a métodos de análisis sofisticados. Debido a que la ecuación de la velocidad es relativamente compleja y difícilmente podría transformarse a una ecuación lineal, se debe llevar a cabo un ajuste del tipo regresión no lineal. Una regresión no lineal no se puede realizar en forma directa, sino que requiere de un proceso iterativo. Esto significa que involucra una serie de pasos y toma de decisiones de las cuales dependerá la calidad y la confiabilidad de los resultados finales.

En el caso particular de la acetilcolinesterasa, se desea comparar los resultados obtenidos de experimentos realizados bajo varias condiciones. No es necesario buscar la ecuación cinética correspondiente a cada conjunto de datos, sino una ecuación común por la cual se observe que se comportan todos los juegos de datos.

La caracterización de la acetilcolinesterasa es de mucha importancia a nivel biológico y bioquímico, por tener esta enzima un papel trascendental en el funcionamiento del sistema nervioso de los

vertebrados y de los invertebrados, y por ser un blanco fácil de inhibidores irreversibles, entre los que se encuentran una gran parte de plaguicidas y sustancias utilizadas en la guerra química. Esta enzima ha sido de amplio estudio desde hace muchas décadas, y su continua investigación se realiza con la finalidad de elaborar plaguicidas que sean menos tóxicos al ser humano, pero efectivos en contra de la plaga que se desea controlar, o antídotos eficientes contra intoxicaciones provocadas por agentes anticolinesterásicos.

Para apoyar el trabajo de los enzimólogos cinetistas, este trabajo de investigación presenta una alternativa a los procesos largos y tediosos que se realizan para la determinación de los parámetros cinéticos en ecuaciones de velocidad no linealizables.

II. FUNDAMENTACION TEORICA

A. La Enzima Acetilcolinesterasa

1. Generalidades

La acetilcolina es un neurotransmisor que se libera durante la conducción de impulsos nerviosos en la sinapsis colinérgica del sistema nervioso de los vertebrados e invertebrados. Su función consiste en abrir las bombas de sodio asociadas con la recepción de acetilcolina, disparándose así un potencial de acción. Se cree que la hidrólisis de la acetilcolina detiene esta acción por lo que se reestablece el potencial de membrana de la neurona post-sináptica, permitiéndole así su participación en la conducción de un nuevo impulso nervioso (Toutant y Maussolié, 1987).

Las colinesterasas permiten un rápido control de la excitación de las sinapsis colinérgicas. Un ejemplo se encuentra en las uniones neuromusculares, en la rápida inactivación de la acetilcolina después de ser liberada en la unión sináptica (Toutant y Maussolié, 1987).

En los vertebrados existen dos tipos de colinesterasas: la acetilcolinesterasa (E.C. 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (E.C. 3.1.1.8). La característica que tienen en común es su capacidad de hidrolizar ésteres de colina más rápidamente que otros ésteres. Difieren, sin embargo, en sus propiedades catalíticas, características moleculares (tales como el tamaño de su sitio catalítico) y sus reactividades inmunológicas. La acetilcolinesterasa hidroliza la acetilcolina mucho más rápido que

otros ésteres de colina, e hidroliza muy poco la butirilcolina. Además, la acetilcolinesterasa está sujeta a la inhibición por exceso de sustrato natural y otros sustratos similares (Toutant y Maussolié, 1987).

La acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa son glicoproteínas que se encuentran presentes en una variedad de formas moleculares, las cuales difieren en su estructura cuaternaria, su solubilidad, y otras propiedades tales como sus interacciones iónicas e hidrofóbicas (Toutant y Maussolié, 1987).

Estas enzimas pueden hallarse adheridas al exterior de las membranas celulares por medio de interacciones hidrofóbicas, pueden encontrarse ancladas a la lámina basal extracelular, o pueden ser excretadas como proteínas solubles en el medio extracelular. Es evidente que la acetilcolinesterasa juega un papel muy importante en el proceso de la sinapsis colinérgica. La variedad de formas moleculares que posee le permite a la enzima mucha versatilidad al posicionarse sobre la superficie de la membrana pre y post-sináptica, y en la lámina basal (Toutant y Maussolié, 1987).

Desde hace mucho tiempo se cree que la presencia de la acetilcolinesterasa en el sistema nervioso central de los vertebrados sirve como un marcador de los recorridos colinérgicos. Sin embargo, esta enzima también se encuentra en neuronas no colinérgicas, lejos de las acetiltransferasas de la colina. El significado de este hecho en particular aún es desconocido. Sin embargo, estas observaciones, y el hecho de que

la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa presentan patrones característicos de localización en el cerebro, sugirieron que estas enzimas tienen otros sustratos además de la acetilcolina (Toutant y Maussolié, 1987).

Por otro lado, la acetilcolinesterasa es el blanco perfecto de muchos ésteres organofosforados y carbámicos, algunos de sus inhibidores, de los tipos de compuestos comúnmente encontrados en guerra química y plaguicidas (Holmstedt, 1963).

2. Propiedades Fisiológicas

Se ha reportado que la acetilcolinesterasa ataca grupos funcionales de o-nitroaceto-anilida, o-nitroanilina y acetatos; por consiguiente, esta enzima posee actividad de arilamidasa. Se ha observado que también posee capacidad para hidrolizar la sustancia P (Chubb et al., 1980 y Lockridge, 1982) y las encefalinas (Chubb et al., 1980). Sakamoto y colaboradores (1985) sugieren que en motoneuronas de la columna vertebral, la acetilcolinesterasa se halla en la sinapsis axo-somáticas, en donde las terminales presinápticas contienen sustancia P y encefalina, tanto solas como en asociación con acetilcolina (Atsumi et al., 1985). En estos sistemas, la acetilcolinesterasa puede terminar la acción de diferentes neurotransmisores. Miller y Chubb (1984) también sugirieron que la enzima intracelular podría participar en la maduración de sustancia P y encefalina, y que también podría romper un propéptido inactivo para producir un neurotransmisor activo (Toutant y Maussolié, 1987).

Además de la actividad hidrolítica que posee, se ha sugerido que puede funcionar como un receptor fisiológico (Froede y Wilson, 1971).

3. Cinética de la Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa no es una enzima totalmente específica para un solo sustrato, y está sujeta a alta inhibición por sustrato (Froede y Wilson, 1971).

La inhibición por sustrato de esta enzima es un tipo de inhibición no competitiva. A grandes rasgos, lo que sucede es que una segunda molécula de sustrato se une reversiblemente al ya formado complejo de enzima-sustrato, lo cual causa reducción de la velocidad máxima (Hellenbrand y Krupka, 1978).

4. Inhibidores

Algunos inhibidores de la acetilcolinesterasa son reversibles, mientras que otros son tóxicos irreversibles. Estos últimos se utilizan como agentes anticolinesterasas, tales como gases de guerra química y plaguicidas del tipo organofosfato y carbamatos. Los inhibidores reversibles se ejemplifican con iones amonio, terciarios o cuaternarios. Ejemplos de ellos son la feniltrimetilamonio, n-metilpiridinio, n-metilquinolina e isoquinolina, y n-metilacridinio. Asociados a los inhibidores de tipo ión amonio, se encuentran los fluoruros (Froede y Wilson, 1971).

Entre los inhibidores alcalinizantes están n, n-dibenzil-B-cloroetilamina (dibeamina) y el n-(2-cloroetil)-n-metil-2-cloro-2-fenetilamina (Froede y Wilson, 1971).

Los organofosfatos son inhibidores irreversibles que alquilan la enzima. Algunos de estos son el tetraetilpirofosfato, sarin y somán; también los fluoroboratos poseen esta capacidad de inhibición (Froede y Wilson, 1971).

En 1936, los científicos alemanes tomaron como objeto de estudio a los organofosfatos como compuestos merecedores de ser analizados. Durante el trabajo de su síntesis, notaron síntomas de malestar. La investigación se desarrolló hasta producir un organofosfato sintético con propiedades insecticidas. En Alemania también se llegó al desarrollo de sustancias que, entonces, eran de toxicidad desconocida (Holmstedt, 1963).

En 1948, H. Gremels reconoció las propiedades anti-acetilcolinesterasa de los organofosfatos. Pocos años después, compuestos homólogos y relacionados fueron sintetizados. Entre estos compuestos se encontraban el diisopropil-fosfofluoridato (DPF), una de las sustancias anti-esterasas más comúnmente utilizadas (Holmstedt, 1963).

En la década de 1950, se llevó a cabo un enorme desarrollo en este campo. Un evento importante fue el advenimiento del malatión, un insecticida de muy baja toxicidad para el ser humano (Holmstedt, 1963).

B. Métodos matemáticos para analizar la cinética enzimática

El análisis de datos científicos se puede regir por dos escuelas: (a) la empírica; o (b) la basada en modelos matemáticos. Cada método tiene sus ventajas y sus limitaciones. Lo ideal sería utilizar objetivamente el método basado en modelos matemáticos y aplicarlo a casos donde no hay fórmulas matemáticas conocidas (o teóricas) y cuando los datos conocidos no permitan una derivación de tal modelo (o sea, que los datos no permitan un análisis directo). También se puede combinar la información obtenida a partir de curvas múltiples (por ejemplo, familias de curvas que representan múltiples ensayos, tratamientos, muestreos, condiciones, experimentos o arreglos) (Guardabasso et al., 1988).

El análisis simultáneo de las curvas múltiples puede proveer una excelente definición de la pendiente o gráfica común. Las diferencias entre las curvas pueden luego ser caracterizadas por deslizamientos y/o escalamientos horizontales y/o verticales. Es recomendable calcular los factores de escalamiento tomando en cuenta todos los puntos experimentales, lo cual se hace posible cuando la forma matemática de la función se conoce o ésta ya se ha determinado (Guardabasso et al., 1988).

Un conjunto de datos puede ser ajustado a una curva arbitraria uniendo los datos con segmentos que van de punto a punto. Sin embargo, esto tiene la desventaja de que se obtienen cambios muy bruscos de pendientes (derivadas), en contraste con el comportamiento de la mayoría

de los sistemas físicos y biológicos. Mejores aproximaciones de las curvas pueden obtenerse al realizar ajustes polinomiales o regresiones no lineales (Guardabasso et al., 1988).

1. Determinaciones enzimáticas

La especificidad es el sello de reconocimiento de una catálisis enzimática. Por lo tanto, es de importancia la determinación de las constantes de especificidad, k_{cat} y K_m (Crompton y Waley, 1986).

Las reacciones catalizadas por enzimas se caracterizan generalmente por los parámetros V_{max} ($k_{cat} * [E_0]$) y K_m . Uno de los objetivos de la cinética enzimática son el de encontrar los parámetros correspondientes a cada sustrato y, en dado caso, la constante de inhibición K_i para inhibidores determinados (Yoshino, 1987).

El análisis cuantitativo de datos en cinética enzimática y de constantes de equilibrio en bioquímica, requiere que los datos experimentales sean comparados con una ecuación teórica (Perrella, 1988).

a. Cinética enzimática clásica. Si la concentración de todos los reactivos (a excepción de uno) se mantienen constantes, la velocidad de una reacción enzimática generalmente cumple la siguiente ecuación:

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

en donde v = velocidad de la reacción y $[S]$ = concentración de sustrato, cuya concentración varía. A esta ecuación se le conoce como la ecuación de Michaelis-Menten. Esta ecuación representa una hipérbola rectangular que pasa por el origen, siendo $y = V_{\max}$ una asíntota horizontal. Esta ecuación generalmente se arregla en formas lineales tales como:

Ecuación de Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Ecuación de Hanes

$$[S] / v = \frac{1}{V_{\max}} * [S] + \frac{K_m}{V_{\max}}$$

Tales análisis de tipo gráfico son muy sencillos y rápidos y proveen la información necesaria para ciertos propósitos. Sin embargo, no se determina la confiabilidad de las constantes (Cleland, 1967).

b. Tipos de inhibición

Existen dos tipos principales de inhibición: completa y parcial, también conocidas como inhibición lineal e hiperbólica, respectivamente, debido a la forma de la gráfica del recíproco de la velocidad de reacción versus la concentración del inhibidor (Yoshino, 1987; Baici, 1987).

En la inhibición acompetitiva, el sustrato no se combina con la enzima libre, sino que sólo con el complejo ES ($K_i = \text{infinito}$, $K_i' \approx 0$) es un tipo de inhibición difícilmente encontrado (Crompton y Waley, 1986).

La inhibición parcial de tipo mixta consiste en una mezcla de inhibición parcial competitiva e inhibición completa no competitiva (Crompton y Waley, 1986).

c. Inhibición por sustrato

Consideremos la reacción generalizada



como una reacción de dos sustratos y dos productos. Este tipo de reacción es de las más comunes en bioquímica, puesto que aproximadamente el 60% de las reacciones catalizadas por enzimas que se conocen obedecen esta ecuación. Las reacciones de dos sustratos y dos productos son realmente reacciones de transferencia de grupo, es decir, reacciones en donde un grupo, G, se transfiere de un radical, X, a otro, Y:



(Cornish-Bowden, 1979).

Existen varios mecanismos para explicar las reacciones de transferencia de grupo, las cuales se dividen principalmente en dos tipos. Los mecanismos que proceden a través de un complejo terciario, EGXY, llamado así porque contiene a la enzima y a ambos sustratos en una sola especie; y los mecanismos que proceden a través de una enzima

sustituida, EG, que contiene a la enzima y al grupo transferido pero ninguno de los dos sustratos completos. Anteriormente, se asumía que el mecanismo debía de proceder a través del complejo terciario y que éste podía ser formado por medio de cualquiera de los complejos binarios EGX o EY, es decir, los sustratos podían unirse a la enzima en un orden aleatorio (Cornish-Bowden, 1979).

En el mecanismo de enzima sustituida, es posible que el sustrato o el producto que no contenga el grupo de transferencia (X o Y) se una a la forma incorrecta de la enzima libre. En el mecanismo de complejo terciario de orden aleatorio, estos mismos pueden unirse a los complejos binarios equivocados. En el caso del mecanismo de complejo terciario de orden concertado, el segundo sustrato o el primer producto pueden unirse al complejo binario erróneo. En este último caso, la inhibición por sustrato puede ocurrir tanto en la reacción derecha como en la reversa, pero no en ambas debido a que sólo uno de los dos complejos binarios está disponible. Si se toma B como el reactivo que sufre la inhibición por sustrato, se obtiene entonces la ecuación de velocidad siguiente:

$$v = \frac{V_{\max} ab}{K_i^A K_m^B + K_m^B a + K_m^A b + ab (1 + b/K_{si}^B)}$$

donde los supraíndices A y B se refieren a las constantes correspondientes a cada especie, K_{si} es una constante que define el grado

de inhibición que sufre B, y a y b son las concentraciones de A y B, respectivamente. De acuerdo a esta ecuación, la inhibición por sustrato será efectiva sólo a altas concentraciones de A, por lo que este tipo de inhibición se asemeja mucho a la inhibición no competitiva (Cornish-Bowden, 1979).

En el mecanismo de enzima sustituida, la ecuación de velocidad es la siguiente:

$$v = \frac{V_{\max} ab}{K_m^B a + K_m^A b (1 + b/K_{si}^B)}$$

De acuerdo con esta ecuación, la inhibición es sumamente efectiva cuando la concentración de A es pequeña, por lo que se asemeja a la inhibición competitiva. Gráficas primarias de $1/v$ versus la concentración de B son parabólicas (Cornish-Bowden, 1979).

2. Ajustes de curvas

2.1 Regresiones lineales de datos transformados

La línea que se obtiene a partir de un procedimiento de regresión lineal se escoge de tal manera que minimice la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto y esa línea. Un método fácil para el manejo de datos de ciertos tipos de curvas es la de transformar estos datos, de manera que se pueda realizar con ellos una regresión lineal. Una regresión lineal da como resultados una pendiente y un

intercepto que pueden ser utilizados para la determinación de los parámetros de interés (Motulsky y Ransnas, 1987).

Llevar a cabo regresiones lineales en datos transformados tiene varias ventajas. El método es directo, no requiere el uso de computadoras y los resultados aparentemente son fáciles de evaluar, estadísticamente. Sin embargo, los resultados que se obtienen no son estadísticamente óptimos. Los resultados de una regresión lineal son válidos únicamente cuando las incertidumbres de las réplicas de los valores de y no se relacionan con los valores de x o de y . Esta suposición generalmente no es válida después que los datos han sido transformados. Linealizaciones de transformaciones no son óptimas debido a que distorsionan los errores experimentales. Estas distorsiones son especialmente graves cuando las transformaciones involucran combinaciones de valores de x y y (Cleland, 1967; Motulsky y Ransnas, 1987).

b. Regresiones polinomiales

Consideremos la ecuación

$$y = A + Bx + Cx^2 + Dx^3 + \dots$$

El objetivo de una regresión polinomial es el de la determinación de los parámetros (A, B, C, D, \dots) que hagan el mejor ajuste de un grupo de datos. Para llevar a cabo una regresión polinomial es necesario especificar el orden del polinomio de ajuste (o sea, el número de parámetros a determinar) (Motulsky y Ransnas, 1987).

La regresión polinomial es usualmente utilizada para crear una curva genérica que pase encima de cada uno de los puntos experimentales. En casos como estos, la forma matemática de la ecuación es irrelevante, por lo que la regresión polinomial no es de mucha utilidad en el análisis de datos biológicos (Motulsky y Ransnas, 1987). Además de esto, posee dos desventajas: la curva tiende a sufrir cambios bruscos de pendiente entre los puntos y generalmente muestra comportamientos extraños fuera del rango de los datos experimentales (Guardabasso et al., 1988).

c. Aproximación cúbica

Una aproximación cúbica es una curva que pasa por encima de cada uno de los puntos ajustados. Es un método bastante útil para graficar las curvas suaves. A diferencia de la regresión no lineal, la aproximación cúbica no es útil para el análisis de datos. La idea detrás de las aproximaciones cúbicas es la siguiente. Un par de puntos puede ser ajustado únicamente a una línea, pero pueden ajustarse a cualquier curva cúbica (de tercer grado). La aproximación cúbica encuentra una curva cúbica que ajuste cada pareja de datos adyacentes, de tal manera que la curva total al final será una curva bien comportada. Esto se logra haciendo iguales a las primeras y segundas derivadas de cada segmento (Motulsky y Ransnas, 1987).

3. Regresión no lineal

La regresión no lineal es un procedimiento utilizado para el ajuste de datos experimentales a una curva previamente seleccionada. Al igual

que la regresión lineal, la regresión no lineal trata de minimizar la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre los puntos experimentales y la curva ajustada. El objetivo es minimizar la suma de los cuadrados de los residuos (SS):

$$SS = \text{suma} [(y_{\text{exp}} - y_{\text{curva}})^2]$$

Una ventaja de utilizar regresión no lineal es que se hace posible ajustar ecuaciones que no pueden ser transformadas a formas que no contengan parámetros no lineales. Este método de mínimos cuadrados es apropiado cuando las incertidumbres experimentales son Gaussianas (normalmente distribuidas) y no relacionadas a los valores de x o y (Cleland, 1967; Motulsky y Ransnas, 1987).

A diferencia de la regresión lineal, la regresión no lineal no puede ser resuelta en un solo paso. En cambio, debe ser resuelta iterativamente; las iteraciones deben empezar con una estimación inicial de los parámetros. Estas estimaciones son utilizadas en procesos complejos para calcular estimaciones posteriores que van mejorando el ajuste hasta que las iteraciones ya no hacen mejoras significativas a la curva y el programa termina (Motulsky y Ransnas, 1987; Cleland, 1967).

A todo método iterativo se le debe dar un punto de arranque, un estimado inicial de los parámetros, obtenidos por cálculo o buena intuición. El ajuste no lineal, entonces, se va moviendo iterativamente a lo largo de la superficie de la curva, alterando los parámetros para obtener un mejor ajuste. Existen varios algoritmos que pueden ser utilizados para

la regresión no lineal. Para el análisis de datos bioquímicos, el método de Marquardt es comúnmente utilizado. Este consiste en un híbrido entre el método de máximo descenso y el método de Gauss-Newton (Motulsky y Ransnas, 1987). Para mayor detalle del método de Marquardt, refiérase a Lawson y Hanson (1974).

El método de máximo descenso consiste en moverse a lo largo de la pendiente mayor de la superficie de la curva a ajustar, a un tamaño de paso arbitrario. La pendiente del nuevo punto se determina y se vuelve a mover hacia abajo. De esta manera, este método encuentra el mínimo moviéndose iterativamente en la dirección del máximo descenso. La primera iteración puede encontrar rápidamente la región del mínimo, pero iteraciones posteriores son más lentas, ya que tienden a moverse en zigzag, especialmente si el paso es de tamaño grande. Se deben realizar muchas iteraciones antes que este método converja. Algunas variaciones pueden hacerse para agilizar este método; por ejemplo, el tamaño del paso puede ser variado en el transcurso del proceso (Motulsky y Ransnas, 1987).

Para funciones que son lineales respecto de los parámetros, el método de Gauss-Newton encuentra rápidamente una solución, sin la necesidad de realizar muchas iteraciones. Es diferente para funciones en donde los parámetros no son lineales, aunque el método podría mejorar el ajuste de la curva. El método de Gauss-Newton a veces trabaja pobremente en las iteraciones iniciales, ya que puede moverse en una

dirección totalmente equivocada. Sin embargo, este método trabaja eficientemente si las estimaciones iniciales son cercanas al mínimo (Motulsky y Ransnas, 1987).

El método de Marquardt combina estos dos métodos, considerando las ventajas y eliminando las limitaciones de cada uno de ellos. El método de máximo descenso trabaja bien en las iteraciones iniciales y el método de Gauss-Newton trabaja bien en las iteraciones posteriores (Motulsky y Ransnas, 1987).

a. Escalando los datos

En la matemática teórica, los valores numéricos de los datos son irrelevantes. Sin embargo, cuando se usan computadoras, esto es muy importante. Las computadoras guardan sólo cierto número de cifras significativas, por lo que los cálculos que involucren valores no enteros están sujetos a errores de aproximación. Por lo tanto, es de importancia expresar los datos en unidades razonables para evitar el uso de números muy grandes o muy pequeños (Motulsky y Ransnas, 1987).

b. Selección de la ecuación

Un programa de regresión no lineal no puede encontrar la mejor curva que pasa a través de un conjunto de datos; únicamente puede optimizar los parámetros en una ecuación ya especificada. La función debe ser seleccionada como y en términos de x , y la ecuación a ser ajustada se debe escoger porque obedece un modelo físico o molecular hipotético. En vez de entrar directamente a la función, algunos programas

permiten el acceso a un sistema de ecuaciones diferenciales. En regresión no lineal, es necesario hacer claramente la distinción entre las constantes (fijadas por el experimento) y los parámetros que deben ser ajustados por el programa. En la mayoría de los programas de regresión no lineal, las derivadas (pendientes) de y con respecto a los parámetros son calculados. A pesar de ser más lento, este método ha probado ser de mayor utilidad (Motulsky y Ransnas, 1987).

En cinética enzimática deben considerarse todas las posibles ecuaciones que pudieran aplicarse a un conjunto dado de datos experimentales y no se deben ignorar las discrepancias e inconvenientes que surgieran, ya que éstas pueden servir de guías para determinar cuál es la ecuación apropiada o el verdadero mecanismo (Cleland, 1967).

c. Estimaciones iniciales

Los valores iniciales para los parámetros deben ser especificados, basándose en experimentos previos, cálculos realizados por análisis basados en transformaciones lineales, o basándose en intuición. Una selección pobre de valores iniciales puede tener las siguientes consecuencias:

1.) En un sistema bien condicionado, la cantidad de tiempo necesaria para que la computadora encuentre la solución se incrementará, pero la solución será la correcta;

2.) En otras situaciones, una selección pobre de valores iniciales puede llevar una regresión no lineal hacia una dirección equivocada y nunca converger a una solución;

3.) Es también posible que la selección pobre de valores iniciales pueda llevar al método a converger en una solución equivocada, o sea un mínimo local (Motulsky y Ransnas, 1987).

d. Selección de factores de ponderación

La mayoría de los métodos para regresión no lineal son algoritmos de mínimos cuadrados. Esto es válido para utilizarse sólo cuando las incertidumbres experimentales no están relacionadas sistemáticamente a los valores de x o de y . A menudo, esto no se cumple. En tales casos, los métodos usuales de regresión no son óptimos. Además que los puntos con valores grandes de y tienden a alejarse más de la curva que los puntos con valores de y pequeños. Al minimizar la suma de cuadrados, el programa tiende a dar mayor importancia a aquellos puntos con valores grandes de y e ignorar los puntos con valores de y pequeños. Para contrarrestar este problema, el procedimiento para mejorar el ajuste puede ser alterado, dividiendo la desviación de cada punto a la curva dentro del valor correspondiente de y de ese punto, y elevándolo al cuadrado. Con esta modificación, el algoritmo no minimiza el cuadrado de las distancias, sino que la suma de los cuadrados de las distancias relativas (expresadas en fracciones). A este método se le conoce como regresión con datos

ponderados. Este procedimiento reduce las ponderaciones inapropiadas que se le da a los puntos con valores grandes de y . Inicialmente, es recomendable ponderar todos los puntos de igual manera. Se utilizan ponderaciones diferentes sólo cuando la relación entre las incertidumbres experimentales y los valores de y son independientes (Motulsky y Ransnas, 1987).

e. Criterios de convergencia

Se deben tomar en cuenta los siguientes factores para escoger los criterios de convergencia. Un criterio muy flexible puede provocar que el programa se detenga antes de llegar a un buen ajuste. Un criterio demasiado estricto causará que el tiempo requerido por la computadora para terminar el ajuste sea demasiado grande, pues tendrá que realizar mayor cantidad de iteraciones (Motulsky y Ransnas, 1987).

f. Interpretación de resultados

Deben tomarse en cuenta los siguientes factores para la interpretación de los resultados de una regresión no lineal.

f.1 Asegurando la calidad del ajuste. Es de importancia examinar primero la gráfica de la curva superimpuesta en los puntos experimentales. No es apropiado utilizar los resultados de una regresión no lineal sin antes haber estudiado la gráfica de los puntos junto con la curva ajustada. Para determinar la desviación promedio de los datos a la

curva se calcula la raíz cuadrado de SS/df , donde SS es la suma de cuadrados y df son los grados de libertad. Si la ecuación no es apropiada, los residuos positivos tenderán a aglutinarse en algunas partes de la gráfica, y los residuos negativos en otra. Tales aglutinamientos indican que los puntos experimentales difieren sistemáticamente (y no aleatoriamente) de las predicciones hechas por la curva (Motulsky y Ransnas, 1987).

En regresión lineal, el valor de R^2 a menudo acompaña los resultados. Este valor representa la fracción de los valores totales de y que se reducen (o se explican) por la línea. En regresión no lineal, este valor se calcula fácilmente como la fracción de la varianza de los valores de y (de la media total), que son reducidos por la curva (Motulsky y Ransnas, 1987).

Aunque los errores estándar no son de total validez para evaluar los resultados de una regresión no lineal, son una medida informal de la calidad del ajuste. Cuando el valor de los errores estándar es de 10% o menor, se ha obtenido un buen ajuste y los resultados son de considerable confianza. Cuando los errores exceden el 25% del valor de los parámetros, se ha hecho un ajuste pobre y poco significativo (Cleland, 1967).

f.2 Incertidumbre en los valores de los parámetros. Los programas de regresión no lineal generalmente calculan el error estándar de los parámetros, pero estos valores son de poca validez. En funciones no lineales, los errores no son ni aditivos ni simétricos, por lo que los límites

de confianza exactos no pueden ser calculados. Los valores de error estándar reportados están basados en linealizaciones y subestiman las incertidumbres reales de cualquier ecuación no lineal. Depende de la ecuación y de los datos ajustados la estimación a un valor de error particular. En una regresión no lineal, las incertidumbres de todos los parámetros serán subestimados, incluso los de aquellos parámetros que sean lineales respecto de y . No es apropiado utilizar los valores de error estándar resultantes de un programa de regresión no lineal en cálculos estadísticos posteriores más formales. Sin embargo, son útiles como una medida informal de la calidad del ajuste. Valores grandes de error estándar indican un problema grave, y sucederán en las siguientes situaciones: cuando los datos tienen mucho esparcimiento, cuando los parámetros están altamente correlacionados o son redundantes o cuando los datos no han sido recopilados a partir de un rango lo suficientemente amplio en valores de x (Motulsky y Ransnas, 1987).

En regresiones lineales y no lineales, los parámetros generalmente no son totalmente independientes. Por lo tanto, alterar un parámetro puede empeorar el ajuste, aunque esto puede mejorarse al cambiar otra variable. El grado de dependencia entre dos parámetros se observa en la matriz de covarianzas, el cual se reporta generalmente como coeficientes de correlación para cada pareja de parámetros. Una correlación de cero significa que dos parámetros son completamente independientes. Correlaciones muy altas (cerca de la unidad) significan que la ecuación

ha incluido variables redundantes, que los datos experimentales no se han recopilado en un rango de x lo suficientemente amplio como para definir bien la curva, o que no hay suficientes puntos experimentales (Motulsky y Ransnas, 1987).

f.3 Comparar el ajuste a un conjunto de datos. Es fácil comparar dos modelos que contengan el mismo número de parámetros; el ajuste que tenga el menor valor de suma de cuadrados es superior, ya que la curva pasará más cerca de los puntos o el ajuste que contenga el menor valor del error estándar (la raíz cuadrada de la varianza) será la mejor de las curvas comparadas. Comparar dos modelos que contengan diferente número de parámetros es menos directo, ya que incrementar el número de parámetros le da mayor flexibilidad al proceso de ajuste de la curva y, por lo tanto, se obtiene una curva más cercana a los puntos (Cleland, 1967; Motulsky y Ransnas, 1987).

f.4 Comparar dos grupos de datos. Usualmente se desea ajustar dos grupos de datos al mismo modelo matemático, y utilizar los resultados para determinar si los dos conjuntos difieren significativamente. No es recomendable comparar valores de error estándar. Se recomienda mejor realizar un mismo experimento varias veces y comparar los resultados con pruebas T. Sin embargo, este método no discrimina diferencias muy pequeñas, especialmente si el experimento se ha realizado sólo dos o tres veces (Motulsky y Ransnas, 1987).

f.5 Linealizaciones aplicadas a modelos no lineales. Los métodos utilizados para calcular los errores estándar de los parámetros y para comparar dos ajustes son estrictamente válidos sólo cuando se aplican a ecuaciones en donde y es lineal respecto de cada uno de los parámetros. Con otros tipos de ecuaciones, las incertidumbres no se distribuyen en forma Gaussiana. Por lo tanto, los límites de confianza calculados sólo son aproximados. Las sumas de los cuadrados tampoco siguen una distribución normal, por lo que las inferencias estadísticas que se basen de las sumas de cuadrados también son aproximadas (Motulsky y Ransnas, 1987).

g. Problemas de la regresión no lineal

g.1 No convergencia. La no convergencia de un programa se puede deber a que la computadora se sobrecarga (“overflow” o “underflow”), porque el sistema está mal condicionado o porque alguna matriz se vuelve singular en algún punto del proceso. Esto ocurre en las situaciones siguientes:

- 1.) los datos contienen valores muy grandes o muy pequeños;
- 2.) la ecuación seleccionada no ajusta adecuadamente los datos;
- 3.) los estimados iniciales se encuentran muy alejados de los correctos;
- 4.) los puntos experimentales están muy dispersos;
- 5.) los datos no fueron recopilados en un rango de valores de x lo suficientemente amplio;

6.) los cálculos hechos por la computadora no fueron lo suficientemente precisos (cifras significativas insuficientes) (Motulsky y Ransnas, 1987).

g.2 Convergencia lenta. Esto indica que el programa tiene dificultad para encontrar una solución. Esto puede ocurrir por varias razones:

- 1.) el criterio de convergencia es demasiado estricto;
- 2.) los datos no son adecuados para definir los parámetros; se requiere mayor número de puntos o puntos más ampliamente distribuidos;
- 3.) la ecuación contiene demasiados parámetros; se debe de fijar uno o más parámetros como constantes para mejorar el ajuste;
- 4.) la ecuación necesita ser reparametrizada (Motulsky y Ransnas, 1987).

g.3 Variables redundantes. La regresión no lineal falla generalmente cuando se trata de ajustar datos a una ecuación que contiene demasiados parámetros. Cuando se tiene una ecuación complicada es muy difícil detectar variables redundantes. Se debe considerar esta posibilidad cuando se reportan valores de error estándar de los parámetros demasiado grandes. También se debe considerar cuando el programa de regresión no lineal consistentemente no logra converger en una solución (Motulsky y Ransnas, 1987).

g.4 Mínimos locales. En regresión no lineal es posible que el ajuste final (de convergencia) no sea el mejor ajuste. Las regresiones no lineales hacen cambios relativamente pequeños durante las iteraciones y se detiene cuando el ajuste ya no mejora al hacer dichos cambios

pequeños. Sin embargo, es posible que al hacer cambios más grandes en los valores de las variables pueda llevar a un mejor ajuste. Esto suele suceder cuando se trata de ajustar demasiados parámetros. En estos casos, lo que se ha encontrado es un mínimo local. Para evitar o resolver este tipo de problema, se debe repetir varias veces la regresión, utilizando diferentes valores de las estimaciones iniciales (Motulsky y Ransnas, 1987).

h. Modificaciones a la regresión no lineal

Para resolver algunos de los problemas que surgen en regresión no lineal o para mejorar la calidad de los ajustes, se han recomendado tomar las siguientes consideraciones:

Regresión lineal robusta. La mayoría de los análisis estadísticos están basados en la suposición de que las incertidumbres experimentales de cada dato es la suma de muchas incertidumbres aleatorias pequeñas. De esta suposición proviene la noción de que los datos experimentales están distribuidos en forma Gaussiana. Sin embargo, en la realidad, las variaciones experimentales resultan, no sólo de la suma de incertidumbres pequeñas, sino también de errores grandes. Se pueden tomar varias medidas para contrarrestar la no-normalidad de la distribución. Es común incluir a todos los puntos en el análisis. Esto puede llevar a resultados incorrectos, ya que la no-normalidad de distribución puede tener una influencia grande en la curva resultante. Una medida más común para contrarrestar la no-normalidad es el de omitir puntos muy alejados,

haciendo a los puntos una evaluación o basándose en criterios personales (Motulsky y Ransnas, 1987).

i. Recapitulación de regresión no lineal

La regresión no lineal es una técnica muy potente para el análisis de datos. Aunque los cálculos de regresiones no lineales pueden hacerse razonablemente a mano, hay programas de computadora disponibles al usuario. Los análisis por regresión no lineal son fáciles, rápidos y prácticos para el uso rutinario. No se requiere de conocimientos sofisticados en computación o matemáticas. Sin embargo, para utilizar apropiadamente la regresión no lineal, es necesario tener una buena intuición para la selección de la ecuación y el modelo físico que representa. Los resultados deben ser estudiados cuidadosamente junto con una visualización gráfica. Si su uso no es apropiado, la regresión no lineal puede dar resultados incorrectos (Motulsky y Ransnas, 1987).

III. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue identificar un método de regresión no lineal para determinar los parámetros cinéticos de una enzima con inhibición de sustrato, la acetilcolinesterasa. Lo que se pretendió realizar fue ajustar los conjuntos de datos disponibles a una ecuación matemática dada que representa la probable ecuación cinética de esta enzima.

Un objetivo secundario fue comparar los valores de los parámetros obtenidos por este método, con los valores reportados por Dary en su trabajo de investigación (Purification, Characterization, and Kinetic Studies of a Wild- and an Insecticide insensitive Acetylcholinesterase from Mosquito (Culex spp.)), Ph.D., University of California, Riverside).

El propósito práctico del trabajo fue hacer disponible un algoritmo para quienes deseen determinar parámetros cinéticos de enzimas con inhibición por sustrato. Con este algoritmo disponible al investigador se busca facilitar y agilizar su análisis posterior a la obtención de datos experimentales. Es decir, hacer accesible al bioquímico investigador en cinética enzimática, un algoritmo válido y práctico para determinación de parámetros cinéticos enzimáticos, sin que se requiera que el investigador posea conocimientos muy elevados de computación o matemáticas.

IV. EXPERIMENTO

A. Investigación experimental

Los valores experimentales fueron obtenidos del estudio cinético que realizó Dary (1989) con la acetilcolinesterasa. Se utilizaron los siguientes conjuntos de datos:

Conc. Sustrato (mM)	Velocidad de Reacción (nm / min.)			
	SELIAM		MSE	
	Control	Control	t-metil ¹ 0.5 mM	t-etil ² 0.6 mM
0.01	0.646	0.396	0.384	0.237
0.02	1.549	0.969	0.675	0.568
0.03	2.331	1.543	0.581	0.723
0.05	3.010	2.297	1.616	1.198
0.10	5.584	3.559	3.074	2.379
0.20	7.666	6.105	5.555	3.012
0.50	8.944	7.829	7.544	5.813
1.00	8.861	8.861	9.556	7.993
2.50	8.250	8.297	9.741	8.226
5.00	7.198	7.951	8.001	7.805
10.00	6.448	6.345	6.466	6.598
20.00	4.335	4.583	4.938	4.044

¹ t-metil = tetrametil amonio

² t-etil = tetraetil amonio

B. Investigación matemática

A partir de Dary (1989) se obtuvo 16 conjuntos de datos experimentales correspondientes a mediciones de velocidad de reacción en función de concentración de sustrato. Cada conjunto de datos se sometió al proceso del ajuste de la siguiente ecuación no lineal:

$$y = \frac{V_{\max}}{1 + \left(\frac{[S]}{K_{si}}\right)^{N_i} + \left(\frac{K_m}{[S]}\right)}$$

El proceso para llevar a cabo la determinación de los parámetros cinéticos fue el de regresión no lineal.

Se procedió inicialmente a tratar de ajustar los datos a la ecuación teórica propuesta por Dary (1989), para regirse por el método basado en modelos matemáticos (referirse a la base teórica). Al observar la no convergencia de los datos a esta función, se procedió al método de prueba y error (empírico), con la finalidad de encontrar una ecuación general por la cual todos los conjuntos de datos pudieran ser ajustados razonablemente.

La siguiente es una lista de las ecuaciones a las cuales se trataron de ajustar los datos, finalizando con la ecuación que produjo mejores resultados (ver anexo de ecuaciones).

$$(1) \quad y = Ax + B$$

$$(2) \quad y = \frac{Ax + B}{Cx + D}$$

$$(3) \quad y = \frac{Ax}{Bx + C}$$

$$(4) \quad y = \frac{Ax + B}{Cx^2 + D}$$

$$(5) \quad y = \frac{A * B^x}{Bx + C}$$

$$(6) \quad y = \frac{Ax^B}{x^C + D}$$

$$(7) \quad y = \frac{Ax^B}{x^{(B+C)} + D}$$

$$(8) \quad y = \frac{Ax^B}{x^{(B+0.675)} + C}$$

$$(9) \quad y = \frac{Ax^B}{x^{(B+0.310)} + C}$$

El método utilizado en el programa de regresión no lineal del paquete estadístico SPSS¹ fue un proceso iterativo muy poderoso. El algoritmo matemático evaluaba la suma de cuadrados de los residuos, la diferencia absoluta entre iteraciones (la pendiente) y, además, el valor numérico de la ecuación diferencial en ciertas iteraciones.

Las características de las ecuaciones que se tomaron en cuenta para seleccionar la fórmula final fueron: rapidez de convergencia, valor de R cuadrado, valores de error estándar, buen ajuste visual de los datos a la gráfica (ver Figura 1 a 5) y semejanza a la ecuación teórica propuesta por Dary (1989) (ver anexo de ecuaciones).

Se procedió a estimar los parámetros cinético de la enzima, utilizando los datos obtenidos para los controles, tanto con la cepa MSE como con SELIAM. Para poder hallar la relación entre los parámetros calculados (de la ecuación 8) y los parámetros cinéticos propiamente dichos, se encontró primero la ecuación que definiera una curva “teórica” de Michaelis-Menten, la que coincidió con el lado izquierdo de la campana formada por los puntos experimentales (ver Figuras 6 a 9). Esta curva hacía omisión a la inhibición por sustrato. El punto máximo de esta curva se interpreta como el valor de velocidad máxima (V_{max}), es decir, el punto máximo extrapolado que teóricamente se encontraría en ausencia de inhibición por sustrato. El valor de la K_m (ap) se calculó empíricamente

¹ Se utilizó SPSS/PC + versión 4.0. Para más detalle del uso de dicho programa, revisar el anexo del procedimiento.

mediante la concentración de sustrato que produjo la mitad de la V_{\max} . La estimación de parámetros se complementó encontrando una ecuación que graficara la segunda parte de la reacción, es decir, la parte correspondiente a la curva de inhibición. Similar al cálculo de la K_m (ap) se estimó el valor de la K_{si} (ap) mediante la concentración de sustrato donde la velocidad de la reacción cae a la mitad de la V_{\max} .

La determinación de los parámetros $[S]_{\text{opt}}$ (concentración de sustrato óptima) y V_{opt} (velocidad máxima experimental) se hizo mediante el cálculo del punto máximo de la curva completa.

V. RESULTADOS

A continuación se muestran tablas resúmenes de los resultados finales. Para ver con detalle las iteraciones y los resultados, refiérase al anexo de resultados.

Cepa: SELIAM (*)

Control

Parámetro	Resultados	Resultados de Dary (1989)
V_{\max} (ap)	11.6 ± 0.6 nm/min	13.8 ± 0.2 IU/ug
K_m (ap)	0.19 0.01 mM	0.130 0.007 mM
$[S]_{\text{opt}}$	0.71 0.05 mM	1.0 mM
V_{opt}	9.4 0.7 nm/min	10.96 IU/ug
K_{si} (ap)	8.8 0.5 mM	9.0 0.6 mM
A	11.6 0.6	
B	0.84 0.08	
C	0.25 0.06	
R^2	0.96836	

(*) Los resultados de esta serie de datos fueron ajustados a una ecuación diferente. Los resultados fueron obtenidos al ajustar la serie correspondiente de datos a la ecuación (9) (refiérase a la Investigación Matemática del Experimento), una pequeña variante de la ecuación (8). Se determinó que esta ecuación ajustaba mejor este conjunto de datos.

Cepa: MSE

Control

Parámetro	Resultados		Resultados de Dary (1989)		
V_{\max} (ap)	32.1 ± 3.6 nm/min		1.54 ± 0.03 IU/ug		
K_m (ap)	1.80	0.88 mM	0.20	0.02	mM
$[S]_{\text{opt}}$	1.01	0.08 mM	1.80		mM
V_{opt}	9.5	0.9 nm/min	1.21		IU/ug
K_{si} (ap)	5.9	0.6 mM	17.96	7.75	mM
A	32.1	3.6			
B	0.53	0.06			
C	3.58	0.46			
R^2	0.96118				

Inhibidor

Parámetro	Tetrametil Amonio		Tetraetil Amonio	
	0.5 mM		0.6 mM	
V_{\max} (ap)	32.4 ± 2.5 nm/min		33.8 ± 2.2 IU/ug	
K_m (ap)	2.57	0.17 mM	2.66	0.12 mM
$[S]_{\text{opt}}$	1.86	0.15 mM	2.39	0.14 mM
V_{opt}	10.3	0.8 nm/min	8.9	0.6 IU/ug
K_{si} (ap)	3.9	0.2 mM	6.7	0.4 mM
A	32.4	2.5	33.8	2.1
B	0.64	0.05	0.63	0.05
C	2.39	0.34	3.33	0.30
R^2	0.97651		0.98495	

VI. DISCUSION DE RESULTADOS

La determinación de los parámetros cinéticos de la enzima acetilcolinesterasa, utilizando los datos proveídos por Dary (1989), se realizó empleando el programa de regresión no lineal del paquete estadístico SPSS. Los datos fueron ajustados para obtener una expresión de la velocidad de la reacción catalizada por la acetilcolinesterasa en función de la concentración de sustrato, realizada a diferentes condiciones experimentales.

La ecuación matemática a la cual fueron ajustados cada uno de los conjuntos de datos no fue la predicha por Dary (1989) en su trabajo de investigación. No obstante es una ecuación muy parecida, y es de importancia notar que la derivación de ambas ecuaciones dan como resultado ecuaciones diferenciales de Bernoulli (refiérase al anexo de ecuaciones). De hecho, la ecuación a la cual fueron ajustados los datos (la ecuación ajustada) tiene una forma muy similar a la ecuación de Michaelis-Menten (refiérase al anexo de ecuaciones), y la ecuación diferencial de ambas tiene la misma forma general, y difieren únicamente por un pequeño factor del exponente. Es interesante saber que muchos fenómenos físicos, moleculares y biológicos se rigen por alguna ecuación de Bernoulli.

La ecuación cinética predicha por Dary (1989) fue descartada debido a que al tratar de hacer los ajustes de los datos a ella, los resultados que se obtenían eran malos, a juzgar por los grandes límites de confianza (mayores del 100% del valor del parámetro) y valores de R cuadrado bajos que se obtenían, o el programa no convergía. Es muy probable que los problemas que surgieron se debieron a que la ecuación contenía demasiados parámetros que debían ser determinados. Debido a que estos parámetros son constantes cinéticas que están relacionadas entre si de alguna manera, el problema resulta ser que hay variables redundantes (refiérase a los antecedentes teóricos). Para resolver este problema, era necesario hacer constantes algunos de los parámetros. Esto presentaba una gran dificultad, ya que para poder hacer constantes algunos de estos parámetros, era necesario conocer su valor numérico, o al menos, una aproximación de dicho valor. Sin embargo, lo que se pretendía hacer era precisamente determinar estos valores, lo cual hacía imposible tomar esta medida.

La alternativa que se tomó para determinar los parámetros, fue la de hallar una ecuación diferente a la cual se obtuvieran buenos ajustes de las curvas. El procedimiento que se siguió para encontrar dicha función fue un híbrido de prueba y error, tomando en cuenta que la ecuación debía tener una forma muy similar a la "teórica". Por ser un proceso de prueba y error, se obtuvieron resultados diversos de las ecuaciones que se probaron, de las cuales había que escoger una.

El criterio utilizado en el proceso de selección de la ecuación se basó en varios factores. Primero, se tomó en cuenta los valores de R cuadrado que se obtenían; aparentemente, los valores más altos representaban los mejores ajustes, aunque este valor en realidad representa la fracción de las mediciones que son explicadas por la curva.

El segundo criterio de selección de la curva fue la evaluación visual. Después de haber realizado las regresiones no lineales, se estudiaron las gráficas de las curvas ajustadas superpuestas con los datos experimentales y se determinó cuáles obedecían mejor el comportamiento común. El criterio visual también evaluaba el buen comportamiento de la curva, esto significa se eliminaron aquellas curvas que presentaban demasiadas fluctuaciones y cambios repentinos en la pendiente.

Con estos criterios se escogió la curva mejor comportada (ver el anexo de gráficas).

Se consideró de mucha importancia como criterio de selección de la ecuación final, la velocidad de convergencia del programa con dicha función. Este factor fue determinante ya que con ciertas funciones el programa tardaba mucho en converger y se indefinía varias veces durante el proceso del cálculo, lo cual indicaba una ecuación matemática mal condicionada. Se puede verificar en los resultados, que con la ecuación seleccionada final, la convergencia de cada grupo de datos fue rápida, ya que no necesitó de un gran número de iteraciones. Además, la solución del problema fue hallada rápidamente a pesar que los valores de las

estimaciones iniciales estaban muy alejados de los valores finales a los que convergieron los parámetros.

Ya habiendo seleccionado la ecuación, se ajustaron a ella todos los conjuntos de datos, con resultados bastante aceptables, a juzgar por los valores obtenidos de R cuadrado, que no bajaron de 0.93. Para llevar a cabo tales ajustes, hubo necesidad de manipular la ecuación, de tal manera que el proceso de convergencia fuera más rápido y los resultados mejores. Al inicio, se observó que la ecuación que contenía cuatro parámetros (ecuación 7 en el Experimento) tardaba en converger, pero aparentemente uno de estos parámetros se mantenía relativamente constante. Hubo necesidad de eliminar este parámetro haciéndolo una constante, el cual requirió de otro proceso de prueba y error.

Para hallar el valor óptimo (el valor de 0.675 y 0.310 que se ven en las ecuaciones) de esta “constante”, se fueron haciendo ajustes, modificando este valor (siguiendo una especie de algoritmo de bisección) hasta ya no obtener una mejora. Teniendo únicamente tres parámetros que determinar, los ajustes llegaron a la convergencia de forma mucho más rápida. Es probable que el problema se estuviera reduciendo al de variables redundantes.

En problemas de regresiones lineales o no lineales, lo ideal es que los parámetros a determinar estén lo menos correlacionados posibles, ya que esto elimina el problema de variables redundantes, y la convergencia del programa es más rápida. En fenómenos naturales, tener coeficientes

de correlación iguales a cero es casi imposible. En casos de cinética enzimática, los parámetros están relacionados todos entre sí. El problema de las variables redundantes en cinética enzimática es casi inherente. Con los resultados obtenidos en este trabajo, se verifican que los coeficientes de las matrices de correlación muestran valores lejanos al cero en la mayoría de los casos, lo cual era predecible.

La ecuación de ajuste de las curvas contiene tres parámetros para ser determinados, de los cuales dos no son lineales respecto a y (la velocidad de reacción). Esto significa que el cálculo de los errores estándar y de los límites de confianza de los parámetros no es de mucha validez. Sin embargo, como sugieren Motulsky y Ransnas (1987), si se utilizan como una medida informal de la calidad de los ajustes, ésta se puede evaluar fácilmente. Los errores estándar calculados para los parámetros se encuentran alrededor del 10%, lo cual, según Cleland (1977), indica que los ajustes realizados fueron buenos. Además, considerando que los valores de R^2 no bajaron de 0.93, se puede afirmar que la ecuación matemática hallada da una buena explicación a los datos experimentales.

Los resultados obtenidos son de reproducibilidad. Aunque hay variaciones, los parámetros calculados para cada conjunto de datos se encuentran dentro de un mismo rango (límite inferior y superior de aproximadamente 15% de la media). Además, los valores de los coeficientes de las matrices de correlación son muy parecidas entre sí.

Es claro que el programa de regresión no lineal del SPSS es de gran capacidad. Es accesible a los químicos y biólogos investigadores por ser de fácil uso, sencillo y rápido en la obtención de resultados. Quizá la más grande dificultad que presenta el uso de dicho programa es la determinación de la función matemática que se utilizará en los ajustes. Una vez seleccionada la adecuada, los siguientes pasos del proceso (estimar los parámetros iniciales, establecer los criterios de convergencia, etc.) no requieren de tanta intuición o conocimientos matemáticos.

Para establecer la relación que existe entre los parámetros calculados y los parámetros cinéticos propiamente dichos, se debió hacer un análisis gráfico de la función a la cual se llegó experimentalmente. Es evidente que el parámetro A corresponde a V_{\max} (ap) (velocidad máxima aparente). A partir de esta suposición, se prosiguió a graficar la curva de Michaelis-Menten, tomando en cuenta únicamente los puntos de la primera parte de la curva (el lado izquierdo de la campana). Con el resto de los puntos (el lado derecho de la campana), se graficó la curva de inhibición. A partir de estas dos funciones, (refiérase a las Figuras 6 a 9) ya era factible calcular los parámetros K_m (ap) (constante de Michaelis-Menten aparente) y K_{si} (ap) (constante de inhibición por el sustrato, aparente), los cuales se calculaban como los valores de las concentraciones de sustrato correspondientes a la mitad de la velocidad máxima aparente, extrapolada en ambas curvas.

Comparando los resultados de los parámetros calculados mediante la ecuación que mejor ajustó los datos experimentales con los estimados cinéticos, y analizando los elementos de la ecuación cinética (ecuación 5 de anexos) con la mejor ecuación empírica (ecuación 6 de anexos) se concluye que el parámetro C de la última corresponde a la K_m (ap). El parámetro cinético K_{si} (ap) debe estar incluido en el exponente ($B + n$) de la ecuación empírica, y que no se pudo interpretar. Probablemente, el fenómeno de inhibición por sustrato de esta enzima sigue las suposiciones de las cuales se derivó la ecuación cinética (ecuación 5). Queda pendiente el postulado de un mecanismo cinético para la inhibición por sustrato que resulte en una ecuación semejante a la obtenida empíricamente. Por el momento, el parámetro calculado gráficamente como K_{si} (ap) carece de significado cinético.

Los parámetros V_{opt} (velocidad de reacción óptima) y $[S]_{opt}$ (concentración de sustrato óptima) fueron fácilmente determinados sin necesidad de hacer los cálculos anteriores. A partir de la ecuación ajustada final, se determinó el máximo de la curva (calculando la primera derivada de la función), y los valores en los ejes x y y eran los correspondientes a los de los parámetros.

La gráfica de la curva de Michaelis-Menten, sin considerar la parte inhibitoria de la reacción completa, superpuesta sobre la experimental coincidía exactamente con la primera parte de la curva. Para hallar la curva de inhibición, sólo se dividió la experimental dentro de la de

Michaelis-Menten y se multiplicó por un factor de escalamiento para dar como resultado la segunda parte de la curva experimental (refiérase al anexo de ecuaciones).

Comparando los gráficos de la cepa MSE con la de SELIAM (inhibidores control), se observa que la curva de Michaelis-Menten correspondiente a MSE tiene una velocidad máxima aparente mucho mayor que la velocidad óptima observada experimentalmente. En el caso de SELIAM, esta diferencia no es tan grande. Es importante recordar que las funciones que definen las gráficas de Michaelis-Menten difieren de las curvas experimentales únicamente por los valores de los exponentes, que incluyen las cantidades de 0.675 para MSE y 0.310 para SELIAM. Este hecho indica, de alguna manera, el grado de inhibición que sufre la enzima, aunque no podría asegurarse si existe alguna proporcionalidad entre este valor exponencial y el grado (o porcentaje) de inhibición.

La gran diferencia que hay entre el valor de V_{\max} (ap) y el de la velocidad óptima da como resultado un aumento considerable en el valor de K_m (ap). Se puede verificar esto comparando los resultados obtenidos para los valores de los parámetros de MSE y los de SELIAM. K_m (ap) correspondiente a MSE es 10.0 veces mayor que el valor de SELIAM. Este resultado guarda lógica con los valores de K_i para inhibidores de tipo competitivo para ambas enzimas. La acetilcolinesterasa de la cepa MSE posee valores mayores que la enzima de la cepa SELIAM (Dary 1989). Esta diferencia en los valores de K_m (ap) del sustrato permaneció oculta

cuando los datos fueron analizados mediante la ecuación cinética que Dary derivó (1989).

A partir del parámetro K_m (ap) se puede establecer alguna idea del mecanismo de catálisis de la enzima. En el caso de la acetilcolinesterasa perteneciente a la enzima de la cepa MSE, pareciera que tiene menor afinidad al sustrato acetilcolina que la de la cepa SELIAM lo cual explica en parte porqué la acetilcolinesterasa de MSE es menos afectada por inhibición con inhibidores competitivos e inhibidores irreversibles (plaguicidas organofosfatos y carbamatos).

VII. CONCLUSIONES

Para poder realizar un ajuste de curvas por regresión no lineal, el paso determinante para obtener excelencia en los resultados es la definición de la ecuación para el ajuste. Una vez ésta se ha definido, el cálculo de estimaciones iniciales de los parámetros y el criterio de convergencia son requeridos, aunque con un mínimo de exigencia, ya que el programa de regresión no lineal del SPSS es de gran capacidad, lo cual permite flexibilidad en tales estimaciones.

Los parámetros cinéticos de la acetilcolinesterasa están relacionados entre sí de alguna manera. Esto se infiere directamente de la matriz de coeficientes de correlación. Además, los estudios cinéticos realizados con enzimas anteriormente han establecido ya cierta relación entre estos, lo cual es predecible.

La ecuación cinética que rige las reacciones catalizadas por la acetilcolinesterasa, y que contiene inhibidores, es una ecuación no linealizable, cuya diferenciación da como resultado una ecuación de Bernoulli.

La ecuación de Bernoulli que se encontró indica un factor importante en el mecanismo de catálisis de la acetilcolinesterasa: que ésta presenta un mecanismo de inhibición. Este factor de inhibición no se encuentra en la ecuación de Michaelis-Menten, ni en la ecuación diferencial correspondiente a ella. Sin embargo, este es el único factor

que difiere en ambas ecuaciones diferenciales, lo cual indica que está relacionado de alguna manera con el grado de inhibición de la enzima por el sustrato, ya que el valor de este factor aumenta cuando la inhibición por sustrato de la enzima se lleva a cabo más fácilmente.

La facilidad por la cual se lleva a cabo la inhibición por sustrato de la enzima, que en la ecuación ajustada final se denota por el factor exponencial, también afecta directamente en el valor de los parámetros cinéticos. Un aumento en el grado de inhibición da como resultado un aumento en la velocidad máxima aparente y, consecuentemente aumenta el valor de la constante de Michaelis-Menten. Esta facilidad de inhibición se puede inferir también a partir de la diferencia que existe entre la velocidad máxima aparente y la velocidad óptima, es decir, que entre más grande sea dicha diferencia, la inhibición por sustrato es mayor. En los casos estudiados, la acetilcolinesterasa perteneciente a la cepa MSE presentó una mayor facilidad para ser inhibida por su sustrato que la enzima perteneciente a la cepa SELIAM, y además el valor de la K_m (ap) fue mayor.

Los parámetros A y C de la ecuación empírica obtenida corresponde a los parámetros cinéticos V_{max} (ap) y K_m (ap), respectivamente. El parámetro K_{si} (ap) está incluido en el exponente $(B + n)$, quedando pendiente la postulación de un mecanismo cinético que resulte en la derivación de una ecuación del tipo de la que ajustó mejor los datos experimentales.

VIII. RECOMENDACIONES

A. Se recomienda tener muchos datos experimentales cuando se realice un ajuste por regresión no lineal, y que los datos estén distribuidos en un rango amplio de valores en x , para poder obtener resultados satisfactorios y significativos. Para aseverar la validez de la ecuación matemática seleccionada, es aconsejable realizar muchas veces el ajuste con muchos conjuntos de datos, para poder hacer una buena definición de la curva común.

B. Se recomienda, a la hora de hacer un ajuste de curva por regresión no lineal, definir claramente la ecuación o función matemática que se utilizará para el ajuste. Esto agiliza los siguientes pasos de regresión, y evita cambios que pudieran hacerse posteriormente.

C. Para completar el estudio cinético teórico de la acetilcolinesterasa, se recomienda hacer un análisis profundo del mecanismo de reacción de dicha enzima. La ecuación de Bernoulli obtenida da algunas indicaciones acerca de tal mecanismo, pero una explicación física completa de éste sólo puede hacerse por medio de estudios fisicoquímicos cinéticos y moleculares de la reacción.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Alles, G. and Hawes, F.C. (1940) Cholinesterases in the blood of man. J. Biol. Chem. **133**: 375-390
- Atsumi, S.; Sakamoto, H.; Yokota, S.; and Fujiwara, T. (1985) Substance P and 5-hydroxytryptamine immunoreactive presynaptic boutons on presumed ex-motoneurons in the chicken ventral horn. Arch. Histol. **48**: 159-172
- Baici, A. (1987) A graphical and statistical analysis of hyperbolic tight-binding inhibition. Biochem. J. **244**: 793-796.
- Chubb, I.W.; Hodgson, A.J.; and White, J.H. (1980) Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. Neuroscience. **5**: 2065-2072.
- Cleland, W.W. (1967) Advanced Enzymology. **29**. The Statistical Analysis of Enzyme Kinetic Data. Pp. 1-32.
- Cornish-Bowden, A. (1979) Fundamentals of enzyme kinetics. 230 p. Butterworths, London, Boston.
- Crompton, I.E. and Waley, S.G. (1986) The determination of specificity constants in enzyme-catalysed reactions Biochem. J. **239**: 221-224.
- Dary, O. (1989) Purification, characterization and kinetic studies of a wild-and a insecticide-insensitive acetylcholinesterase of mosquito (Culex spp.). Tesis Ph. D. En Bioquímica de University of California Riverside.
- Froede, H.C. and Wilson, J.B. (1971) Acetylcholinesterase, in The Enzymes. 3 ed. (Boyer, R.D., Ed), vol. V, 114 p. Academic Press, New York, London.
- Guardabasso, R.; Munson, P.J.; and Roddard, D. (1988) A versatile method for simultaneous analysis of families of curves. FASEB J. **2**: 209-215
- Hellenbrand, S. and Krupka, R.M. (1970) Kinetic studies on the mechanism of insect acetylcholinesterase. Biochemistry. **9**:65-72.

- Holmstedt, B. (1963) Structure-activity relationships in the anticholinesterase agents, in Cholinesterase Agents (Eichler O, Farah A. and Koelle C.B., Eds), pp. 427-485. Springer-Verlag, Berlin, Gostingen, Heidelberg.
- Lawson, C.L. and Hanson, R. J. (1974) Practical Analysis of Least Squares Problems, in Solving Least Squares Problems. pp. 180-196. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Lockridge, O. (1982) Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. J Neurochem. 39:106-110.
- Miller, T. J. ; and Chubb, I. W. (1984) Sections of cheek retinae treated with acetylcholinesterase show enhanced enkephalin and substance P immunoreactivity. Neuroscience. 12:441-451.
- Motulsky, H. J. and Ransnas, L. A. (1987) Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. FASEB J. 1:365-374.
- Perrella, F. W. (1988) EZ-FIT: A practical curve -fitting microcomputer program for the analysis of enzyme kinetic data on IBM-PC compatible computers. Anal. Biochem. 175:434-447.
- Ratkowsky, D. A. (1986) A suitable parameterization of the Michaelis-Menten enzyme reaction. Biochem. J. 240:357-360.
- Sakamoto, H. ; Ohsato, K. ;and Atsumi, S. (1985) Acetylcholinesterase activity at the presynaptic boutons with presumed ex-motoneurons in chicken ventral horn. Light- and electronmicroscopic studies. Histochemistry. 83:291-298.

Toutant, J.P. and Maussolié, J. (1987) Acetylcholinesterase, in Mammalian Ectoenzymes (Kenny, A. J. and Turner, A. J., Eds), pp.289-328. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.

Yoshino, M. (1987) A graphical method for determining inhibition parameters for partial and complete inhibitors. Biochem. J. 248:815-820.

Zill, D. G. (1986) Ecuaciones diferenciales con aplicaciones. Iberoamérica, México. 524p.

i. ANEXOS

A. Anexo de Ecuaciones

X representa la concentración variable de un sustrato

v representa la velocidad de reacción

1. Ecuación de Michaelis-Menten

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

2. Ecuación de Lineweaver-Burk

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

3. Ecuación de Hanes

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

4. Ecuación de Eadie-Hofstee

$$v = V_{max} - K_m * \frac{v}{X}$$

5. Ecuación teórica de la acetilcolinesterasa (tomada de Dary, 1989)

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \left(\frac{X}{K_{Si}}\right)^{N_i} + \left(\frac{K_m}{X}\right)}$$

$$= \frac{V_{max} * X}{X + X \left(\frac{X}{K_{Si}}\right)^{N_i} + K_m}$$

6. Ecuación final para el ajuste de datos cinéticos de la acetilcolinesterasa

$$y = \frac{A * X^B}{X^{(B+n)} + C}$$

donde $n = 0.675$ ó $n = 0.310$

7. Generalización de la Ecuación de Bernoulli

$$y' = P(X) * y + Q(X) * y^n$$

donde n es un entero

8. Derivación de la ecuación diferencial de la ecuación (6)

$$y' = \frac{(B-1)}{X} * y - \frac{((B+n)/A)}{X^{(1-n)}} * y^2$$

9. Ecuación matemática de la curva de inhibición

$$Y = \frac{E * X^B + C}{X^{(B+n)} + C}$$

donde E es un factor de escalamiento

B. Anexo de Símbolos

$[E]_0$	concentración total de enzima en el sistema
EI	complejo enzima-inhibidor
ES	complejo enzima-sustrato
k	constante de velocidad de reacción simple
K	constante de equilibrio de una reacción
k_{cat}	constante de velocidad de la reacción catalizada
K_i	constante de inhibición
K_m	constante de Michaelis-Menten aparente (*)
K_{si}	constante de inhibición por sustrato, aparente (*)
N_i	coeficiente de simetría de gráfica
P	producto
$[S]_{opt}$	concentración de sustrato óptima experimental
v	velocidad de reacción
V_{max}	velocidad máxima extrapolada (en presencia de inhibición por sustrato) (*)
V_{opt}	velocidad óptima experimental de la reacción
X ó [S]	concentración de sustrato

(*) En el caso de las enzimas inhibidas por su sustrato, estos parámetros son complejos, por lo que usualmente se les agrega como un subíndice la definición de aparente (ver Dary, 1989).

C. Anexo del procedimiento

A continuación, la secuencia de pasos a seguir para ingresar y utilizar el programa de regresión no lineal del SPSS.

1. Para entrar al paquete estadístico, teclear SPSS y ENTER. Aparece en la pantalla el menú principal.
2. Seleccionar en el menú con el cursor la opción RUN DOS AND OTHER PROGRAMS y presionar ENTER.
3. Presionar F10 y luego ENTER para regresar nuevamente al sistema operativo.
4. Teclear: COPY A:DATOS C:NOMBRE.PAD
DATOS es un archivo previamente creado que contiene los datos como se muestra en las siguientes páginas. NOMBRE.PAD es el archivo que se crea en el SPSS y que utiliza para realizar el proceso de regresión no lineal.
5. Teclear EXIT y luego ENTER.
6. ENTER.
7. CTRL E y luego HOME.
8. ENTER. Se realiza el proceso y se van dando las iteraciones hasta que el programa converge y saca los resultados de cada ajuste.
9. Para salir teclear FINISH.
10. F10 ENTER.

Cepa: SELIAM
Control

x = Concentración de Sustrato (mM)
t14 = Velocidad de reacción (nm/min.)

data list free / x t14.
begin data.

0.01	0.646
0.02	1.549
0.03	2.331
0.05	3.010
0.10	5.586
0.20	7.666
0.50	8.946
1.00	8.861
2.50	8.251
5.00	7.198
10.00	6.448
20.00	3.335

end data.

model program a=1 b=1 c=1.
compute p=a*x**b/(x**(b+0.310)+c)
nlr t14 with x..

FINISH.

Sepa: MSE
Inhibidor: tetrametil amonio 0.5 mM

x = Concentración de sustrato (mM)
y14a = Velocidad reacción (nm/min.)

PROCESO SPSS:

```
data list free / x y14a.
```

```
begin data.
```

```
0.01 0.384  
0.02 0.675  
0.03 0.851  
0.06 1.616  
0.10 3.074  
0.20 5.555  
0.50 7.544  
1.00 9.556  
2.50 9.741  
5.00 8.001  
10.00 6.466  
20.00 4.938
```

```
end data.
```

```
model program a=1 b=1 c=1.
```

```
compute pred = a*(x**b)/(x**(b+.675)+c).
```

```
nls y14a with x.
```

```
FINISH.
```

Sepa: MSE
Inhibidor: tetraetil amonio 0.6 mM

x = Concentración de sustrato (mM)
y13a = Velocidad de reacción (nm/min.)
t13a = Vel. reacción del control

PROCESO SPSS:

```
data list free / x y13a t13a.  
begin data.
```

.01	0.237	0.396
0.02	0.560	0.969
0.03	0.723	1.543
0.06	1.198	2.297
0.10	2.379	3.559
0.20	3.812	6.105
0.50	5.813	7.829
1.00	7.993	8.861
2.50	8.226	8.297
5.00	7.805	7.857
10.00	6.598	6.345
20.00	4.044	4.583

```
end data.
```

```
model program a=1 b=1 c=1.  
compute pred= a*(x**b)/(x**(b+.675)+c).  
nlr y13a with x.
```

```
model program a=1 b=1 c=1.  
compute pred = a*(x**b)/(x**(b+.675)+c).  
nlr t13a with x.
```

```
FINISH.
```

D. Anexo de Resultados

Cepa: SELIAM
Control

x = Concentración de Sustrato (mM)
t14 = Velocidad de reacción (nm/min.)

SPSS/PC+ The Statistical Package for IBM PC

```
data list free / x t14.  
begin data.  
end data.
```

12 cases are written to the compressed active file.

```
model program a=1 b=1 c=1.  
compute pred=a*x**b/(x**(b+0.310)+c).  
nlr t14 with x.
```

All the derivatives will be calculated numerically.

Iteration	Residual SS	A	B	C
1	394.3460380	1.00000000	1.00000000	1.00000000
1.1	8713.442179	13.6981863	-12.369910	-8.2768209
1.2	1399.981997	1.96027636	-.04244682	-1.6309267
1.3	383.6807417	1.09524168	.894494257	.735739413
2	383.6807417	1.09524168	.894494257	.735739413
2.1	359.4062574	1.27320478	.744402010	.437636340
3	359.4062574	1.27320478	.744402010	.437636340
3.1	316.8398387	1.57255930	.623854448	.237215106
4	316.8398387	1.57255930	.623854448	.237215106
4.1	257.0990962	2.08892845	.549157000	.135519102
5	257.0990962	2.08892845	.549157000	.135519102
5.1	192.1850924	2.99568378	.546448160	.099343616
6	192.1850924	2.99568378	.546448160	.099343616
6.1	117.7729728	4.57186782	.665743821	.109075189
7	117.7729728	4.57186782	.665743821	.109075189
7.1	31.28049588	7.67972758	.889174115	.138599541
8	31.28049588	7.67972758	.889174115	.138599541
8.1	3.461130133	11.3673048	.806292266	.250174018
9	3.461130133	11.3673048	.806292266	.250174018
9.1	3.130823514	11.5730722	.843750942	.246868392
10	3.130823514	11.5730722	.843750942	.246868392
10.1	3.130507327	11.5836709	.841156988	.248621252
11	3.130507327	11.5836709	.841156988	.248621252
11.1	3.130505759	11.5842857	.841176934	.248663468
12	3.130505759	11.5842857	.841176934	.248663468
12.1	3.130505753	11.5843436	.841165839	.248671475

Run stopped after 26 model evaluations and 12 derivative evaluations.
 Iterations have been stopped because the relative reduction between
 successive
 residual sums of squares is at most SSSCON = 1.000E-08

Nonlinear Regression Summary Statistics Dependent Variable T14

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	435.28820	145.09607
Residual	9	3.13051	.34783
Uncorrected Total	12	438.41870	
(Corrected Total)	11	98.92821	

R squared = 1 - Residual SS / Corrected SS = .96836

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
A	11.584343595	.622047410	10.177174592	12.991512599
B	.841165839	.086647777	.645154950	1.037176729
C	.248671475	.063435920	.105169454	.392173496

Asymptotic Correlation Matrix of the Parameter Estimates

	A	B	C
A	1.0000	-.6195	.8058
B	-.6195	1.0000	-.9090
C	.8058	-.9090	1.0000

FINISH.

RESULTADOS

Cepa: MSE
 Inhibidor: tetrametil amonio 0.5 mM

data list free / x y14A.
 begin data.
 end data.

12 cases are written to the compressed active file.

model program a=1 b=1 c=1.
 compute pred = a*(x**b)/(x**(b+.675)+c).
 nlr y14A with x.

Iteration	Residual	SS	A	B	C
1	382.4414892	1.00000000	1.00000000	1.00000000	1.00000000
1.1	716988.3054	28.4719373	-9.2470956	19.7543516	
1.2	1504.001152	3.50328922	-.27503323	-2.5981542	
1.3	365.7076119	1.22616293	.858175643	.649584855	
2	365.7076119	1.22616293	.858175643	.649584855	
2.1	336.2252385	1.58363471	.736340019	.399063348	
3	336.2252385	1.58363471	.736340019	.399063348	
3.1	296.6574734	2.09829564	.663032204	.267256804	
4	296.6574734	2.09829564	.663032204	.267256804	
4.1	247.0754930	2.97081160	.638611898	.196329994	
5	247.0754930	2.97081160	.638611898	.196329994	
5.1	192.8130276	4.47812362	.723874515	.192654404	
6	192.8130276	4.47812362	.723874515	.192654404	
6.1	121.3295247	7.33449578	.919595934	.237148922	
7	121.3295247	7.33449578	.919595934	.237148922	
7.1	50.66142119	13.0859559	.999189506	.444566185	
8	50.66142119	13.0859559	.999189506	.444566185	
8.1	29.13993721	21.8527698	.584750936	1.14442325	
9	29.13993721	21.8527698	.584750936	1.14442325	
9.1	5.514337627	30.1111916	.608518567	2.00615476	
10	5.514337627	30.1111916	.608518567	2.00615476	
10.1	3.165743473	31.8905163	.646078617	2.30264191	
11	3.165743473	31.8905163	.646078617	2.30264191	
11.1	3.132879163	32.2665307	.640681774	2.37843597	
12	3.132879163	32.2665307	.640681774	2.37843597	
12.1	3.132337319	32.3446541	.639572440	2.39069672	
13	3.132337319	32.3446541	.639572440	2.39069672	
13.1	3.132327703	32.3556252	.639427306	2.39234208	
14	3.132327703	32.3556252	.639427306	2.39234208	
14.1	3.132327537	32.3570837	.639407177	2.39256043	
15	3.132327537	32.3570837	.639407177	2.39256043	
15.1	3.132327534	32.3572744	.639404636	2.39258893	

Run stopped after 32 model evaluations and 15 derivative evaluations.
 Iterations have been stopped because the relative reduction between successive residual sums of squares is at most SSCON = 1.000E-08

Nonlinear Regression Summary Statistics Dependent Variable Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	414.43907	138.14636
Residual	9	3.13233	.34804
Uncorrected Total	12	417.57139	
(Corrected Total)	11	133.34833	

R squared = 1 - Residual SS / Corrected SS = .97651

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
A	32.357274421	2.459331235	26.793880653	37.920668189
B	.639404636	.055629122	.513562818	.765246453
C	2.392588931	.343415076	1.615730057	3.169447805

Asymptotic Correlation Matrix of the Parameter Estimates

	A	B	C
A	1.0000	-.6308	.9233
B	-.6308	1.0000	-.7179
C	.9233	-.7179	1.0000

FINISH.

RESULTADOS

```
data list free / x y13a t13a.
begin data.
end data.
```

12 cases are written to the compressed active file.

```
model program a=1 b=1 c=1.
compute pred= a*(x**b)/(x**(b+.675)+c).
nlr y13a with x.
```

Iteration	Residual	SS	A	B	C
1	278.9231863	1.000000000	1.000000000	1.000000000	1.000000000
1.1	623709.3836	26.5454168	-7.7503745	22.7291611	
1.2	1019.579560	3.51856074	.108912208	-2.2584999	
1.3	266.5577190	1.22357669	.888261630	.678152180	
2	266.5577190	1.22357669	.888261630	.678152180	
2.1	244.8826116	1.58341402	.778881701	.428793243	
3	244.8826116	1.58341402	.778881701	.428793243	
3.1	212.0556503	2.17516794	.703930150	.275297303	
4	212.0556503	2.17516794	.703930150	.275297303	
4.1	174.4705094	3.17689643	.704619902	.213562551	
5	174.4705094	3.17689643	.704619902	.213562551	
5.1	131.5505571	4.92093034	.829745723	.231256330	
6	131.5505571	4.92093034	.829745723	.231256330	
6.1	76.96977380	8.36139187	1.03893678	.330895083	
7	76.96977380	8.36139187	1.03893678	.330895083	
7.1	31.81196627	14.7607133	.856212060	.786420887	
8	31.81196627	14.7607133	.856212060	.786420887	
8.1	17.62732367	25.5992078	.507532546	2.08139020	
9	17.62732367	25.5992078	.507532546	2.08139020	
9.1	2.283543428	32.6555609	.599305906	3.12177205	
10	2.283543428	32.6555609	.599305906	3.12177205	
10.1	1.588967534	32.8361263	.638143827	3.28482098	
11	1.588967534	32.8361263	.638143827	3.28482098	
11.1	1.585974879	32.9976017	.634704064	3.32536513	
12	1.585974879	32.9976017	.634704064	3.32536513	
12.1	1.585948806	33.0165462	.634616641	3.32909840	
13	1.585948806	33.0165462	.634616641	3.32909840	
13.1	1.585948557	33.0188438	.634577195	3.32953524	
14	1.585948557	33.0188438	.634577195	3.32953524	
14.1	1.585948555	33.0190233	.634576571	3.32957008	

Run stopped after 30 model evaluations and 14 derivative evaluations.
Iterations have been stopped because the relative reduction between successive

residual sums of squares is at most SSCON = 1.000E-08

Nonlinear Regression Summary Statistics Dependent Variable Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	307.08440	102.36147
Residual	9	1.58595	.17622
Uncorrected Total	12	308.67035	
(Corrected Total)	11	105.40580	

R squared = 1 - Residual SS / Corrected SS = .98495

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
A	33.019023333	2.157889626	28.137537858	37.900508807
B	.634576571	.046195696	.530074647	.739078495
C	3.329570076	.382112480	2.465171593	4.193968559

Asymptotic Correlation Matrix of the Parameter Estimates

	A	B	C
A	1.0000	-.6487	.9301
B	-.6487	1.0000	-.6783
C	.9301	-.6783	1.0000

```
model program a=1 b=1 c=1.
compute pred = a*(x**b)/(x**(b+.675)+c).
nlr t13a with x.
```

Iteration	Residual SS	A	B	C
1	356.7636353	1.000000000	1.000000000	1.000000000
1.1	647208.4011	27.0757056	-13.150092	20.1690587
1.2	3289.041293	3.34749245	-.63425963	-2.5575110
1.3	340.1839082	1.21252383	.830042677	.654799598
2	340.1839082	1.21252383	.830042677	.654799598
2.1	310.3881847	1.54574319	.694407918	.405076610
3	310.3881847	1.54574319	.694407918	.405076610
3.1	269.9719864	2.01820674	.612358561	.271258455
4	269.9719864	2.01820674	.612358561	.271258455
4.1	219.7580120	2.80786080	.573905833	.194943766

5	219.7580120	2.80786080	.573905833	.194943766
5.1	170.0493466	4.16805607	.643859628	.186886911
6	170.0493466	4.16805607	.643859628	.186886911
6.1	107.4575672	6.71431425	.817135991	.227103514
7	107.4575672	6.71431425	.817135991	.227103514
7.1	46.76160066	11.8931381	.894752329	.411352834
8	46.76160066	11.8931381	.894752329	.411352834
8.1	31.87727572	19.6464138	.520468423	1.03793710
9	31.87727572	19.6464138	.520468423	1.03793710
9.1	7.838500624	26.4510577	.550168306	1.75009345
10	7.838500624	26.4510577	.550168306	1.75009345
10.1	4.501789803	30.3307233	.544466933	2.29292336
11	4.501789803	30.3307233	.544466933	2.29292336
11.1	4.262839625	31.6373538	.535013547	2.51206168
12	4.262839625	31.6373538	.535013547	2.51206168
12.1	4.251925939	32.0083313	.531135478	2.57175834
13	4.251925939	32.0083313	.531135478	2.57175834
13.1	4.251513587	32.0874098	.530352030	2.58386192
14	4.251513587	32.0874098	.530352030	2.58386192
14.1	4.251499317	32.1025289	.530194247	2.58615635
15	4.251499317	32.1025289	.530194247	2.58615635
15.1	4.251498833	32.1053094	.530166219	2.58657672
16	4.251498833	32.1053094	.530166219	2.58657672
16.1	4.251498816	32.1058223	.530160914	2.58665435

Run stopped after 34 model evaluations and 16 derivative evaluations.
Iterations have been stopped because the relative reduction between successive residual sums of squares is at most SSCON = 1.000E-08

Nonlinear Regression Summary Statistics Dependent Variable T

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	386.08498	128.69499
Residual	9	4.25150	.47239
Uncorrected Total	12	390.33648	

(Corrected Total) 11 103.77257

R squared = 1 - Residual SS / Corrected SS = .95903

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
A	32.105822306	3.246273805	24.762240765	39.449403846
B	.530160914	.056321580	.402752647	.657569180
C	2.586654350	.468125426	1.527681066	3.645627635

Asymptotic Correlation Matrix of the Parameter Estimates

	A	B	C
A	1.0000	-.6433	.9358
B	-.6433	1.0000	-.7368
C	.9358	-.7368	1.0000

FINISH.

E. Anexo de Gráficas

Cepa: SELIAM

CONTROL

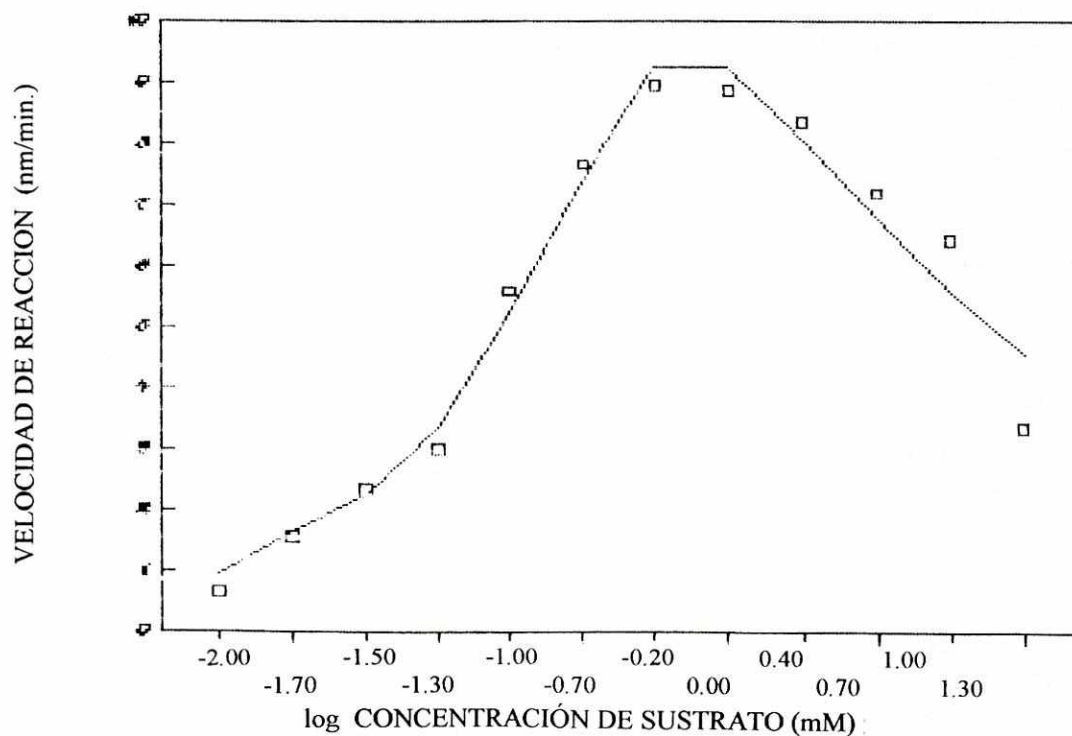
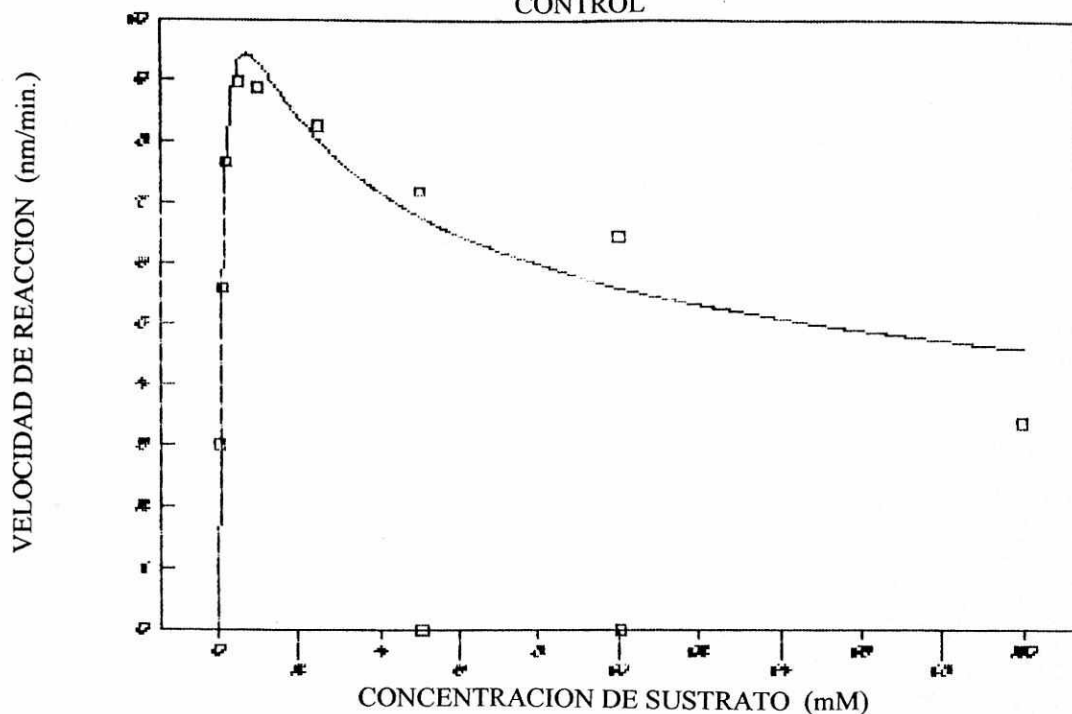


Figura 1 - La gráfica superior muestra la curva ajustada (línea continua) con los datos experimentales (puntos aislados) superpuestos a ella. Estos datos corresponden al conjunto de control de la cepa SELIAM. La gráfica inferior está trazada utilizando los mismos valores pero utilizando el logaritmo de los valores en x.

Cepa: MSE

CONTROL

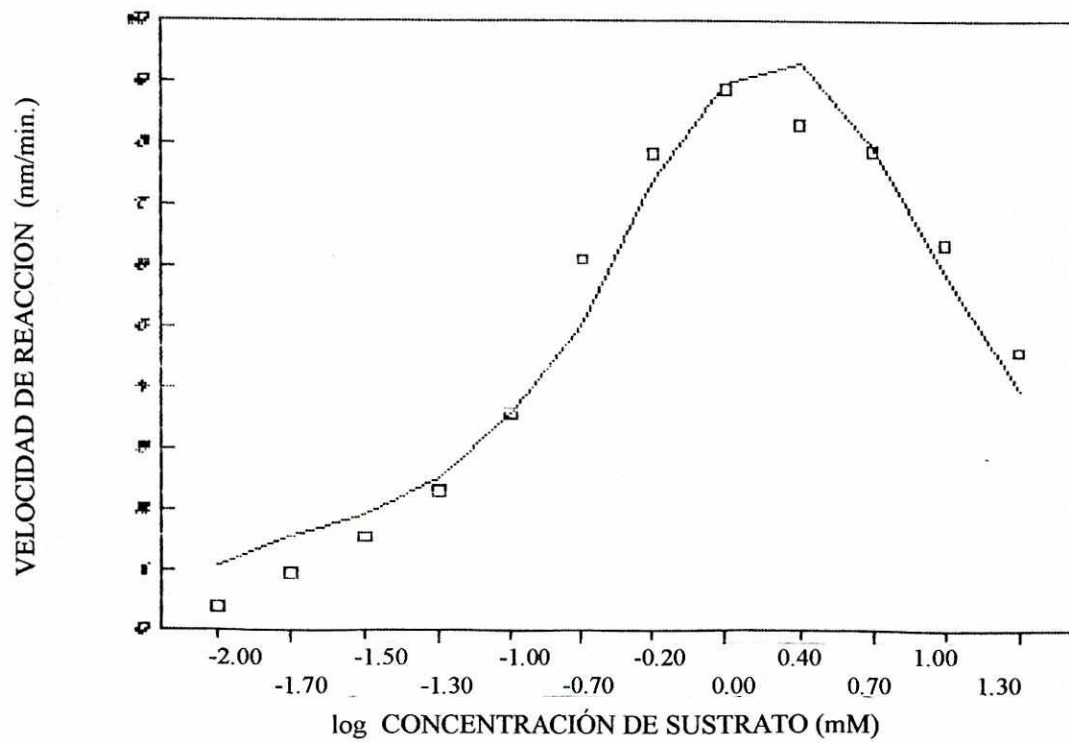
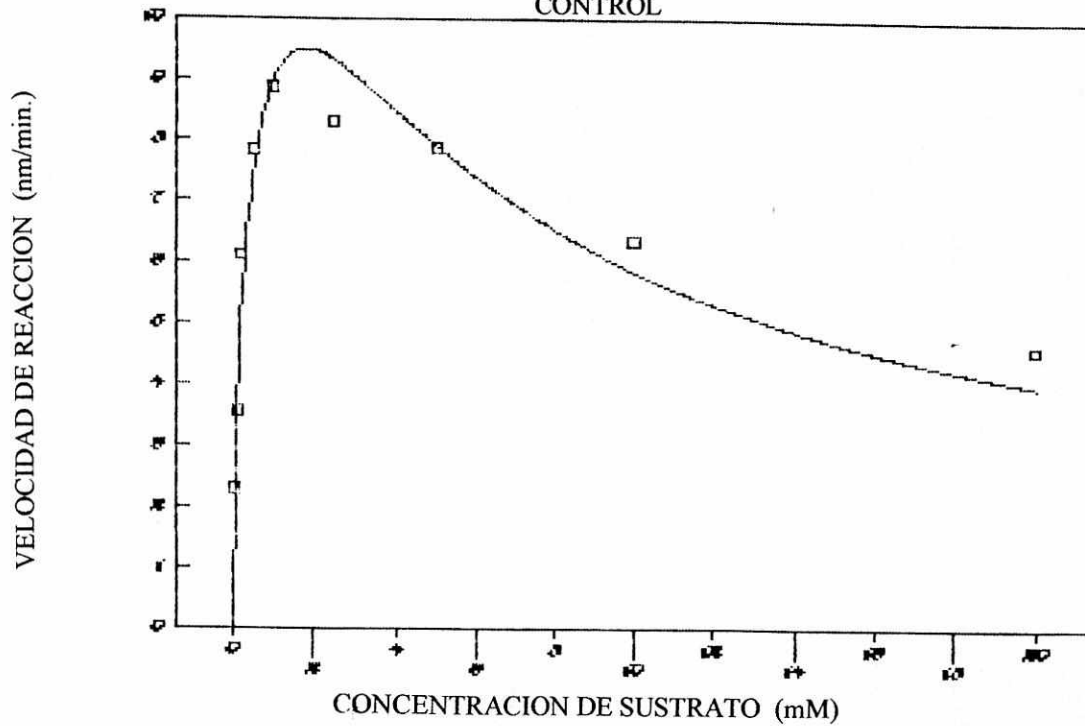


Figura 2 - La gráfica superior muestra la curva ajustada (línea continua) con los datos experimentales (puntos aislados) superpuestos a ella. Estos datos corresponden al conjunto de control de la cepa MSE. La gráfica inferior está trazada utilizando los mismos valores pero utilizando el logaritmo de los valores en x.

Cepa: MSE

INH. TETRAMETIL AMONIO 0.5 mM

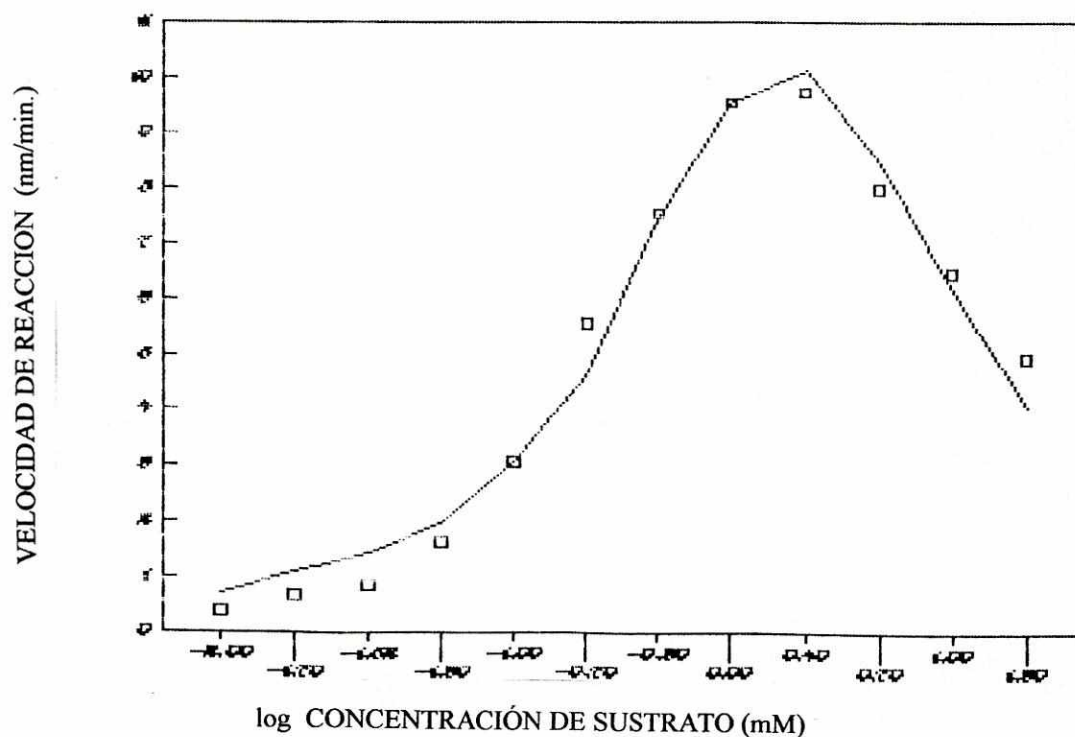
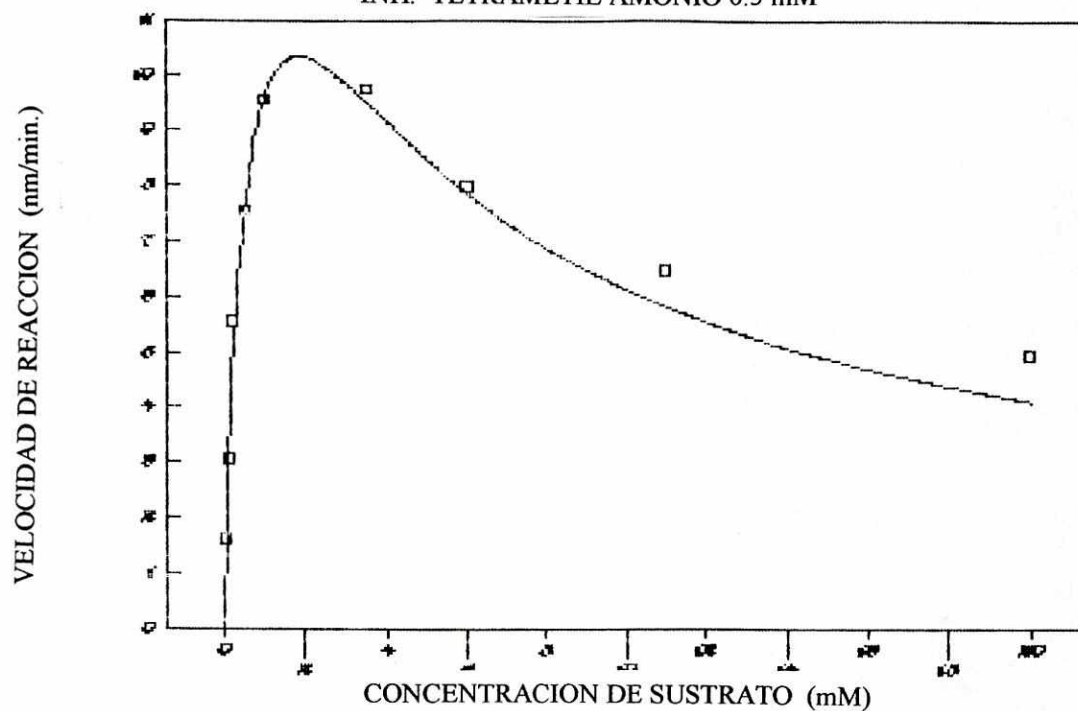


Figura 3 - La gráfica superior muestra la curva ajustada (línea continua) con los datos experimentales (puntos aislados) superpuestos a ella. Estos datos corresponden al conjunto para la cepa MSE con TETRAMETIL AMONIO 0.5 mM como el inhibidor. La gráfica inferior está trazada utilizando los mismos valores pero utilizando el logaritmo de los valores en x.

Cepa: MSE
INH. TETRAETIL AMONIO 0.6 mM

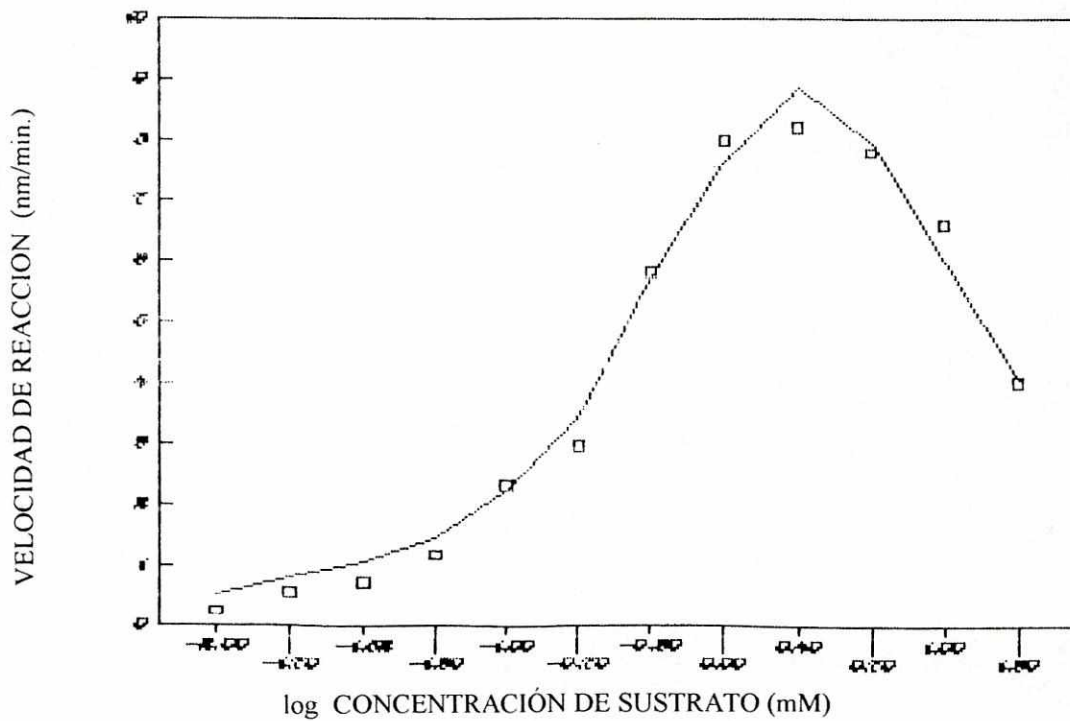
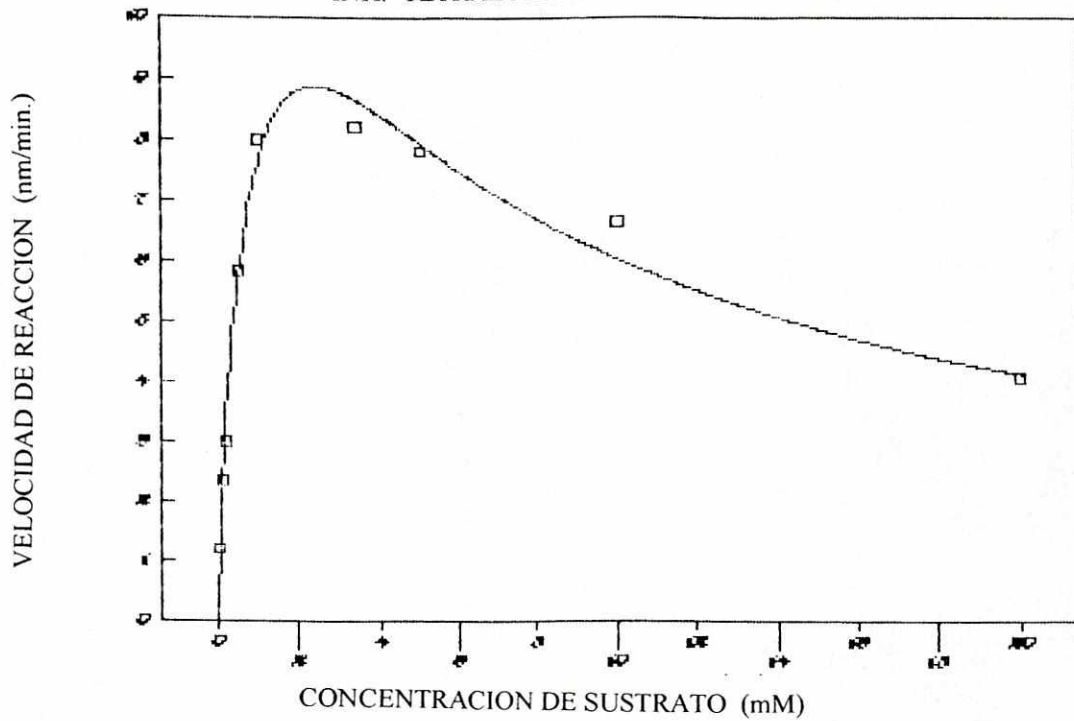


Figura 4 - La gráfica superior muestra la curva ajustada (línea continua) con los datos experimentales (puntos aislados) superpuestos a ella. Estos datos corresponden al conjunto para la cepa MSE con TETRAETIL AMONIO 0.6 mM como el inhibidor. La gráfica inferior está trazada utilizando los mismos valores pero utilizando el logaritmo de los valores en x.

Cepa: MSE

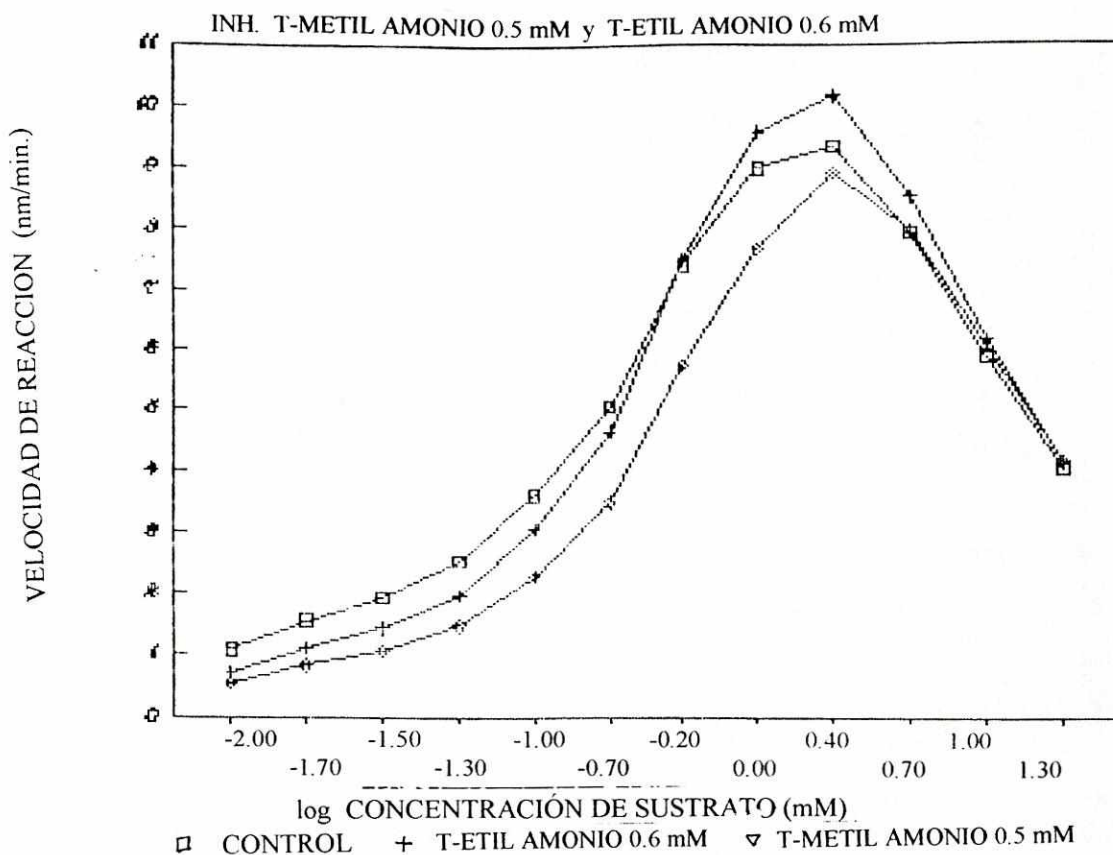


Figura 5 - Se muestran las gráficas de las curvas ajustadas de los tres conjuntos de datos correspondientes a la cepa MSE: Control, con T-Metil Amonio 0.5 mM y T-Etil Amonio 0.6 mM (inhibidores) trazadas con el logaritmo de la concentración de sustrato (en mM) en el eje x.

Cepa: SELIAM

CONTROL

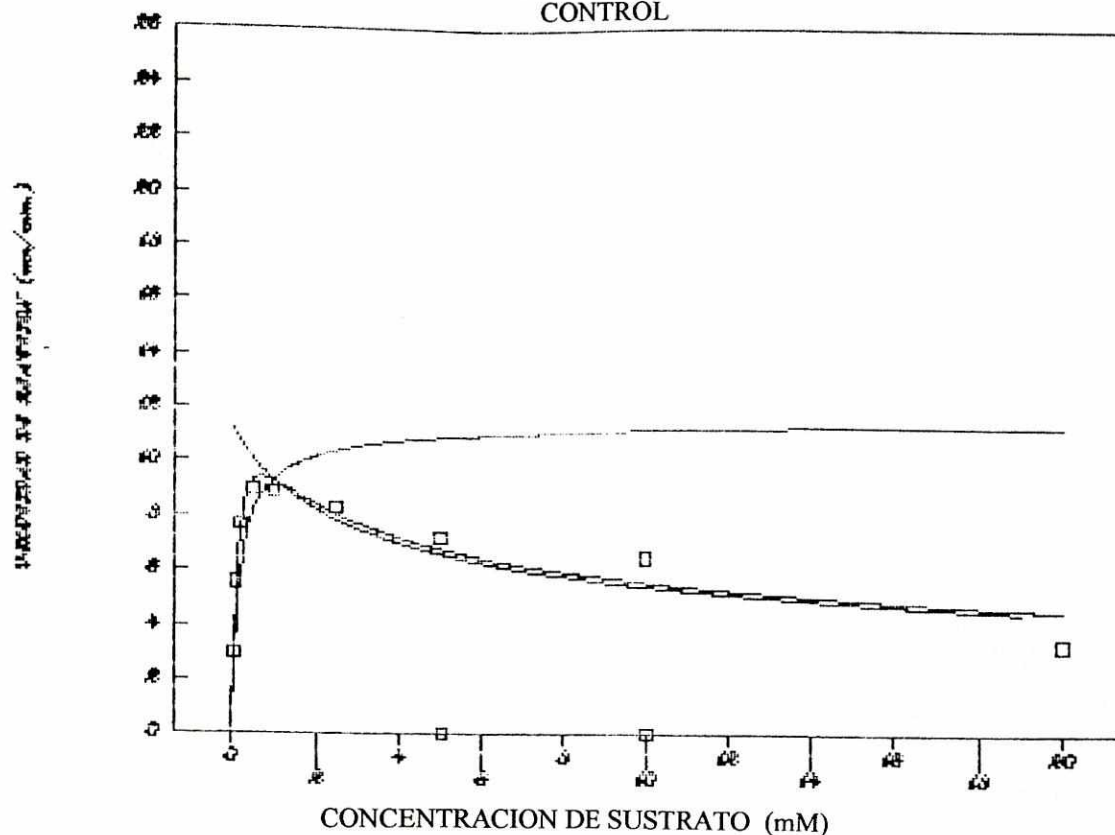


Figura 6 - Datos correspondientes a la cepa SELIAM control. La curva acampanada es la gráfica de la ecuación a la cual fueron ajustados los datos experimentales (puntos aislados). Esta ecuación (que representa la reacción completa de la enzima) se descompone para obtener una curva de Michaelis-Menten teórica (que representaría la reacción sin la parte inhibitoria y que corresponde con la parte inicial de la reacción completa) y la parte complementaria que llamamos curva de inhibición (que coincide con la segunda parte de la gráfica de la reacción completa).

Cepa: MSE

CONTROL

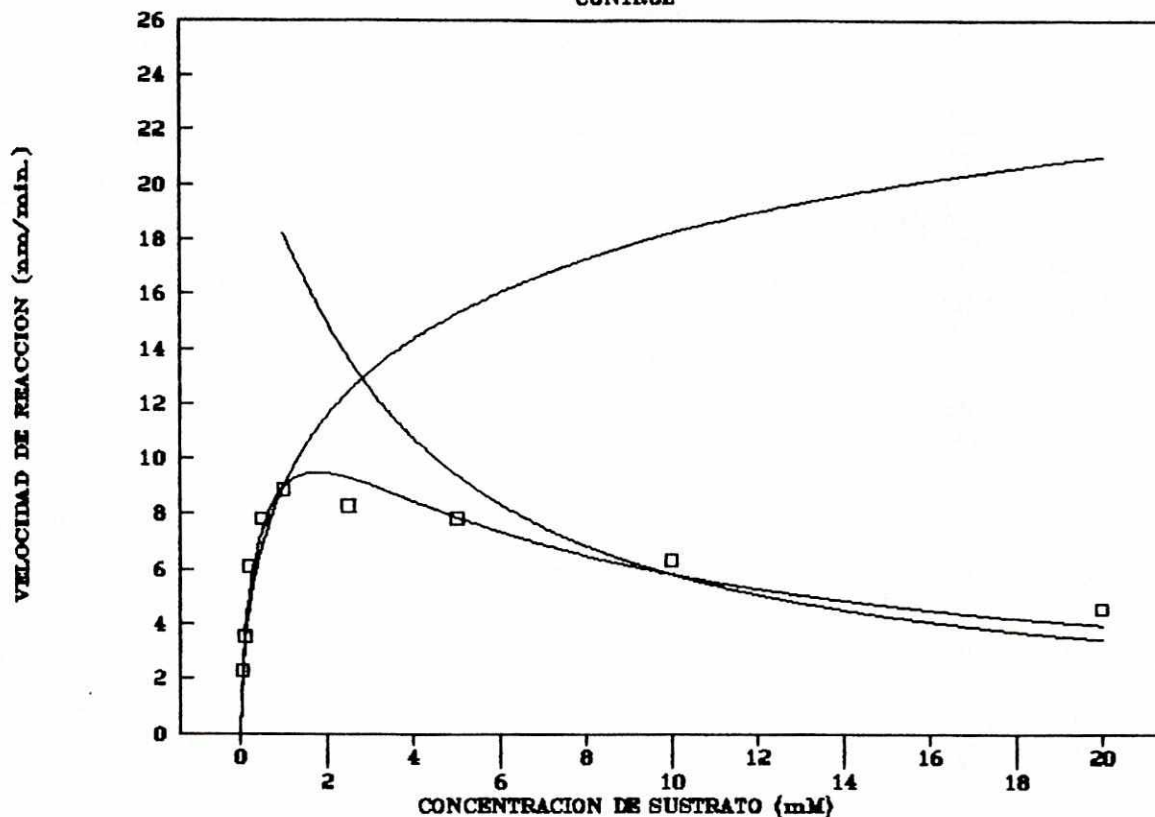


Figura 7 - Datos correspondientes a la cepa MSE control. La curva acampanada es la gráfica de la ecuación a la cual fueron ajustados los datos experimentales (puntos aislados). Esta ecuación (que representa la reacción completa de la enzima) se descompone para obtener una curva de Michaelis-Menten teórica (que representaría la reacción sin la parte inhibitoria y que corresponde con la parte inicial de la reacción completa) y la parte complementaria que llamamos curva de inhibición (que coincide con la segunda parte de la gráfica de la reacción completa).

Cepa: MSE

INH.: TETRAMETIL AMONIO 0.5 mM

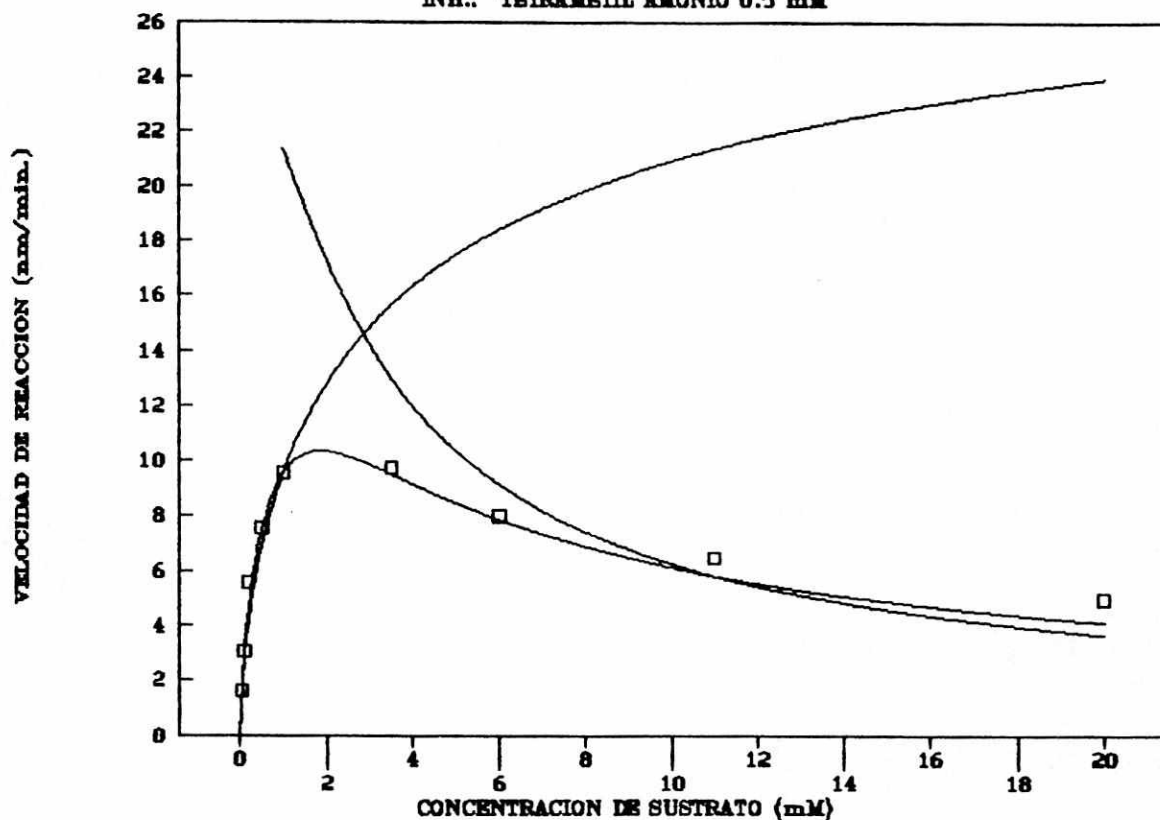


Figura 8 - Datos correspondientes a la cepa MSE con Tetra-Metil Amonio 0.5 mM como el inhibidor. La curva acampanada es la gráfica de la ecuación a la cual fueron ajustados los datos experimentales (puntos aislados). Esta ecuación (que representa la reacción completa de la enzima) se descompone para obtener una curva de Michaelis-Menten teórica (que representaría la reacción sin la parte inhibitoria y que corresponde con la parte inicial de la reacción completa) y la parte complementaria que llamamos curva de inhibición (que coincide con la segunda parte de la gráfica de la reacción completa).

Cepa: MSE

INH.: TETRAETIL AMONIO 0.6 mM

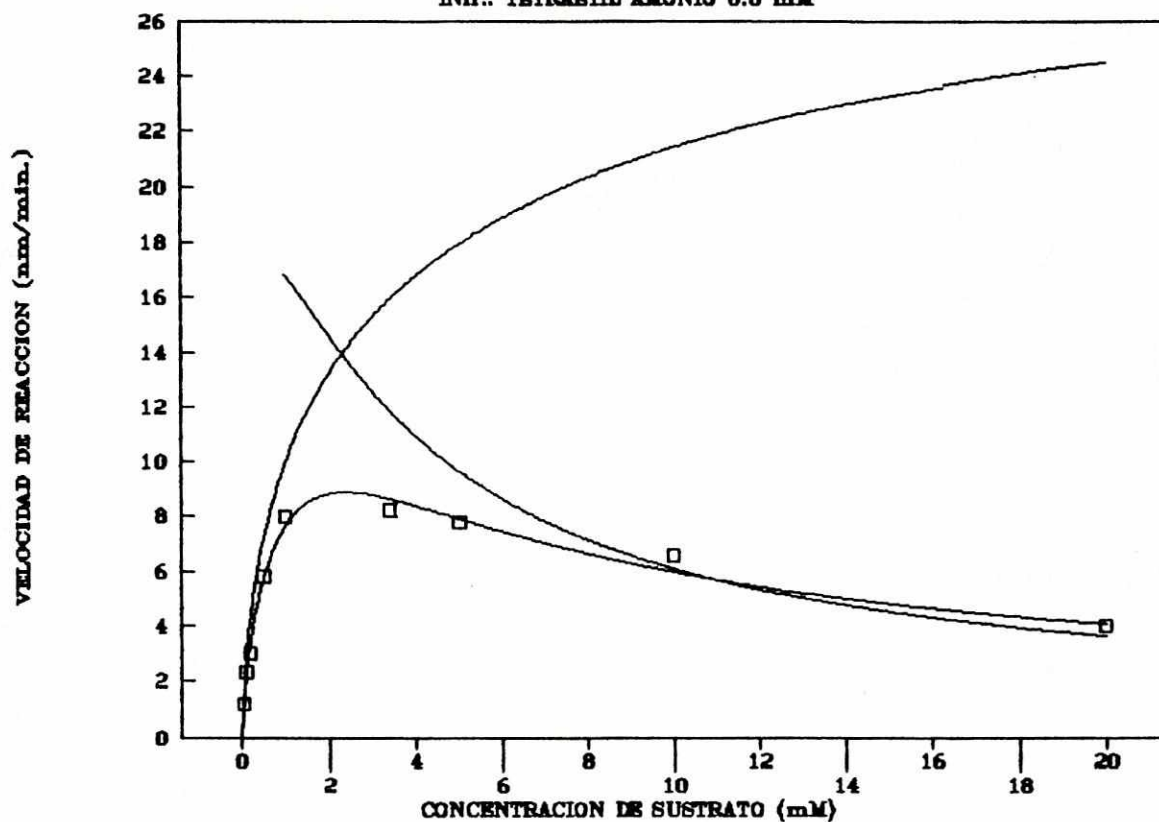


Figura 9 - Datos correspondientes a la cepa MSE con Tetra-Etil Amonio 0.6 mM como el inhibidor. La curva acampanada es la gráfica de la ecuación a la cual fueron ajustados los datos experimentales (puntos aislados). Esta ecuación (que representa la reacción completa de la enzima) se descompone para obtener una curva de Michaelis-Menten teórica (que representaría la reacción sin la parte inhibitoria y que corresponde con la parte inicial de la reacción completa) y la parte complementaria que llamamos curva de inhibición (que coincide con la segunda parte de la gráfica de la reacción completa).