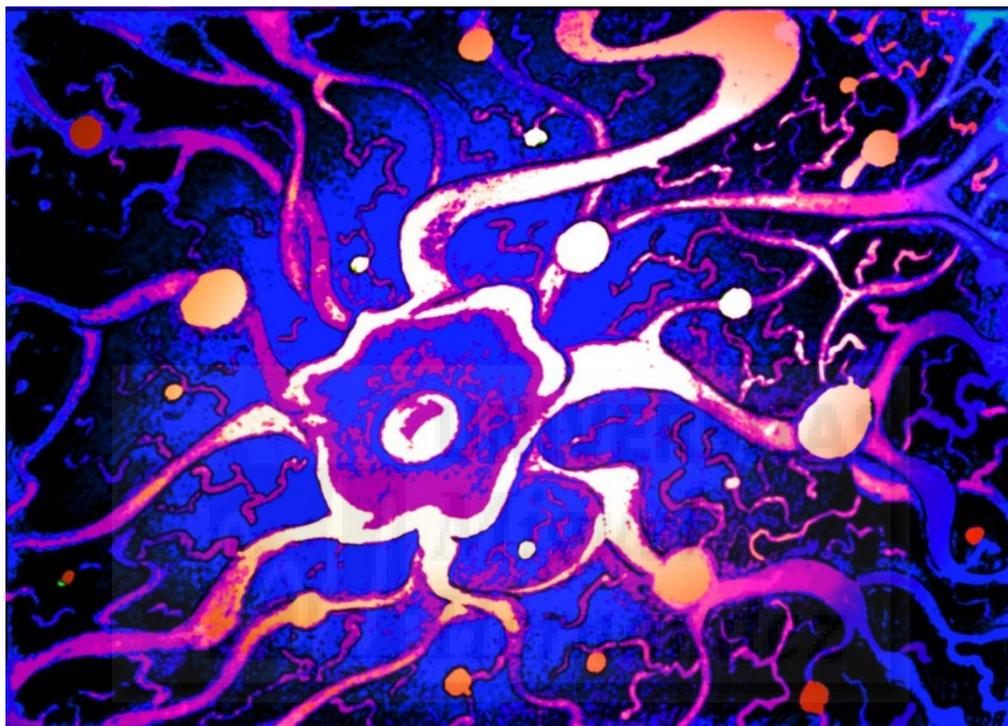


## **CARBOXILESTERASAS Y COLINESTERASAS DE CEREBRO DE POLLO: INTERACCIONES ENTRE SUSTRATOS E INHIBIDORES NEUROTÓXICOS.**



**Mónica Benabent Rubio**

Dirigido por:

**Jorge Estévez Doménech**

**Eugenio Vilanova Gisbert**

Universidad Miguel Hernández de Elche

Departamento de Biología Aplicada

Unidad de Toxicología y Seguridad Química,

2015



**D. Jorge Estévez Doménech**, Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad Miguel Hernández de Elche y Profesor Ayudante D. de Toxicología en la Universidad Miguel Hernández de Elche, investigador del Instituto de Bioingeniería, y

**D. Eugenio Vilanova Gisbert**, Doctor en Ciencias por la Universidad de Alicante y Catedrático de Toxicología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, investigador del Instituto de Bioingeniería

**CERTIFICAMOS:**

Que **Dña.Mónica Benabent Rubio**, Licenciada en Biología por la Universidad de Alicante ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación incluido en la memoria de Tesis Doctoral titulada

**“Carboxilesterasas y colinesterasas de cerebro de pollo: interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos“**

Dentro del Programa de Doctorado de Bioingeniería del Departamento de Biología Aplicada y el trabajo experimental en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

En Elche, Marzo de 2015

Fdo. Dr. D. Jorge Estévez Doménech

Fdo. Dr. D. Eugenio Vilanova Gisbert



A quien corresponda:

**José Luis Micol Molina**, Catedrático de Universidad en el área de conocimiento de Genética y Director del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HAGO CONSTAR:

Que doy mi conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral presentada por Doña Mónica Benabent Rubio, titulada **“Carboxilesterasas y colinesterasas de cerebro de pollo: interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos”**, que se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado de Bioingeniería de este Departamento, bajo la dirección de los profesores Dr. D. Jorge Estévez Domènech y Dr. D. Eugenio Vilanova Gisbert.

Lo que firmo en Elche, a instancias de la interesada y a los efectos oportunos, a diecisiete de marzo de dos mil quince.

José Luis Micol Molina

Catedrático de Genética

Director del Departamento de Biología Aplicada



"Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."

Marie Curie





## Agradecimientos

Son muchas las veces que he pensado en este momento y por fin está aquí. Para mí es un sueño cumplido, poder cerrar una etapa de mi vida y demostrarme a mí misma que soy capaz de hacer todo lo que propongo. Aún así creo que nunca seré consciente del esfuerzo que me ha costado llegar hasta aquí, sobre todo llegado un punto en el que no llegas a ver el final. En este capítulo que cierro he aprendido muchas cosas y no sólo a cerca de la ciencia sino de las personas e incluso de mi misma; así que además de "mi libro" me llevo experiencias que espero me sirvan de herramientas para enfrentarme a esta nueva etapa llena de luces y sombras.

Son tantas las personas a las que tengo que agradecer que esta tesis sea una realidad que habreis de perdonarme que pueda olvidar a alguien.

Para empezar, una llamada a Eugenio, en la que volvió a aceptarme como miembro dentro de su grupo de investigación, aunque no sólo tengo que agradecerle esta última etapa juntos; ya que aun recuerdo toda la confianza que depositaste en mí en los primeros años de conocernos, estuviste a mi lado dando la cara por mí e hiciste que volviera a creer en mi misma. Por todo ello te doy las GRACIAS.

Y por supuesto el apoyo de Jordi sin cuya paciencia y enseñanzas esto sólo seguiría siendo un sueño. Lamento los malos ratos que te he hecho pasar, GRACIAS por este esfuerzo final que has hecho, soy consciente de él y he de decirte que los años de becarios que pasamos juntos fueron de las mejores épocas que he vivido. Si te llegan a decir que ibas a acabar dirigiendo mi tesis.....!la de vueltas que da la vida!

Ambos habeis confiado en mí (a veces más que yo misma) y me habeis ayudado a recordar todo aquello que tenía aprendido y que creía olvidado. !!Gracias por vuestros consejos científicos y literarios, a través de las miles de versiones!!!

Desde luego que GRACIAS a Jose, por todos los años que has estado escuchándome contarte que soñaba que por fin acababa la tesis, GRACIAS por ayudarme a llevarlo a cabo, por estar a mi lado y ayudarme en los momentos de

desánimo. Son tantas las cosas vividas juntos que necesitaría todo un capítulo de la tesis para darte las GRACIAS y por supuesto sabes que voy a estar muuuuuucho tiempo sin escribir ni mi nombre. GRACIAS a Aitana y a Álvaro, por vuestra paciencia y espero que este esfuerzo por parte de todos os enseñe a perseguir vuestros sueños en la vida y a creer en vosotros mismos.

GRACIAS a todos esos cangur@s: papá, mamá, Celi, Eva García, Mar.....sin vuestra ayuda no hubiera sacado el tiempo necesario para acabar.

GRACIAS a toda mi familia, que tengo la gran suerte de tener a mi lado y a la que también he ido robando tiempo, sobretodo gracias a mi tia M<sup>a</sup> Francisca que desde que recuerdo no sólo me ha enseñado el placer de aprender, sino que además me ha guiado, aconsejado y apoyado; un especial abrazo a esa gran mujer que es mi abuela Lucía.

GRACIAS a mis amigas, a TODAS: Alicia, Inma, Alma, Begoña dra. en Word, M<sup>a</sup> Luisa, Susi, Rosina, Raquel et al, Pino, Celi....al grupo de las Pencas, a Adolfo (gracias por tu apoyo en la distancia y porque sé que puedo contar contigo para lo que sea), a mis cuñados, en especial a Willy por esa superportada, a Manolo Escribano y a tod@s los que me habeis aguantado el rollo. Sabéis que en mi vida sois fundamentales, vuestro apoyo y confianza ha sido total, en los ratos de desánimo y cabreo pero también en los buenos momentos....vosotras también sois las culpables de que decidiera tirar "pa ´ lante" con el proyecto... Creo que hay pocas personas en el mundo que tengan unas amigas como las mías....OS QUIERO.

GRACIAS, también a mis dos compañeras y amigas, Iris y Eva, por todas esas risas, cafés y ánimos. Eva solo decirte: "Me encanta" y que desde luego tu inestimable ayuda en los experimentos no solo me ha facilitado el trabajo sino que además me lo he pasado genial, ya sabes que eres la próxima; e Iris, no sé cómo agradecerte tus consejos, correcciones, apoyo y ejemplo, eres admirable como persona y brillante como científica. Sois unas grandes personas y os deseo lo mejor. De estos cuatro años me llevo dos buenas compañeras y amigas.

Quiero tener un recuerdo también por el resto de mis compañer@s de laboratorio: Encarna (gracias por esos ratitos de charlas y risas), Carmen, Lucía, David, M<sup>o</sup>Cruz, Amparo, Óscar y Roberto; y por supuesto, Miguel Ángel que son muchos los años y las risas que nos hemos echado, eres de las personas de las que siempre se aprende algo, espero que sepas que siempre puedes contar conmigo.

Por fin esto se acerca a su fin porque se va pareciendo sospechosamente a una clausura (jejeje) y ahora como decía Bowie:

...“LET´S DANCE”...





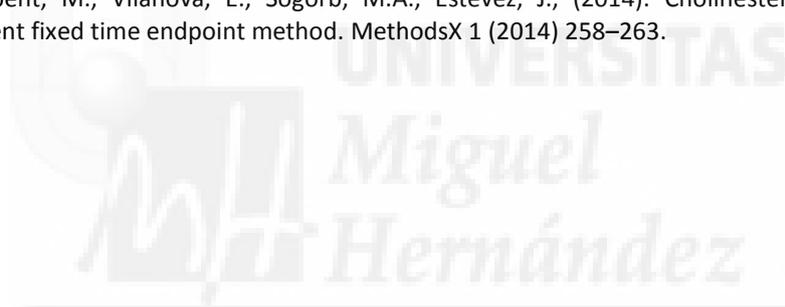


**A mi familia y amigas**



Este trabajo ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos:

1. Benabent, M., Vilanova, E., Mangas, I., Sogorb, M.A., Estévez, J., (2014). Interaction between substrates suggests a relationship between organophosphorus-sensitive phenylvalerate- and acetylcholine-hydrolyzing activities in chicken brain. *Toxicology letters*, pii: S0378-4274(14)00090-3.
2. Benabent, M., Vilanova, E., Sogorb, M.A., Estévez, J., (2014). Cholinesterase assay by an efficient fixed time endpoint method. *MethodsX* 1 (2014) 258–263.





## **RESUMEN**

Los compuestos organofosforados (OPs) pueden causar varios efectos neurotóxicos: (i) toxicidad colinérgica aguda por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, (ii) neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN) por la modificación covalente de la llamada esterasa diana de neuropatía (NTE), (iii) efectos neuroconductuales y neuropsicológicos asociado con exposición a dosis medio-bajas de OPs, que no se pueden explicar con las moléculas diana conocidas; (iv) la potenciación de OPIDN, cuya molécula diana se desconoce.

Potencialmente, muchas proteínas podrían interactuar con los OPs, especialmente en la familia de enzimas serina esterases. En nuestro laboratorio se detectaron y discriminaron cinéticamente distintos componentes enzimáticos en las fracciones solubles y de membrana de cerebro de pollo que hidrolizan fenilvalerato (PVasa), usando los inhibidores mipafox, paraoxon y PMSF. Se identificaron tres componentes citosólicos en fracción soluble (**E $\alpha$** , **E $\beta$**  y **E $\gamma$** ) y cuatro en mebranas (**EP $\alpha$** , **EP $\beta$** , **EP $\gamma$**  y **EP $\delta$** ).

En este trabajo, se ha observado que la acetiltiocolina, sustrato de colinesterasas, inhibe parcialmente la actividad PVasa y que el fenilvalerato inhibe parcialmente la actividad colinesterasa. A fin de comprender la relación de los componentes de actividad PVasa con la actividad colinesterasa, se han discriminado los componentes enzimáticos que hidrolizan acetilcolina en fracciones soluble y de membranas de cerebro de pollo utilizando los siguientes inhibidores: mipafox (inductor de OPIDN), paraoxon (no inductor), PMSF (promotor de OPIDN), iso-OMPA (inhibidor irreversible considerado específico de butirilcolinesterasa), etopropazina (inhibidor reversible considerado específico de butirilcolinesterasa) y BW284c51 (inhibidor reversible considerado específico de acetilcolinesterasa). Se ha desarrollado un método para medir actividad hidrolizante de acetiltiocolina, modificado a partir del método cinético de Ellman. Se ha elaborado un modelo matemático basado en el mecanismo de inhibición reversible que estima las  $I_{50}$  de inhibidores reversibles y que permite además discriminar entre componentes enzimáticos. Se han identificado cuatro componentes colinesterásicos citosólicos (**CS1**, **CS2**, **CS3** y **CS4**) y tres en membranas (**CP1**, **CP2** y **CP3**).

De la respuesta a inhibidores y las interacciones entre sustratos, se ha concluido que en fracción soluble el componente enzimático de actividad colinesterasa CS1 corresponde con el componente enzimático de actividad PVasa E $\alpha$ , la butirilcolinesterasa puede ser la responsable esta actividad. En membranas, el componente EP $\alpha$  podría tener relación con el componente enzimático de actividad colinesterasa CP1. Los demás componentes PVasa, no parecen contener ni tener relación con los componentes de actividad colinesterasa detectados.



## Abreviaturas

<b>AAP</b>	Aminoantipirina
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>anti-ChE</b>	anti-colinesterásicos
<b>BuChE</b>	Butirilcolinesterasa
<b>BW284C51</b>	1,5-bi(4-alildimetilamoniofenil)pentano-3-1 dibromuro
<b>CarbEs</b>	carboxilesterasas
<b>CB1</b>	receptor cannabinoide tipo 1
<b>CbEs</b>	Colinesterasas
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>DFP</b>	Diisopropilfluorofosfato
<b>DMF</b>	dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTNB</b>	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>E<math>\alpha</math></b>	componente esterásico soluble alfa
<b>E<math>\beta</math></b>	componente esterásico soluble beta
<b>E<math>\gamma</math></b>	componente esterásico soluble gamma
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetracético
<b>EP<math>\alpha</math></b>	componente esterásico de membrana alfa
<b>EP<math>\beta</math></b>	componente esterásico de membrana beta
<b>EP<math>\gamma</math></b>	componente esterásico de membrana gamma
<b>EP<math>\delta</math></b>	componente esterásico de membrana delta
<b>DE</b>	desviación estándar
<b>HDCP</b>	o-hexil O-2,5-dichlorofenil fosforamidato
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alta resolución
<b>Iso-OMPA</b>	tetraisopropil fosforamida
<b>IUB</b>	unión internacional de Bioquímica
<b>Kh</b>	constante de hidrólisis
<b>Km</b>	constante de Michaelis
<b>MFOs</b>	oxidasas de función mixta
<b>NTE</b>	esterasa diana de neuropatía
<b>OP</b>	compuesto organofosforado
<b>OPIDP</b>	neuropatía retardada inducida por organofosforados

<b>PMSF</b>	fenilmetilsulfonilfluoruro
<b>PVasa</b>	fenilvalerato esterasa
<b>PV</b>	Fenilvalerato
<b>mRNA</b>	acido ribonucleico mensajero
<b>S9B</b>	1- (saligenin cyclic phosphor)-9-biotinyldiaminononane
<b>Ser</b>	Serina
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>SNTE</b>	esterasa diana de neuropatía soluble
<b>TOCP</b>	tri-o-cresyl fosfato
<b>TRIS</b>	tris (hidroximetil) aminometano
<b>Vmax</b>	velocidad máxima
<b>WHO</b>	World Health Organization



<b>INDICE</b>	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS	3
1.1.1. Evolución histórica de los organofosforados.	3
1.1.2. Estructura química y propiedades físico-químicas de los compuestos organofosforados.	4
1.1.3. Aplicaciones de los compuestos organofosforados	5
1.2. Toxicocinética de los compuestos organofosforados	7
<i>Absorción de compuestos organofosforados</i>	
<i>Distribución y acumulación de compuestos organofosforados</i>	
<i>Biotransformación de compuestos organofosforados.</i>	
1.3. EFECTOS TÓXICOS DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS	10
<i>Reacciones de interacción con esterasas</i>	
<i>Efectos colinérgicos agudos</i>	
<i>Síndrome intermedio</i>	
<i>Neuropatía retardada</i>	
<i>Neurotoxicidad crónica del Sistema Nervioso Central</i>	
1.4. INHIBIDORES UTILIZADOS.	16
<i>Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).</i>	
<i>Diethyl4-nitrofenil fosfato (paraoxon).</i>	
<i>N, N-<math>\zeta</math>-diisopropilfosforodiamidofluoridato (mipafox).</i>	
<i>Tetraisopropil fosforamida (iso-OMPA)</i>	
<i>Etopropazina</i>	
<i>1,5-bis (4-alildimetilamoniofenil)pentano-3-1 dibromuro (BW284C51).</i>	
1.5. ESTERASAS.	21
1.5.1. Esterasas que reaccionan con organofosforados	21
1.5.2. Colinesterasas (E.C.3.1.1.7, E.C.1.1.8.)	24
<i>Mecanismo de acción de las colinesterasas.</i>	
<i>Inhibición de las colinesterasas.</i>	
1.5.3. Carboxilesterasas (E.C.3.1.1.1.)	31
1.6. ANTECEDENTES.	33
<i>Discriminación de componentes enzimáticos esterásicos</i>	
<b>2. MODELOS MATEMÁTICOS</b>	<b>35</b>
2.1. MODELO MATEMÁTICO DE LA INHIBICIÓN DE ESTERASAS POR OPs. INHIBICIÓN IRREVERSIBLE.	37
<i>Cinética de las reacciones de fosforilación</i>	
<i>Sistemas que contienen más de un componente enzimático.</i>	
2.2. COMPORTAMIENTO ANTE LA INHIBICIÓN CON PMSF. HIDRÓLISIS ESPONTÁNEA DEL INHIBIDOR SIMULTÁNEA A LA INHIBICIÓN EN CURSO.	41
<i>Sistemas que contienen más de un componente enzimático.</i>	
2.3. MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS PARA EL ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE ACTIVIDAD PVasa Y ChE CON ACETILCOLINA Y PV, RESPECTIVAMENTE.	45
2.4. MODELO MATEMÁTICO DE LA INHIBICIÓN REVERSIBLE DE ESTERASAS.	47
<i>Mecanismo de inhibición reversible competitiva.</i>	
<i>Mecanismo de inhibición reversible no competitiva.</i>	
<b>3. OBJETIVOS.</b>	<b>49</b>

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>53</b>
4.1. REACTIVOS ESPECÍFICOS Y EQUIPOS UTILIZADOS	55
<i>Tampones y Reactivos</i>	
<i>Estación automatizada Biomek 2000</i>	
<i>Lector de placas</i>	
<i>Centrífugas</i>	
4.2. PREPARACIÓN DEL TEJIDO	58
<i>Obtención del material biológico</i>	
<i>Disección y homogeneización del tejido</i>	
<i>Fraccionamiento subcelular</i>	
4.3. MEDIDAS DE ACTIVIDADES PVasa: microensayo	60
4.4. MEDIDAS DE ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA	61
<i>Método cinético de Ellman</i>	
<i>Método de punto final a tiempo fijo</i>	
4.5. ENSAYOS DE INHIBICIÓN	63
<i>Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetilcolina.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo con dos inhibidores de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina.</i>	
<i>Inhibición progresiva con el tiempo de la actividad PVasa</i>	
4.6. ENSAYOS DE COMPETICIÓN ENTRE SUSTRATOS.	66
4.6.1. Ensayos en fracción soluble.	66
<i>Ensayo de interacción entre sustratos de la actividad enzimática PVasa resistente a 1500 <math>\mu</math>M de PMSF (E<math>\alpha</math>), 25 <math>\mu</math>M de mipafox (E<math>\beta</math>), 25 <math>\mu</math>M de paraoxon (E<math>\gamma</math>).</i>	
<i>Ensayo de interacción entre sustratos de la actividad enzimática acetilcolinesterasa resistente a 1500 <math>\mu</math>M de PMSF, 25 <math>\mu</math>M de mipafox y 25 <math>\mu</math>M de paraoxon.</i>	
4.6.2. Ensayos en fracción de membrana.	
<i>Ensayo de interacción entre sustratos de la actividad enzimática PVasa resistente a 1000 <math>\mu</math>M de PMSF (E<math>\rho</math><math>\alpha</math>), 50 <math>\mu</math>M de mipafox (E<math>\rho</math><math>\beta</math>), 25 <math>\mu</math>M de paraoxon (E<math>\rho</math><math>\gamma</math>) y 25 <math>\mu</math>M de mipafox más 600 <math>\mu</math>M de PMSF(E<math>\rho</math><math>\delta</math>).</i>	
<i>Ensayo de interacción entre sustratos de la actividad enzimática acetilcolinesterasa resistente a 1000 <math>\mu</math>M de PMSF, 50 <math>\mu</math>M de mipafox, 25 <math>\mu</math>M de paraoxon y 25 <math>\mu</math>M de mipafox más 600 <math>\mu</math>M de PMSF.</i>	
4.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS.	68
<i>Curvas de inhibición a tiempo fijo.</i>	
<i>Análisis de competición entre sustratos.</i>	
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>71</b>
5.1. DESARROLLO DEL MÉTODO DE MEDIDA AUTOMATIZADO DE LA ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA.	73
<i>El método cinético de Ellman y propuesta alternativa</i>	
<i>Respuesta de blancos y controles: DTNB y SDS</i>	
<i>Interacción del tejido con DTNB</i>	
<i>Linealidad de la medida.</i>	
<i>Concentraciones óptimas de sustrato.</i>	
<i>Estabilidad de la absorbancia después de parar la reacción.</i>	

*Linealidad con el tiempo de reacción y con la concentración de tejido.*

*Reproducibilidad del ensayo.*

*Comparación entre el método cinético de Ellman y el propuesto.*

*Medida de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con sustrato específico de AChE.*

5.2. ACTIVIDAD PVasa EN FRACCIÓN SOLUBLE.	83
5.2.1. Detección de componentes de PVasa : E $\alpha$ , E $\beta$ y E $\gamma$ , en fracción soluble	83
5.2.2. Interacciones de sustratos de acetilcolinesterasa con la actividad PVasa.	84
<i>Observaciones preliminares.</i>	
<i>Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a PMSF 1500 <math>\mu</math>M (componente E<math>\alpha</math>).</i>	
<i>Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a mipafox 25 <math>\mu</math>M (componente E<math>\beta</math>).</i>	
<i>Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a paraoxon 25 <math>\mu</math>M (componente E<math>\gamma</math>).</i>	
5.2.3. Inhibición de actividad PVasa total.	88
<i>Inhibición de la actividad PVasa total con iso-OMPA.</i>	
<i>Inhibición de la actividad PVasa total con BW284C51.</i>	
<i>Inhibición de la actividad PVasa total con etopropazina.</i>	
5.2.4. Inhibición de los componentes de PVasa E $\alpha$ y E $\gamma$ .	96
<i>Interacción con actividad PVasa resistente a PMSF 1500 <math>\mu</math>M (E<math>\alpha</math>) en fracción soluble de cerebro.</i>	
<i>Interacción con actividad PVasa resistente a paraoxon 25 <math>\mu</math>M (E<math>\gamma</math>) en fracción soluble de cerebro.</i>	
5.3. ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA EN FRACCIÓN SOLUBLE.	101
5.3.1. Detección de componentes aplicando las condiciones experimentales de E $\alpha$ , E $\beta$ y E $\gamma$ .	101
5.3.2. Interacciones de PV con actividad hidrolizante de acetiltiocolina.	102
<i>Observaciones preliminares de inhibición con PV.</i>	
<i>Interacción de PV con la actividad resistente a PMSF 1500 <math>\mu</math>M.</i>	
<i>Interacción de PV con la actividad resistente a mipafox 25 <math>\mu</math>M.</i>	
<i>Interacción de PV con la actividad resistente a paraoxon 25 <math>\mu</math>M.</i>	
5.3.3. Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con iso-OMPA, BW284C51 y etopropazina.	105
<i>Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total con iso-OMPA.</i>	
<i>Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total con BW284C51.</i>	
<i>Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total con etopropazina.</i>	
5.3.4. Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con paraoxon, mipafox y PMSF.	111
<i>Inhibición de la actividad total con paraoxon.</i>	
<i>Inhibición de la actividad total con mipafox.</i>	
<i>Inhibición de la actividad total con PMSF.</i>	
5.3.5. Inhibición secuencial a un tiempo fijo con dos inhibidores	114
<i>Preincubación con PMSF y posterior inhibición con etopropazina y viceversa.</i>	
<i>Preincubación con PMSF y posterior inhibición con iso-OMPA y viceversa.</i>	
<i>Preincubación con iso-OMPA y posterior inhibición con etopropazina y viceversa.</i>	
5.4. ACTIVIDAD PVASA EN MEMBRANAS.	117
5.4.1. Detección de componentes de PVasa en fracción de membrana: E $\alpha$ , E $\beta$ ,	117

EP $\gamma$ y EP $\gamma$ .	
5.4.2. Interacciones de acetiltiocolina con la actividad PVasa.	118
<i>Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a PMSF 1000 <math>\mu</math>M (componente EP<math>\alpha</math>).</i>	
<i>Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a mipafox 50 <math>\mu</math>M (componente EP<math>\beta</math>).</i>	
<i>Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a paraoxon 25 <math>\mu</math>M (componente EP<math>\gamma</math>).</i>	
<i>Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a mipafox 25 <math>\mu</math>M y PMSF 600 <math>\mu</math>M (componente EP<math>\delta</math>).</i>	
5.4.3. Inhibición de la actividad PVasa total	123
<i>Inhibición de la actividad PVasa total con iso-OMPA.</i>	
<i>Inhibición de la actividad PVasa total con BW284C51.</i>	
<i>Inhibición de la actividad PVasa total con etopropazina.</i>	
5.4.4. Inhibición de actividad PVasa resistente a PMSF 1000 $\mu$ M (componente EP $\alpha$ ) con iso-OMPA, BW284C51 y etopropazina.	129
5.5. ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA EN FRACCIÓN DE MEMBRANA.	131
5.5.1. Detección de componentes aplicando las condiciones experimentales de EP $\alpha$ , EP $\beta$ y EP $\gamma$ .	131
5.5.2. Interacciones de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina.	132
<i>Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000 <math>\mu</math>M.</i>	
<i>Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox 50 <math>\mu</math>M.</i>	
<i>Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a paraoxon 25 <math>\mu</math>M.</i>	
<i>Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox 25 <math>\mu</math>M y PMSF 600 <math>\mu</math>M</i>	
5.5.3. Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con iso-OMPA, BW284C51 y etopropazina.	135
<i>Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total con iso-OMPA.</i>	
<i>Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total con BW284C51.</i>	
<i>Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total con etopropazina.</i>	
5.5.4. Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con paraoxon, mipafox y PMSF.	141
<i>Inhibición de la actividad total con paraoxon.</i>	
<i>Inhibición de la actividad total con mipafox.</i>	
<i>Inhibición de la actividad total con PMSF.</i>	
<b>6. DISCUSIÓN</b>	145
6.1. COMPARATIVA ENTRE EL MÉTODO PROPUESTO Y EL MÉTODO CINÉTICO TRADICIONAL DE ELLMAN.	147
<i>El método cinético de Ellman</i>	
6.2. COMPETICIÓN DE SUSTRATOS: FENILVALERATO/ACETILTIOCOLINA.	150
<i>Estudios preliminares de interacciones de PVasa total con acetiltiocolina.</i>	
<i>Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a PMSF 1500 <math>\mu</math>M.</i>	
<i>Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a mipafox 25 <math>\mu</math>M.</i>	
<i>Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a paraoxon 25 <math>\mu</math>M.</i>	

6.3. COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD PVASA SOLUBLE DE CEREBRO CON INHIBIDORES.	155
6.3.1. Inhibición con iso-OMPA	157
<i>Inhibición a diferentes tiempos en actividad PVasa total.</i>	
<i>Inhibición de los componentes E<sub>α</sub> y E<sub>γ</sub> de la actividad PVasa.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de actividad PVasa total</i>	
6.3.2. Inhibición con BW284C51.	159
<i>Inhibición a diferentes tiempos en actividad PVasa total.</i>	
<i>Inhibición de los componentes E<sub>α</sub> y E<sub>γ</sub> de la actividad PVasa.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de PVasa total</i>	
6.3.3. Inhibición con etopropazina	160
<i>Inhibición a diferentes tiempos en PVasa total.</i>	
<i>Inhibición de los componentes E<sub>α</sub> y E<sub>γ</sub>.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de PVasa total</i>	
6.3.4. Consideraciones a cerca de la actividad PVasa en fracción soluble de cerebro.	161
6.4. COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA SOLUBLE DE CEREBRO CON INHIBIDORES.	163
6.4.1. Estudios preliminares	163
6.4.2. Inhibición a tiempo fijo con paraoxon.	166
6.4.3. Inhibición a tiempo fijo con mipafox	166
6.4.4. Inhibición con BW284c51	167
<i>Inhibición a diferentes tiempos de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.</i>	
6.4.5. Inhibición con iso-OMPA	168
<i>Inhibición a diferentes tiempos de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.</i>	
6.4.6. Inhibición a tiempo fijo con PMSF	169
6.4.7. Inhibición con etopropazina.	169
<i>Inhibición a diferentes tiempos de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.</i>	
6.4.8. Inhibición a tiempo fijo con dos inhibidores	170
<i>Preincubación con PMSF y posterior inhibición con etopropazina y viceversa.</i>	
<i>Preincubación con PMSF y posterior inhibición con iso-OMPA y viceversa.</i>	
<i>Preincubación con iso-OMPA y posterior inhibición con etopropazina y viceversa.</i>	
6.4.9. Consideraciones a cerca de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina en fracción soluble de cerebro	172
6.5. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES GLOBALES DE LA RELACIÓN ENTRE ACTIVIDADES PVASA Y CHE EN FRACCIÓN SOLUBLE DE CEREBRO	175
6.6. INTERACCIONES ENTRE DIFERENTES SUSTRATOS E INHIBIDORES EN FRACCIÓN SOLUBLE DE MEMBRANA DE CEREBRO.	177
6.6.1. Competición de sustratos: Fenilvalerato/acetiltiocolina	177
<i>Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a mipafox 25 μM y OMSF 600 μM</i>	
<i>Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a PMSF 1000 μM</i>	
<i>Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a mipafox 50 μM</i>	
<i>Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a paraoxon 25 μM</i>	
6.7. COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD PVASA DE MEMBRANA DE CEREBRO CON INHIBIDORES.	181
6.7.1. Inhibición con iso-OMPA.	182

<i>Inhibición a diferentes tiempos en PVasa total.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de PVasa total.</i>	
<i>Inhibición del componente EP<math>\alpha</math>.</i>	
6.7.2. Inhibición con BW284C51	183
<i>Inhibición a diferentes tiempos en PVasa total.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de PVasa total.</i>	
<i>Inhibición del componente EP<math>\alpha</math>.</i>	
6.7.3. Inhibición con etopropazina.	184
<i>Inhibición a diferentes tiempos en PVasa total</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de PVasa total</i>	
<i>Inhibición del componente EP<math>\alpha</math>.</i>	
6.7.4. Consideraciones a cerca de la actividad PVasa en fracción de membrana de cerebro.	185
6.8. COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA DE MEMBRANA DE CEREBRO CON INHIBIDORES.	186
6.8.1. Inhibición a tiempo fijo con paraoxon	187
6.8.2. Inhibición a tiempo fijo con mipafox	187
6.8.3. Inhibición a tiempo fijo con PMSF	188
6.8.4. Inhibición a tiempo fijo con BW284C51	188
<i>Inhibición a diferentes tiempos de la actividad hidrolizante de acetilticolina total</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetilticolina total.</i>	
6.8.5. Inhibición con iso-OMPA	189
<i>Inhibición a diferentes tiempos de la actividad hidrolizante de acetilticolina total.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetilticolina total.</i>	
6.8.6. Inhibición con etopropazina.	190
<i>Inhibición a diferentes tiempos de la actividad hidrolizante de acetilticolina total.</i>	
<i>Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetilticolina total.</i>	
6.8.7. Consideraciones a cerca de la actividad hidrolizante de acetilticolina en fracción de membrana de cerebro	190
6.9. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES GLOBALES DE LA RELACIÓN ENTRE ACTIVIDADES PVASA Y CHE EN LA FRACCIÓN DE MEMBRANA DE CEREBRO	193
<b>7. CONCLUSIONES</b>	195
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	199
<b>9. ANEXO 1</b>	215

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Estructura química general de los compuestos organofosforados.	4
<b>Figura 1.2.</b> Principales vías de activación tóxica y detoxificación de compuestos organofosforados.	8
<b>Figura 1.3.</b> Mecanismo de inhibición de esterasas por organofosforados.	10
<b>Figura 1.4.</b> Estructura química del PMSF.	16
<b>Figura 1.5.</b> Estructura química del paraoxon.	17
<b>Figura 1.6.</b> Estructura química del mipafox.	17
<b>Figura 1.7.</b> Estructura química del iso-OMPA.	18
<b>Figura 1.8.</b> Estructura química de la etopropazina.	19
<b>Figura 1.9.</b> Estructura química del BW284C51.	20
<b>Figura 1.10.</b> Dianas de los compuestos organofosforados.	22
<b>Figura 1.11.</b> Transmisión del impulso nervioso.	23
<b>Figura 1.12.</b> Estructuras de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.	26
<b>Figura 1.13.</b> Carboxilesterasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	32
<b>Figura 2.1.</b> Ejemplo de inhibición competitiva en la que el inhibidor causa un impedimento físico para la unión del sustrato en el sitio activo.	46
<b>Figura 2.2.</b> Inhibición no competitiva.	46
<b>Figura 4.1.</b> Vista superior del cerebro.	58
<b>Figura 4.2.</b> Esquema general del fraccionamiento subcelular.	59
<b>Figura 4.3.</b> Curva de calibrado de fenol.	60
<b>Figura 4.4.</b> Esquema del ensayo de la medida de actividad hidrolizante de acetiltiocolina.	62
<b>Figura 4.5.</b> Procedimiento general del método de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa.	63
<b>Figura 5.1.</b> Absorbancias de blancos en el diseño del método de medida de actividad hidrolizante de acetiltiocolina.	74
<b>Figura 5.2.</b> Evolución de la absorbancia con la concentración de tejido y sin sustrato con el tiempo de incubación con tampón fosfato.	75
<b>Figura 5.3.</b> Curva de calibración de la tiocolina del método propuesto.	76
<b>Figura 5.4.</b> Actividad versus concentración de sustrato.	77
<b>Figura 5.5.</b> Estabilidad de la absorbancia después de parar la reacción enzima-sustrato.	78
<b>Figura 5.6.</b> Linealidad del ensayo con el tiempo de reacción.	79
<b>Figura 5.7.</b> Actividad hidrolizante de acetiltiocolina utilizando como sustrato acetil- $\beta$ -metiltiocolina.	82
<b>Figura 5.8.</b> Actividad PVasa resistente a PMSF 1500 $\mu$ M, mipafox 25 $\mu$ M y paraoxon 25 $\mu$ M.	83
<b>Figura 5.9.</b> Curva de Michaelis-Menten de la actividad PVasa resistente a PMSF 1500 $\mu$ M ( $E\alpha$ ) en presencia de acetiltiocolina (A) y su representación de Lineweaver-Burk (B).	85
<b>Figura 5.10.</b> Curva de Michaelis-Menten de la actividad PVasa resistente a mipafox 25 $\mu$ M ( $E\beta$ ).	86
<b>Figura 5.11.</b> Curva de Michaelis-Menten de la actividad PVasa resistente a paraoxon 25 $\mu$ M ( $E\gamma$ ) en presencia de acetiltiocolina (A) y su representación de Lineweaver-Burk (B).	87
<b>Figura 5.12.</b> Inhibición de actividad PVasa total por iso-OMPA 900 $\mu$ M durante 10 o 30 min de preincubación.	88
<b>Figura 5.13.</b> Inhibición con iso-OMPA a tiempo fijo de la actividad PVasa soluble de cerebro.	89
<b>Figura 5.14.</b> Inhibición de actividad PVasa total por BW284C51 50 $\mu$ M, durante 10 o 30 min de preincubación con la fracción soluble de cerebro.	91
<b>Figura 5.15.</b> Inhibición con BW284C51 a tiempo fijo de la actividad PVasa soluble de cerebro.	92
<b>Figura 5.16.</b> Inhibición de actividad PVasa total por etopropazina 50 $\mu$ M, durante 10 o 30 min de preincubación.	94
<b>Figura 5.17.</b> Inhibición con etopropazina a tiempo fijo de la actividad PVasa soluble de cerebro.	95
<b>Figura 5.18.</b> Actividad PVasa resistente a PMSF 1500 $\mu$ M ( $E\alpha$ ) inhibida con iso-OMPA 1, 10 o 100 $\mu$ M, 15 o 30 min.	97
<b>Figura 5.19.</b> Actividad PVasa resistente a PMSF 1500 $\mu$ M ( $E\alpha$ ) inhibida con etopropazina 100 $\mu$ M, o con BW284C51, 10 o 30 min.	97
<b>Figura 5.20.</b> Actividad PVasa resistente a paraoxon 25 $\mu$ M ( $E\gamma$ ) inhibida con iso-OMPA 0,4-1-5-25 o 900 $\mu$ M, 10 o 30 min.	99

<b>Figura 5.21.</b> Actividad PVasa resistente a paraoxon 25 $\mu\text{M}$ ( $\text{E}\gamma$ ) inhibida con BW284C51 50 $\mu\text{M}$ , 10 o 30 min.	99
<b>Figura 5.22.</b> Actividad PVasa resistente a paraoxon 25 $\mu\text{M}$ ( $\text{E}\gamma$ ) inhibida con etopropazina 100 $\mu\text{M}$ , 10 o 30 min.	100
<b>Figura 5.23.</b> Actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1500 $\mu\text{M}$ , mipafox 25 $\mu\text{M}$ y paraoxon 25 $\mu\text{M}$ .	101
<b>Figura 5.24.</b> Curva de Michaelis-Menten de la actividad AChE resistente a PMSF 1500 $\mu\text{M}$ en presencia de PV (A) y su representación de Lineweaver-Burk (B).	103
<b>Figura 5.25.</b> Curva de Michaelis-Menten de la actividad AChE resistente a mipafox 25 $\mu\text{M}$ en presencia de PV (A) y su representación de Lineweaver-Burk (B).	104
<b>Figura 5.26.</b> Inhibición de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total por iso-OMPA 0,6 ó 500 $\mu\text{M}$ , durante 10 o 30 min de preincubación.	105
<b>Figura 5.27.</b> Inhibición con iso-OMPA a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	106
<b>Figura 5.28.</b> Inhibición de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total por BW284C51 0,41 $\mu\text{M}$ , durante 10 o 30 min de preincubación.	107
<b>Figura 5.29.</b> Inhibición con BW284C51 a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	108
<b>Figura 5.30.</b> Actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1500 $\mu\text{M}$ ( $\text{E}\alpha$ ) inhibida con etopropazina 0,2 o 600 $\mu\text{M}$ , 10 o 30 min.	109
<b>Figura 5.31.</b> Inhibición con etopropazina a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	110
<b>Figura 5.32.</b> Inhibición con paraoxon a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina soluble de cerebro.	111
<b>Figura 5.33.</b> Inhibición con mipafox a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	112
<b>Figura 5.34.</b> Inhibición con PMSF a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	113
<b>Figura 5.35.</b> Actividad residual hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro con PMSF y etopropazina.	114
<b>Figura 5.36.</b> Actividad residual hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro con PMSF y iso-OMPA.	115
<b>Figura 5.37.</b> Actividad residual hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro con etopropazina y iso-OMPA.	116
<b>Figura 5.38.</b> Actividad PVasa resistente a PMSF 1000 $\mu\text{M}$ , mipafox 50 $\mu\text{M}$ , paraoxon 25 $\mu\text{M}$ o mipafox 25 $\mu\text{M}$ y PMSF 600 $\mu\text{M}$ .	117
<b>Figura 5.39.</b> Curva de la actividad PVasa resistente a PMSF 1000 $\mu\text{M}$ ( $\text{E}\text{P}\alpha$ ) en presencia de acetiltiocolina.	118
<b>Figura 5.40.</b> Curva de la actividad PVasa resistente a mipafox 50 $\mu\text{M}$ ( $\text{E}\text{P}\beta$ ) en presencia de acetiltiocolina.	119
<b>Figura 5.41.</b> Curva de la actividad PVasa resistente a paraoxon 25 $\mu\text{M}$ ( $\text{E}\text{P}\gamma$ ) en presencia de acetiltiocolina.	121
<b>Figura 5.42.</b> Curva de Michaelis-Menten de la actividad PVasa resistente a mipafox 25 $\mu\text{M}$ y PMSF 600 $\mu\text{M}$ en presencia de acetiltiocolina.	122
<b>Figura 5.43.</b> Inhibición de la actividad PVasa total por iso-OMPA 900 $\mu\text{M}$ , durante 10 o 30 min de preincubación	123
<b>Figura 5.44.</b> Inhibición con iso-OMPA a tiempo fijo de la actividad PVasa de membrana de cerebro.	124
<b>Figura 5.45.</b> Inhibición con BW284C51 a tiempo fijo de la actividad PVasa de fracción de membrana de cerebro.	126
<b>Figura 5.46.</b> Inhibición de la actividad PVasa total por etopropazina 50 $\mu\text{M}$ , durante 10 o 30 min de preincubación.	127
<b>Figura 5.47.</b> Inhibición con etopropazina a tiempo fijo de la actividad PVasa de membrana de cerebro.	128
<b>Figura 5.48.</b> Actividad PVasa resistente a PMSF 1000 $\mu\text{M}$ ( $\text{E}\text{P}\alpha$ ) inhibida con iso-OMPA 900 $\mu\text{M}$ , 10 o 30 min	130

<b>Figura 5.49.</b> Actividad PVasa resistente a PMSF 1000 $\mu\text{M}$ ( $\text{EP}\alpha$ ) inhibida con etopropazina 100 $\mu\text{M}$ , 10 o 30 min.	130
<b>Figura 5.50.</b> Actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000 $\mu\text{M}$ , mipafox 50 $\mu\text{M}$ , paraoxon 25 $\mu\text{M}$ o mipafox 25 $\mu\text{M}$ y PMSF 600 $\mu\text{M}$ .	131
<b>Figura 5.51.</b> Curva de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000 $\mu\text{M}$ en presencia de fenilvalerato.	132
<b>Figura 5.52.</b> Curva de la actividad AChE resistente a mipafox 50 $\mu\text{M}$ en presencia de fenilvalerato.	133
<b>Figura 5.53.</b> Curva de la actividad AChE resistente a mipafox 25 $\mu\text{M}$ y PMSF 600 $\mu\text{M}$ en presencia de fenilvalerato.	134
<b>Figura 5.54.</b> Inhibición de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total por iso-OMPA 0,5 $\mu\text{M}$ durante 10 o 30 min de preincubación a 37°C.	135
<b>Figura 5.55.</b> Inhibición con iso-OMPA a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de membrana de cerebro.	136
<b>Figura 5.56.</b> Inhibición de actividad AChE total por BW284C51 1 $\mu\text{M}$ , durante 10 o 30 min de preincubación.	137
<b>Figura 5.57.</b> Curva de inhibición con BW284C51 a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro.	138
<b>Figura 5.58.</b> Inhibición de actividad AChE total por etopropazina 150 $\mu\text{M}$ , durante 10 o 30 min de preincubación.	139
<b>Figura 5.59.</b> Curva de inhibición a tiempo fijo con etopropazina de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro.	140
<b>Figura 5.60.</b> Curva de inhibición con paraoxon a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de membrana de cerebro.	141
<b>Figura 5.61.</b> Curva de inhibición a tiempo fijo con mipafox de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de membrana de cerebro.	142
<b>Figura 5.62.</b> Curva de inhibición a tiempo fijo con PMSF de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro.	143
<b>Figura 6.1.</b> Ensayo de discriminación de los diferentes componentes en fracción soluble de cerebro de pollo., utilizando iso-OMPA y PMSF.	173
<b>Figura 6.2.</b> Componentes de actividades hidrolizantes de fenilvalerato (PVasa) y de acetiltiocolina (ChE).	176
<b>Figura 6.3.</b> Ensayo de discriminación de los diferentes componentes en fracción de membrana de cerebro de pollo, utilizando iso-OMPA.	192
<b>Figura 6.4.</b> Componentes de actividades hidrolizantes de fenilvalerato (PVasa) y de acetiltiocolina (ChE) de membrana de cerebro.	194

## Índice de Tablas.

<b>Tabla 1.1.</b> Toxicidad de los organofosforados relacionada con la inhibición de esterasas.	11
<b>Tabla 1.2.</b> Efectos de la sobreestimulación de los receptores de la acetilcolina después de una exposición aguda a OPs.	12
<b>Tabla 1.3.</b> Clasificación de hidrolasas según la IUB	21
<b>Tabla 1.4.</b> Propiedades y diferencias de acetil y butirilcolinesterasa.	27
<b>Tabla 1.5.</b> Discriminación de tres componentes esterásicos enzimáticos en fracción soluble de cerebro.	34
<b>Tabla 1.6.</b> Discriminación de cuatro componentes esterásicos enzimáticos en fracción de membrana de cerebro.	34
<b>Tabla 4.1.</b> Protocolo del método de medida de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina.	62
<b>Tabla 5.1.</b> Reproducibilidad intraensayo	80
<b>Tabla 5.2.</b> Reproducibilidad interensayo.	81
<b>Tabla 5.3.</b> Actividad PVasa total incubando el sustrato fenilvalerato en presencia de acetiltiocolina o acetil- $\beta$ -metil-tiocolina	84
<b>Tabla 5.4.</b> Parámetros cinéticos de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la <b>Figura 5.9.</b>	85
<b>Tabla 5.5.</b> Parámetros cinéticos de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la <b>Figura 5.10.</b>	86
<b>Tabla 5.6.</b> Parámetros cinéticos de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la <b>Figura 5.11.</b>	87
<b>Tabla 5.7.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición a tiempo fijo con iso-OMPA de la actividad PVasa de fracción soluble de cerebro.	90
<b>Tabla 5.8.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición a tiempo fijo con BW284C51 de la actividad PVasa de fracción soluble de cerebro.	93
<b>Tabla 5.9.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición irreversible a tiempo fijo con etopropazina de la actividad PVasa de fracción soluble de cerebro.	95
<b>Tabla 5.10.</b> Actividad hidrolizante de acetiltiocolina total incubando el sustrato acetil- $\beta$ -metil-tiocolina o acetiltiocolina en presencia de PV como inhibidor.	102
<b>Tabla 5.11.</b> Parámetros cinéticos de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina en experimento de inhibición con PV correspondiente a la <b>Figura 5.24.</b>	103
<b>Tabla 5.12.</b> Parámetros cinéticos e índices estadísticos obtenidos.	104
<b>Tabla 5.13.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición con iso-OMPA de actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	107
<b>Tabla 5.14.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición con BW284C51 de actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	108
<b>Tabla 5.15.</b> Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	110
<b>Tabla 5.16.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición a tiempo fijo con paraoxon de actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	111
<b>Tabla 5.17.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición con mipafox a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	112
<b>Tabla 5.18.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición con PMSF de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.	113
<b>Tabla 5.19.</b> Velocidad máxima sin inhibidor ( $V$ ) y en presencia de inhibidor ( $V'$ ) de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la <b>Figura 5.39.</b>	119
<b>Tabla 5.20.</b> Velocidad máxima ( $V$ ) de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la <b>Figura 5.40.</b>	120
<b>Tabla 5.21.</b> Velocidad máxima ( $V$ ) de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la <b>Figura 5.41.</b>	121
<b>Tabla 5.22.</b> Velocidad máxima ( $V$ ) de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la <b>Figura 5.42.</b>	122

<b>Tabla 5.23.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición con iso-OMPA de la actividad PVasa de fracción de membrana de cerebro.	125
<b>Tabla 5.24.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición con etopropazina de actividad PVasa de fracción de membrana de cerebro.	128
<b>Tabla 5.25.</b> Valores de velocidad máxima sin inhibidor (V) y con inhibidor (V') de la actividad hidrolizante de acetilcolina en experimento de inhibición con PV correspondiente a la <b>Figura 5.51.</b>	132
<b>Tabla 5.26.</b> Valores de velocidad máxima sin inhibidor (V) y con inhibidor (V') de la actividad hidrolizante de acetilcolina en experimento de inhibición con PV correspondiente a la <b>Figura 5.52.</b>	133
<b>Tabla 5.27.</b> Valores de velocidad máxima sin inhibidor (V) y con inhibidor (V') de la actividad hidrolizante de acetilcolina en experimento de inhibición con PV correspondiente a la <b>Figura 5.53.</b>	134
<b>Tabla 5.28.</b> Parámetros y componentes de la curva de inhibición con iso-OMPA de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción de membrana de cerebro de la <b>Figura 5.55.</b>	137
<b>Tabla 5.29.</b> Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción de membrana de cerebro de la <b>Figura 5.57</b>	138
<b>Tabla 5.30.</b> Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción de membrana de cerebro de la <b>Figura 5.59</b>	140
<b>Tabla 5.31.</b> Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro de la <b>Figura 5.60</b>	142
<b>Tabla 5.32.</b> Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro de la <b>Figura 5.61</b>	143
<b>Tabla 5.33.</b> Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro de la <b>Figura 5.62.</b>	144
<b>Tabla 6.1.</b> Comparaciones de las constantes cinéticas obtenidas de los experimentos de interacción de sustratos de la actividad PVasa y AChE, en fracción soluble de cerebro.	151
<b>Tabla 6.2.</b> Comparación de los resultados de la inhibición a dos tiempos diferentes de actividad PVasa, en fracción soluble de cerebro.	155
<b>Tabla 6.3.</b> Interpretación global de los distintos componentes enzimáticos de actividad PVasa detectados en fracción soluble de cerebro de pollo con los inhibidores ensayados y con los inhibidores utilizados en los trabajos de Mangas et al.	156
<b>Tabla 6.4.</b> Comparación de los resultados de la inhibición a dos tiempos diferentes de actividad hidrolizante de acetilcolina, en fracción soluble de cerebro.	164
<b>Tabla 6.5.</b> Interpretación global de los distintos componentes enzimáticos de actividad hidrolizante de acetilcolina detectados en fracción soluble de cerebro de pollo.	165
<b>Tabla 6.6.</b> Comparaciones de la Vmax y V'max obtenidas de las interacciones entre las actividades PVasa e hidrolizante de acetilcolina en fracción de membrana de cerebro de pollo.	178
<b>Tabla 6.7.</b> Comparación de los resultados de la inhibición a dos tiempos diferentes de actividad PVasa, en fracción de membrana de cerebro.	181
<b>Tabla 6.8.</b> Interpretación global de los distintos componentes enzimáticos de actividad PVasa detectados en fracción de membrana de cerebro de pollo con los inhibidores ensayados y con los utilizados en los trabajos de Mangas et al.	182
<b>Tabla 6.9.</b> Comparación de los resultados de la inhibición a dos tiempos diferentes de la actividad hidrolizante de acetilcolina, en fracción de membrana de cerebro.	186
<b>Tabla 6.10.</b> Interpretación global de los distintos componentes enzimáticos de actividad hidrolizante de acetilcolina detectados en fracción de membrana de cerebro de pollo.	186





# **1. INTRODUCCIÓN.**



## 1.1. COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

### 1.1.1. Evolución histórica de los OPs

La química del fósforo se remonta a 1820, cuando Lassaingne estudió por primera vez las reacciones del alcohol con el ácido fosfórico.

Las investigaciones modernas datan de 1932, año en que Lange y Krueger sintetizaron los dimetil y dietil fosfofluoridatos, y por primera vez describieron los efectos nocivos de los OPs sobre los seres vivos. Las observaciones de los autores de que la inhalación de los vapores de estos compuestos causaba una persistente sensación de ahogo y visión borrosa fue lo que condujo al alemán Schrader y sus colaboradores en 1937, a investigar la actividad biocida de estos compuestos.

Las conclusiones a las que se llegaron sobre su toxicidad llevaron a pensar en su uso como armas de guerra química. Por este motivo fueron prohibidos como armamento químico por la Convención de Génova de la Liga de las Naciones en 1925, aunque algunos países se reservaron el derecho a utilizarlos si eran atacados primero con ellos.

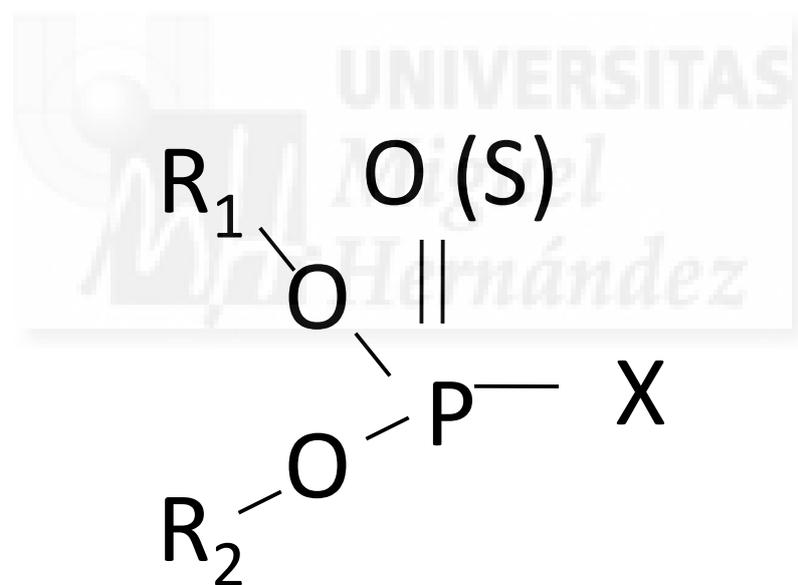
A pesar de tal prohibición, a finales de los años 30 y principios de los 40, se siguió investigando por el mismo Schrader y otros muchos como armas de guerra química, llegando a sintetizar unos 300 OPs diferentes con fines militares, de los cuales uno de los más conocidos es el Diisopropilfluorofosfato (DFP). Durante la II Guerra Mundial se crearon en Alemania nuevos compuestos como el tabún, el sarin y el somán (Baños J.E., Bosch F., 1992)

En 1944 Schrader sintetizó el paratión, un compuesto ampliamente utilizado en la agricultura por su elevada potencia insecticida, su baja volatilidad y su buena estabilidad en el agua. En 1950 se descubrió el malatión, también de amplio espectro pero de menor toxicidad para los mamíferos. En 1947 la compañía suiza Geigy descubrió un nuevo grupo de insecticidas, los carbamatos, que actuaban de forma similar a los OPs, aunque con efectos menos duraderos.

### 1.1.2. Estructura química y propiedades fisico-químicas de los compuestos organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OPs) conforman un amplio grupo de compuestos de síntesis: amidas, ésteres y derivados tiólicos del ácido fosfórico o fosfónico. Su estructura química, tal y como se muestra en la **Figura 1.1.**, presenta dos grupos R, que generalmente son grupos alquilo o arilo simples, que pueden estar unidos ambos directamente al átomo de fósforo (fosfinatos) o a través de un átomo de oxígeno o azufre (fosfatos o fosforotioatos, respectivamente)

En los fosforamidatos, al menos uno de los radicales está unido al átomo de fósforo a través de un grupo  $-NR_2$ . El grupo X puede tener diversas estructuras, dentro de diversos grupos alifáticos, aromáticos o heterocíclicos, unido al fósforo mediante un enlace de oxígeno o azufre, en el caso de los gases de guerra es el flúor ó el cianuro. Este grupo X, al que se conoce como “grupo saliente”, es el que se separa cuando el inhibidor reacciona covalentemente con la proteína diana ó cuando es hidrolizado química ó enzimáticamente (**Figuras 1.2 y 1.3**)



**Figura 1.1. Estructura química general de los compuestos organofosforados.**  $R_1$  y  $R_2$  son generalmente grupos alquilo o arilo simples. El grupo X puede ser cualquiera dentro de una amplia variedad de grupos.

A la forma P=O del éster se le denomina forma "oxo" y a veces se incorpora al nombre común, por ejemplo paraoxon es la forma oxo del paratión. La forma P=S es más estable, así que muchos de estos compuestos se sintetizan en esta forma y mediante reacciones metabólicas se transforman en la forma oxo que es potencialmente más tóxica (WHO, 1986a).

Sus propiedades químicas pueden variar considerablemente de unos a otros, pero presentan algunas características comunes. Son sustancias muy liposolubles, lo que favorece su penetración en los organismos, son estables a pH neutro, a pH inferiores a 2 y superiores a 9 pierden estabilidad y se hidrolizan rápidamente (Lunn y Sansone, 1994)

Su naturaleza electrofílica puede dar lugar a reacciones de sustitución (fosforilaciones y alquilaciones) con reactivos nucleofílicos. Uno de estos reactivos puede ser el agua que puede producir una hidrólisis a pH alcalino o enzimática. Así mismo puede reaccionar con un grupo -OH de serina perteneciente a carboxilesterasas tipo B causando su inhibición.

### **1.1.3. Aplicaciones de los compuestos organofosforados.**

Su aplicación más habitual e importante se produce en la agricultura, como plaguicidas. Se emplean como insecticidas, fungicidas y acaricidas, para combatir plagas, eliminar vectores de enfermedades y a nivel doméstico (Instituto Nacional de Toxicología 1996).

La cantidad de OPs en uso está disminuyendo, especialmente en los países desarrollados. Desde 1997, ha habido un cambio en el mercado de los OPs y de los carbamatos hacia los neonicotinoides, acompañado por una clara tendencia hacia una variedad de insecticidas no neuroactivos. Sin embargo, su importancia probablemente continúe durante décadas ya que son efectivos y de bajo costo (Casida y Durkin., 2013).

Por ejemplo, la cantidad de insecticidas organofosforados utilizados se ha reducido en más de un 60% desde 1990, de un estimado de £ 85 millones en 1990 a £ 33 millones en 2007 en los Estados Unidos. Los OPs han representado alrededor del 35% de los insecticidas utilizados en el último año de análisis, 2007. A pesar de que han aumentado en los últimos tres decenios la cantidad de compuestos que actúan en otras dianas, OPs y metilcarbamatos, permanecen en lo alto de los números de la lista entre los insecticidas comerciales (Casida y Durkin, 2013; Grube et al, 2011).

## INTRODUCCIÓN

Las intoxicaciones por OPs son especialmente frecuentes en las zonas agrícolas, donde se usan de forma habitual. Debido a su progresivo uso en los hogares como insecticidas para las viviendas o para aplicarlos en pequeños jardines, cada vez son más frecuentes las intoxicaciones domésticas (Yelamos F. et al, 1992)

Respecto a su uso como armas químicas, a pesar de que el acuerdo de la Convención de Génova fue ratificado por la Conferencia de París de 1989 (Hu, H. et al, 1989), en la última década algunos países y grupos terroristas han vuelto a utilizarlos como armas de guerra.

Los iraquíes los utilizaron en las guerras contra Irán y los kurdos. Grupos terroristas japoneses utilizaron el sarín en Junio de 1994 en la ciudad de Matsumoto (Morita H. et al, 1995) y en Marzo de 1995 en el metro de Japón (Suzuki, T. et al, 1995).

Se ha estudiado el uso de inhibidores reversibles de la colinesterasa (ChEs), como la piridostigmina, en la profilaxis de soldados expuestos a la guerra química en la Guerra del Golfo Persa (Keeler J.R. et al 1991).

También hay que destacar sus aplicaciones industriales, como plastificantes y aditivos del petróleo, en la gasolina funcionan como detonantes del proceso de combustión y en los aceites lubricantes y fluidos hidráulicos proporcionan resistencia al calor y a las presiones extremas debido a sus propiedades como estabilizantes térmicos.

Su aspecto terapéutico en medicina humana se basa en su acción anticolinesterásica y se utilizan en tratamientos de enfermedades como el glaucoma y el Alzheimer, en medicina veterinaria suelen usarse como parasiticidas.

## 1.2. TOXICOCINÉTICA DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS.

### *Absorción de los OPs*

Un compuesto OP debe alcanzar las moléculas diana para ejercer su acción tóxica. Para ello debe de penetrar en el organismo, atravesando un gran número de barreras y membranas biológicas. Las vías de entrada de estos compuestos a los sistemas biológicos son múltiples, incluyendo la digestiva, respiratoria y dérmica.

La entrada a través del tracto gastrointestinal se produce por difusión, en los pulmones por absorción y en la piel por difusión simple.

Ahora bien, si tenemos en cuenta su marcado carácter lipofílico, la entrada a través de estas vías resulta muy sencilla, aunque influyen el tiempo de exposición y la forma de aplicación (Davis y Richarson, 1980).

La absorción dérmica suele ser más lenta pero si el tiempo de exposición es alto, encontramos mayores tasas de absorción. La absorción aumenta conforme lo hace la temperatura y en presencia de afecciones de la piel (dermatitis) (Gallo y Larwyk, 1991). En esta vía de entrada también influye la presencia de prendas de vestir así como de emulsionantes y/o disolventes.

En las intoxicaciones ocupacionales la vía cutánea y respiratoria son las más importantes.

### *Distribución y acumulación*

Una vez que el compuesto ha penetrado en el organismo su distribución está determinada por su unión a proteínas plasmáticas y otros tejidos y la velocidad con que atraviesan las membranas celulares.

Los compuestos OPs se almacenan en tejidos ricos en grasas, al menos de forma temporal, dependiendo de la biodegradabilidad del compuesto. Un ejemplo a modo ilustrativo es el estudio de la distribución del paratión marcado con  $^{32}\text{P}$  realizado por Fiedriksson y Bigelow en 1961. Después de la inyección subcutánea de paratión marcado en ratones, se observó que los mayores niveles de radiactividad se encontraban en sangre, seguidos por la grasa parda cervical y en las glándulas salivares. De la misma forma, se detectaron altos niveles radiactivos en hígado, riñón y tejido adiposo. La radiactividad detectada fue menor en las paredes del tracto gastrointestinal, tiroides, bazo y pulmones, mientras que los niveles fueron mínimos en sistema nervioso central, en tejido muscular y médula ósea. La radiactividad resultó apenas detectable en timo, glándulas adrenales, piel, bilis y luz intestinal.

## INTRODUCCIÓN

### Biotransformación

Los organofosforados pueden seguir dos procesos metabólicos:

A) En la *Desactivación* o *destoxificación* pueden convertirse en un compuesto más hidrosoluble y ser excretado, este proceso se lleva a cabo mediante hidrólisis con fosfotriesterasas (Vilanova y Sogorb, 1999; Sogorb y Vilanova, 2002) ó unión a carboxilesterasas, en ambos casos se produce una ruptura del enlace éster del fósforo, produciendo una carga negativa en la molécula.

B) En la *Activación tóxica*, puede experimentar modificaciones estructurales que le lleven a aumentar su toxicidad, generalmente implica reacciones de oxidación e hidroxilación.

Las principales vías de biotransformación de los compuestos OPs son: oxidasas de función mixta (MFOs), glutatión-S-transferasas e hidrolasas, acetilcolinesterasas (AChE), carboxilesterasas (CbEs) y fosfotriesterasas. Las relaciones entre todas estas enzimas se muestran en la **Figura 1.2**.

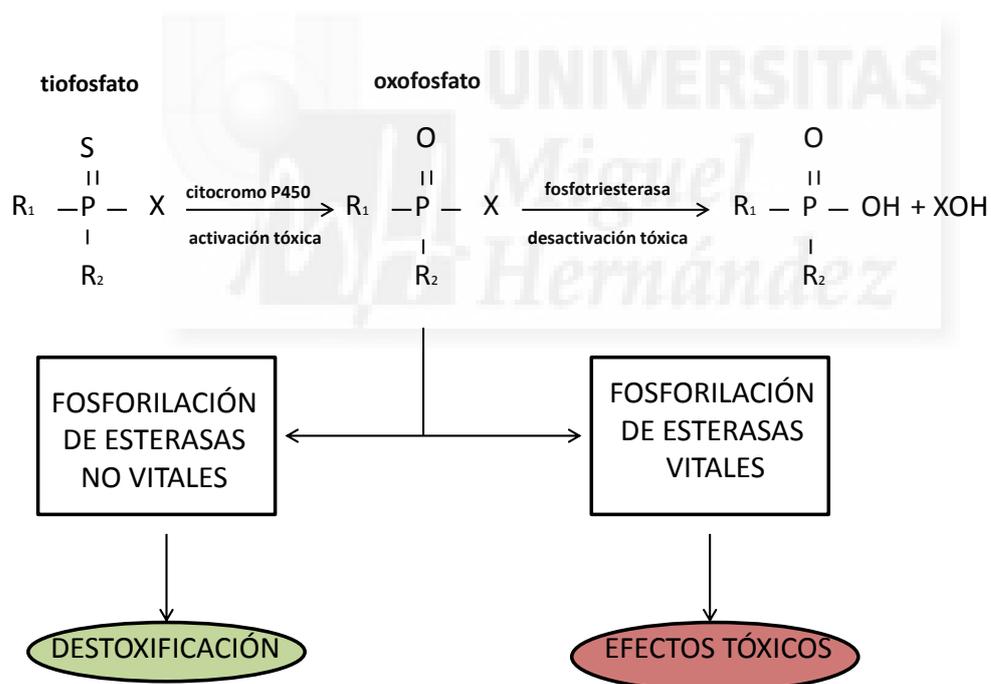


Figura 1.2. Principales vías de activación tóxica y destoxificación de compuestos organofosforados.

Los OPs interactúan principalmente con dos tipos de hidrolasas: fosfotriesterasas y carboxilesterasas.

Las fosfotriesterasas catalizan la hidrólisis de los OPs por la ruptura del enlace éster del grupo saliente, entre ellas se encuentra la paraoxonasa, cuya función e detoxificación de xenobióticos es conocida (Sogorb et al, 1996).

Las carboxilesterasas (CbEs) son hidrolasas que se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos de mamíferos y otras especies incluidos insectos. Pueden interactuar con los OPs mediante la esterificación del residuo de serina situado en el centro activo de la esterasa (Aldrige y Reiner, 1972). Bloqueando el centro activo y su actividad catalítica queda inhibida. Cuando las CbEs fosforiladas por estos compuestos no tienen funciones vitales, su fosforilación en la práctica funciona como un mecanismo de detoxificación, así por ejemplo, el incremento de las CbEs es el mecanismo de adquisición de resistencia de los insectos a plaguicidas OPs (Cuany et al, 1993; Smyth et al, 1994). En el supuesto de que la enzima fosforilada tenga una función biológica vital, como es el caso de la acetilcolinesterasa (AChE), se desencadenan efectos tóxicos. De este grupo de enzimas se hará una descripción más detallada en los apartados siguientes.

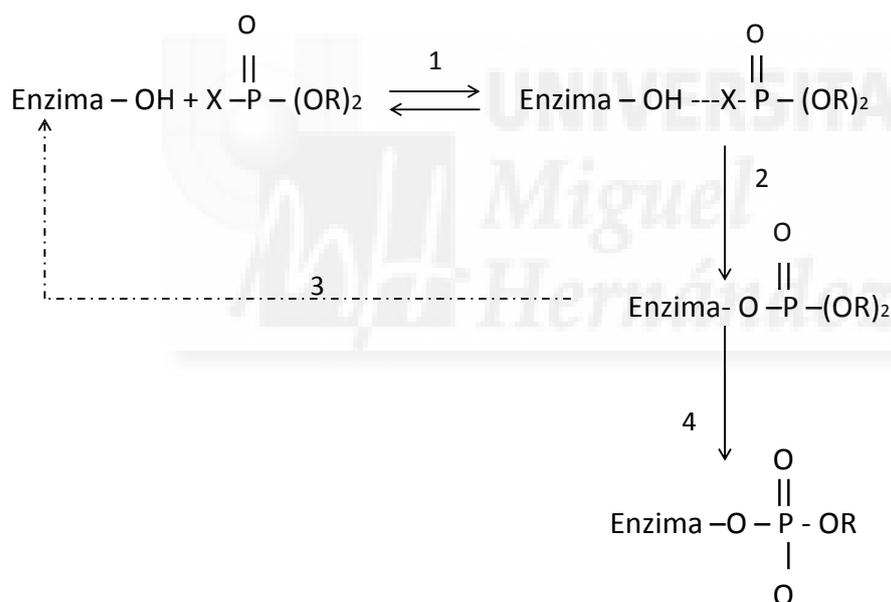


### 1.3. EFECTOS TÓXICOS DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS.

#### *Reacciones de interacción con esterasas*

El lugar bioquímico diana de los efectos biológicos de un OP generalmente implica la inhibición de esterasas mediante fosforilación. Este mecanismo es igual para todas ellas y se muestra en la **Figura 1.3** y se pueden distinguir las siguientes reacciones:

1. Formación del complejo Michaeliano.
2. Fosforilación de la enzima
3. Reacción de reactivación
4. Reacción de envejecimiento



**Figura 1.3. Mecanismo de inhibición de esterasas por organofosforados**

Cuando se ha formado el complejo michaeliano entre la enzima y el OP (reacción 1), se fosforila un residuo de serina de la enzima perdiéndose el grupo saliente X (reacción 2). A partir de aquí pueden darse dos vías: la de reactivación (reacción 3) en la que la enzima se recupera o una reacción de envejecimiento (reacción 4) en la que se rompe el enlace R-O-P perdiéndose el grupo R y formándose un residuo fosfórico con una carga negativa (Johnson, 1975). La reacción 3 puede ser espontánea o inducida por reactivos nucleofílicos.

Los efectos tóxicos más característicos de los OPs se relacionan con la fosforilación de las esterasas (**Tabla 1.1**) aunque dependiendo del compuesto pueden darse otros tipos de efectos. Su acción tóxica se puede resumir en:

- Inhibición de la AChE del sistema nervioso produciendo efectos tóxicos inmediatos.
- Inhibición de la esterasa diana de la neuropatía (NTE) causando efectos tóxicos retardados.
- Otros efectos sobre órganos como pulmón, hígado, riñón, médula ósea, sistema inmunitario, etc., por mecanismos no muy bien conocidos.

**Tabla 1.1. Toxicidad de los organofosforados relacionada con la inhibición de esterasas.**

Efectos	Síntomas	Aparición sintomatología	Proteína implicada
Colinérgicos	<i>Muscarínicos</i> : broncoconstricción, vómitos... <i>Nicotínicos</i> : fatiga, temblor, debilidad muscular. <i>Derivados del SNC</i> : ansiedad, depresión respiratoria, confusión...	Inmediata	Acetilcolinesterasa
Síndrome intermedio	<i>Afección muscular</i> : parada respiratoria, debilidad muscular (cuello y extremidades)	24 – 96 h	Hiperestimulación de receptores nicotínicos
Neurotoxicidad retardada	<i>Afección motora</i> : debilidad muscular y parálisis flácida (zona distal extremidades inferiores).	2-3 semanas	NTE
Otros	<i>Otros síntomas</i>	----	Otras

## INTRODUCCIÓN

### *Efectos colinérgicos agudos.*

La intoxicación aguda por OPs se atribuye a un aumento de la acetilcolina endógena como consecuencia de la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) y la sobreestimulación consecuente de las funciones colinérgicas tanto en el sistema nervioso como en los órganos efectores. Como consecuencia de la inhibición de la AChE se observa un cuadro clínico característico de intoxicación que puede incluir síntomas muscarínicos, nicotínicos y, en muchos casos, efectos sobre el sistema nervioso central (**Tabla 1.2**) (Solé-Violán et al, 1985; Sales et al, 2004).

Niveles de inhibición de cerca del 70 % de la acetilcolinesterasa nerviosa conducen a la acumulación de la acetilcolina en los espacios sinápticos de las uniones neuromusculares.

**Tabla 1.2. Efectos de la sobreestimulación de los receptores de la acetilcolina después de una exposición aguda a OPs.**

<b>Receptor</b>	<b>Síntomas clínicos</b>
<b>Receptores muscarínicos</b>	Diarrea, incontinencia urinaria, miosis, bradicardia, broncoconstricción, hipotensión, incremento de la movilidad gastrointestinal, calambres intestinales e hipersalivación.
<b>Receptores nicotínicos</b>	Hipertensión, taquicardias, fibrilación, necrosis de los músculos estriados.
<b>Ambos</b>	Temblores, pérdida de la coordinación del movimiento, depresión de la respiración, coma, muerte.

### *Síndrome intermedio*

Senanayake y Karalliedde describieron el síndrome intermedio en 1987. El término "síndrome intermedio" se aplica al cuadro caracterizado por recaída clínica, con gran debilidad muscular que aparece 24 a 96 horas después de la exposición. Puede estar asociado a una terapia insuficiente con oximas (Murat S, Muhammed G., 2001).

Este síndrome aparece generalmente, después de 4-5 días de iniciado el episodio agudo tóxico; se caracteriza por parálisis respiratoria aguda, debilidad de músculos flexores de la nuca, lengua y faringe, músculos proximales de las extremidades y músculos del tórax, con compromiso de la función respiratoria, entre otros. En un estudio prospectivo sobre síndrome intermedio en intoxicación por organofosforados realizado por Bleecker, Neucker y Colardyn en 1993, se demostró que el síndrome intermedio sólo ocurre en pacientes con inhibición prolongada de la acetilcolinesterasa y la presencia del síndrome no depende del tipo de agente tóxico involucrado. Aún no se conoce su mecanismo exacto (Karalliede y Henry, 1993).

### *Neuropatía retardada.*

Determinados compuestos OPs, pueden producir además de los efectos anteriores (intoxicación colinérgica y/o un síndrome intermedio) una neuropatía de aparición retardada (Yelamos F. et al, 1992). También conocida como "neuropatía retardada inducida por OPs" (OPIDN) (Johnson, 1969b, Johnson, 1982).

Esta neuropatía aparece después de la fase aguda de la intoxicación, alrededor de la 2ª-4ª semana. Está producida por la fosforilación de una enzima conocida como "esterasa diana de la neuropatía" (NTE) (Johnson, MK., 1982).

Se caracteriza por ser una polineuropatía sensitivo- motora de predominio axonal, de carácter agudo y bilateral, afecta fundamentalmente a los nervios periféricos (Johnson MK, 1980). Evoluciona de forma retrógrada y ascendente, pudiendo llegar a afectar al SNC.

Los OPs que son capaces de producir este tipo de efecto se denominan neuropáticos, o inductores de neuropatía. Si compuestos no neuropáticos, inhibidores de la NTE, se administran previamente a un OP neurotóxico, ejerce una acción protectora de la capacidad de inducir OPIDN por este último (Johnson, 1987; Lotti 1992).

Los primeros casos de neurotoxicidad retardada por OPs que se conocen en humanos datan de finales del siglo XIX, en pacientes tuberculosos tratados con fosfato de Cresota (Lorot C., 1899).

Sin embargo el diagnóstico correcto no se hizo hasta unos 30 años después, al observar la similitud de esas polineuropatías con las producidas por el triortocresil Fosfato (TOCP) comercial. Entonces se demostró que al fabricar fosfato de Cresota se formaba también TOCP (Mestre B. 1971).

## INTRODUCCIÓN

En Diciembre de 1946 se registró la primera intoxicación por TOCP en España. Afectó a 7 marineros del barco "Sandres", que hacía la travesía entre Barcelona, Valencia y las Baleares, y que consumieron por error un aceite que Llevaba TOCP. Todos ellos desarrollaron una neuropatía retardada, cuyas secuelas fueron seguidas durante 25 años.

En 1953 se informó de dos casos de neuropatía retardada en un laboratorio destinado a la producción de un nuevo OP denominado mipafox.

En 1959 se registraron en Marruecos al menos 10.000 casos de neuropatía en personas que habían consumido aceite de oliva adulterado con aceites lubricantes para aviones que llevaban en su composición TOCP (Smith HV., 1959).

Desde entonces la mayoría de casos de neuropatía retardada por OPs, se han relacionado con el manejo de los OPs, habiéndose comunicado en todo el mundo numerosos incidentes aislados de neuropatía por leptofos, tricloronato, clorpirifos, metamidofos y otros (Senanayake N. and Johnson MK., 1982).

Es posible que los OPs jueguen un papel oscuro pero importante en ciertas neuropatías ocasionales en trabajadores que manejan disolventes, adhesivos y otros materiales plásticos.

Aquí se incluiría la denominada " neuropatía del calzado", descrita a finales de los 60 y principios de los 70 en Italia y España, y que fue achacada (sin fundamento analítico suficiente) al TOCP. En España se han comunicado también casos de neuropatías por OPs en trabajadores de impermeables, marroquinería, recauchutado, caucho sintético y cintas adhesivas (Mestre, B. 1971; Bermejillo M., 1971).

Además se ha demostrado la potenciación sinérgica para producir neurotoxicidad al asociar los OPs con otras sustancias habitualmente utilizadas en estas industrias, como el n-hexano (Abou-Donia, M.B. y Lapadula, D.M., 1990).

En la presente década, debido al uso progresivo de los OPs en los hogares, se han descrito casos aislados de NR en el ámbito doméstico, como los 8 casos por clorpirifos descritos por Kaplan en los EE.UU. en 1993.

*Neurotoxicidad Crónica del Sistema Nervioso Central.*

Los efectos tóxicos en el SNC a largo plazo relacionados con la exposición OPs, se reportó por primera vez cuando, al regresar de la guerra del Golfo en 1991, miles de soldados mostraban una variedad de signos y síntomas de déficit neurológico (es decir, déficit de atención, dificultades de memoria y trastornos del sueño) que se conocen como enfermedades de la Guerra del Golfo. A pesar de la exposición intencional a la piridostigmina, la exposición a bajos niveles de agentes nerviosos OPs se ha asociado con estos efectos (McCauley., 2006; RAC report., 2008).

En las últimas décadas, un número creciente de estudios epidemiológicos han sugerido que la exposición de las personas a dosis repetidas de bajo a medio nivel de OPs, puede producir efectos neurológicos y de comportamiento a largo plazo, que afectan el sistema nervioso central en mayor grado que al sistema nervioso periférico (informe COT., 1999, Colosio et al, 2009; Brown y Brix, 1998; Parrón et al, 1996; Roldán-Tapia et al, 2006).

Estos efectos también se han observado en el personal militar, trabajadores agrícolas (Bazylewicz-Walczak et al, 2005; Roldán-Tapia et al, 2006; Mackenzie Ross, 2008), y los pilotos expuestos a aire contaminado con OPs (Mackenzie Ross et al., 2008). Síntomas similares se han reportado después de la exposición aguda al sarín durante el ataque terrorista de Tokio en 1995 (RAC report., 2008).

La mayor parte de la población tiene niveles medibles de metabolitos de OPs en la orina: Barr y su grupo (2004) informaron que el 50% de las personas en EE.UU. tienen niveles medibles de los metabolitos dialquil fosfato y el 71% del metabolito dietilfosfato. El USDA informó en 2006 que aproximadamente el 73% de las legumbres de frutas frescas, el 61% de los alimentos procesados y el 66% del agua potable en los EE.UU. contenía niveles detectables de OPs (USDA., 2005).

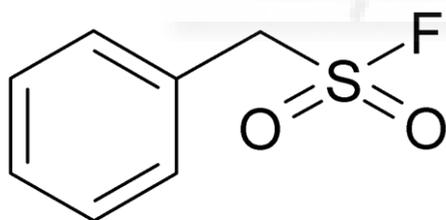
#### 1.4. INHIBIDORES UTILIZADOS.

##### *Fluoruro de fenilmetilsulfonilo*

El fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (**Figura 1.4**) es un inhibidor irreversible de proteasas y serín esterases, se hidroliza rápidamente en tampón tris pH 8 (James, 1978) de modo que es preparado en disoluciones de alcohol anhidro, isopropanol, o DMSO.

El compuesto se une específicamente a la serina del sitio activo de la proteasa. La molécula de PMSF se une covalentemente a la enzima, lo que posibilita que el complejo pueda ser visualizado mediante cristalografía de rayos X, siendo por tanto utilizado como marcador químico para identificar el sitio activo de las proteasas de esta clase.

Causa tanto protección como potenciación de la neuropatía retardada inducida por organofosforados, dependiendo de que se dosifique antes o después del OP inductor. Estos mecanismos son importantes para llegar a entender las potenciales consecuencias neurotoxicológicas de la exposición a contaminantes ambientales que no se consideran neurotóxicos. El PMSF es capaz de inhibir un 72% de la actividad fenilvalerato esterasa total de fracción soluble de cerebro de manera progresiva con el tiempo (Mangas, I. et al, 2012) e inactiva la AChE de ratón pero no de algunos peces como *Torpedo californica* (Fahrney and Gold, 1963; Barnett and Rosenberry, 1978; Moss and Fahrney, 1978).



**Figura 1.4.** Estructura química del PMSF (Número CAS 329-98-6).

##### *Dietil 4-nitrofenil fosfato (paraoxon).*

El paraoxon, (**Figura 1.5**), se eligió debido a que es el modelo de OP no inductor de OPIDN usado en el ensayo de la NTE (Johnson., 1974). Es el metabolito activo del plaguicida paratión y el compuesto representativo del grupo dietil de los plaguicidas OPs (Worek et al., 2004). El paratión fue desarrollado por Farben en 1940 y es usado en la actualidad en muchos países como insecticida, principalmente en cultivos hortofrutícolas, algodón y trigo.

Su toxicidad aguda es: en ratas: DL50 oral (M): 13 mg/kg; (F): 3.6 mg/kg y se ha reportado una dosis oral de 3-5 mg/kg usualmente fatal en humanos (FAO report., 1969).

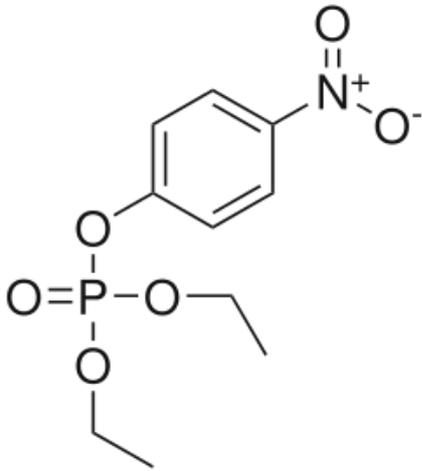


Figura 1.5. Estructura química del paraoxon. (Número CAS 311-45-5)

*N, N*-diisopropilfosforodiamidofluoridato (*Mipafox*)

El mipafox (**Figura 1.6**), se eligió como inhibidor OP modelo inductor de OPIDN usado en el ensayo de NTE. Fue sintetizado y comercializado como insecticida por Merck (The Merck Index., 1983). Sin embargo fue retirado de los mercados en 1973 como sospechoso de producir parálisis en dos trabajadores (Spencer, 1973). Después de este hecho, se ha venido empleando solo en investigación de la OPIDN.

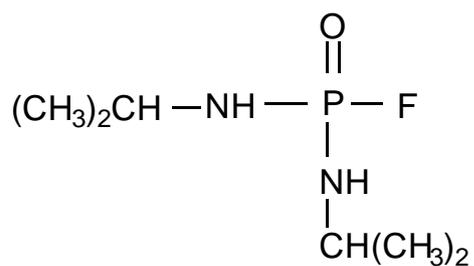
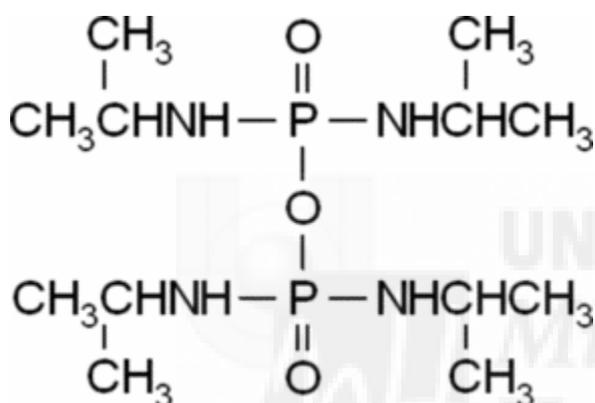


Figura 1.6. Estructura química del mipafox (Número CAS 371-86-8)

## INTRODUCCIÓN

### *Tetraisopropil fosforamida.*

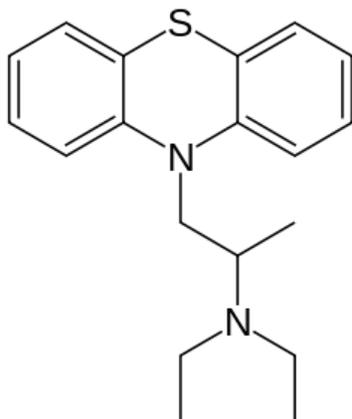
El tetraisopropil fosforamida (Iso-OMPA), (**Figura 1.7**) es un compuesto hidrófilo y liposoluble, se le conoce por ser un inhibidor específico e irreversible (Silver, 1974) de la butirilcolinesterasa (BuChE) de mamíferos. Por lo que se utiliza frecuentemente en experimentación para determinar la implicación de la BuChE en los procesos enzimáticos. En estudios llevados a cabo por Layer en 1992 en cultivos celulares de embriones de pollo, se observó un descenso de la expresión de acetilcolinesterasa con iso-OMPA, por lo que se concluyó que la inhibición de la actividad butirilcolinesterasa podría ser un mecanismo de regulación de la expresión de acetilcolinesterasa. El iso-Ompa también reduce significativamente la actividad carboxilesterasa en cerebro, plasma e hígado de ratas e induce la potenciación de la toxicidad del soman (Gupta, 1987) y del DFP en la misma especie (Gupta, 1985).



**Figura 1.7.** Estructura química del iso-OMPA (Número CAS: 513-00-8).

### *Etopropazina.*

La Etopropazina, (**Figura 1.8**) pertenece al grupo de los anticolinérgicos antimuscarínicos de acción central, y por ello se ubica por sus efectos terapéuticos en el grupo de los antiparkinsonianos o, más genéricamente, antidiscinéticos. Se utiliza para inhibir de forma específica la actividad BuChE (Koelle, 1963; Edwards y Brimijoin, 1983). Sin embargo la inhibición con etopropazina cambia, incluso entre diferentes especies de vertebrados y tejidos (Mikalsen et al 1986). La etopropazina inhibe totalmente la actividad BuChE en suero de caballo a una concentración de  $5 \cdot 10^{-5}$  M y a esa concentración no afecta a la actividad AChE, en el caso de la enzima plasmática en rata se observa una inhibición total a una concentración de  $5 \cdot 10^{-6}$  M.



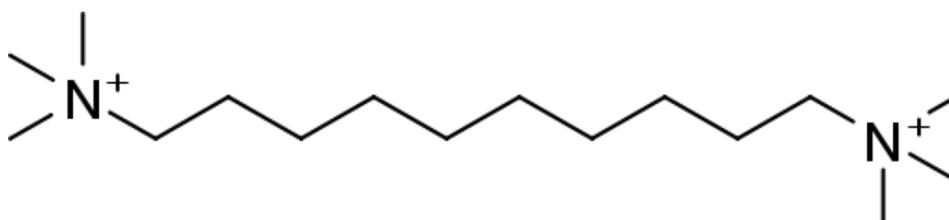
**Figura 1.8.** Estructura química de la etopropazina (Número CAS: 1094-08-2).

Worek y sus colaboradores (1999), sugieren el uso de etopropazina 20  $\mu\text{M}$  con la finalidad de inhibir la butirilcolinesterasa (BuChE) humana plasmática en la medida de actividad acetilcolinesterasa en sangre.

Sin embargo se observaron diferencias en las tasas de inhibición entre los distintos fenotipos descritos de BuChE humana en suero cuando se utiliza la etopropazina como un inhibidor selectivo, el fenotipo habitual de BuChE se inhibe el 98% (con etopropazina 20  $\mu\text{M}$ ), mientras que el fenotipo atípico de BuChE se inhibe sólo el 74% (Simeon-Rudolf V. et al 1999).

*1,5-bis (4-alildimetilamoniofenil) pentano-3-1 dibromuro (BW284C51).*

El BW284C51, este compuesto hidrosoluble es un amonio biscuaternario, cuya estructura química se muestra en la **Figura 1.9**. Actúa como inhibidor reversible de la AChE y afecta de manera reversible principalmente a los receptores nicotínicos de acetilcolina (Olivera-Bravo et al, 2005). Es de baja liposolubilidad, característica que dificulta su entrada a las células (Silver, 1974). Este hecho explica porqué después de una larga exposición al BW284C51 la actividad acetilcolinesterasa determinada en homogeneizados celulares, no es cero.



**Figura 1.9.** Estructura química del BW284C51 (Número CAS: 402-40-4)

## INTRODUCCIÓN

Este compuesto se ha utilizado para comprobar las localizaciones tisulares de la AChE debido a las diferencias significativas entre las estructuras y funciones encontradas en las diferentes colinesterasas de especies de vertebrados (Koelle, 1963; Mikalsen et al., 1986, Radic et al., 1993; Dupree y Bigbee, 1994). Su alta especificidad permite la discriminación entre AChE y BuChE. La unión del BW284C51 depende de la presencia de determinados residuos de aminoácidos en los sitios catalíticos y periféricos de la enzima (Radic et al, 1993; Eichler et al, 1994).

Sin embargo, no se han descrito otras funciones para BW284C51 que no sean de inhibición de AChE, aunque existe significativa similitud estructural y funcional con este compuesto y otros inhibidores de colinesterasas que se comportan como moduladores del receptor nicotínico de AChE, especialmente aquellos con grupos de amonio cuaternario.



## 1.5. ESTERASAS.

### 1.5.1. Esterasas que interactúan con organofosforados

Las esterazas son un grupo dentro de las Hidrolasas que comprende más de 60 enzimas diferentes que a su vez se distribuyen en subgrupos (**Tabla 1.3**).

**Tabla 1.3. Clasificación de hidrolasas según la IUB**

<b>GRUPO 3</b>	<b>HIDROLASAS</b>
<b>3.1.</b>	ESTERASAS
<b>3.1.1.</b>	HIDROLASAS DE ÉSTERES CARBOXÍLICOS
<b>3.1.1.1.</b>	Carboxilesterasas
<b>3.1.1.7.</b>	Acetilcolinesterasas
<b>3.1.1.8.</b>	Colinesterasas
<b>3.1.8.</b>	HIDROLASAS DE TRIÉSTERES FOSFÓRICOS (Fosfotriesterasas)

La diferenciación y sistematización de las esterazas que interactúan con OPs, es de una importancia considerable, tanto para entender sus efectos biológicos como los mecanismos de biodegradación.

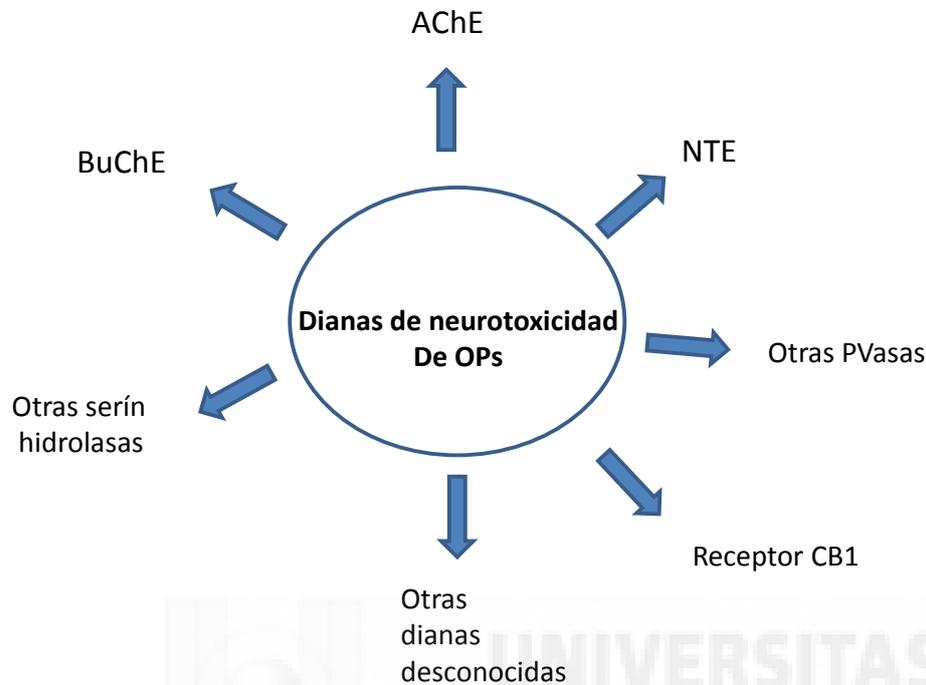
Desde un punto de vista toxicológico, las esterazas se clasifican en tres grandes categorías (Reiner et al, 1993):

1. A Esterasas: aquellas que pueden utilizar organofosforados como sustrato e interactúan hidrolizándolos.
2. B Esterasas: aquellas que son inhibidas por los organofosforados.
3. C Esterasas: no interactúan con organofosforados (Aldridge, 1993; Walker et al., 1997).

Aldrige (1953) clasificó a las esterazas que hidrolizan OPs en dos grupos en función de su interacción con estos compuestos: hidrolizando OPs sin ser inhibidas por éstos (A-esterasas), o bien pueden interactuar de manera covalente mediante la esterificación de un residuo de serina situado en el centro activo de la esteraza (B-esterasas) (Aldrige y Reiner, 1972).

## INTRODUCCIÓN

En ambos casos, los OPs se comportan como sustratos de las enzimas; en las A-esterasas los OPs son biotransformados (liberación de un grupo saliente y ácido). Mientras que en las B-esterasas los OPs forman un complejo enzima-sustrato irreversible.



**Figura 1.10. Dianas de los compuestos organofosforados. (Fuente: tesis doctoral I. Mangas).**

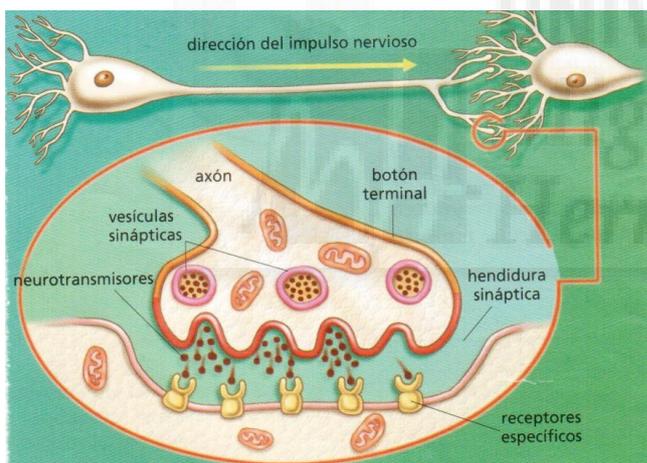
Los efectos tóxicos de los OPs pueden ser sobre dianas conocidas (inhibición de la AChE o de la NTE) o sobre dianas aún desconocidas. **(Figura 1.10).**

La AChE es diana tanto de los OPs como de los carbamatos y como consecuencia de su inhibición se producen los síndromes colinérgicos.

### Papel de la AChE en el impulso nervioso

El impulso nervioso, de naturaleza eléctrica, no puede transmitirse directamente a la membrana postsináptica debido a que existe un espacio entre las membranas pre y postsináptica (**Figura 1.11.**), se requiere de la liberación de una sustancia llamada neurotransmisor que llega a la membrana postsináptica y se une a un receptor específico; como resultado de esta interacción, la neurona postsináptica cambia su potencial de membrana (Hodgkin y Huxley, 1952; Amstrong, 1992; Hille, 1992)

La acetilcolina es uno de los neurotransmisores que interviene en el proceso (Dale, H.H., 1914), la neurotransmisión mediada por AChE es fundamental en la función del SNC; su interrupción abrupta es letal y su pérdida gradual está asociada al deterioro cognitivo progresivo, autonómico y a la función neuromuscular, como en múltiples atrofas y en la enfermedad de Alzheimer (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008). La AChE hidroliza rápidamente a la acetilcolina en acetato y colina, regulando la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis.



**Figura 1.11. Transmisión del impulso nervioso** (Fuente: <http://larafranciscobio1.blogspot.com.es> Mayo 2014).

Por el contrario aun no se conoce el papel fisiológico que desempeña la BuChE y aunque algunos datos sugieren que participa en procesos de detoxificación su ausencia o bajos niveles en determinados individuos, aparentemente no supone consecuencias (Lockridge, O. et al, 2005).

## INTRODUCCIÓN

Otra de las esterasas que son inhibidas por los OPs, es la esterasa diana de la neuropatía (NTE), su inhibición y posterior envejecimiento produce la llamada neuropatía retardada inducida por OPs (OPIDP) (Johnson, 1969b, Johnson, 1982).

La relación existente entre las carboxilesterasas y las colinesterasas empieza por que ambas contienen un resto de serina en su centro activo, además de sus similitudes en el mecanismo catalítico (Augustinsson 1968), estos hechos llevaron a plantear una teoría en la que ambas enzimas habrían evolucionado a partir de una serín-proteína única. Durante todo el proceso que dio lugar a las formas actuales, los grupos se diferenciaron al adquirir las colinesterasas el centro aniónico, lo que las capacitó para unirse a sustratos catiónicos.

Augustinsson demostró que las BuChE (también llamadas pseudocolinesterasas) de diferentes especies animales, exhibían diferencias de especificidad frente a los colinésteres así como de sensibilidad ante inhibidores, las butirilcolinesterasas de diferentes especies fueron homogéneas respecto a esas propiedades.

Concluyó afirmando que las diferencias en cuanto al comportamiento de estas colinesterasas se debían a cambios producidos por mutaciones, siendo la BuChE la forma más especializada de pseudocolinesterasas. Parece probable que los centros activos de acetil y butirilcolinesterasas sean similares respecto al centro del éster, aunque bien la propia naturaleza del centro aniónico, o bien los restos aminoacídicos que rodean a este centro podrían ser diferentes.

En 1970 Kingsbury, incluso admitió la posibilidad de un desarrollo filogenético común para todas las esterasas, a partir de una esterasa ancestral común. En las secciones siguientes se describen con más detalle las colinesterasas y carboxilesterasas.

### 1.5.2. Colinesterasas (E.C.3.1.1.7, E.C.1.1.8.)

La definición y posterior clasificación de las colinesterasas tuvo su origen en el descubrimiento hecho por Galehr y Plattner (1927) de la distinta especificidad de sustrato que poseían las esterasas de sangre completa y de suero.

Algunos años después, en 1932, se llevó a cabo la preparación de una enzima de suero de caballo, cuya actividad era la hidrólisis de ésteres de colina, específicamente, además, esta enzima también era capaz de hidrolizar la butirilcolina, de manera más rápida que la acetilcolina (Stedman y Easson, 1932)

Desde entonces este grupo de enzimas son objeto de numerosas investigaciones: estructura molecular, biología celular, distribución en tejidos, etc... pero también son muchas las cuestiones sin resolver.

Las colinesterasas (**Figura 1.12.**), constituyen una familia de esterasas pertenecientes al grupo de las B esterasas, que hidrolizan ésteres de colina de forma más activa que a otro tipo de ésteres, sus sustratos más importantes son: acetilcolina, butirilcolina, succinilcolina,....

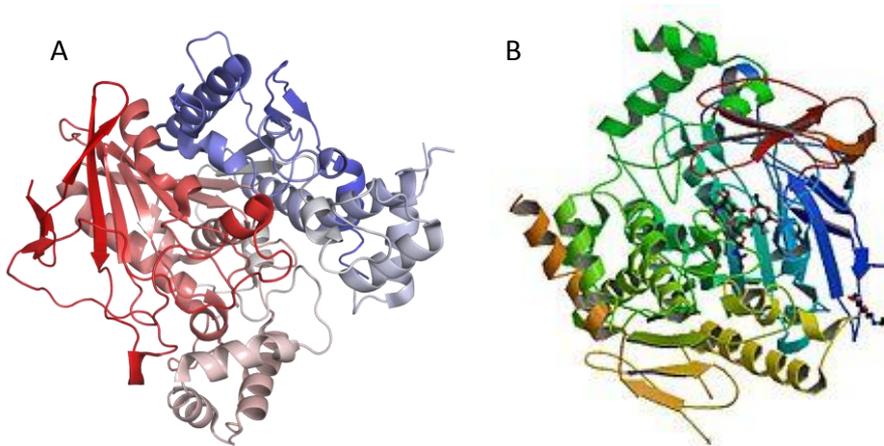
Se diferencian de otras esterasas por la fuerte inhibición que experimentan a bajas concentraciones ( $10^{-5}M$ ) del alcaloide natural fisostigmina, un carbamato conocido como eserina. Se caracterizan por tener un resto de serina en el sitio activo. En vertebrados se distinguen, la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa.

No hay relación alguna entre la distribución de ambas colinesterasas en los tejidos. La AChE es predominante en músculo y sistema nervioso, en donde los niveles de BuChE son menores. La BuChE está presente en otros tejidos, como el hígado y después de ser sintetizada y es secretada al plasma.

El único sustrato natural de la AChE (E.C. 3.1.1.7.) es la acetilcolina, aunque también es capaz de hidrolizar butirilticolina,  $\beta$ -metilticolina, propionilcolina y a los análogos tiocolina de los tres compuestos (Repetto, M., 1995).

La butirilcolinesterasa (E.C. 3.1.1.8.), también conocida como pseudocolinesterasa y colinesterasa plasmática no actúa sobre la  $\beta$ -metilticolina (Alles y Hawes, 1940). La BuChE de mamíferos hidroliza la butirilcolina 4 veces más rápido que a la acetilcolina (Massoulié et al, 1993 y 2005). Otra forma de distinguir ambas enzimas es por sus inhibidores; la butirilcolinesterasa es inhibida por la quinina, la etopropazina y el iso-OMPA (Vellom et al, 1993; Radic et al, 1993), que no influyen en la AChE de mamíferos. El BW284C51 inhibe fuertemente la acetilcolinesterasa que además también experimenta un efecto de inhibición por exceso de sustrato, por el contrario la BuChE es activada por la concentración de sustrato (Radic y Taylor, 2006).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 1.12. Estructuras de butirilcolinesterasa (A) y acetilcolinesterasa (B).**

(Fuente: <http://www.proteopedia.org> Mayo 2014).

Ambas enzimas son codificadas por genes distintos, en vertebrados superiores, en insectos y nematodos pueden existir múltiples genes que codifican la AChE (Taylor y Radic, 1994). En todos los grupos animales que se han estudiado existen enzimas capaces de hidrolizar acetilcolina (Silver 1974), pero los criterios establecidos para vertebrados, no son aplicables en el resto, de hecho en invertebrados, la mayoría de los insectos poseen una sola colinesterasa con una preferencia de sustrato intermedia entre la AChE y la BuChE (Hall, 1986), tenemos el ejemplo de la *Drosophila* (Greenspan et al, 1980). En el nematodo *Caenorhabditis elegans* se han encontrado cuatro genes de AChE (Arpagaus y col., 1998), y en *Sepia officinalis* se postula la existencia tanto de AChE como de BuChE (Kling, 1986). En muchas especies de peces, tanto óseos como cartilagosos, existen colinesterasas con propiedades intermedias.

La dualidad de ambas está sólo bien definida en vertebrados superiores (Massoulié et al, 1993; Thompson et al, 1991; Moralev et al, 2007).

Tres dominios definidos sobre la acetilcolinesterasa constituyen sitios de fijación para ligandos inhibidores y fundamentan las diferencias de especificidad entre AChE y BuChE: el saco acilo del centro activo, el subsitio de la colina sobre el centro activo y el sitio aniónico periférico (Taylor y Rádíc, 1994).

La **Tabla 1.4** muestra las principales diferencias entre ambas enzimas, tal y como se conocen en mamíferos.

Tabla 1.4. Propiedades y diferencias de acetil y butirilcolinesterasa. (Fuente: C. Vidal, 1981.)

	Acetilcolinesterasa	Butirilcolinesterasa
<b>Nombre sistemático</b>	Acetilcolina:acetilhidrolasa	Acilcolina:acilhidrolasa
<b>Número E.C.</b>	3.1.1.7.	3.1.1.8.
<b>Sustrato óptimo</b>	Acetilcolina	Butiril o propionilcolina
<b>Exceso de sustrato</b>	Inhibición	No inhibición
<b>Acetil-<math>\beta</math>-metilcolina</b>	Sustrato	No sustrato
<b>Benzoilcolina</b>	No sustrato	Sustrato
<b>pH óptimo</b>	7.5-8.0	8.5
<b>Inhibición por BW284C51</b>	Inhibición fuerte	Inhibición débil
<b>Tejidos con alta actividad</b>	Eritrocitos, tejido nervioso Músculo esquelético, timo, placenta	Suero sanguíneo, páncreas, hígado, corazón.

El principal mecanismo de acción de los OPs en la inhibición de la AChE fue descubierto por DuBois (1947). La inhibición de la actividad AChE cerebral o neuromuscular, más allá del 70-90% es generalmente letal (Casida et al 2005). El papel fundamental que desempeña la acetilcolinesterasa es la destrucción de manera rápida de la acetilcolina en las terminaciones sinápticas (Siegel GJ, 1989).

Adicionalmente a su función colinérgica convencional, la AChE participa en procesos de desarrollo y su secuencia contiene un dominio que se presenta en proteínas de adhesión celular como la glutactina, la neurotactina, la gliotactina y las neuroliginas (Sánchez, G., Salceda, R., 2008). Cambios en su concentración o propiedades se presentan en algunas neuropatologías como el Alzheimer, Parkinson y miastenia gravis (Silman, I., 1987).

## INTRODUCCIÓN

La AChE de humanos presenta dos formas moleculares y se ha demostrado que un único gen codifica todos los tipos de AChE (Schumacher et al., 1986; Massoulié et al 1993; Taylor y Rádic, 1994), sin embargo existe una gran diversidad molecular como consecuencia de un procesamiento alternativo del RNAm. Las distintas formas difieren tan sólo en su extremo carboxilo-terminal, la porción de gen que codifica el sitio catalítico es invariable, por lo tanto, todas las formas de la enzima muestran idéntica especificidad en cuanto a sustrato e inhibidor (Schumacher et al, 1986; Gibney et al 1988).

Por otro lado, el gen que codifica la BuChE es diferente, aunque estructuralmente relacionado (Lockridge et al., 1987) al de la AChE.

Se han sugerido numerosos papeles que la BuChE podría estar desempeñando, desde su implicación en el metabolismo de lipoproteínas (Kutty y Payne, 1994), pasando por adhesiones celulares (Tsigelny et al, 2000), hasta su participación en procesos de detoxificación mediante actividades catalíticas no colinérgicas, la BuChE plasmática participa activamente en la degradación de la cocaína (Gatley et al 1991).

### *Mecanismo de acción de las colinesterasas*

Las colinesterasas son serín hidrolasas. La hidrólisis de un éster de colina por estas enzimas, transcurre en dos etapas: en la primera se forma un complejo intermedio acil-enzima, ya que el grupo acilo queda unido de forma covalente a la serina de centro activo, en la segunda etapa se libera el grupo acilo (Schwarz et al, 1995)

En la 1ª etapa de la reacción, el resto de Ser del centro activo de la acetilcolinesterasa reacciona con la acetilcolina, generándose un intermedio acetil-enzima y la liberación de la colina (Rosenberry, 1975a)

Paso 1: Acetilcolina + enzima (Acetilcolinesterasa) -----> Colina + Acetilcolinesterasa acetilada

En la 2ª etapa de la reacción se produce la hidrólisis de la acetil-enzima, regenerándose la acetilcolinesterasa y liberándose el acetato.

Paso 2: Acetilcolinesterasa acetilada + H<sub>2</sub>O -----> Acetilcolinesterasa + ácido acético

Este mecanismo de acción es característico de las serín-proteasas.

Según el modelo clásico, el centro activo de la AChE está formado por dos subsitios, el subcentro esterásico que contiene la serina y es el responsable del mecanismo catalítico y el subcentro aniónico que une el nitrógeno cuaternario de la acetilcolina. Además se ha identificado en la acetilcolinesterasa un sitio aniónico periférico relacionado con mecanismos alostéricos de inhibición (Changeux, 1966), este sitio parece que estaría implicado en la formación de un complejo inicial que facilitaría la transferencia del sustrato hacia el centro catalítico que estaría en el interior de la molécula (Haas et al, 1992).

Se ha llegado a sugerir que este sitio aniónico sea el responsable de la inhibición por exceso de sustrato (Radic et al, 1991).

Las diferencias en la composición y estructura del hueco catalítico entre la AChE y la BuChE explicarían la capacidad de la butiril para acomodar un mayor número de sustratos artificiales. A pesar de esto todo parece indicar que el mecanismo es similar en ambas enzimas.

### *Inhibición de las colinesterasas*

La inhibición de estas enzimas por OPs, carbamatos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, es uno de los temas más estudiados desde su descubrimiento, sin embargo, siguen existiendo numerosas lagunas a medida que se va avanzando en su conocimiento.

Desde el punto de vista clínico, su interés radica en la posibilidad de su utilización como índice de exposición humana en el área de la medicina ocupacional. En general los fármacos que inhiben las colinesterasas se denominan anticolinesterasas (anti-ChE). Los agentes anti-ChE se han utilizado como agentes tóxicos en forma de insecticidas agrícolas y de gases nerviosos en la "guerra química"; pero también otros compuestos pertenecientes a esta misma clase se utilizan con fines terapéuticos (Taylor P., 1996).

Podemos dividir en dos grupos los inhibidores de las colinesterasas, según sean reversibles o irreversibles. Se consideran irreversibles todos los compuestos organofosforados.

1. Inhibidores Reversibles: los inhibidores reversibles forman complejos no covalentes con la enzima en el fondo del sitio activo, en el reborde del sitio periférico ó abarcan los 2 sitios. La mayoría de las asociaciones con inhibidores reversibles de las colinesterasas tienen una difusión limitada. El equilibrio de la unión para estos complejos se establece rápidamente y sólo la magnitud de su tasa de disociación controla la afinidad de la unión, con constantes de disociación encontradas en el rango de  $\mu\text{M}$  a  $\text{nM}$  (Radic y Taylor, 2001).

Un grupo diferente de inhibidores reversibles (fasciculinas, triazoles y trifluoroacetofenonas) se disocian muy lentamente de la enzima (horas, días e incluso semanas), las afinidades de éstos por las colinesterasas son excepcionalmente altas (Radic y Taylor, 2006).

## INTRODUCCIÓN

2. Inhibidores Irreversibles: son sustratos que deacilan la serina del centro activo, produciendo una ocupación prolongada del centro activo de la enzima incapacitándola para hidrolizar acetilcolina (Aldridge y Reiner, 1972). Un ejemplo de este tipo de inhibición son los OPs y carbamatos. Algunos plaguicidas como el malatión y paratión, experimentan una oxidación in vivo por el citocromo P450, formando la forma activa oxo (malaoxon y paraoxon) que desencadena los efectos tóxicos.

Determinados OPs se usan también como agentes de guerra nerviosos y algunos pueden producir las llamadas reacciones de envejecimiento (Aldridge y Reiner, 1972). La actividad catalítica de la enzima fosforilada se puede restaurar por deacilación espontánea en agua ó por el uso de agentes nucleofílicos (oximas). El proceso de envejecimiento de los gases nerviosos, como el soman, es muy rápido y tiene lugar en minutos, mientras que el de plaguicidas como el paraoxon, puede llevar días (Nachon et al, 2005).



### 1.5.3. Carboxilesterasas (E.C.3.1.1.1.)

Son esterasas que poseen una amplia especificidad de sustrato y que actúan sobre ésteres carboxílicos de cadena corta liberando los ácidos correspondientes. Hasta la fecha, no se han definido ni identificado sustratos endógenos para estas enzimas (Cashman J. et al, 1996). Las carboxilesterasas de mamíferos representan una familia multigénica. Poseen, en su estructura, una tríada de residuos de aminoácidos esenciales (Serina, histidina y ácido glutámico) para el desempeño de su actividad catalítica, de hecho la mutación en alguno de estos residuos se traduce en la pérdida de actividad (Redinbo, M.R. et al, 2005). Presentan una amplia especificidad de sustrato y muestran una alta expresión en hígado de mamíferos. En roedores se han identificado varias de estas enzimas altamente homólogas que exhiben especificidades del sustrato superpuestas (Mentlein, R. et al 1980; Robbi, M. et al 1983; Hosokawa, M. et al 1987; Morgan E.W. et al 1994; Sanghani, S.P. et al, 2002).

Las carboxilesterasas (CbE) juegan un papel importante en la detoxificación y tolerancia a algunos plaguicidas y drogas (Walker et al., 2001). Muchos xenobióticos son metabolizados por estas enzimas, por lo que la alteración de su actividad tiene muchas implicaciones clínico/toxicológicas.

Se han identificado dos carboxilesterasas mayoritarias en hígado de mamífero: hCbE-1 y hCbE-2 (Brzezinski, M.R. et al 1994; Pindel, E.V. et al, 1997), mientras que una tercera carboxilesterasa hepática se ha aislado recientemente (Sanghani, S.P. et al, 2004). Las dos formas hepáticas (hCbE-1 y hCbE-2) en mamíferos muestran capacidad de interacción con piretroides, a diferencia de las colinesterasas humanas (Ross, M.K. et al 2005).

Aldridge demostró la existencia de diferentes esterasas en tejidos de cerebro de pollo que eran inhibidas por bajas concentraciones de phenyl saligenin fosfato y DFP (Poulsen and Aldridge, 1964; Aldridge, 1964). La NTE fue hallada por primera vez por Johnson (1969) mediante unos experimentos de marcaje con (<sup>32</sup>P)-DFP de las proteínas presentes en homogenizados de cerebro de gallina adulta (Johnson., 1977) en los que se buscaba la diana molecular de la OPIDN.

Las investigaciones de los efectos de inhibición en la actividades carboxilesterasas proporcionan información muy útil para la predicción in vivo de las interacciones de drogas y para el desarrollo de éstas (Takahashi et al, 2009).

El fenilvalerato es un éster carboxílico que se usa como sustrato para la detección de la NTE y de otras enzimas sensibles a OPs (Johnson, 1974; Escudero, 1996). Se han observado otras carboxilesterasas que hidrolizan fenilvalerato y que son sensibles a OPs adoptando el mismo criterio operacional que para discriminar la NTE.

## INTRODUCCIÓN

Se han medido actividades fenilvalerato esterasas sensibles a OPs en fracción soluble y de membrana de cerebro, médula espinal, nervio ciático de pollo y suero (Escudero et al, 1997a, 1997b, Estévez et al 1999, 2004, 2010, 2011; Barril et al 1999; García-Pérez et al 2003). Además se ha llevado a cabo la discriminación de componentes sensibles en cerebro, médula y ciático en fracción soluble y de membrana con paraoxon (como modelo de OP no neuropático), mipafox (modelo de OP neuropático) y PMSF (como modelo de OP potenciador de neuropatía) (Céspedes et al, 1997; Mangas et al, 2012, 2014). Para discriminar entre la NTE y otras actividades fenilvalerato esterasas se diseñaron dos ensayos diferentes: un ensayo concurrente donde se incuban el paraoxon y el mipafox con el compuesto a testar y otro ensayo secuencial (Vilanova et al, 1999).

Mediante estos ensayos se ha llegado a discriminar hasta cuatro componentes carboxilesterasas diferentes en membrana de cerebro (Mangas et al 2013a). Se ha demostrado que existen altos niveles de actividad PVasa en fracción soluble de nervio ciático de pollo y suero (Estévez et al, 2012, García-Pérez et al, 2003).



**Figura 1.13.** Carboxilesterasa de *Pseudomonas fluorescens*. Fuente: <http://commons.wikimedia.org>, Mayo 2014.

## 1.6. ANTECEDENTES

### *Discriminación de componentes enzimáticos esterásicos.*

Carboxilesterasas y otras serín hidrolasas de cerebro han recibido especial atención en la búsqueda de dianas (AChE, BuChE, NTE, etc.) de los efectos neurotóxicos de OPs. La proteína diana de la OPIDP (NTE) fue la primera encontrada entre las estererasas de cerebro de pollo (Johnson, 1969,1982).

El interés de las enzimas de sistema nervioso de pollo se debe a que es la especie establecida para los ensayos de neurotoxicidad retardada de OPs (OCDE 418, 419).

En los últimos años en nuestro laboratorio se han llevado a cabo una serie de trabajos con el objetivo de caracterizar el amplio grupo de las fenilvalerato estererasas. Las investigaciones se han realizado en cerebro de pollo utilizando paraoxon, mipafox y PMSF; y han proporcionado evidencias de que la mayoría de estererasas que hidrolizan fenilvalerato son altamente sensibles a uno o varios de estos inhibidores.

El conocimiento del comportamiento cinético de las estererasas de cerebro de pollo con estos modelos de inhibidor es esencial para ser capaces de identificar y purificar potenciales proteínas diana con el objetivo de evaluar la potencia de los inhibidores y diseñar estrategias de terapia y prevención. (Sogorb et al, 2004; Worek et al 2004,2007).

Se han determinado componentes susceptibles, diferenciados por sus constantes de inhibición y reactivación espontánea, en cerebro de pollo (Mangas, I. et al, 2011; 2012a; 2012b; 2013a) aplicando la estrategia y los modelos cinéticos descritos previamente por Estévez y Vilanova (2009). Estos modelos cinéticos se habían usado para discriminar estererasas sensibles en nervio periférico y suero de pollo (Estévez et al, 2004; 2009; 2010; 2011; 2012; García et al 2003).

El número de componentes enzimáticos es el mismo que el de inhibidores y los parámetros cinéticos estimados para cada inhibidor son comparables en diferentes tipos de experimentos. Estos modelos cinéticos pueden aplicarse para discriminar estererasas sensibles a OPs o a otros inhibidores esterásicos, en otros tejidos y especies. Este procedimiento experimental ha demostrado ser una herramienta de utilidad para identificar biomarcadores potenciales del exposición o toxicidad de OPs.

En estas caracterizaciones se ha discriminado la existencia de diferentes componentes enzimáticos con comportamientos distintos frente a mipafox, paraoxon y PMSF: tres en fracción soluble (nombrados como E $\alpha$ , E $\beta$  y E $\gamma$ , Mangas et al, 2011; Mangas et al, 2012b) (**Tabla 1.5**) y cuatro en membrana (nombrados como EP $\alpha$ , EP $\beta$ , EP $\gamma$  y EP $\delta$ ) (**Tabla 1.6**).

La identificación molecular de las proteínas responsables de estos componentes esterásicos enzimáticos es un objetivo a largo plazo de nuestro grupo.

## INTRODUCCIÓN

Hasta el momento, únicamente se ha identificado EP $\gamma$  como la NTE y se han obtenido datos que sugieren que E $\alpha$  podría ser butirilcolinesterasa (Mangas, I., tesis doctoral 2014).

Para los otros seis componentes, la identificación molecular permanece desconocida y sigue en estudio.

**Tabla 1.5. Discriminación de tres componentes esterásicos enzimáticos en fracción soluble de cerebro.**

	<b>Amplitud del componente</b>	<b>PARAXON</b> 150 (30 min) <sup>#</sup>	<b>MIPAFOX</b> 150 (30min) <sup>#</sup>	<b>PMSF</b> 150 (20min) <sup>*</sup>
<b>E<math>\alpha</math></b>	11-28%	9-11 nM ( r )	4 nM	R
<b>E<math>\beta</math></b>	61-84%	1216 nM	R	70 $\mu$ M
<b>E<math>\gamma</math></b>	5-11%	R	3398 nM	447 $\mu$ M

( r ) Reactivación espontánea; R= Resistente a las mayores concentraciones de inhibidor.

<sup>#</sup> Fuentes: Mangas et al., 2011; <sup>\*</sup> Mangas et al., 2012b

**Tabla 1.6. Discriminación de cuatro componentes esterásicos enzimáticos en fracción de membrana de cerebro.**

	<b>Amplitud del componente</b>	<b>PARAXON</b> 150 (30 min) <sup>#</sup>	<b>MIPAFOX</b> 150 (30min) <sup>#</sup>	<b>PMSF</b> 150 (20min) <sup>*</sup>
<b>EP<math>\alpha</math></b>	4-8 %	15-43 nM( r )	29 nM	R
<b>EP<math>\beta</math></b>	38-41 %	1540 nM	R	138 $\mu$ M
<b>EP<math>\gamma</math></b>	39-48 %	R	6601 nM	23 $\mu$ M
<b>EP<math>\delta</math></b>	10 %	R	R	R

( r ) Reactivación espontánea; R= Resistente a las mayores concentraciones de inhibidor.

<sup>#</sup> Fuentes: Mangas et al., 2012a\* Mangas et al., 2013a.

## **2.MODELOS MATEMÁTICOS**



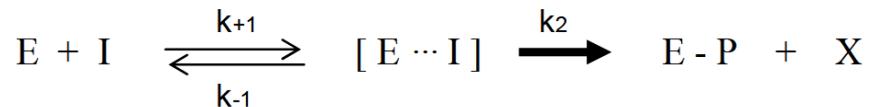


## 2.1. MODELO MATEMÁTICO DE LA INHIBICIÓN DE ESTERASAS POR ORGANOFOSFORADOS. INHIBICIÓN IRREVERSIBLE

### *Cinética de las reacciones de fosforilación*

La interacción característica de compuestos organofosforados con esterazas implica la organofosforilación por las reacciones descritas anteriormente en la **Figura 1.3**.

Desde el punto de vista cinético se puede expresar como:

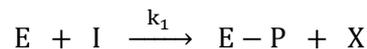


Donde **E** representa la enzima, **I** el inhibidor organofosforado, **k<sub>+1</sub>** y **k<sub>-1</sub>** las constantes de las reacciones del equilibrio de formación y disociación del complejo tipo Michaeliano, y **k<sub>2</sub>** la constante de la reacción de fosforilación.

Habitualmente la formación del complejo tipo Michaeliano **[E ⋯ I]** no es significativa por varios factores: (a) la solubilidad del inhibidor es baja y por ello no se puede alcanzar una concentración de inhibidor suficiente para saturar la reacción; (b) la afinidad es baja, ya que el xenobiótico no es el ligando habitual de la enzima; y (c) la reacción de fosforilación es más rápida que la de formación del complejo Michaeliano.

En algunos casos (por ejemplo la inhibición de la acetilcolinesterasa por inhibidores de alta afinidad), el complejo intermedio reversible es cinéticamente significativo. Por el contrario cuando la afinidad es baja (**k<sub>+1</sub> / k<sub>-1</sub> < k<sub>2</sub>**), o no hay concentración de inhibidor suficiente para detectar la saturación de la enzima la formación del complejo Michaeliano no es significativa.

El mecanismo aparente desde el punto de vista cinético puede representarse por:



Donde **k<sub>1</sub>** representa la constante de segundo orden. Si se asume que **I >> E** (la concentración de inhibidor es mucho mayor que la de enzima), **I** no disminuye significativamente con el tiempo mientras que **E** disminuye de forma detectable. Así, la enzima sufrirá una inhibición progresiva con el tiempo según una cinética de segundo orden respecto a E e I.

## MODELOS MATEMÁTICOS

Consecuentemente la reacción biomolecular entre la enzima y el inhibidor (OP) pasa a tener la concentración de enzima activa como única variable dependiente durante el tiempo de inhibición. Así, la ley cinética de la velocidad de inactivación de E con el tiempo sería:

$$v = \frac{-dE}{dt} = k_1 \cdot E \cdot I \quad [\text{Ec. 2.1}] \text{ y}$$

$$\frac{dE}{E} = -k_1 \cdot I \cdot dt \quad [\text{Ec. 2.2}]$$

Integrando entre  $t_0$  y  $t$  y entre  $E_0$  y  $E$ :

$$\ln\left(\frac{E}{E_0}\right) = -k_1 \cdot I \cdot dt \quad [\text{Ec. 2.3}]$$

Así para un componente enzimático se puede expresar, por lo tanto, como:

$$\ln\left(\frac{E}{E_0}\right) = -k_1 \cdot I \cdot dt = -k_1' \cdot I \quad [\text{Ec. 2.4}]$$

Siendo  $(k_1 \cdot t = k_1')$  la constante de primer orden.

O expresado de forma exponencial como:

$$\frac{E}{E_0} = e^{(-k_1' \cdot I)} \quad [\text{Ec. 2.5}] \text{ o bien}$$

$$E = E_0 \cdot e^{(-k_1' \cdot I)} \quad [\text{Ec. 2.6}]$$

En términos de porcentaje de actividad la ecuación es:

$$100 \cdot \frac{E}{E_0} = (\% \text{ Actividad}) = 100 \cdot e^{(-k_1' \cdot I)} \quad [\text{Ec. 2.7}] \text{ o bien}$$

$$(\% \text{ Actividad}) = \frac{E_t}{E_0} \cdot 100 \cdot e^{(-k_1' \cdot I)} \quad [\text{Ec. 2.8}]$$

*Sistemas que contienen más de un componente enzimático*

En una preparación biológica, la actividad esterasa habitualmente no corresponde con un solo tipo de enzimas, sino que existen varias fracciones de enzimas o grupos de enzimas con diferentes sensibilidades al inhibidor o incluso alguna fracción de enzimas prácticamente resistente. En estas situaciones cada uno de los componentes sensibles sigue un comportamiento exponencial equivalente a la ecuación:

$$\frac{E}{E_0} = e^{(-k_1' \cdot I)} \quad \text{[Ec. 2.9]}$$

La actividad residual después de un tiempo de inhibición será la suma de las actividades residuales de cada componente enzimático.

$$E = E_1 + E_2 + \dots + E_R \quad \text{[Ec. 2.10]}$$

Así, por ejemplo, un sistema con dos componentes enzimáticos, uno sensible ( $E_1$ ) y uno resistente ( $E_R$ ) a una concentración de inhibidor  $I$ , se puede describir por la siguiente ecuación:

$$(\% \text{ Actividad}) = 100 \cdot \frac{E}{E_0} = E_{1_0} \cdot e^{(-k_1' \cdot I)} + E_R \quad \text{[Ec. 2.11]}$$

Y en un sistema con tres componentes enzimáticos, dos sensibles ( $E_1$  y  $E_2$ ) y uno resistente ( $E_R$ ), el comportamiento de las distintas curvas de inhibición se describe por la siguiente ecuación:

$$(\% \text{ Actividad}) = 100 \cdot \frac{E}{E_0} = E_{1_0} \cdot e^{(-k_1' \cdot I)} + E_{2_0} \cdot e^{(-k_2' \cdot I)} + E_R \quad \text{[Ec. 2.12]}$$

Análogamente, en un sistema con más proporciones de enzimas, el comportamiento de las distintas curvas de inhibición vendrá descrito por:

$$(\% \text{ Actividad}) = E_{1_0} \cdot e^{(-k_1' \cdot I)} + E_{2_0} \cdot e^{(-k_2' \cdot I)} + E_{3_0} \cdot e^{(-k_3' \cdot I)} + E_R \quad [\text{Ec. 2.13}]$$

Donde  $E_{1_0}$ ,  $E_{2_0}$  y  $E_{3_0}$  representan la proporción (amplitud) de enzimas de cada componente sensible,  $E_R$  representa la amplitud del componente resistente de enzima a la concentración de inhibidor utilizada ( $I$ );  $k_1'$ ,  $k_2'$  y  $k_3'$  representan las constantes de inhibición de primer orden para cada componente enzimático. Se deben aplicar una serie de restricciones:  $k_1'$ ,  $k_2'$ ,  $k_3'$ ,  $E_{1_0}$ ,  $E_{2_0}$ ,  $E_{3_0}$  y  $E_R > 0$ ; y  $(E_{1_0} + E_{2_0} + E_{3_0} + \dots + E_R) = 100$ . Y la concentración a la cual se inhibe un 50 % de la actividad enzimática total del componente  $I_{50}$  para un tiempo  $t$  de preincubación de 30 min se puede deducir mediante la ecuación:

$$I_{50} = \frac{\ln 2}{k_1'}$$

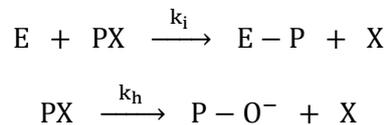
En estas situaciones, cuando hay más de un componente enzimático el comportamiento del log (% **Actividad**) como función del tiempo ( $t$ ) ya no es lineal por lo que no puede usarse para la estimación de las constantes. Se hace necesario en estos casos un análisis por regresión no lineal de los datos para determinar el modelo cinético y predecir las amplitudes y constantes cinéticas. Así pues, un análisis mediante sistemas de múltiples aproximaciones, permite obtener resultados consistentes (Estévez *et al.*, 2004). En primer lugar, mediante este análisis, se estima el componente resistente ( $E_R$ ), utilizando los datos de la curva obtenida con la mayor concentración de inhibidor ensayada; posteriormente, fijándose este valor, se estiman las constantes cinéticas utilizando el resto de curvas y, finalmente, se obtienen las amplitudes.

## 2.2. COMPORTAMIENTO ANTE LA INHIBICIÓN CON PMSF. HIDRÓLISIS ESPONTÁNEA DEL INHIBIDOR SIMULTÁNEA A LA INHIBICIÓN EN CURSO.

Si un inhibidor se hidroliza durante el transcurso de la inhibición se obtendrán valores menores de los esperados. Este efecto no es muy significativo, ya que sólo se observa aproximadamente en el 10 % de la más alta concentración de inhibidor. Sin embargo, podría dificultar el análisis de los datos si no se considera, por lo menos para los componentes más sensibles (Estévez y Vilanova, 2009; Estévez *et al.*, 2010).

Los resultados de la inhibición con PMSF sugieren que interactúa con estas esterasas sin reactivación espontánea y que PMSF se hidroliza químicamente de forma espontánea mientras transcurre el experimento. Por lo tanto, el modelo cinético debe tener en cuenta (a) varios componentes, (b) la hidrólisis de PMSF y (c) la inhibición en curso (Estévez *et al.*, 2012).

Las reacciones a tener en cuenta son las siguientes:



Donde **PX** es el inhibidor (PMSF en este caso), el grupo saliente **X** (fluoruro) y **PO<sup>-</sup>** el producto de la hidrólisis (ácido fenilmetilsulfónico). Para un solo componente enzimático, las ecuaciones del modelo deducidas son las siguientes:

Variación de **E** y **PX** en función del tiempo:

$$\frac{dE}{dt} = v_d E = -k_1 \cdot E \cdot PX \quad [\text{Ec. 2.14}] \text{ y}$$

$$\frac{dPX}{dt} = v_d PX_2 + v_d PX_3 = -k_1 \cdot E \cdot PX - k_h \cdot PX \quad [\text{Ec. 2.15}]$$

Donde **k<sub>1</sub>** es la constante de inhibición de segundo orden, **k<sub>h</sub>** es la constante de la hidrólisis química, **E** es la concentración de la enzima libre, **PX** es la concentración de inhibidor, **v<sub>d</sub>E** es la velocidad de desaparición de la enzima, **v<sub>d</sub>PX<sub>2</sub>** es la velocidad de desaparición del inhibidor a través de reacción de inhibición y **v<sub>d</sub>PX<sub>3</sub>** es la velocidad de desaparición del inhibidor a través de reacción de hidrólisis.

Al considerar que la velocidad de desaparición del inhibidor a través de reacción de hidrólisis es superior que la desaparición a través de la reacción de inhibición, se aplica la siguiente aproximación:

$$v_d PX_3 \gg \gg \gg v_d PX_2$$

Entonces

$$k_h \cdot PX \gg \gg \gg k_1 \cdot E \cdot PX$$

## MODELOS MATEMÁTICOS

Al aplicar estas consideraciones, las ecuaciones deducidas se convierten en

$$\frac{dE}{dt} = -k_1 \cdot E \cdot PX \quad [\text{Ec. 2.16}] \text{ y}$$

$$\frac{dPX}{dt} = -kh \cdot PX \quad [\text{Ec. 2.17}]$$

Reordenando la **Ec. 2.17**, se deduce que

$$\frac{dPX}{PX} = -kh \cdot dt \quad [\text{Ec. 2.18}]$$

Mientras que de la integración de la **Ec. 2.18**, obtenemos

$$\ln(PX) = a - (kh \cdot t) \quad [\text{Ec. 2.19}]$$

Entonces

$$PX = A \cdot e^{(-kh \cdot t)} \quad [\text{Ec. 2.20}]$$

Cuando  $t = 0$  y  $PX = PX_0$  (la concentración inicial de inhibidor), en ese caso  $A = PX_0$  y

$$PX = PX_0 \cdot e^{(-kh \cdot t)} \quad [\text{Ec. 2.21}]$$

Mediante la sustitución de **PX (Ec. 2.21)** en la **Ec. 2.15**, vemos que

$$\frac{dE}{dt} = -k_1 \cdot E \cdot PX_0 \cdot e^{(-kh \cdot t)} \quad [\text{Ec. 2.22}]$$

Reordenando la ecuación anterior, se logra lo siguiente:

$$\frac{dE}{E} = -k_1 \cdot PX_0 \cdot e^{(-kh \cdot t)} \cdot dt \quad [\text{Ec. 2.23}]$$

A continuación, mediante la integración de la **Ec. 2.23**, observamos que

$$\ln(E) = (k_1 / kh) \cdot PX_0 \cdot e^{(-kh \cdot t)} + C \quad [\text{Ec. 2.24}]$$

Entonces

$$E = B \cdot e^{((k_1/kh) \cdot PX_0 \cdot e^{(-kh \cdot t)})} \quad [\text{Ec. 2.25}]$$

Cuando  $t = 0$  y  $E = E_0$  (la concentración inicial de la enzima libre), en ese caso  $B = E_0$  y

$$E_0 = B \cdot e^{((k_1/kh) \cdot PX_0)} \quad [\text{Ec. 2.26}]$$

Y

$$B = E_0 \cdot e^{-((k_1/kh) \cdot PX_0)} \quad [\text{Ec. 2.27}]$$

Mediante la sustitución de **B (Ec. 2.27)** en la **Ec. 2.25**, logramos

$$E = E_0 \cdot e^{-((k_1/kh) \cdot PX_0)} \cdot e^{((k_1/kh) \cdot PX_0 \cdot e^{(-kh \cdot t)})} \quad [\text{Ec. 2.28}]$$

Al reorganizar la última ecuación, se obtiene la ecuación de la inhibición teniendo en cuenta la hidrólisis simultánea del inhibidor para un componente enzimático sensible:

$$E = E_0 \cdot e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k_1/kh) \cdot PX_0} \quad [\text{Ec. 2.29}]$$

*Sistemas que contienen más de un componente enzimático*

En una preparación biológica la actividad esterasa habitualmente no corresponde con un solo tipo de enzimas, sino que existen varias fracciones de enzimas o grupos de enzimas con diferentes sensibilidades al inhibidor o incluso alguna fracción de enzimas prácticamente resistente.

En estas situaciones cada uno de los componentes sensibles sigue un comportamiento exponencial equivalente a la ecuación:

$$E = E_0 \cdot e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k/kh) \cdot PX_0} \quad [\text{Ec. 2.29}]$$

La actividad residual después de un tiempo de inhibición será la suma de las actividades residuales de cada componente enzimático.

$$E = E_1 + E_2 + \dots + E_R \quad [\text{Ec. 2.30}]$$

Así, por ejemplo, un sistema con dos componentes enzimáticos, uno sensible ( $E_1$ ) y uno resistente ( $E_R$ ) a una concentración de inhibidor  $I$ , se puede describir por la siguiente ecuación:

$$E = E_{1_0} \cdot e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k_1/kh) \cdot PX_0} + E_R \quad [\text{Ec. 2.31}]$$

Y en un sistema con tres componentes enzimáticos, dos sensibles ( $E_1$  y  $E_2$ ) y uno resistente ( $E_R$ ), el comportamiento de las distintas curvas de inhibición se describe por la siguiente ecuación:

## MODELOS MATEMÁTICOS

$$E = E_{1_0} \cdot e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k_1/kh) \cdot PX_0} + E_{2_0} \cdot e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k_2/kh) \cdot PX_0} + E_R$$

[Ec. 2.32]

donde **kh** es la constante de hidrólisis espontánea del inhibidor, **E<sub>1<sub>0</sub></sub>** es la proporción (amplitud) del componente enzimático más sensible, **E<sub>2<sub>0</sub></sub>** es la proporción (amplitud) del segundo componente enzimático más sensible, **k<sub>1</sub>** y **k<sub>2</sub>** son las constantes de segundo orden para la inhibición de estos componentes sensibles, **E<sub>R</sub>** es la proporción (amplitud) del componente enzimático resistente, **PX<sub>0</sub>** es la concentración inicial de inhibidor y **t** es el tiempo de reacción fijo.

En términos de porcentaje de actividad la **Ec. 2.30** es:

$$100 \cdot \frac{E}{E_0} = (\% \text{ Actividad}) = 100 \cdot e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k/kh) \cdot PX_0} \quad [\text{Ec. 2.33}]$$

Análogamente en un sistema con más proporciones de enzimas, el comportamiento de las distintas curvas de inhibición vendrá descrito por:

$$(\% \text{ Actividad}) = E_{1_0} \cdot e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k_1/kh) \cdot PX_0} + E_{2_0} \cdot e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k_2/kh) \cdot PX_0} + E_R$$

[Ec. 2.34]

Donde **k<sub>1</sub>** y **k<sub>2</sub>** son las constantes de inhibición de segundo orden de los distintos componentes sensibles a la inhibición, **E<sub>1<sub>0</sub></sub>**, **E<sub>2<sub>0</sub></sub>** y **E<sub>R</sub>** son las proporciones (amplitud) de componentes enzimáticas **E<sub>1</sub>**, **E<sub>2</sub>** y **E<sub>R</sub>**, respectivamente, **PX<sub>0</sub>** es la concentración inicial de inhibidor y **kh** es la constante de hidrólisis espontánea del inhibidor. Se deben aplicar las siguientes restricciones: **k<sub>1</sub>**, **k<sub>2</sub>**, **kh**, **E<sub>1<sub>0</sub></sub>**, **E<sub>2<sub>0</sub></sub>** y **E<sub>R</sub>** > 0; y (**E<sub>1<sub>0</sub></sub>** + **E<sub>2<sub>0</sub></sub>** + ... + **E<sub>R</sub>**) = 100. Y la concentración a la cual se inhibe un 50 % de la actividad enzimática total del componente **I<sub>50</sub>** para un tiempo de preincubación de 30 min se calcula como:

$$I_{50} = \frac{\ln 2}{-e^{((e^{-kh \cdot t}) - 1) \cdot (k_1/kh)}} \quad [\text{Ec. 2.35}]$$

**2.3. MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS PARA EL ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE ACTIVIDADES PVasa Y ChE CON ACETILTIOCOLINA Y PV, RESPECTIVAMENTE.**

La inhibición de la actividad enzimática es uno de los mecanismos regulatorios más importantes de las células vivas y uno de los procedimientos de diagnóstico de la enzimología. Estos estudios indican la especificidad de una enzima, la arquitectura física y química del centro activo y las clases de complejos enzima-sustrato y enzima-producto (Whitley, G.C., 1999 y 1997).

La inhibición reversible puede clasificarse como competitiva, no competitiva, acompetitiva o mixta, según el efecto que produzcan en las constantes cinéticas  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten) y  $V_{max}$  (Velocidad máxima de la reacción). Este efecto depende de que el inhibidor (I) se una a la enzima (E), al complejo enzima-sustrato (ES) o a ambos. A continuación se describen los dos tipos de inhibición (competitiva y no competitiva) que aparecen en el trabajo. Las ecuaciones 2.36 y 2.37 fueron utilizadas por módulo Exploratory E-K del software del SigmaPlot versión 12.5. (Systat Software Inc, Chicago, USA) para Windows para los ajustes.

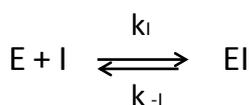
La reacción de Michaelis-Menten está descrita como sigue:



Donde  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_{-1}$ , son las constantes cinéticas individuales de cada reacción del proceso.

En la inhibición competitiva inhibidor y sustrato compiten por el mismo centro activo, encontramos dos ejemplos: un inhibidor con una estructura muy parecida a la del sustrato, pudiendo unirse directamente al centro activo compitiendo con el sustrato directamente, otra posibilidad es que exista un impedimento físico causado por el inhibidor para la unión del sustrato (Figura 2.1.).

La característica fundamental de este tipo de inhibición es que puede ser superada a concentraciones suficientemente altas de sustrato. Un inhibidor competitivo no produce una alteración de la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), pero sí afecta al valor de la  $K_M$  produciéndose un aumento. El esquema general de este tipo de inhibición es:



Y la ecuación matemática de la velocidad deducida para una cinética Michaelis-Menten con inhibición competitiva simultánea sería:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M \cdot (1 + \frac{[I]}{K_I}) + [S]} \quad [\text{Ec. 2.36}]$$

Siendo  $K_I$  la constante de disociación del complejo EI

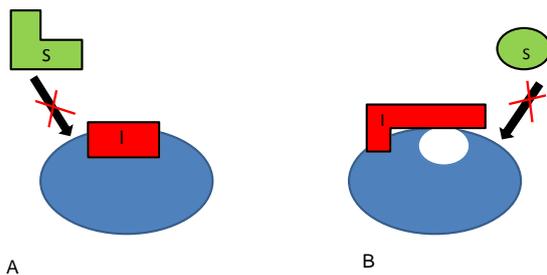
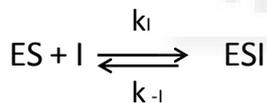


Figura 2.1. Ejemplo de inhibición competitiva en la que el inhibidor causa un impedimento físico para la unión del sustrato en el sitio activo.

En la inhibición no competitiva (Whiteley, C.G. 1999) el I se une en un sitio diferente al del centro activo, la  $V_{max}$  disminuye y el valor de  $K_M$  no cambia. (Figura 2.2.). El esquema general de este tipo de inhibición es:



Y la ecuación matemática de la velocidad deducida para una cinética Michaelis-Menten con una inhibición no competitiva simultánea sería:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{(K_M + [S]) \cdot (1 + \frac{[I]}{K_I})} \quad [\text{Ec. 2.37}]$$

Siendo  $K_I$  la constante de disociación del complejo ESI

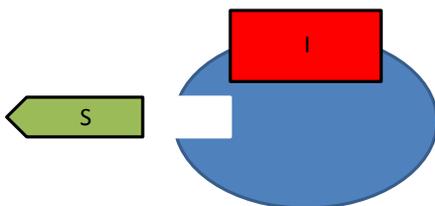


Figura 2.2. Inhibición no competitiva.

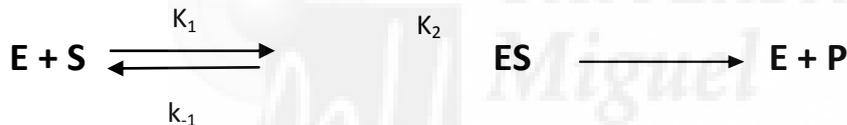
## 2.4. MODELO MATEMÁTICO DE LA INHIBICIÓN REVERSIBLE DE ESTERASAS

Los modelos matemáticos utilizados para ajustar los datos de las cinéticas de una inhibición progresiva con el tiempo que se detallan en el capítulo de Materiales y Métodos, no son aplicables en los casos en los que la inhibición no es progresiva con el tiempo. Para el caso de inhibidores que no presentan una dependencia del tiempo se considera que cumplen una cinética Michaeliana de inhibición tipo competitiva o no competitiva.

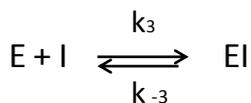
En el laboratorio del Dr. Jorge Estévez, se ha desarrollado un modelo de matemático basado en la inhibición reversible para ajustar los datos que permite calcular la  $I_{50}$  y las amplitudes de los componentes enzimáticos (datos no publicados). La justificación de los modelos y su derivación matemática se describe en el Anexo I.

*Mecanismo de inhibición reversible competitiva.*

La reacción de Michaelis-Menten está definida como sigue:



Donde  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_{-1}$ , son las constantes cinéticas individuales de cada reacción del proceso. El esquema de la reacción que se da en un proceso de inhibición reversible competitivo es:



Siendo E la enzima libre, I el inhibidor, EI la enzima inhibida,  $k_3$  y  $k_{-3}$  las constantes cinéticas.

Modelos cinéticos para sistemas multienzimáticos

De este desarrollo se ha deducido (ver **Anexo 1**) que la ecuación que describe un comportamiento reversible competitivo en un sistema multienzimático es el siguiente:

$$E = \frac{E_1}{1+A*x} + \frac{E_2}{1+B*x} + \dots + E_n \quad [\text{Ec. 2.35.}]$$

## MODELOS MATEMÁTICOS

Donde  $E$ , es la actividad enzimática total observada en la preparación y que corresponde a la suma de las amplitudes de los componentes enzimáticos sensibles,  $E_1, E_2, \dots, E_n$ , y siendo:

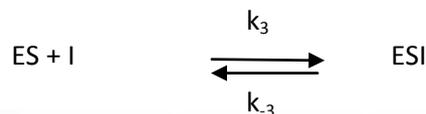
$$A = \frac{1}{I1_{50}}; B = \frac{1}{I2_{50}}; N = \frac{1}{In_{50}};$$

En donde  $I1_{50}, I2_{50}, In_{50}$  son las concentraciones de inhibidor que inhiben el 50% de la actividad de cada componente con la concentración de sustrato usada en el experimento.

La deducción de la **Ecuación 2.35** se describe con detalle en el **Anexo I**.

*Mecanismo de inhibición reversible no competitivo.*

El esquema de un proceso de inhibición reversible no competitivo es:



Siendo ES, el complejo enzima-sustrato, I el inhibidor libre, ESI el complejo enzima-sustrato-inhibidor,  $k_3$  y  $k_{-3}$  las constantes cinéticas.

La ecuación que describe un comportamiento reversible no competitivo para un sistema multienzimático es:

$$E = \frac{E_1}{1+A*x} + \frac{E_2}{1+B*x} + \dots + E_n \quad [\text{Ec.2.36}]$$

La deducción de la Ecuación del comportamiento reversible no competitivo (**Ecuación 2.36**) se describe con detalle en el **Anexo I**.

Como puede observarse la **Ec. 2.35** es idéntica a la **Ec. 2.36** por lo tanto estas ecuaciones no nos permitirían discriminar entre inhibición competitiva o no competitiva ya que considerando los dos tipos de inhibición se deduce la misma ecuación. Sin embargo es de utilidad a la hora de poder calcular número de componentes, sus amplitudes e  $I_{50}$  de un inhibidor reversible independientemente de que sea de tipo competitivo o no competitivo.



### **3. OBJETIVOS**



**OBJETIVO GENERAL.**

En nuestro laboratorio (Mangas et al., 2014) se detectaron y discriminaron cinéticamente diferentes componentes enzimáticos de la actividad esterasa hidrolizan fenilvalerato (PVasa) en fracciones solubles y de membrana de cerebro de pollo, con los inhibidores mipafox, paraoxon y PMSF. Detectaron tres componentes citosólicos (**E $\alpha$** , **E $\beta$**  y **E $\gamma$** ) y cuatro de membrana (**EP $\alpha$** , **EP $\beta$** , **EP $\gamma$**  y **EP $\delta$** ). **EP $\gamma$**  se atribuyó a la enzima NTE siendo éste es el único componente para el cual se han identificado roles toxicológicos y biológicos, y está molecularmente y genómicamente caracterizado. El papel toxicológico y biológico de los otros componentes se desconoce, además cada uno podría estar formado por múltiples proteínas.

**OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo es establecer si hay relación entre las actividades PVasa y colinesterasa, así como detectar diferentes componentes colinesterásicos utilizando inhibidores en la fracción soluble y de membrana de cerebro de pollo para seguir profundizando en el conocimiento de estas esterasas.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Desarrollar un microensayo automatizado de actividad hidrolizante de acetiltiocolina con el fin de procesar un gran número de muestras y optimizar el tiempo de ensayo.
2. Analizar si existe interacción del sustrato acetiltiocolina en los componentes enzimáticos de actividad PVasa y del fenilvalerato con la actividad colinesterasa, en fracción soluble y de membrana de cerebro de pollo.
3. Establecer la respuesta de la actividad PVasa y colinesterasa en fracción soluble y de membrana con inhibidores específicos de AChE y BuChE (BW284C51, etopropazina, iso-OMPA) y de la actividad colinesterasa con inhibidores anteriormente estudiados para PVasa (paraoxon, mipafox, PMSF).
4. Discriminar componentes enzimáticos colinesterásicos en fracción de membrana y soluble por sus propiedades cinéticas con diferentes inhibidores (paraoxon, mipafox, PMSF, iso-OMPA, etopropazina y BW284C51).
5. Establecer la relación entre componentes de actividad colinesterasa y componentes de actividad PVasa, en base a los datos cinéticos con inhibidores y de inhibición con sustratos.
6. Proponer un método sencillo para poder discriminar los componentes colinesterásicos en fracción soluble y de membrana.



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**





#### 4.1. REACTIVOS ESPECÍFICOS Y EQUIPOS UTILIZADOS

##### *Tampones y Reactivos*

**Tris pH 8:** Tris 50 mM / EDTA 1 mM/ ClH

Se preparó con Tris 50 mM y EDTA 1 mM, disolviéndolos en agua desionizada. El pH se ajustó a 8.0 con ClH 1 M y se conservó a temperatura ambiente.

**Fosfato pH 7.4:** Sodio-di-hidrógeno fosfato-1-hidrato 0.1 mM/ EDTA 1 mM. Se preparó disolviendo ambos reactivos en agua destilada y ajustando el pH a 7.4 con NaOH 1 M.

**Fenilvalerato (PV).** Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA). Se preparó una disolución concentrada de 30 mg/mL en N,N'-dimetilformamida y se conservó en nevera a 4°C, ya que en estas condiciones es estable durante un periodo de tiempo de 3-4 meses. En su utilización como sustrato en los ensayos de actividad PVasa, se diluyó en agua, inmediatamente antes de usarlo, a una dilución 1/30.

En los ensayos como competidor en la actividad acetilcolinesterasa, se prepararon las concentraciones adecuadas a cada ensayo en agua a partir de un stock en dimetilformamida.

**Acetil-β-metilcolina yoduro.** Adquirido de Sigma Chemical Company, para su uso se disolvió en agua ultrapura a las concentraciones apropiadas a cada ensayo.

**Acetiltiocolina yoduro.** Se adquirió de Sigma-Aldrich. Se preparó una disolución en agua ultrapura a las concentraciones adecuadas a cada ensayo.

**Agua ultrapura.** Se obtuvo a partir de agua purificada por ósmosis inversa (Elix 3 de Millipore) que se ultrapurificó con el equipo (milliQ Element de Millipore).

**Albúmina de suero bovino (BSA).** Pureza 96% se adquirió de Sigma -Aldrich Química S.A. (Madrid, España).

**Butirilcolinesterasa humana (hButChE).** Proporcionada por Palmer W, Taylor y Zoran Radić (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California, San Diego, USA)

**Dodecilsulfato sódico (SDS) y 4-aminoantipirina (AAP).** Se adquirieron de proveedores locales. Para su uso se preparó una disolución de SDS 2%-AAP 0.25 mg/mL en tampón Tris pH 8; esta mezcla se conservó a temperatura ambiente en botella de topacio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Dodecilsulfato sódico (SDS) y reactivo de Ellman (DTNB).** Se preparó una disolución de SDS 2 % –DTNB 6 mM en tampón fosfato pH 7.4 y se mantuvo a temperatura ambiente y en un recipiente adecuado a la sensibilidad del DTNB a la luz.

**Ferricianuro potásico.** Se preparó al 2 % en agua y se conservó a temperatura ambiente.

**Dietil p-nitrofenil fosfato (paraoxon).** (Pureza superior al 90%) Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Se preparó una disolución concentrada de 10 mM en acetona seca y se conservó a 4°C.

**N,N'-Diisopropil fosforamido fluoridato (mipafox).** (Pureza superior al 99%) Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA). Se preparó una disolución concentrada de 10 mM en tampón Tris/citrato 10 mM pH 6.0 y se conservó a 4°C.

**Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF).** Fue proporcionado por Sigma-Aldrich (Madrid, España). La disolución concentrada se preparó a 50 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se conservó a 4°C.

**1,5-bis(4-alildimetilamoniofenil)pentano-3-1 dibromuro (BW284C51).** Fue adquirido de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Se disolvió en agua a 11 mM y se conservó a 0°C.

**Etopropazina hidrocloreto (etopropazina).** Proporcionado por Sigma- Aldrich (Madrid, España). Se realizó una disolución a 11 mM en agua y se mantuvo a 0°C.

**Tetraisopropil fosforamida (iso-Ompa)** Se obtuvo de Sigma Chemical Company y se disolvió en etanol absoluto a la concentración apropiada en cada ensayo, inmediatamente antes de usarse.

**Tiocolina.** Se obtuvo mediante degradación química de la acetiltiocolina yoduro. Se incubó una solución de acetilcolina 60 mM a pH 10 durante 30 horas a 37°C. La disolución se neutralizó a pH 7.4 y se diluyó en agua a las concentraciones deseadas para su uso.

El resto de reactivos fueron proporcionados por proveedores locales y fueron de calidad analítica.

*Estación automatizada Biomek 2000*

Para las medidas de actividades enzimáticas mediante microensayo, se utilizó la estación de trabajo Biomek 2000 (Beckman-Coulter), con el doble objetivo de minimizar el consumo de muestra y chequear de forma simultánea un número elevado de muestras.

La estación está equipada con pipetas multicanales (8x) con capacidad de 20-200  $\mu\text{L}$  y 20  $\mu\text{L}$ , y se dotaron con dos bloques de aluminio termostatizados para 8x12 minitubos de 1 mL, con un controlador de temperatura electrónico de fabricación propia.

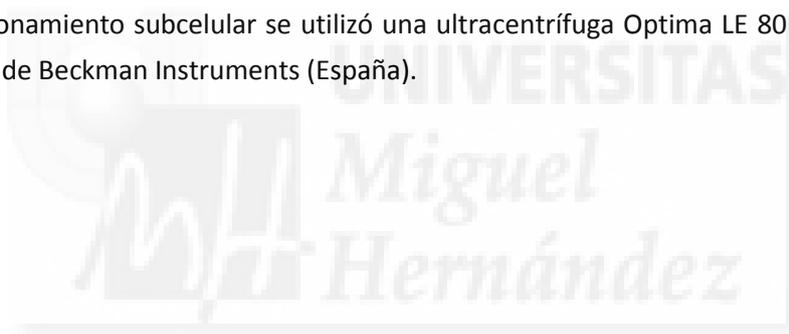
*Lector de placas*

Para la lectura fotométrica se utilizó un lector de microplacas SD340 C (Beckman). Se utilizaron los filtros de 510 y 410 nm, para las medidas de actividad PV-esterasa y colinesterasas respectivamente.

*Centrífugas*

Se utilizó la centrífuga Allegra-21R equipada con un rotor de 54180 de Beckman Instruments (España), para precipitar las fibras y los materiales más gruesos del tejido.

Para el fraccionamiento subcelular se utilizó una ultracentrífuga Optima LE 80K con rotor TFT 70 Ti, ambos de Beckman Instruments (España).



## 4.2. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

### *Obtención del material biológico*

El material biológico que se utilizó en los experimentos fue cerebro de pollo cuya disección se describe más adelante.

Se obtuvieron a partir de pollos de uso comercial (*Gallus domesticus*) y nos fueron proporcionados por un matadero industrial de aves. Inmediatamente después del sacrificio, los animales fueron transportados en frío hasta el laboratorio donde se procedió a la disección y extracción del cerebro.

Los animales en el matadero fueron sacrificados mediante el siguiente método: Aturdimiento por baño eléctrico de alrededor de 10 segundos y desangrado durante aproximadamente 3 min.

### *Disección y homogeneización del tejido*

El cerebro fue extraído, después de separar las meninges y desechar la parte proximal de la médula, que permanecía unida al tallo cerebral (**Figura 4.1**). Los cerebros se mantuvieron en tampón frío (0-4°C) durante menos de una hora hasta su homogeneización.

El homogeneizado se preparó a la concentración de 200 mg de tejido fresco/mL en tampón Tris pH 8.0. Para este proceso se utilizó un homogeneizador Politron (Kinemática GmbH, Alemania) con una sonda PTA 10S a un 70% de su potencia (3 ciclos de 30 segundos).

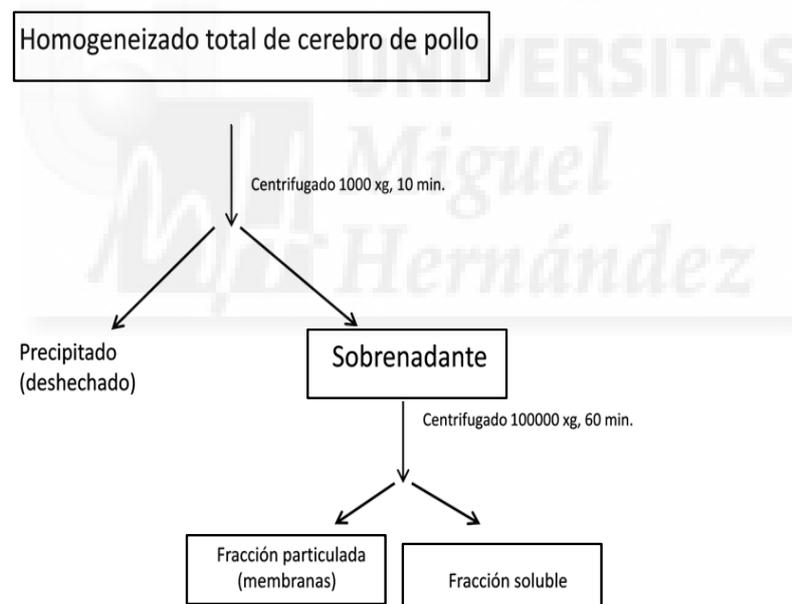


**Figura 4.1. Vista superior del cerebro**

*Fraccionamiento subcelular*

Para el fraccionamiento del tejido se usó una versión modificada del método desarrollado por Vilanova et al. 1990. El tejido ya homogeneizado se centrifugó a 1000xg durante 10 min (4°C) para precipitar y eliminar fibras y material no homogeneizado. El sobrenadante se centrifugó a 100000 xg durante 60 min (4°C), para obtener un sobrenadante final que se llevó al volumen del que partíamos con Tris pH 8.0 y se le denominó **fracción soluble**. El precipitado se resuspendió en Tris pH 8.0 al mismo volumen de partida y lo denominamos como **fracción particulada**. Las fracciones se alicuotaron en crioviales y se guardaron en nitrógeno líquido hasta la realización de los ensayos. En la **Figura 4.2** se muestra esquematizado el proceso.

En el resto del trabajo la concentración de las preparaciones de tejido de ambas fracciones expresadas en mg/mL se referirá a la cantidad de fracción soluble y de membrana que procede de los mg de tejido fresco original que se indican.

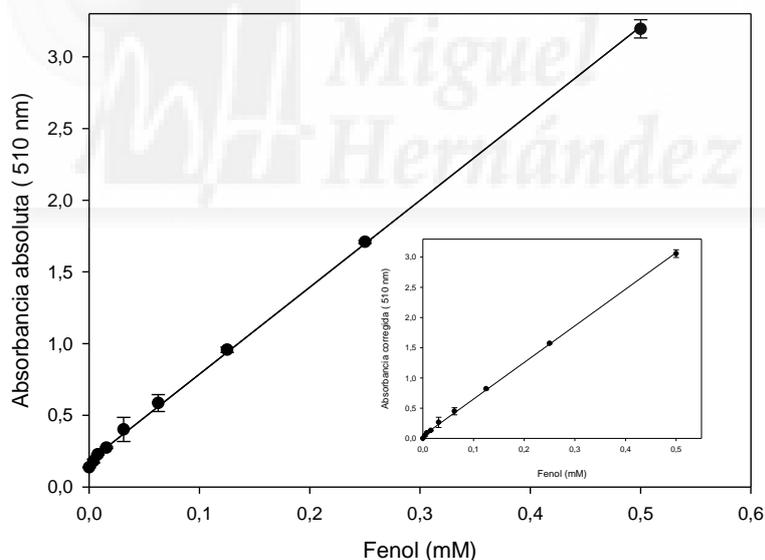


**Figura 4.2.** Esquema general del fraccionamiento subcelular

### 4.3. MEDIDA DE ACTIVIDADES Pvasas: Microensayo.

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo según han descrito (Estévez et al., 2004) usando un procedimiento basado en el método colorimétrico del ensayo de la NTE, desarrollado por Johnson (1977).

El método se modificó para adaptarlo a un microensayo automatizado usando la estación Biomek 2000 (Beckman), (Escudero et al, 1996), con el procedimiento que se detalla a continuación: 20  $\mu\text{L}$  de tampón y 200  $\mu\text{L}$  de tejido (a la concentración necesaria en cada experimento), a los que se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de preparación de sustrato PV a la concentración necesaria (volumen de reacción 420  $\mu\text{L}$ ); este volumen se incubó durante 10 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo se paró la reacción añadiendo 200  $\mu\text{L}$  de una solución de SDS (2%)-AAP (0.25 mg/mL), con posterioridad se agregan 100  $\mu\text{L}$  de ferricianuro potásico (40 mg/mL). Se transfieren 300  $\mu\text{L}$  de la mezcla a una microplaca de 96 pocillos y se mide la absorbancia a 510 nm. En el ensayo se incluyeron controles de hidrólisis espontánea (muestras sin tejido). La actividad en nmoles/min se calculó tomando como referencia, una curva de calibrado hecha con patrones de fenol (**Figura 4.3**)



**Figura 4.3. Curva de calibrado de fenol.** La curva se realizó a las concentraciones de 0-0,004 - 0,008 - 0,016 - 0,031 - 0,063 - 0,125 - 0,250 y 0,5 mM de fenol en tampón Tris pH 8. El gráfico mayor muestra absorbancias absolutas ( $n = 2$ ) y las desviaciones estándar. Los parámetros de la recta de regresión lineal para el rango lineal fueron  $y_0 = 0,043$ ,  $m = 6,062 \text{ mM}^{-1}$  y  $R^2 = 0,997$ . El panel más pequeño muestra la diferencia de la absorbancia corregida, restando la absorbancia de los blancos (sin fenol).

#### 4.4. MEDIDA DE ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA.

##### *Método cinético de Ellman*

Se mezcló 100  $\mu\text{L}$  de hButChE 0,2 nM en tampón fosfato/ BSA 1% con 100  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato/DTNB 6mM y 20  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura. Después se añadió 200  $\mu\text{L}$  de acetiltiocolina y se incubó la mezcla a 25°C. Se leyó la absorbancia a 410 nm cada 2 min desde el min 3 a partir del comienzo de la reacción hasta el min 17.

##### *Método de punto final a tiempo fijo*

Se desarrolló un procedimiento basado en el reactivo de Ellman para adaptarlo a su uso en la estación automatizada Biomek 2000. El método se adaptó para poder medir múltiples muestras simultáneamente y añadiendo el reactivo de color al final de la reacción (punto final). Tanto las ventajas como el desarrollo de este método se discuten en el Capítulo de Resultados. Se preincubaron 200  $\mu\text{L}$  de preparación de tejido (tampón fosfato en los blancos) con 20  $\mu\text{L}$  de tampón o inhibidor, en microtubos de 1 mL, a 37°C durante el tiempo requerido para la inhibición. Después se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de disolución de sustrato acetiltiocolina o acetyl- $\beta$ -metilcolina, en agua para que las concentraciones finales del sustrato en el volumen de reacción de 420  $\mu\text{L}$  fueran las deseadas.

Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C, transcurridos los cuales se detuvo la reacción añadiendo 200  $\mu\text{L}$  de una solución SDS 2%- DTNB 6 mM.

Posteriormente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 a las muestras ó de preparación del tejido en los blancos. De este volumen de 820  $\mu\text{L}$  transferimos 300  $\mu\text{L}$  a una micoplaca de 96 pocillos y se mide la absorbancia de 410 nm, transcurridos al menos 5 minutos.

El procedimiento se presenta en la **Figura 4.4** y el protocolo en la **Tabla 4.1**. La actividad se calculó en nmoles/minuto tomando como referencia una curva de calibrado hecha con patrones de tiocolina. El método procedimiento está basado en el método de Ellman para el ensayo de colinesterasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

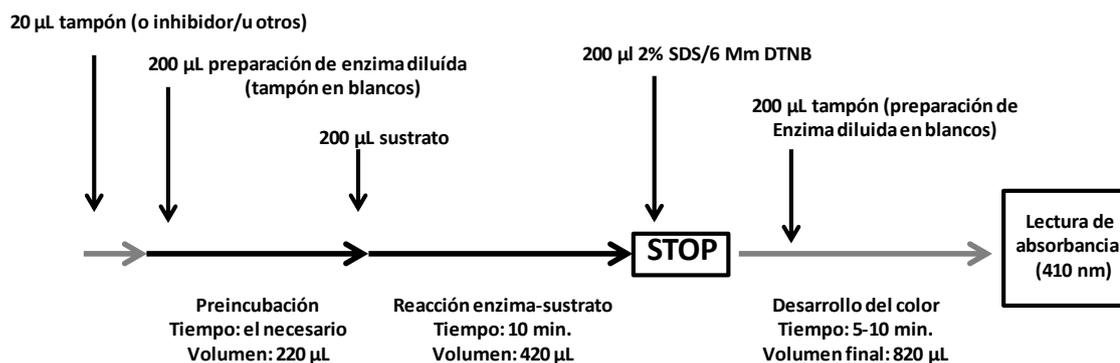


Figura 4.4. Esquema del ensayo de la medida de actividad hidrolizante de acetilcolina.

Tabla 4.1. Protocolo del método de medida de la actividad hidrolizante de acetilcolina.

Paso	Acción
(1)	20 µL de tampón (o inhibidor)
(2)	200 µL de preparación de enzima diluida (tampón en blancos) y mezclado
	<i>Volumen total de preincubación: 220 µL</i>
(3)	Tiempo de preincubación/inhibición
(4)	200 µL de sustrato y mezclado
	<i>Volumen total de reacción enzimática: 420 µL</i>
(5)	Tiempo de reacción enzima-sustrato: 10 minutos a 37°C
(6)	Parada de la reacción con 200 µL de 2% SDS/6 mM DTNB y mezcla
(7)	200 µL de tampón (preparación de enzima diluida en blancos) y mezcla
	<i>Volumen final total: 820 µL</i>
(8)	Tiempo de espera 5-10 min.
(9)	Lectura de absorbancia a 410 nm y transferencia a microplacas de 300 µL.
	Estimación de la absorbancia corregida (Muestras-Blancos)
	Cálculos: unidades de actividad (nmoles/min), porcentaje sobre controles...

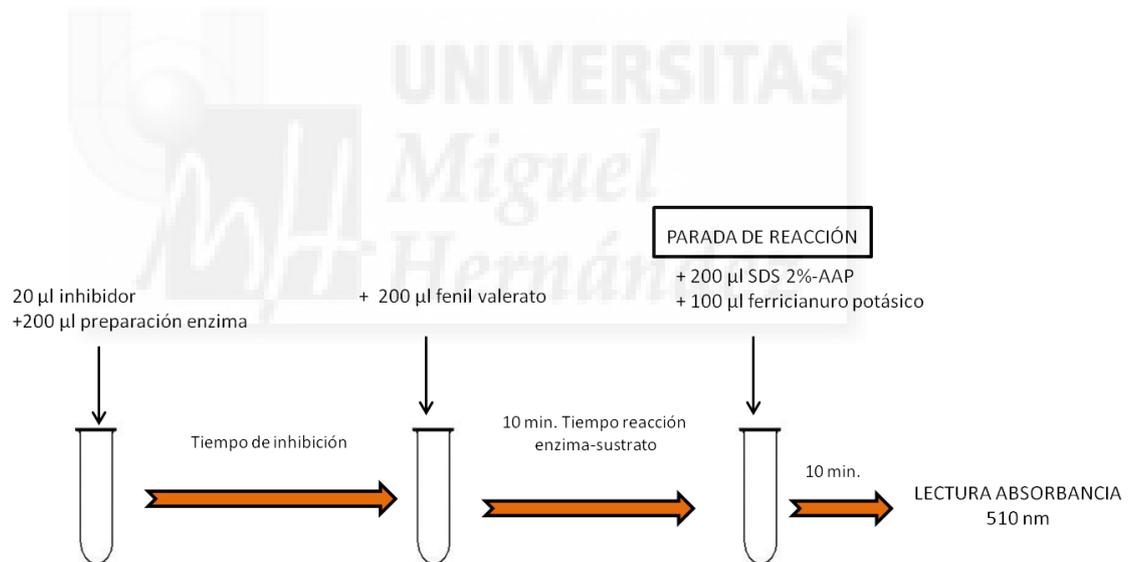
#### 4.5. ENSAYOS DE INHIBICIÓN

*Curvas de Inhibición de la actividad PVasa.*

En la **Figura 4.5** se muestra un esquema del procedimiento general.

Se usaron las condiciones del microensayo estándar de PVasas donde las concentraciones de inhibidor en la mezcla de preincubación fueron variables, dentro de los rangos detallados a continuación para cada inhibidor; el tiempo de preincubación fue 30 min y la concentración de tejido fue de 15 mg/mL de tejido fresco (en 420  $\mu$ L de volumen de reacción). Los datos se expresaron en porcentajes de actividad respecto al control de actividad total (muestra sin inhibidor). Las concentraciones tanto de inhibidor como de tejido fueron las mismas para fracción soluble y de membrana.

- iso-OMPA entre 0-1500  $\mu$ M
- BW284C51 entre 0-1000  $\mu$ M
- etopropazina entre 0-1000  $\mu$ M



**Figura 4.5.** Procedimiento general del método de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Curvas de Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina.*

Se utilizaron las condiciones del ensayo descrito anteriormente para la medida de la actividad colinesterasa. Se preincubaron los inhibidores (paraoxon, mipafox, PMSF, etopropazina, BW284C51, o iso-OMPA) con la preparación de enzima diluida (fracción soluble o de membrana), durante un tiempo fijo de inhibición de 30 min. La concentración de tejido que se utilizó fue de 10 mg/mL tanto en fracción soluble como de membrana (en 420  $\mu$ L de volumen de reacción enzima-sustrato). Las concentraciones de inhibidores, en el volumen de inhibición de 220  $\mu$ L, fueron:

- iso-OMPA entre 0-1500  $\mu$ M
- BW284C51 entre 0-1000  $\mu$ M
- etopropazina entre 0-1000  $\mu$ M
- paraoxon entre 0-650  $\mu$ M
- mipafox entre 0-900  $\mu$ M
- PMSF entre 0-4000  $\mu$ M

### *Inhibición secuencial a un tiempo fijo con dos inhibidores, de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina.*

Se utilizaron las condiciones del ensayo para la medida de la actividad colinesterasa. La preparación de tejido a 10 mg/mL (en el volumen de 420  $\mu$ L de reacción enzima-sustrato) de tejido fresco se incubó con 10  $\mu$ L del primer inhibidor a la concentración necesaria en cada caso, durante 30 min de preincubación a 37  $^{\circ}$ C, y posteriormente se añadió 10  $\mu$ L de un segundo inhibidor y se incubó la mezcla 30 min a 37  $^{\circ}$ C. Las concentraciones de los inhibidores fueron 100  $\mu$ M de PMSF, 150  $\mu$ M de etopropazina y 30  $\mu$ M de iso-OMPA. Los datos se expresaron en porcentajes de actividad respecto al control de actividad total (muestra sin ninguno de los dos inhibidores).

*Inhibición progresiva con el tiempo de la actividad PVasa*

PVasa total.

Se realizaron ensayos de la dependencia del tiempo de inhibición de actividad total PVasa en fracción soluble y membranas.

Se usó el microensayo de PVasas. Los tiempos de inhibición fueron de 10 ó 30 minutos. Las concentraciones de inhibidor en la mezcla de preincubación (220  $\mu$ L), así como las concentraciones de tejido (en 420  $\mu$ L de volumen de reacción) se detallan en Resultados.

Componentes de actividad PVasa.

El mismo ensayo fue utilizado para estudiar las dependencias del tiempo en las actividades resistentes a PMSF 1500  $\mu$ M (E $\alpha$ ), paraoxon 25  $\mu$ M (E $\gamma$ ) y mipafox 25  $\mu$ M (E $\beta$ , en fracción soluble de cerebro). Las muestras fueron previamente pretratadas con los inhibidores durante 30 minutos a 37°C y a continuación se ensayó siguiendo el protocolo de microensayo de Pvasa.

En cada experimento se incluyeron además de los blancos, controles del 100% de actividad.



## 4.6. ENSAYOS DE COMPETICIÓN ENTRE SUSTRATOS

### 4.6.1. Ensayos en fracción soluble.

*Interacción de la acetiltiocolina con actividad PVasa resistente a PMSF 1500  $\mu$ M (E $\alpha$ ), mipafox 25  $\mu$ M (E $\beta$ ) o paraoxon 25  $\mu$ M (E $\gamma$ ).*

Se incubaron 20  $\mu$ L del inhibidor (PMSF, mipafox o paraoxon) con 200  $\mu$ L de preparación de la enzima diluida (a las concentraciones necesarias para cada ensayo) a 37°C durante 30 min. Las concentraciones de inhibidor en los 220  $\mu$ L de volumen de inhibición fueron: PMSF 1500  $\mu$ M, mipafox 25  $\mu$ M y paraoxon 25  $\mu$ M (como se describe en Mangas et al. 2012).

Después de 30 min de inhibición, se añadieron 200  $\mu$ L de una mezcla de fenilvalerato y acetilcolina (preparada en agua mili-Q) las concentraciones de estas disoluciones fueron las siguientes (en los 420  $\mu$ L de reacción):

Fenilvalerato = 0,014; 0,029; 0,059; 0,119; 0,230 ó 0,470 mM

Acetilcolina = 0; 1,42; 3,33 ó 7,14 mM

Después de 10 min de reacción enzima-sustrato, se paró la reacción añadiendo 200  $\mu$ L de una disolución de SDS 2%- AAP 10 mM y a continuación se añadió 100  $\mu$ L de ferricianuro potásico 2%. Después de 10 minutos se midió la absorbancia a la longitud de onda de 510 nm.

*Interacción del PV con la actividad hidrolizante de acetilcolina resistente a PMSF 1500  $\mu$ M, mipafox 25  $\mu$ M o paraoxon 25  $\mu$ M.*

Se incubaron 20  $\mu$ L del inhibidor (PMSF, mipafox o paraoxon) con 200  $\mu$ L de preparación de la enzima diluida (a las concentraciones necesarias para cada ensayo y especificadas en Resultados) a 37°C durante 30 min. Las concentraciones de inhibidor en los 220  $\mu$ L de volumen de inhibición fueron: PMSF 1500  $\mu$ M, mipafox 25  $\mu$ M y paraoxon 25  $\mu$ M (como se describe en Mangas et al. 2012).

Después de 30 min de inhibición, se añadieron 200  $\mu$ L de una mezcla de fenilvalerato y acetilcolina (preparada en agua mili-Q) las concentraciones de estas disoluciones fueron las siguientes (en los 420  $\mu$ L de reacción):

Acetiltiocolina= 0,04; 0,14; 0,47; 1,42; 4,28 ó 12,85 mM

Fenilvalerato= 0; 1,42; 4,28 ó 8,57 mM

Después de 10 min de reacción enzima-sustrato, se añadió 200  $\mu\text{L}$  de una disolución de SDS 2%-DTNB 6 mM y se paró la reacción. Para equiparar volúmenes de muestras y blancos, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato a las muestras y el mismo volumen de preparación del tejido a los blancos. Transcurridos entre 5 y 10 min se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.

#### 4.6.2. Ensayos en fracción de membrana.

*Interacción de la acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a PMSF 1000  $\mu\text{M}$  (EP $\alpha$ ), mipafox 50  $\mu\text{M}$  (EP $\beta$ ), paraoxon 25  $\mu\text{M}$  (EP $\gamma$ ) o mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$  (EP $\delta$ ).*

El procedimiento utilizado en estos ensayos fue el mismo que con fracción soluble, únicamente variaron la concentraciones de inhibidor (Mangas et al., 2013), tejido y sustratos.

Las concentraciones de inhibidor en el volumen de inhibición de 220  $\mu\text{L}$  fueron de: PMSF 1000  $\mu\text{M}$ , mipafox 50  $\mu\text{M}$ , paraoxon 25  $\mu\text{M}$  o mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$ . La concentración de tejido se especifica en cada apartado de Resultados (en el volumen de reacción de 420  $\mu\text{L}$ ).

Las concentraciones finales de la mezcla de sustratos en el volumen de reacción fueron:

Fenilvalerato = 0,014; 0,029; 0,059; 0,119; 0,230 ó 0,470 mM

Acetiltiocolina= 0; 1,42; 3,33 ó 7,14 mM

*Interacción del PV en la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000  $\mu\text{M}$ , mipafox 50  $\mu\text{M}$ , paraoxon 25  $\mu\text{M}$  o mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$ .*

Se usó el método descrito para fracción soluble. La concentración de tejido fue la apropiada para cada ensayo y las concentraciones de inhibidor en el volumen de 220  $\mu\text{L}$  fueron de: PMSF 1000  $\mu\text{M}$ , mipafox 50  $\mu\text{M}$ , paraoxon 25  $\mu\text{M}$ , mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$ . Las concentraciones finales de sustrato en el volumen de reacción fueron:

Acetiltiocolina= 0,04; 0,14; 0,47; 1,42; 4,28 ó 12,85 mM

Fenilvalerato= 0; 1, 42; 4,28 ó 8,57 mM.

#### 4.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

*Análisis de los datos de inhibición a tiempo fijo.*

Análisis de los datos considerando una inhibición tipo irreversible.

Los datos obtenidos de los experimentos de inhibición a tiempo fijo utilizando diferentes inhibidores, tanto de colinesterasas como de PVasas, se sometieron a un análisis en el que se buscó el modelo que mejor se ajustara, mediante el programa Sigma Plot 12.5.

El programa utilizó el algoritmo de Marquardt-Levenberg que busca los valores de los parámetros a determinar de tal modo que la suma de los cuadrados de la diferencia entre el valor real y el predeterminado por la ecuación (residual) resulte mínima (Marquardt, 1963; Shragar, 1970, 1972; Nash 1979; Press et al., 1986).

El modelo empleado (**Ecuación 4.1**) de acuerdo con Estévez y Vilanova (2009), para la inhibición de varios componentes enzimáticos, contenía uno, dos o tres componentes exponenciales (sensibles, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>) con o sin un componente resistente (E<sub>R</sub>).

$$E = E_{10} \cdot e^{-(k_1 \cdot I \cdot t)} + E_{20} \cdot e^{-(k_2 \cdot I \cdot t)} + E_{30} \cdot e^{-(k_3 \cdot I \cdot t)} + \dots + E_{n0} \cdot e^{-(k_n \cdot I \cdot t)} + E_R \quad [\text{Ec. 4.1}]$$

Donde E es el control de la actividad inicial (sin inhibidor), E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> representan el contenido relativo de los componentes sensibles o amplitud, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> y k<sub>3</sub> representan las constantes exponenciales de segundo orden de cada componente y E<sub>R</sub> representa el contenido relativo del componente resistente (actividad residual resistente a las concentraciones de inhibidor empleadas). Los valores de I<sub>50</sub> de cada componente para 30 minutos fueron calculados aplicando la **Ecuación 4.2**:

$$(\ln 2) / K \cdot t \quad [\text{Ec. 4.2}]$$

Con el objetivo de comprobar, cuál de los modelos era el mejor desde punto de vista estadístico, se sometieron los ajustes al test de la F (Bevington, 1969).

Para el comportamiento cinético en presencia de PMSF, se utilizó la **Ecuación 4.3** (Estévez et al, 2012), debido a que existe una fuerte influencia de la hidrólisis espontánea del inhibidor cuando está en medio acuoso en presencia del tampón Tris pH 8. Esta ecuación incluye el efecto de la hidrólisis del inhibidor.

$$E = E1_0 * e^{(e^{-k_h \cdot t} - 1) \frac{k_1}{k_h} I_0} + E2_0 * e^{(e^{-k_h \cdot t} - 1) \frac{k_2}{k_h} I_0} + R \quad \text{[Ec. 4.3]}$$

*Análisis de los datos de los experimentos de competición entre sustratos.*

Los resultados de los ensayos cinéticos de competición de sustratos se analizaron con el módulo Exploratory E-K del software SigmaPlot versión 12.5. (Systat Software Inc, Chicago, USA) para Windows. Este módulo está diseñado para trabajar en conjunto con el modelo de cinética enzimática tipo Michaelis-Menten.

El análisis cinético realizado con el módulo de SigmaPlot se usó con el objetivo de obtener información tanto cualitativa como cuantitativa sobre el mecanismo de inhibición. Este modulo crea gráficos directos lineales, gráficos secundarios e informes numéricos.

A partir de regresiones no lineales el software da como resultado el ajuste del modelo de Michaelis-Menten y un ajuste secundario de Lineweaver-Burk partir del cual se obtiene la estimación del tipo de inhibición (competitiva, no competitiva, acompetitiva y/o mixta) así como las constantes de inhibición y los parámetros cinéticos ( $V_{max}$ ,  $K_i$  y  $K_M$ ).

Se usó el criterio de ALCc (Akaike, 1974) para comparar los ajustes secundarios obtenidos y analizar cuál de ellos se ajustó mejor a las opciones de inhibición. Los valores más bajos de ALCc corresponden a los mejores ajustes. Este procedimiento ha sido usado en otros trabajos (Li et al., 2004; Fišar et al., 2010; Calamini et al., 2010).





## **5. RESULTADOS**



## 5.1. DESARROLLO DEL MÉTODO DE MEDIDA AUTOMATIZADO DE LA ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA.

*El método cinético de Ellman y propuesta alternativa.*

El método de Ellman (Ellman, 1961) se usa, habitualmente para determinar la actividad hidrolizante de acetiltiocolina. En este método, el DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoato) se añade al medio junto con el sustrato y reacciona como cromógeno con la tiocolina producida. El aumento de color que se produce debido a la reacción, se registra de forma continua durante el tiempo que dura la reacción. Las ventajas de este método de medida en continuo son su alta sensibilidad y las pequeñas cantidades de muestra que requiere (Sanz y Repetto, 1995).

Los inconvenientes del método son: (1) se ha descrito que la presencia del DTNB y TNB en el medio de reacción podría producir inhibición de la actividad enzimática (Komersová, 2007) ya que no está demostrado que no pueda producir interacciones en estudios de inhibición. (2) Además dificulta el procesado simultáneo de muchas muestras.

El método que se ha desarrollado, permite realizar numerosas medidas simultáneas, parando la reacción enzimática y añadiendo el DTNB después, para producir el color. Se aplicó tanto a la fracción soluble como de membrana de cerebro pero también puede llevarse a cabo en otros tipos de tejidos. Los objetivos de este nuevo diseño son: (1) Eliminar las interferencias del DTNB en la inhibición y reacción con el sustrato y (2) permite procesar múltiples muestras simultáneamente en paralelo.

*Respuesta de blancos y controles: DTNB con SDS*

Se llevó a cabo un experimento sin tejido, con el objetivo de clarificar las diferencias de absorbancia entre diferentes tipos de controles y blancos, determinar si era mejor añadir el DTNB junto al SDS o al final y qué concentraciones y volúmenes de DTNB eran los adecuados.

Se incluyeron los siguientes blancos, preparado por triplicado y se midió la absorbancia a 410 nm:

B1: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de agua + 200  $\mu$ L SDS 2%

B2: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de agua + 200  $\mu$ L SDS 2%-DTNB 2mM

B3: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de agua + 200  $\mu$ L SDS 2%-DTNB 4mM

B4: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de agua + 200  $\mu$ L SDS 2%-DTNB 6mM

## RESULTADOS

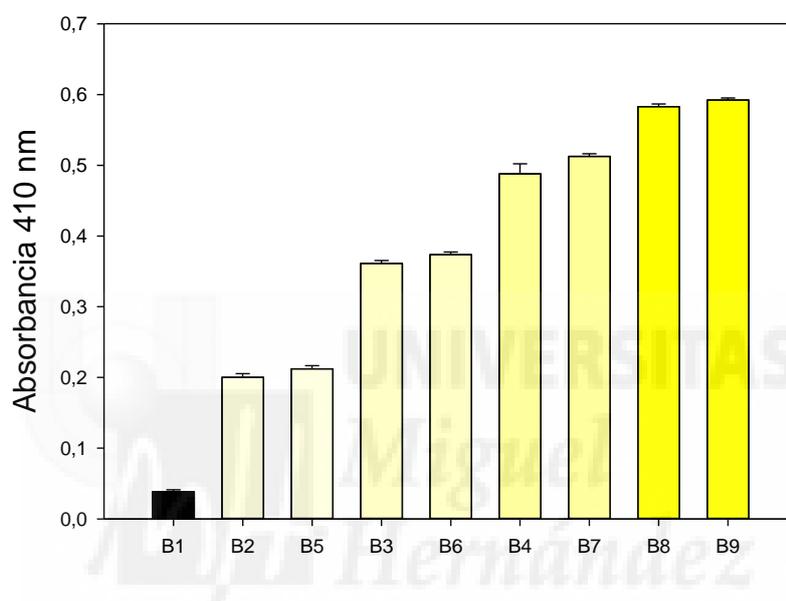
B5: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de agua + 100  $\mu$ L SDS 4% + 100  $\mu$ L DTNB 2 mM

B6: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de agua + 100  $\mu$ L SDS 4% + 100  $\mu$ L DTNB 4 mM

B7: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de agua + 100  $\mu$ L SDS 4% + 100  $\mu$ L DTNB 6 mM

B8: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de acetiltiocolina 15 mM+ 200  $\mu$ L SDS 2% -DTNB 6 mM

B9: 220  $\mu$ L de tampón fosfato+ 200  $\mu$ L de acetiltiocolina 15 mM + 100  $\mu$ L SDS 4% + 100  $\mu$ L DTNB 6 mM



**Figura 5.1. Absorbancias de blancos en el diseño del método de medida de actividad hidrolizante de acetiltiocolina.** Se midió la absorbancia a 410 nm de las diferentes preparaciones sin tejido. Según se indica en el texto. Las medidas se realizaron por triplicado

No se observaron diferencias entre añadir el DTNB junto al SDS o después de añadir SDS (**Figura 5.1** blancos B2-B5, B3-B6 y B8-B9).

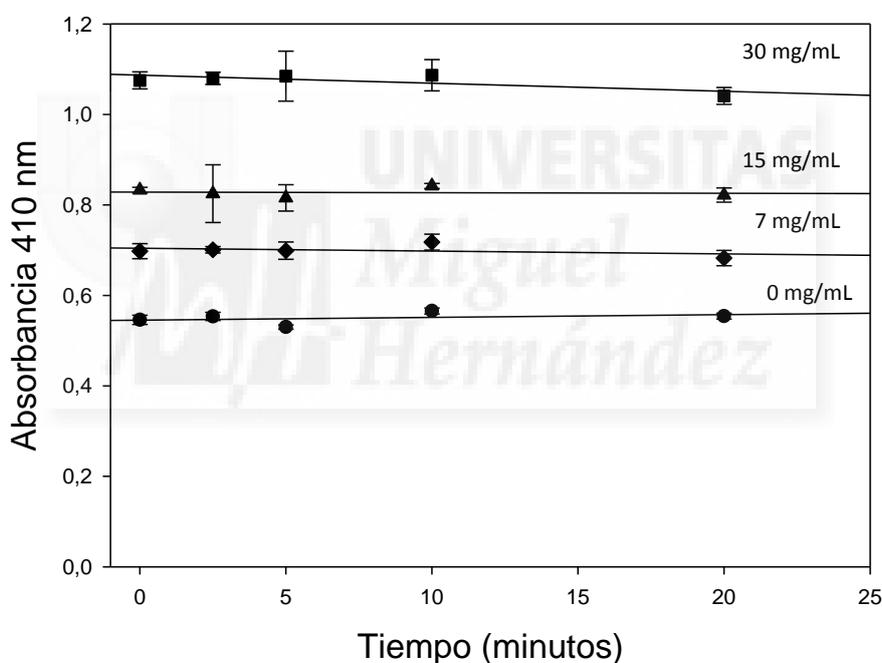
Al aumentar la concentración de DTNB aumentó la absorbancia. Al añadir el sustrato, acetiltiocolina en lugar de agua también la absorbancia fue mayor (B4-B8, B7-B9).

Se decidió añadir el DTNB junto al SDS para simplificar el método.

*Interacción del tejido con DTNB*

Se llevó a cabo un experimento para comprobar si la medida de la absorbancia cambiaba por la interacción del tejido con el DTNB. Se incubó durante diferentes tiempos (0-2,5-5-10-20 min) una preparación de fracción soluble de diferentes concentraciones con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4. Después del tiempo de incubación se añadió SDS 2%-DTNB 6 mM y se procedió como se indica en el capítulo de Materiales y Métodos.

La evolución de la absorbancia de los blancos con la presencia de tejido a diferentes concentraciones y sin sustrato, a diferentes tiempos (**Figura 5.2**), mostró que al aumentar la concentración de tejido, se incrementa la absorbancia en el tiempo ensayado permaneciendo constante al menos hasta 20 min de incubación.



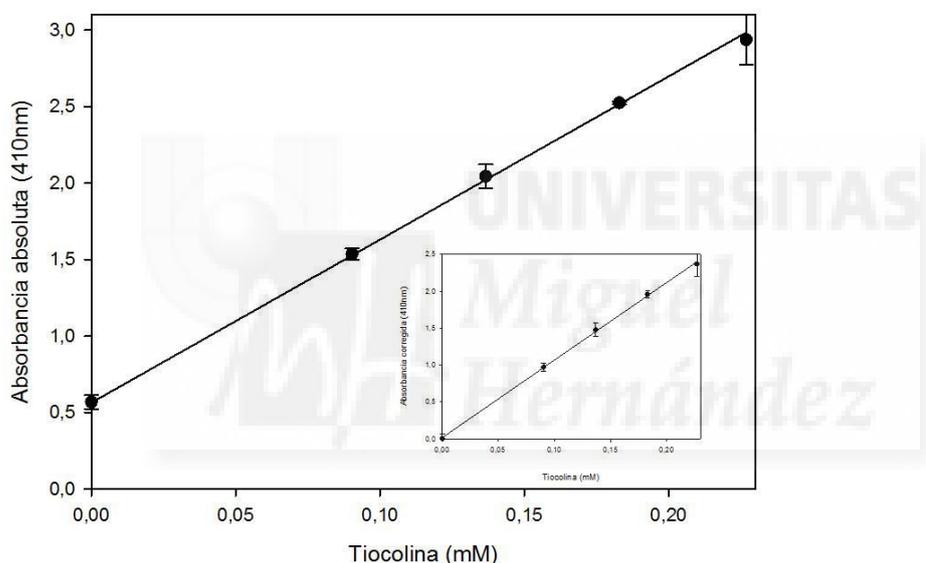
**Figura 5.2. Evolución de la absorbancia con la concentración de tejido y sin sustrato con el tiempo de incubación con tampón fosfato.** Se incubaron 220  $\mu$ L de preparación de fracción soluble de cerebro a concentraciones finales de 0, 7, 15 y 30 mg de tejido fresco /mL, durante 0-2,5-5-10 y 20 min a 37°C, con 200  $\mu$ L de tampón fosfato pH 7,4. Se añadieron 200  $\mu$ L de SDS 2%-DTNB 6 mM y se midió la absorbancia a 410 nm

## RESULTADOS

### Linealidad de la medida

Se estudió la linealidad de la medida de la reacción de la tiocolina con el DTNB, con una curva de calibrado de diferentes concentraciones de tiocolina. Se incubaron 420  $\mu\text{L}$  de diferentes concentraciones de tiocolina con 200  $\mu\text{L}$  de SDS 2%-DTNB 6mM, durante 10 min a 37°C. Las concentraciones de tiocolina en el volumen de ensayo (820  $\mu\text{L}$ ) fueron 0-0,09-0,14-0,18 y 0,23 mM. Se midió la absorbancia a 410 nm y se representaron las concentraciones de tiocolina utilizadas, frente a los valores de absorbancia reales obtenidos y frente a la absorbancia corregida después de restarle el blanco sin tiocolina.

Los valores de absorbancia fueron directamente proporcionales a la concentración de tiocolina (hasta 0,25 mM). (**Figura 5.3**).

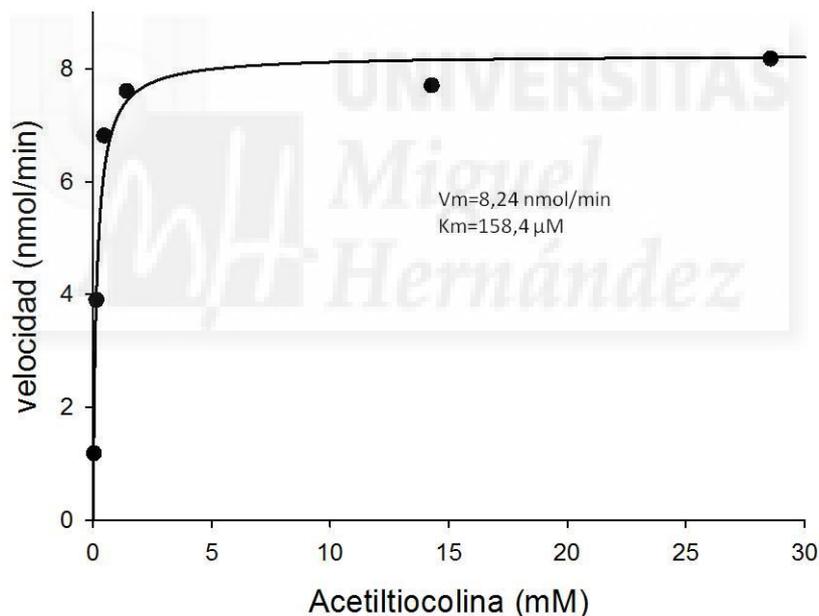


**Figura 5.3. Curva de calibración de la tiocolina del método propuesto.** Tiocolina incubada con SDS 2%/DTNB 6mM. El panel A muestra absorbancias absolutas ( $n = 3$ ) y las desviaciones estándar. Los parámetros de la recta de regresión lineal para el rango lineal fueron  $y_0 = 0,569$ ,  $m = 10,668 \text{ mM}^{-1}$  y  $R^2 = 0,9951$ . El panel B muestra la absorbancia corregida restando la absorbancia de los blancos (una solución sin tiocolina que contiene la misma disolución de SDS 2%/DTNB 6 mM). Los parámetros de regresión lineal fueron  $y_0 = 0,016$ ,  $m = 10,514 \text{ mM}^{-1}$  y  $R^2 = 0,999$ .

### Concentraciones óptimas de sustrato.

Con el objetivo de establecer la concentración óptima de acetilcolina para utilizar en el ensayo de medida de actividad, se realizó un experimento conforme al método propuesto, variando la concentración de sustrato y sustituyendo los 20  $\mu\text{L}$  de inhibidor por tampón fosfato. Se ensayaron concentraciones de acetilcolina entre 0,047 y 28 mM (en miliQ). Se usó una concentración de tejido de 10 mg/mL en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4.

En la representación gráfica de Michaelis-Menten (**Figura 5.4**) obtenida de la actividad hidrolizante de acetilcolina, se observa cómo evoluciona la velocidad en el rango de concentración de sustrato comprendido entre 1 y 28 mM hasta que se alcanza la velocidad máxima. Se estimó una constante de Michaelis-Menten de ( $K_m$ ) 0,158 mM, y una velocidad máxima ( $V_m$ ) de 8,24 nmol/min. La actividad no disminuyó al incrementar la concentración de acetilcolina.



**Figura 5.4. Actividad versus concentración de sustrato.** Se incubó fracción soluble de cerebro de 10 mg/mL en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 a 37°C, en volúmenes de reacción de 420  $\mu\text{L}$ , con concentraciones de sustrato de 0,047, 0,142, 0,470, 1,420, 14,280 y 28 mM, durante 10 min y se paró la reacción con SDS-DTNB según el procedimiento indicado en Materiales y Métodos

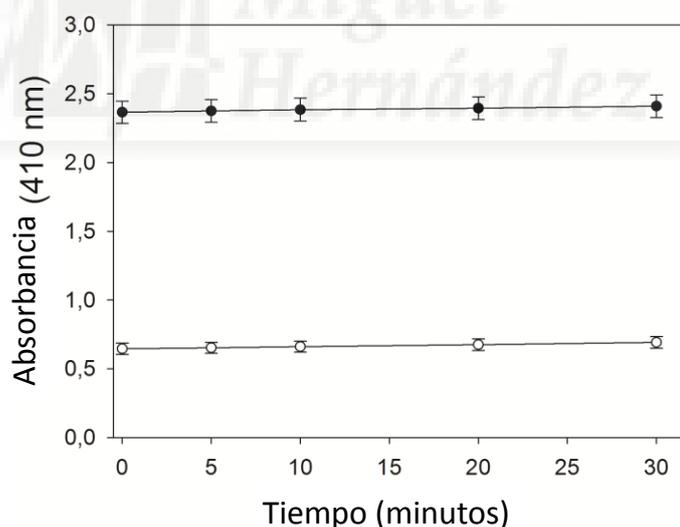
## RESULTADOS

### *Estabilidad de la absorbancia después de parar la reacción.*

Se llevó a cabo un ensayo para comprobar si una vez parada la reacción enzimática, la absorbancia permanecía estable. El procedimiento seguido fue el descrito en el capítulo de Materiales y Métodos, se incubaron 20  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 con 200  $\mu\text{L}$  de una preparación de fracción soluble de 10 mg/mL con 200  $\mu\text{L}$  de sustrato (acetilcolina 15 mM), a los 10 min se paró la reacción añadiendo 200  $\mu\text{L}$  SDS 2 %-DTNB 6 mM, se incluyeron controles de la hidrólisis química de la acetilcolina en los que también se añadió preparación de enzima diluida, después de añadir SDS 2%/ DTNB 6 mM al final. Finalmente se midió la absorbancia a los 0-5-10-20 y 30 min después de parada la reacción.

La absorbancia se mostró estable frente al tiempo (**Figura 5.5**), una vez que la reacción enzimática se paró añadiendo SDS 2%/ DTNB 6 mM conforme al procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

De los resultados se puede deducir que la medida colorimétrica se puede realizar en cualquier momento en un rango de tiempo comprendido al menos desde 1 hasta 30 min después de que se haya parado la reacción enzimática con SDS/DTNB.



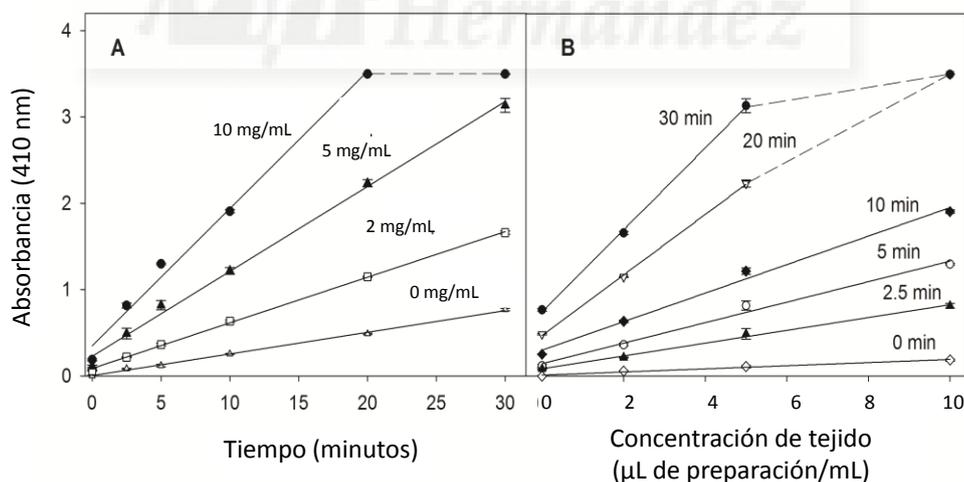
**Figura 5.5. Estabilidad de la absorbancia después de parar la reacción enzima-sustrato, en fracción soluble.** Se midió la absorbancia una vez parada la reacción enzima-sustrato por adición de SDS/DTNB. Los círculos negros representan la absorbancia de las muestras con enzima. Los círculos blancos representan la absorbancia de los blancos. Se representa el valor medio de 3 replicados y su desviación estándar.

*Linealidad con el tiempo de reacción y con la concentración de tejido.*

Se realizó un experimento en el que se analizó la dependencia del tiempo de la reacción y su evolución con la concentración de tejido, en la aplicación del método. Se incubó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 con 200  $\mu\text{L}$  de preparación de enzima diluida a diferentes concentraciones (0, 2, 5 Y 10 mg de tejido fresco/ mL en 420  $\mu\text{L}$ ) y con 200  $\mu\text{L}$  de sustrato 30 mM (correspondiente a 14,29 mM en 420  $\mu\text{L}$  de volumen de reacción). Después de el tiempo de reacción (0- 2,5-5-10-20-30 min) a 37°C, se añadió 200  $\mu\text{L}$  de SDS 2%- DTNB 6 mM. El ensayo se realizó cómo se describe en el capítulo de Materiales y Métodos.

La **Figura 5.6A** muestra la dependencia lineal de la actividad frente al tiempo de reacción para las diferentes preparaciones de enzima diluida. En la **Figura 5.6B** se representan las absorbancias frente a las concentraciones de enzima para varios tiempos de reacción. En todas las concentraciones de enzima diluida la respuesta fue lineal con el tiempo hasta que se alcanzó la máxima absorbancia (aproximadamente 3,5). Esto se fue debido a que la reacción estaba limitada por la estequiometría del reactivo cromógeno.

Para 0 min de reacción se observó un ligero aumento de la absorbancia con la concentración de la enzima. Esto fue interpretado como una reacción entre el DTNB y los grupos tioles de las proteínas en la preparación de enzima diluida. También se observó un incremento de absorbancia con el tiempo en los controles sin tejido probablemente debido a hidrólisis espontánea del sustrato.



**Figura 5.6.(A). Linealidad del ensayo con el tiempo de reacción.** Absorbancias en función del tiempo de reacción para diferentes concentraciones de tejido. Para diferentes tiempos de reacción enzima-sustrato. Los puntos representan la media de tres replicados y su desviación estándar. **(B).** Linealidad del ensayo con la concentración de tejido. La absorbancia frente a diferentes concentraciones de preparación de enzima diluida (0, 2, 5 Y 10 mg de tejido fresco/ mL).

## RESULTADOS

### *Reproducibilidad del ensayo.*

El ensayo propuesto de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina (ver Materiales y Métodos), se utilizó para determinar las actividades de disoluciones que contenían 12,5, 25, y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de una preparación de la fracción soluble procedente de 200 mg de cerebro/mL, con una concentración de sustrato de acetiltiocolina de 14,28 mM en el volumen de reacción, para estudiar la variabilidad de los valores intra-experimentos (**Tabla 5.1**). La variabilidad fue menos de 0,8% para la concentración más alta de tejido y hasta 4% para el más bajo. El método puede aplicarse para otras concentraciones de tejido y de sustrato menor como es empleado en otros experimentos.

Para estudiar la variabilidad inter-experimentos Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes realizados en diferentes días con una preparación de enzima diluida de 25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  en el volumen de reacción y con una concentración de sustrato de 1 mM de acetiltiocolina en la reacción. La variabilidad de cada uno de estos experimentos se situó entre 1,6 y 5,0%, mientras que entre los promedios de los tres experimentos fue de 6,45%. Al considerar todos los datos de manera global ( $n = 24$ ), la variabilidad fue de 4,19% (**Tabla 5.2**).

**Tabla 5.1. Reproducibilidad intraensayo.** La tabla muestra los valores de actividad media junto con sus desviaciones estándar, en cada concentración de tejido ensayada, en un mismo experimento.

Concentración de tejido	Actividad $\pm$ DS (nmol/min) (n=8)	% DE	Actividad en la preparación (nmol/min $\cdot\mu\text{L}$ preparación)
12,5 $\mu\text{L}$ preparación/mL	3,1 $\pm$ 0,1	3,7	0,58 $\pm$ 0,02
25 $\mu\text{L}$ preparación/mL	5,4 $\pm$ 0,1	2,1	0,52 $\pm$ 0,01
50 $\mu\text{L}$ preparación/mL	12,5 $\pm$ 0,1	0,7	0,60 $\pm$ 0,01

\*DE= desviación estándar

**Tabla 5.2. Reproducibilidad interensayo.** Se muestran los valores de actividad obtenidos en 3 experimentos llevados a cabo en días diferentes, junto con sus desviaciones

	Actividad±DE (nmol/min)	% DE	Actividad en la preparación (nmol/min· µL preparación)
Experimento 1 (n =8)	7,5±0,4	5,0	0,72±0,04
Experimento 2 (n =8)	7,3±0,1	1,6	0,70±0,01
Experimento 3 (n =8)	7,0±0,2	3,6	0,67±0,02
Media de los experimentos (n=3)	7,3±0,5	6,5	0,70±0,04
Global (n=24)	7,3±0,3	4,2	0,70±0,03

\*DE= desviación estándar

#### *Comparación entre el método cinético de Ellman y el propuesto.*

Se realizó el ensayo de actividad hidrolizante de acetilcolina mediante el procedimiento descrito por Ellman (ver capítulo de Materiales y Métodos) y se comparó con las medidas obtenidas con el nuevo método propuesto utilizando butirilcolinesterasa humana.

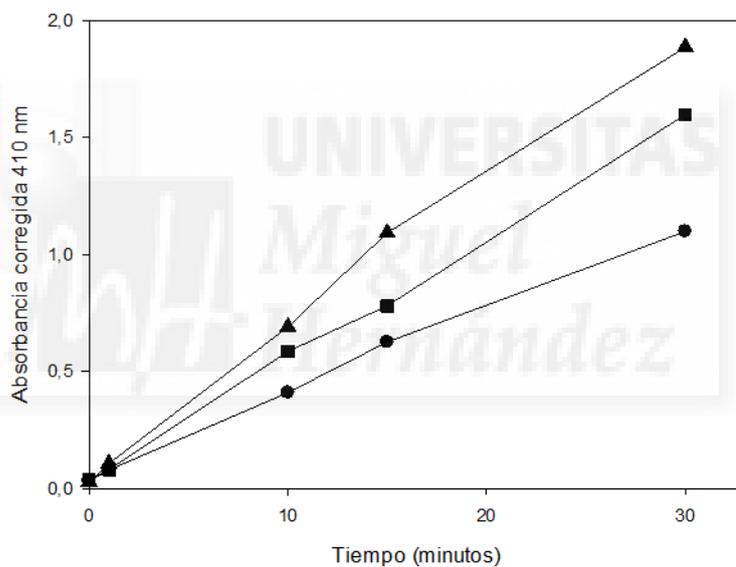
Utilizando el método de Ellman, la absorbancia frente al tiempo de reacción fue lineal. El incremento de absorbancia entre 5 y 15 minutos de reacción fue  $1,063 \pm 0,047$ . Se realizó una curva de calibrado. Los parámetros obtenidos de la regresión lineal fueron  $y_0 = 0,004$ ,  $m = 11,693$  y  $R^2 = 0,989$ , a partir de estos valores se estimó que la actividad específica fue de  $0,37 \pm 0,02$  mmol de tiocolina/nmol hButChE/min. Con el nuevo método propuesto la actividad estimada fue de  $0,66 \pm 0,03$  mmol de tiocolina/nmol hButChE/min.

La actividad obtenida con el nuevo método de fue mayor que la obtenida con el método de Ellman.

## RESULTADOS

### *Medida de la actividad hidrolizante de acetil- $\beta$ -metiltiocolina.*

Se realizó un experimento en el que se midió la actividad hidrolizante de acetil- $\beta$ -metiltiocolina, con una concentración de 11 mM en el volumen final de reacción. La actividad se midió a varios tiempos de reacción enzima-sustrato (1, 10, 15 y 30 min) y se utilizó diferentes concentraciones de tejido (10, 15 y 20 mg/mL en el volumen final de reacción). La reacción se paró con SDS 2%- DTNB 2,6 mM, se incluyeron controles de la hidrólisis química de la acetilcolina en los que también se añadió preparación de enzima diluida. Se midió la absorbancia a 410 nm. El procedimiento utilizado fue el descrito en Materiales y Métodos. Se observó (**Figura 5.7**) que la actividad aumentó de manera lineal con el tiempo y la concentración de tejido.



**Figura 5.7** Actividad hidrolizante de acetilcolina utilizando como sustrato acetil- $\beta$ -metiltiocolina. Se midió la actividad a diferentes tiempos de reacción y concentraciones de tejido. Los círculos representan 10 mg/mL, los cuadrados 15 mg/mL y los triángulos 20 mg/mL.

## 5.2. ACTIVIDAD PVasa EN FRACCIÓN SOLUBLE.

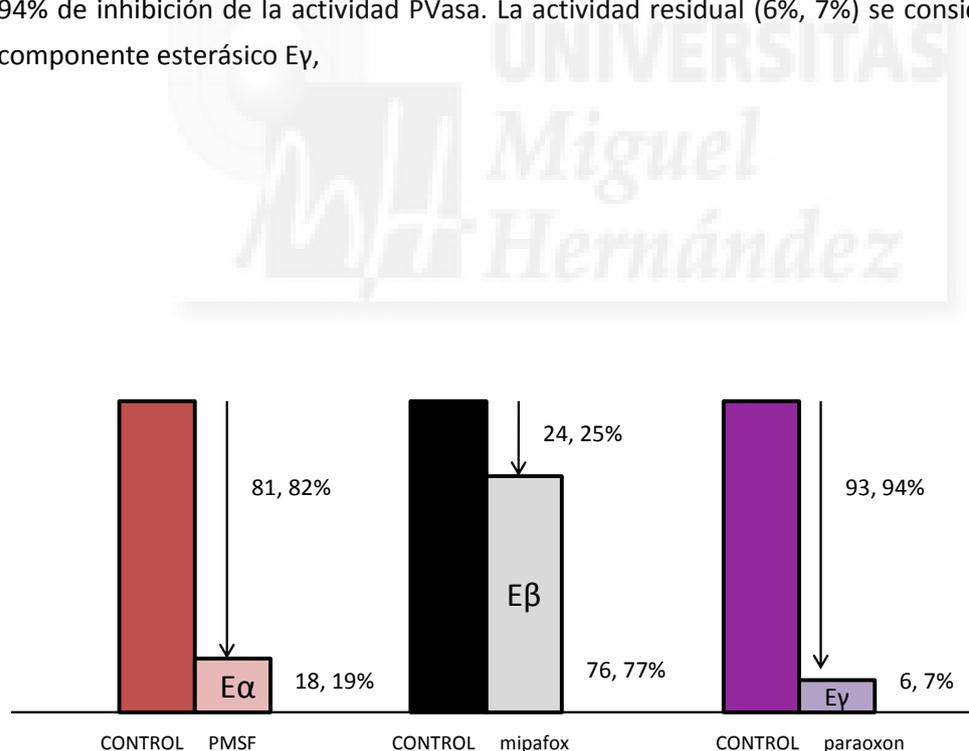
### 5.2.1. Detección de componentes de PVasa: E $\alpha$ , E $\beta$ y E $\gamma$ , en fracción soluble.

Se detectaron los componentes enzimáticos de la actividad PVasa descritos por Mangas et al. (2011, 2012), llamados E $\alpha$ , E $\beta$  y E $\gamma$ . Se considera E $\alpha$  la actividad resistente a PMSF 1500  $\mu$ M, E $\beta$  la resistente a mipafox 25  $\mu$ M y E $\gamma$  la resistente a paraoxon 25  $\mu$ M. Las concentraciones de inhibidor aplicadas en cada caso, se determinaron calculando la I<sub>99</sub> correspondiente al componente más resistente a cada inhibidor.

La incubación de la preparación soluble de cerebro con PMSF 1.500  $\mu$ M durante 30 min, en dos experimentos independientes, produjo 81%, 82% de inhibición de la actividad PVasa. La actividad resistente (18%, 19%) se consideró una estimación del componente esterásico E $\alpha$  (Figura 5.8).

Con mipafox 25  $\mu$ M durante 30 min, en dos experimentos independientes, se produjo 24% y 25% de inhibición de la actividad PVasa. La actividad residual (76%, 77%) se consideró como el componente esterásico E $\beta$ ,

Con paraoxon 25  $\mu$ M durante 30 min, en dos experimentos independientes se produjo 93% y 94% de inhibición de la actividad PVasa. La actividad residual (6%, 7%) se consideró como el componente esterásico E $\gamma$ ,



**Figura 5.8. Actividad PVasa resistente a PMSF 1500  $\mu$ M, mipafox 25  $\mu$ M y paraoxon 25  $\mu$ M.** Se muestran los valores de actividad residual PVasa obtenidos después de la incubación con los tres inhibidores. Se dan los valores de dos experimentos independientes.

### 5.2.2. Interacciones de sustratos de acetilcolinesterasa con la actividad PVasa.

#### *Observaciones preliminares.*

Se midió actividad PVasa total en presencia de acetil- $\beta$ -metil-tiocolina. Se incubaron 200  $\mu$ L de una preparación de la fracción soluble de 15 mg/mL, con una preparación de PV 5,6 mM y acetil- $\beta$ -metil-tiocolina 30 mM, durante 10 min a 37°C. Después de parar la reacción con una solución de SDS/ AAP (según se detalla en Materiales y Métodos), se transfirieron 300  $\mu$ L de la mezcla a una microplaca y se midió la absorbancia a 510 nm a fin de medir la actividad PVasa. En el ensayo se incluyó un control que contenía solo PV como sustrato (sin acetil- $\beta$ -metil-tiocolina), así como controles de hidrólisis espontánea (muestras sin tejido). Se hicieron dos experimentos independientes y en cada uno las medidas se realizaron por triplicado. Se observó un descenso de la actividad de 22% y 29% respecto del control sin acetil- $\beta$ -metil-tiocolina. En las mismas condiciones experimentales, pero utilizando acetiltiocolina, el descenso fue del 21,5% y 20,5% (Tabla 5.3).

La disminución de la actividad PVasa en presencia tanto de acetiltiocolina como de acetil- $\beta$ -metil-tiocolina, es indicativa de interacción de los sustratos de acetilcolinesterasa con uno o varios componentes de la actividad PVasa.

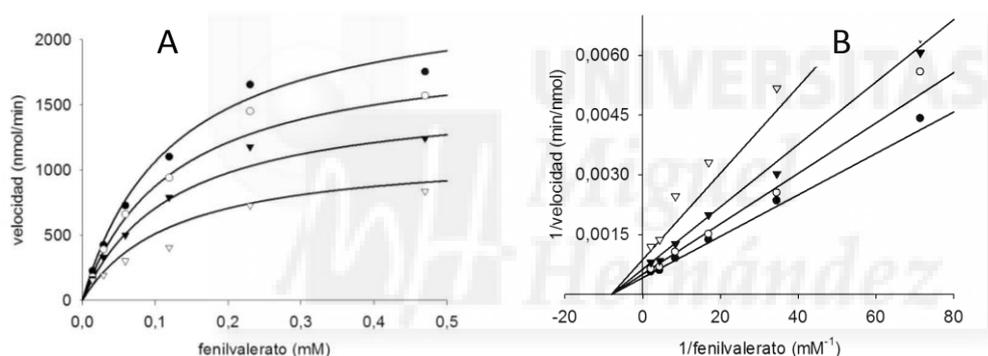
**Tabla 5.3. Actividad PVasa total incubando el sustrato fenilvalerato (5,6 mM) en presencia de acetiltiocolina (30 mM) o acetil- $\beta$ -metil-tiocolina (30 mM).** Se indica % de actividad residual o inhibición y D.E. de n replicados de cada uno de los dos experimentos.

Inhibidor	Experimento	Actividad residual (% $\pm$ DE)	Inhibición (% $\pm$ DE)
acetil- $\beta$ -metil-tiocolina	Experimento 1	78,0 $\pm$ 0,1%	22,0 $\pm$ 0,1 %
	Experimento 2	70,9 $\pm$ 0,1%	29,0 $\pm$ 0,1%
acetiltiocolina	Experimento 1	78,5 $\pm$ 0,1%	21,5 $\pm$ 0,1%
	Experimento 2	79,5 $\pm$ 0,1%	20,5 $\pm$ 0,1%

*Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a PMSF 1500  $\mu$ M (componente E $\alpha$ ).*

Se preinhibió una preparación de fracción soluble de 30 mg/mL con PMSF 1500  $\mu$ M durante 30 min, después se añadió una mezcla de fenilvalerato y acetiltiocolina y se midió la actividad PVasa (como se describe en Materiales y Métodos). Las concentraciones usadas de PV fueron: 0,01-0,03-0,06-0,12-0,24-0,48 mM y de acetiltiocolina: 0-1,42-3,33-7,14 mM

Se realizaron dos experimentos independientes, los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.9** y se procesaron con el módulo de cinética enzimática del software Sigma Plot 12.5. Se observó que la acetiltiocolina interacciona con el componente E $\alpha$  de la actividad PVasa, disminuyendo Vmax al incrementar la concentración de acetiltiocolina. La  $K_M$  no resultó alterada. El mejor modelo enzimático que se ajustó a los datos según el criterio de Akaike (ver Materiales y Métodos) fue el correspondiente al modelo de inhibición no competitiva. Los parámetros que resultaron del ajuste se muestran en la **Tabla 5.4**.



**Figura 5.9. Curva de Michaelis-Menten de la actividad PVasa resistente a PMSF 1500  $\mu$ M (E $\alpha$ ) en presencia de acetiltiocolina (A) y su representación de Lineweaver-Burk (B).** Se representan los datos experimentales de uno de los experimentos y las líneas representan el modelo que resultó del mejor ajuste según el criterio de Akaike de una inhibición no competitiva. Los círculos negros corresponden a una concentración de acetiltiocolina 0 mM, círculos blancos 1,42 mM, triángulos negros 3,33 mM y triángulos blancos 7,14 mM.

**Tabla 5.4. Parámetros cinéticos de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la Figura 5.9.** Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

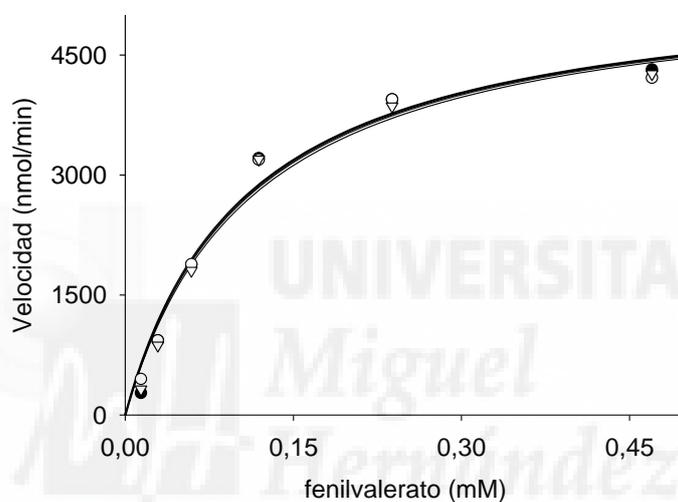
	Vmax (nmoles/min)	$K_M$ (mM)	$K_I$ (mM)	$R^2$
<b>Experimento 1</b>	2392	0,124	6,60	0,985
<b>Experimento 2</b>	3741	0,229	7,60	0,977

## RESULTADOS

*Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a mipafox 25  $\mu$ M (componente E $\beta$ ).*

Se preinhibió una preparación de fracción soluble de 30 mg/mL con mipafox 25  $\mu$ M durante 30 min, después se añadió una mezcla de fenilvalerato y acetiltiocolina y se midió la actividad PVasa. Las concentraciones usadas de PV fueron: 0,01-0,03-0,06-0,12-0,24-0,48 mM y de acetiltiocolina: 0-1,42-3,33-7,14 mM

Se realizaron dos experimentos independientes. Los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.10** y se procesaron con el módulo de cinética enzimática del software Sigma Plot 12.5. Se observó que la acetiltiocolina no altera la actividad PVasa del componente E $\beta$ . Los parámetros que resultaron del ajuste se muestran en la **Tabla 5.5**.



**Figura 5.10. Curva de Michaelis-Menten de la actividad PVasa resistente a mipafox 25  $\mu$ M (E $\beta$ ) en presencia de acetiltiocolina.** Se representan los datos experimentales obtenidos de la interacción de la acetiltiocolina con el componente esterásico E $\beta$ . Círculos negros corresponden a una concentración de acetiltiocolina 0 mM, círculos blancos 1,42 mM, triángulos negros 3,33 mM y triángulos blancos 7,14 mM.

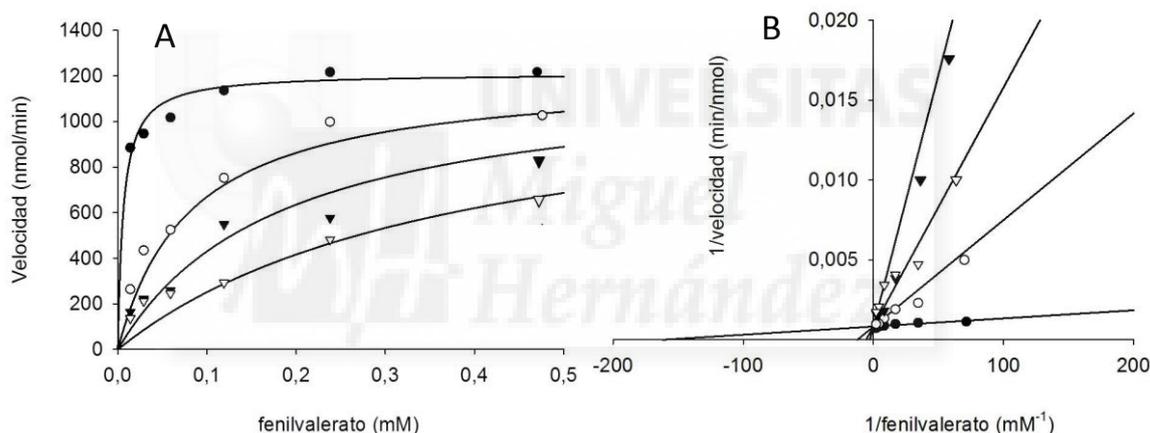
**Tabla 5.5. Parámetros cinéticos de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la Figura 5.10.** Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

	Vmax (nmoles/min)	K <sub>M</sub> (mM)	R <sup>2</sup>
Experimento 1	5465	0,107	0,995
Experimento 2	5999	0,160	0,993

*Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a paraoxon 25  $\mu$ M (componente E $\gamma$ )*

Se preinhibió una preparación de fracción soluble de 30 mg/mL con paraoxon 25  $\mu$ M durante 30 min, después se añadió una mezcla de fenilvalerato y acetiltiocolina y se midió la actividad PVasa. Las concentraciones usadas de PV fueron: 0,01-0,03-0,06-0,12-0,24-0,48 mM y de acetiltiocolina: 0-1,42-3,33-7,14 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes. Los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.11** y se procesaron con el módulo de cinética enzimática del software Sigma Plot 12.5. Se observó que la acetiltiocolina interacciona con el componente E $\gamma$  de la actividad PVasa, aumentando  $K_M$  al incrementar la concentración de acetiltiocolina. La  $V_{max}$  no resultó alterada. El mejor modelo enzimático que se ajustó a los datos según el criterio de Akaike (ver Materiales y Métodos) fue el correspondiente al modelo de inhibición competitiva. Los parámetros que resultaron del ajuste se muestran en la **Tabla 5.6**.



**Figura 5.11. Curva de Michaelis-Menten de la actividad PVasa resistente a paraoxon 25  $\mu$ M (E $\gamma$ ) en presencia de acetilcolina (A) y su representación de Lineweaver-Burk (B).** Se representan los datos experimentales de uno de los dos experimentos y las líneas representan el modelo que mejor se ajusta según el criterio Akaike de una inhibición competitiva. Los círculos negros corresponden a una concentración de acetiltiocolina 0 mM, círculos blancos 1,42 mM, triángulos negros 3,33 mM y triángulos blancos 7,14 mM.

**Tabla 5.6. Parámetros cinéticos de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la Figura 5.11.** Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

	$V_{max}$ (nmoles/min)	$K_M$ (mM)	$K_i$ (mM)	$R^2$
<b>Experimento 1</b>	1255	0,0071	0,198	0,933
<b>Experimento 2</b>	1281	0,0083	0,257	0,957

## RESULTADOS

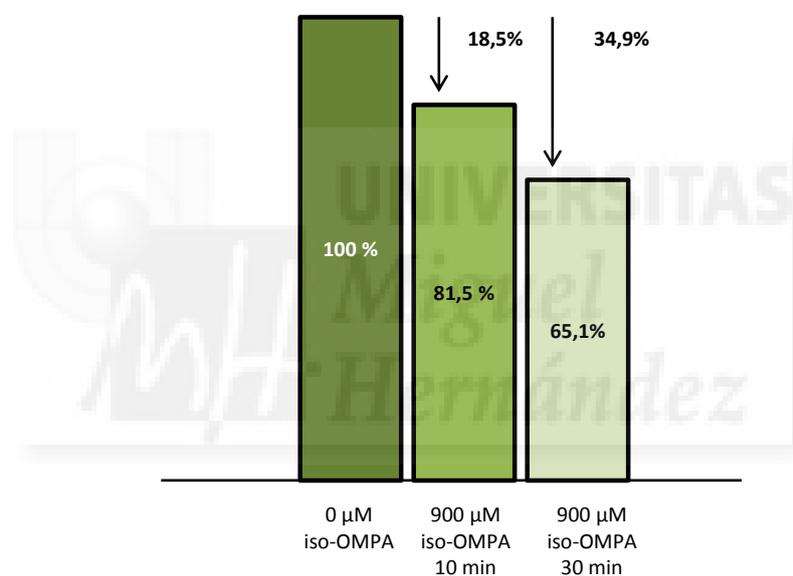
### 5.2.3. Inhibición de actividad PVasa total.

*Inhibición de la actividad PVasa total con iso-OMPA.*

Inhibición a dos tiempos.

Se estudió en un experimento la inhibición de la actividad PVasa soluble de cerebro a una concentración equivalente a 15 mg/mL de tejido fresco y se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con iso-OMPA 900  $\mu$ M. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa, las medidas se realizaron por triplicado. La inhibición a 10 min fue  $18,5\pm 0,1\%$  y a 30 min  $34,9\pm 0,1\%$  (**Figura 5.12**).

La observación de diferente inhibición a los dos tiempos de incubación ensayados sugiere una inhibición dependiente del tiempo y por lo tanto de tipo irreversible.

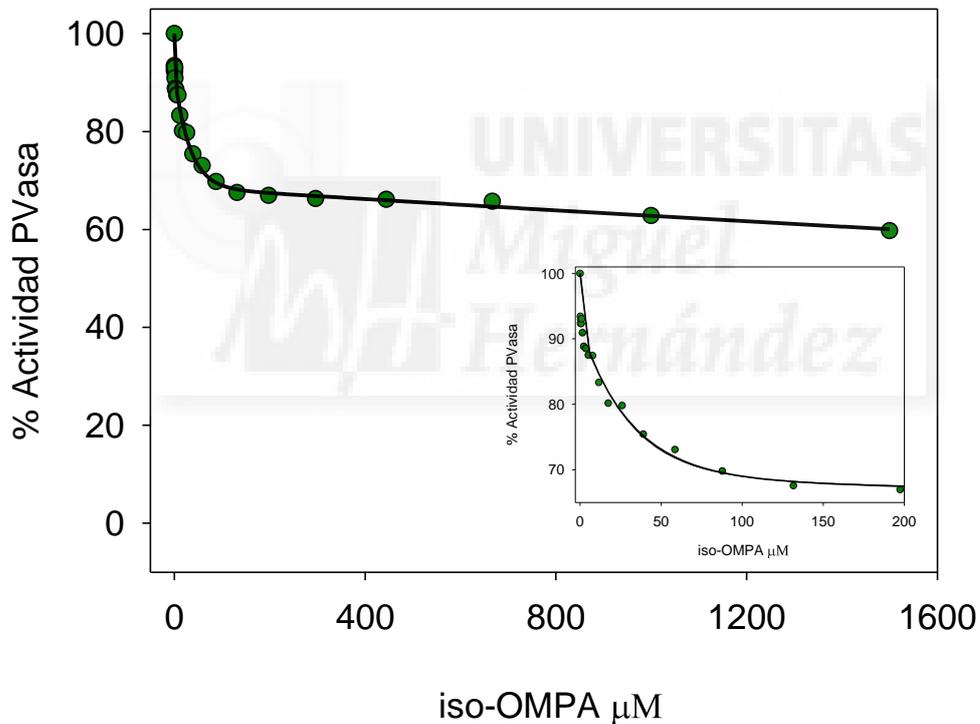


**Figura 5.12.** Inhibición de actividad PVasa total por iso-OMPA 900  $\mu$ M durante 10 o 30 min de preincubación.

Inhibición a tiempo fijo.

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de iso-OMPA, comprendidas entre 0 y 1500  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. En la **Figura 5.13** se muestran los datos obtenidos de uno de los experimentos (experimento 2) así como el modelo irreversible que mejor se ajustó según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de tres componentes enzimáticos que se inhiben. La **Tabla 5.7** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste a la ecuación **Ec. 5.1**.

$$E = E_{1*} e^{-k_1 \cdot I} + E_{2*} e^{-k_2 \cdot I} + E_{3*} e^{-k_3 \cdot I} \quad [\text{Ec.5.1.}]$$



**Figura 5.13. Inhibición con iso-OMPA a tiempo fijo de la actividad PVasa soluble de cerebro.** Se usó la fracción soluble correspondiente a 15 mg/mL de tejido fresco con concentraciones de iso-OMPA comprendidas entre 0 y 1500  $\mu\text{M}$  durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad PVasa están referidos a la actividad PVasa del control sin iso-OMPA. Se muestra la curva correspondiente al experimento 2 de la Tabla 8, ajustada a la **Ec. 5.1**.

## RESULTADOS

**Tabla 5.7. Parámetros y componentes de la curva de inhibición a tiempo fijo con iso-OMPA de la actividad PVasa de fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial de tres componentes según el test de la F de, de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Componente	Experimento	Amplitud (%)	k' ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	k(*) ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	I <sub>50</sub> (**) ( $\mu\text{M}$ )
E <sub>1</sub>	1	10,5	2,627	0,0876	0,26
	2	8,3	6,389	0,213	0,11
E <sub>2</sub>	1	20,3	0,0189	0,000630	36,70
	2	23,1	0,0314	0,00105	22,10
E <sub>3</sub>	1	69,9	0,0000966	0,00000322	***
	2	68,6	0,0000887	0,00000296	***

(\*)siendo K, la constante de segundo orden.  $k=k'/30$

(\*\*)I<sub>50</sub>=-Ln(0,5)/k'

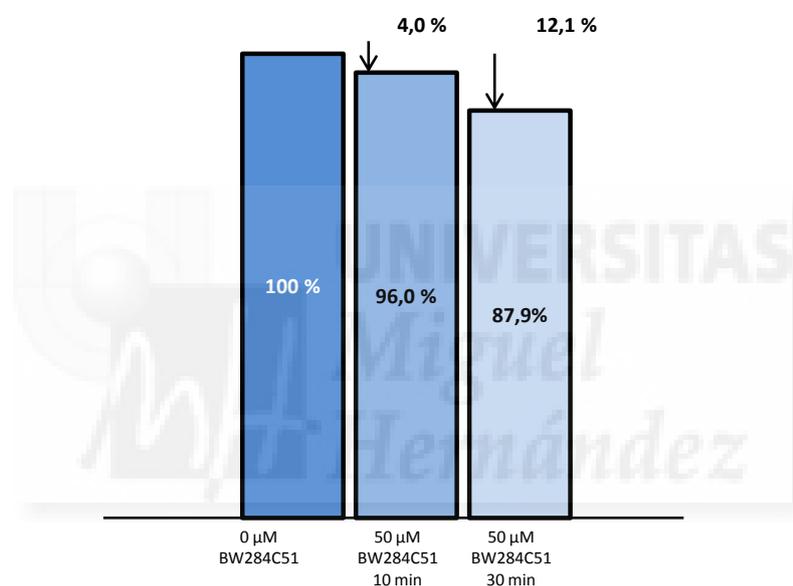
(\*\*\*)I<sub>50</sub> mucho mayor que la máxima concentración ensayada por lo que consideramos el componente resistente.



*Inhibición de la actividad PVasa total con BW284C51.*

## Inhibición a dos tiempos

Se estudió en un experimento la inhibición de la actividad PVasa soluble de cerebro utilizando una concentración equivalente a 15 mg/mL de tejido fresco que se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con una concentración de BW284C51 50  $\mu$ M. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. La inhibición se calculó respecto de un control que no llevaba inhibidor. Las medidas se realizaron por triplicado. La inhibición fue del 4,0 $\pm$ 0,1% a los 10 min y 12,1 $\pm$ 0,1% a los 30 minutos (**Figura 5.14**). La inhibición fue mayor a 30 minutos. La observación de diferente inhibición a los dos tiempos de incubación ensayados sugiere una inhibición de tipo irreversible.



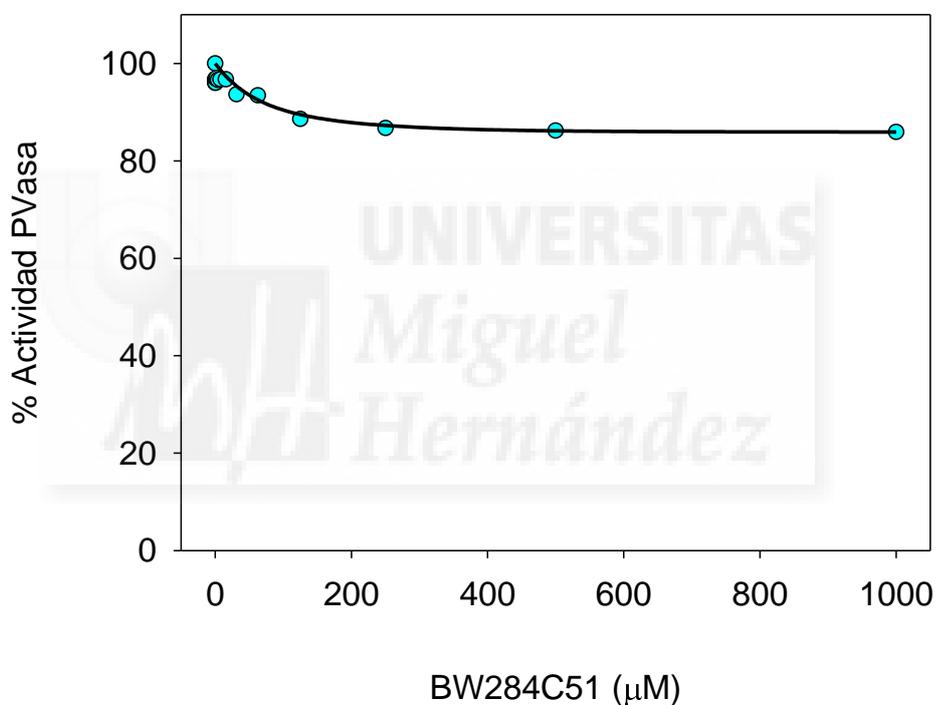
**Figura 5.14.** Inhibición de actividad PVasa total por BW284C51 50  $\mu$ M, durante 10 o 30 min de preincubación con la fracción soluble de cerebro.

## RESULTADOS

### Inhibición a tiempo fijo.

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de BW284C51, entre 0 y 1000  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. En la **Figura 5.15** se muestran los datos obtenidos así como el modelo irreversible que mejor se ajustó según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de un componente que se inhibe ( $E_1$ ) otro resistente ( $E_R$ ). La **Tabla 5.8** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste a la ecuación (**Ec. 5.2.**)

$$E = E_1 * e^{-k'_1 \cdot I} + E_R \quad [\text{Ec. 5.2.}]$$



**Figura 5.15. Inhibición con BW284C51 a tiempo fijo de la actividad PVasa soluble de cerebro.** Se usó la fracción soluble correspondiente a 15 mg/mL de tejido fresco con concentraciones de BW284C51 comprendidas entre 0 y 1000  $\mu\text{M}$  durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad PVasa están referidos a la actividad PVasa del control sin BW284C51. Se muestra la curva correspondiente al experimento 2 de la **Tabla 5.8.** ajustada a la **Ec. 5.2.**

**Tabla 5.8. Parámetros y componentes de la curva de inhibición a tiempo fijo con BW284C51 de la actividad PVasa de fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial de dos componentes según el test de la F de, a partir de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Exp.	E <sub>1</sub> (%)	k' ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	k ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )*	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )**	E <sub>R</sub> (%)
1	14,1	0,0100	0,000333	69,31	85,9
2	13,6	0,0158	0,000526	43,90	86,4

(\*)Siendo K, la constante de segundo orden.  $k=k'/30$

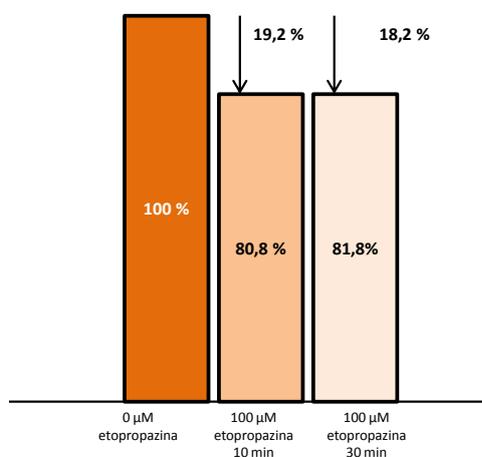
(\*\*)  $I_{50} = -\text{Ln}(0,5)/k'$

#### *Inhibición de la actividad PVasa total con etopropazina.*

##### Inhibición a dos tiempos

Se estudió la inhibición de la actividad PVasa soluble de cerebro utilizando una concentración equivalente a 15 mg/mL de tejido fresco y se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con una concentración de etopropazina 100  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. La inhibición se calculó respecto de un control que no llevaba inhibidor. Las medidas se realizaron por triplicado.

La inhibición con etopropazina durante 30 min fue similar respecto a la observada a 10 min (**Figura 5.16**). Las inhibiciones fueron del  $19,2 \pm 0,1\%$  para el tiempo de inhibición de 10 min y del  $18,2 \pm 0,5\%$  para 30 min. La observación de que no hay diferencias en la inhibición a los dos tiempos ensayados sugiere una inhibición no progresiva con el tiempo y por tanto probablemente de tipo reversible.



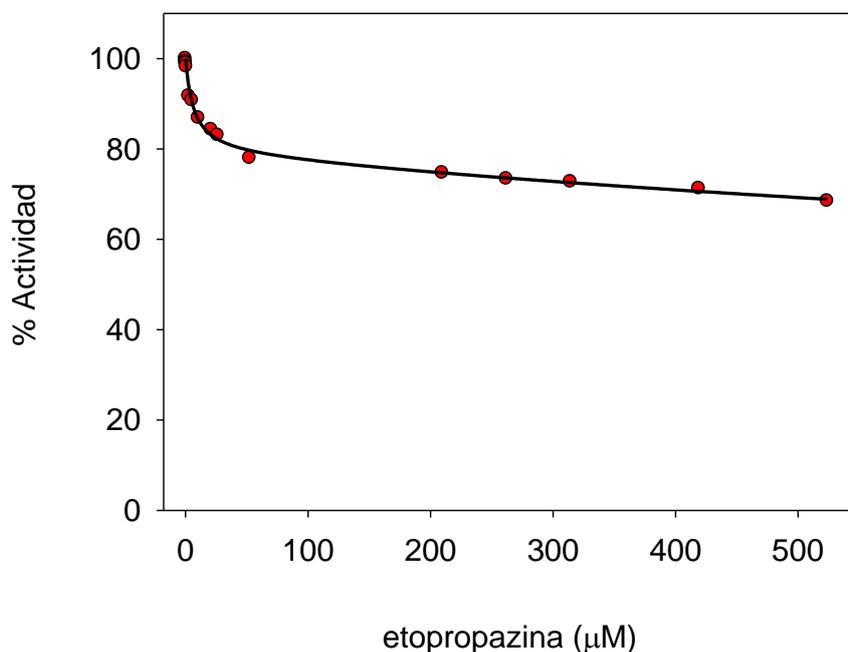
**Figura 5.16. Inhibición de actividad PVasa total por etopropazina 50 µM, durante 10 o 30 min de preincubación.**

Inhibición a tiempo fijo.

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de etopropazina, entre 0 y 524 µM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. En la **Figura 5.17** se muestran los datos obtenidos aplicando un modelo en el que se considera la inhibición reversible. El modelo que mejor se ajustó a los datos, según el test de la F fue el de dos componentes que se inhiben. La **Tabla 5.9** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste a la ecuación **Ec. 5.3**.

$$E = E_1/(1 + A * x) + E_2/(1 + B * x) \quad \text{[Ec. 5.3.]}$$

Otra interpretación de estos resultados se plantea en la discusión teniendo en cuenta los datos obtenidos en el siguiente apartado.



**Figura 5.17.** Inhibición con etopropazina a tiempo fijo de la actividad PVasa soluble de cerebro. Se usó la fracción soluble correspondiente a 15 mg/mL de tejido fresco con concentraciones de etopropazina comprendidas entre 0 y 524  $\mu\text{M}$  durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad PVasa están referidos a la actividad PVasa del control sin etopropazina. Se muestra el ejemplo del experimento 2 de la **Tabla 5.9**, tras el ajuste a la **Ec. 5.3**.

**Tabla 5.9.** Parámetros y componentes de la curva de inhibición a tiempo fijo con etopropazina de actividad PVasa de fracción soluble de cerebro. Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo mixto de dos componentes según el test de la F, a partir de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Exp.	$E_1$ (%)	$A$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_2$ (%)	$B$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
1	21,7	0,152	6,56	78,3	0,000074	*
2	21,6	0,155	6,42	78,4	0,000077	*

(\*) $I_{50}$  mucho mayor que la máxima concentración ensayada por lo que consideramos el componente resistente.

## RESULTADOS

### 5.2.4. Inhibición de los componentes de PVasa E $\alpha$ y E $\gamma$ .

Se estudió la dependencia del tiempo de la inhibición de los dos componentes enzimáticos de PVasa (E $\alpha$  y E $\gamma$ ) que habían mostrado una interacción con la acetiltiocolina, con los inhibidores iso-OMPA, BW284C51 y etopropazina.

*Interacción con actividad PVasa resistente a PMSF 1500  $\mu$ M (E $\alpha$ ) en fracción soluble de cerebro.*

Se estudió la interacción de estos inhibidores con la actividad PVasa resistente a PMSF 1500  $\mu$ M, a diferentes tiempos de incubación. Se realizaron experimentos con iso-OMPA 1, 10 o 100  $\mu$ M, a 15 o 30 min de incubación, y con BW284C51 50  $\mu$ M y etopropazina a 100  $\mu$ M durante 10 o 30 min de incubación a 37°C.

Se preincubaron 180  $\mu$ L de la fracción soluble de cerebro de pollo a una concentración de 30 mg/mL, con 20  $\mu$ L PMSF 1500  $\mu$ M, durante 30 min a 36°C, a continuación se añadió 20  $\mu$ L de iso-OMPA, BW284C51 o etopropazina (a las concentraciones indicadas en el volumen de 220  $\mu$ L) y se preincubó la mezcla durante el tiempo indicado para cada inhibidor; después se añadió el sustrato PV y se ensayó cómo se detalla en Materiales y Métodos.

Se midió la actividad PVasa y se calculó el porcentaje de actividad residual respecto del control preincubado solo con PMSF.

La actividad residual a los 15 min con iso-OMPA 100  $\mu$ M fue de 62,6 $\pm$ 4,0% y a los 30 min de 36,6 $\pm$ 2,3% (**Figura 5.18**). La inhibición es progresiva con el tiempo y por lo tanto de tipo irreversible o covalente.

No se detectó inhibición con 50  $\mu$ M BW284C51 (**Figura 5.19**).

A los 10 min con etopropazina 100  $\mu$ M la actividad fue de 53,1 $\pm$ 2,1% y la misma a los 30 min (**Figura 5.19**). La observación de que no hay diferencias en la inhibición a los dos tiempos ensayados sugiere una inhibición no progresiva con el tiempo y por tanto probablemente de tipo reversible.

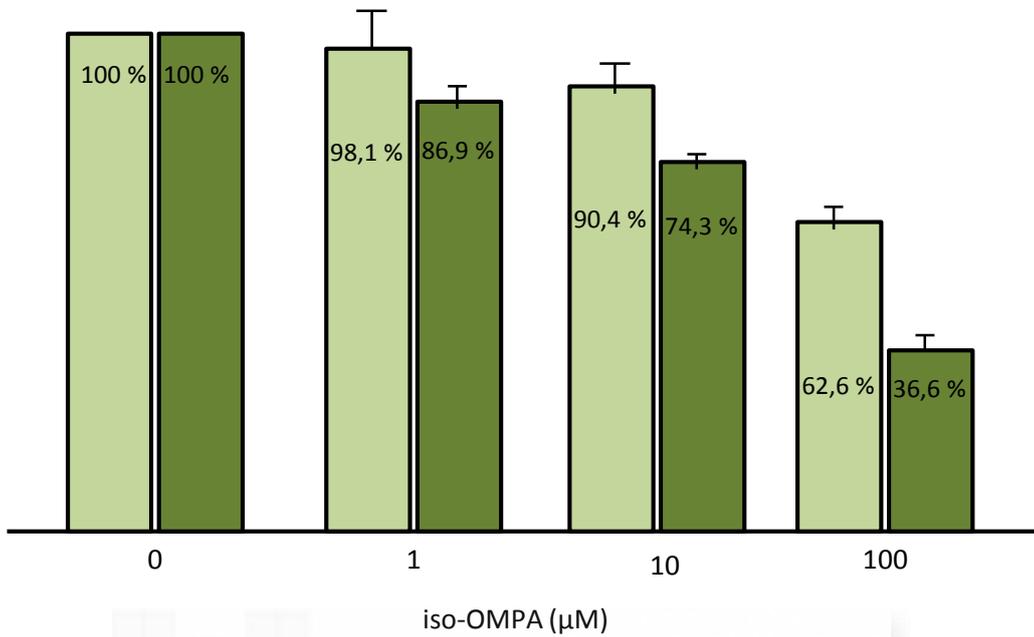


Figura 5.18. Actividad PVasa resistente a PMSF 1500 μM (componente Eα) inhibida con iso-OMPA 1, 10 o 100 μM, durante 15 min (barras verde claro) o 30 min (barras verde oscuro).

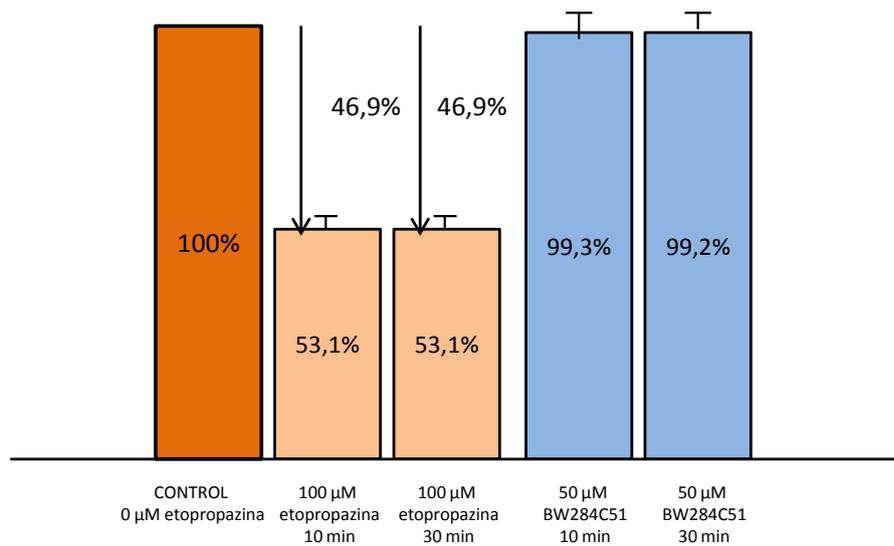


Figura 5.19. Actividad PVasa resistente a PMSF 1500 μM (componente Eα) inhibida con etopropazina 100 μM (barras naranjas), o con BW284C51 50 μM (barras azules), 10 o 30 min.

## RESULTADOS

*Interacción con actividad PVasa resistente a paraoxon 25  $\mu\text{M}$  (Ey) en fracción soluble de cerebro.*

Se estudió la inhibición de la actividad PVasa resistente a paraoxon 25  $\mu\text{M}$  con iso-OMPA o BW284C51 o etopropazina, a 10 o 30 min de incubación. Para ello se preincubó la fracción soluble de cerebro de pollo a una concentración de 30 mg/mL durante 30 minutos a 37°C con 20  $\mu\text{L}$  de paraoxon 25  $\mu\text{M}$  en 200  $\mu\text{L}$ . Transcurrido el tiempo de preinhibición, se incubaron 10 o 30 minutos con iso-Ompa o BW284C51 o etopropazina. La actividad PVasa residual se midió cómo se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos.

La actividad residual a los 10 min de inhibición con iso-OMPA 0,4  $\mu\text{M}$  fue 98,0 $\pm$ 0,1% y a los 30 min de 95,4 $\pm$ 0,3% (**Figura 5.20**), la inhibición con iso-OMPA 1, 5 o 25  $\mu\text{M}$  mostró que la actividad residual fue menor a los 30 min de incubación con iso-OMPA 5 o 25  $\mu\text{M}$  excepto en el caso de la inhibición con iso-OMPA 1  $\mu\text{M}$  que dio como resultado una inhibición de 32,5 $\pm$ 0,3% a los 10 min y 26,7 $\pm$ 0,1% a los 30 min.

Los resultados de la inhibición a 10 o 30 minutos con iso-OMPA 0,4, 5 y 25  $\mu\text{M}$  sugieren una inhibición dependiente del tiempo y por lo tanto de tipo irreversible, la incubación con iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$  implica que hemos llegado al máximo porcentaje de inhibición. Sin embargo los resultados de la incubación con iso-OMPA 1  $\mu\text{M}$  hacen posible explicaciones que incluyen la existencia de fenómenos de resistencia y que se desarrollan en el apartado correspondiente del capítulo de la Discusión. La actividad residual a los 10 min de inhibición con iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$  fue de 60,2 $\pm$ 0,3% y a los 30 min de 60,9 $\pm$ 0,1% , con esta concentración hemos alcanzado la máxima inhibición.

Y con BW284C51 50  $\mu\text{M}$ , a los 10 min fue de 86,8 $\pm$ 0,1% y a los 30 min de 77,7 $\pm$ 0,1% (**Figura 5.21**), la inhibición aumentó de 13,2 a 22,3% con el tiempo.

La actividad residual con etopropazina 100  $\mu\text{M}$  a los 10 min de inhibición fue de 78,4 $\pm$ 0,1% y a los 30 min de 68,3 $\pm$ 0,6% (**Figura 5.22**) que implica un incremento de inhibición de 21 a 32% con el tiempo.

Las inhibiciones por etopropazina y BW284C51, sí dependen del tiempo, lo que sugiere que son de tipo irreversible.

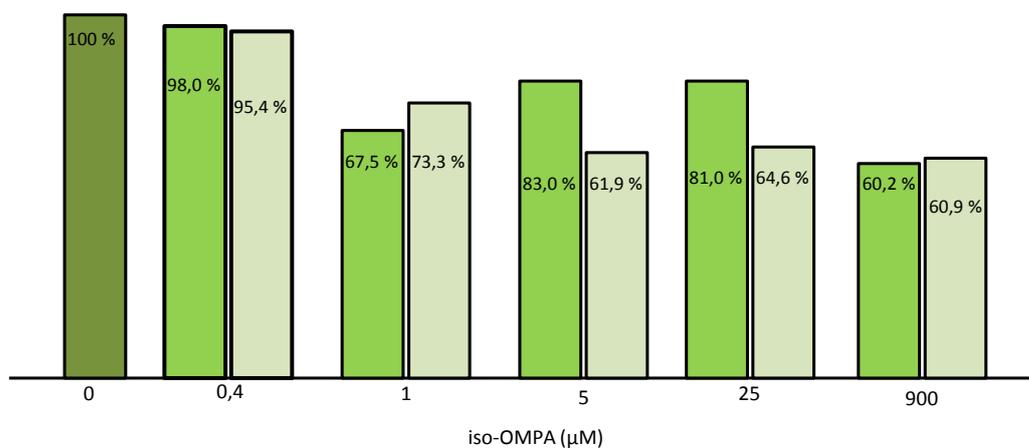


Figura 5.20. Actividad PVasa resistente a paraoxon 25 µM (componente Eγ) inhibida con iso-OMPA 0,4, 1, 5, 25 o 900 µM 10 o 30 min de inhibición.

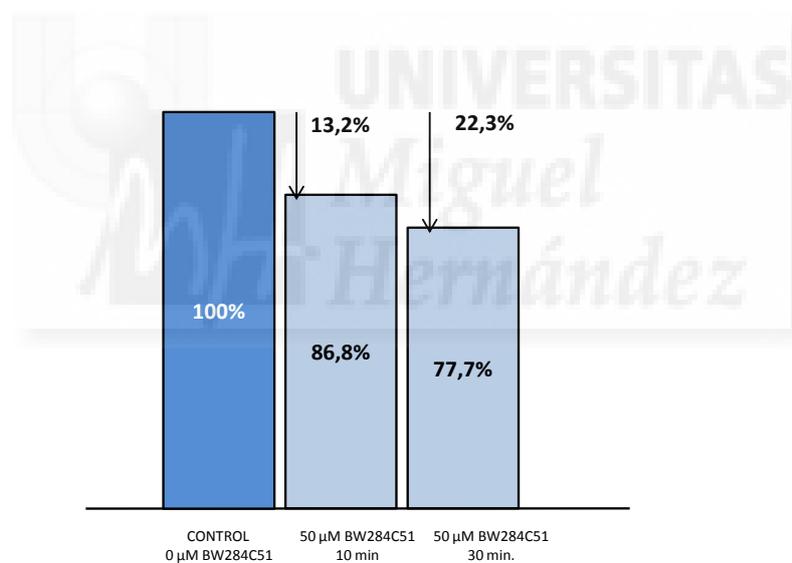
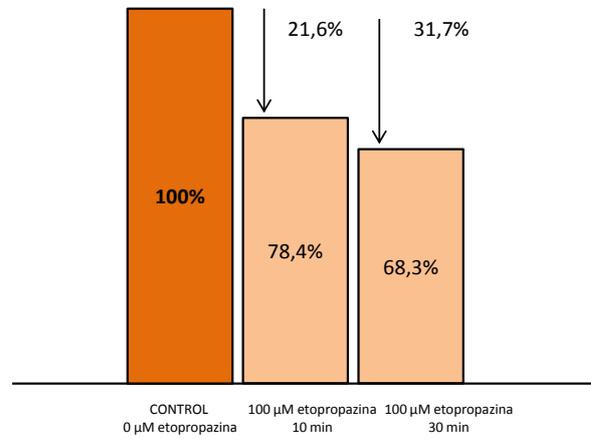


Figura 5.21. Actividad PVasa resistente a paraoxon 25 µM (componente Eγ) inhibida con BW284C51 50 µM, 10 o 30 min



**Figura 5.22. Actividad P-asa resistente a paraoxon 25 μM (componente E<sub>γ</sub>) inhibida con etopropazina 100 μM, 10 o 30 min.**



### 5.3. ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA EN FRACCIÓN SOLUBLE.

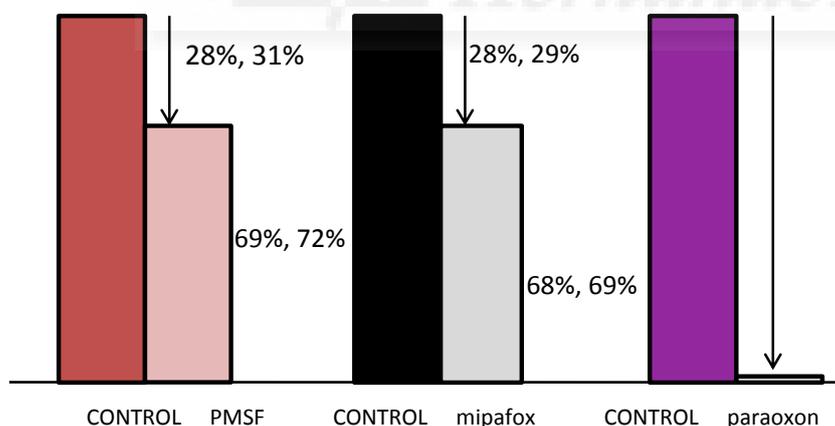
#### 5.3.1. Detección de actividad aplicando las condiciones experimentales de E $\alpha$ , E $\beta$ y E $\gamma$ .

Las concentraciones de PMSF, mipafox y paraoxon utilizadas para discriminar los componentes enzimáticos de actividad PVasa, se aplicaron para estudiar la actividad hidrolizante de acetiltiocolina, con el objetivo de establecer la actividad colinesterasa en las condiciones en las que se miden los componentes E $\alpha$ , E $\beta$  y E $\gamma$  (Mangas et al 2011, 2012).

La incubación de la preparación soluble de cerebro con PMSF 1.500  $\mu$ M durante 30 min condición en la que se determina E $\alpha$ , en dos experimentos independientes, produjo una actividad residual del 69%, 72% (Figura 5.23).

En las condiciones en las que se discrimina E $\beta$ , la incubación de la preparación soluble de cerebro con mipafox 25  $\mu$ M durante 30 min, en dos experimentos independientes, produjo una actividad residual de 68%, 69%.

Con paraoxon 25  $\mu$ M durante 30 minutos, en dos experimentos independientes, no se detectó actividad significativa, lo que es coherente con la sensibilidad conocida de la AChE al paraoxon con I50 (30 min) a niveles de concentración de nanomolar (10-28 nM) (Lotti y Johnson, 1978; Kemp y Wallace, 1990). Por lo tanto en las condiciones en las que se determina PVasa- E $\gamma$ , no se detectó actividad hidrolizante de acetiltiocolina (Figura 5.23).



**Figura 5.23. Actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1500  $\mu$ M, mipafox 25  $\mu$ M y paraoxon 25  $\mu$ M.** Se muestran los valores de actividad residual obtenidos después de la incubación con los tres inhibidores. Se dan los valores de dos experimentos independientes.

## RESULTADOS

### 5.3.2. Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina.

#### *Observaciones preliminares de inhibición con PV.*

Se midió actividad hidrolizante de acetiltiocolina total o acetil- $\beta$ -metil-tiocolina en presencia de PV. Para ello se incubó una preparación de la fracción soluble (15 mg/mL en el volumen final) con una preparación de PV 5,6 mM y acetil- $\beta$ -metil-tiocolina 30 mM, durante 10 min a 37°C. Después de parar la reacción con una solución de SDS/ DTNB (según se detalla en Materiales y Métodos), se transfirieron 300  $\mu$ L de la mezcla a una microplaca y se midió la absorbancia a 410 nm. En el ensayo se incluyó un control que contenía solo acetil- $\beta$ -metil-tiocolina como sustrato (sin PV), así como controles de hidrólisis espontánea (muestras sin tejido). Se realizaron dos experimentos independientes y en cada uno se hicieron medidas por triplicado. Se observó un descenso de la actividad de 1,1%, 2,8% respecto del control sin PV (**Tabla 5.10**).

También se realizó un experimento utilizando acetiltiocolina 30 mM como sustrato, donde la disminución fue del 10,7%, 14,2%.

Esta observación sugiere que al menos parte de la actividad colinesterasa puede ser interferida por PV y que la inhibición causada por el PV fue mayor cuando se utilizó acetiltiocolina como sustrato.

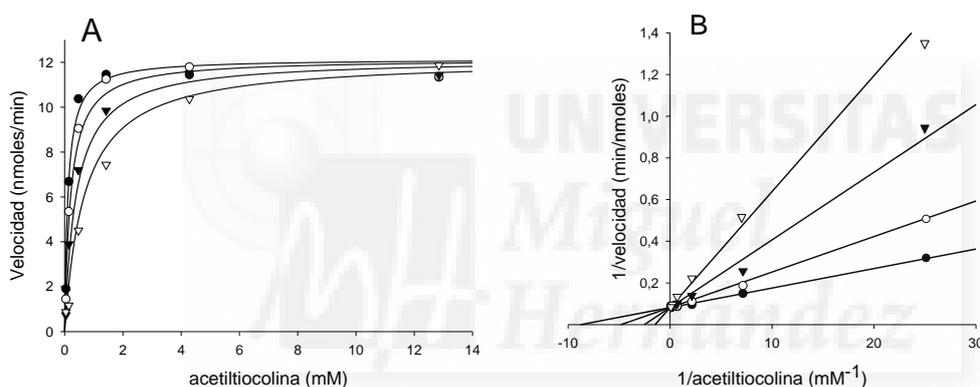
**Tabla 5.10. Actividad hidrolizante de acetiltiocolina total incubando el sustrato acetil- $\beta$ -metil-tiocolina o acetiltiocolina en presencia de PV como inhibidor.**

Experimento	Sustrato	Actividad residual (% $\pm$ DE)	Inhibición (% $\pm$ DE)
Experimento 1	acetil- $\beta$ -metil-tiocolina	97,2 $\pm$ 0,1%	2,8 $\pm$ 0,1%
Experimento 2	30mM	98,9 $\pm$ 0,1%	1,1 $\pm$ 0,1%
Experimento 1	Acetiltiocolina 30 mM	89,3 $\pm$ 0,1%	10,7 $\pm$ 0,1%
Experimento 2		85,8 $\pm$ 0,1%	14,2 $\pm$ 0,1%

*Interacción de PV con la actividad resistente a PMSF 1500  $\mu\text{M}$ .*

Se preinhibió una preparación de la fracción soluble (10 mg/mL en el volumen final de reacción) con PMSF 1500  $\mu\text{M}$  durante 30 min, después se añadió una mezcla de acetiltiocolina y PV (en agua mili Q) y el ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, finalmente se midió la absorbancia. Las concentraciones usadas de acetiltiocolina fueron 0,04-0,1-0,5-1,4-4,3-12,8 mM y las de PV 0-1,4-4,3- 8,6 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes. Los datos se procesaron, con el módulo de cinética enzimática del software Sigma Plot 12.5. Se observó que el PV interacciona con la actividad residual hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1500  $\mu\text{M}$ , aumentando la  $K_M$  al incrementar la concentración de PV. La  $V_{\text{max}}$  no resultó alterada. El mejor modelo enzimático que se ajustó a los datos según el criterio de Akaike (ver Materiales y Métodos) fue el correspondiente al modelo de inhibición competitiva (**Figura 5.24**). Los parámetros que resultaron del ajuste se muestran en la **Tabla 5.11**.



**Figura 5.24. Curva de Michaelis-Menten de la actividad AChE resistente a PMSF 1500  $\mu\text{M}$  en presencia de PV (A) y su representación de Lineweaver-Burk (B).** Se representan los datos experimentales de uno de los experimentos y las líneas representan el modelo que resultó del mejor ajuste según el criterio de Akaike de una inhibición competitiva. Los círculos negros corresponden a una concentración de fenilvalerato 0 mM, círculos blancos 1,4 mM, triángulos negros 4,3 mM y triángulos blancos 8,6 mM

**Tabla 5.11. Parámetros cinéticos de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina en experimento de inhibición con PV correspondiente a la Figura 5.24.** Se muestran los valores de dos experimentos independientes a una inhibición competitiva.

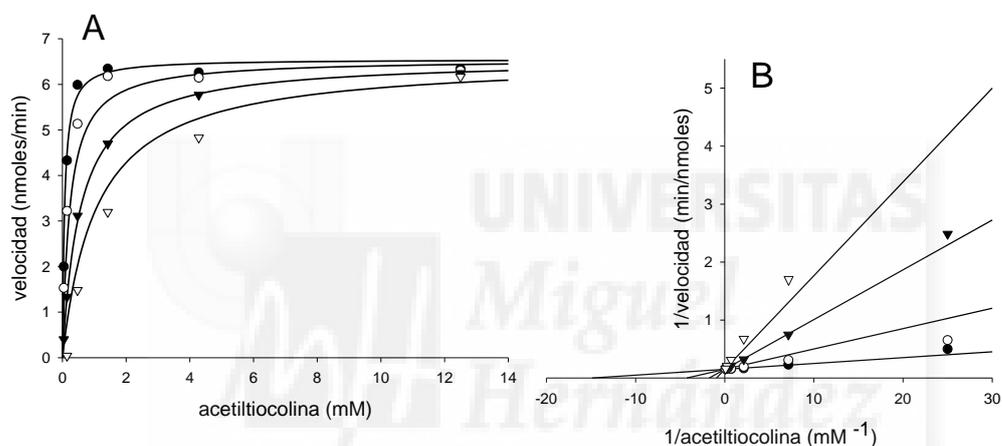
	$V_{\text{max}}$ (nmoles/min)	$K_M$ (mM)	$K_i$ (mM)	$R^2$
<b>Experimento 1</b>	12,2	0,090	1,70	0,997
<b>Experimento 2</b>	12,2	0,111	2,23	0,989

## RESULTADOS

### *Interacción de PV con la actividad resistente a mipafox 25 $\mu$ M.*

Se preinhibió una preparación de la fracción soluble (10 mg/mL) con mipafox 25  $\mu$ M durante 30 min. Después se añadió una mezcla de acetiltiocolina y PV y el ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, finalmente se midió la absorbancia. Las concentraciones usadas de acetiltiocolina fueron 0,04-0,1-0,5-1,4-4,3-12,8 mM y las de PV 0-1,4-4,3- 8,6 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes. Los datos se procesaron con el módulo de cinética enzimática del software Sigma Plot 12.5. Se observó que el PV interacciona aumentando la  $K_M$  al incrementar la concentración de PV. La  $V_{max}$  no cambió. El mejor modelo enzimático que se ajustó a los datos según el criterio de Akaike (ver Materiales y Métodos) fue el correspondiente al modelo de inhibición competitiva (**Figura 5.25**). Los parámetros que resultaron del ajuste se muestran en la Tabla **5.12**.



**Figura 5.25. Curva de Michaelis-Menten de la actividad AChE resistente a mipafox 25  $\mu$ M en presencia de PV (A) y su representación de Lineweaver-Burk (B).** Se representan los datos experimentales de uno de los experimentos y las líneas representan el modelo que resultó del mejor ajuste según el criterio de Akaike de una inhibición competitiva. Los círculos negros corresponden a una concentración de fenilvalerato 0 mM, círculos blancos 1,4 mM, triángulos negros 4,3 mM y triángulos blancos 8,6 mM

**Tabla 5.12. Parámetros cinéticos e índices estadísticos obtenidos.** Se muestran los valores de dos experimentos independientes, aplicando el modelo de inhibición competitiva.

	$V_{max}$ (nmoles/min)	$K_M$ (mM)	$K_i$ (mM)	$R^2$
<b>Experimento 1</b>	6,6	0,050	0,440	0,979
<b>Experimento 2</b>	6,9	0,065	0,570	0,969

*Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a paraoxon 25  $\mu$ M.*

El componente E<sub>y</sub> de actividad PVasa descrito por Mangas et al (2011, 2012) se discrimina mediante la inhibición de la actividad enzimática con paraoxon 25  $\mu$ M. En estas condiciones se observó que no hay una actividad hidrolizante de acetiltiocolina significativa.

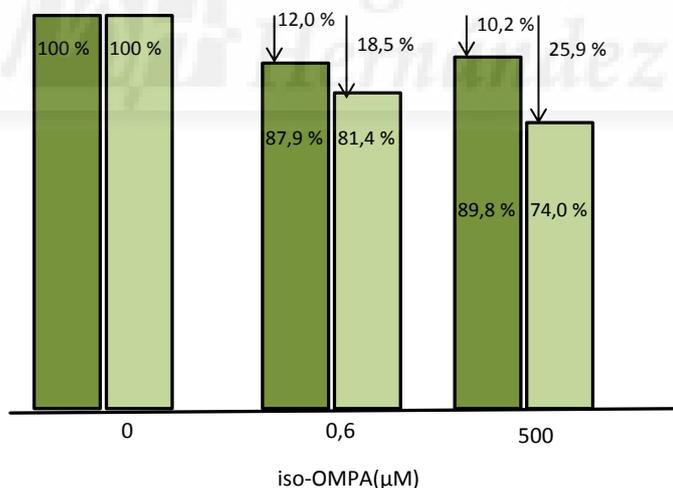
### 5.3.3. Inhibición de actividad hidrolizante de acetiltiocolina con iso-OMPA, BW284C51 y etopropazina.

*Inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total con iso-OMPA.*

Inhibición a dos tiempos.

Se estudió en un experimento la inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina soluble de cerebro a una concentración equivalente a 10 mg/mL de tejido fresco y se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con iso-OMPA 0,6 ó 500  $\mu$ M. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. Las medidas se realizaron por triplicado. La inhibición con iso-OMPA 0,6  $\mu$ M a 10 min fue 12 $\pm$ 0,1% y a 30 min 18,5 $\pm$ 0,1%. La inhibición con iso-OMPA 500  $\mu$ M a 10 min fue 10,2 $\pm$ 0,1% y a 30 min 25,9 $\pm$ 0,1% (**Figura 5.26**).

La observación de diferente inhibición a los dos tiempos de incubación ensayados sugiere una inhibición dependiente del tiempo y por lo tanto de tipo irreversible.



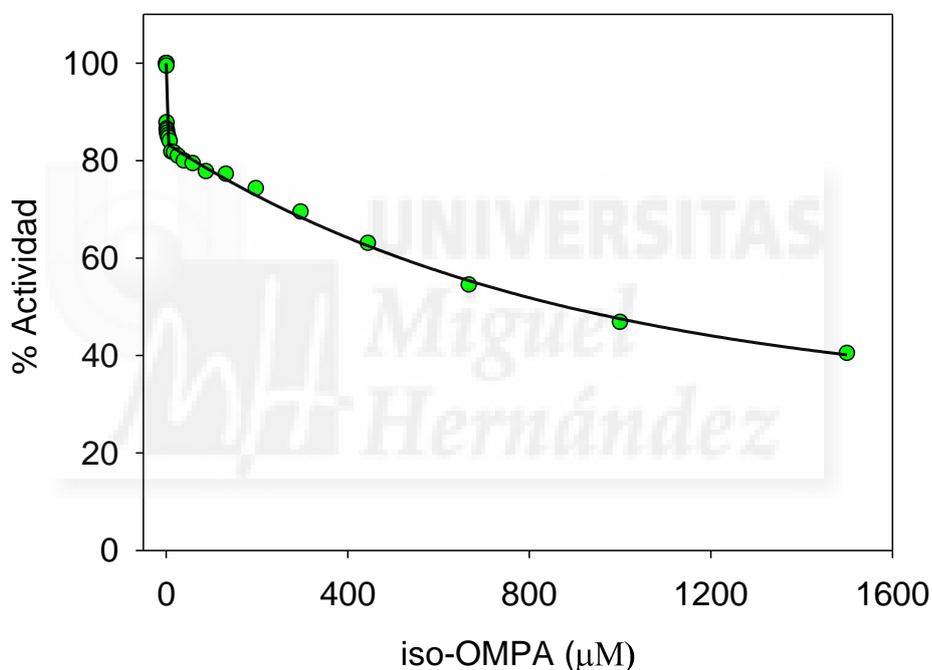
**Figura 5.26.** Inhibición de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total por iso-OMPA 0,6 ó 500  $\mu$ M, durante 10 min (verde oscuro) o 30 min (verde claro) de preincubación.

## RESULTADOS

### Inhibición a tiempo fijo.

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de iso-OMPA, comprendidas entre 0 y 1500 µM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad hidrolizante de acetiltiocolina. En la **Figura 5.27** se muestran los datos obtenidos de uno de los experimentos (experimento 1) así como el modelo irreversible que mejor se ajustó a los datos según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de dos componentes enzimáticos que se inhiben y uno resistente. En la **Tabla 5.13** se muestran los parámetros obtenidos tras el ajuste a la ecuación **Ec. 5.4**.

$$E = E_1 \cdot e^{(-k'_1 \cdot I)} + E_2 \cdot e^{(-k'_2 \cdot I)} + E_R \quad [\text{Ec. 5.4.}]$$



**Figura 5.27. Inhibición con iso-OMPA a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.** Se usó la fracción soluble correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de iso-OMPA comprendidas entre 0 y 1500 µM durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetiltiocolina del control sin iso-OMPA. Se muestra la curva correspondiente al experimento 1 ajustada a la **Ec. 5.4** cuyos parámetros se muestran en la **Tabla 5.13**.

**Tabla 5.13. Parámetros y componentes de la curva de inhibición con iso-OMPA de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al modelo de dos componentes exponenciales y uno resistente según el test de la F, a partir de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Exp.	E <sub>1</sub> (%)	k' ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	k* ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	I <sub>50</sub> ** ( $\mu\text{M}$ )	E <sub>2</sub> (%)	K' ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	k ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	E <sub>R</sub> (%)
1	16,4	1,007	0,0335	0,68	53,1	0,00113	0,0000377	612	30,4
2	17,8	1,418	0,0472	0,48	52,7	0,00106	0,0000354	652	29,4

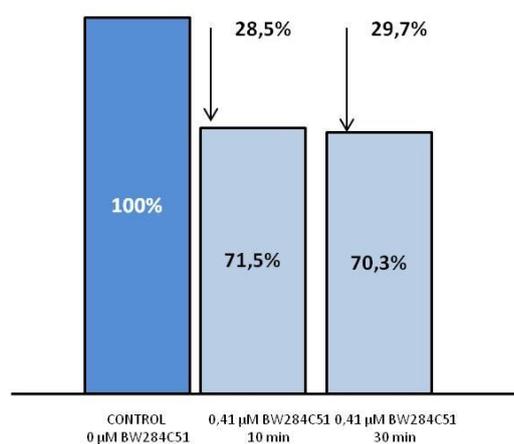
(\*)siendo K, la constante de segundo orden.  $k=k'/30$

(\*\*)  $I_{50} = -\ln(0,5)/k'$

#### *Inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina total con BW284C51.*

Inhibición a dos tiempos.

Se estudió la inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina utilizando una concentración equivalente a 10 mg/mL de tejido fresco que se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con una concentración de BW284C51 0,41  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. Las medidas se hicieron por triplicado. La actividad residual a los 10 min de inhibición fue de 71,5 $\pm$ 0,1% y a los 30 min de 70,3 $\pm$ 0,1% (**Figura 5.28**). La inhibición no fue mayor a 30 minutos. La observación de que no hay diferencias en la inhibición a los dos tiempos ensayados sugiere una inhibición no progresiva con el tiempo y por tanto de tipo reversible.



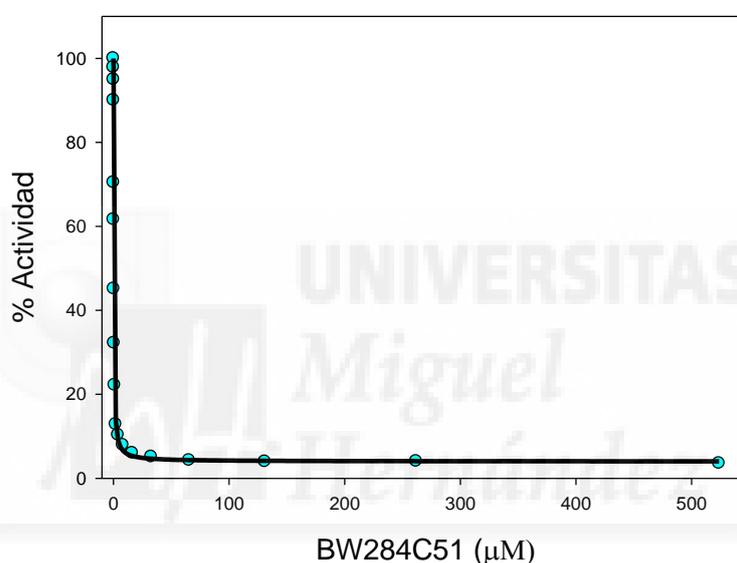
**Figura 5.28. Inhibición de actividad hidrolizante de acetilcolina total por BW284C51 0,41  $\mu\text{M}$ , durante 10 o 30 min de preincubación**

## RESULTADOS

### Inhibición a tiempo fijo

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de BW284C51, entre 0 y 524  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. En la **Figura 5.29** se muestran los datos obtenidos así como el modelo reversible que mejor se ajustó a los datos, según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de dos componentes que se inhiben (**Ec. 5.5.**). La **Tabla 5.14** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = (E_1/(1 + A * x)) + (E_2/(1 + B * x)) \quad [\text{Ec.5.5.}]$$



**Figura 5.29. Inhibición con BW284C51 a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro.** Se usó la fracción soluble correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con concentraciones de BW284C51 comprendidas entre 0 y 524  $\mu\text{M}$  durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetilcolina del control sin BW284C51. La curva está ajustada a la **Ec. 5.5.**

**Tabla 5.14. Parámetros y componentes de la curva de inhibición con BW284C51 de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al modelo de dos componentes sensibles y uno resistente según el test de la F, a partir de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

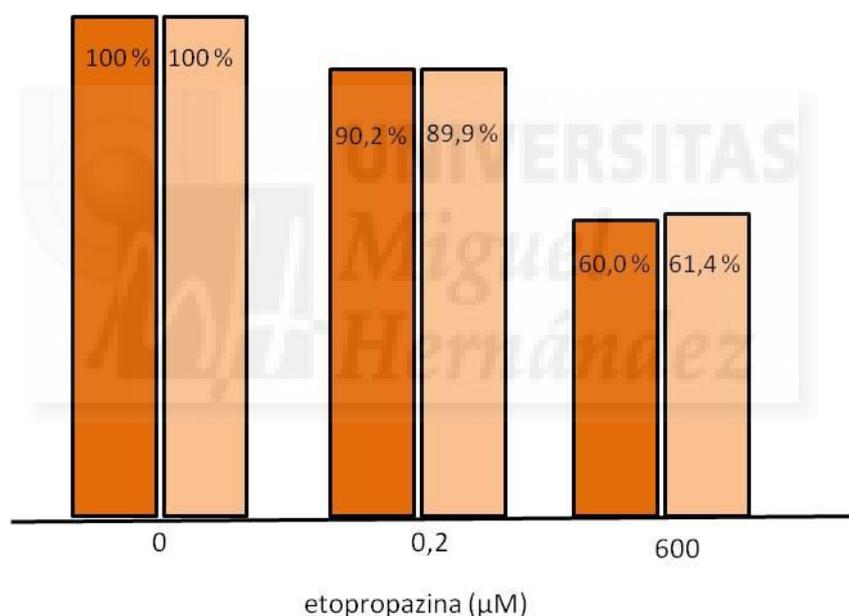
Experimento.	$E_1$ (%)	$A$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_2$ (%)	$B$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
1	96,8	5,46	0,18	3,2	0,057	17,45
2	96,4	5,99	0,17	3,6	0,076	13,09

*Inhibición de la actividad total con etopropazina.*

## Inhibición a dos tiempos

Se estudió la inhibición de la actividad utilizando una concentración equivalente a 10 mg/mL de tejido fresco para ello se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con una concentración de etopropazina 0,2 o 600  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. La inhibición se calculó respecto de un control que no llevaba inhibidor. Las medidas se hicieron por triplicado.

La inhibición con etopropazina durante 30 min no aumentó respecto a la observada a 10 min en las dos concentraciones ensayadas (**Figura 5.30**). La actividad residual a los 10 min con etopropazina 0,2  $\mu\text{M}$  fue de  $90,2\pm 0,1\%$  y a los 30 min de  $89,9\pm 0,1\%$ . Con etopropazina 600  $\mu\text{M}$  fue de  $60\pm 0,1\%$  y  $61,4\pm 0,1\%$ . La observación de que no hay diferencias en la inhibición a los dos tiempos ensayados con ninguna de las dos concentraciones ensayadas sugiere una inhibición no progresiva con el tiempo y por tanto de tipo reversible.



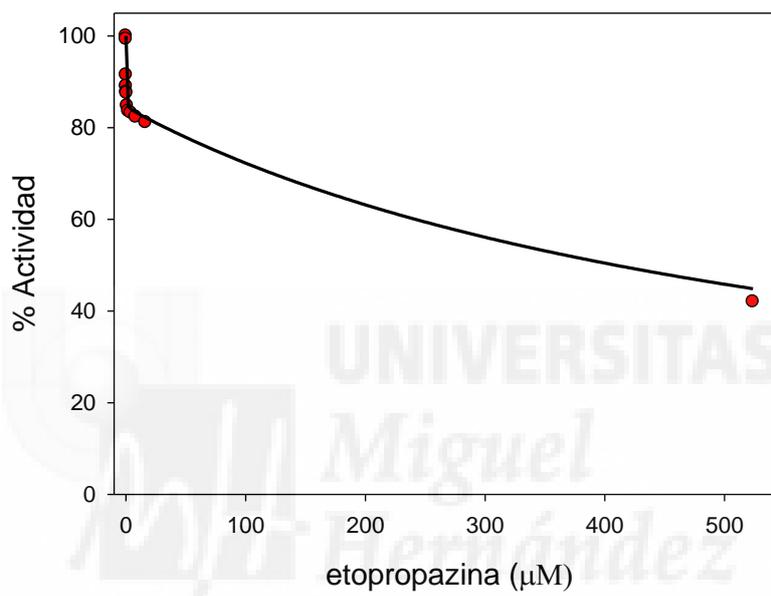
**Figura 5.30.** Actividad hidrolizante de acetilcolina resistente a PMSF 1500  $\mu\text{M}$  ( $\text{E}\alpha$ ) inhibida con etopropazina 0,2 o 600  $\mu\text{M}$ , 10 min (barras naranja oscuro) o 30 min (barras naranja claro).

## RESULTADOS

### Inhibición a tiempo fijo.

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de etopropazina, entre 0 y 524  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. En la **Figura 5.31** se muestran los datos experimentales obtenidos así como el modelo reversible que mejor se ajustó a los datos, según el test de la F. El mejor ajuste fue el de dos componentes (**Ec. 5.6.**). La **Tabla 5.15** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1/(1 + A * x) + E_2/(1 + B * x) \quad \text{[Ec. 5.6.]}$$



**Figura 5.31. Inhibición con etopropazina a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro.** Se usó la fracción soluble correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de etopropazina comprendidas entre 0 y 524  $\mu\text{M}$  durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetilcolina del control sin etopropazina.

**Tabla 5.15. Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al modelo de dos componentes sensibles según el test de la F de la curva de inhibición a tiempo fijo con etopropazina, a partir de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

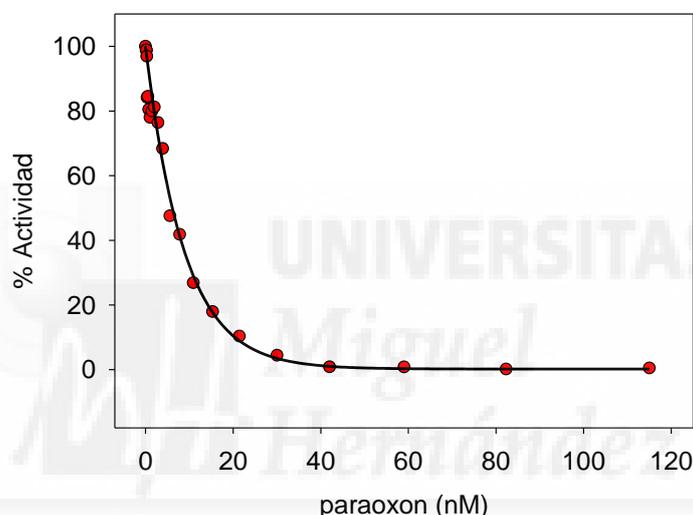
Experimento	$E_1$ (%)	$A$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_2$ (%)	$B$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
1	13,2	20,00	0,050	86,8	0,0017	594
2	10,8	35,46	0,028	89,2	0,0018	555

**5.3.4. Inhibición de actividad hidrolizante de acetilcolina total con paraoxon, mipafox y PMSF.**

*Inhibición de la actividad total con paraoxon.*

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de paraoxon comprendidas entre 0 y 650 nM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad hidrolizante de acetilcolina En la **Figura 5.35** se muestran los datos obtenidos así como el modelo de inhibición irreversible que mejor se ajustó, según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de un componente (**Ec. 5.7**). La **Tabla 5.16** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1 \cdot e^{k' \cdot I} \quad \text{[Ec. 5.7]}$$



**Figura 5.32. Inhibición con paraoxon a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetilcolina soluble de cerebro.** Se usó la fracción soluble correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de paraoxon comprendidas entre 0 y 650 μM durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetilcolina del control sin paraoxon.

**Tabla 5.16. Parámetros y componentes de la curva de inhibición a tiempo fijo con paraoxon de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial según el test de la F, a partir de los datos obtenidos en dos experimentos independientes aplicando la **Ec.5.7**.

Experimento	E <sub>1</sub> (%)	k' (nM <sup>-1</sup> )	k* (nM <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	I <sub>50</sub> ** (nM)
1	99,8	0,10	0,0035	6,6
2	99,8	0,11	0,0038	6,1

(\*)siendo K, la constante de segundo orden. k=k'/30

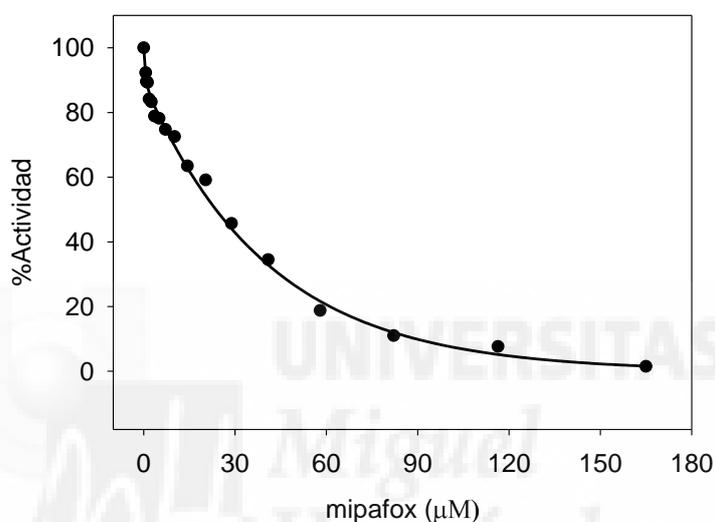
(\*\*)I<sub>50</sub>=-Ln(0,5)/k'

## RESULTADOS

### *Inhibición de la actividad total con mipafox.*

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de mipafox comprendidas entre 0 y 900 µM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad hidrolizante de acetiltiocolina. En la **Figura 5.36** se muestran los datos obtenidos así como el modelo de inhibición irreversible que mejor se ajustó, según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de un componente (**Ec. 5.8**). La **Tabla 5.17** muestra los parámetros obtenidos.

$$E = E_1 \cdot e^{-k' \cdot I} \quad [\text{Ec.5.8}]$$



**Figura 5.33.** Inhibición con mipafox a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro. Se usó fracción soluble correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de mipafox comprendidas entre 0 y 1500 µM durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetiltiocolina del control sin mipafox.

**Tabla 5.17.** Parámetros y componentes de la curva de inhibición con mipafox a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro. Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al modelo exponencial de un componente, según el test de la F, de los datos obtenidos en dos experimentos independientes aplicando la **Ec.5.8**.

Experimento	$E_1$ (%)	$k'$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$k^*$ ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$I_{50}^{**}$ ( $\mu\text{M}$ )
1	100	0,024	0,00080	28,64
2	100	0,032	0,0010	21,13

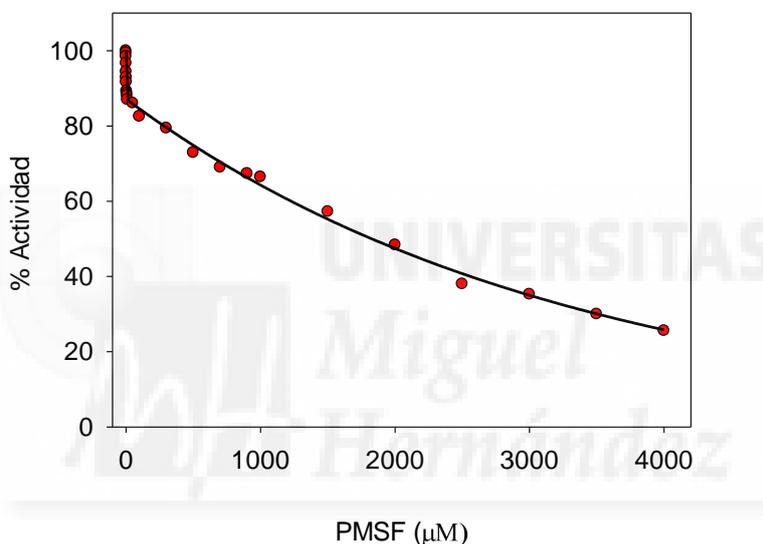
(\*)siendo K, la constante de segundo orden.  $k=k'/30$

(\*\*)  $I_{50} = -\ln(0,5)/k'$

*Inhibición de la actividad total con PMSF.*

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de PMSF comprendidas entre 0 y 4000 μM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad hidrolizante de acetiltiocolina. Los datos se ajustaron a un modelo de inhibición irreversible considerando que el inhibidor se hidroliza con el tiempo (Estévez et al, 2007). En la **Figura 5.37** se muestra el mejor ajuste que según el test de la F fue el modelo de dos componentes que se inhiben exponencialmente y considerando la hidrólisis del inhibidor (**Ec. 5.9**). La **Tabla 5.18** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1 \cdot e^{((e^{-kh \cdot I}) - 1) \cdot (k' / kh)} + E_2 \cdot e^{((e^{-kh \cdot I}) - 1) \cdot (k' / kh)} \quad \text{[Ec. 5.9]}$$



**Figura 5.34. Inhibición con PMSF a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.** Se usó la fracción soluble correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de PMSF comprendidas entre 0 y 1500 μM durante 30 min a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetiltiocolina del control sin PMSF y aplicando la **Ec. 5.9** cuyos parámetros se dan en la **Tabla 5.18**

**Tabla 5.18. Parámetros y componentes de la curva de inhibición con PMSF de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial, de dos componentes según el test de la “F” de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

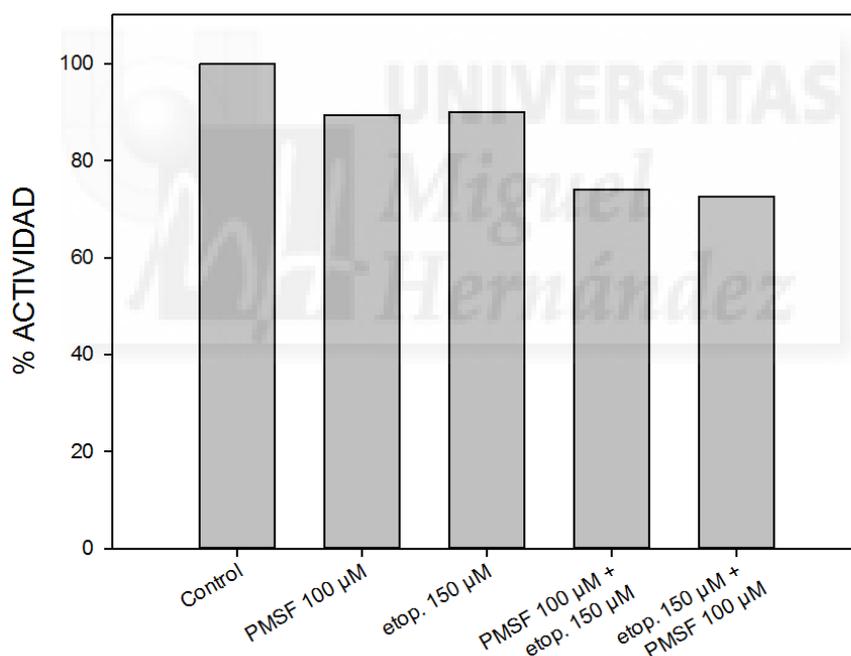
Experimento	E <sub>1</sub> (%)	k (μM <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	I <sub>50</sub> (μM)	E <sub>2</sub> (%)	k (μM <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	I <sub>50</sub> (μM)	kh
1	11.2	0,23	0,4	88.8	0,000043	2.000	0.136
2	14.9	0,13	0,4	85.0	0,000036	2.000	0.105

### 5.3.5. Inhibición secuencial a un tiempo fijo con dos inhibidores

Los experimentos de inhibición a tiempo fijo con iso-OMPA, PMSF y etopropazina han permitido discriminar varios componentes, algunos de amplitudes similares. Para detectar componentes comunes para cada inhibidor se diseñó un experimento en el que primero se preincubó con uno de los inhibidores y después se añadió un segundo inhibidor, a las concentraciones necesarias de cada uno para inhibir el componente en ambos casos.

Preincubación con PMSF y posterior inhibición con etopropazina, y viceversa

La **Figura 5.32** muestra la actividad obtenida tras la inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina durante 30 minutos de incubación a 37 °C con PMSF 100  $\mu$ M (concentración que inhibe totalmente el componente más sensible a PMSF) o con etopropazina 150  $\mu$ M (concentración que inhibe totalmente el componente más sensible a etopropazina), así como PMSF 100  $\mu$ M y etopropazina 150  $\mu$ M o etopropazina 150  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de PMSF.

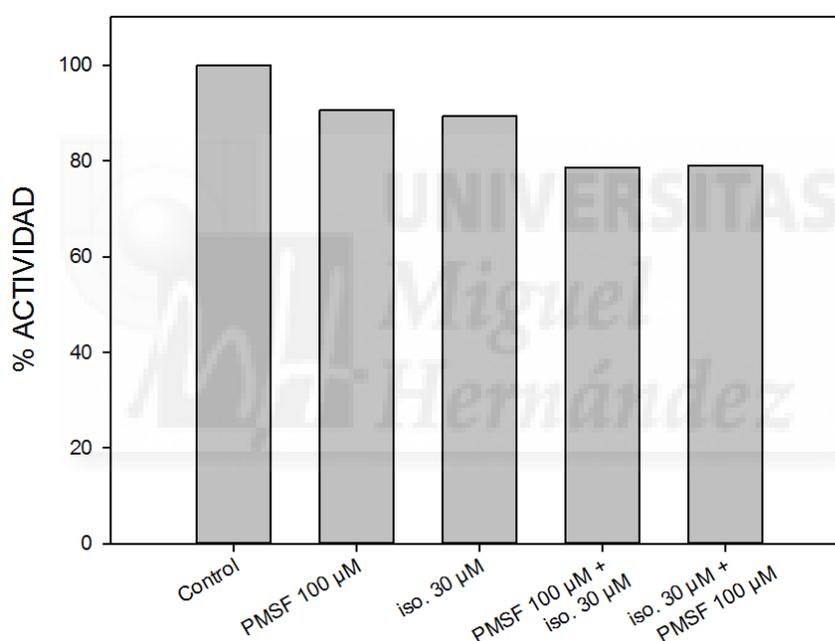


**Figura 5.35. Actividad residual hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro con PMSF y etopropazina.** La actividad se ensayó tal como está descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. En la leyenda, el primer inhibidor indica el primer inhibidor utilizado en la inhibición secuencial (ver Materiales y métodos). Los porcentajes de actividad son referidos a la actividad del control.

Se observa que hay menos actividad residual cuando se inhibe secuencialmente con dos inhibidores, que cuando se inhibe con solamente un inhibidor, lo cual sugiere que la proporción que se inhibe con PMSF no es la que se inhibe con etopropazina o que el componente más sensible a PMSF no es el más sensible a etopropazina, y viceversa.

Preincubación con PMSF y posterior inhibición con iso-OMPA, y viceversa

La **Figura 5.33** muestra la actividad obtenida tras la inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina durante 30 minutos de incubación a 37 °C con PMSF 100  $\mu$ M (concentración que inhibe totalmente el componente más sensible a PMSF), o con iso-OMPA 30  $\mu$ M (concentración que inhibe totalmente el componente más sensible a iso-OMPA), así como PMSF 100  $\mu$ M e iso-OMPA 30  $\mu$ M o iso-OMPA 30  $\mu$ M y PMSF 100  $\mu$ M.



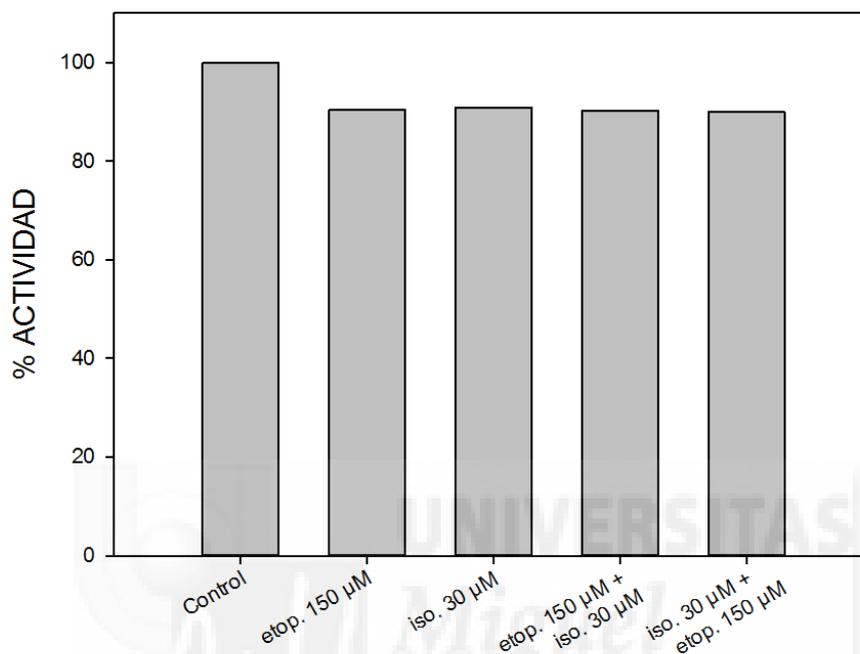
**Figura 5.36. Actividad residual hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro con PMSF y iso-OMPA.** La actividad se ensayó tal como está descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. En la leyenda, el primer inhibidor indica el primer inhibidor utilizado en la inhibición secuencial (ver Materiales y métodos). Los porcentajes de actividad son referidos a la actividad del control.

Se observa que hay menos actividad residual cuando se inhibe secuencialmente con dos inhibidores, que cuando se inhibe con solamente un inhibidor, lo cual sugiere que el componente más sensible a PMSF no es el más sensible a iso-OMPA, y viceversa.

## RESULTADOS

Preincubación con iso-OMPA y posterior inhibición con etopropazina, y viceversa

La **Figura 5.34** muestra la actividad obtenida tras la inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina durante 30 minutos de incubación a 37 °C con etopropazina 150 µM (concentración que inhibe totalmente el componente más sensible a etopropazina), o con iso-OMPA 30 µM (concentración que inhibe totalmente el componente más sensible a iso-OMPA), así como etopropazina 150 µM e iso-OMPA 30 µM o iso-OMPA 30 µM y etopropazina 150 µM.



**Figura 5.37 Actividad residual hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro con etopropazina y iso-OMPA.** La actividad se ensayó tal como está descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. En la leyenda, el primer inhibidor indica el primer inhibidor utilizado en la inhibición secuencial (ver Materiales y métodos). Los porcentajes de actividad son referidos a la actividad del control.

En esta ocasión, no se observan cambios significativos en la actividad enzimática al hacer la inhibición secuencial con los dos inhibidores, de lo que se puede deducir que el componente más sensible a iso-OMPA se trata también del componente más sensible a etopropazina y además corresponde a la proporción de actividad deducida para los componentes más sensibles de ambos inhibidores que se sitúan en el rango de 10-17% (**Tablas 5.15 y 5.13**).

## 5.4. ACTIVIDAD PVasa EN MEMBRANAS.

### 5.4.1. Detección de componentes de PVasa en fracción de membrana: EP $\alpha$ , EP $\beta$ , EP $\gamma$ y EP $\delta$ .

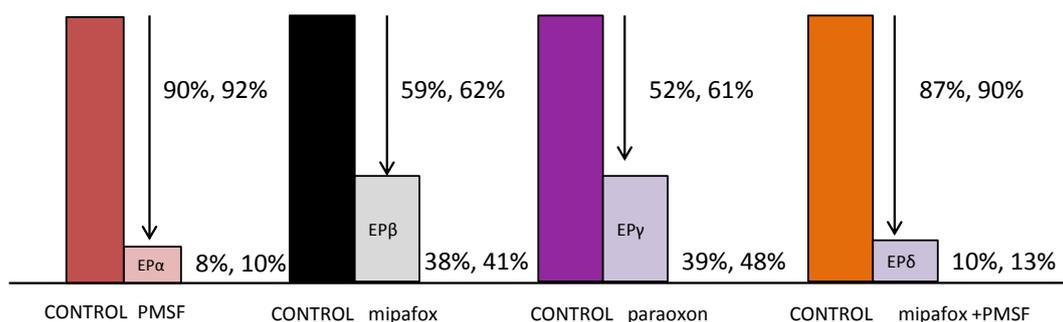
Se detectaron los componentes enzimáticos de la actividad PVasa descritos por Mangas et al. (2013), llamados EP $\alpha$ , EP $\beta$ , EP $\gamma$  y EP $\delta$ . Se considera EP $\alpha$  resistente a PMSF 1000  $\mu$ M, EP $\beta$  resistente a mipafox 50  $\mu$ M, EP $\gamma$  resistente a paraoxon 25  $\mu$ M y EP $\delta$  a PMSF 600  $\mu$ M y mipafox 25  $\mu$ M. Se aplicó el mismo criterio que en la fracción soluble para la elección de las concentraciones.

La incubación de la preparación de membrana de cerebro con PMSF 1000  $\mu$ M durante 30 minutos, en dos experimentos independientes, produjo 90%, 92% de inhibición de la actividad PVasa. La actividad resistente (8%, 10%) se consideró una estimación del componente esterásico EP $\alpha$  (Figura 5.38).

La incubación de la preparación de membrana de cerebro con mipafox 50  $\mu$ M durante 30 minutos, en dos experimentos independientes, produjo 59% y 62% de inhibición de la actividad PVasa. La actividad resistente (38%, 41%) se consideró una estimación del componente esterásico EP $\beta$ .

Con paraoxon 25  $\mu$ M durante 30 minutos, en dos experimentos independientes, se produjo 52% y 61% de inhibición de la actividad PVasa. La actividad resistente (39%, 48%) se consideró una estimación del componente esterásico EP $\gamma$ .

Con mipafox 25  $\mu$ M y PMSF 600  $\mu$ M durante 30 minutos, en dos experimentos independientes, se produjo 87%, 90% de inhibición de la actividad PVasa. La actividad resistente (10%, 13%) se consideró una estimación del componente esterásico EP $\delta$ .



**Figura 5.38. Actividad PVasa resistente a PMSF 1000  $\mu$ M, mipafox 50  $\mu$ M, paraoxon 25  $\mu$ M o mipafox 25  $\mu$ M y PMSF 600  $\mu$ M.** Se muestran los valores de la actividad residual PVasa obtenidos después de la incubación con los inhibidores. Se dan los valores de dos experimentos independientes.

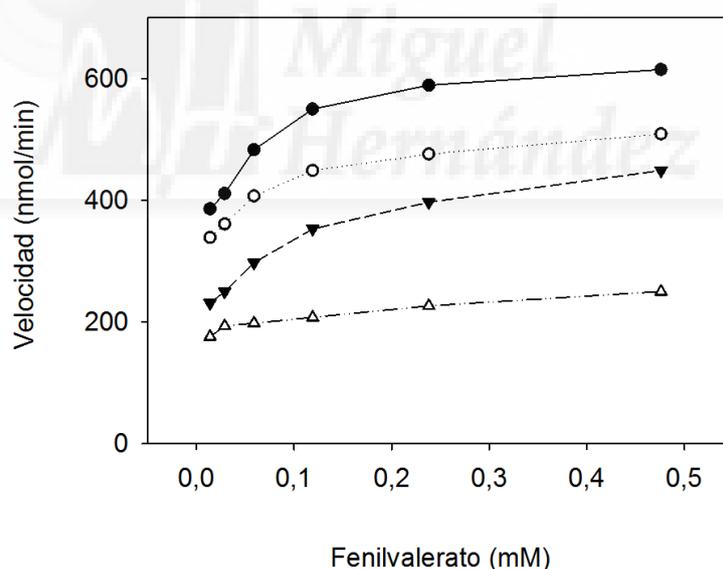
#### 5.4.2. Interacciones de acetiltiocolina con la actividad PVasa.

*Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a PMSF 1000  $\mu$ M (componente  $EP\alpha$ ).*

Se preinhibió una preparación de la fracción de membrana de 15 mg/mL con PMSF 1000  $\mu$ M durante 30 min, después se añadió una mezcla de fenilvalerato y acetiltiocolina y se midió la actividad PVasa (como se describe en Materiales y Métodos). Las concentraciones usadas de PV fueron: 0,01-0,03-0,06-0,12-0,24-0,48 mM y de acetiltiocolina: 0-0,7-1,42-2,14 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes, los datos de uno de los experimentos se muestran en la **Figura 5.39**. Se observó que la acetiltiocolina interacciona con la actividad resistente a PMSF 1000  $\mu$ M, disminuyendo velocidad máxima al incrementar la concentración de acetiltiocolina (**Tabla 5.19**).

El componente  $EP\delta$  es resistente a los inhibidores utilizados para discriminar el resto de componentes y la actividad resultante es debida a la suma de dos componentes,  $EP\alpha$  y  $EP\delta$ , por este motivo no se pudo aplicar un modelo para establecer los parámetros cinéticos.



**Figura 5.39. Curva de la actividad PVasa resistente a PMSF 1000  $\mu$ M ( $EP\alpha$ ) en presencia de acetiltiocolina.** Se representan los datos experimentales de uno de los experimentos. Los círculos negros corresponden a una concentración de acetiltiocolina 0 mM, círculos blancos 0,7 mM, triángulos negros 1,42 mM y triángulos blancos 2,14 mM

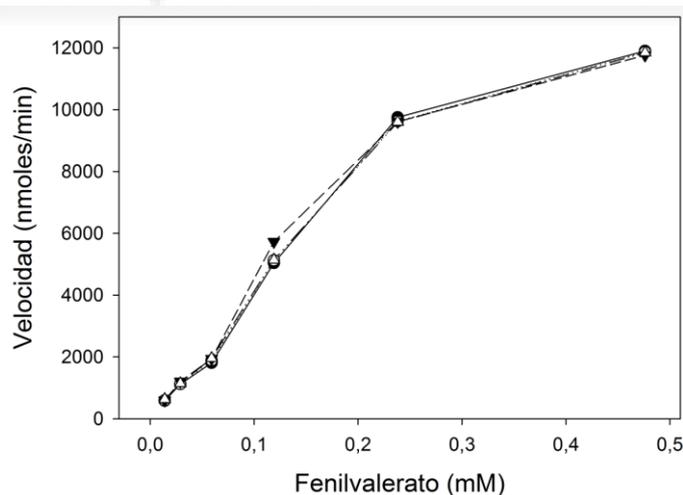
**Tabla 5.19. Velocidad máxima sin inhibidor (V) y en presencia de inhibidor (V') de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a la Figura 5.39.** Se muestran los valores de dos experimentos independientes. V' es el valor que alcanza la velocidad máxima con la concentración más alta de inhibidor.

	V (nmoles/min)	V' (nmoles/min)
<b>Experimento 1</b>	637	250
<b>Experimento 2</b>	960	415

*Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a mipafox 50  $\mu$ M (componente EP $\beta$ ).*

Se preinhibió una preparación de la fracción de membrana de 15 mg/mL con mipafox 50  $\mu$ M durante 30 min, después se añadió una mezcla de fenilvalerato y acetiltiocolina y se midió la actividad PVasa. Las concentraciones usadas de PV fueron: 0,01-0,03-0,06-0,12-0,24-0,48 mM y de acetiltiocolina: 0- 1,42-3,33-7,14 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes, los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.40**. No se observó inhibición de la actividad PVasa en este componente por la presencia de acetiltiocolina en el medio. Se concluyó que no hay una interacción de acetiltiocolina con el componente EP $\beta$  de la actividad PVasa. Los parámetros que resultaron se muestran en la **Tabla 5.20**.



**Figura 5.40. Curva de la actividad PVasa resistente a mipafox 50  $\mu$ M (EP $\beta$ ) en presencia de acetiltiocolina.** La figura representa los datos experimentales obtenidos de la interacción de la acetiltiocolina con el componente esterásico EP $\beta$ . Los círculos negros corresponden a una concentración de acetiltiocolina 0 mM, círculos blancos 1,42 mM, triángulos blancos 3,33 mM y triángulos negros 7,14 mM.

## RESULTADOS

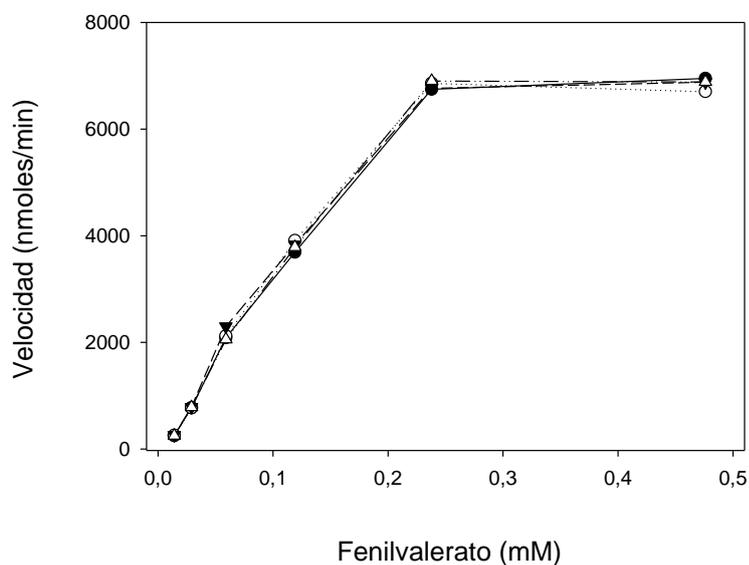
**Tabla 5.20. Velocidad máxima (V) de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a Figura 5.40.** No se observó inhibición y se indican los valores de V a la máxima concentración de sustrato utilizada. Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

	V (nmoles/min)
Experimento 1	11.902
Experimento 2	11.845

*Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a paraoxon 25  $\mu$ M (componente EP $\gamma$ ).*

Se preinhibió una preparación de fracción de membrana de 15 mg/mL con paraoxon 25  $\mu$ M durante 30 min, después se añadió una mezcla de fenilvalerato y acetiltiocolina y se midió la actividad PVasa. Las concentraciones usadas de PV fueron: 0,01-0,03-0,06-0,12-0,24-0,48 mM y de acetiltiocolina: 0- 1,42-3,33-7,14 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes, los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.41**. No se detectó inhibición de la actividad PVasa en este componente por la presencia de acetiltiocolina en el medio. Se concluyó que no hay una interacción de acetiltiocolina con el componente EP $\gamma$  de la actividad PVasa. Los parámetros cinéticos deducidos se muestran en la **Tabla 5.21**.



**Figura 5.41. Curva de la actividad PVasa resistente a paraoxon 25  $\mu$ M (EP $\gamma$ ) en presencia de acetiltiocolina.** La figura representa los datos experimentales obtenidos de la interacción de la acetiltiocolina con el componente esterásico EP $\gamma$ . Los círculos negros corresponden a una concentración de acetiltiocolina 0 mM, círculos blancos 1,42 mM, triángulos negros 3,33 mM y

**Tabla 5.21. Velocidad máxima (V) de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a Figura 4.41.** No se observó inhibición y se indican los valores de velocidad a la máxima concentración de sustrato utilizada. Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

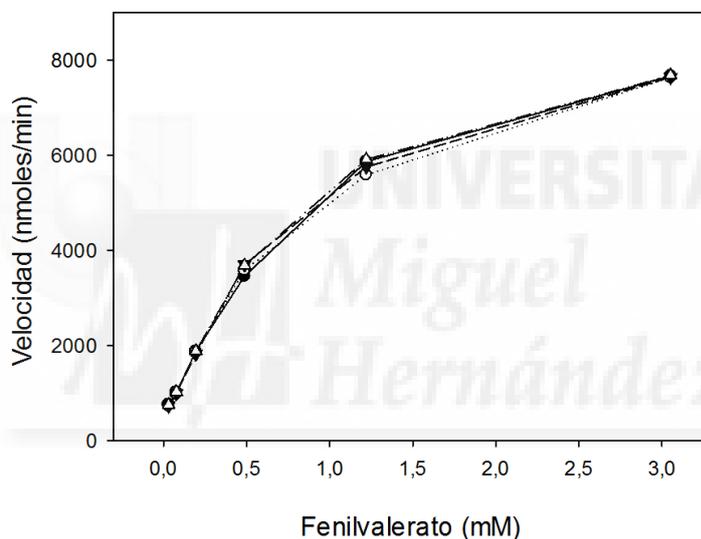
	V (nmoles/min)
Experimento 1	6.952
Experimento 2	6.886

## RESULTADOS

*Interacción de acetiltiocolina con la actividad PVasa resistente a mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$  (componente EP $\delta$ ).*

Se preinhibió la preparación de fracción de membrana de 30 mg/mL con una mezcla de mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$  durante 30 min, después se añadió una mezcla de fenilvalerato y acetiltiocolina y se midió la actividad PVasa. Las concentraciones usadas de PV fueron: 0,03-0,08-0,2-0,3-1,2-3 mM y de acetiltiocolina: 0- 1,42-3,33-7,14 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes, los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.42**. No se detectó inhibición de la actividad PVasa en este componente por la presencia de acetiltiocolina en el medio. Se concluyó que no hay una interacción de acetiltiocolina con el componente EP $\delta$  de la actividad PVasa. Los parámetros deducidos se muestran en la **Tabla 5.22**.



**Figura 5.42. Curva de Michaelis-Menten de la actividad PVasa resistente a mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$ .** La figura representa los datos experimentales obtenidos de la interacción de la acetiltiocolina con el componente esterásico EP $\delta$ . Los círculos negros corresponden a una concentración de acetiltiocolina 0 mM, círculos blancos 1,42 mM, triángulos negros 3,33 mM y

**Tabla 5.22. Velocidad máxima (V) de la actividad PVasa en experimento de inhibición con acetiltiocolina correspondiente a Figura 5.42.** No se observó inhibición y se indican los valores de velocidad a la máxima concentración de sustrato. Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

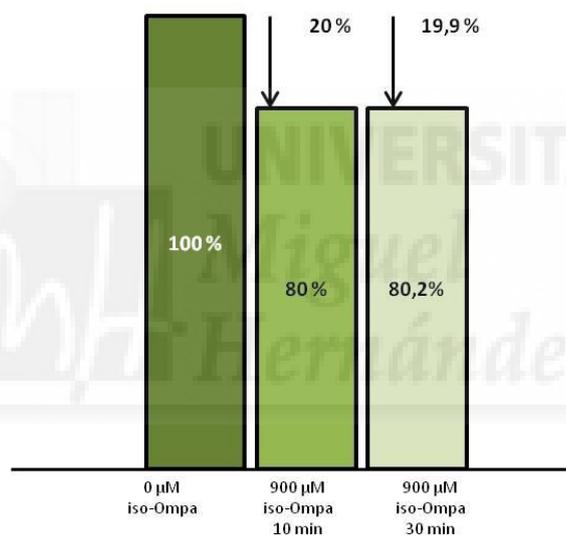
	V (nmoles/min)
Experimento 1	7.672
Experimento 2	7.682

### 5.4.3. Inhibición de la actividad PVasa total.

#### *Inhibición de la actividad PVasa total con iso-OMPA.*

Inhibición a dos tiempos.

Se estudió en un experimento la inhibición de la actividad PVasa de membrana de cerebro a una concentración equivalente a 15 mg/mL de tejido fresco y se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con iso-OMPA 900  $\mu$ M. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa, las medidas se realizaron por triplicado. La inhibición a los 10 min fue  $20 \pm 0,1\%$  y a 30 min  $19,9 \pm 0,1\%$  (**Figura 5.43**). La observación de que no hay diferencias en la inhibición a los dos tiempos de incubación ensayados no se observa una inhibición dependiente del tiempo y por tanto podría ser de tipo reversible.



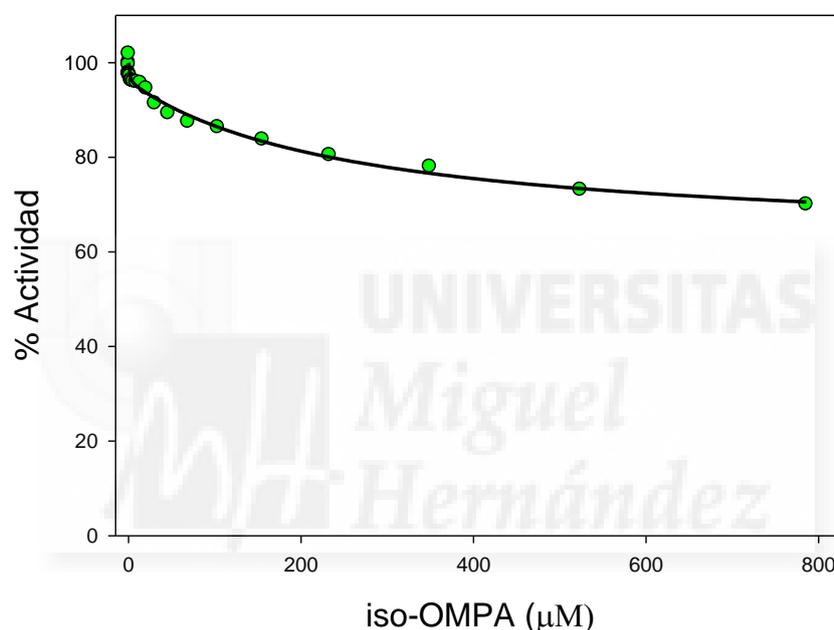
**Figura 5.43. Inhibición de la actividad PVasa total por iso-OMPA 900  $\mu$ M, durante 10 o 30 min de preincubación**

## RESULTADOS

Inhibición a tiempo fijo.

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C, con concentraciones crecientes de iso-OMPA, comprendidas entre 0 y 786 µM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. En la **Figura 5.44** se muestran los datos obtenidos de uno de los experimentos así como la curva del ajuste al modelo de inhibición reversible que mejor se ajustó según el test de la F que fue el modelo de tres componentes que se inhiben (**Ec. 5.10.**). La **Tabla 5.23** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = (E_1/(1 + A * x)) + (E_2/(1 + B * x)) + (E_3/(1 + C * x)) \quad \text{[Ec. 5.10]}$$



**Figura 5.44. Inhibición con iso-OMPA a tiempo fijo de la actividad PVasa de membrana de cerebro.** Se usó la fracción de membrana de cerebro correspondiente a 15 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de iso-OMPA comprendidas entre 0 y 786 µM durante 30 min a 37°C. La actividad PVasa se ensayó tal y como está descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los porcentajes de actividad PVasa están referidos a la actividad PVasa del control sin iso-OMPA. Se muestra la curva correspondiente a experimento 1 de la **Tabla 5.23**.

**Tabla 5.23. Parámetros y componentes de la curva de inhibición con iso-OMPA de la actividad PVasa de fracción de membrana de cerebro.** Se muestran los valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial de tres componentes sensibles según el test de la F de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Exp.	E <sub>1</sub> (%)	A ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	E <sub>2</sub> (%)	B ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	E <sub>3</sub> (%)	C ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
1	2,5	1,53	0,65	12,2	0,015	65,47	81,3	0,000052	*
2	2,8	2,55	0,40	15,8	0,0076	130	85,1	0,000052	*

(\*)I<sub>50</sub> muy superior a la mayor concentración ensayada por lo que consideramos al componente como resistente.

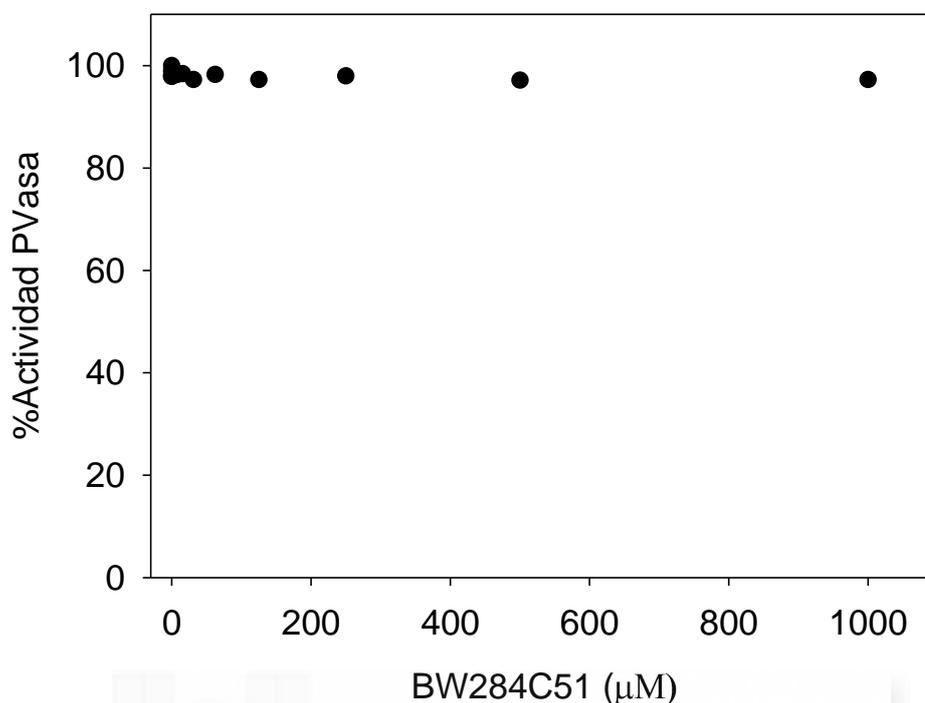
#### *Inhibición de la actividad PVasa total con BW284C51.*

Inhibición a dos tiempos.

Se estudió en un experimento la inhibición de la actividad PVasa de membrana de cerebro utilizando una concentración equivalente a 15 mg/mL de tejido fresco que se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con una concentración de BW284C51 50  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. La inhibición se calculó respecto de un control sin inhibidor. Las medidas se realizaron por triplicado. Después de 10 o 30 minutos de inhibición con BW284C51 50  $\mu\text{M}$  la tasa de inhibición fue de  $0 \pm 0,1\%$ . Así pues el BW284C51 ensayado a esa concentración no inhibió la actividad PVasa de membrana de cerebro.

Inhibición a tiempo fijo.

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de BW284C51, entre 0 y 1000  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. En la **Figura 5.45** se muestran los datos experimentales. No se detecta inhibición significativa de la actividad PVasa durante los 30 minutos de preincubación con esas concentraciones de BW284C51.



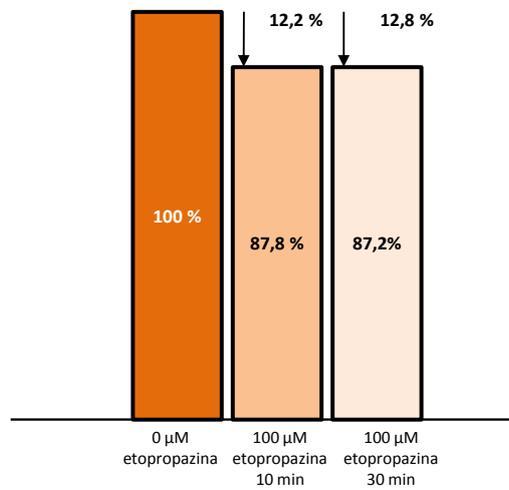
**Figura 5.45. Inhibición con BW284C51 a tiempo fijo de la actividad PVasa de fracción de membrana de cerebro.** Se usó la fracción de membrana de cerebro correspondiente a 15 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de BW284C51 comprendidas entre 0 y 1000 µM durante 30 min a 37°C. La actividad PVasa se ensayó tal y como está descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los porcentajes de actividad PVasa están referidos a la actividad PVasa del control sin BW284C51.

#### *Inhibición de la actividad PVasa total con etopropazina.*

##### *Inhibición a dos tiempos*

Se estudió en un experimento la inhibición de la actividad PVasa de membrana de cerebro utilizando una concentración equivalente a 15 mg/mL de tejido fresco y se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con una concentración de etopropazina 100 µM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. La inhibición se calculó respecto de un control sin inhibidor. Las medidas se realizaron por triplicado.

La inhibición con etopropazina durante 30 min fue similar respecto a la observada a 10 min (**Figura 5.46**). La actividad residual a los 10 minutos de inhibición fue de un  $87,8 \pm 0,1\%$  y a los 30 minutos de un  $87,2 \pm 0,1\%$ . La observación de que no hay diferencias en la inhibición a los dos tiempos ensayados sugiere una inhibición no progresiva con el tiempo y por tanto de tipo reversible.



**Figura 5.46. Inhibición de la actividad PVasa total por etopropazina 50 µM, durante 10 o 30 min de preincubación**

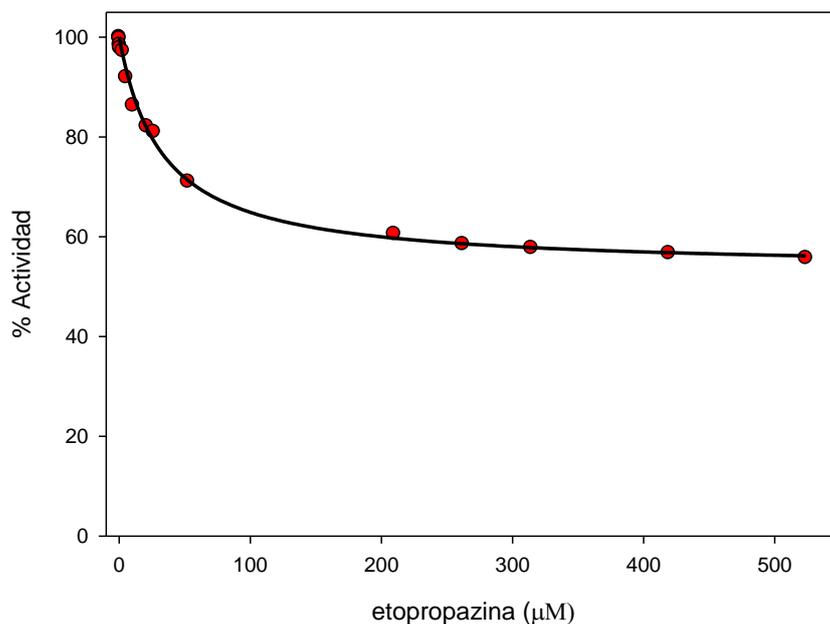
#### Inhibición a tiempo fijo

Se realizaron otros dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de etopropazina, entre 0 y 524 µM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad PVasa. En la **Figura 5.47** se muestran los datos experimentales obtenidos así como el modelo de inhibición reversible que mejor se ajustó, según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de dos componentes, uno que se inhibe y otro resistente (**Ec. 5.11.**). La **Tabla 5.24** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1 / (1 + A * x) + E_R$$

[**Ec. 5.11.**]

## RESULTADOS



**Figura 5.47. Inhibición con etopropazina a tiempo fijo de la actividad PVasa de membrana de cerebro.** Se usó la fracción de membrana de cerebro correspondiente a 15 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de etopropazina comprendidas entre 0 y 524  $\mu\text{M}$  durante 30 min a 37°C. La actividad PVasa se ensayó tal y como está descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los porcentajes de actividad PVasa están referidos a la actividad PVasa del control sin etopropazina. Se muestra la curva correspondiente al experimento 2 de la **Tabla 5.24**.

**Tabla 5.24. Parámetros y componentes de la curva de inhibición con etopropazina de actividad PVasa de fracción de membrana de cerebro.** Valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial de dos componentes, según el test de la F de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Exp.	$E_1$ (%)	$A$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_R$ (%)
1	46,5	0,0306	32,61	53,4
2	46,9	0,0286	34,89	53,1

#### 5.4.4. Inhibición de actividad PVasa resistente a PMSF 1000 $\mu\text{M}$ (componente $\text{EP}\alpha+\text{EP}\delta$ ) con iso-OMPA, BW284C51 y etopropazina.

Se estudió la dependencia del tiempo de la inhibición del componente enzimático de PVasa ( $\text{EP}\alpha+\text{EP}\delta$ ) que mostró una interacción con acetilcolina.

Se realizaron experimentos de interacción de la actividad PVasa resistente a PMSF 1000  $\mu\text{M}$  con iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$ , BW284C51 50  $\mu\text{M}$  o etopropazina 100  $\mu\text{M}$ , a 10 o 30 min de incubación.

Se preincubaron 180  $\mu\text{L}$  de la fracción soluble de cerebro de pollo a una concentración de 30 mg/mL, con 20  $\mu\text{L}$  PMSF 1000  $\mu\text{M}$ , durante 30 min a 37°C, a continuación se añadió 20  $\mu\text{L}$  de iso-OMPA o BW284C51 o etopropazina (a las concentraciones indicadas en el volumen de 220  $\mu\text{L}$ ) y se preincubó la mezcla durante 10 o 30 min; después se añadió el sustrato PV y se ensayó cómo se detalla en Materiales y Métodos. Se realizó un experimento con cada inhibidor y las medidas se realizaron por triplicado.

Se midió la actividad PVasa y se calculó el porcentaje de actividad residual respecto de un control preincubado solo con PMSF. La actividad residual a los 10 min de inhibición con iso-OMPA fue  $52,6\pm 0.1\%$  y a los 30 min de  $52,8\pm 0.1\%$ . La inhibición no aumentó al aumentar el tiempo de inhibición de 10 a 30 min (**Figura 5.48**). En la incubación durante 10 o 30 min con BW284C51 50  $\mu\text{M}$  no se observó inhibición.

Con etopropazina la actividad residual a 10 min fue  $84,9\pm 0.1\%$  y a los 30 min  $85,6\pm 0.1\%$ . La inhibición no aumentó al incrementar el tiempo de inhibición de 10 a 30 min (**Figura 5.49**).

Se concluyó que en los componentes  $\text{EP}\alpha+\text{EP}\delta$  las inhibiciones por iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$  y etopropazina 100  $\mu\text{M}$  no dependen del tiempo, el BW284C51 a la concentración ensayada no inhibe.

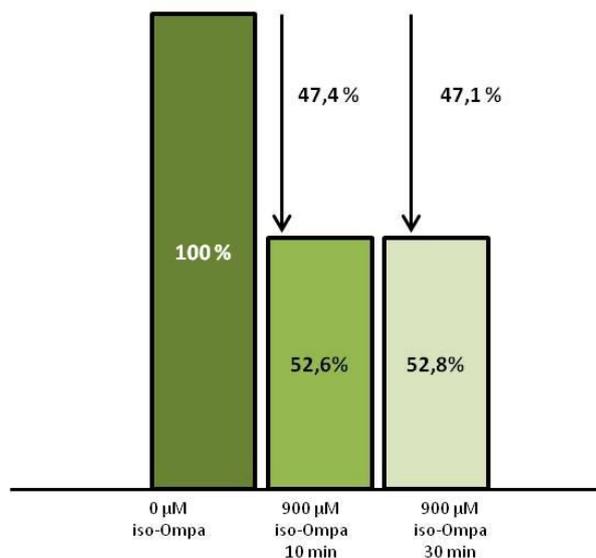


Figura 5.48. Actividad PVasa resistente a PMSF 1000 µM (EPα+EPδ) inhibida con iso-OMPA 900 µM, 10 o 30 min

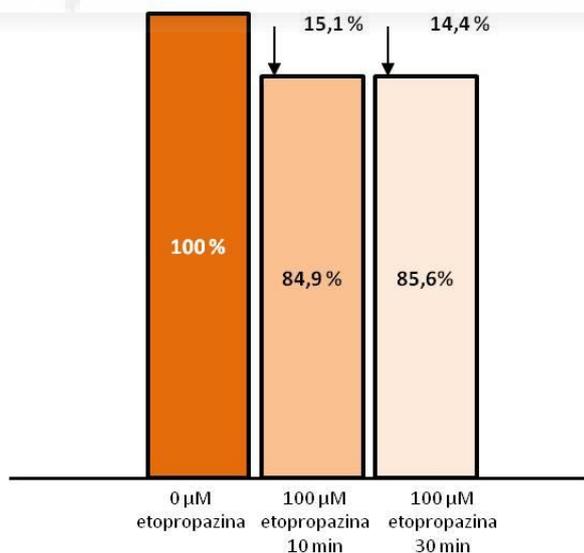


Figura 5.49. Actividad PVasa resistente a PMSF 1000 µM (EPα+EPδ) inhibida con etopropazina 100 µM, 10 o 30 min.

## 5.5. ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA EN FRACCIÓN DE MEMBRANA.

### 5.5.1. Detección de componentes aplicando las condiciones experimentales de EP $\alpha$ , EP $\beta$ , EP $\gamma$ y EP $\delta$ .

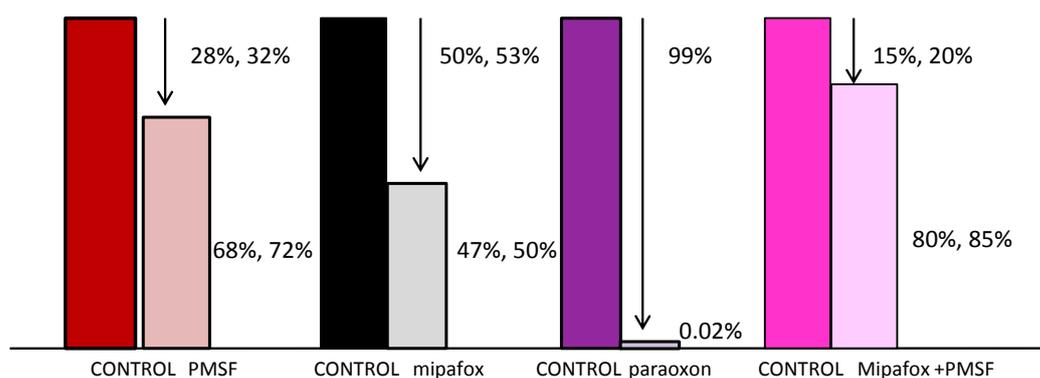
Las concentraciones de PMSF, mipafox, paraoxon o PMSF y mipafox utilizadas para discriminar los componentes enzimáticos de actividad PVasa en membrana, se aplicaron con el objetivo de establecer la actividad colinesterasa en las condiciones en las que se miden los componentes EP $\alpha$ , EP $\beta$ , EP $\gamma$  y EP $\delta$  (Mangas et al, 2012).

La incubación de la preparación de membrana de cerebro con PMSF 1.000  $\mu$ M durante 30 min, condición en la que se determina PVasa-EP $\alpha$ , produjo una inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina, del 28% y 32% en dos experimentos independientes (**Figura 5.50**).

En las condiciones en las que se determina PVasa- EP $\beta$ , la incubación con mipafox 50  $\mu$ M durante 30 min, en dos experimentos independientes produjo una actividad residual de 47% y 50% (**Figura 5.50**).

Con paraoxon 25  $\mu$ M durante 30 min, en dos experimentos independientes se produjo una inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina del 99%. (PVasa- EP $\gamma$ ).

La incubación de la preparación de membrana de cerebro con mipafox 25  $\mu$ M y PMSF 600  $\mu$ M durante 30 min, en dos experimentos independientes. Por lo tanto, en las condiciones en las que se determina PVasa- EP $\delta$ , la actividad hidrolizante de acetiltiocolina residual es de 80%, 85% (Mangas et al. 2013).



**Figura 5.50. Actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000  $\mu$ M, mipafox 50  $\mu$ M, paraoxon 25  $\mu$ M o mipafox 25  $\mu$ M y PMSF 600  $\mu$ M.** Se muestran los valores de actividad residual obtenidos después de la incubación con los inhibidores. Se dan los valores de dos experimentos independientes.

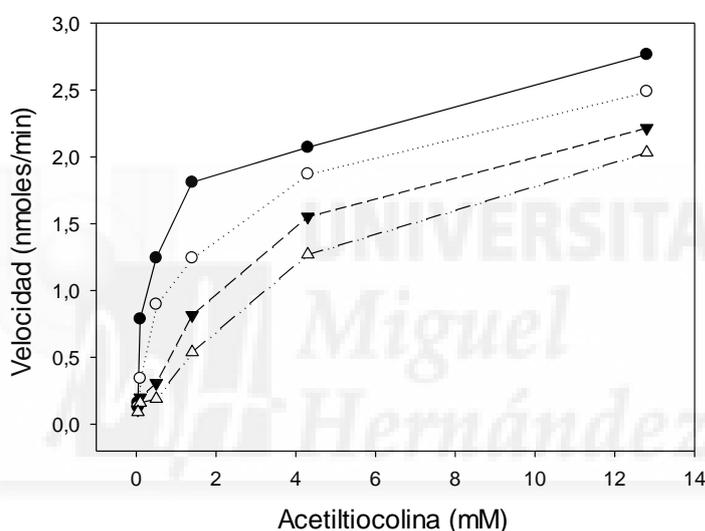
## RESULTADOS

### 5.5.2. Interacciones de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina.

*Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000  $\mu$ M.*

Se preinhibió una preparación de fracción de membrana de 20 mg/mL con PMSF 1000  $\mu$ M durante 30 min, después se añadió una mezcla de acetiltiocolina y PV. Se midió la actividad hidrolizante de acetiltiocolina (cómo se describe en Materiales y Métodos). Las concentraciones usadas de acetiltiocolina fueron: 0,04-0,1-0,5-1,4-4,3-12,8 mM y de PV: 0-1,4-4,3-8,6 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes, los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.51**. Se observó que el PV interacciona con la actividad residual hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000  $\mu$ M (**Tabla 5.25**.)



**Figura 5.51.** Curva de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000  $\mu$ M en presencia de fenilvalerato. Se representan los datos experimentales de uno de los experimentos. Los círculos negros corresponden a una concentración de fenilvalerato 0 mM, círculos blancos 1,4 mM, triángulos negros 4,3 mM y triángulos blancos 8,6 mM.

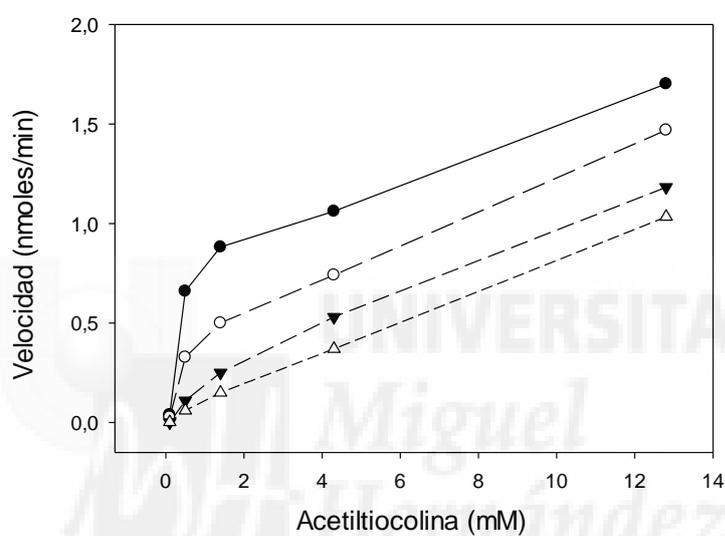
**Tabla 5.25.** Valores de velocidad máxima sin inhibidor ( $V$ ) y en presencia de inhibidor ( $V'$ ) de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina en experimento de inhibición con PV correspondiente a la **Figura 5.51**. Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

	$V$ (nmoles/min)	$V'$ (nmoles/min)
Experimento 1	2,7	2,0
Experimento 2	2,9	2,1

*Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox 50 µM.*

Se preinhibió una preparación de la fracción de membrana de 25 mg/ml con mipafox 50 µM durante 30 min. Después se añadió una mezcla de acetiltiocolina y PV y se midió actividad hidrolizante de acetiltiocolina. Las concentraciones usadas de acetiltiocolina fueron: 0,04-0,1-0,5-1,4-4,3-12,8 mM y de PV: 0-1,4-4,3-8,6 mM.

Se realizaron dos experimentos independientes, los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.52**. Se observó que el PV interacciona con la actividad residual hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox 50 µM (**Tabla 5.26**.)



**Figura 5.52. Curva de Michaelis-Menten de la actividad AChE resistente a mipafox 50 µM en presencia de fenilvalerato .** Se representan los datos experimentales de uno de los experimentos. Los círculos negros corresponden a una concentración de fenilvalerato=0 mM, círculos blancos =1,4 mM, triángulos negros=4,3 mM.

**Tabla 5.26. Valores de velocidad máxima sin inhibidor (V) y en presencia de inhibidor (V') de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina en experimento de inhibición con PV obtenidos de la Figura 5.52.** Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

	V (nmol/min)	V' (nmol/min)
<b>Experimento 1</b>	1,70	1,0
<b>Experimento 2</b>	2,03	1,8

## RESULTADOS

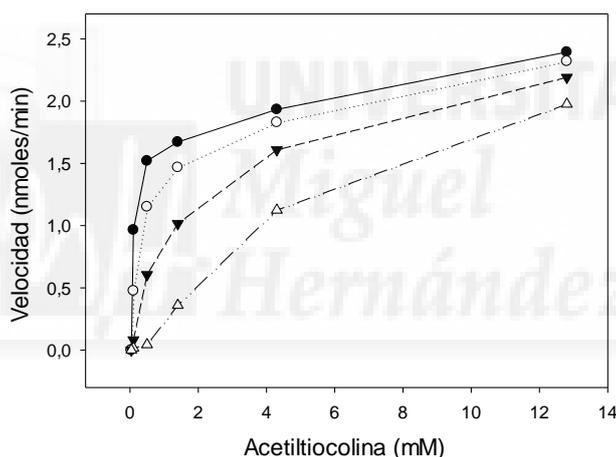
### *Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a paraoxon 25 $\mu$ M.*

La actividad residual después de preincubar con paraoxon 25  $\mu$ M fue de un 0.02% por lo que resultó imposible llevar a cabo el ensayo en presencia de fenilvalerato.

### *Interacción de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox 25 $\mu$ M y PMSF 600 $\mu$ M.*

Se preinhibió una preparación de la fracción de membrana de 15 mg/ml con una mezcla de mipafox 25  $\mu$ M y PMSF 600  $\mu$ M durante 30 min. Después se añadió una mezcla de acetiltiocolina (0,04-0,1-0,5-1,4-4,3-12,8 mM) y PV (0-1,4-4,3- 8,6 mM) y se midió actividad hidrolizante de acetiltiocolina.

Se realizaron dos experimentos independientes, los datos de un experimento se muestran en la **Figura 5.53**. Se observó que el PV interacciona con la actividad residual hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox 25  $\mu$ M y PMSF 600  $\mu$ M (**Tabla 5.27**).



**Figura 5.53.** Curva de la actividad AChE resistente a mipafox 25  $\mu$ M y PMSF 600  $\mu$ M en presencia de fenilvalerato. Se representan los datos experimentales de uno de los experimentos. Los círculos negros corresponden a una concentración de fenilvalerato 0 mM, círculos blancos 1,4 mM, triángulos negros 4,3 mM y triángulos blancos 8,6 mM.

**Tabla 5.27.** Valores de velocidad máxima sin inhibidor ( $V$ ) y en presencia de inhibidor ( $V'$ ) de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina en experimento de inhibición con PV obtenidos de la **Figura 5.53**. Se muestran los valores de dos experimentos independientes.

	$V$ (nmol/min)	$V'$ (nmol/min)	$K_M$ (mM)	$R^2$
<b>Experimento 1</b>	2,1	2,0	0,20	0,979
<b>Experimento 2</b>	2,3	2,1	0,22	0,969

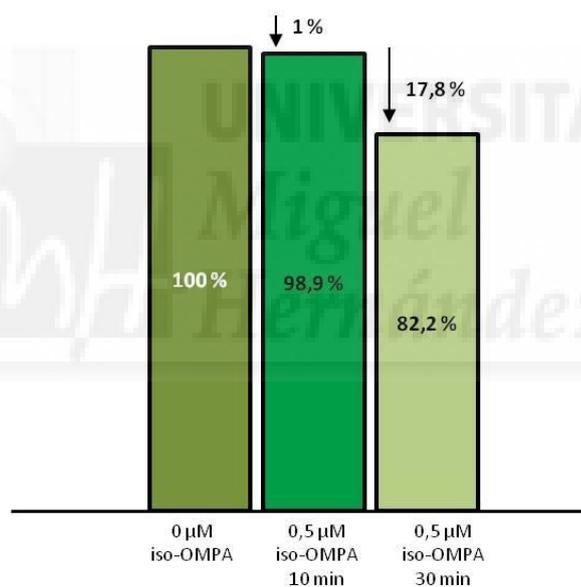
### 5.5.3. Inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina total con iso-OMPA, BW284C51 y etopropazina.

*Inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina total con iso-OMPA.*

Inhibición a dos tiempos.

Se estudió en un experimento la inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro a una concentración equivalente a 10 mg/mL de tejido fresco y se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con iso-OMPA 0,5  $\mu$ M. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. Las medidas se realizaron por triplicado. La inhibición con iso-OMPA 0,5  $\mu$ M a 10 min fue  $1 \pm 0,1\%$  y a 30 min  $17,8 \pm 0,1\%$ . (**Figura 5.54**).

La observación de diferente inhibición a los dos tiempos de incubación ensayados sugiere una inhibición dependiente del tiempo y por lo tanto de tipo irreversible.



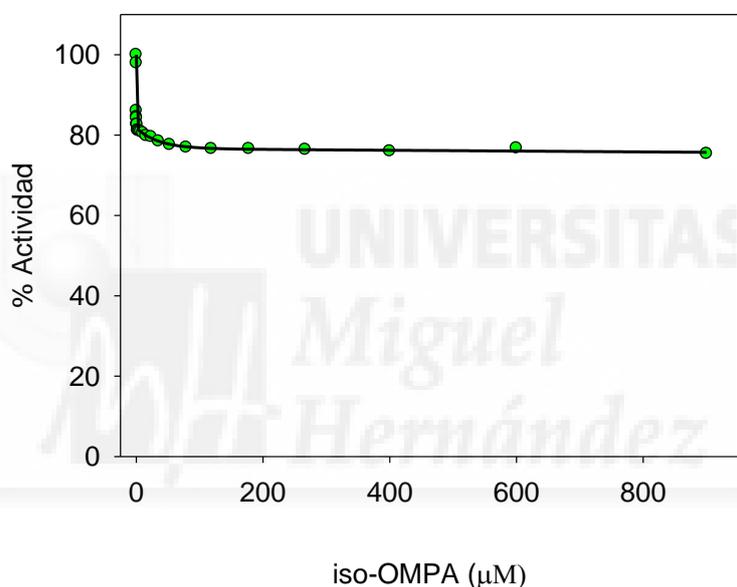
**Figura 5.54.** Inhibición de actividad hidrolizante de acetilcolina total por iso-OMPA 0,5  $\mu$ M durante 10 o 30 min de preincubación a 37°C.

## RESULTADOS

### Inhibición a tiempo fijo.

Se realizó un experimento a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de iso-OMPA, comprendidas entre 0 y 900  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad AChE. En la **Figura 5.55** se muestran los datos obtenidos así como el modelo de inhibición irreversible que mejor se ajustó según el resultado del test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de tres componentes enzimáticos (**Ec. 5.12.**). En la **Tabla 5.28** se muestran los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1 * e^{-k_1 \cdot t} + E_2 * e^{-k_2 \cdot t} + E_R \quad [\text{Ec. 5.12.}]$$



**Figura 5.55. Inhibición con iso-OMPA a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro.** Se usó la fracción particulada correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de iso-OMPA comprendidas entre 0 y 900  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad del control sin iso-OMPA. Se muestra la curva correspondiente al experimento 1 de la **Tabla 5.28**.

**Tabla 5.28. Parámetros y componentes de la curva de inhibición con iso-OMPA de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción de membrana de cerebro.** Deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial de dos componentes, según el test de la F, de los datos obtenidos.

Experim.	E <sub>1</sub> (%)	k' ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	k* ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	I <sub>50</sub> ** ( $\mu\text{M}$ )	E <sub>2</sub> (%)	k' ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	k* ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	I <sub>50</sub> ** ( $\mu\text{M}$ )	E <sub>R</sub> (%)
1	18,3	3,367	0.112	0.20	5,5	0.0241	0.000803	28,7	76,1

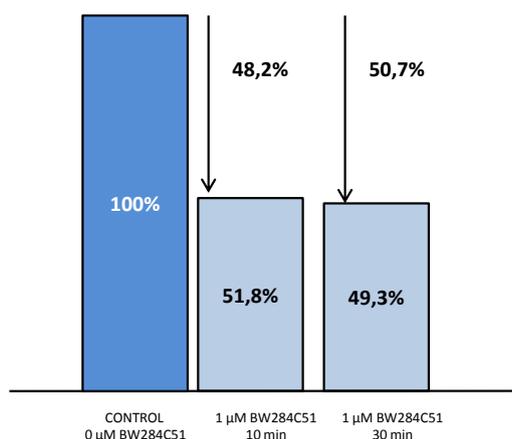
(\*)siendo K, la constante de segundo orden.  $k=k'/30$

(\*\*) $I_{50}=-\text{Ln}(0,5)/k'$

*Inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina total con BW284C51.*

Inhibición a dos tiempos.

Se estudió la inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina utilizando una concentración equivalente a 10 mg/mL de tejido fresco que se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con una concentración de BW284C51 1  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. La inhibición se calculó respecto de un control sin inhibidor. Las medidas se hicieron por triplicado. La actividad residual a los 10 min de inhibición fue de  $51,8 \pm 0,1\%$  y a los 30 min de  $49,3 \pm 0,1\%$  (**Figura 5.56**). Los resultados sugieren una inhibición no progresiva con el tiempo y por lo tanto de tipo reversible.



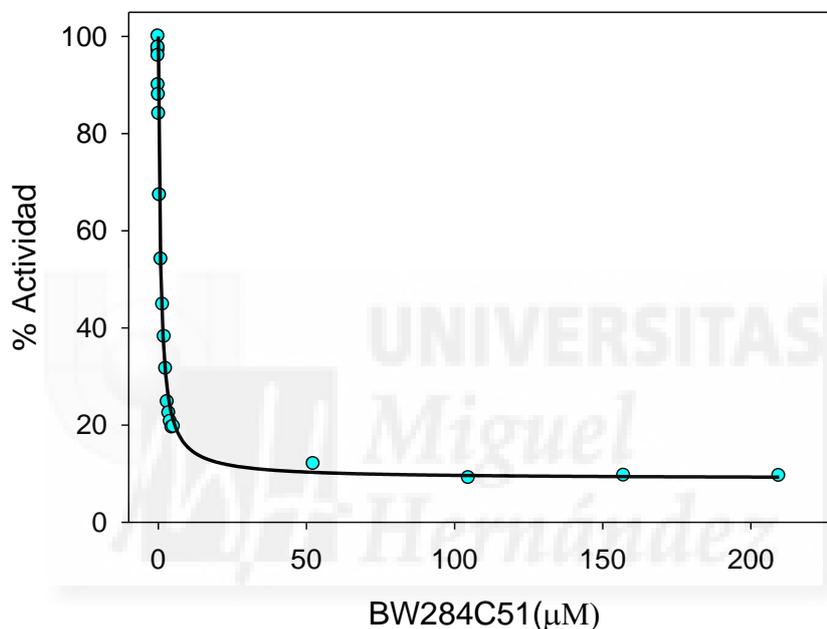
**Figura 5.56. Inhibición de actividad AChE total por BW284C51 1  $\mu\text{M}$ , durante 10 o 30 min de preincubación.**

## RESULTADOS

### Inhibición a tiempo fijo

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de BW284C51, entre 0 y 210 µM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. En la **Figura 5.57** se muestran los resultados obtenidos así como el modelo de inhibición irreversible que mejor se ajustó a los datos, según el resultado del test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de dos componentes que se inhiben y otro resistente (**Ec.5.13**). La **Tabla 5.29** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1/(1 + A * x) + E_2/(1 + B * x) + E_R \quad [\text{Ec.5.13}]$$



**Figura 5.57. Curva de inhibición con BW284C51 a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro.** Se usó la fracción de membrana correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de BW284C51 comprendidas entre 0 y 210 µM durante 30 minutos a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetilcolina del control sin BW284C51

**Tabla 5.29. Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción de membrana de cerebro.** Deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencia de la curva de inhibición a tiempo fijo con BW284C51, según el test de la F, de los datos obtenidos.

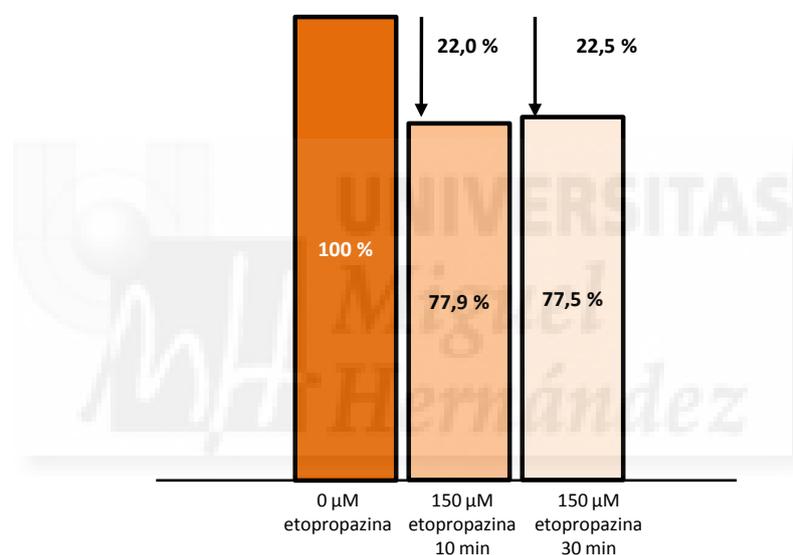
Experimento.	$E_1$ (%)	$A$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_2$ (%)	$B$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_R$ (%)
1	71,3	3,44	0,29	22,2	0,35	5,440	2,85
2	75,1	2,51	0,40	17,9	0,26	7,658	3,83

*Inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina total con etopropazina.*

Inhibición a dos tiempos.

Se estudió la inhibición de la actividad utilizando una concentración equivalente a 10 mg/mL de tejido fresco y se preincubó durante 10 o 30 min a 37°C con una concentración de etopropazina 150  $\mu$ M. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. La inhibición se calculó respecto de un control que no llevaba inhibidor. Las medidas se hicieron por triplicado.

La inhibición con etopropazina no aumentó durante 30 min respecto a la observada a 10 min (**Figura 5.58**). La observación de que no hay diferencias en la inhibición a los dos tiempos ensayados sugiere una inhibición no progresiva con el tiempo y por lo tanto de tipo reversible.



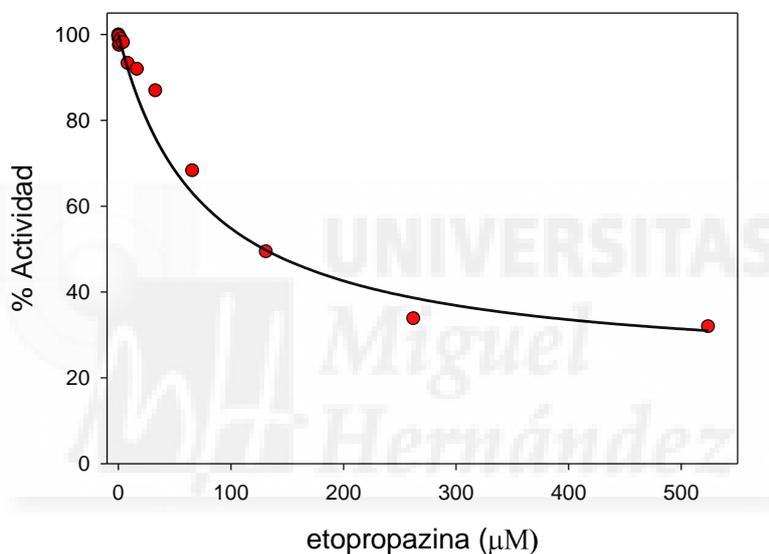
**Figura 5.58.** Inhibición de actividad AChE total por etopropazina 150  $\mu$ M, durante 10 o 30 min de preincubación.

## RESULTADOS

### Inhibición a tiempo fijo

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de etopropazina, entre 0 y 524  $\mu\text{M}$ . Transcurrido ese tiempo se midió la actividad. En la **Figura 5.59** se muestran los datos experimentales obtenidos así como el modelo de inhibición reversible que mejor se ajustó a los datos, según el resultado del test de la F. El mejor ajuste fue el de dos componentes (**Ec. 5.14.**). La **Tabla 5.30** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1/(1 + A * x) + E_R \quad [\text{Ec. 5.14.}]$$



**Figura 5.59. Curva de inhibición a tiempo fijo con etopropazina de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro.** Se usó la fracción de membrana correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de etopropazina comprendidas entre 0 y 524  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetilcolina del control sin etopropazina.

**Tabla 5.30. Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción de membrana de cerebro.** Deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial de las curvas de inhibición a tiempo fijo con etopropazina, según el test de la F, de los datos obtenidos.

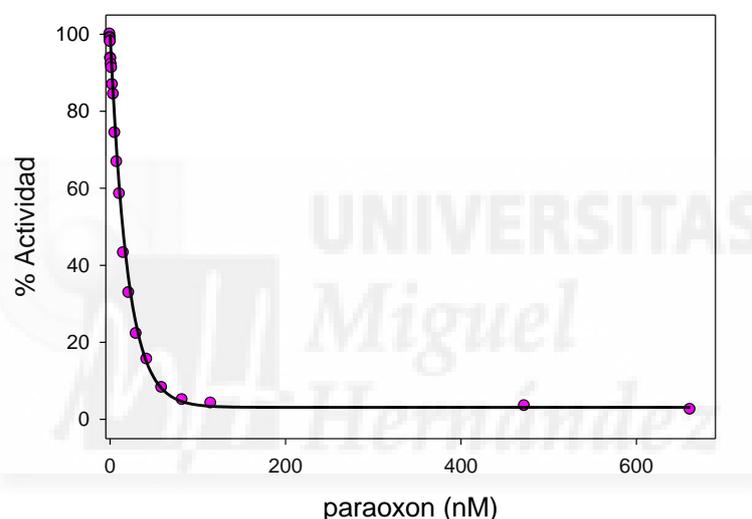
Experimento.	$E_1$ (%)	$A$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_R$ (%)
1	82,3	0,0135	74,05	17,6
2	83,1	0,0133	74,71	16,9

#### 5.5.4. Inhibición de la actividad hidrolizante de acetilcolina con OPs

##### *Inhibición de la actividad total con paraoxon.*

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de paraoxon comprendidas entre 0 y 650 nM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad AChE. En la **Figura 5.60** se muestran los datos obtenidos de uno de los experimentos así como el modelo que mejor se ajustó según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de dos componentes (**Ec. 5.15.**). La **Tabla 5.31** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1 * e^{-k \cdot I} + E_R \quad [\text{Ec. 5.15.}]$$



**Figura 5.60.** Curva de inhibición con paraoxon a tiempo fijo de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro. Se usó la fracción de membrana correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de paraoxon comprendidas entre 0 y 650 nM durante 30 minutos a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetilcolina del control sin paraoxon.

## RESULTADOS

**Tabla 5.31. Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro.** Valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial, según el test de la F, del experimento de inhibición con concentraciones variables de paraoxon en un tiempo de inhibición fijo de 30 minutos.

Experimento	E <sub>1</sub> (%)	k' (nM <sup>-1</sup> )	k* (nM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	I <sub>50</sub> ** (nM)	E <sub>2</sub> (%)
1	96,8	0,050	0,0017	13,64	3,1
2	96,1	0,056	0,0019	12,26	3,8

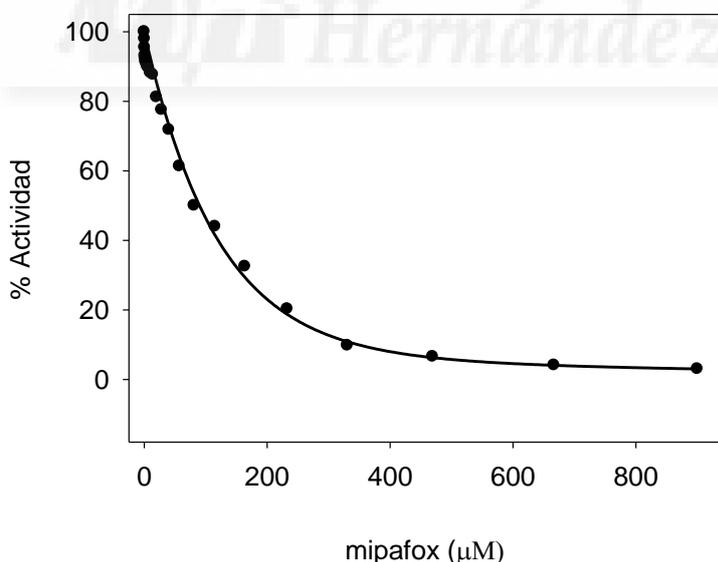
(\*)siendo K, la constante de segundo orden.  $k=k'/30$

(\*\*)  $I_{50} = -\ln(0,5)/k'$

### *Inhibición de la actividad total con mipafox.*

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de mipafox comprendidas entre 0 y 900 µM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad AChE. En la **Figura 5.61** se muestran los datos obtenidos de uno de los experimentos así como el modelo que mejor se ajustó según el test de la F. El mejor ajuste fue el modelo de un componente que se inhibe y otro resistente (**Ec. 5.16**). La **Tabla 5.32** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1 * e^{-k \cdot I} + E_R \quad [\text{Ec. 5.16}]$$



**Figura 5.61. Curva de inhibición a tiempo fijo con mipafox de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de membrana de cerebro.** Se usó la fracción de membrana correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de mipafox comprendidas entre 0 y 900 µM durante 30 minutos a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetiltiocolina del control sin mipafox.

**Tabla 5.32. Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro.** Valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial, según el test de la F, del experimento de inhibición con concentraciones variables de mipafox en un tiempo de inhibición fijo de 30 minutos.

Experimento	E <sub>1</sub> (%)	k' (μM <sup>-1</sup> )	k (μM <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )*	I <sub>50</sub> (μM)**	E <sub>R</sub> (%)
1	97,2	0,01	0.00033	67,3	2,7
2	96,8	0,007	0,00025	90,1	3,2

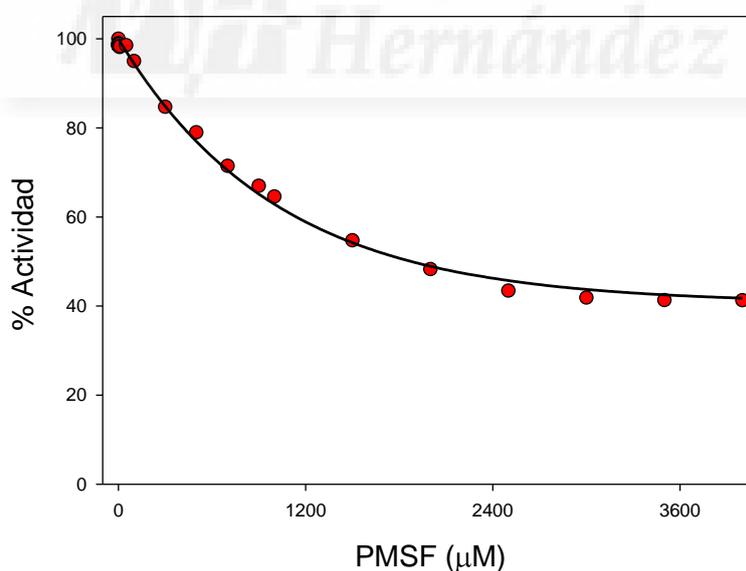
(\*)siendo K, la constante de segundo orden.  $k=k'/30$

(\*\*)  $I_{50} = -\ln(0,5)/k'$

#### *Inhibición de la actividad total con PMSF.*

Se realizaron dos experimentos independientes a tiempo fijo de preincubación durante 30 min a 37°C con concentraciones crecientes de PMSF comprendidas entre 0 y 1500 μM. Transcurrido ese tiempo se midió la actividad AChE. Los datos se ajustaron a un modelo de inhibición irreversible considerando que el inhibidor se hidroliza con el tiempo (Estévez et al, 2007). En la **Figura 5.62** se muestra el modelo que mejor se ajustó según el test de la F que fue el modelo de un componente que se inhibe y otro resistente (**Ec. 5.17.**). La **Tabla 5.33** muestra los parámetros obtenidos tras el ajuste.

$$E = E_1 * e^{((e^{(-kh \cdot I)} - 1) * (k/kh))} + E_R \quad [\text{Ec. 5.17.}]$$



**Figura 5.62. Curva de inhibición a tiempo fijo con PMSF de la actividad hidrolizante de acetilcolina de membrana de cerebro.** Curva de inhibición de la actividad de membrana correspondiente a 10 mg/mL de tejido fresco con varias concentraciones de PMSF comprendidas entre 0 y 1500 μM durante 30 minutos a 37°C. Los porcentajes de actividad están referidos a la actividad hidrolizante de acetilcolina del control sin PMSF.

## RESULTADOS

**Tabla 5.33. Parámetros y componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina de fracción soluble de cerebro.** Valores deducidos del ajuste matemático al mejor modelo exponencial, según el test de la F, del experimento de inhibición con concentraciones variables de mipafox en un tiempo de inhibición fijo de 30 minutos.

Experimento	$E_1$ (%)	kh ( $\text{min}^{-1}$ )	k ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_R$ (%)
1	62,0	0,29	0.00022	707	37,9
2	61,5	0,24	0.00021	731	38,4





## **6. DISCUSIÓN**



## 6.1. COMPARATIVA ENTRE EL MÉTODO PROPUESTO Y EL MÉTODO CINÉTICO TRADICIONAL DE ELLMAN.

### *El método cinético de Ellman*

Ellman et al., (1961) propusieron el método colorimétrico con acetiltiocolina/DTNB para determinar la actividad colinesterasa (ChE) en eritrocitos y en tejido. Este método se basa en el uso análogo del sustrato biológico (acetilcolina) y el uso del llamado reactivo de Ellman (DTNB) que reacciona con el grupo tiol del producto de reacción (tiocolina). Con este método se mide la absorbancia de forma continua incubando juntos el sustrato y el cromógeno (DTNB). La actividad se estima a partir del incremento en la absorbancia entre dos tiempos de reacción sin llegar a detener la reacción enzima-sustrato.

Este método es el más utilizado para medir la colinesterasa y ha sido de gran utilidad en investigación y en diagnóstico clínico durante más de 50 años. El método presentaba algunos inconvenientes:

- la absorbancia máxima del producto de la reacción coincide con el pico de absorbancia máxima de la hemoglobina a 412 nm en la determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de eritrocitos (Worek et al, 1999; Worek et al, 2012; Eyer et al, 2003).
- Algunos autores han descrito que la presencia de DTNB en la mezcla de reacción puede alterar la actividad AChE (Komersová et al, 2007) debido a que el TNB producido y el DTNB pueden inhibir parcialmente esta actividad. En experimentos de inhibición y de reactivación, el DTNB interacciona con el inhibidor o el agente reactivante (Komersová et al, 2007).
- El DTNB no sólo reacciona con la tiocolina sino que lo hace también con los grupos tioles de las proteínas, por ejemplo en los eritrocitos hemolisados (Reiner, E. 2000) por lo que el color formado por la reacción con proteínas interfiere con el de la formación de tiocolina.

Bellino et al. 1978, describieron un método en el cual se detuvo la reacción con SDS, midiendo posteriormente la absorbancia. En este método el DTNB se añade al sustrato desde el inicio de la reacción enzima-sustrato y después se añade SDS al final para detener la reacción.

En este trabajo, hemos desarrollado un ensayo para la medida de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina donde en lugar de añadir el DTNB junto al sustrato como en los métodos de Ellman y de Bellino, añadimos el DTNB al final del tiempo de reacción, cuando está ya detenida con SDS 17 mM (2 %).

## DISCUSIÓN

El motivo de utilizar esta concentración de SDS es porque el método de medida de la actividad PVasa utiliza esta misma concentración. El método en si es una modificación del método Ellman pero con la ventaja de que nos permite eliminar las interferencias.

Otra de las diferencias que se han encontrado respecto al método de Ellman fue que la actividad utilizando butirilcolinesterasa humana fue mayor ( $0,66 \pm 0,03$  mmol de tiocolina/nmol hButChE/min) que realizando la medida con el método original ( $0,37 \pm 0,02$  mmol de tiocolina/nmol hButChE/min).

Este método puede optimizarse con el fin de poder procesar un gran número de muestras en ensayos cinéticos complejos con inhibidores organofosforados en diferentes tejidos, el método se puede llevar a cabo de forma manual, o con estaciones de trabajo automatizados lo que aumenta la reproducibilidad y disminuye el tiempo manual de ensayo. La absorbancia puede ser leída en un espectrofotómetro convencional o en un lector de microplacas. El diseño del método utilizado en este trabajo es similar al utilizado para medir la actividad PVasa (Johnson, M.K, 1977; Escudero et al, 1996; Estévez et al, 2004; Mangas et al, 2012) lo que permitió medir ambos tipo de enzimas por el mismo procedimiento cambiando sustrato y cromógeno.

El tiempo de reacción se puede reducir incrementando la concentración de la enzima en la preparación. Las muestras que presentan una menor actividad se pueden ensayar utilizando un tiempo de reacción más largo o una concentración de tejido superior.

Este método reduce el tiempo global del ensayo en experimentos complejos en los que se necesitan un gran número de muestras (es decir, en experimentos de inhibición progresiva con el tiempo con varias concentraciones de inhibidor y tiempos de inhibición) y también pueden realizarse en paralelo simultáneamente con muchas muestras y en diferentes condiciones. Esto también facilita aplicaciones automatizadas robóticas.

El volumen final del ensayo que se utilizó fue de 820  $\mu$ L en un minitubo de 1 mL, de los cuales se utilizaron 300  $\mu$ L para la lectura de la absorbancia en pocillos de la microplaca (350  $\mu$ L de capacidad). Sin embargo, se pueden utilizar otros volúmenes menores siempre y cuando se mantengan las proporciones si la intención es, o bien utilizar una menor cantidad de tejido o para hacer una reacción en la misma microplaca.

El color final es estable (durante un tiempo de al menos 30 min), este hecho permite medir en cualquier momento, una vez parada la reacción, según sea necesario. Todo esto facilita el diseño cuando se procesan muchas muestras.

El DTNB reacciona con la tiocolina producida enzimáticamente y con la producida por la hidrólisis espontánea, además reacciona con otros grupos tiol de las proteínas en la muestra. Por lo tanto, el método necesita blancos apropiados en los que se tenga en cuenta no sólo el color de la hidrólisis espontánea del sustrato si no también el color de fondo de los grupos tiol de las proteínas en la preparación de enzima diluida.

El blanco puede ser eliminado, si se tiene previamente demostrado, que el aumento del color causado por la preparación de enzima es insignificante.

En los experimentos realizados para validar este método cuando se utilizó la disolución de DTNB 6 mM / SDS 2%, la absorbancia se comportó de forma lineal frente a la concentración de tiocolina (**Figura 5.3**) y la actividad fue lineal frente a la concentración de la enzima y el tiempo de reacción (**Figura 5.6**). Por lo tanto, podemos concluir que el SDS no afectó a la medida colorimétrica.

Este método ha sido utilizado para realizar una curva de Michaelis-Menten de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina en fracción soluble de cerebro de pollo (**Figura 5.4**) donde se estimó una  $K_m$  de 158,4  $\mu\text{M}$ , que es comparable a la  $K_m$  de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de cerebro de gallina 105,2  $\mu\text{M}$ , como fue estimada por Kemp y Wallace en 1990, utilizando el método de Ellman y otros procedimientos para preparar el tejido homogeneizado.

El método propuesto permite:

- (i) Evitar reacciones no deseadas por el DTNB y TNB (Komersová et al, 2007).
- (ii) Optimizar el tiempo de reacción con el sustrato con el fin de minimizar el efecto de las reacciones entre el sustrato y otros productos químicos, tales como oximas, en ensayos de reactivación (Šinko et al, 2007).
- (iii) Minimizar el efecto de la " on-going inhibition" en los ensayos de inhibición con OPs donde la reacción de inhibición se lleva a cabo antes de añadir el sustrato de reacción (Estévez et al, 2010).
- (iv) Procesar muchas muestras en paralelo.
- (v) Sincronizar y diseñar mejor los tiempos cuando se usa para estudios de cinética de inhibición con inhibidores irreversibles (como OPs, carbamatos y otros) en ensayos a diferentes tiempos de inhibición y muchas muestras (por ejemplo 5 concentraciones de inhibidor por 12 tiempos diferentes por triplicado, más varios controles  $\geq 180$  muestras en un experimento).
- (vi) Utilizar un procedimiento similar para medir actividad colinesterasa y carboxilesterasa, como fenilvalerato esterasa, como se aplica en este trabajo (**Figura 4.4. y 4.5.**).

## 6.2. COMPETICIÓN DE SUSTRATOS: FENILVALERATO/ACETILTIOCOLINA EN ACTIVIDADES DE FRACCIÓN SOLUBLE.

El objetivo de estos estudios es analizar la interacción de la acetiltiocolina con los tres componentes de actividad PVasa discriminados en estudios anteriores en nuestro laboratorio en la fracción soluble de cerebro de pollo (Mangas et al, 2012):

- **E $\alpha$**  (11-23 % de la actividad enzimática total,  $I_{50}$  (30 min) = 9-11 nM) es el componente más sensible para paraoxon y también el más sensible para mipafox ( $I_{50}$  (30 min) = 4 nM). Este componente se reactiva de forma espontánea después de la inhibición con paraoxon.
- **E $\beta$**  (71-84 % de la actividad enzimática total;  $I_{50}$  (30 min) = 1216 nM) es el segundo componente sensible a paraoxon, pero es prácticamente resistente a mipafox.
- **E $\gamma$**  (5-8 % de la actividad enzimática total) es resistente a paraoxon y tiene una  $I_{50}$  (30 min) de 3400 nM con mipafox, similar a la obtenida en NTE (esterasa diana de neuropatía).

Los componentes de la actividad PVasa se han discriminado pre-incubando con PMSF, paraoxon o mipafox (componentes E $\alpha$ , E $\beta$  y E $\gamma$  respectivamente) para inhibirlos irreversiblemente y estudiar la actividad residual. Las concentraciones empleadas para la discriminación de los componentes enzimáticos en la actividad PVasa se basan en las propiedades descritas por Mangas et al (2012).

- El componente E $\alpha$  se midió como la actividad resistente a PMSF 1500  $\mu$ M.
- El componente E $\beta$  se midió como la actividad resistente a mipafox 25  $\mu$ M.
- E $\gamma$  como la actividad resistente a paraoxon 25  $\mu$ M.

Las proporciones observadas (**Figura 5.8**) muy similares a los obtenidos por Mangas et al en sus trabajos.

Las mismas condiciones de inhibidores fueron aplicadas a la actividad hidrolizante de acetiltiocolina para distinguir las fracciones de actividad colinesterasa (**Figura 5.23**).

Se estudió la interacción del sustrato acetiltiocolina con la actividad PVasa y el efecto de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina, tanto en la fracción soluble de cerebro de pollo como en las fracciones/componentes de ambas actividades discriminadas con inhibidores.

*Estudios preliminares de interacciones de PVasa total con acetiltiocolina.*

Con la actividad PVasa total (**Tabla 5.3**) en la fracción soluble de cerebro de pollo, se observó que existía una inhibición parcial de la actividad PVasa por acetiltiocolina o con acetil- $\beta$ -metiltiocolina. Los porcentajes de inhibición fueron similares con ambos compuestos. La acetil- $\beta$ -metil-tiocolina es un sustrato considerado específico de la AChE (Vidal, C., 1981). La conclusión que se extrae de estos experimentos, es que la actividad PVasa total de fracción soluble de cerebro de pollo, interacciona de alguna forma con el sustrato de la actividad acetilcolinesterasa. Por ello se realizaron diversos experimentos para analizar esas interacciones entre sustratos de actividad PVasa y ChE en los componentes/fracciones de actividad.

En la **Tabla 6.1** se resumen y comparan los resultados de los estudios cinéticos de interacción entre sustratos de las actividades PVasa e hidrolizante de acetilcolina.

**Tabla 6.1. Comparaciones de las constantes cinéticas obtenidas de los experimentos de interacción de sustratos de la actividad PVasa y ChE, en fracción soluble de cerebro.** Los datos de esta tabla resumen y comparan los datos que se muestran en los resultados en las Tablas 5.4, 5.5, 5.6, 5.11 y 5.12. y en las Figuras 5.9., 5.10 y 5.11

Actividad	Inhibidor	Vmax (nmoles/min)	Km (mM)	Ki (mM)	TIPO INHIBICIÓN
PVasa resistente a 1500 $\mu$ M PMSF (E $\alpha$ )	Acetiltiocolina	2392/3741	0,124/0,229	6,60/7,60	No competitiva
ChE resistente a 1500 $\mu$ M PMSF	PV	12,2/12,2	0,090/0,111	1,70/2,23	Competitiva
PVasa resistente a 25 $\mu$ M mipafox (E $\beta$ )	Acetiltiocolina	5465/5999	0,107/0,160	-----	No inhibe
ChE resistente a 25 $\mu$ M mipafox	PV	6,6/6,9	0,050/0,065	0,440/0,570	Competitiva
PVasa resistente a 25 $\mu$ M paraoxon (E $\gamma$ )	Acetiltiocolina	1255/1281	0,0071/0,0083	0,198/0,257	Competitiva
ChE resistente a 25 $\mu$ M paraoxon	PV	-----	-----	-----	No actividad

## DISCUSIÓN

### *Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a PMSF 1500 $\mu$ M.*

La actividad PVasa resistente a PMSF 1500  $\mu$ M (componente E $\alpha$ ) se inhibió en presencia de acetiltiocolina. Se observó que la Vmax disminuyó al incrementar la concentración de acetiltiocolina sin alterarse el valor de la Km. El mejor modelo que se ajustó a los datos experimentales fue un modelo de inhibición no competitiva.

Paralelamente se estudió el comportamiento de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1500  $\mu$ M con fenilvalerato. La Km aumentó al incrementar la concentración de PV y la Vmax permaneció constante, ajustándose a un modelo de inhibición competitiva.

De acuerdo a estos resultados el mecanismo de inhibición en ambos casos es aparentemente diferente como se puede ver en la **Tabla 6.1**.

La Km observada de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina es comparable a la Km obtenida para AChE en cerebro de pollo descritas por Kemp y Wallace (1990) y al-Jafari y Kamal (1994) (0.053 y 0.196 mM, respectivamente).

Los valores deducidos de la Km de actividad PVasa y de hidrolizante de acetiltiocolina fueron también similares (**Tabla 6.1**). Sin embargo la Ki obtenida en la inhibición de la actividad PVasa con acetiltiocolina es mayor que la Ki de la inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con fenilvalerato. Esto sugiere que ambos sustratos interactúan en el mismo centro pero que la afinidad del fenilvalerato es mayor que la de la acetiltiocolina.

El comportamiento competitivo de la interacción del fenilvalerato con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina, sugiere que éste podría interactuar en el mismo centro activo de la esterasas hidrolizante de acetiltiocolina.

Sin embargo la interacción de la acetiltiocolina con el componente E $\alpha$  de la actividad PVasa, mostró un comportamiento no competitivo que sugiere una interpretación más compleja.

Respecto al componente E $\alpha$ , estos resultados pueden interpretarse con diferentes opciones como sigue:

- A. La existencia de una proteína con actividad PVasa e hidrolizante de acetiltiocolina, pero con diferentes centros activos.
- B. Contiene proteínas con actividad PVasa, pero sin actividad hidrolizante de acetiltiocolina que interactúan con la acetiltiocolina.
- C. La misma proteína tiene actividad hidrolizante de fenilvalerato y acetiltiocolina, con el mismo centro catalítico pero la interacción está sujeta a mecanismos diferentes.

*Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a mipafox 25  $\mu$ M.*

La actividad PVasa resistente a mipafox (componente E $\beta$ ) no se afectó con acetiltiocolina, sin embargo la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox 25  $\mu$ M se inhibió con fenilvalerato.

La Km aumentó al incrementar la concentración de PV y la Vmax permaneció constante, ajustándose a un modelo de inhibición competitiva

La Km obtenida para la actividad PVasa fue similar a la obtenida para el componente E $\alpha$ , mientras que la Km deducida para la actividad hidrolizante de acetiltiocolina es comparable a la Km publicada para las actividades de AChE de cerebro de pollo (ver apartado anterior).

La Ki para la actividad colinesterasa resistente a mipafox es menor que la estimada para la actividad resistente a PMSF, sugiriendo que la afinidad del fenilvalerato por la actividad resistente a mipafox 25  $\mu$ M es mayor.

En nuestro laboratorio, se había observado que concentraciones no inhibitorias de PMSF y mipafox dan lugar a un cambio de sensibilidad en las esterasas de fracción soluble de cerebro respecto a otros inhibidores organofosforados. La conclusión extraída es que el PMSF y otros inhibidores podrían interactuar en otros centros además del catalítico (Mangas et al. 2011, Estévez et al., 2013). Basándonos en todo esto, no puede descartarse que la pre-incubación con PMSF o mipafox pueda causar alguna alteración de las propiedades observadas en la actividad resistente.

*Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a paraoxon 25  $\mu$ M.*

La actividad PVasa resistente a paraoxon 25  $\mu$ M (componente E $\gamma$ ), se inhibió en presencia de acetiltiocolina. Se observó que la Km aumentó al aumentar la concentración de acetiltiocolina y la Vmax permaneció constante, ajustándose a un modelo de inhibición competitiva (Tabla 6.1).

La Km obtenida para la actividad PVasa de este componente fue menor que las obtenidas para E $\alpha$  y E $\beta$ . La Ki de la interacción de la acetiltiocolina con el componente E $\gamma$  es menor que la obtenida para el componente E $\alpha$  indicando que la afinidad por la acetiltiocolina es mayor en el componente E $\gamma$  que en el E $\alpha$ .

## DISCUSIÓN

La inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con PV no se ha podido estudiar debido a que a la concentración de paraoxon utilizada para discriminar este componente, inhibió toda la actividad, hecho que coincide con la sensibilidad de la AChE de cerebro de pollo al paraoxon cuya  $I_{50}$ (30 min) se sitúa en niveles de concentración nanomolar (10-28 nM) (Lotti and Johnson, 1978; Kemp and Wallace, 1990).

La inhibición del componente E<sub>γ</sub> de la actividad PVasa con acetiltiocolina, muestra un comportamiento competitivo, sugiriendo que la acetiltiocolina actúa como un inhibidor reversible en el centro activo de la actividad PVasa.



### 6.3. COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD PVASA SOLUBLE DE CEREBRO CON INHIBIDORES.

En el apartado anterior se demostró que hay inhibición de la actividad PVasa total y de los componentes E $\alpha$  y E $\gamma$  con acetilcolina. Para comprender la relación con acetilcolinesterasa se estudiaron las interacciones de inhibidores típicos de colinesterasas con la actividad PVasa total y con sus componentes E $\alpha$  y E $\gamma$ . Los resultados de estos estudios se resumen y comparan en las **Tablas 6.2 y 6.3**.

**Tabla 6.2. Comparación de los resultados de la Inhibición a dos tiempos diferentes de actividad PVasa, en fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores de inhibición obtenidos para 10 o 30 min con los diferentes inhibidores. Los datos aquí comparados corresponden a los resultados obtenidos en las **Figuras 5.12, 5.14, 5.16, 5.18, 5.19, 5.20, 5.21 y 5.22**. Se indica el valor de % inhibición y DE de un experimento por triplicado.

Fracción	Inhibidor	Inhibición 10 min (% $\pm$ DE)	Inhibición 30 min (% $\pm$ DE)	Dependencia tiempo
<b>E<math>\alpha</math></b>	BW284C51 50 $\mu$ M	0,7 $\pm$ 1,1	0,8 $\pm$ 1,0	NO INHIBE
	iso-Ompa 1 $\mu$ M	1,9 $\pm$ 4,0*	13,1 $\pm$ 1,8	SI
	iso-Ompa 10 $\mu$ M	9,6 $\pm$ 2,0*	25,7 $\pm$ 0,5	SI
	iso-Ompa 100 $\mu$ M	37,4 $\pm$ 4,0*	63,4 $\pm$ 2,3	SI
	Etopropazina 100 $\mu$ M	46,9 $\pm$ 2,1	46,9 $\pm$ 2,1	NO
<b>E<math>\gamma</math></b>	BW284C51 50 $\mu$ M	13,2 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	SI
	iso-Ompa 0,4 $\mu$ M	2 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,5	SI
	iso-Ompa 1 $\mu$ M	32,5 $\pm$ 0,5	26,7 $\pm$ 0,1	-
	iso-Ompa 5 $\mu$ M	17,0 $\pm$ 0,9	38,2 $\pm$ 1,0	SI
	iso-Ompa 25 $\mu$ M	19,1 $\pm$ 0,5	35,5 $\pm$ 0,1	SI
	iso-Ompa 900 $\mu$ M	39,7 $\pm$ 0,1	39,1 $\pm$ 0,1	-
	Etopropazina 100 $\mu$ M	21,6 $\pm$ 0,1	31,7 $\pm$ 0,6	SI
<b>Total</b>	BW284C51 50 $\mu$ M	4,0 $\pm$ 0,1	12,1 $\pm$ 0,1	SI
	iso-Ompa 900 $\mu$ M	18,5 $\pm$ 0,1	34,9 $\pm$ 0,1	SI
	Etopropazina 100 $\mu$ M	19,2 $\pm$ 0,1	18,2 $\pm$ 0,5	NO

(\*) En el caso de la inhibición de E $\alpha$  con iso-OMPA el tiempo utilizado para inhibir fue de 15 min en lugar de 10 min.

## DISCUSIÓN

**Tabla 6.3. Interpretación global de los distintos componentes enzimáticos de actividad PVasa detectados en fracción soluble de cerebro de pollo con los inhibidores ensayados y con los inhibidores utilizados en los trabajos de Mangas et al.** Se muestran los valores de  $I_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) obtenidos en dos experimentos independientes. La amplitud de cada componente se expresa indicando el rango de valores teniendo en cuenta globalmente los valores obtenidos con los diferentes inhibidores.

Inhibidor	Componente Amplitud TIPO	$E\alpha$ (11-23%)	$E\beta$ (63-84%)	$E\gamma$ (5-15%)
iso-OMPA	Irreversible	22,1/36,7	R	0,1/0,2
etopropazina	Reversible Irreversible	0,005/0,001	R	3,47/7,6
BW284c51	Irreversible		R	43,9/68,6
paraoxon*	Irreversible	0,009/0,011	1,22	R
mipafox*	Irreversible	0,004	R	3,40 $\mu\text{M}$
PMSF*	Irreversible	R	70	447 **

\*Datos extraídos del artículo publicado por Mangas et al, 2012.

\*\*150 deducidos para 30 min de inhibición, excepto para el PMSF que están estimados para 20 min debido a su rápida degradación espontánea.

### 6.3.1. Inhibición con iso-OMPA

#### *Inhibición a diferentes tiempos en actividad PVasa total.*

El iso-OMPA es considerado un inhibidor irreversible y específico de la butirilcolinesterasa (Silver, 1974) y es utilizado en un gran número de trabajos para discriminar entre AChE y BuChE (Giacobini, 2003; Singh et al 2013; Pohanka et al, 2011; Nostrandt et al, 1993). Existen pocos trabajos donde se estudie la inhibición de actividad carboxilesterasa no colinesterásica con iso-OMPA, entre estos se han encontrado algunos estudios que relacionan la potenciación de la toxicidad de algunos compuestos como el soman en la inhibición de las carboxilesterasas de plasma de ratas (Grubic, Z. 1988) y el carbofuran (Gupta, R.C., 1989) con el pretratamiento con iso-OMPA.

Los experimentos realizados al inhibir la actividad total con iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$  durante 10 o 30 min, obtenemos porcentajes de inhibición diferentes, 18,5% de inhibición a los 10 min y 34,9% a los 30 min (**Tabla 6.2.**) lo que sugiere una inhibición dependiente del tiempo y por lo tanto se puede considerar de tipo irreversible.

#### *Inhibición de los componentes E $\alpha$ y E $\gamma$ de la actividad PVasa.*

Al inhibir el componente E $\alpha$  (resistente a PMSF 1500  $\mu\text{M}$ ) con iso-OMPA 1, 10 ó 100  $\mu\text{M}$  a diferentes tiempos se observó una inhibición dependiente del tiempo y por lo tanto se puede considerar irreversible. Estos resultados sugieren que el componente E $\alpha$  podría ser o contener BuChE.

Los experimentos de inhibición del componente E $\gamma$  (resistente a paraoxon 25  $\mu\text{M}$ ) con iso-OMPA 0,4, 5 ó 25  $\mu\text{M}$  a 10 o 30 minutos muestran inhibición mayor a 30 que a 10 min y por lo tanto se puede considerar irreversible (**Tabla 6.2.**)

La sensibilidad al iso-OMPA del componente E $\gamma$  en estas condiciones de ensayo es menor de la esperada al comparar con la obtenida en actividad total. Resultados similares fueron obtenidos por Estévez et al (2012) cuando se analizó la sensibilidad al mipafox del componente E $\gamma$ , al preinhibir con paraoxon, la sensibilidad de E $\gamma$  al mipafox fue disminuyendo a medida que aumentó la concentración de éste; la inhibición con 250  $\mu\text{M}$  de mipafox sin preincubar con paraoxon fue del 100%, pero al preincubar con paraoxon 10  $\mu\text{M}$  la inhibición con mipafox 250  $\mu\text{M}$  fue de solo el 36,6%. Los autores concluyeron que probablemente existían diferentes centros de interacción además del centro activo de hidrólisis del PV. Aquí podría estar ocurriendo algo similar de forma que la preincubación con paraoxon cambia la sensibilidad del componente E $\gamma$  modificando el sitio de unión del iso-OMPA. De hecho la inhibición que alcanzamos a partir de 5  $\mu\text{M}$  de iso-OMPA es de 38%, muy similar a la obtenida por Estévez et al (2012).

## DISCUSIÓN

### *Inhibición a tiempo fijo de actividad PVasa total*

La actividad PVasa total se inhibió con iso-OMPA 1500  $\mu\text{M}$  (la máxima concentración ensayada) un 40,3%. Como se ha visto en el apartado anterior, la inhibición de la actividad PVasa total con iso-OMPA es de tipo irreversible. De acuerdo con esto se han utilizado las ecuaciones del modelo irreversible descritas en el **Capítulo 2**. El mejor modelo según el test de la F fue un modelo de tres componentes sensibles:

- Un componente muy sensible con una amplitud de 8,3-10,5 % de la actividad enzimática total y una  $I_{50}$  para 30 min de 0,1-0,2  $\mu\text{M}$ .
- Un componente de una amplitud de 20,3-23,0 % de la actividad total y una  $I_{50}$  de 22,1-36,7  $\mu\text{M}$  para 30 min.
- Un componente más resistente con una proporción de 68,6-69,1% y una  $I_{50}$  de 7180-7810  $\mu\text{M}$  para 30 min. La  $I_{50}$  para este componente es superior a la concentración más alta utilizada de inhibidor por lo que se puede considerar resistente en estas condiciones experimentales.

El número de componentes y su amplitud son comparables (**Tabla 6.3**) a los discriminados en los trabajos de Mangas et al (2012), de manera que el componente más sensible sería el componente  $E\gamma$  que está descrito con una amplitud de 5-8%, el componente  $E\alpha$  de sensibilidad intermedia (11-23%) y el componente  $E\beta$  es prácticamente resistente, con una amplitud de 71-84%.

### 6.3.2. Inhibición con BW284C51.

#### *Inhibición a diferentes tiempos en actividad PVasa total.*

El BW284C51 es un inhibidor reversible y considerado específico de la acetilcolinesterasa usado en estudios llevados a cabo en diferentes tejidos y grupos animales como peces, eritrocitos bovinos, suero de caballo, córtex cerebral y plasma de rata. (Olivera-Bravo et al, 2005; Silver, 1974)

La actividad residual PVasa total a 10 min con BW284C51 50  $\mu\text{M}$  fue 96,0% y a 30 min 87,9% (**Tabla 6.2**). La interacción del BW284C51 con la actividad PVasa total soluble de cerebro de pollo es dependiente del tiempo y por lo tanto se puede considerar irreversible.

#### *Inhibición de los componentes E $\alpha$ y E $\gamma$ de la actividad PVasa.*

Se encontró que el BW284C51 no inhibe al componente E $\alpha$ .

El componente E $\gamma$  se inhibe con BW284C51 50  $\mu\text{M}$  un 13,2% a 10 min y 22,3% a 30 min. Por lo tanto la inhibición es dependiente del tiempo y se puede considerar irreversible.

Estos resultados nos sugieren una clara diferencia entre estos dos componentes enzimáticos y que el carácter irreversible observado en la inhibición de la actividad PVasa total es debido a la inhibición de E $\gamma$ , mientras que E $\alpha$  no se inhibe por BW284C51.

#### *Inhibición a tiempo fijo de PVasa total*

A tiempo fijo, la actividad PVasa total, se inhibió con BW284C51 1000  $\mu\text{M}$  (la máxima concentración ensayada) un 15,52%. Como se ha visto en el apartado anterior la inhibición de la actividad PVasa total con BW284C51 es de tipo irreversible, de acuerdo con esto se han utilizado las ecuaciones del modelo irreversible descritas en el **Capítulo 2**. El mejor modelo fue de dos componentes uno sensible a la inhibición y otro resistente:

- El componente sensible a BW284C51 tiene una amplitud de 13,6-14,0 % de la actividad enzimática total y una  $I_{50}$  para 30 min de 43,9-69,3  $\mu\text{M}$ .
- El componente resistente tiene una proporción de 85,9-86,4%.

La proporción del componente sensible concuerda con el componente E $\gamma$  que está descrito anteriormente (Mangas et al, 2012) con una amplitud de 5-8%.

### 6.3.3. Inhibición con etopropazina

#### *Inhibición a diferentes tiempos en PVasa total.*

La etopropazina es un inhibidor reversible considerado específico de butirilcolinesterasa y es utilizado en un gran número de trabajos para discriminar entre AChE y BuChE (Mikalsen et al, 1986).

La inhibición de la actividad PVasa total con etopropazina 100  $\mu$ M fue similar a dos tiempos ensayados (10 o 30 min) (**Tabla 6.2**). Se deduce que la interacción de la etopropazina con la actividad PVasa no es dependiente del tiempo y por lo tanto se puede considerar de tipo reversible.

#### *Inhibición de los componentes E $\alpha$ y E $\gamma$ .*

El componente E $\alpha$  se inhibió 46,9% con etopropazina 100  $\mu$ M a 10 min y un 46,9% a 30 min. La interacción de la etopropazina con el componente E $\alpha$  no es dependiente del tiempo y por lo tanto se puede considerar de tipo reversible.

Sin embargo el componente E $\gamma$ , con etopropazina 100  $\mu$ M se inhibió 21,6% a los 10 min y 31,7% a los 30 min. Por lo que mostró una dependencia del tiempo y por lo tanto corresponde un mecanismo de inhibición al irreversible o covalente. Teniendo en cuenta que el porcentaje de la actividad de este componente es un 8% de la actividad total (Mangas et al, 2012), esta inhibición correspondería a una inhibición del 3% del total. En cambio el componente E $\alpha$  supone un 20% del total y además presenta mayor sensibilidad a la etopropazina; es por esta razón que al realizar el ensayo en actividad PVasa total se ve un mecanismo reversible.

#### *Inhibición a tiempo fijo de PVasa total*

En el apartado correspondiente del capítulo de Resultados se muestra que se obtuvo un modelo de dos componentes sensibles a la inhibición con etopropazina pero de acuerdo con los datos analizados en el apartado anterior, la inhibición por etopropazina del componente E $\alpha$  es reversible y la del componente E $\gamma$  sería irreversible. Por este motivo el modelo que se consideró más adecuado para ajustar los datos fue uno que incluía al menos un componente reversible sensible y otro componente irreversible sensible.

### Modelo matemático de Inhibición reversible

En este trabajo las ecuaciones para ajustar los datos de los experimentos a tiempo fijo con inhibidores irreversibles se basan en modelos de inhibición irreversibles. Sin embargo los métodos clásicamente utilizados para establecer  $I_{50}$  en modelos reversibles, no están basados en ningún mecanismo de reacción (Whiteley, 1999). El modelo clásico consiste en representar el % de actividad, frente al logaritmo de la concentración de inhibidor a una concentración de sustrato constante, se obtiene entonces una curva sigmoidea que se puede ajustar bien a un modelo matemático donde se estima la  $I_{50}$ . En este trabajo se ha propuesto un modelo (descrito en el Anexo 1, y desarrollado por el Dr. Estévez) basado en mecanismos de inhibición reversible competitiva o no competitiva; este modelo es sencillo y permite establecer el número de componentes, su amplitud o porcentaje y sus  $I_{50}$ . El método ofrece también la posibilidad de ajustar datos cuando en una mezcla compleja existe un componente reversible y otro irreversible, como se muestra a continuación.

La actividad PVasa total, se inhibió con etopropazina 524  $\mu\text{M}$  (la máxima concentración ensayada) un 31,6% y el mejor modelo obtenido contiene tres componentes:

- Un componente reversible más sensible con una proporción del 21,3% de la actividad total y con una  $I_{50}$  de 0,005-0,001  $\mu\text{M}$ .
- Un componente irreversible sensible de una amplitud del 9,9-15,2% con una  $I_{50}$  de entre 3,47-7,06  $\mu\text{M}$ .
- Un componente resistente con una proporción de 63,4-68,6%.

El número de componentes y su amplitud son comparables (**Tabla 6.3**) a los discriminados en los trabajos usando paraoxon, mipafox y PMSF como inhibidores (Mangas et al, 2012). El componente más sensible reversible sería el componente  $E\alpha$  que está descrito con una amplitud de 11-23%, el componente irreversible de sensibilidad intermedia sería el componente  $E\gamma$  (5-8%) y el componente  $E\beta$  es resistente, con una amplitud de 71-84%.

#### 6.3.4. Consideraciones acerca de la actividad PVasa en fracción soluble de cerebro.

Mangas (2012) discriminó tres componentes enzimáticos en la fracción soluble de cerebro de pollo:

- **$E\alpha$**  (11-23 % de la actividad enzimática total,  $I_{50}$  (30 min) = 9-11 nM) es el componente más sensible para paraoxon y también el más sensible para mipafox ( $I_{50}$  (30 min) = 4 nM). Este componente se reactiva de forma espontánea después de la inhibición con paraoxon.

## DISCUSIÓN

- **E $\beta$**  (63-84 % de la actividad enzimática total;  $I_{50}$  (30 min) = 1216 nM) es el segundo componente sensible a paraoxon, pero es prácticamente resistente a mipafox.
- (**E $\gamma$** : 5-15 % de la actividad enzimática total) es resistente a paraoxon y tiene una  $I_{50}$  (30 min) de 3400 nM con mipafox, similar a la obtenida en NTE (esterasa diana de neuropatía).

En el presente trabajo hemos observado en la actividad PVasa lo siguiente:

- La inhibición con iso-OMPA discrimina el mismo número de componentes con amplitudes muy similares a los establecidos por Mangas et al (2012): siendo E $\gamma$  el componente más sensible con una amplitud de 8-15%, el componente E $\alpha$  es de sensibilidad intermedia (20-23%) y el componente E $\beta$  es prácticamente resistente, con una amplitud de 63-69%.
- El BW284C51 discrimina dos componentes y la proporción del más sensible concuerda con el componente E $\gamma$  que está descrito con una amplitud de 5-8%.
- Ante la presencia de etopropazina también se diferencian tres componentes: el más sensible sería E $\alpha$  con una amplitud de 11-23%, el componente de sensibilidad intermedia sería E $\gamma$  (5-8%) y el componente resistente es E $\beta$ , con una amplitud de 71-84%.

El criterio que se ha utilizado para discriminar los distintos componentes es que las proporciones de los componentes deben mantenerse constantes sea cual sea el inhibidor utilizado (Tesis doctorales de Mangas, 2014 y Estévez 2003). Atendiendo a este criterio, en la **Tabla 6.3** discriminamos hasta tres componentes que a su vez se correlacionan bien con las proporciones obtenidas en los trabajos de Mangas et al (2012).

De acuerdo con las interacciones con etopropazina, BW284C51 e iso-OMPA, con la actividad PVasa en fracción soluble de cerebro sugieren que el componente E $\alpha$  podría ser o tener actividad hidrolizante de acetilcolina.

Sin embargo esta interpretación debe ser considerada con cuidado ya que el iso-Ompa y la etopropazina pueden inhibir otras actividades a parte de la hidrolizante de acetilcolina y cómo se demostrará más adelante la actividad hidrolizante de acetilcolina en fracción soluble de cerebro de pollo no se comporta como el resto de colinesterasas de vertebrados. Las conclusiones extraídas de estas interacciones cinéticas necesitan ser confirmadas por más investigaciones moleculares con el objetivo de identificar las proteínas responsables de estas actividades enzimáticas.

## 6.4. COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA SOLUBLE DE CEREBRO CON INHIBIDORES.

### 6.4.1. Estudios preliminares

Se realizaron experimentos donde se observó que la actividad hidrolizante de acetiltiocolina se inhibió con PV 5,6 mM (**apartado 5.3.2.**) Los experimentos se realizaron utilizando acetiltiocolina o acetil- $\beta$ -metiltiocolina, como sustratos. Los porcentajes de inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con PV fueron de 10,7-14,2% cuando se utilizó acetiltiocolina como sustrato (**Tabla 5.10**). Sin embargo, los resultados de inhibición cuando el sustrato utilizado fue acetil- $\beta$ -metiltiocolina fueron menores (1,1-2,8%). Estos datos sugieren que la actividad hidrolizante de acetiltiocolina de fracción soluble de cerebro de pollo es capaz de interactuar con el sustrato no biológico PV.

Se ha descrito que la AChE se inhibe por una concentración de sustrato en exceso, a partir de 1 mM en la AChE humana (Radic y Taylor, 2006; Giacobini, 2003; Silver, 1974) pero no se ha observado en nuestros experimentos (con concentración de sustrato hasta 30 mM).

También se ha observado que las actividades hidrolizantes de acetiltiocolina resistente a PMSF y mipafox (**apartado 6.2.1. Competición de sustratos**) no se inhiben por altas concentraciones de acetiltiocolina. De acuerdo con estos datos podría considerarse que se trata de BuChE, pero si tenemos en cuenta los resultados que indican que la inhibición de la actividad, es menor cuando se utiliza como sustrato acetil- $\beta$ -metiltiocolina, ambos hechos ponen de manifiesto datos contradictorios.

De los datos obtenidos se concluye que no parece que las colinesterasas de cerebro de pollo respondan a los mismos patrones que el resto de colinesterasas descritas en otros grupos animales, tal y cómo se verá a lo largo de este capítulo.

Los resultados pueden interpretarse:

- A. Que se trate de una colinesterasa atípica que no se inhibe por exceso de sustrato.
- B. Que sea una BuChE atípica que hidrolice la acetil- $\beta$ -metiltiocolina.
- C. Que nos encontremos ante una forma intermedia de colinesterasa, aunque esto podría descartarse debido a que tanto la AChE como la BuChE de pollo han sido purificadas (Treskatis, 1992; Rotundo, 1984).
- D. Que sean varias enzimas.

Para aclararlo hemos estudiado la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con inhibidores específicos de colinesterasas (iso-OMPA, etopropazina y BW284C51) y paraoxon, mipafox y con PMSF. Los resultados se resumen y comparan en las **Tablas 6.4.** y **6.5.**

## DISCUSIÓN

**Tabla 6.4. Comparación de los resultados de la Inhibición a dos tiempos diferentes de actividad hidrolizante de acetiltiocolina, en fracción soluble de cerebro.** Se muestran los valores de inhibición obtenidos para 10 o 30 min con los diferentes inhibidores. Los datos aquí comparados corresponden a los resultados descritos en las **Figuras 5.26, 5.28 y 5.30**. Se indica el valor de % inhibición y DE de un experimento por triplicado.

<b>Inhibidor</b>	<b>Inhib. 10 min (%±DE)</b>	<b>Inhib. 30 min (%±DE)</b>	<b>Depend. tiempo</b>
<b>BW284C51 0,41 μM</b>	28,5±0,1	29,7±0,1	NO
<b>iso-Ompa 0,6 μM</b>	12,0±0,3	18,5±0,1	SI
<b>iso-Ompa 500 μM</b>	10,2±0,3	25,9±0,5	SI
<b>etopropazina 0,2 μM</b>	9,8±0,3	10,1±0,3	NO
<b>etopropazina 0,2 μM</b>	40,0±0,3	38,6±0,5	NO



**Tabla 6.5. Interpretación global de los distintos componentes enzimáticos de actividad hidrolizante de acetilcolina detectados en fracción soluble de cerebro de pollo.** La amplitud de cada componente se expresa indicando el rango de valores teniendo en cuenta globalmente los valores obtenidos con los diferentes inhibidores. Se muestran los valores de **150 ( $\mu\text{M}$ )** obtenidos en dos experimentos independientes.

Inhibidor	Componente: Amplitud: Tipo	CS1	CS2	CS3	CS4
		(10-17 %)	(53-57 %)	(11-15 %)	(14-18 %)
iso-OMPA	Irreversible	<b>0,48/0,68</b>	612/652		R
etopropazina	Reversible	<b>0,03/0,05</b>	555/594		R
BW284c51	Reversible	<b>0,16/0,18</b>			
paraoxon	Irreversible	<b>0,00657/0,00609</b>			
mipafox	Irreversible	21,1/28,6			
PMSF	Irreversible	R	>2000		<b>0,40</b>



### 6.4.2. Inhibición a tiempo fijo con paraoxon.

El paraoxon es el metabolito activo del paratión un organofosforado utilizado desde hace décadas como insecticida debido a que el paraoxon es un potente inhibidor de AChE. Provoca síntomas muscarínicos y colinérgicos, pero no induce a OPIDN. El experimento de inhibición a tiempo fijo en presencia de paraoxon se realizó con un amplio rango de concentraciones. Para el tratamiento de los datos se ha asumido que no hay reactivación después de la inhibición (Estévez *et al.*, 2012; Mangas *et al.*, 2013).

La actividad hidrolizante de acetiltiocolina se inhibió totalmente con paraoxon a concentraciones de hasta 650 nM (la máxima concentración ensayada), mostrando una curva que respondía a un solo componente de  $I_{50}$  de 6,1-6,6 nM.

El paraoxon es el inhibidor al que presenta mayor sensibilidad la fracción soluble, ya que su  $I_{50}$ (30 min) es de 5,8-6 nM. Lotti y Johnson (1978) encontraron para AChE de cerebro de pollo un valor de  $I_{50}$ (30 min) con paraoxon de 10 nM. La sensibilidad observada en este trabajo a este inhibidor es parecida a la sensibilidad observada en la bibliografía de AChE, de acuerdo con esto se podría deducir que toda la actividad hidrolizante de acetiltiocolina podría corresponder a actividad AChE.

### 6.4.3. Inhibición a tiempo fijo con mipafox

El mipafox es un compuesto organofosforado utilizado por ser un inhibidor de esterasas, es inductor de OPIDN y habitualmente usado para medir NTE. La inhibición de fracción soluble de cerebro con mipafox se comporta como un único componente enzimático sensible a la inhibición, con una  $I_{50}$  (30 min) de 21,1-28,6  $\mu$ M.

La  $I_{50}$ (30 min) obtenida por Lotti y Johnson (1978) para AChE de cerebro de pollo con mipafox fue 41,2  $\mu$ M, y Kropp y Richardson (2003) obtuvieron una  $I_{50}$ (20 min) de AChE de 8,1  $\mu$ M. El valor de  $I_{50}$ (30 min) obtenida en este trabajo se encuentra entre valores encontrados en bibliografía para actividad AChE en cerebro de pollo.

#### 6.4.4. Inhibición con BW284c51

*Inhibición a diferentes tiempos de la actividad total hidrolizante de acetiltiocolina.*

El BW284c51 es un inhibidor reversible, considerado como un inhibidor específico de acetilcolinesterasa (AChE) usado en estudios llevados a cabo en diferentes tejidos y grupos animales como peces, eritrocitos bovinos, suero de caballo, córtex cerebral y plasma de rata (Olivera-Bravo et al, 2005; Silver, 1974).

La inhibición a los 10 min fue de un 28,5% y a los 30 min del 29,7% (**Tabla 6.4.**). Estos datos indican que no existe dependencia del tiempo y por lo tanto se trata de una inhibición de tipo reversible. Este resultado nos indica que se ajusta al tipo de inhibición descrito para la AChE con este compuesto.

*Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.*

La actividad hidrolizante de acetiltiocolina total se inhibió con concentraciones de BW284c51 de hasta 524  $\mu\text{M}$  (la máxima concentración ensayada) y la inhibición fue de un 97%.

Después de aplicar los modelos de ecuación para inhibidores reversibles desarrollados por el Dr. Estévez (**Anexo 1**), se concluyó que se comporta mayoritariamente como un solo componente con  $I_{50}$  de entre 0,16 y 0,18  $\mu\text{M}$ , aunque se detectó una pequeña proporción (< 3%) de un componente menos sensible de  $I_{50}$  13-17,4  $\mu\text{M}$ .

Mikalsen y colaboradores (1986) describieron que con 1  $\mu\text{M}$  de BW284c51 se inhibe toda la actividad colinesterasa en eritrocitos de bovino, de aquí se deduce que su  $I_{50}$  tiene un valor menor de 1  $\mu\text{M}$ , tal como ocurre con la  $I_{50}$  obtenida en nuestra muestra.

Atack y colaboradores (1989) describieron que las  $I_{50}$  en AChE con BW284c51 en eritrocitos y córtex humanos y anguila eléctrica fueron 18, 28 y 8 nM respectivamente, y también describieron que los valores de  $I_{50}$  en BuChE con BW284c51 en córtex y plasma humanos fueron 300 y 48  $\mu\text{M}$ , valores comparables a los obtenidos para el componente minoritario detectado en nuestra muestra.

De acuerdo con estos datos podríamos considerar que se trata de una AChE, sin embargo esto contradice los criterios establecidos ya que toda la actividad se inhibe como un componente enzimático que debería ser AChE, pero que no se inhibe por exceso de sustrato, como hemos visto en apartados anteriores. Los resultados sugieren que estamos ante una colinesterasa atípica.

## DISCUSIÓN

### 6.4.5. Inhibición con iso-OMPA

El iso-OMPA es un inhibidor irreversible considerado específico de la actividad butirilcolinesterasa (Massoulié, 1993; 2005; Thomsen et al., 1991). Sin embargo en otros estudios llevados a cabo por Pezzementi y colaboradores (2011) se ha encontrado una butirilcolinesterasa en el pez Medaka *Oryzias latipes*, que atípicamente no es inhibida por el iso-OMPA.

#### *Inhibición a diferentes tiempos de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.*

El porcentaje de inhibición a los 10 min con iso-OMPA 0,6  $\mu\text{M}$  fue de un 12,0% y a los 30 min de 18,5%. La inhibición con iso-OMPA 500  $\mu\text{M}$  a los 10 min fue 10,2% y a los 30 min del 25,9% (Tabla 6.4.). Estos datos indican que existe dependencia del tiempo y por lo tanto se trata de una inhibición de tipo irreversible.

#### *Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.*

En el experimento de inhibición a tiempo fijo el mejor modelo fue de tres componentes enzimáticos: dos sensibles a iso-OMPA y uno resistente a la inhibición:

- El componente más sensible tiene una amplitud (proporción) de 16,4-17,8 % de la actividad enzimática total, y una  $I_{50}$ (30 min) de 0,48-0,68  $\mu\text{M}$ .
- El componente menos sensible tiene una amplitud de 52,7-53,1 % de actividad total, y una concentración  $I_{50}$ (30 min) de 612-652  $\mu\text{M}$ .
- Y un tercer componente (29,4-30,4 % de la actividad enzimática total) resistente a la inhibición con iso-OMPA.

De acuerdo con los resultados, el iso-OMPA discrimina tres entidades enzimáticas diferentes, uno de 16-18 % muy sensible ( $I_{50} < 1 \mu\text{M}$ ), otro poco sensible ( $I_{50}$  del orden de 600  $\mu\text{M}$ ) que representa el 53 % y otro resistente de aproximadamente 30%.

La  $I_{50}$ (30 min) obtenida en este trabajo para el componente más sensible es del orden de la obtenida por Atack y colaboradores (1989) que describieron que las  $I_{50}$ (30 min) en BuChE con iso-OMPA en córtex y plasma humanos fueron 6,7 y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Las  $I_{50}$ (30 min) para el segundo componente enzimático son similares a las descritas en AChE con iso-OMPA en eritrocitos y córtex humanos y anguila eléctrica. Estos valores fueron de 340, 180 y  $>1000 \mu\text{M}$  respectivamente.

De acuerdo a las  $I_{50}$ (30 min) encontradas en la bibliografía, se podría deducir que el componente más sensible a iso-OMPA de fracción soluble de cerebro de pollo (16,4-17,8 %) se trata de actividad BuChE, y el segundo componente sensible (52,7-53,1 %) sea actividad AChE. Además de la existencia de un componente resistente a iso-OMPA (29,4-30,4 %) de naturaleza desconocida (otras proteínas hidrolizantes de acetiltiocolina).

#### 6.4.6. Inhibición a tiempo fijo con PMSF

El fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) es el inhibidor con el cual se descubrió el fenómeno de promoción de la OPIDN (Lotti *et al.*, 1991; Pope y Padilla, 1990). De los resultados obtenidos en el experimento de inhibición a tiempo fijo se deducen al menos dos componentes enzimáticos distintos:

- Un componente sensible con una amplitud (proporción) de 11,2-15,0 % de la actividad enzimática total, y una  $I_{50}(30 \text{ min})$  de 0,4  $\mu\text{M}$ .
- Se estimó un segundo componente sensible con una amplitud del 85,0-88,8 % de actividad total, y una  $I_{50}(30 \text{ min})$  de 2 mM.

La  $I_{50}(30 \text{ min})$  deducida (28,1  $\mu\text{M}$ ) a partir de datos cinéticos de inhibición de AChE con PMSF en ratón (Kraut *et al.*, 2000) es mucho mayor que la  $I_{50}(30 \text{ min})$  del componente más sensible para la inhibición de PMSF obtenido en este trabajo, aunque en la bibliografía no se consideró la hidrólisis espontánea del inhibidor.

#### 6.4.7. Inhibición con etopropazina

*Inhibición a diferentes tiempos de actividad hidrolizante de acetilcolina total.*

La etopropazina es un inhibidor reversible considerado específico de butirilcolinesterasa y es utilizado en un gran número de trabajos para discriminar entre AChE y BuChE (Mikalsen et al, 1986).

Con etopropazina 0,2  $\mu\text{M}$  el porcentaje de inhibición fue de 9,8% a los 10 min y de 10,1% a los 30 min. Tras la incubación durante 10 min con etopropazina 600  $\mu\text{M}$  la inhibición fue de 40,0% y a los 30 min de 38,6% (**Tabla 6.4**). Estos datos indican que no existe dependencia del tiempo y por lo tanto se trata de una inhibición de tipo reversible, lo que coincide con el carácter reversible encontrado en la bibliografía de la BuChE con la etopropazina.

*Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetilcolina total.*

Según los resultados obtenidos en la sección anterior se aplicaron las ecuaciones descritas en el capítulo 2 de modelos cinéticos de inhibición reversible para realizar los ajustes de las curvas de inhibición a tiempo fijo de 30 min.

La actividad disminuyó hasta un 41-47% con etopropazina 524  $\mu\text{M}$ , la máxima concentración utilizada. El mejor ajuste fue el modelo en el que se diferencian dos componentes:

- Un componente muy sensible con una amplitud de 10,8-13,1 % de la actividad enzimática total y una  $I_{50}$  estimada de 0,03-0,05  $\mu\text{M}$ .

## DISCUSIÓN

- Y otro menos sensible que correspondería al 86,8-89,2 % restante con una  $I_{50}$  estimada de 555-594  $\mu\text{M}$ .

Los valores de  $I_{50}$  del componente sensible son comparables a los encontrados en bibliografía. Atack et al (1989) describieron concentraciones de  $I_{50}$  en BuChE con etopropazina en córtex y plasma humano de 0,21 y 0,3  $\mu\text{M}$  respectivamente, comparables a la obtenida en este trabajo para el componente sensible considerando que la especie es diferente.

La  $I_{50}$  del segundo componente enzimático es también comparable a las descritas en AChE con etopropazina en eritrocitos humanos y anguila eléctrica de 260, 210 y 120  $\mu\text{M}$  respectivamente (Atack et al, 1989).

De acuerdo a las  $I_{50}$  encontradas en la bibliografía, se podría deducir que el componente más sensible a etopropazina se trata de actividad BuChE y comparando las amplitudes podría ser el mismo que el más sensible a iso-OMPA y a PMSF.

### **6.4.8. Inhibición a tiempo fijo con dos inhibidores**

Estos ensayos se llevaron a cabo con el objetivo de identificar si los componentes más sensibles a la inhibición con iso-OMPA, PMSF y etopropazina se trataban del mismo. Para ello se diseñó un experimento en el que se preincubó con un inhibidor y después se añadió un segundo inhibidor, a las concentraciones necesarias de cada uno para inhibir el componente más sensible en ambos casos. Si el componente sensible es el mismo para ambos inhibidores, al añadir el segundo inhibidor no se observarían diferencias significativas respecto a la inhibición inicial puesto que ya está inhibido el componente. Si por el contrario se trata de componentes distintos, la actividad residual al añadir el segundo inhibidor, debe ser menor respecto a la inhibición causada por uno solo.

*Preincubación con PMSF y posterior inhibición con etopropazina, y viceversa.*

Al preincubar con PMSF 100  $\mu\text{M}$  y a continuación con etopropazina 150  $\mu\text{M}$  se observó una disminución de la actividad enzimática, lo cual significa que el componente más sensible a PMSF no es el más sensible a etopropazina.

Al preincubar con etopropazina 150  $\mu\text{M}$  y a continuación con el PMSF 100  $\mu\text{M}$  se observó que la amplitud del componente más sensible a la inhibición con PMSF y la amplitud del componente más sensible a la inhibición con etopropazina se suman. Se concluyó que el componente más sensible a PMSF es diferente al más sensible con etopropazina.

*Preincubación con PMSF y posterior inhibición con iso-OMPA, y viceversa.*

Al preincubar con PMSF 100  $\mu\text{M}$  y después con iso-OMPA 30  $\mu\text{M}$ , se observó una disminución de la actividad enzimática, lo cual significa que el componente más sensible a PMSF no es el mismo que el más sensible a iso-OMPA.

Al realizar el experimento preincubando primero con iso-OMPA 30  $\mu\text{M}$  y a continuación con PMSF 100  $\mu\text{M}$ , la actividad residual resultante fue la suma de las proporciones obtenidas al inhibir de forma individual lo que indica que ambos inhibidores están inhibiendo componentes distintos.

*Preincubación con iso-OMPA y posterior inhibición con etopropazina, y viceversa.*

No se observaron cambios significativos en la actividad enzimática resultante de la preincubación primero con iso-OMPA 30  $\mu\text{M}$  al añadir etopropazina 150  $\mu\text{M}$ , de lo que se puede deducir que el componente más sensible a iso-OMPA se trata también del componente más sensible a etopropazina.

Al preincubar con etopropazina y añadir después el iso-OMPA el componente que es sensible a la inhibición con iso-OMPA ya ha sido inhibido previamente con etopropazina, lo que indica que ambos inhibidores están inhibiendo el mismo componente.

Se deduce que existe un cuarto componente con actividad hidrolizante de acetiltiocolina que es sensible a paraoxon y a mipafox y resistente a iso-OMPA y etopropazina.

#### 6.4.9. Consideraciones a cerca de la actividad hidrolizante de acetilcolina en fracción soluble de cerebro:

Analizando globalmente los resultados se deduce que podemos distinguir cuatro componentes enzimáticos (**Tabla 6.5.**):

- **CS1** (10-17 %). Se inhibe por todos los inhibidores ensayados excepto PMSF.
- **CS2** (53-57 %). Es muy sensible a la inhibición con mipafox, paraoxon y BW284C51; se inhibe a altas concentraciones de iso-OMPA y etopropazina y es resistente a PMSF.
- **CS3** (11-15 %). Es muy sensible a la inhibición con mipafox, paraoxon y BW284C51 pero resistente a la etopropazina, PMSF e iso-OMPA.
- **CS4** (14-18 %). Es muy sensible a la inhibición con mipafox, paraoxon y BW284C51; se inhibe con PMSF, pero es resistente a la inhibición por iso-OMPA y etopropazina.

Otras consideraciones:

- Con paraoxon, mipafox y BW284c51 las curvas de inhibición se comportan como un solo componente y con ellos, en las condiciones de ensayo, no se han podido discriminar componentes de diferente sensibilidad. Con el mipafox la observación visual sugiere que podría haber un componente de muy alta sensibilidad que representaría alrededor de un 10%.
- El componente CS1 es el más sensible a iso-OMPA y también a etopropazina.
- El componente más sensible a la inhibición con PMSF (CS4) es distinto al más sensible a iso-OMPA o etopropazina (CS1).
- Con la inhibición de iso-OMPA y etopropazina (considerados inhibidores específicos de BuChE) se han podido distinguir 3 componentes:
  - ✓ CS1 cuya  $I_{50}$  (0,48-0,68  $\mu\text{M}$ ) para el iso-OMPA es del orden de la descrita por Atack et al (1989) para este compuesto con BuChE (6,7 y 1  $\mu\text{M}$ ) en córtex y plasma humano respectivamente. La sensibilidad de este componente con la etopropazina es de 0,03-0,05  $\mu\text{M}$ , valores comparables a los encontrados para la BuChE con este compuesto cuya  $I_{50}$  0,21 y 0,3  $\mu\text{M}$  en córtex y plasma humano.
  - ✓ CS2, resistente a etopropazina y de sensibilidad intermedia al iso-OMPA con  $I_{50}$  612  $\mu\text{M}$ , del mismo orden de magnitud que el valor de  $I_{50}$  = 340  $\mu\text{M}$  encontrado para la AChE en eritrocitos humanos y en anguila eléctrica (> 1000  $\mu\text{M}$ )
  - ✓ CS3 que es resistente a iso-OMPA y etopropazina.

Propuesta de condiciones de ensayo para la discriminación de los componentes de actividad colinesterasa.

Se propone un ensayo basado en el uso de las siguientes condiciones de inhibidores, Estas concentraciones corresponden a las concentraciones que inhibirían el 99 % de cada componente ( $I_{99}^{30 \text{ min}}$ ):

- A=Actividad total
- B= Actividad resistente a iso-OMPA 5  $\mu\text{M}$
- C=Actividad resistente a iso-OMPA 4,5 mM
- D= Actividad resistente a iso-OMPA 4,5 mM y PMSF 4,5  $\mu\text{M}$ .
- E= Actividad resistente a PMSF 4,5  $\mu\text{M}$

La actividad de cada componente se estimaría por:

- CS1 =A-B
- CS2= B-C
- CS3= A-D
- CS4= A-E

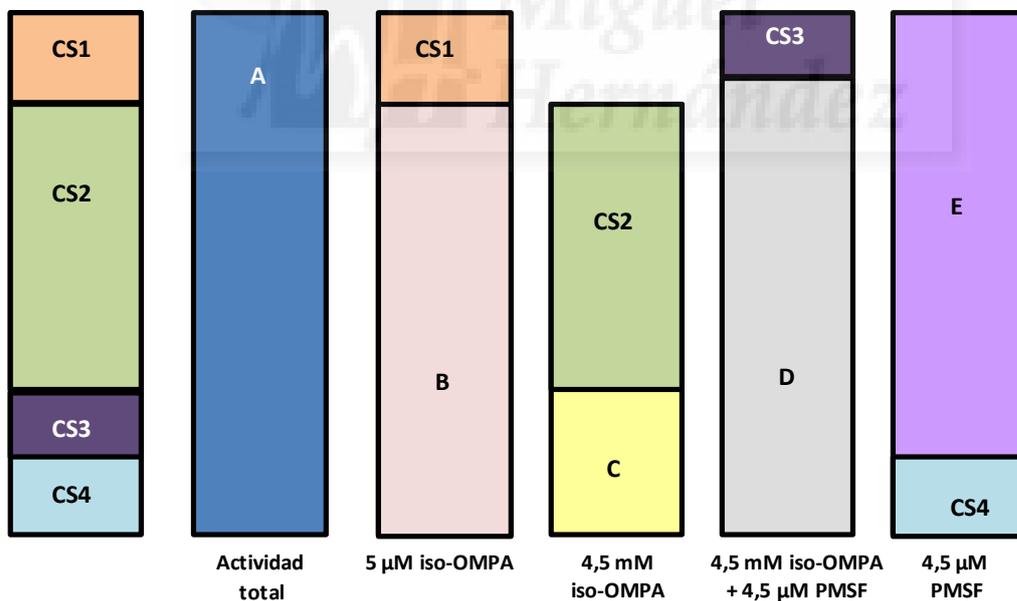


Figura 6.1. Ensayo de discriminación de los diferentes componentes en fracción soluble de cerebro de pollo., utilizando iso-OMPA y PMSF.

## 6.5. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES GLOBALES DE LA RELACIÓN ENTRE ACTIVIDADES PVasa Y ChE EN FRACCIÓN SOLUBLE DE CEREBRO.

Existe interacción de la actividad PVasa con el sustrato acetiltiocolina y de la actividad colinesterasa con el sustrato PV.

La actividad PVasa total soluble medidas está en el rango 1255-5465 nmol/min y la actividad ChE de 6,6-12,5 nmol/min. Estos valores varían notablemente en función del lote de muestra y de las condiciones de concentración de tejido y tiempo de reacción.

Se han detectado tres componentes diferentes en actividad PVasa con iso-OMPA, BW284C51 y etopropazina que se correlacionan bien con los detectados por Mangas et al (2012): E $\alpha$ , E $\beta$  y E $\gamma$  con paraoxon, mipafox y PMSF.

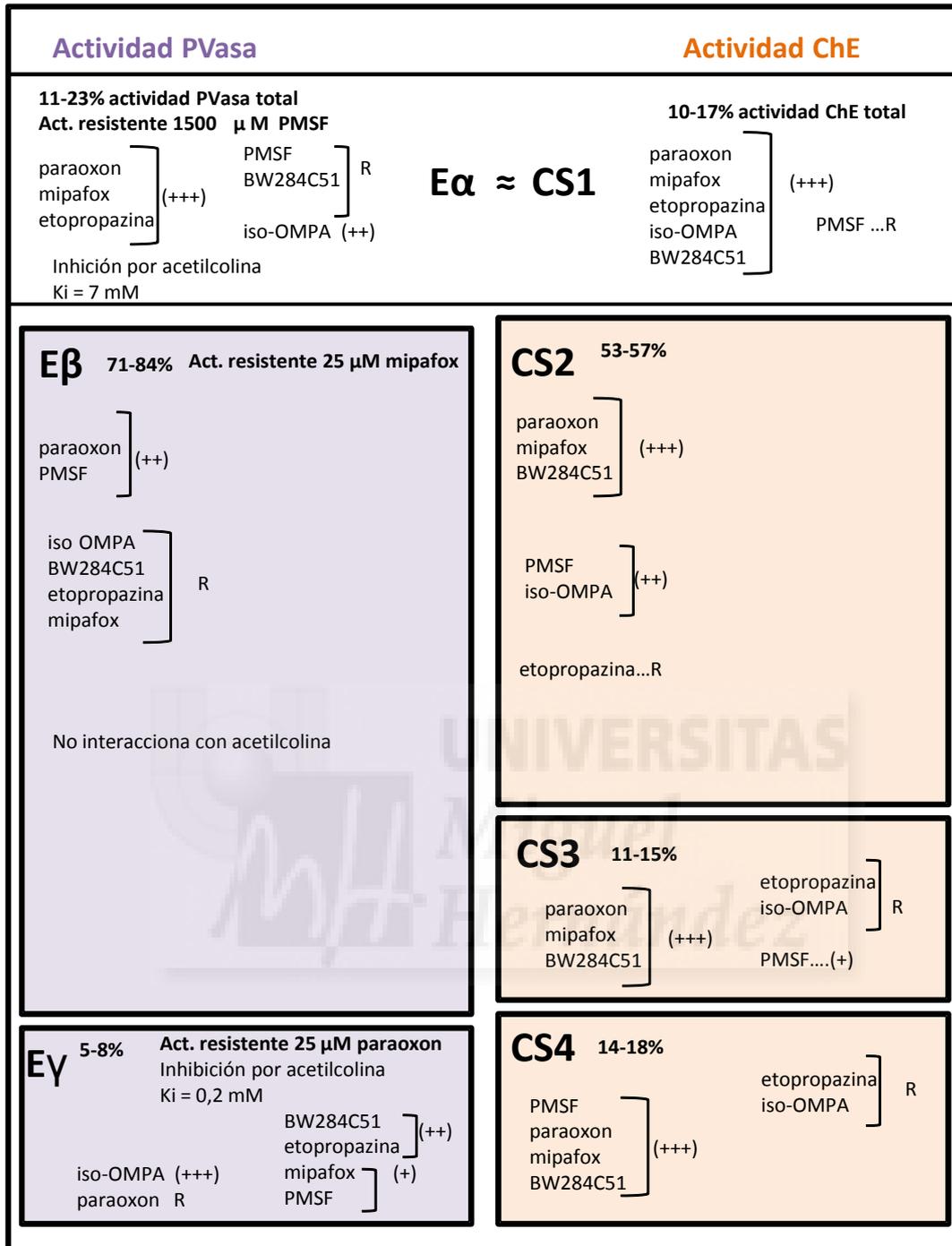
En la actividad ChE se han detectado 4 componentes (CS1, CS2, CS3 Y CS4) utilizando iso-OMPA, BW284C51, etopropazina, mipafox, paraoxon y PMSF.

Se puede establecer correlación entre la actividad PVasa E $\alpha$  y la actividad colinesterasa CS1, ya que ambos son muy sensibles a etopropazina e iso-OMPA y resistentes a PMSF. Sin embargo su comportamiento ante el BW284C51 es diferente ya que E $\alpha$  es resistente y CS1 es sensible. Esto puede interpretarse porque la inhibición por BW284C51 es de tipo reversible y su efecto puede ser diferente en función del sustrato con el que esté compitiendo. Otra explicación adicional puede relacionarse con la observación hecha por Mangas et al (2013a) de una disminución de la sensibilidad frente al mipafox por la incubación a bajas concentraciones de PMSF. Dado que la medida de E $\alpha$  requiere la preincubación con PMSF 1500  $\mu$ M, este tratamiento podría estar afectando a las propiedades frente al BW284C51.

Por el contrario CS2, CS3 Y CS4 no forman parte de los componentes de la actividad PVasa E $\beta$  ni de E $\gamma$  porque los primeros tienen baja sensibilidad al PMSF ( $I_{50} \geq 2000 \mu$ M), mientras que a esa concentración de PMSF los componentes PVasa E $\beta$  y E $\gamma$  están completamente inhibidos. Por lo tanto CS2, CS3 y CS4 corresponden a proteínas que no tienen actividad PVasa, al menos en el mismo centro activo de su actividad hidrolizante de acetiltiocolina.

A pesar de que CS2, CS3 y CS4 no tienen actividad PVasa, se inhiben reversiblemente ante la presencia de PV.

E $\beta$  y E $\gamma$  no tienen actividad ChE, dado que se detectan como la actividad resistente a paraoxon 25  $\mu$ M, condición en la que toda la actividad colinesterasa está completamente inhibida. Sin embargo, E $\gamma$  se inhibe con la presencia de acetiltiocolina mostrando además una relativa alta afinidad por ésta del mismo orden que las concentraciones usadas de sustrato (0,198 mM).



**Figura.6.2. Componentes de actividades hidrolizantes de fenilvalerato (PVasa) y de acetiltiocolina (ChE).** Se muestran los distintos componentes de las actividades PVasa y ChE, con sus amplitudes (%) y sensibilidades a los inhibidores: (+++) muy sensible, (++) sensibilidad intermedia, (+) baja sensibilidad y (R) resistente.

## 6.6. INTERACCIONES ENTRE DIFERENTES SUSTRATOS E INHIBIDORES EN FRACCIÓN DE MEMBRANA DE CEREBRO.

### 6.6.1. Competición de sustratos: Fenilvalerato/acetilticolina.

El objetivo de estos estudios es analizar la interacción de la acetilticolina con los componentes de actividad PVasa de fracción de membrana discriminados en estudios anteriores en nuestro laboratorio (Mangas et al, 2012):

- **EP $\alpha$**  (4-8 % de la actividad enzimática total) es el componente más sensible a la inhibición con paraoxon ( $I_{50}$  30 min=15-43 nM) y también el más sensible para mipafox ( $I_{50}$  30 min=29 nM). Este componente se reactiva de forma espontánea después de la inhibición con paraoxon.
- **EP $\beta$**  (38 % de la actividad enzimática total) es el segundo componente sensible a paraoxon ( $I_{50}$  30 min= 1540 nM), pero es prácticamente resistente a mipafox.
- **EP $\gamma$**  (38-47 % de la actividad enzimática total,  $I_{50}$  30 min= 5.3-6.6  $\mu$ M) es sensible a concentraciones micromolares de mipafox y es resistente a paraoxon.
- **EP $\delta$**  (9-11% de la actividad enzimática total) es prácticamente resistente a todos los inhibidores.

EP $\gamma$  se atribuye a la enzima NTE, la proteína diana de la neuropatía retardada que se describió por primera vez entre las esterasas de membrana de cerebro de pollo (Johnson, 1969, 1982; Williams y Johnson, 1981). Por lo que este es el único componente detectado para el cual se han identificado roles toxicológicos y biológicos, y está molecular y genómicamente caracterizado. El papel de los otros tres componentes detectados en membranas se desconoce. Las interacciones observadas con los inhibidores revelan que puedan estar relacionados con la neurotoxicidad de OPs (Tesis Doctoral de Mangas, I. 2014), estas interacciones son importantes en la comprensión de los efectos neurotóxicos de exposiciones a múltiples xenobióticos.

Los componentes de la actividad PVasa de fracción de membrana de cerebro se han discriminado pre-incubando con los inhibidores PMSF, paraoxon, mipafox o PMSF y mipafox a las concentraciones descritas por Mangas et al (2012, 2013):

- El componente EP $\alpha$  se midió como la actividad resistente a PMSF 1000  $\mu$ M.
- El componente EP $\beta$  se midió como la actividad resistente a mipafox 50  $\mu$ M
- EP $\gamma$  como la actividad resistente a paraoxon 25  $\mu$ M,
- EP $\delta$  como la actividad resistente a mipafox 25  $\mu$ M y PMSF 600  $\mu$ M.

Los porcentajes de los distintos componentes fueron muy similares a los obtenidos por Mangas en sus trabajos.

Se aplicaron las mismas condiciones para discriminar componentes de actividad colinesterasa en la fracción de membrana de cerebro de pollo.

Se estudió la interacción del sustrato acetiltiocolina con la actividad PVasa y de PV con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina, en membrana de cerebro de pollo.

En la **Tabla 6.6.** se resumen y comparan los resultados de los estudios de interacción entre sustratos de las actividades PVasa e hidrolizante de acetiltiocolina de fracción de membrana.

No se muestran datos cinéticos ya que corresponderían a la suma de dos componentes enzimáticos y en las condiciones de este estudio no es posible discriminar la cinética detallada de los componentes. Se muestran los valores de V (valor que alcanza la velocidad a la máxima concentración de sustrato y sin presencia del inhibidor) y V' (valor que alcanza la velocidad a la máxima concentración de sustrato y en presencia de la máxima concentración de inhibidor).

**Tabla 6.6. Comparaciones de la V y V' obtenidas de las interacciones entre sustratos y entre las actividades PVasa e hidrolizante de acetiltiocolina en fracción de membrana de cerebro de pollo.** Los datos de esta tabla resumen y comparan los datos que se muestran en los resultados en las Tablas 5.19, 5.20, 5.21, 5.22, 5.25, 5.26 y 5.27. y Figuras 5.39, 5.40, 5.41, 5.42, 5.51, 5.52, 5.53.

Actividad	Inhibidor	V (nmoles/min/mg tej)	V' (nmoles/min/mg tej)	INHIBICIÓN
<b>PVasa resistente a mipafox 25 <math>\mu</math>M y PMSF 600 <math>\mu</math>M (EP<math>\delta</math>)</b>	Acetiltiocolina	208/325	-----	NO
<b>AChE resistente a mipafox 25 <math>\mu</math>M y PMSF 600 <math>\mu</math>M</b>	PV	0,14/0,15	0,13/0,14	SI
<b>PVasa resistente a PMSF 1000 <math>\mu</math>M (EP<math>\alpha</math>+ EP<math>\delta</math>)</b>	Acetiltiocolina	43/64	17/28	SI
<b>AChE resistente a PMSF 1000 <math>\mu</math>M</b>	PV	0,13/0,14	0,10/0,11	SI
<b>PVasa resistente a mipafox 50 <math>\mu</math>M (EP<math>\beta</math>+ EP<math>\delta</math>)</b>	Acetiltiocolina	800/801	----	NO
<b>AChE resistente a mipafox 50 <math>\mu</math>M</b>	PV	0,072/0,080	0,040/0,072	SI
<b>PVasa resistente a paraoxon 25 <math>\mu</math>M (EP<math>\gamma</math>+ EP<math>\delta</math>)</b>	Acetiltiocolina	686/713	-----	NO
<b>AChE resistente a paraoxon 25 <math>\mu</math>M</b>	PV	-----	-----	-----

## DISCUSIÓN

### *Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a mipafox 25 $\mu\text{M}$ y PMSF 600 $\mu\text{M}$ .*

La actividad PVasa resistente a mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$  está definido como el componente EP $\delta$  y supone un 10% de la fracción total. Esta actividad no se inhibió en presencia de acetiltiocolina.

Sin embargo la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox 25  $\mu\text{M}$  y PMSF 600  $\mu\text{M}$  se inhibió por la presencia de PV. La velocidad máxima no cambió al incrementar la concentración de PV. Este comportamiento sugiere una inhibición de tipo competitivo.

### *Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a PMSF 1000 $\mu\text{M}$ .*

La actividad PVasa resistente a PMSF 1000  $\mu\text{M}$  corresponde a la actividad del componente EP $\alpha$  más el componente EP $\delta$  que como se vio en el apartado anterior no interacciona con la acetiltiocolina. La actividad PVasa resistente a PMSF 1000  $\mu\text{M}$  se inhibió en presencia de acetiltiocolina. Se observó que la velocidad máxima disminuyó al incrementar la concentración de acetiltiocolina, este comportamiento sugiere una inhibición que no es competitiva. Las actividades que se observan son el resultado de la suma de dos componentes enzimáticos ya que el componente EP $\delta$  es resistente a PMSF 1000  $\mu\text{M}$ , esto implicaría que el único componente que interacciona es EP $\alpha$ .

Al estudiar la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a PMSF 1000  $\mu\text{M}$  con PV, se observó inhibición en presencia de PV aunque la velocidad máxima no cambió al incrementar la concentración de PV.

De acuerdo a estos resultados, el mecanismo de inhibición en ambos casos es aparentemente diferente como se puede ver en la **Tabla 6.6**.

Por lo tanto podemos considerar diferentes opciones respecto al componente EP $\alpha$ :

- A. La existencia de una proteína con actividad PVasa e hidrolizante de acetiltiocolina, pero con diferentes centros activos.
- B. Contiene proteínas con actividad PVasa, pero sin actividad hidrolizante de acetiltiocolina que interactúan con la acetiltiocolina.
- C. La misma proteína tiene actividad hidrolizante de fenilvalerato y acetiltiocolina, con el mismo centro catalítico pero la interacción está sujeta a mecanismos diferentes.

*Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a mipafox 50  $\mu$ M.*

La actividad PVasa resistente a mipafox (componente EP $\beta$ +EP $\delta$ ) no se inhibió con acetiltiocolina. EP $\delta$  no se inhibe con la acetiltiocolina, esto demuestra que EP $\beta$  no se inhibe tampoco con la acetiltiocolina.

Sin embargo la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a mipafox se inhibió con PV. La velocidad máxima no cambió al incrementar la concentración de PV lo que sugiere inhibición de tipo competitiva.

El componente esterásico EP $\beta$  no tiene capacidad para hidrolizar acetiltiocolina y en cambio el componente resistente a mipafox 50  $\mu$ M, de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina, sí que es capaz de hidrolizar PV.

*Interacciones entre sustratos de actividades resistentes a paraoxon 25  $\mu$ M.*

La actividad PVasa resistente a paraoxon 25  $\mu$ M (EP $\gamma$ +EP $\delta$ ) no se inhibió en presencia de acetiltiocolina y por lo tanto no es capaz de hidrolizarla, este componente es el que se identifica con la NTE.

La inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina, no se pudo estudiar debido a que a la concentración de paraoxon utilizada para discriminar este componente, inhibió toda la actividad, hecho que coincide con la sensibilidad de la AChE de cerebro de pollo al paraoxon, con una IC<sub>50</sub>(30 min) a niveles de concentración nanomolar (10-28 nM) (Lotti and Johnson, 1978; Kemp and Wallace, 1990).

### 6.7. COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD PVASA DE MEMBRANA DE CEREBRO CON INHIBIDORES.

En el apartado anterior se demostró que hay inhibición de la actividad PVasa del componente EP $\alpha$  con acetiltiocolina y de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina con PV. Se estudiaron por lo tanto, las interacciones de inhibidores típicos de colinesterasas en la actividad PVasa total y en su componente EP $\alpha$ . Los resultados de estos estudios se resumen y comparan en las Tablas 6.7 y 6.8.

**Tabla 6.7. Comparación de los resultados de la inhibición a dos tiempos diferentes de actividad PVasa, en fracción de membrana de cerebro.** Se muestran los valores de inhibición obtenidos para 10 o 30 min con los diferentes inhibidores. Los datos aquí comparados corresponden a los resultados obtenidos en las Figuras 5.43, 5.46, 5.48 y 5.49. Se indica el valor de % inhibición y DE de un experimento por triplicado.

Fracción	Inhibidor	Inhib. 10 min (%±DE)	Inhib. 30 min (%±DE)	Depend. tiempo
<b>Total</b>	BW284C51 50 $\mu$ M	-	-	NO INHIBE
	iso-Ompa 900 $\mu$ M	20,0±0,1	19,9±0,1	NO
	Etopropazina 100 $\mu$ M	12,2±0,1	12,8±0,1	NO
<b>EP<math>\alpha</math></b>	BW284C51 50 $\mu$ M	-	-	NO INHIBE
	iso-Ompa 900 $\mu$ M	47,4±0,1	47,2±0,1	NO
	Etopropazina 100 $\mu$ M	15,1±0,1	14,4±0,1	NO

**Tabla 6.8. Interpretación global de los distintos componentes enzimáticos de actividad PVasa detectados en fracción de membrana de cerebro de pollo con los inhibidores ensayados y con los inhibidores utilizados en los trabajos de Mangas et al.** La amplitud de cada componente se expresa indicando el rango de valores teniendo en cuenta globalmente los valores obtenidos con los diferentes inhibidores. Se muestran los valores de **150 ( $\mu\text{M}$ )** obtenidos en dos experimentos independientes.

Inhibidor	Componente Amplitud Tipo	EP $\alpha$ (2-8%)	EP $\beta$ (35-40%)	EP $\gamma$ (38-47%)	EP $\delta$ (9-15%)
iso-OMPA	Reversible	0,40/0,65	R		130/65,47
etopropazina	Reversible	R		32,61/34,89	R
BW284c51	No inhibe	R			
paraoxon*	Irreversible	0,015/0,043	1,54	R	
mipafox*	Irreversible	0,029	R	6,60	R
PMSF**	Irreversible	R	138	23	R

\*Datos extraídos del artículo publicado por Mangas et al, 2013.

\*\*150 deducidos para 30 min de inhibición, excepto para el PMSF que están estimados para 20 min debido a su rápida degradación espontánea.

### 6.7.1. Inhibición con iso-OMPA.

*Inhibición a diferentes tiempos en PVasa total.*

El iso-OMPA, tal y cómo se ha descrito en el apartado correspondiente de la fracción soluble es un inhibidor irreversible considerado específico de la actividad butirilcolinesterasa (Massoulié, 1993; 2005; Thomsen et al., 1991). Se ha utilizado en diversos trabajos para aislar y purificar la AChE (Rotundo, 1984) y BuChE (Treskatis et al., 1992) de cerebro de pollo en fracción de membranas.

En ensayos preliminares el iso-OMPA solo inhibió a concentraciones muy altas, con iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$  durante 10 o 30 min, obtenemos el mismo porcentaje de inhibición, un 20% (Tabla 6.7.) lo que sugiere que la inhibición a concentraciones altas no es dependiente del tiempo y por lo tanto se puede considerar de tipo reversible. Dadas las altas concentraciones necesarias y la no dependencia del tiempo, esta inhibición por iso-OMPA del 15-20% de la actividad PVasa, probablemente no se debe a mecanismos de acilación covalente sino a interacciones reversibles más específicas.

## DISCUSIÓN

### *Inhibición del componente EP $\alpha$ +EP $\delta$ .*

Al inhibir con iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$  a 10 y 30 min se observó un porcentaje de inhibición de 47% (Tabla 6.7.) Estos datos mostraron un comportamiento no dependiente del tiempo. Sin embargo con iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$  el componente EP $\alpha$  está totalmente inhibido si tenemos en cuenta las  $I_{50}$  obtenidas en el siguiente apartado. No se pudo distinguir bien entre EP $\alpha$  y EP $\delta$  dada la poca amplitud del componente, así que pudiera ser que EP $\alpha$  fuera irreversible pero los datos de los que se dispone no son suficientes así que se trató como reversible.

### *Inhibición a tiempo fijo de PVasa total.*

La actividad PVasa total se inhibió con iso-OMPA 786  $\mu\text{M}$  (la máxima concentración ensayada) un 30 %. Como se ha visto en el apartado anterior la inhibición de la actividad PVasa con el iso-OMPA es de tipo reversible, de acuerdo con esto se han utilizado las ecuaciones del modelo reversible descrito en el Anexo 1.

El mejor modelo fue de tres componentes sensibles a la inhibición con iso-OMPA:

- Un componente más sensible que tiene una amplitud de 2,5-2,8 % de la actividad enzimática total y una  $I_{50}$  para 30 min de 0,40-0,65  $\mu\text{M}$ .
- Un componente de una amplitud de 12,2-15,8 % de la actividad total y una  $I_{50}$  de 65,47-130  $\mu\text{M}$  para 30 min.
- Un componente mayoritario prácticamente resistente con una proporción de 81,3-85,1 %.

El componente más sensible a iso-OMPA sería el componente EP $\alpha$  que está descrito con una amplitud de 4-8%, el componente de sensibilidad intermedia sería el componente EP $\delta$  y el componente resistente es la suma de los componentes EP $\beta$  y EP $\gamma$ , cuyas amplitudes son 38-41% y 39-48%, respectivamente.

### **6.7.2. Inhibición con BW284C51.**

#### *Inhibición a diferentes tiempos en PVasa total.*

El BW284C51 es un inhibidor reversible considerado específico de AChE.

No se detectó inhibición de la actividad PVasa total, después de la incubación durante 10 min con BW284C51 50  $\mu\text{M}$  y lo mismo ocurrió después de la incubación durante 30 min y tampoco inhibió con BW284C51 1000  $\mu\text{M}$ , la máxima concentración ensayada.

*Inhibición del componente EP $\alpha$ +EP $\delta$ .*

El componente EP $\alpha$  tampoco se inhibió con BW284C51 50  $\mu$ M ni a 10 ni a 30 min. El BW284C51 no inhibe al componente EP $\alpha$ .

**6.7.3. Inhibición con etopropazina***Inhibición a diferentes tiempos en PVasa total.*

La etopropazina es un inhibidor reversible considerado específico de butirilcolinesterasa.

La inhibición de la actividad PVasa total con etopropazina 100  $\mu$ M fue 12,2% a los 10 min y 12,8% a los 30 min. Estos datos indican que no existe dependencia del tiempo y por lo tanto se puede considerar una inhibición de tipo reversible.

*Inhibición del componente EP $\alpha$ +EP $\delta$ .*

La inhibición del componente EP $\alpha$  con etopropazina 100  $\mu$ M a dos tiempos diferentes, fue 15,1% a los 10 min y 14,4% a los 30 min por lo que mostró un comportamiento no dependiente del tiempo y por lo tanto puede considerarse de tipo reversible. Además los porcentajes de inhibición del componente fueron muy similares a las encontradas en la actividad total. De acuerdo con este comportamiento el componente EP $\alpha$  se puede tratar de BuChE.

*Inhibición a tiempo fijo de PVasa total.*

La actividad PVasa total se inhibió hasta un 45,3 % con etopropazina 524  $\mu$ M, la máxima concentración ensayada. Como se ha visto en el apartado anterior la inhibición de la actividad PVasa con etopropazina es de tipo reversible de acuerdo con esto se han utilizado las ecuaciones del modelo reversible descrito en el **Anexo 1**.

El mejor modelo fue el de dos componentes:

- Un componente sensible con una proporción del 46,5-46,9 % de la actividad total y con una  $I_{50}$  de 32,61-34,89  $\mu$ M.
- Otro de una amplitud del 53,1-53,4% resistente a la inhibición.

El componente más sensible, con una amplitud de 46,5-46,9 %, correspondería al componente descrito como EP $\gamma$  (38-47%) y el componente resistente con un 53,1-53,4%, sería la suma del resto de los componentes.

#### 6.7.4. Consideraciones a cerca de la actividad PVasa en fracción de membrana de cerebro

Mangas discriminó cuatro componentes enzimáticos en la fracción de membrana de cerebro de pollo:

- **EP $\alpha$**  (2-8 %) es el componente más sensible a la inhibición con paraoxon ( $I_{50}$  30 min=15-43 nM) y también el más sensible para mipafox ( $I_{50}$  30 min=29 nM). Se reactiva de forma espontánea después de la inhibición con paraoxon.
- **EP $\beta$**  (35-40 %) es el segundo componente sensible a paraoxon ( $I_{50}$  30 min= 1540 nM), pero es prácticamente resistente a mipafox.
- **EP $\gamma$**  (38-47 %) es sensible a concentraciones micromolares de mipafox ( $I_{50}$  30 min= 5.3-6.6  $\mu$ M) y es resistente a paraoxon.
- **EP $\delta$**  (9-15%) es prácticamente resistente a todos los inhibidores ensayados.

En el presente trabajo hemos observado en la actividad PVasa que:

- El iso-OMPA discrimina tres componentes enzimáticos, siendo dos de ellos en proporciones muy similares a EP $\alpha$  y EP $\delta$  establecidos por Mangas et al (2012, 2013) y un tercer componente de amplitud 81-85% que interpretamos que responde a la suma de los componentes EP $\beta$  y EP $\gamma$  (con amplitudes de 38-41 y 39-48%, respectivamente).
- El BW284C51 no inhibe la actividad PVasa de membrana.
- La etopropazina diferencia dos componentes enzimáticos. El componente más sensible, con una amplitud de 46,5-46,9 %, que interpretamos que correspondería al componente descrito como EP $\gamma$  (38-47%) y el componente resistente con un 53,1-53,4%, sería la suma del resto de los componentes.

El criterio que se ha utilizado para establecer la relación de los distintos componentes obtenidos tras la inhibición con los diferentes inhibidores es que los porcentajes de los componentes deben conservarse sea cual sea el inhibidor utilizado (Tesis doctorales de I.Mangas, 2014 y J. Estévez 2003). En la **Tabla 6.8** discriminamos hasta cuatro componentes que se correlacionan bien con las proporciones obtenidas en los trabajos de Mangas et al (2012, 2013), atendiendo a este criterio. Tres de los componentes de membrana se discriminan mediante las curvas a tiempo fijo y el componente EP $\beta$ , es deducido a partir de las proporciones del resto de los componentes.

## 6.8. COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE ACETILTIOCOLINA DE MEMBRANA DE CEREBRO CON INHIBIDORES.

En el apartado 6.6. se demostró que hay inhibición de la actividad ChE con PV. Se estudiaron las interacciones de inhibidores típicos de colinesterasas y de compuestos OPs. Los resultados de estos estudios se resumen y comparan en las Tablas 6.9. y 6.10.

**Tabla 6.9. Comparación de los resultados de la Inhibición a dos tiempos diferentes de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina, en fracción de membrana de cerebro.** Se muestran los valores de inhibición obtenidos para 10 o 30 min con los diferentes inhibidores. Los datos aquí comparados corresponden a los resultados obtenidos en las Figuras 5.54, 5.57 y 5.58. Se indica el valor de % inhibición y DE de un experimento por triplicado.

Fracción	Inhibidor	Inhib. 10 min (%±DE)	% Inhib. 30 min (%±DE)	Depend. tiempo
Total	BW284C51 1 µM	48,2±0,1	50,7±0,1	NO
	iso-Ompa 0,5 µM	1,0±0,1	17,8±0,1	SI
	Etopropazina 150 µM	22,0±0,1	22,5±0,1	NO

**Tabla 6.10. Interpretación Global de los distintos componentes enzimáticos de actividad hidrolizante de acetiltiocolina detectados en fracción de membrana de cerebro de pollo.** La amplitud de cada componente se expresa indicando el rango de valores teniendo en cuenta globalmente los valores obtenidos con los diferentes inhibidores. Se muestran los valores de 150 (µM) obtenidos en dos experimentos independientes.

Inhibidor	Componentes	CP1 (5-7%)	CP2 (61-76%)	CP3 (18-22%)
	Amplitud TIPO			
iso-OMPA	Irreversible	28,70	R	0,20
etopropazina	Reversible	74,7		R
BW284c51	Reversible	R	0,30/0,40	2,85/3,83
Paraoxon	Irreversible	0,0122		
Mipafox	Irreversible	67,3/90,1		
PMSF	Irreversible	R	707	R

### 6.8.1. Inhibición a tiempo fijo con paraoxon.

La actividad hidrolizante de acetiltiocolina total se inhibió hasta un 97% con paraoxon 650 nM, la máxima concentración ensayada.

Para el tratamiento de los datos se ha asumido que no hay reactivación después de la inhibición (Estévez *et al.*, 2012; Mangas *et al.*, 2013). El mejor modelo fue el de dos componentes enzimáticos distintos (**Tabla 6.10.**):

- Un componente mayoritario muy sensible a la inhibición (96,1-96,8 % de amplitud) con  $I_{50}$  de 12,26-13,64 nM.
- Un componente resistente de una amplitud del 3,1-3,8%.

Lotti y Johnson (1978) encontraron para AChE de cerebro de pollo un valor de  $I_{50}$  con paraoxon de 10 nM. La sensibilidad observada del primer componente a este inhibidor es muy parecida a la encontrada en la bibliografía con lo que podríamos suponer que se trata de AChE. No se han encontrado este tipo de estudios en fracción de membrana.

### 6.8.2. Inhibición a tiempo fijo con mipafox

El mipafox es un compuesto organofosforado inductor de OPIDN (Davis *et al.*, 1985). En los experimentos de inhibición a tiempo fijo en presencia de mipafox la actividad hidrolizante de acetiltiocolina total se inhibió hasta un 97% con mipafox 900 nM, la máxima concentración ensayada.

El mejor modelo fue el de dos componentes enzimáticos distintos:

- Un componente mayoritario sensible a la inhibición (96,81-97,24 % de amplitud) con  $I_{50}$  (30min) de 67,3-90,1  $\mu$ M.
- Un segundo componente minoritario resistente (2.7-3.1 %).

Podemos considerar que toda la actividad colinesterásica se inhibe totalmente como un solo componente sensible con  $I_{50}$  estimada de 67,29-90,11  $\mu$ M. La  $I_{50}$  estimada por Lotti y Johnson (1978) para AChE de cerebro de gallina con mipafox fue 41  $\mu$ M, en los trabajos llevados a cabo en fracción de membrana de cerebro de gallina adulta. El valor de  $I_{50}^{(30 \text{ min})}$  obtenida en este trabajo se corresponde con valores bibliográficos encontrados para actividad AChE en cerebro de pollo de acuerdo con esto se podría deducir que toda la actividad enzimática podría corresponder a actividad AChE.

### 6.8.3. Inhibición a tiempo fijo con PMSF

La actividad hidrolizante de acetiltiocolina total se inhibió hasta un 58% con PMSF 1500  $\mu\text{M}$ , la máxima concentración ensayada. El mejor modelo fue el de dos componentes enzimáticos:

- Un componente sensible (61,5-62,0 %) con  $I_{50}$ (30 min) de 707-731  $\mu\text{M}$ .
- Un componente resistente 37,9-38,4 %.

No se han encontrado publicaciones sobre inhibición de ChE por PMSF realizados en fracción de membrana.

### 6.8.4. Inhibición con BW284C51.

*Inhibición a diferentes tiempos en actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.*

Después de la incubación durante 10 min con BW284C51 1  $\mu\text{M}$  el porcentaje de inhibición fue 48,2% y a 30 min 50,7%. Estos datos indican que no existe dependencia del tiempo lo que sugiere que se trata de una inhibición de tipo reversible (**Tabla 6.9.**)

*Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetiltiocolina total.*

La actividad hidrolizante de acetiltiocolina total se inhibió hasta un 93% con BW284C51 210  $\mu\text{M}$ , la máxima concentración ensayada.

Después de aplicar los modelos de ecuaciones reversibles desarrolladas en el Anexo 1, el mejor modelo fue el de tres componentes enzimáticos:

- Un componente sensible a la inhibición (71,3-75,0%) con  $I_{50}$  de 0,3-0,4  $\mu\text{M}$ .
- Un componente con una sensibilidad intermedia (17,9-22,2%) con  $I_{50}$  entre 2,85-3,83  $\mu\text{M}$ .
- Un componente resistente del 6,4-6,9%.

Mikalsen y colaboradores (1986) describieron que con 1  $\mu\text{M}$  de BW284c51 se inhibe toda la actividad colinesterasa en eritrocitos de bovino, se deduce que su  $I_{50}$  tiene un valor menor de 1  $\mu\text{M}$ .

## DISCUSIÓN

En fracción particulada, el valor obtenido en este trabajo es mayor. Atack y colaboradores (1989) describieron que las  $I_{50}$  en AChE con BW284c51 en eritrocitos y córtex humanos y anguila eléctrica fueron 18, 28 y 8 nM respectivamente, y también describieron que los valores de  $I_{50}$  en BuChE con BW284c51 en córtex y plasma humanos fueron 300 y 48  $\mu\text{M}$  respectivamente. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que el componente más sensible se parece a los datos encontrados en la bibliografía de AChE. El segundo componente de sensibilidad intermedia podría ser BuChE. Las diferencias entre este trabajo y Atack y colaboradores (1989) pueden explicarse porque en este trabajo estudiamos un modelo animal diferente.

### 6.8.5. Inhibición con iso-OMPA

*Inhibición a diferentes tiempos en actividad hidrolizante de acetilcolina total.*

Después de la incubación durante 10 min con Iso-OMPA 0,5  $\mu\text{M}$  el porcentaje de inhibición fue 1% y después de la incubación durante 30 min 17,8% (**Tabla 6.9.**). Estos datos indican que existe dependencia del tiempo y sugiere que se trata de una inhibición de tipo irreversible.

*Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetilcolina total.*

La actividad hidrolizante de acetilcolina total se inhibió hasta un 25% con iso-OMPA 900  $\mu\text{M}$ , la máxima concentración ensayada.

Después de aplicar los modelos de ecuaciones para inhibidores irreversibles el mejor modelo fue el de tres componentes enzimáticos distintos:

- El componente más sensible (18,3%) con  $I_{50}$  de 0.20  $\mu\text{M}$ .
- Un componente de sensibilidad intermedia (5,5%) con  $I_{50}$  de 28.7  $\mu\text{M}$ .
- Un tercer componente resistente mayoritario (76,1%).

Atack y colaboradores (1989) describieron que las  $I_{50}$  en BuChE con iso-OMPA en córtex y plasma humanos fueron 6.7 y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente, valores del orden a la  $I_{50}$  obtenida en este trabajo para el componente más sensible considerando que el modelo animal de este trabajo es pollo. También describieron valores de  $I_{50}$  en AChE con iso-OMPA en eritrocitos y córtex humanos y anguila eléctrica. Estos valores fueron 340, 180 y  $>1000$   $\mu\text{M}$  respectivamente, similares a la  $I_{50}$  obtenida en el segundo componente enzimático sensible del presente trabajo. De acuerdo a las  $I_{50}$ (30 min) encontradas en la bibliografía, se podría interpretar que el componente más sensible a iso-OMPA de fracción particulada de cerebro de pollo se trata de actividad BuChE, y que el componente resistente sea actividad AChE.

### 6.8.6. Inhibición con etopropazina.

*Inhibición a diferentes tiempos en actividad hidrolizante de acetilcolina total.*

La actividad hidrolizante de acetilcolina total se inhibió un 22% tras la incubación 10 min con etopropazina 150  $\mu\text{M}$  y después de la incubación durante 30 min, se inhibió un 22,5%. Estos datos indican que no existe dependencia del tiempo lo que sugiere una inhibición de tipo reversible.

*Inhibición a tiempo fijo de actividad hidrolizante de acetilcolina total.*

La actividad hidrolizante de acetilcolina total se inhibió hasta un 59% con etopropazina 524  $\mu\text{M}$ , la máxima concentración ensayada.

Después de aplicar los modelos de ecuaciones para inhibidores reversibles el mejor modelo fue el de dos componentes enzimáticos distintos:

- Un componente sensible (82,3-83,0 %) con  $I_{50}$  estimada de 74,7  $\mu\text{M}$ .
- Y otro prácticamente resistente que correspondería al 16,9-17,6 % restante.

Atack y colaboradores (1989) describieron unas  $I_{50}$  en BuChE con etopropazina en córtex y plasma humanos de 0.21 y 0.3  $\mu\text{M}$  respectivamente, y valores de  $I_{50}$  en AChE con etopropazina en eritrocitos y córtex humanos y anguila eléctrica de 260, 210 y 120  $\mu\text{M}$  respectivamente. De acuerdo a las  $I_{50}$  encontradas en la bibliografía, el componente sensible a etopropazina de fracción particulada de cerebro de pollo podría corresponder a actividad AChE.

### 6.8.7. Consideraciones a cerca de la actividad hidrolizante de acetilcolina en fracción de membrana de cerebro

Analizando globalmente los datos se ha interpretado que al menos hay tres componentes de actividad hidrolizante de acetilcolina en membranas (**Tabla 6.10**):

- **CP1** (5-7%). Es sensible a iso-OMPA ( $I_{50}$  30 min= 28,7  $\mu\text{M}$ ) y resistente a PMSF y BW284C51.
- **CP2** (61-76%). Es muy sensible a BW284C51 ( $I_{50}$  30 min = 0,3  $\mu\text{M}$ ), poco sensible a PMSF ( $I_{50}$  30 min = 707  $\mu\text{M}$ ) y resistente a iso-OMPA.
- **CP3** (18-22%). Es resistente a PMSF y etopropazina, de sensibilidad intermedia a BW284C51 ( $I_{50}$  30 min = 2,85  $\mu\text{M}$ ) y sensible a iso-OMPA ( $I_{50}$  30 min = 0,2  $\mu\text{M}$ ).

## DISCUSIÓN

Otras consideraciones:

- Con mipafox y paraoxon las curvas de inhibición se comportan como un solo componente así que en las condiciones de ensayo, no se han podido discriminar componentes de diferente sensibilidad.
- Con la inhibición de iso-OMPA (considerado inhibidor específico de BuChE) se ha podido distinguir 3 componentes: CP3 cuya  $I_{50}$  0,20  $\mu\text{M}$  es del orden de la descrita por Attack et al (1989) para este compuesto con BuChE (6,7 y 1  $\mu\text{M}$ ), CP2 que es resistente al iso-OMPA como corresponde a la AChE y CP3 cuya  $I_{50}$  de 28,70  $\mu\text{M}$  no corresponde a ningún valor encontrado en la bibliografía.
- Con etopropazina se distinguen dos componentes, uno resistente y otro poco sensible ( $I_{50}$  74,7  $\mu\text{M}$ ).
- El BW248C51 diferencia tres componentes: un componente mayoritario muy sensible ( $I_{50}$  0,3-0,4  $\mu\text{M}$ ), un segundo componente de menor sensibilidad ( $I_{50}$  2,85-3,83  $\mu\text{M}$ ) y amplitud y un tercer componente minoritario resistente.

Propuesta de condiciones de ensayo para la discriminación de los componentes de actividad colinesterasa de membrana.

Se propone un ensayo basado en el uso de las siguientes condiciones, estas concentraciones corresponden a las concentraciones que inhibirían el 99 % de cada componente ( $I_{99}^{30 \text{ min}}$ ):

- (A) Actividad total
- (B) Actividad resistente a iso-OMPA 191  $\mu\text{M}$
- (C) Actividad resistente a iso-OMPA 1,5  $\mu\text{M}$

La actividad de cada componente se estimaría por:

- CP2 =B
- CP3= A-C
- CP1= C-B

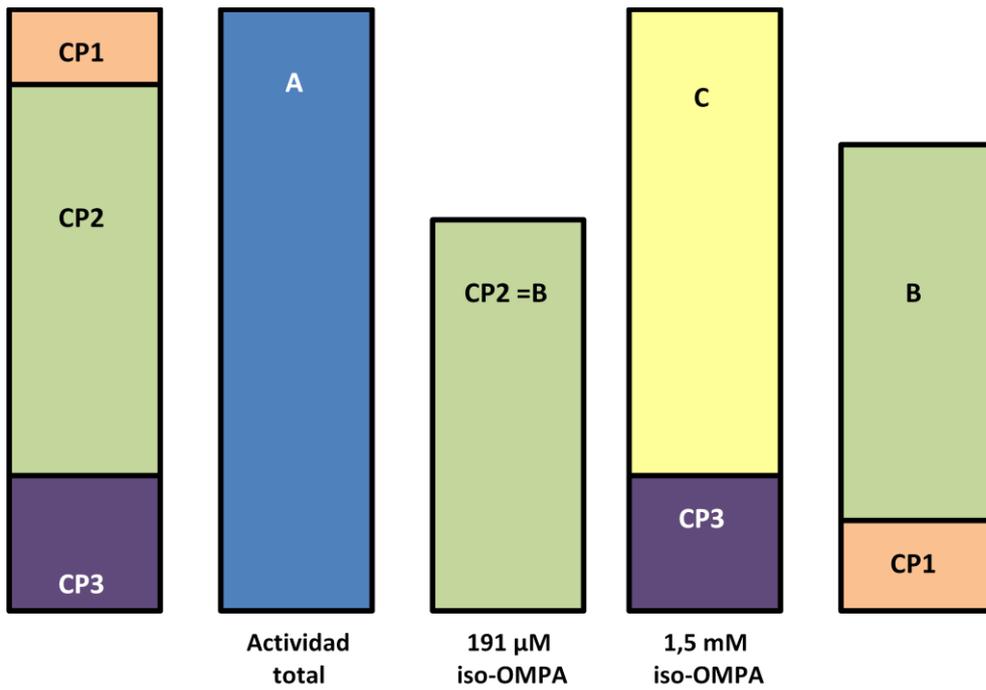


Figura 6.3. Ensayo de discriminación de los diferentes componentes en fracción de membrana de cerebro de pollo, utilizando iso-OMPA.



**6.9. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES GLOBALES DE LA RELACIÓN ENTRE ACTIVIDADES PVasa y ChE EN FRACCIÓN DE MEMBRANAS DE CEREBRO.**

De los cuatro componentes de la actividad PVasa, sólo EP $\alpha$  interacciona con el sustrato acetilcolina, el resto de componentes no lo hacen. En cambio la actividad ChE si interacciona con el sustrato PV, excepto la actividad resistente a paraoxon 25  $\mu$ M que a esa concentración está inhibida.

Se han detectado cuatro componentes en actividad PVasa con iso-Ompa, BW284C51 y etopropazina, tres de ellos se discriminan mediante las curvas a tiempo fijo y el cuarto es deducido a partir de las proporciones del resto de componentes.

De acuerdo con las interacciones con BW284C51 e iso-OMPA con el componente EP $\alpha$  de la actividad PVasa, no se inhibe con BW284C51 y sí con iso-OMPA, este componente podría ser o tener actividad butirilcolinesterasa, con etopropazina no hay inhibición pero como es reversible podría estar dependiendo de la naturaleza del sustrato. Sin embargo esta interpretación debe ser considerada con cuidado ya que el iso-Ompa y la etopropazina pueden inhibir otras actividades a parte de la hidrolizante de acetilcolina.

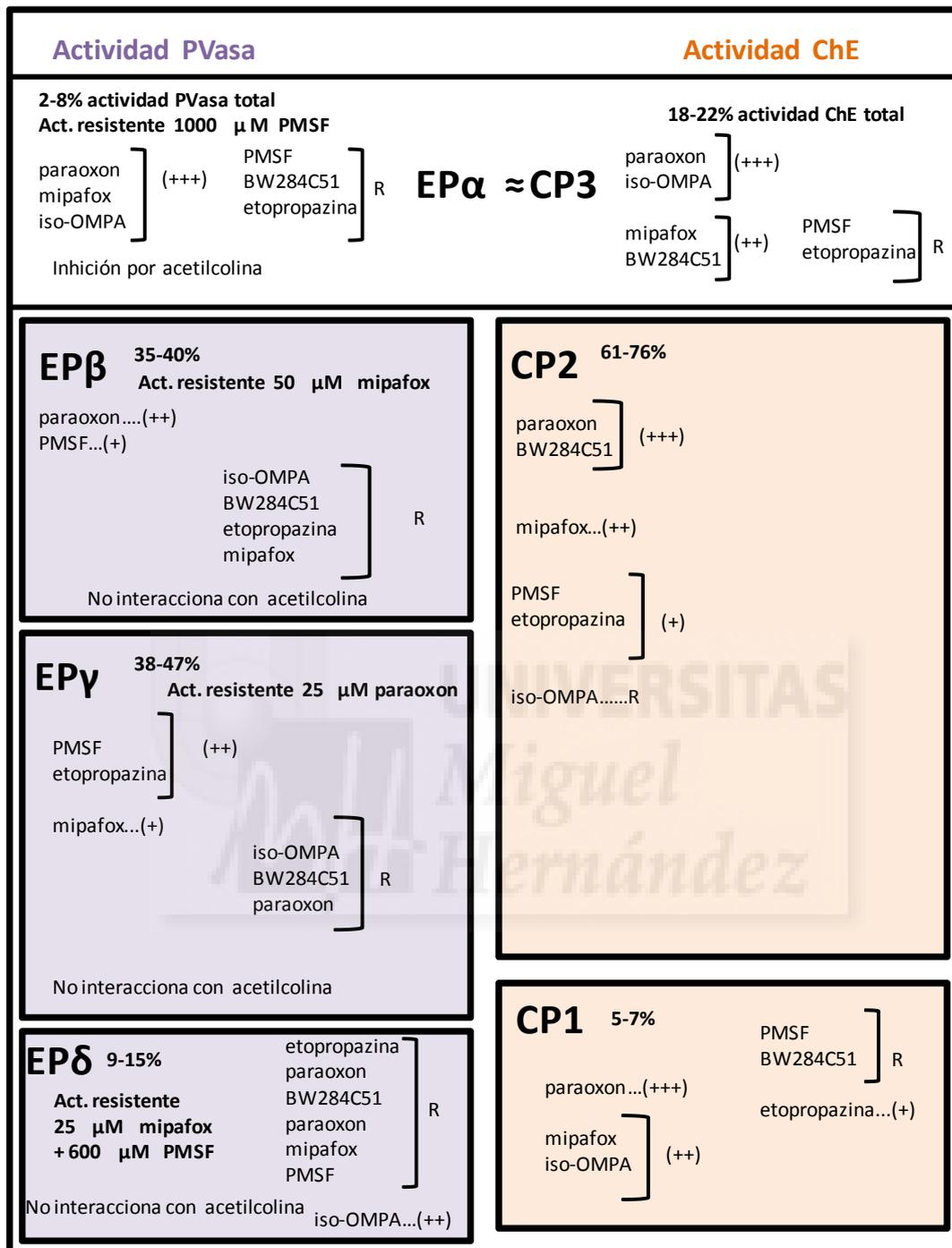
En actividad ChE se han detectado tres componentes (CP1, CP2 y CP3) de propiedades diferentes utilizando iso-Ompa, BW284C51, etopropazina, paraoxon, mipafox y PMSF.

El componente de la actividad PVasa EP $\delta$  no forma parte de los componentes de la actividad ChE porque sus características (solo es sensible al iso-OMPA) no se encuentran en CP1, CP2 ni CP3.

EP $\beta$  es resistente a mipafox pero CP1, CP2 y CP3 son sensibles a este inhibidor, y el mismo criterio puede usarse con EP $\gamma$  y el paraoxon; por lo tanto EP $\beta$ , EP $\gamma$  y EP $\delta$  no tienen actividad ChE. CP2 muestra la mayoría de actividad ChE en membrana se comporta de forma similar a lo establecido para la AChE de mamíferos.

Parece existir correlación entre la actividad PVasa EP $\alpha$  y la actividad ChE CP3 ambos son sensibles a mipafox, paraoxon e iso-OMPA y resistentes a etopropazina y PMSF, la única diferencia entre ellos es la sensibilidad a BW284C51 ya que EP $\alpha$  es resistente y CP1 muestra una sensibilidad intermedia, aunque dado el carácter reversible del BW284C51 su comportamiento puede variar en función del sustrato con el que esté compitiendo.

Los datos obtenidos en este trabajo con BW284c51, etopropazina e iso-OMPA sugieren que no podemos utilizarlos para diferenciar entre AChE y BuChE en cerebro de pollo.



**Figura.6.4 Componentes de actividades hidrolizantes de fenilvalerato (PVasa) y de acetilcolina (ChE) de membrana de cerebro.** Se muestran los distintos componentes de las actividades PVasa y ChE, con sus amplitudes (%) y sensibilidades a los inhibidores: (+++) muy sensible, (++) sensibilidad intermedia, (+) baja sensibilidad y (R) resistente.





## **7. CONCLUSIONES**



1. Se ha desarrollado un método modificado a partir del método cinético de Ellman para medir la actividad hidrolizante de acetilcolina. Este método permite procesar un gran número de muestras en ensayos cinéticos complejos, disminuyendo el tiempo de ensayo y eliminando la interacción del DTNB con las proteínas en el tiempo de reacción enzima-sustrato. El método ha sido utilizado en este trabajo.
2. Se ha elaborado un modelo matemático para el análisis de inhibidores reversibles en mezclas de varias enzimas. Permite estimar los valores de  $I_{50}$  y diferenciar el número de componentes y su amplitud o porcentaje.
3. En fracción soluble de cerebro se ha concluido que:
  - ✓ La acetilcolina interacciona con los componentes de actividad PVasa  $E\alpha$  y  $E\gamma$ , de manera no competitiva y competitiva, respectivamente.
  - ✓ La actividad PVasa total se inhibe con el sustrato acetil- $\beta$ -metiltiocolina.
  - ✓ El componente de actividad PVasa  $E\alpha$ , interacciona de forma irreversible con iso-OMPA con una  $I_{50}$  de 22,1-36,7  $\mu\text{M}$  y de manera reversible con la etopropazina con una  $I_{50}$  de 0,001-0,0047. El BW284C51 no inhibe al componente  $E\alpha$ .
  - ✓ El componente de actividad PVasa  $E\gamma$ , interacciona de forma irreversible con iso-OMPA con una  $I_{50}$  de 0,1-0,2  $\mu\text{M}$ ; con etopropazina de forma irreversible con una  $I_{50}$  de 3,47-7,06  $\mu\text{M}$  y con BW284C51 de forma irreversible con una  $I_{50}$  de 43,9-69,3  $\mu\text{M}$ . En actividad PVasa con etopropazina, BW284C51 e iso-OMPA, discriminamos hasta tres componentes que se correlacionan bien con las proporciones de los componentes  $E\alpha$ ,  $E\beta$  y  $E\gamma$  obtenidos por Mangas et al (2012).
  - ✓ El PV interacciona con la actividad colinesterasa total.
  - ✓ En la actividad colinesterasa de fracción soluble de cerebro no se ha observado saturación por sustrato.
  - ✓ La actividad colinesterasa se inhibe de forma reversible con BW284C51 y con etopropazina y de manera irreversible con el iso-OMPA.
  - ✓ En la actividad colinesterasa se han detectado y discriminado 4 componentes (CS1, CS2, CS3 Y CS4) utilizando iso-OMPA, BW284C51, etopropazina, mipafox, paraoxon y PMSF.
  - ✓ Se puede establecer correlación entre el componente de actividad PVasa  $E\alpha$  y el componente de la actividad colinesterasa CS1 y puede corresponder a una actividad butirilcolinesterasa.
  - ✓ Por el contrario CS2, CS3 Y CS4 no se correlacionan con los componentes de la actividad PVasa  $E\beta$  ni  $E\gamma$ .

## CONCLUSIONES

- ✓ Se ha propuesto un ensayo simple a tiempo fijo, utilizando el iso-OMPA y el PMSF para discriminar los componentes de actividad colinesterasa en preparaciones complejas de fracción soluble.

### 4. En fracción de membrana de cerebro:

- ✓ La acetilcolina interacciona con el componente de actividad PVasa  $EP\alpha$ , aparentemente de manera no competitiva.
- ✓ El componente de actividad PVasa  $EP\alpha$ , se inhibe de forma reversible con etopropazina. El BW284C51 no inhibe al componente  $EP\alpha$ . No se dispone de datos suficientes para confirmar la reversibilidad de  $EP\alpha$  con el iso-OMPA.
- ✓ La actividad PVasa total es inhibida de manera reversible por etopropazina e iso-OMPA, el BW284C51 no inhibe.
- ✓ En actividad PVasa con las interacciones con etopropazina, BW284C51 e iso-OMPA, discriminamos cuatro componentes que a su vez se correlacionan bien con las proporciones obtenidas en los trabajos de Mangas et al (2012, 2013).
- ✓ El PV interacciona con la actividad colinesterasa.
- ✓ La actividad colinesterasa se inhibe de forma reversible con BW284C51 y con etopropazina y de manera irreversible con el iso-OMPA.
- ✓ En la actividad colinesterasa se han detectado y discriminado tres componentes (CP1, CP2 y CP3) utilizando iso-OMPA, BW284C51, etopropazina, mipafox, paraoxon y PMSF.
- ✓ Se puede establecer correlación entre el componente de actividad PVasa  $EP\alpha$  y la el componente de actividad colinesterasa CP3.
- ✓ Por el contrario no se deduce relación entre los otros componentes de la actividad PVasa y colinesterasa.
- ✓ Se ha propuesto un ensayo simple a tiempo fijo, utilizando el iso-OMPA para discriminar los componentes de actividad colinesterasa en preparaciones complejas de fracción de membrana.

### 5. La actividad PVasa que parece contener actividad hidrolizante de acetilcolina no tiene las propiedades típicas de las colinesterasas de mamíferos.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que no se pueden utilizar BW284C51, etopropazina e iso-OMPA para diferenciar entre AChE y BuChE en cerebro de pollo.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



Abou-Donia, M.B., Lapadula, D.M. Mechanism of organophosphorus ester-induced delayed - neurotoxicity: type I and type II. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990; 30: 405-440.

Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control.* 19, 716-723.

Alberty, R.A. Kinetic effects of the ionization of groups in the enzyme molecule. *Journal of Cellular and Comparative Physiology. Supplement: Volume 47, Supplement 1, May 1956. Volume 47, Issue Supplement 1, pages 245-281, May 1956.*

Alles, G.A. y Hawes, R.C. *J. Biol. Chem.*,133 (1940) pp 375-390.

Aldrige, W.N. and Reiner, E. Acylated amino acids in inhibited B-esterases. In: Neuberger A., Tatum E.L., (Eds), *Enzyme inhibitors as substrates.* 1972. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp170-175.

Aldridge, W.N., (1953). Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J.* 53(1):110-7.

Aldrige, W.N. (1993) The esterases: perspectives and problems. *Chem Biol Interact.* Jun; 87 (1-3):5-13.

Al-Jafari, A.A., Kamal, M.A., 1994. The preparation and kinetic properties of multiple forms of chicken brain acetylcholinesterase. *Cell Biochem Funct.* 12(1), 29-35.

Amstrong, C.M. Voltage-dependent ion channels and their gating. *Physiol. Rev.* 1992, 72 Suppl 4:S5-S-13.

Arpagaus, M., Chatonnet, A., Masson, P., Newton, M., Vaughan, T.A., Bartels, C.F., Nogueira, C.P., La Du, B.N. y Lockridge, O. (1991). Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. *J. Biol. Chem.* 266: 6966-6974.

Augustinsson, K.B. (1968). The evolution of esterases in vertebrates, In: *Homologous enzymes and biochemical evolution*, N.V. Thiery & J. Roche, pp. 299-311, Gordon & Breach, New York

Baños JE, Bosch F. Aspectos históricos de los organofosforados. *Med. Clin. (Barc)* 1992; 99: 718-719.

Barnett, P., and Rosenberry, T. L., 1978, A residual subunit fragment in the conversion of 18S to 11S acetylcholinesterase, *Fed. Proc.* 36:485.

Barr, D.B.; Bravo, R.; Weerasekera, G.; Caltabiano, L.M.; Whitehead, R.D. Jr; Olsson, A.O.; Caudill, S.P. Schober, S.E.; Pirkle, J.L.; Sampson, E.J.Jackson, R.J.; Needham, L.L. Concentrations of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in the U.S. population. *Environ Health Perspect.* 2004 Feb;112(2):186-200.

## BIBLIOGRAFÍA

Bazylewicz-Walczak, B.; Majczakowa, W.; Szymczak, M. Behavioral effects of occupational exposure to organophosphorus pesticides in female greenhouse planting workers. *Neurotoxicology*. 1999 Oct;20 (5):819-26.

Bellino, M., Ficarra, M., Frontalip, N., Ghezzi, F., Guarcini, A. M., Orecchio, F., Serpietri, L.A., Traina, M. E., 1978. A quick and simple method for the routine determination of acetyl- and butyrylcholinesterase in blood. *Br. J. Ind. Med.*, 35, 161-167.

Bermejillo, M. Intoxicación laboral por el triorto cresil fosfato. *Rev Med Seg Trab* 1971; 74: 49-58.

Bevington, P.R. (1969). *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, McGraw-Hill, New York, 1969.

De Bleecker, J., Van den Neucker, K. and Colardyn, F. Intermediate syndrome in organophosphorus poisoning: a prospective study. *Crit Care Med*. 1993 Nov;21(11):1706-11.

Brown, M.A.; Brix, K.A. Review of health consequences from high, intermediate and low level exposure to organophosphorus nerve agents. *J Appl Toxicol*. 1998 Nov-Dec; 18(6):393-408.

Brzezinski, M.R., Abraham, T.L., Stone, C.L., Dean, R.A., Bosron, W.F. Purification and characterization of a human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of B-benzoylgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine. *Biochem Pharmacol* 1994; 48:1747-55.

Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M.G., Cuendet, M., Pezuto, J.M., Santarsiero, B.D., Mesecar, A.D., 2010. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem. J.* 429, 273-282.

Carnes, S.A., Watson, A.P. Disposing of the US chemical weapons stockpile: an approaching reality. *JAMA* 1989; 262: 653-659.

Casida, J.E., and Quistad, G.B., 2005. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chem. Biol. Interact.* 57-158, 277-283.

Casida, J.E., Durkin, K.A. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol. Interact.* 2013 Mar 25;203(1):221-5.

Cashman, J., Perroti, B., Berkman, C. Pharmacokinetics and molecular detoxification. *Environ Health Perspect.* 1996; 104:23–40. This excellent review details the role of carboxylesterases in xenobiotic metabolism.

Céspedes, M.V.; Escudero, M.A.; Barril, J.; Sogorb, M.A.; Vicedo, J.L.; Vilanova, E. Discrimination of carboxylesterases of chicken neural tissue by inhibition with a neuropathic, non-neuropathic organophosphorus compounds and neuropathy promoter. *Chemico- Biological Interactions.* Volum 106, Issue 3, 24 October 1997, Pages 191–200.

Changeux, J.P. (1966). Effects of ionic forces and curarizing agents on the acetylcholine esterase properties of the electric tissue of *Torpedo marmorata*. *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* Feb 21; 262 (8):937-40.

Cleland WW (1963a) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica Biophysica Acta* 67: 104–137.

Cleland WW (1963b) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochimica Biophysica Acta* 67: 188–196.

Colosio, C.; Tiramani, M.; Brambilla, G.; Colombi, A.; Moretto, A. Neurobehavioral effects of pesticides with special focus on organophosphorus compounds: wich is the real size of the problem? *Neurotoxicology.* 2009 Nov;30 (6):1155-61.

COT Report, 1999. Organophosphates. A report of the comitee on Toxicology of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. UK Department of Health, London.

Cleland WW (1979) Statistical analysis of enzyme kinetic data. *Methods in Enzymology* 63: 103–138.

Cuany A., J. Handani, J. Berge, D. Fournier, M. Raymond, G. P. Georghiou, and N. Pasteur. 1993. Action of esterase B1 on clorpyrifos in organophosphate resistant *Culex* mosquitoes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45: 1-6.

Dale, H.H. The beginnins and the prospects of neurohumoral transmission. *Pharmacol. Rev.*, 1954, 6:7-13.

Davis, C.R. y Richardson, R.J. Organophosphorus compounds. Spencer P.S. y Schaumburg H.H., Eds., 1980. *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, Baltimore, pp: 527-44.

Dubois, K. P. & Mangun, G. H. (1947). *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.*, 64, 137.

## BIBLIOGRAFÍA

Dupree, J.L. and Bigbee, J.W. (1994). Retardation of neuritic outgrowth and cytoskeletal changes accompany acetylcholinesterase inhibitor treatment in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci. Res.*, 39, 567–575.

Edwards J. A. and Brimijoin S. (1983) Effects of hypophysectomy on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1183-1189.

Eichler, J., Anselment, A., Sussman, J.L., Massoulie, J. and Silman, I. (1994). Differential effects of 'peripheral' site ligands on Torpedo and chicken acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.*, 45, 335–340.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., Feather-Stone. R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7, 88-95.

Escudero MA, Sogorb MA, Vilanova E., 1996. An automatable microassay for phenyl valerate esterase activities sensitive to organophosphorus compounds. *Toxicol. Letters.* 89:241-247.

Escudero M.A., Vilanova E., (1997). Purification and characterisation of naturally soluble neuropathy target esterase from chicken sciatic nerve by HPLC and Western blot. *J. Neurochem.* 69:1975-82.

Escudero MA, Céspedes MV, and Vilanova E, (1997). Chromatographic discrimination of soluble neuropathy target esterase isoenzymes and related phenyl valerate esterases from chicken brain, spinal cord, and sciatic nerve. *J. Neurochem.* 68(5), 2170-2176.

Estévez, J., Barril, J., and Vilanova, E., 2010. Inhibition with spontaneous reactivation and the "ongoing inhibition" effect of esterases by biotinylated organophosphorus compounds: S9B as a model. *Chem.-Biol. Interact.* 187 (1–3), 397–402.

Estévez J., y Vilanova E., (2009). Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: Esterases and organophosphorus compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 39 (5):427-448.

Estévez, J., Barril, J., Vilanova, E., 2012. Kinetics of inhibition of soluble peripheral nerve esterases by PMSF: a non-stable compound that potentiates the organophosphorus-induced delayed neurotoxicity. *Arch. Toxicol.* 86, 767–777.

Estévez, J., García-Perez, A., Barril, J., Pellín, M.C., Vilanova, E., 2004. The inhibition of the high sensitive peripheral nerve soluble esterases by mipafox. A new mathematical processing for the kinetics of inhibition of esterases by organophosphorus compounds. *Toxicol. Lett.* 151, 243–249.

Estévez, J., García-Pérez, A., Barril, J., Vilanova, E., 2011. Inhibition with spontaneous reactivation of carboxyl esterases by organophosphorus compounds: paraoxon as a model. *Chem. Res. Toxicol.* 2011 (24), 135–143.

Estévez, J., Mangas I., Sogorb, M.A., Vilanova E., 2013. Interactions of neuropathy inducers and potentiators/promoters with soluble esterases. *Chem. Biol. Interact.* 203(1), 245-50

Estévez, J., and Vilanova, E., 2009. Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: Esterases and organophosphorus compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 39 (5), 427–448.

Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., 2003. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal. Biochem.* 312, 224–227.

FAO report: FAO/PL:1968/M/9/1/WHO/FOOD ADD/69.35 Joint Meeting of the FAO Working Party of Experts and the WHO Expert Committee on Pesticide Residues. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Geneva, 9-16 December, 1969.

Fahrney and Gold, 1963; Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase,  $\alpha$ -Chymotrypsin, and Trypsin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85 (7), pp 997–1000.

Fišar, Z., Hroudová, J., Raboch, J., 2010. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 31(5), 645–656 .

Fredriksson, T. and Bigelow, J.K. Tissue distribution of P32-labeled parathion. Autoradiographic technique. 1961. *Arch Environ Health* 2, 663-667.

Froede, H.C.; Wilson, I.B. In the *Enzymes* (Ed Boyer P.D.) 3<sup>rd</sup> Ed. 1971, 5, 87-114.

Galehr, O. y Plattner, F. *Arch. Ges. Physiol.* 218 (1927), pg 488-505.

Gallo MA, Lawryk NJ. Organic phosphorus pesticides. En: Hayes WJ, Laws ER, editores. *Handbook of pesticide toxicology.* San Diego: Academic Press; 1991; 917-1.123.

García-Pérez, A.G.; Barril, J.; Estévez, J.; Vilanova, E. Properties of phenyl valerate esterase activities from chicken serum are comparable with soluble esterases of peripheral nerves in relation with organophosphorus compounds inhibition. *Toxicol Lett.* 2003 Apr 30;142(1-2):1-10.

Gatley, S.J. Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. *Biochem Pharmacol* 41:1249-1254, 1991.

Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research* 50 (2004) 433–440.

Gibney, G. MacPhee-Quigley, K. Thompson, B., Vedvick, T., Low, M.G., Taylor, S. and Taylor, P. (1988) Divergence in primary structure between the molecular forms of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 263, 1140-1145.

## BIBLIOGRAFÍA

Greenspan R.J.; Finn, J.A. Jr; Hall, J.C. Acetylcholinesterase mutants in drosophila and their effects on the structure and function of the central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* Vol 189, Issue 4, pages 741–774, 15 February 1980.

Grube, A.; Donalson, D.; Kiely, T.; Wu, L. Pesticides Industry Sales and Usage 2006 and 2007 Market Estimateds. 2011 Biological and Economic Analysis Division Office of Pesticide Programs. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention U.S. Environmental Protection Agency, Washintong.

Gupta KC, Kingsbury DW. Translational modulation in vitro of a eukaryotic viral mRNA encoding overlapping genes: ribosome scanning and potential roles of conformational changes in the P/C mRNA of Sendai virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Aug 30;**131**(1):91–97.

Gupta KC. Antisense oligodeoxynucleotides provide insight into mechanism of translation initiation of two Sendai virus mRNAs. *J Biol Chem.* 1987 Jun 5;**262**(16):7492–7496.

Haas R. Haas, T.R. Marshall, T.L. Rosenberry. Substrate-selective inhibition and peripheral site labeling of acetylcholinesterase by platinum(terpyridine)chloride. Shafferman, B. Velan (Eds.), *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*, Plenum Press, New York (1992), pp. 131–140.

Hall, L.M.C y Spierer, P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster* Structural gene for Acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.* 5 2949-2954.

Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, 1992.

Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. Aquantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Phisiol (Lond)* 1952, 117:500-544.

Hosokawa M, Maki T and Satoh T (1987) Multiplicity and regulation of hepatic microsomal carboxylesterases in rats. *Mol Pharmacol* 31:579–584.

Hu H, Cook-Deegan R, Shukri A. The use of chemical weapons: conducting an investigation using survey epidemiology. *JAMA* 1989; 262: 640-643.

Instituto Nacional de Toxicología y Asociación de Fabricantes de Detergentes, Tensioactivos y Productos Afines. Madrid: ALVI, 1996.

John Willey & Sons. ISBN: 978-0-470-41030-0, pp. 121-133.

James, G.T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal Biochem.* 1978 Jun 1;**86**(2):574-9.

Johnson, M.K. A phosphorylation site in brain and delayed neurotoxic effects of some organophosphorus compounds. 1969b *Biochem.J.* 111, 487-495.

Johnson, M.K. The delayed neuropathy caused by some organophosphorous esters: mechanism and challenge. 1975 CRC. Crit. Rev. Toxicol 3:289-316.

Johnson M.K., Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. 1977 Arch Toxicol; 37(2):113-5.

Johnson MK. Delayed neurotoxicity induced by organophosphorus compounds. Areas of understanding and ignorance. Dev Toxicol Environ Sci 1980; 8: 2738.

Johnson, M. K and Clothier, B., Biochemical events in delayed neurotoxicity: is aging of chymotrypsin inhibited by saligenin cyclic phosphates a model for aging of neurotoxic esterase? 1980 Toxicol. Lett. 5(1), 95-8.

Johnson, MK. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. 1982 Rev Biochem Toxicol; 4: 141-212.

Jonhson, M.K. Receptor or enzyme: the puzzle of NTE and organophosphate-induced delayed polyneuropathy. TIPS 1987 8:174-179.

Kaplan, J.G., Kessler, J., Rosenberg, N., Pack, D., Schaumburg, H.H. Sensory neuropathy associated with dursban (chlorpyrifos) exposure. Neurology 43: 2193-2196.

Karalliedde, L. and Henry, J.A. Effects of organophosphates on skeletal muscle. Hum Exp Toxicol 1993 Jul; 12(4):289-96.

Kedderis GL, Hollenberg PF. Characterization of the N-demethylation reactions catalyzed by horseradish peroxidase. J Biol Chem. 1983 Jul 10;258(13):8129-38.

Keeler, J.R. ; Hurst, C.G.; Dunn, M.A. Pyridostigmine used as a nerve agent pretreatment under wartime conditions. JAMA 1991; 266: 693-695.

Kemp, J.R. and Wallace, K.B. Molecular Determinants of the Species-Selective inhibition of Brain Acetylcholinesterase. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1990 104, 246-258.

Kingsbury, N. y Masters, C.J. Biochim. Biophys. Acta 200 (1970) pp 58-69

Kling, G. (1986). Histochemical localization of cholinesterase and monoamides in the central heart of *Sepia officinalis* L (Cephalopoda). Histochemistry 85: 241-250.

Koelle, G.B. Cholineesterase and anticholinesterase agents. Handbuch der Experimentellen Pharmacologie. (Edited by Eichlcr O. and Farah A,). Vol. 15. pp. 1220. 1963 Springer. Berlin.

## BIBLIOGRAFÍA

Komersová, A., Komers, K., Čegan, A. New Findings about Ellman's Method to Determine Cholinesterase Activity. 2007 Z. Naturforsch. 62c, 150-154.

Kutty, K.M.; Payne, R.H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. J Clin Lab Anal 1994; 8(4):247-50. Review. PubMed PMID: 7931819.

Layer P.G., Weikert, T., Willbold, E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and butyrylcholinesterase activity. Cell Tissue Res. 1992. 268:409-418.

Li, X.Q., Andersson, T.B., Ahlström, M., Weidolf, L.,. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs Omeprazole, Esomeprazole, Lansoprazole, Pantoprazole and Rabeprazole on human cytochrome P450 activities. Drug. Metab. Dispos 2004. 32, 821-827.

Lockridge, O.; Duysen, E.G.; Voelker, T.; Thomson, c.m.; Schopfer, L.M. Life without acetylcholinesterase: the implications of cholinesterase inhibitor toxicity in AChE- knowout mice. Environ. Toxicol Pharmacol. 2005 May; 19(3):463-9.

Lockridge, O.. Aminoacid sequence of human cholinesterase. Gov Rep Announce 1987 Index 87,21.

Lorot C. Les combinations de la cresote dans le traitement de la tuberculose pulmonaire (Tesis Doctoral). Paris: Universidad de Paris. Facultad de Medicina, 1899.

Lotti, M., Caroldi, S., Capodicasa, E., and Moretto, A., 1991. Promotion of organophosphateinduced delayed polyneuropathy by phenylmethanesulfonyl fluoride. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108, 234-241.

Lotti, M., and Johnson, M.K., 1978. Neurotoxicity of organophosphorus pesticides: predictions can be based on in vitro studies with hen and human enzymes. Arch. Toxicol. 41(3), 215-21.

Lotti, M. (1992) The pathogenesis of organophosphate Polyneuropathy. CRC Crit. Rev.Toxicol. 21: 465-487.

Lunn, G. y Sansone, E.B. (1994). Safe disposal of diiodopropyl fluorophosphate (DFP). App. Biochem. Biotechnol. 49:167-172.

Marquardt, D.W. (1963) An algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics, Vol. 11, Nº 2 Jun. 431-441.

Mangas, I., Vilanova, E., Estevez, J. 2011. Kinetics of the inhibitory interaction of organophosphorus neuropathy inducers and non-inducers in soluble esterases in the avian nervous system. Toxicol. App. Pharmacol. 256, 360-368.

Mangas, I.; Vilanova, E.; Estévez, J. 2012a NTE and non-NTE esterases in brain membrane: Kinetic characterization with organophosphates. *Toxicology* 297 (2012) 17– 25.

Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., 2012b. Phenylmethylsulfonyl Fluoride a Potentiator of Neuropathy, alter the interaction of organophosphorus compounds with soluble brain esterases. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2393-2401.

Mangas, I.; Vilanova, E.; Estévez, J., 2013a. Kinetic interactions of a neuropathy potentiator phenylmethylsulfonyl fluoride) with the neuropathy target esterase and other membrane bound esterases. *Arch Toxicol* DOI 10.1007/s00204-013-1135-0.

Mangas, I. Brain Carboxylesterases interacting with organophosphorus Compounds. Kinetic characterization and approaches to purification and molecular identification. Tesis Doctoral, Diciembre 2013. Umh.

Mangas I, Vilanova E, Benabent M, Estévez J. (2013b). Separating esterase targets of organophosphorus compounds in the brain by preparative chromatography. *Toxicology Letters* 225(1):167-176.

Martinez J. Intoxicación por insecticidas anticolinesterásicos. *Rev Toxicol* 1990; 7: 135-149.

Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E. and Vallette F.-M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41, 31-91.

Massoulié J, Bon S, Perrier N, Falasca C (2005) The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact* 157-158:3.14.

McCauley, L.A. Organophosphates and the Gulf War Syndrome. In *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds* 2006. (Gupta, Ed) pp 69-79, Academic Press, San Diego.

Mckenzie Ross, S.J. Cognitive function following exposure to contaminated air on commercial aircraft. A case series of 27 airline pilots seen for clinical purposes. *Journal of nutritional & Environmental Medicine*, 2008.17 (2):111-126.

Mentlein, R.; Heiland, S.; Heymam, E. Simultaneous purification and comparative characterization of six serine hydrolases from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1980, 200, 547–559.

Mestre B. Intoxicación colectiva por triortocresil fosfato ocurrida en 1946. Polineuropatías y secuelas. Estado actual. *Rev Clin Esp* 1971; 120: 407-416.

Mikalsen, A., Andersen, R.A., Alexander, J. (1986) Use of etohopropazine and BW 284C51 as selective inhibitors for cholinesterases from various species. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 83C, Nº.2 pp 447-449.

## BIBLIOGRAFÍA

Milatovic D, Moretto A, Osman KA, Lotti M. Phenyl valerate esterases other than neuropathy target esterase and the promotion of organophosphate polyneuropathy. *Chem Res Toxicol.* 1997 Sep;10(9):1045-8.

Moreto, A., Bertolazzi, M., Lotti, M., 1994. The phosphorothioic acid O-(2-chloro-2,3,3-trifluorocyclobutyl) O-ethyl S-propyl ester exacerbates organophosphate polyneuropathy without inhibition of neuropathy target esterase. *Toxicol. App. Pharmacol* 129(1), 133-7.

Moralev, S.N. y Rozengart, E.V. Comparative analysis of sensitivity of cholinesterases of various origin to monoanion reversible inhibitors. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii.* 2008 Jul-Aug;44(4):352-64

Morgan, SEW, Yan B, Greenway DD, Petersen DR and Parkinson A (1994) Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B). *Arch Biochem Biophys* 315:495–512.

Morita H, Yanagisawa N, Nakajima T, Shimizu M, Hirabayashi H, Okudera H, et al. Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* 1995; 346: 290-293.

Moss, D.E. and Fahrney, D. A kinetic analysis of difference in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources. *Biochemical Pharmacology* 27, 2693-2698, 1978.

Murat S, Muhammed G. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Critical Care* 2001; 5: 211- 215.

Nash JC (1979). *Compact Numerical Methods for Computers: Linear Algebra and Function Minimisation.* Adam Hilger, Bristol. Second Edition, 1990, Bristol: Institute of Physics Publications.

Nachon, F., Asojo, O. A., Borgstahl, G.E., Mason, P. and Lockridge, O. (2005). Role of water in aging of human butyrylcholinesterase inhibited by echothiophate: The crystal structure suggest two alternative mechanisms of aging. *Biochemistry* 44, 1154-1162.

Olivera-Bravo S., Ivorra, I., Morales, A. The acetylcholinesterase inhibitor BW284c51 is a potent blocker of Torpedo nicotinic AchRs incorporated into the *Xenopus* oocyte membrane. (2005). *British Journal of Pharmacology* 144, 88–97.

Parrón, T.; Hernández, A.F.; Villanueva, E. Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12 years retrospective study. *Forensics Sci Int* 1996 May 17;(1):53-63

Pindel EV, Kedishvili NY, Abraham TL, Brzezinski MR, Zhang J, Dean RA, Bosron WF. Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin. *J Biol Chem* 1997;272:14769–75.

Pope, C.N., and Padilla, S., 1990. Potentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity by phenylmethylsulfonyl fluoride. *J. Toxicol. Environ. Health* 31, 261–273.

Poulsen, E. and Aldridge, W.N. (1964) Studies on Esterases in the Chicken Central Nervous System. *Biochem. J.* 90, 182.

Press, W.H; Flannery, B.P.; Teukolsky S.A.; Vetterling, W.T. (1986) *Numerical Recipes: the Art of Science Computing*. Cambridge University Press, U.K.

RAC report: Research Advisory Committee on Gulf War veterans' illnesses, 2008. *Gulf War Illness and the Health of Gulf War Veterans. Scientific Findings and Recommendations*. U.S Government Printing Office, Washintong D.C. 2008.

Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S.; Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32, 12074–12084.

Radic Z., Reiner E. and Taylor P. (1991) Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol. Pharmacol.* 39, 98-104.

Radic, Z. y Taylor, P. *Structure and Function of Cholinesterases*. 2006. *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*. Cap. 12 pp 161-186. Ed. R.C. Gupta. Elsevier, Inc. 2006

Radić, Z. and Taylor, P. (2001). Peripheral site ligands accelerate inhibition of acetylcholinesterase by neutral organophosphates. *J Appl Toxicol.* Dec; 21 Suppl 1:S13-4.

Redinbo, M.R., Stewart, L., Champoux, J.J., and Hol, W.G. Structural flexibility in human topoisomerase I revealed in multiple non-isomorphous crystal structures. *J. Mol. Biol.* 1999; 292: 685–696.

Redinbo, M.R. and Potter, P.M. (2005). Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *DRUG DISCOVERY TODAY*. MAR 1; 10 (5): 313.

Reiner, E. Recommendations of the IUBMB Nomenclature Committee: comments concerning classification and nomenclature of esterases hydrolysing organophosphorus compounds. 1993. *Chem Biol Interact* 87 (1-3), 15-16

Repetto, M. (1995) *Toxicología Avanzada*. Ed. Díaz de Santos.

Robbi M and Reaufay H (1983) Purification and characterization of various esterases from rat liver. *Eur J Biochem* 137:293–301.

Roldán-Tapia, L.; Nieto-Escámez, F.A.; Del Águila, E.M. Laynez, F.; Parrón, T.; Sánchez-Santed, F. Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides. *Neurotoxicol Teratol* 2006;28(6):694-703.

## BIBLIOGRAFÍA

Rosenberry, T. L. (1975a). Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol.* 43, 103-218.

Rosenberry, T.L.; The Enzymes of Biological Membranes. 1985, pp 403-429 Structural Distinctions among Acetylcholinesterase Forms.

Ross, M. K.; Borazjani, A.; Edwards, C.C.; Potter, P.M. (2006) Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochemical pharmacology* 71: 657–669.

Sales, K.M.; Kingston, S.T., Doyle, K.M. and Purcell, W.M. Preliminary characterization of an in vitro paradigm for the study of the delayed effects of organophosphorus compounds: hen embryo brain spheroids. 2004 *Toxicology* 195 (2-3), 187-202.

Sánchez, G. y Salceda, R. Enzimas Polifuncionales: El caso de la Acetilcolinesterasa. 2008 *REB* 27(2): 44-51.

Sanghani, S.P.; Davis, W.I.; Dumaul, N.G.; Mahrenholz, A. and Bosron, W.F. Identification of microsomal rat liver carboxylesterases and their activity with retinyl palmitate. 2002 *Eur J Biochem* 269: 4387–4398.

Sanghani, S.P.; Quinney, S.K.; Fredenburg, T.B.; Davis, W.I.; Murry, D.J.; Bosron, W.F. Hydrolysis of irinotecan and its oxidative metabolites, 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-pipeddino] carbonyloxycamptothecin and 7-ethyl-10-[4-(1-pipeddino)-1-amino]-arboonyloxycamptothecin, by human carboxylesterases CES1A1, CES2, and a newly expressed carboxylesterase isoenzyme, CES3. 2004 *Drug Metab Dispos*;32:505–11.

Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S., Firedmann, T. and Taylor, P. (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* 319, 407-409.

Segel, I.H. *Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York: Wiley- Interscience, 1975, 957p.

Senanayake N, Johnson MK. Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphate insecticide. *N Eng J Med* 1982; 306: 155-157.

Senanayake, N. and Karalliedde, L., 1987. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. *N. Engl. J. Med.* 316(13), 761-3.

Senanayake N., Johnson M.K., (1982). Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphate insecticide. *N Eng J Med.* 306:155-157.

Shrager, R.I. (1970) Nonlinear regression with linear constraints: An extension of the magnified diagonal method. *Journal of the ACM*, Vol. 17 Issue 3, July.

Shrager, R. I. 1972. Quadratic programming for nonlinear regression. *Comm. ACM.* 15:41-45.

Sidell FR, Borak J. Chemical warfare agents: II. Nerve agents. *Ann Emerg Med* 1992; 21: 865-871.

Siegel P.K.S., Cragoe E.J., Trumble M.J., Kaczorowski G.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984), pp. 3238–3242.

Silman I, Futerman AH (1987) Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *Eur J Biochem* 170:11-22.

Silver, A. (1974) *The biology of cholinesterases*. North-Holland, Amsterdam.

Simeon-Rudolf, V; Sinko, G; Stuglin, A; Reiner, E . Inhibition of human blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by ethopropazine. *CROAT CHEM*, 74(1), 2001, pp. 173-182

Šinko, G., Čalid, M., Bosak, A., Kovarik, Z., 2007. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Anal. Biochem.*, 370, 223–227.

Smith HV, Spalding JMK. Outbreak of paralysis in Morocco due to ortho-cresyl phosphate poisoning. *Lancet* 1959; 2: 1.019-1.021.

Smyth, K.A., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1994. A cluster of at least three esterase genes in *Lucilia cuprina* includes malathion carboxylesterase and two other esterases implicated in resistance to organophosphates. *Biochemistry and Genetics* 32, 437–453.

Sogorb, M.A., Vilanova, E., Carrera, V., 2004. Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicol Lett.* 151 (1), 219-233.

Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2010. Detoxification of anticholinesterase pesticides, in Satoh, T., Gupta R.G.(Eds.), *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology*.

Sogorb, M.A., Vilanova, E., Quintanar, J.L., Viniestra, S., Bovine chromaffin cells in culture show carboxylesterase activities sensitive to organophosphorus compounds. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 1996 Sep; 28(9): 983-9.

Sogorb, M.A., Vilanova, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett.* 2002 Mar 10;128(1-3):215-28.

Solé-Violán, J., Martínez Chuecos, J., Molinero Somolinos, F., Marco Moreno, J.M., Rubio Sanz, R. y Rodríguez Nieto, I. (1985). Neurologic manifestations in acute poisoning by organophosphorus insecticides. *Med Clin (Barc)* 85 (6):217-220.

Spencer, E.Y. *Guide to the Chemicals Used in crop protection*. 6<sup>th</sup> ed. Publication 1093, Research Institute, Agriculture Canada, Ottawa, Canada: Information Canada, 1973.357.

## BIBLIOGRAFÍA

Stedman, E. y Easson, L.H. *Biochem J.* 26 (1932) pp 2056-2066.

Schwarz, M., Glick, D., Loewenstein, Y., Soreq, H. (1995). Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacol Ther.* 67(2):283-322.

Suzuki T, Morita H, Ono K, Maekawa K, Nagai R , Yazaki Y. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet* 1995; 345: 980.

Takahashi,S.; Katoh,M.; Saitoh,T.; Nakajima,M.; Yokoi, T. (2009). Different Inhibitory Effects in Rat and Human Carboxylesterases. *Drug Metabolism and Disposition.* Vol. 37, No. 5.

Taylor, P Anticolinesterasas. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw-Hill Interamericana, 171-87, 1996.

Taylor, P., and Z. Radic. 1994. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34:281–320.

The Merck-index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. Martha Windholz; Merck and Company. Edited by Rahway, N.J.: mERCK, 1983.

Thompson, H. M. Walker, C. H. Hardy, A. R.. Changes in activity of avian serum esterases following exposure to organophosphorus insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* May 1991, Volume 20, Issue 4, pp 514-518

Tsigelny I, Shindyalov IN, Bourne PE, Sudhof TC, Taylor P (2000) Common EF-hand motifs in cholinesterases and neuroligins suggest a role for Ca<sup>2+</sup> binding in cell surface associations. *Protein Sci* 9:180–185.

USDA, Pesticide Data Program Annual Summary, US Department of Agriculture, 2005, World Health Organization, 1992

Vellom DC, RadiC Z, Ying L, Pickering NA, Camp S , Taylor P. 1993. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 32:12-17.

Vidal, C.J. (1981). *Colinesteras séricas.* Universidad de Murcia, Depósito legal MU 17-1958.

Vidal C.J. (2005) Expression of cholinesterases in brain and non brain tumor. *Chem Biol Interact* 157-158: 227-232.

Vilanova, E., Escudero, M.A., Barril, J., 1999. NTE soluble isoforms: new perspectives for targets of neuropathy inducers and promoters, *Chem. Biol. Interact.* 119–120, 525–540.

Vilanova, E., Sogorb, M.A. The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Crit RevToxicol.* 1999 Jan; 29 (1):21-57.

Walker, C.H.; Hopkin, SP.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. 2001. *Principles of Ecotoxicology.* Taylor and Francis, UK.

Worek, F.; Aurbek, N.; Koller, M.; Becker, C.; Eyer, C.; Thiermann, H. 2007. Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. *Biochem. Pharmacol.*

Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P. 2004 Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2237-2248.

Whiteley, C.G., 1999. Enzyme kinetics: partial and complete non-competitive inhibition. *Biochem. Educ.* 27, 15-18

Whiteley, C. G. 1997. Enzyme kinetics: partial and complete competitive inhibition. *Biochem. Educ.* 25:144–146.

Williams, D.G., and Johnson, M.K., 1981. Gel-electrophoretic identification of hen brain neurotoxic esterase, labelled with tritiated di-isopropyl phosphorofluoridate. *Biochem J.* 199(2),323-33.

Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta*, 288, 73–90.

Worek F., Eyer P., Thiermann H., 2012. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Test. Analysis*, 4, 282–291.

World Health Organisation (WHO).(1986a) Properties and analytical methods pp23-29. En: *Organophosphorus Insecticides: A general Introduction.* Geneva.

World Health Organisation (WHO). *Public health impact of pesticides used in agriculture.* Ginebra: WHO, 1990.

Yelamos F, Diez F, Martin JC, Blanco JL, Garcia MJ, Lardelli A, Peña JF Intoxicaciones agudas por insecticidas organofosforados en la provincia de Almeria. Estudio de 187 casos. *Med Clin (Barc)* 1992; 98: 681-684.





**ANEXO**



MODELOS DE INHIBICIÓN REVERSIBLE MICHAELIANA PARA SISTEMAS MULTIENZIMÁTICOS.

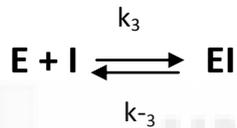
**Mecanismo de inhibición reversible competitiva**

La reacción de Michaelis-Menten está definida como sigue:



Donde  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_{-1}$ , son las constantes cinéticas individuales de cada reacción del proceso.

El esquema de la reacción que se da en un proceso de inhibición reversible competitivo es:



Siendo E la enzima libre, I el inhibidor, EI la enzima inhibida,  $k_3$  y  $k_{-3}$  las constantes cinéticas. Partimos de las siguientes ecuaciones: velocidad de la reacción (**Ec.1**), constante de Michaelis (**Ec. 2**), constante de inhibición (**Ec. 3**) y balance de masas (**Ec. 4**):

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot ES = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{S+K_M} \quad [\text{Ec. 1}]$$

$$K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad [\text{Ec. 2}]$$

$$K_I = \frac{E \cdot I}{EI} \quad [\text{Ec. 3}]$$

$$E_0 = E + ES + EI \quad [\text{Ec. 4}]$$

Donde  $E_0$  es la concentración de enzima total, E la concentración de enzima libre, ES la concentración de enzima unida al sustrato y EI la concentración de enzima inhibida. Despejando ES y EI de las ecuaciones 2 y 3 obtenemos:

$$ES = \frac{E \cdot S}{K_M} \quad [\text{Ec.5}]$$

$$EI = \frac{E \cdot I}{K_I} \quad [\text{Ec. 6}]$$

A continuación sustituimos los términos de ES y EI en la ecuación 4:

$$E_0 = E + \frac{E \cdot S}{K_M} + \frac{E \cdot I}{K_I} = E \cdot \left(1 + \frac{S}{K_M} + \frac{I}{K_I}\right) \quad [\text{Ec. 7}]$$

Despejamos E:

$$E = \frac{E_0}{\left(1 + \frac{S}{K_M} + \frac{I}{K_I}\right)}$$

Sustituimos E en la ecuación 5:

$$ES = \frac{\left(\frac{E_0}{\left(1 + \frac{S}{K_M} + \frac{I}{K_I}\right)}\right) \cdot S}{K_M} = \frac{E_0 \cdot S}{\left(1 + \frac{S}{K_M} + \frac{I}{K_I}\right) \cdot K_M} \quad [\text{Ec. 8}]$$

Y ahora sustituimos la ecuación 8 en la ecuación 1:

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{\left(1 + \frac{S}{K_M} + \frac{I}{K_I}\right) \cdot K_M} \quad [\text{Ec. 15}]$$

Siendo la Ecuación 9 la ecuación de velocidad en presencia de un inhibidor reversible competitivo. Esta ecuación la podemos reordenar:

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{\left(K_M + S + K_M \cdot \frac{I}{K_I}\right)} \quad [\text{Ec. 10}]$$

Introducimos el término  $(S+K_M)/S+K_M$  en la ecuación 10:

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S + K_M}{S + K_M} \cdot \frac{S}{\left(K_M + S + K_M \cdot \frac{I}{K_I}\right)} = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{S + K_M} \cdot \frac{S + K_M}{\left(K_M + S + K_M \cdot \frac{I}{K_I}\right)}$$

Donde  $k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{S+K_M}$  es la velocidad de reacción en ausencia de inhibidor (**Ec. 1**).

### Inhibición competitiva en sistema multienzimático

En un sistema de varios componentes enzimáticos la Actividad total cuando no hay inhibidor (Act) está definida como:

$$\text{Act} = \text{Act}_1 + \text{Act}_2 + \dots + \text{Act}_n$$

$$\text{Donde: Act 1} = k_{1_2} \cdot E_{1_0} \cdot \frac{S}{S+K_{1_M}}$$

$$\text{Act 2} = k_{2_2} \cdot E_{2_0} \cdot \frac{S}{S+K_{2_M}}$$

⋮

$$\text{Act n} = k_{n_2} \cdot E_{n_0} \cdot \frac{S}{S+K_{n_M}}$$

Siendo Act 1 la actividad del componente 1, Act 2 la actividad del componente 2 y Act n, la actividad del componente n.

Por tanto la actividad total sería:

$$\% \text{ Act} = k_{1_2} \cdot E_{1_0} \cdot \frac{S}{S+K_{1_M}} + k_{2_2} \cdot E_{2_0} \cdot \frac{S}{S+K_{2_M}} + \dots + k_{n_2} \cdot E_{n_0} \cdot \frac{S}{S+K_{n_M}}$$

Podemos expresar el % de Act del componente 1 respecto al total como:

$$\% \text{ Act 1} = \frac{k_{1_2} \cdot E_{1_0} \cdot \frac{S}{S+K_{1_M}}}{k_{1_2} \cdot E_{1_0} \cdot \frac{S}{S+K_{1_M}} + k_{2_2} \cdot E_{2_0} \cdot \frac{S}{S+K_{2_M}} + \dots + k_{n_2} \cdot E_{n_0} \cdot \frac{S}{S+K_{n_M}}} \cdot 100 \quad [\text{Ec.11}]$$

En un sistema de varios componentes enzimáticos la Actividad total en presencia de un inhibidor (Act') está definida como:

$$\text{Act}' = \text{Act}'_1 + \text{Act}'_2 + \dots + \text{Act}'_n$$

$$\text{Donde: Act}'_1 = k_{1_2} \cdot E_{1_0} \cdot \frac{S}{\left( K_{1_M} + S + K_{1_M} \frac{I}{K_{1_I}} \right)}$$

$$\text{Act}'_2 = k_{2_2} \cdot E_{2_0} \cdot \frac{S}{\left( K_{2_M} + S + K_{2_M} \frac{I}{K_{2_I}} \right)}$$

⋮

$$\text{Act}'_n = k_{n_2} \cdot E_{n_0} \cdot \frac{S}{\left( K_{n_M} + S + K_{n_M} \frac{I}{K_{n_I}} \right)}$$

Siendo Act' 1 la actividad del componente 1 en presencia del inhibidor, Act' 2 la actividad del componente 2 en presencia del inhibidor y Act' n, la actividad del componente n en presencia del inhibidor.

Podemos expresar el % de actividad del componente 1 (E1) en presencia del inhibidor respecto de la actividad total, en ausencia del inhibidor como:

$$\% \text{ Act } 1' = \frac{k_2 \cdot E1_0 \cdot \frac{S}{S + K1_M} \cdot \frac{S + K1_M}{\left(K1_M + S + K1_M \cdot \frac{I}{K1_I}\right)}}{k1_2 \cdot E1_0 \cdot \frac{S}{S + K1_M} + k2_2 \cdot E2_0 \cdot \frac{S}{S + K2_M} + \dots + kn_2 \cdot En_0 \cdot \frac{S}{S + Kn_M}} \cdot 100 \quad [\text{Ec. 12}]$$

$\% \text{ Act } 1'$

$$= \left( \frac{k_2 \cdot E1_0 \cdot \frac{S}{S + K1_M}}{k1_2 \cdot E1_0 \cdot \frac{S}{S + K1_M} + k2_2 \cdot E2_0 \cdot \frac{S}{S + K2_M} + \dots + kn_2 \cdot En_0 \cdot \frac{S}{S + Kn_M}} \cdot 100 \right) \cdot \frac{S + K1_M}{\left(K1_M + S + K1_M \cdot \frac{I}{K1_I}\right)}$$

$$= \% \text{ Act } 1 \cdot \frac{S + K1_M}{\left(K1_M + S + K1_M \cdot \frac{I}{K1_I}\right)}$$

Siendo  $\% \text{ Act}$  definida como Ecuación 11.

Para un sistema de varios componentes enzimáticos, el % de Actividad total ( $\% \text{ Act}'$ ) en presencia del inhibidor, respecto a la actividad total en ausencia de inhibidor sería:

$$\% \text{ Act}' = \% \text{ Act } 1 \cdot \frac{S + K1_M}{\left(K1_M + S + K1_M \cdot \frac{I}{K1_I}\right)} + \% \text{ Act } 2 \cdot \frac{S + K2_M}{\left(K2_M + S + K2_M \cdot \frac{I}{K2_I}\right)} + \dots$$

$$+ \% \text{ Act } n \cdot \frac{S + Kn_M}{\left(Kn_M + S + Kn_M \cdot \frac{I}{Kn_I}\right)}$$

$$\% \text{ Act}' = \% \text{ Act } 1 \cdot \frac{1}{\left(\frac{K1_M + S + K1_M \cdot \frac{I}{K1_I}}{S + K1_M}\right)} + \% \text{ Act } 2 \cdot \frac{1}{\left(\frac{K2_M + S + K2_M \cdot \frac{I}{K2_I}}{S + K2_M}\right)} + \dots$$

$$+ \% \text{ Act } n \cdot \frac{1}{\left(\frac{Kn_M + S + Kn_M \cdot \frac{I}{Kn_I}}{S + Kn_M}\right)}$$

$$\% \text{ Act}' = \% \text{ Act } 1 \cdot \frac{1}{1 + \frac{K1_M \cdot \frac{I}{K1_I}}{S + K1_M}} + \% \text{ Act } 2 \cdot \frac{1}{1 + \frac{K2_M \cdot \frac{I}{K2_I}}{S + K2_M}} + \dots + \% \text{ Act } n \cdot \frac{1}{1 + \frac{Kn_M \cdot \frac{I}{Kn_I}}{S + Kn_M}} \quad [\text{Ec. 13}]$$

El término  $\left(\frac{K_{1M}}{S+K_{1M}} \cdot \frac{1}{K_{1I}}\right)$  es una constante que depende de la concentración de sustrato, por lo que la Ec. 13 podría escribirse como:

$$\% \text{ Act}' = \% \text{ Act } 1 \cdot \frac{1}{1+A \cdot I} + \% \text{ Act } 2 \cdot \frac{1}{1+B \cdot I} + \dots + \% \text{ Act } n \cdot \frac{1}{1+N \cdot I} \quad [\text{Ec. 14}]$$

La  $I_{50}$  de cada componente está determinada como sigue. Para el componente 1 el % Act sería:

$$\% \text{ Act}' = \% \text{ Act} \frac{1}{1+A \cdot I}$$

Para la concentración de inhibidor que inhibe el 50% de actividad:

$$50 = 100 \frac{1}{1+A \cdot I_{50}}$$

Despejando la  $I_{50}$  :

$$50 \cdot (1 + A \cdot I_{50}) = 100$$

$$100 \cdot A \cdot I_{50} = 100$$

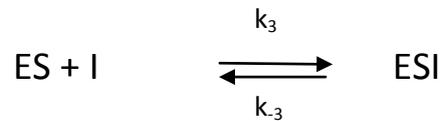
$$I_{50} = \frac{1}{A}$$

Si sustituimos en la ecuación 14:

$$\% \text{ Act} = \% \text{ Act } 1 \frac{1}{1+\frac{1}{I_{150}}} + \% \text{ Act } 2 \frac{1}{1+\frac{1}{I_{250}}} + \dots + n \quad [\text{Ec. 15}]$$

**Inhibidor reversible no competitivo.**

El esquema de un proceso de inhibición reversible no competitivo es:



Siendo ES, el complejo enzima-sustrato, I el inhibidor libre, ESI el complejo enzima-sustrato-inhibidor,  $k_3$  y  $k_{-3}$  las constantes cinéticas.

Partimos, por lo tanto de las siguientes ecuaciones,

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot ES \quad [\text{Ec. 16}] \text{ Ecuación de velocidad de la reacción}$$

$$K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad [\text{Ec. 17}] \text{ Constante de Michaelis-Menten}$$

$$K_I = \frac{ES \cdot I}{ESI} \quad [\text{Ec. 18}] \text{ Constante de inhibición}$$

$$E_0 = E + ES + ESI \quad [\text{Ec. 19}] \text{ Balance de masas}$$

Donde  $E_0$  es la concentración de enzima total, E la concentración de enzima libre, ES la concentración de enzima unida al sustrato y ESI la concentración del complejo enzima unida al sustrato e inhibidor.

Despejando ES de la ecuación 22 y ESI de la ecuación 23, obtenemos:

$$ES = \frac{E \cdot S}{K_M} \quad [\text{Ec. 20}] \quad ESI = \frac{ES \cdot I}{K_I} = \frac{\frac{E \cdot S}{K_M} \cdot I}{K_I} \quad [\text{Ec. 21}]$$

Sustituimos ambos términos en la ecuación 19:

$$E_0 = E + \left( \frac{E \cdot S}{K_M} \right) + \left( \frac{\frac{E \cdot S}{K_M} \cdot I}{K_I} \right) = E \left( 1 + \frac{S}{K_M} + \frac{\frac{S}{K_M} \cdot I}{K_I} \right) \quad [\text{Ec. 22}]$$

Despejamos E de la ecuación 22:

$$E = \frac{E_0}{1 + \left(\frac{S}{K_M}\right) + \left(\frac{\frac{S \cdot I}{K_M}}{K_I}\right)} \quad [\text{Ec. 23}]$$

Sustituimos E en la ecuación 20:

$$ES = \frac{\left(\frac{E_0 \cdot \frac{S \cdot I}{K_M}}{1 + \frac{S}{K_M} + \frac{\frac{S \cdot I}{K_M}}{K_I}}\right) \cdot S}{K_M} = E_0 \frac{S}{K_M + S + \frac{S \cdot I}{K_I}} \quad [\text{Ec. 24}]$$

Sustituimos la ecuación 24 en la ecuación 16, obteniendo así la ecuación de velocidad en presencia de un inhibidor reversible no competitivo:

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{K_M + S + \frac{S \cdot I}{K_I}} \quad [\text{Ec. 25}]$$

Introducimos el término  $\frac{S+K_M}{S+K_M}$  en la ecuación 25:

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S + K_M}{S + K_M} \cdot \frac{S}{K_M + S + \frac{S \cdot I}{K_I}} = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{S + K_M} \cdot \frac{S + K_M}{K_M + S + \frac{S \cdot I}{K_I}}$$

Donde  $k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{S+K_M}$  es la velocidad de reacción en ausencia de inhibidor (**Ecuación 16**)

En un sistema de varios componentes enzimáticos la Actividad total en ausencia de inhibidor (Act) está definida como:

$$\text{Act} = \text{Act1} + \text{Act2} + \dots + \text{Actn}$$

$$\text{Donde: Act 1} = k_{12} \cdot E_{10} \cdot \frac{S}{S+K_{1M}}$$

$$\text{Act 2} = k_{22} \cdot E_{20} \cdot \frac{S}{S + K_{2M}}$$

⋮

$$\text{Act n} = k_{n2} \cdot E_{n0} \cdot \frac{S}{S+K_{nM}}$$

Siendo Act 1 la actividad del componente 1, Act 2 la actividad del componente 2 y Act n, la actividad del componente n.

Por tanto la actividad total sería:

$$\text{Act} = k_{12} \cdot E_{10} \cdot \frac{S}{S + K_{1M}} + k_{22} \cdot E_{20} \cdot \frac{S}{S + K_{2M}} + \dots + k_{n2} \cdot E_{n0} \cdot \frac{S}{S + K_{nM}}$$

Podemos expresar el % de Act del componente 1 respecto al total como:

$$\% \text{ Act } 1 = \frac{k_{12} \cdot E_{10} \cdot \frac{S}{S + K_{1M}}}{k_{12} \cdot E_{10} \cdot \frac{S}{S + K_{1M}} + k_{22} \cdot E_{20} \cdot \frac{S}{S + K_{2M}} + \dots + k_{n2} \cdot E_{n0} \cdot \frac{S}{S + K_{nM}}} \cdot 100 \quad [\text{Ec. 26}]$$

En un sistema de varios componentes enzimáticos la Actividad total en presencia de un inhibidor (Act') está definida como:

$$\text{Act}' = \text{Act}'1 + \text{Act}'2 + \dots + \text{Act}'n$$

$$\text{Donde: Act}'1 = k_{12} \cdot E_{10} \cdot \frac{S}{\left(K_{1M} + S + K_{1M} \frac{I}{K_{i1}}\right)}$$

$$\text{Act}'2 = k_{22} \cdot E_{20} \cdot \frac{S}{\left(K_{2M} + S + K_{2M} \frac{I}{K_{i2}}\right)}$$

⋮

$$\text{Act}'n = k_{n2} \cdot E_{n0} \cdot \frac{S}{\left(K_{nM} + S + K_{nM} \frac{I}{K_{in}}\right)}$$

Siendo Act' 1 la actividad del componente 1 en presencia del inhibidor, Act' 2 la actividad del componente 2 en presencia del inhibidor y Act' n, la actividad del componente n en presencia del inhibidor.

Podemos expresar el % de Actividad del componente 1 (E1) en presencia de un inhibidor (%Act') respecto de la actividad total en ausencia del inhibidor como (%Act):

$$\% \text{ Act}'1 = \frac{\left(k_{12} \cdot E_{10} \cdot \frac{S}{S + K_{1M}} \cdot \frac{S + K_{1M}}{K_{M1} + S + \frac{S \cdot I}{K_I}}\right)}{\left(k_{12} \cdot E_{10} \cdot \frac{S}{S + K_{1M}}\right) + \left(k_{22} \cdot E_{20} \cdot \frac{S}{S + K_{2M}}\right) + \dots + n} \cdot 100 \quad [\text{Ec. 27}]$$

En un sistema de varios componentes enzimáticos, el % de la actividad total en presencia de un inhibidor, respecto a la actividad total en ausencia de inhibidor sería:

$$\begin{aligned} \%Act' = \% Act1 \cdot \frac{S+K1_M}{K1_M+S+\frac{S \cdot I}{K1_I}} + \% Act2 \cdot \frac{S+K2_M}{K2_M+S+\frac{S \cdot I}{K2_I}} + \dots \\ + \% Actn \cdot \frac{S + Kn_M}{Kn_M + S + \frac{S \cdot I}{Kn_I}} \end{aligned} \quad [Ec. 28]$$

Si seguimos operando, al final obtenemos:

$$\begin{aligned} \% Act' = \% Act 1 \cdot \frac{1}{1 + \frac{S}{K1_M + S} \cdot \frac{I}{K1_I}} + \% Act 2 \cdot \frac{1}{1 + \frac{S}{K2_M + S} \cdot \frac{I}{K2_I}} + \dots \\ + \% Act n \cdot \frac{1}{1 + \frac{S}{Kn_M + S} \cdot \frac{I}{Kn_I}} \end{aligned}$$

El término  $\frac{S}{K1_M+S} \cdot \frac{1}{K1_I}$  es una constante que depende de la concentración de sustrato, por lo que podemos reescribir la ecuación anterior:

$$\% Act' = \% Act 1 \cdot \frac{1}{1+A \cdot I} + \% Act 2 \cdot \frac{1}{1+B \cdot I} + \dots + \% Act n \cdot \frac{1}{1+N \cdot I} \quad [Ec. 29]$$

La  $I_{50}$  de cada componente está determinada como sigue.

Para el componente 1 el % Act sería:

$$\%Act' = \%Act \frac{1}{1+A \cdot I}$$

Para la concentración de inhibidor que inhibe el 50% de actividad:

$$50 = 100 \frac{1}{1+A \cdot I_{50}}$$

Despejando la  $I_{50}$ :

$$50 \cdot (1 + A \cdot I_{50}) = 100$$

$$100 \cdot A \cdot I_{50} = 100$$

$$I_{50} = \frac{1}{A}$$

$$50 = 100 \frac{1}{1+A \cdot I_{50}} ; \text{despejando la } I_{50}$$

$$I_{50} = \frac{1}{A}, \text{ si sustituimos en la ecuación 29:}$$

$$\% \text{ Act} = \% \text{ Act } 1 \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{I_{150}}} + \% \text{ Act } 2 \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{I_{250}}} + \dots + \% \text{ Act } n \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{I_{n50}}} \quad [\text{Ec. 30}]$$

Consideraciones de las ecuaciones deducidas:

Estas ecuaciones no nos permitirían discriminar entre inhibición competitiva o no competitiva ya que considerando los dos tipos de inhibición se deduce la misma ecuación. Sin embargo es de utilidad a la hora de poder calcular número de componentes, sus amplitudes e  $I_{50}$  de un inhibidor reversible.

