

Métete a Michaelis en el bolsillo

Estimados compañeros bioquímicos:

En esta ocasión os traigo una propuesta para actualizar una práctica clásica en el laboratorio docente, como es la dedicada a obtener los parámetros cinéticos de una enzima, mediante la incorporación de un método robusto de regresión no lineal que proporciona la estimación de dichos parámetros así como su imprecisión.

Probablemente muchos de nosotros estamos acostumbrados a realizar con nuestros alumnos una práctica en la que se determinan los parámetros cinéticos de una enzima siguiendo el diseño de la curva de Michaelis y Menten. El experimento incluye un extracto biológico que contiene la enzima a caracterizar, un sustrato o un producto que puedan medirse empleando un método sencillo, y la preparación de una serie de tubos con concentraciones crecientes del sustrato. A continuación se suelen representar los valores obtenidos a partir de las medidas en una gráfica con velocidad de reacción frente a concentración del sustrato. Seguidamente, se prepara una segunda gráfica con alguna transformación matemática de los datos, tal como la de dobles recíprocos, con el objeto de conseguir una línea recta que permita estimar los valores de la constante de Michaelis y de la velocidad máxima.

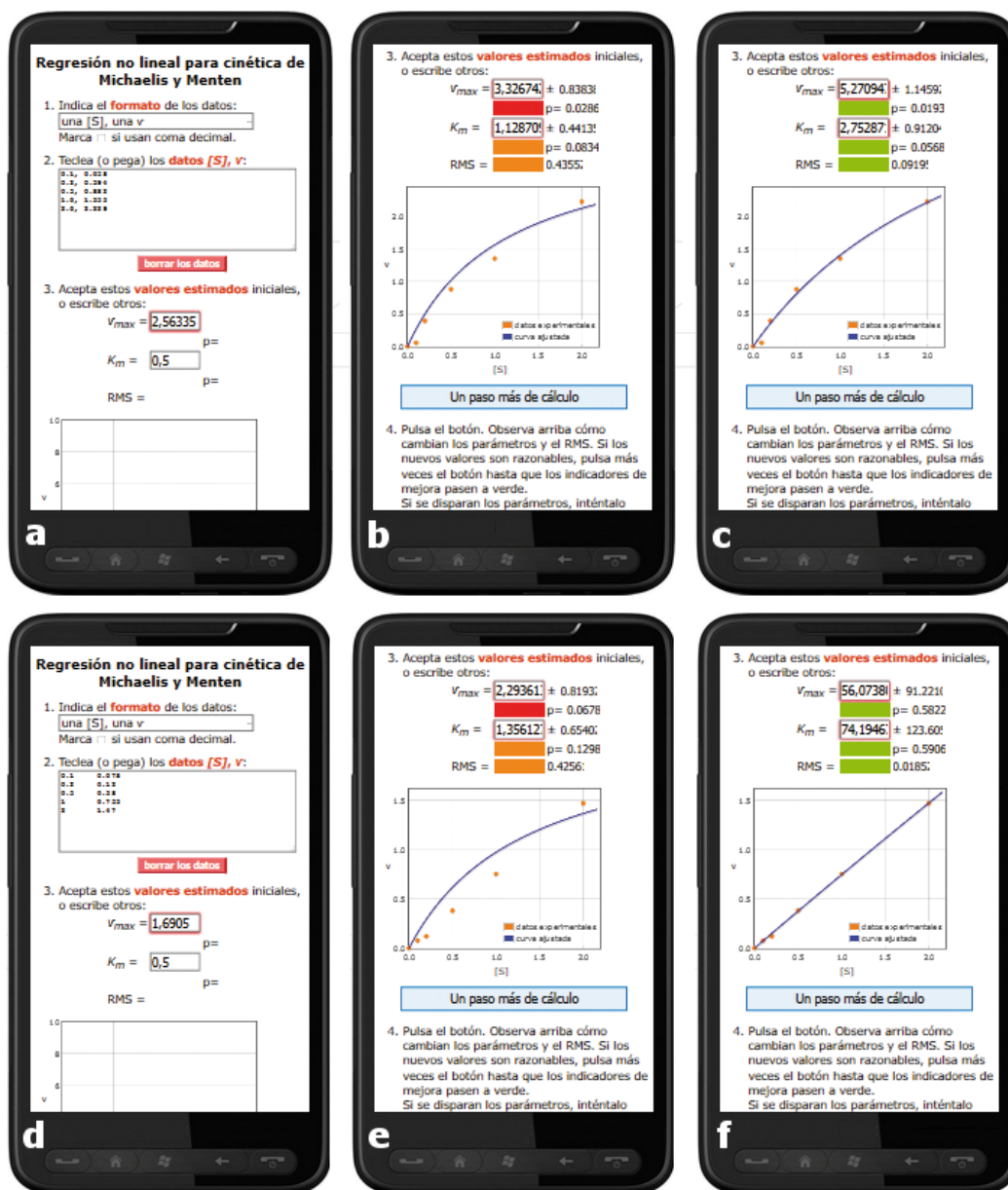
La experiencia vivida a lo largo de los años con esta práctica indica que con este planteamiento cubrimos adecuadamente algunos objetivos formativos y que sirve de refuerzo para lo que enseñamos en las clases “teóricas” en el aula. Sin embargo, la fiabilidad de los valores estimados con este método es muy baja, en las circunstancias realistas de nuestros laboratorios docentes. Se suma a ello el hecho de que existe amplia y ya antigua bibliografía sobre lo inadecuado estadísticamente de las representaciones linealizadas: al calcular el inverso, los datos experimentales de valor más bajo, sometidos a un notable error experimental, se convierten en los que más afectan al resultado; presentado de forma más general, debemos decir que se está alterando la uniformidad del error entre las diferentes medidas (en vocabulario técnico, se altera la homocedasticidad de los datos). La respuesta tradicional a este cuestionamiento era que es la única aproximación viable en la práctica, con

estudiantes inexpertos y con medios de cálculo limitados. Hoy en día este argumento ya no es defendible, por lo cual me he planteado la propuesta que os lanzo en este artículo: formar a nuestros estudiantes en el procesamiento de los datos con un abordaje propio de los tiempos que vivimos.

DEBERÍAMOS FORMAR a nuestros estudiantes en el procesamiento de los datos con un abordaje propio de los tiempos en los que vivimos.

A partir de un algoritmo preexistente para calcular regresión no lineal a cualquier ecuación mediante *JavaScript*¹ se ha preparado una aplicación en línea que lo adapta para la cinética enzimática. El usuario introduce datos experimentales de velocidad y concentración, y la aplicación calcula el mejor ajuste a la ecuación de Michaelis y Menten, directamente sin ninguna transformación matemática de los datos. En una segunda etapa, se ha adaptado la aplicación para adecuarla a dispositivos móviles, como el teléfono. Esto abre la posibilidad de que los estudiantes obtengan el resultado final de su trabajo experimental mientras están en el laboratorio, sin necesidad de equipo informático. El único requisito es una conexión a internet en el teléfono o tableta (asequible bien con su tarifa de datos o a través de la red inalámbrica del centro), dado que no se trata, por ahora, de una aplicación nativa que se pueda instalar (las ya famosas *app*).

En el congreso SEBBM de 2013 ya presenté una comunicación (*Cien años de Michaelis y Menten*²) con algunas inquietudes sobre la cuestión de la enseñanza de la cinética enzimática, y de entonces procede el desarrollo y la progresiva mejora de esta aplicación. Este curso hemos tenido la oportunidad de llevarla al laboratorio de prácticas y, a modo de experiencia piloto, olvidar la representación de dobles recíprocos y, en su lugar, inducir a nuestros alumnos a que usaran la aplicación para completar su sesión de trabajo experimental.



Dos ejemplos de ajuste de datos. En la fila superior, a partir de unos pocos datos (a) se obtiene una estimación inicial (b) de los parámetros que rápidamente se consigue ajustar (c, indicadores en color verde). Las desviaciones de los puntos experimentales se traducen en una imprecisión notable, con un 22% de error típico en v_{max} y un 33% en K_m . En el caso de unos datos de peor calidad (d), que no muestran la tendencia hiperbólica hacia la saturación (e), la regresión igualmente conduce a un resultado (f), pero puede apreciarse que no es en absoluto fiable, con errores de 165% tanto en v_{max} como en K_m (Véase la tabla para más detalle de los resultados).

La experiencia ha funcionado de forma eficaz tanto en el formato de página web como en el diseñado para el teléfono. El primero es más descriptivo y adecuado para un ordenador; el segundo, más sencillo en su diseño y más compacto. En ambos, el uso de la aplicación es sencillo, sin entrenamiento previo, y el cálculo ha demostrado ser robusto, capaz de proporcionar resultados incluso a partir de datos de poca calidad.

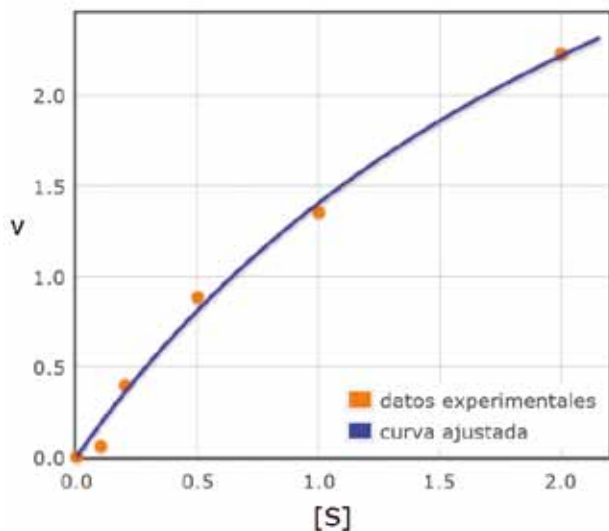
Se consiguen buenos resultados con datos reales obtenidos por los alumnos. El diseño de la práctica no incluye réplicas, los alumnos son inexpertos en el manejo de las pipetas y, en consecuencia, es común la presencia de errores experimentales sustanciales; por último, no es infrecuente que los resultados no se aproximen a las condiciones de saturación de la enzima. Todas estas situaciones hacen difícil el ajuste fiable de una recta >>>

DETALLE DE LOS EJEMPLOS DE AJUSTE DE DATOS

0	0
0.1	0.058
0.2	0.394
0.5	0.882
1.0	1.353
2.0	2.229

0	0
0.1	0.078
0.2	0.120
0.5	0.380
1.0	0.753
2.0	1.470

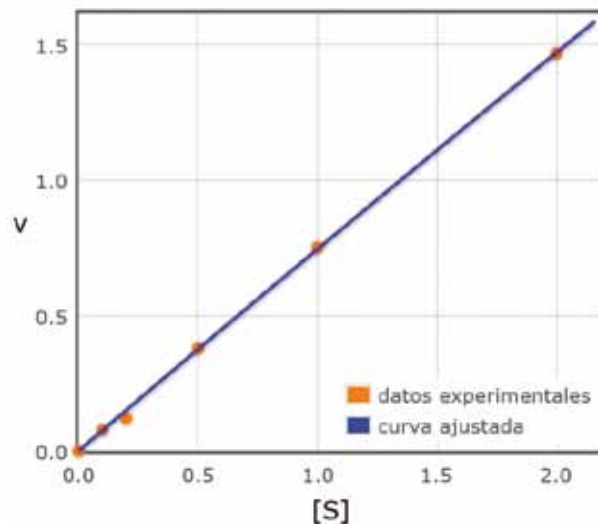
Gráfica y línea ajustada



Resultado

$$v_{m\acute{a}x} = 5.3 \pm 1.1$$

$$K_m = 2.8 \pm 0.9$$



Resultado

$$v_{m\acute{a}x} = 56 \pm 91$$

$$K_m = 74 \pm 123$$

en la gráfica de dobles recíprocos; sin embargo, con este método de regresión no lineal el ajuste a la curva de Michaelis y Menten se realiza de un modo semiautomático, que permite ir verificando su progreso tanto visualmente como mediante indicadores calculados, y termina con éxito a pesar de las limitaciones de calidad de los datos de partida.

Otro elemento muy positivo es que los valores obtenidos para K_m y $v_{m\acute{a}x}$ vienen acompañados de una cifra de error típico. Esto permite validar de forma crítica la fiabilidad de estos valores estimados y no asumir “a ciegas” el resultado numérico obtenido.

La principal ventaja de este procedimiento radica en usar un método moderno, estadísticamente sólido, para la regresión y, en consonancia con ello, entrenar a los alumnos en buenas prácticas para el procesamiento y análisis de datos experimentales.

Sin duda algunos de vosotros habréis desarrollado o utilizado metodologías similares donde se realiza un tratamiento correcto de los datos, pero creo que esta es la primera vez que se ofrece un método muy sencillo de im-

plementar y accesible para cualquier laboratorio docente. En todo caso, será un recurso más a disposición de todos.

La aplicación está disponible de forma gratuita; si estáis interesados en llevarla a la práctica con vuestros alumnos, os agradeceré un mensaje y cualquier informe sobre vuestra experiencia con ella.

Angel Herréz

Bioquímica y Biología Molecular
Dept. de Biología de Sistemas
Universidad de Alcalá

REFERENCIAS

1. Pezzullo JC (s/f). *Nonlinear least squares regression (curve fitter)*. Disponible en <http://statpages.info/nonlin.html> (Acceso 10 mayo 2016).
2. Herréz A (2013). *Cien años de Michaelis y Menten: ¿qué podemos enseñar a nuestros alumnos?* Ponencia invitada nº R00-01, XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, 3-6 septiembre 2013. Resumen disponible en <http://hdl.handle.net/10017/19767> (Acceso 10 mayo 2016).