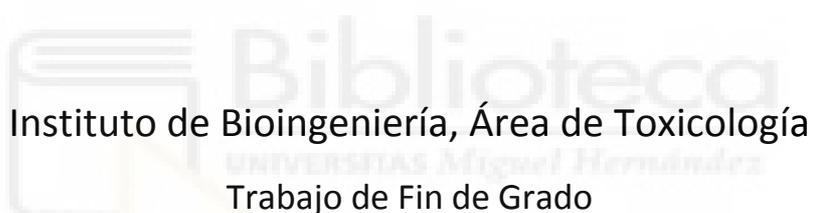




UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Grado en Ciencias Ambientales

Curso 2018-2019



Instituto de Bioingeniería, Área de Toxicología
Trabajo de Fin de Grado

Interacción de acetilcolinesterasa humana recombinante con demeton-S-metil

Luis Pizarro Prieto

Tutor: Jorge Estévez Domènech

ÍNDICE

ÍNDICE

0. Resumen.....	0
1. Introducción.....	1-5
1.1 Los compuestos organofosforados.....	1-3
1.2 Las carboxilesterasas.....	4-5
2. Antecedentes.....	6-11
3. Objetivos.....	12
4. Materiales y Métodos.....	13-18
4.1 y 4.2 Tampones, reactivos y material biológico utilizado.....	13
4.3 Equipos utilizados.....	13-14
4.4 Microensayos de actividad colinesterasa	14
4.5 Ensayo de inhibición a tiempo fijo	14
4.6 Ensayo cinética de inhibición	14-15
4.7 Ensayo de reactivación enzimática por dilución tras inhibición con DSM.....	15
4.8 Ensayo de reactivación enzimática por ultrafiltración tras inhibición con DSM.....	15-16
4.9 Modelos matemáticos y análisis de los datos.....	16-18
5. Resultados.....	19-28
6. Discusión.....	29-33
6.1. Discusión del comportamiento cinético de inhibición y reactivación de acetilcolinesterasa humana recombinante preparada en BSA en presencia de DSM.....	29-31
6.2 Discusión del comportamiento cinético de inhibición y reactivación de acetilcolinesterasa humana recombinante preparada en BSA con 5% de EtOH en presencia de DSM	31-33
6.3 Consideraciones finales.....	33
7. Conclusiones y proyecciones futuras.....	34
8. Bibliografía.....	35-38

RESUMEN

Algunos compuestos organofosforados son sustancias activas de numerosos productos insecticidas y biocidas donde la diana principal de estos compuestos es la acetilcolinesterasa (AChE). El demeton-S-metil (DSM) es un compuesto organofosforado (OP) considerado como un buen sustituto para estudiar la exposición dérmica de otros OP como el gas VX, sin embargo, ha presentado dificultades en la interpretación de su interacción con AChE.

Este trabajo caracteriza cinéticamente la interacción del compuesto DSM con acetilcolinesterasa humana recombinante (hAChE), aportando información sobre las reacciones de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento y planteando las posibles causas que impedían explicar su interacción, así como explicar las observaciones realizadas en la literatura.

Palabras clave: demeton-S-metil (DSM), acetilcolinesterasa (AChE).

ABSTRACT

Some organophosphorous compounds are active substances of numerous insecticide and biocidal products where the main target of this compounds is acetylcholinesterase (AChE). Demethon-S-methyl (DSM) is an organophosphate compound (OP) considered a good substitute for studying the dermal exposure of other OP like VX gas, however, has presented difficulties in interpreting its interaction with AChE.

This work characterizes kinetically the interaction of the DSM compound with recombinant human acetylcholinesterase (hAChE), providing information on inhibition, spontaneous reactivation and aging reactions, also explaining the observations made in the literature.

Key words: Demethon-S-methyl (DSM), acetylcholinesterase (AChE)



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los compuestos organofosforados inhibidores de esterasas

1.1.1. Características químicas

Los compuestos organofosforados (OPs) forman un amplio grupo de sustancias de síntesis: amidas, ésteres y derivados tiólicos del ácido fosfórico o fosfónico. La estructura química general de los OPs inhibidores de esterasas (**Figura 1.1**) está compuesta por un átomo central de fósforo (P) y un enlace fosfórico (P=O) o tiofosfórico (P=S). El símbolo X corresponde con el grupo saliente, el cual es sustituido (por sustitución nucleofílica) por el oxígeno del residuo en el sitio activo de la proteína diana que inhibe.

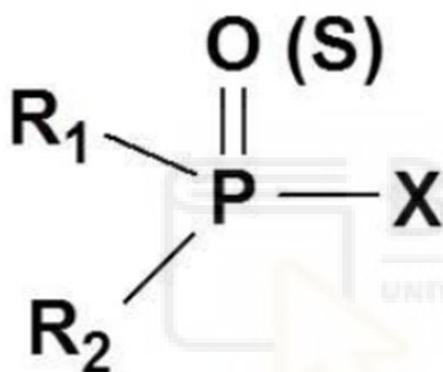


Figura 1.1. Estructura química general de los compuestos organofosforados. R1 y R2 son normalmente grupos arilo o alquilo simples. El grupo X es el llamado "grupo saliente" y puede tener una gran variedad de naturalezas químicas.

A lo largo de la historia, los OPs se han empleado para muchos propósitos, destacando su uso como plaguicidas y armas químicas. Son una de las clases de insecticidas más utilizadas actualmente y su importancia probablemente continúe, pues son efectivos y de bajo costo (Casida y Durkin., 2013). Sin embargo, se ha visto que los OPs pueden afectar a humanos, causando múltiples desordenes neurotóxicos. En la **Tabla 1.1** se describe la toxicidad de organofosforados y se relaciona con la inhibición de las esterasas. La acción tóxica de los OPs se puede resumir en:

- Inhibición de AChE del sistema nervioso produciendo efectos tóxicos inmediatos.
- Inhibición de la esterasa diana de neuropatía (NTE) causando efectos neurotóxicos retardados. Su inhibición y posterior envejecimiento produce la neuropatía retardada inducida por OPs (OPIDN) (Johnson, 1969b, Johnson, 1982).
- Otros efectos sobre órganos como pulmón, hígado, riñón, médula ósea, sistema inmunitario, etc., por mecanismos no muy bien conocidos

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Toxicidad de organofosforados relacionada con la inhibición de las esterasas.

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

1.1.2. 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.

INTRODUCCIÓN

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

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

1.1.3. Reacciones de interacción con esterasas

El lugar bioquímico del mecanismo molecular de los efectos biológicos de un OP generalmente implica el grupo hidroxilo de proteínas y tiene como consecuencia la inhibición de esterasas mediante fosforilación. Este mecanismo es común en todas ellas y se muestra en la **Figura 1.2** y se pueden distinguir las siguientes reacciones:

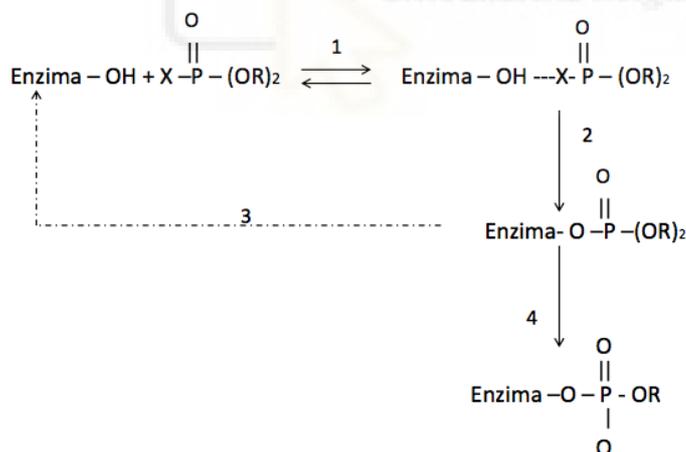


Figura 1.2. Mecanismo general de esterasas por organofosforados (OPs).

Cuando se ha formado el complejo de tipo michaeliano entre la enzima y el OP (1), se fosforila un residuo de serina de la enzima perdiéndose el grupo saliente X (2). A partir de aquí pueden darse dos vías: la de reactivación (3), en la que la enzima se recupera, o una reacción de envejecimiento (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 una reactivación espontánea o inducida por reactivos nucleofílicos.

INTRODUCCIÓN

1.1.4. Dianas moleculares no identificadas

Algunos de los efectos tóxicos ocurren debido a la interacción de los OPs con dianas moleculares definidas (crisis colinérgica, neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN) y síndrome intermedio), pero se ha visto que existen otros efectos debidos a la interacción con dianas moleculares no identificadas hasta la fecha, cuyos mecanismos no se conocen con claridad (efectos neuropsicológicos crónicos, potenciación de OPIDN, toxicidad cognitiva a largo plazo, etc.) (COT 1999; Jamal et al. 2002; Lockridge and Schopfer 2006; Terry 2012; McDaniel and Moser 2004).

1.2. Carboxilesterasas

1.2.1. Tipos de carboxilesterasas

Las enzimas carboxilesterasas (CbEs) pertenecen al grupo de las esterasas encargadas de catalizar reacciones de hidrólisis de esteres carboxílicos. Hay varios tipos de enzimas CbEs, y Aldridge (1953) las clasifico en función de su interacción con los compuestos OPs:

- A-esterasas: hidrolizan esteres carboxílicos y OPs sin ser inhibidos por estos.
- B-esterasas: hidrolizan esteres carboxílicos y son inhibidas por OPs irreversiblemente.
- C-esterasas: aquellas que no tienen ningún tipo de interacción con OPs.

Las CbEs de tipo B, catalizan la hidrólisis de compuestos acilo esteres mediante un ataque nucleofílico del grupo -OH de la serina o tirosina formándose un enlace que es hidrolizado por agua. Esta reacción se completa con la consecuente hidrólisis del grupo acetilo y recuperación de la enzima la cual estará disponible para iniciar de nuevo el ciclo catalítico (Aldridge y Reiner, 1972; WHO, 1986a; Ballantyne y Mars, 1992). En este grupo entrarían las colinesterasas.

1.2.2. Colinesterasas

Las colinesterasas son enzimas serinhidrolasas, una familia de esterasas tipo de las B-esterasas. Contienen un resto de serina en el sitio activo e hidrolizan esteres de colina, tales como acetilcolina, butirilcolina, succinilcolina, etc. Sin embargo, el principal sustrato es el neurotransmisor acetilcolina, ya que se concentran mayoritariamente en las señales colinérgicas del cerebro y en las uniones neuromusculares. Existen dos tipos diferentes de colinesterasas en vertebrados, la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (BuChE), también llamada pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o colinesterasa de suero (EC 3.1.1.8). Se diferencian por su especificidad de sustrato (Kovarik et al., 2003). Mientras que se ha demostrado que la AChE desempeña una función de terminación de la neurotransmisión colinérgica en la hendidura sináptica y neuromuscular, no se conoce bien el papel fisiológico que desempeña la BuChE. Algunos datos sugieren que la BuChE participa en procesos de detoxificación, su ausencia o

INTRODUCCIÓN

bajos niveles en determinados individuos, aparentemente no supone consecuencias (Lockridge, O. et al, 2005). La estructura de ambas enzimas se representa en las **Figuras 1.3.** y **1.4.**

La AChE es predominante en músculo y sistema nervioso, 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).

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

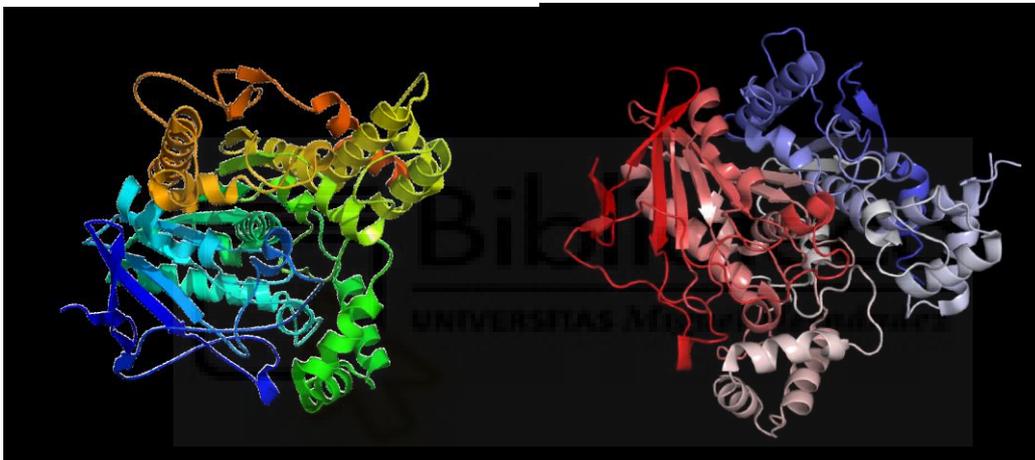


Figura 1.3. Estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa humana.

Imagen obtenida de Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>)

Figura 1.4. Estructura tridimensional de la butirilcolinesterasa humana.

Imagen obtenida de Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>)

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudio cinético de la inhibición de colinesterasas humanas por demeton-S-metil.

El insecticida organofosforado, demeton-S-metil (DSM), es considerado como un buen sustituto del agente nervioso altamente tóxico VX para estudios de absorción dérmica debido a similares propiedades fisicoquímicas y similar perfil de penetración percutánea.

Bazire et al (2011) encontraron que usando el mismo método que en la evaluación de la distribución dérmica, los resultados eran poco reproducibles. Se sospechó que los distintos grados de las disoluciones comerciales de DSM eran el origen de las discrepancias. Esta hipótesis se probó midiendo inhibición de la acetil- y butirilcolinesterasa humana a través de soluciones comerciales de DSM. La tasa de inhibición fue independiente de la concentración de enzima, confirmando condiciones de pseudo-primer orden. Pero la inhibición completa de la actividad de la butirilcolinesterasa sólo se alcanzó cuando la concentración de DSM era al menos 1500 veces más alta que la concentración de enzima. Además, la inhibición completa de acetilcolinesterasa nunca se logró. El análisis de espectrometría de masas del aducto de la butirilcolinesterasa inhibida identifica una serina monometoxifosfolirada, producto envejecido de la inhibición por DSM o un derivado con un grupo de salida modificado. Ni la reactivación espontánea ni el envejecimiento de la serina dimetoxifosfolirada podrían explicar la cinética de inhibición observada.

Bazire y colaboradores no encontraron ningún modelo cinético simple razonable que podría explicar la inhibición que observaron. Los resultados obtenidos por Bazire et al. No eran comparables con los obtenidos por Worek et al., que trabajaban con oxidemeton-metil, compuesto organofosforado, cuyo residuo unido a la AChE era idéntico al residuo unido del DSM. Otra de las diferencias entre ambos trabajos que Worek et al. no utilizaron EtOH en el medio de reacción y en cambio Bazire et al. si lo usaron. El EtOH ha sido utilizado como solubilizantes de algunos compuestos OP (Fekonja et al, 2007; O'Brien, 1955).

2.2. Inhibidor utilizado

Demeton-S-metil, O,O-Dimetil S-2-(etilsulfanyl)etilfosforotioato (DSM)

El DSM (**Figura 2.1**), $C_6H_{15}O_3PS_2$, es un compuesto organofosforado usado como insecticida en agricultura y sustituto del gas VX. Empezó a usarse en 1950 en sustitución del Demeton, $C_8H_{19}O_3PS_2$, al tener una toxicidad más baja en humanos. Ahora está clasificado como una sustancia altamente tóxica por la OMS y está prohibido su uso en agricultura. Su toxicidad aguda en mamíferos por vía dérmica es LD_{50} 30mg/kg peso corporal.

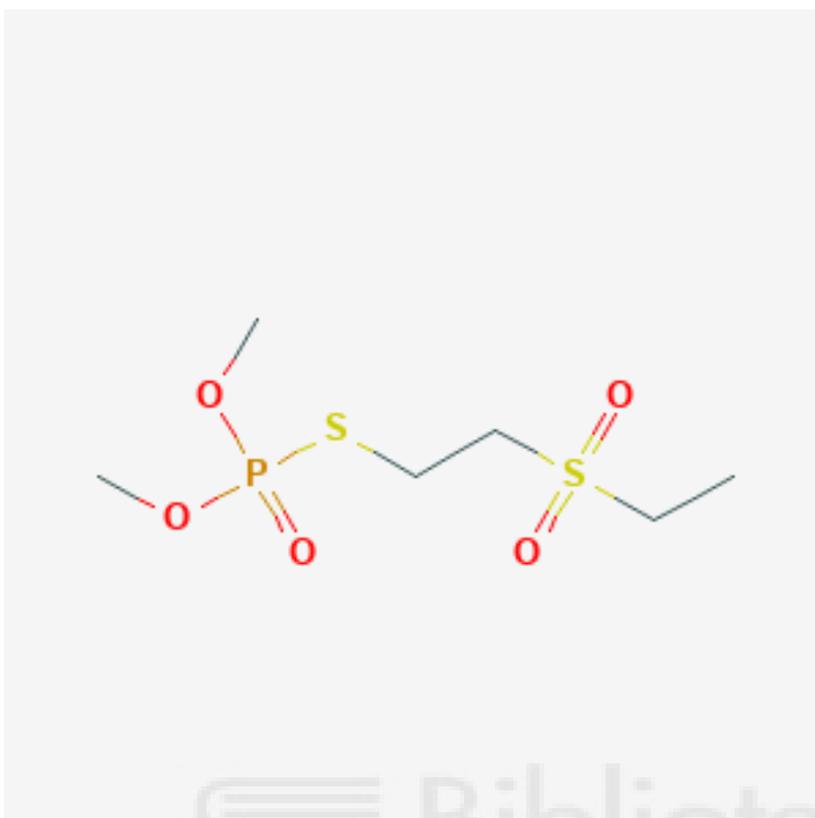


Figura 2.1. Estructura química del DSM
Nº CAS 919-86-8

2.3. Modelos cinéticos de la inhibición de esterasas por organofosforados

2.3.1. Efecto de la inhibición durante el tiempo de reacción

enzima-sustrato.

Como se muestra en la **Figura 2.2** en el ensayo habitual de inhibición, la preparación enzimática se preincuba con el inhibidor (t_i , tiempo de inhibición) y posteriormente se añade el sustrato para medir la actividad enzimática (t_s , tiempo de reacción con el sustrato) (Estévez y Vilanova., 2009; Sogorb et al., 1994). Cuando se añade el sustrato la reacción de inhibición, fosforilación, normalmente se para o se reduce a velocidad indetectable, debido a que se dan dos situaciones: (a) el inhibidor se diluye por el volumen de sustrato añadido; y (b) el sustrato compite con el inhibidor debido a su alta afinidad y a que se encuentra a una concentración de saturación.

Sin embargo, en algunos casos la inhibición en el tiempo de reacción enzima sustrato (t_s) es significativa y se detecta experimentalmente (efecto de "ongoing inhibition" o "inhibición adicional"). Especialmente en inhibiciones con enzimas muy sensibles y / o inhibidores muy

ANTECEDENTES

potentes que no son totalmente bloqueados por la presencia del sustrato. En estos casos al representar % de actividad respecto al tiempo se observa una disminución de la actividad en el tiempo 0 de inhibición respecto al control, la curva no parte del 100% de actividad o bien en la representación logarítmica a tiempo 0 no es 2.0 (Figuras 2.3A y 2.3B).

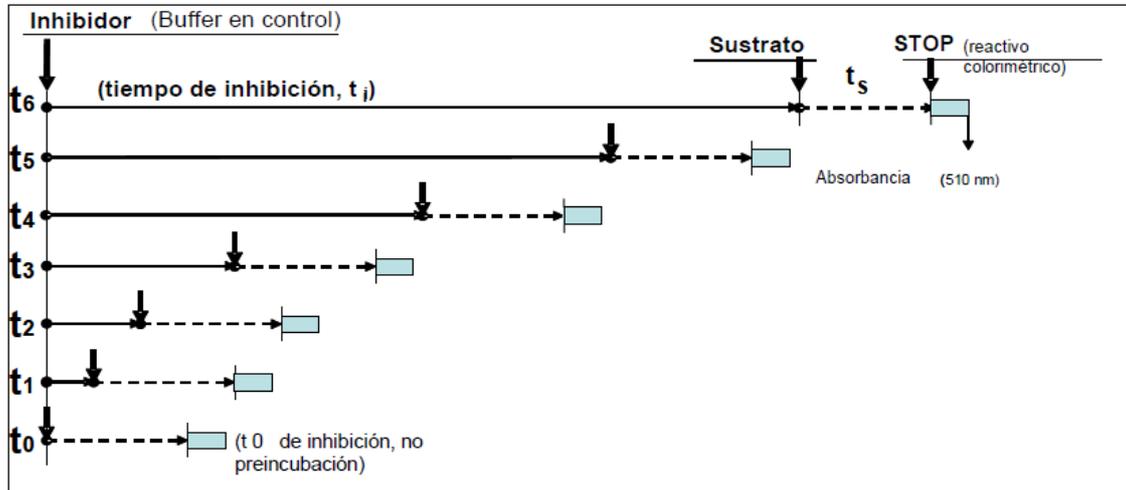
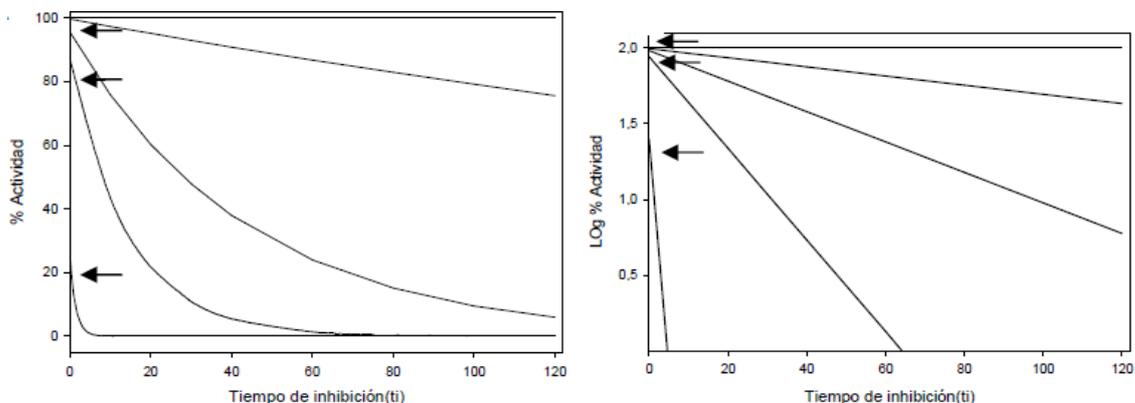


Figura 2.2.- Evolución en el tiempo de un experimento de inhibición. La preparación enzimática se preincuba durante el tiempo de "inhibición" (t_i) (flechas de línea continua). Después del cual se añade el sustrato (flechas verticales) y se incuba durante el tiempo de reacción con sustrato (t_s) (flechas discontinuas). Por último, la reacción se detiene y se añade un reactivo que de color para medir la absorbancia. La adición de sustrato generalmente detiene la inhibición debido a la dilución y la competencia por el sustrato. Sin embargo, en algunos casos, la inhibición continúa en el tiempo de reacción con el sustrato "inhibición adicional" (Imagen tomada de Mangas, 2010).



Figuras 2.3 A y 2.3B.- Comportamiento cinético de una preparación en la que la inhibición continúa en el tiempo de reacción con el sustrato. Se muestra un caso en el que $k_i = 500 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y $k_a = 0.001 \text{ μM}^{-1}$ para seis concentraciones crecientes de inhibidor ($I = 0, 1, 13.9, 46.2, 139, 1386 \text{ μM}$) .. La figura de la izquierda muestra la representación exponencial y la de la derecha la logarítmica (Imagen tomada de Mangas, 2010).

ANTECEDENTES

Corrección del modelo cinético cuando la inhibición en el tiempo de reacción con el sustrato es significativa

De acuerdo con Estévez y Vilanova (2009) en esta situación ocurre un proceso complejo que incluye la interacción competitiva del inhibidor y el sustrato, la cual matemáticamente puede ser simplificada por un factor adicional exponencial [$e^{-ka' \cdot I}$]. En el que el parámetro ka' representa la constante cinética aparente de primer orden de la inhibición observada durante el tiempo de reacción con el sustrato. Este factor exponencial es un factor matemático operacional.

Por lo tanto, la ecuación que rige el sistema para un único componente enzimático sería:

$$\% \text{ actividad} = 100 \cdot E/E_0 = [e^{-ka' \cdot I}] \cdot E_{10} \cdot e^{-k_1 \cdot I \cdot t} \quad [\text{Ec 1}]$$

Así pues, la ecuación que rige el sistema para varios componentes enzimáticos t si la enzima se reactiva espontáneamente el componente más sensible se comportaría según la ecuación:

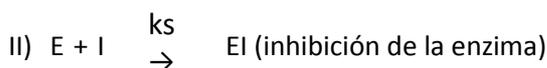
$$E = \left(\frac{k_{1s} \cdot E_{10}}{k_{1i} \cdot I + k_{1s}} + \frac{k_{1i} \cdot E_{10}}{(k_{1i} \cdot I + k_{1s})} \cdot e^{-(k_{1i} \cdot I + k_{1s}) \cdot t} \right) \cdot e^{-ka' \cdot I} \quad [\text{Ec 2}]$$

2.3.2. Estimación del efecto del "envejecimiento" en el experimento de inhibición y reactivación con un inhibidor organofosforado

Se describe a continuación el comportamiento esperable de reactivación tras dilución y la cinética de inhibición a tiempos cortos en caso de existir envejecimiento.

Deducción del modelo de la ecuación para un proceso de inhibición reactivación y envejecimiento simultáneos en una cinética de reactivación tras dilución

Si existe reactivación espontánea y el envejecimiento es considerado importante. (Estévez y Vilanova., 2009). Las reacciones que se dan en el experimento de reactivación tras dilución considerando el envejecimiento y la inhibición de la enzima reactivada son:



ANTECEDENTES

Siendo E la enzima activa, I el inhibidor, EI la enzima inhibida, P el producto (en este caso el inhibidor hidrolizado), EI* la enzima "envejecida", k_s la constante de segundo orden correspondiente a la reactivación, k_i la constante de de segundo orden correspondiente a la inhibición, k_g la constante de segundo orden correspondiente al envejecimiento.

En el trabajo de Estévez y Vilanova (2009) se dedujeron las ecuaciones generales para la situación de un ensayo de inhibición en el que se dan reactivación y envejecimiento simultáneos cuando el inhibidor es eliminado por completo. En este caso, se deducirán las ecuaciones particulares para la situación en la que hay reactivación y envejecimiento simultáneos y además inhibición de la concentración residual de inhibidor.

En el trabajo de Mangas (2010) aplicando las condiciones particulares de su ensayo de reactivación por dilución a las soluciones generales de las ecuaciones diferenciadas asociadas a estos procesos de acuerdo con Estévez y Vilanova (2009) se obtiene la ecuación 3, que se muestra a continuación:

$$E = \frac{k_s}{\sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \cdot EI_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} - \frac{k_s}{\sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \cdot EI_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t}$$

[Ec.3]

Donde k_s es la constante de reactivación, k_g es la constante de envejecimiento y "a" la constante de inhibición por la concentración de inhibidor ($k_i \cdot I$).

En el trabajo de Mangas (2010) aplicando constantes teóricas a la ecuación 3 se obtuvieron los perfiles de las curvas de las cinéticas de reactivación teóricas mostradas en la **Figura 2.4**

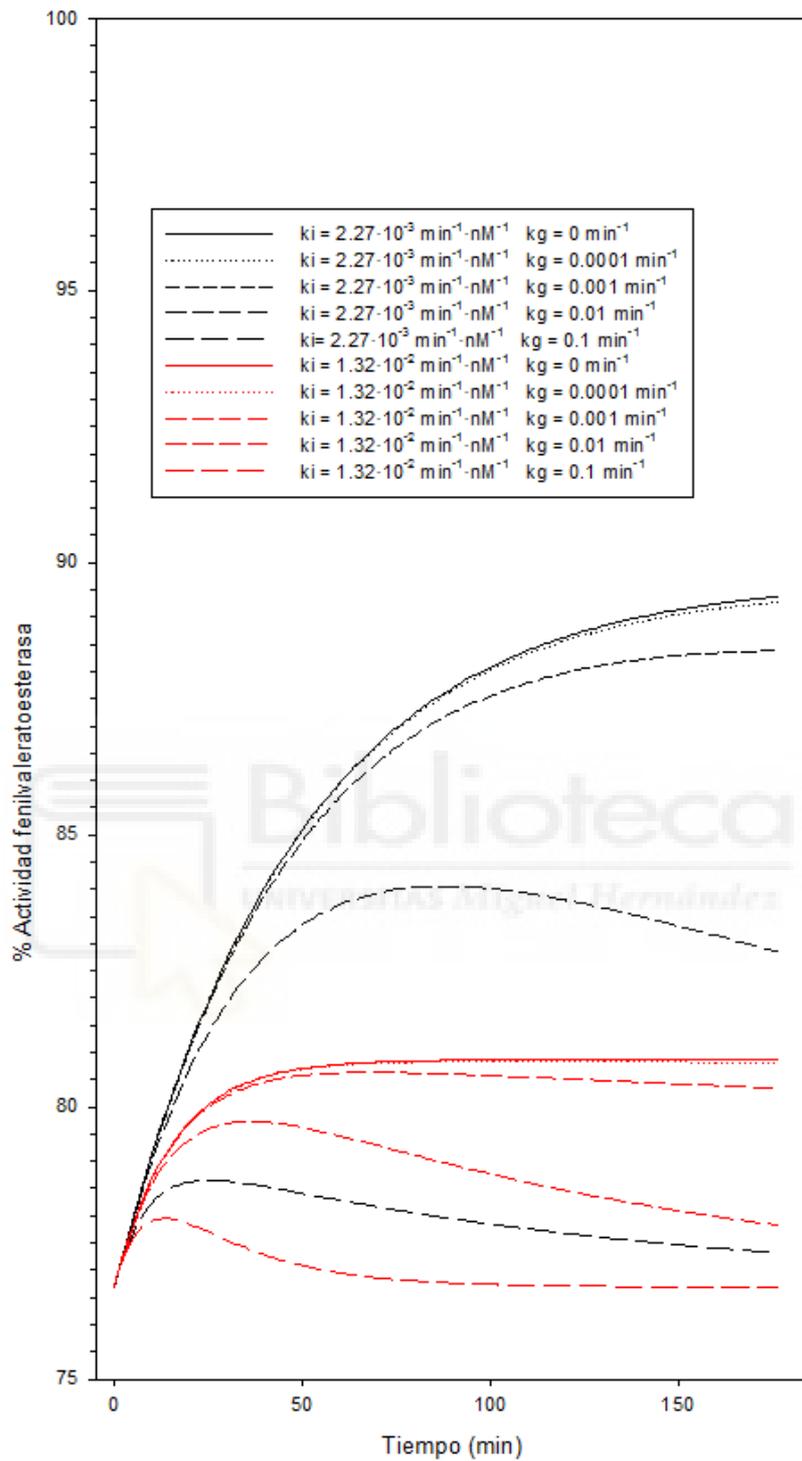


Figura 2.4.- Cinéticas de reactivación teóricas utilizando las constantes de inhibición y reactivación teóricas. Las curvas de color negro tienen como k_i es la mínima estimada ($k_i=0,00227 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) y como k_s la estimada en el apartado ($k_s=0,0116 \text{ min}^{-1}$), siendo k_g un valor teórico variable entre el intervalo de 0 - 0.1 min^{-1} . Las curvas de color rojo tienen como k_i una de un orden mayor ($k_i= 0.0132 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). En ambos conjuntos de curvas a partir de una $k_g > 0,001 \text{ min}^{-1}$ el máximo de actividad estaría dentro del intervalo de tiempo 0-180 minutos y a partir de ese punto la actividad disminuye conforme aumenta el tiempo. (Imagen tomada de Mangas 2010).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo general es estudiar la cinética de inhibición y la recuperación (no mediada por agentes reactivantes) de la actividad de la acetilcolinesterasa humana inhibida por demeton-s-metil medida con acetiltiocolina como sustrato en presencia de EtOH o en ausencia de EtOH en el medio de reacción.

3.1. Objetivos específicos

1. Establecer si la inhibición de hAChE por DSM en presencia y en ausencia de EtOH es progresiva con el tiempo..
2. Identificar el efecto de la presencia de EtOH en la inhibición de hAChE por DSM.
3. Establecer si la inhibición de la acetilcolinesterasa por DSM es permanente o si por el contrario hay reactivación espontánea tanto en ausencia como en presencia de EtOH.
4. Establecer si tras inhibición por DSM hay envejecimiento tanto en ausencia como presencia de EtOH.
5. Establecer el modelo teórico cinético que mejor describe la interacción entre AChE y DSM.
6. Establecer las constantes cinéticas de la interacción entre AChE y DSM en presencia y ausencia de EtOH.
7. Identificar una posible explicación a la incertidumbre obtenida en el trabajo de Bazire et al. (2011) en los experimentos de inhibición con DSM.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tampones y reactivos utilizados

- **Albúmina de suero bovino (BSA) 1%.** (Pureza 96%) se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Se preparó al 1% p/v en tampón fosfato 0,1M a pH 7,4. Se utilizó para preparar las disoluciones de enzima y los blancos de las mismas.
- **Albúmina de suero bovino (BSA) 1% y 5% EtOH.** Se preparó al 1% p/v en tampón fosfato 0,1M a pH 7,4 y con un 5%v/v de etanol.
- **Etanol (EtOH).** Concentración 95%. Se usó para preparar disoluciones de BSA y hAChE con un 5%v/v de etanol.
- **Tampón fosfato.** dihidrofosfato de sodio monohidratado 0,1M pH 7,4. Se preparó disolviendo dihidrofosfato de sodio monohidratado en agua ultrapura. El pH se ajustó a 7,4 con NaOH 10 mM y se conservó a temperatura ambiente.
- **Agua ultrapura (MQ).** Se obtuvo a partir de agua purificada por ósmosis inversa (Elix 3 de Millipore) que se ultrapurificó con el equipo (milliQ Element de Millipore).
- **Yoduro de acetiltiocolina (AtCh).** (Pureza>95%) Se adquirió de BOC Sciences. Para su utilización como sustrato, se preparó a 2mM en agua ultrapura, y se conservó a -20°C.
- **Dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).** Se adquirieron de grado analítico de Panreac Química S. A. (Barcelona, España) y Sigma-Aldrich Química S. A. (Madrid, España) respectivamente. Se preparó una disolución de SDS 2% / DTNB 6mM en tampón fosfato 0,1 M / EDTA 1 mM, pH 7,4 y se conservó a temperatura ambiente en botella envuelta en papel de aluminio para evitar la degradación del DTNB.
- **Demeton-S-methyl (DSM).** Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S. A. (Madrid, España). Se preparó una disolución concentrada 10mM en isopropanol y se conservó a -20 °C.

4.2. Material biológico

- **Acetilcolinesterasa humana (hAChE).** Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Se preparó un stock a concentración 10 nM en BSA.

4.3. Equipos utilizados

- **Estación automatizada Biomek 2000 (Beckman-Coulter).** esta estación de trabajo se utilizó para realizar todas las medidas de cinéticas enzimáticas, a fin de minimizar el consumo de muestra, permitiendo además la automatización la realización simultánea de un número elevado de muestras y garantizando la reproducibilidad de los volúmenes y

MATERIALES Y MÉTODOS

tiempos. Estuvo equipada con pipetas multicanal (8x) con capacidad entre 20-200 μ l, dos termobloques de aluminio termostatzado para 8x12 minitubos de 1mL con un controlador de temperatura electr3nico, y una microplaca de 96 pocillos para la lectura fotom3trica.

- **Lector de placas:** para la lectura fotom3trica se utiliz3 el lector de placas AD 340 C (Beckman Coulter).
- **Centrífugas.** se utiliz3 la centrífuga Allegra 21R equipada con un rotor 54180 de Beckman Coulter.
- **Filtros de centrifugaci3n.** Se utilizaron filtros Ultracel 10K de Millipore para eliminar el DSM de la disoluci3n enzimática en el ensayo de reactivaci3n tras inhibici3n con DSM.

4.4. Microensayo de actividad colinesterasa

Se mezclaron 90 μ L de una soluci3n con enzima a la concentraci3n deseada (0,0824 nM en reacci3n) en BSA 1% con 90 μ L de otra soluci3n con el sustrato. Pasado el tiempo de reacci3n, especificado en cada ensayo, se detuvo el proceso ańadiendo 90 μ L de SDS 2% / DTNB (6 mM) y, posteriormente, se ańadieron 90 μ L de BSA 1% a las muestras o enzima en el caso de los blancos. Se midi3 la absorbancia a 405 nm. El m3todo est3 basado en el ensayo descrito por Benabent et al. (2014).

4.5. Ensayo de inhibici3n a tiempo fijo (30 min).

Se prepararon muestras de enzima 0,94nM (0,082nM en reacci3n), las cuales se incubaron 90 μ L con 20 μ L de DSM a 12 concentraciones finales diferentes (0, 0.5, 2.5, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 160, 320 μ M) durante 30 min a 37 $^{\circ}$ C. Se incluyeron en el ensayo controles sin inhibir y blancos.

Tras la incubaci3n se ańadi3 100 μ L del sustrato (AtCh), tras 10 minutos de reacci3n se par3 ańadiendo 100 μ L de SDS/DTNB, posteriormente, se ańadieron 90 μ L de BSA 1% a las muestras o enzima en el caso de los blancos. Se midi3 la absorbancia a 405 nm. Utilizando las condiciones del microensayo de actividad colinesterasa descritas anteriormente.

4.6. Ensayo cin3tica de inhibici3n

Se prepararon muestras de enzima a 0,194 nM (0,0824 nM en reacci3n) en ausencia y presencia de un 5% de EtOH, las cuales se incubaron 90 μ L con 20 μ L de DSM a 4 concentraciones finales diferentes que se especifican para cada ensayo en el apartado de Resultados durante 12 tiempos distintos (desde 0 segundos a 2 horas) a 37 $^{\circ}$ C. Se incluyeron en el ensayo controles sin inhibir y blancos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tras la incubación se añadió 100 μL del sustrato (AtCh), tras 10 minutos de reacción se paró añadiendo 100 μL de SDS/DTNB, posteriormente, se añadieron 90 μL de BSA 1% a las muestras o enzima en el caso de los blancos. Se midió la absorbancia a 405 nm. Utilizando las condiciones del microensayo de actividad colinesterasa descritas anteriormente.

4.7. Ensayo reactivación por dilución tras inhibición con DSM

Inhibición con DSM

Se utilizaron las condiciones del microensayo de actividad colinesterasa descritas anteriormente. Se prepararon muestras de enzima, las cuales se incubaron con DSM en concentraciones y volúmenes que se especifican para cada ensayo en el apartado de Resultados durante 30 min a 37°C. Se incluyeron en el ensayo controles sin inhibir y blancos.

Dilución

Pasado el tiempo de incubación el material se llevó a un volumen que se especifica para cada ensayo en el apartado de Resultados con BSA o BSA con EtOH. La concentración residual estimada final de DSM tras el proceso de dilución se especifica para cada ensayo en el apartado de Resultados.

Medida de actividad tras dilución

Las muestras obtenidas tras el proceso anterior se incubaron a 37°C y se fueron retirando alícuotas de 90 μL de cada muestra (muestra inhibida y controles) para medir la actividad colinesterasa de acuerdo a los siguientes tiempos: 0, 20, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 330 minutos y a las 24 horas.

4.8. Ensayo reactivación por ultrafiltración tras inhibición con DSM

Inhibición con DSM

Se utilizaron las condiciones del microensayo de actividad colinesterasa descritas anteriormente. Se prepararon muestras de enzima 2,64 nM, las cuales se incubaron 500 μL con 50 μL de DSM a 220 μM durante 30 min a 37°C. Se incluyeron en el ensayo controles sin inhibir y blancos. Pasado el tiempo de incubación, se retiraron 50 μL de cada tubo y se llevaron a un volumen final de 1 mL con BSA 1% en tampón fosfato, para medir la actividad colinesterasa tras inhibición.

Ultrafiltración y posterior dilución

Un volumen de 500 μL de muestra preparadas en el paso anterior (muestras inhibidas y sin inhibir), se colocaron en filtros (Ultracel 10K de Millipore) y se centrifugó a 14000 x g durante 15 minutos a 4°C. El material retenido se diluyó con tampón fosfato a 4°C hasta alcanzar 500 μL y se

MATERIALES Y MÉTODOS

procedió a ultrafiltrar de nuevo. El material retenido en el filtro se llevó a un volumen de 8 mL con BSA o BSA con EtOH. La concentración residual estimada final de DSM tras el proceso de ultrafiltración y dilución se especifica para cada ensayo en resultados.

Medida de actividad tras ultrafiltración y lavado

Las muestras obtenidas tras el proceso anterior se incubaron a 37°C y se fueron retirando alícuotas de 90µL de cada muestra (muestra inhibida y controles) para medir la actividad colinesterasa de acuerdo a los siguientes tiempos: 0, 10,30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 330 minutos y a las 24 horas.

4.9. Modelos matemáticos y análisis de los datos

Los datos de inhibición y reactivación espontánea con diferentes inhibidores de colinesterasas se ajustaron a modelos matemáticos diferentes mediante el programa de ordenador Sigma Plot 13.0. El programa utilizó el algoritmo de Marquardt-Levenberg. Este algoritmo busca los valores de los parámetros a determinar de modo que la suma de los cuadrados de la diferencia entre el valor real y el valor predeterminado por la ecuación (residual) resulte mínima (Marquardt, 1963; Shrager, 1970,1972; Nash, 1979; Press et al., 1986).

Los modelos empleados de acuerdo con Estevéz y Vilanova (2009) y Estevéz (2003) fueron los siguientes:

- Para inhibición de varios componentes enzimáticos:

$$E = E_{10}e^{-k_1 \cdot I} + E_{20}e^{-k_2 \cdot I} + \dots + E_R$$

- Para inhibición de varios componentes enzimáticos, teniendo en cuenta el efecto de

inhibición en el tiempo enzima-sustrato, para varios componentes enzimáticos:

$$E = [e^{-(k_a \cdot I)}]E_{10}e^{-k_1 \cdot I} + E_{20}e^{-k_2 \cdot I} + \dots + E_R$$

Donde, E_0 es el control de actividad inicial (sin inhibidor); E es la actividad para una concentración de inhibidor I ; E_1 , E_2 y E_3 representan el contenido relativo de los componentes sensibles; k_1 , k_2 y k_3 representan las constantes exponenciales para esos mismos componentes; k_a la constante de "inhibición adicional". Se aplicaron las siguientes restricciones: $k_1 > 0$, $k_2 > 0$, $k_3 > 0$, $k_a > 0$, $k_r > 0$, $A_1 > 0$, $A_2 > 0$ y $E_{10} + E_{20} + \dots + E_R = 100$.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Para la inhibición-reactivación de varios componentes enzimáticos, teniendo en cuenta el efecto de inhibición en el tiempo enzima sustrato, para varios componentes enzimáticos:

$$E = \frac{k_s \cdot E_0}{k_i \cdot I + k_s} + \frac{k_i \cdot I \cdot E_0}{(k_i \cdot I + k_s)} \cdot e^{-(a+k_s) \cdot t} \dots + E_R$$

k_i es la constante de inhibición, k_s es la constante de reactivación, “ a ” la constante de inhibición por la concentración de inhibidor ($k_i \cdot I$) y E_R es el contenido relativo del componente resistente (actividad residual resistente a las altas concentraciones de inhibidor empleadas).

- Para inhibición, reactivación y envejecimiento simultáneos en experimentos de inhibición (Estévez y Vilanova.,2009):

$$E = \left(\frac{(a - k_s - k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2 \cdot \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \right) \cdot E_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} - \left(\frac{(a - k_s - k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2 \cdot \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \right) \cdot E_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t}$$

k_s es la constante de reactivación, k_g es la constante de envejecimiento y “ a ” la constante de inhibición por la concentración de inhibidor ($k_i \cdot I$).

- Para inhibición, reactivación y envejecimiento simultáneos en experimentos de reactivación espontánea (Mangas 2010):

$$E = \frac{k_s}{\sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \cdot EI_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} - \frac{k_s}{\sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \cdot EI_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t}$$

MATERIALES Y MÉTODOS

k_s es la constante de reactivación, k_g es la constante de envejecimiento, y a la constante de inhibición por la concentración ($k_i \cdot I$).

Test estadístico.

Para comprobar la mejora del ajuste más complejo frente al más sencillo se realizó un test de F (Bevington, 1969). Dicho test se llevó a cabo con el programa Sigma Plot 13.0.



5. RESULTADOS

5.1. Ensayos de acetilcolinesterasa preparada en BSA.

5.1.1. Ensayo de inhibición a tiempo fijo (30 min).

Se incubaron muestras de enzima 0,194 nM (0,0824 nM en reacción) con DSM a 12 concentraciones finales diferentes (0, 0.5, 2.5, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 160, 320 μM) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se midió la actividad acetilcolinesterasa. Los resultados se muestran en la **Figura 5.1.** y los parámetros en la **Tabla 5.1.** El mejor ajuste según el test de la F fue una ecuación correspondiente a dos componentes enzimáticos, uno que se inhibe, se reactiva y envejece simultáneamente (E_0), y otro resistente (E_R), [Ec.4].

$$E = \left(\frac{(a - k_s - k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2 \cdot \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \right) \cdot E_0 \cdot e^{\frac{-(a + k_s + k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot 30} - \left(\frac{(a - k_s - k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2 \cdot \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \right) \cdot E_0 \cdot e^{\frac{-(a + k_s + k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot 30} + E_R \quad [\text{Ec.4}]$$

Siendo “a” la constante de inhibición por la concentración de inhibidor ($k_i \cdot I$) y k_s y k_g las constantes de reactivación espontánea y envejecimiento respectivamente. La $I_{50}(30\text{min})$ (concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad en 30 minutos; **Tabla 5.1.**) fue obtenida aplicando la ecuación 4 en una hoja de cálculo con los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

Tabla 5.1. Parámetros obtenidos. k_i es la constante de inhibición. k_s es la constante de reactivación. k_g es la constante de envejecimiento. Se muestran los parámetros estimados de tres experimentos independientes.

	E (%)	k_i ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_s (min^{-1})	k_g (min^{-1})	I_{50} (μM)	E_R (%)
	100	0,0236	0,0570	1,37E-11	1,02	0
	96,35	0,0413	0,0224	2,38E-12	0,56	3,65
	96,54	0,0343	0,0190	9,33E-13	0,68	3,46
Media	97,63	0,0331	0,0328	5,67E-12	0,71*	2,37
Desviación estándar	2,05	0,0089	0,0210	6,99E-12		2,05

* El dato que se muestra es la I_{50} obtenida con la ecuación 4 en una hoja de cálculo con las medias de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

RESULTADOS

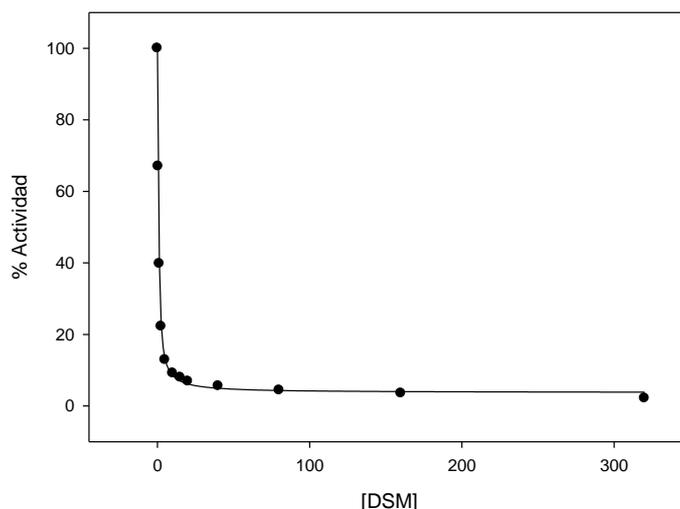


Figura 5.1. Inhibición a tiempo fijo con DSM. Se utilizaron varias concentraciones de DSM comprendidas entre 0 y 320 μM . La actividad se ensayó tal y como se muestra en Materiales y Métodos, ensayo de actividad colinesterasa. La curva se ajusta a una ecuación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento simultáneos para un componente sensible y otro resistente.

5.1.2 Ensayo cinética de inhibición

Se incubaron muestras de enzima 0,194 nM (0,0824 nM en reacción) con DSM a 4 concentraciones finales diferentes (0,0.25, 0.5, 1.25 μM) durante 12 tiempos (de 0 a 120 minutos) a 37°C. Posteriormente se midió su actividad colinesterasa. Los resultados se muestran en la **Figura 5.2.** y los parámetros en la **Tabla 5.2.** el mejor ajuste según el test de la F fue una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece simultáneamente (E_0), [Ec.5].

$E =$

$$\left(\frac{(a-k_s-k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2 \cdot \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \right) \cdot E_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} - \left(\frac{(a-k_s-k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2 \cdot \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \right) \cdot E_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} \quad [\text{Ec.5}]$$

Siendo “a” la constante de inhibición por la concentración de inhibidor ($k_i \cdot I$) y k_s y k_g las constantes de reactivación espontánea y envejecimiento respectivamente. La $I_{50}(30\text{min})$ (concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad en 30 minutos; **Tabla 5.2.**) fue obtenida aplicando la ecuación 5 en una hoja de cálculo con los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. ($50 \pm 0.01 \%$)

RESULTADOS

Tabla 5.2. Parámetros obtenidos. k_i es la constante de inhibición. k_s es la constante de reactivación. k_g es la constante de envejecimiento. Se muestran los parámetros estimados de dos experimentos independientes.

	k_i ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_s (min^{-1})	k_g (min^{-1})	I_{50} (μM)
	0,0409	0,0199	0,0037	0,57
	0,0434	0,0203	0,0048	0,52
Media	0,0422	0,0201	0,0043	0,55*
Desviación estándar	0,0016	0,0003	0,0008	

* El dato que se muestra es la I_{50} obtenida la ecuación 4 en una hoja de cálculo con las medias de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

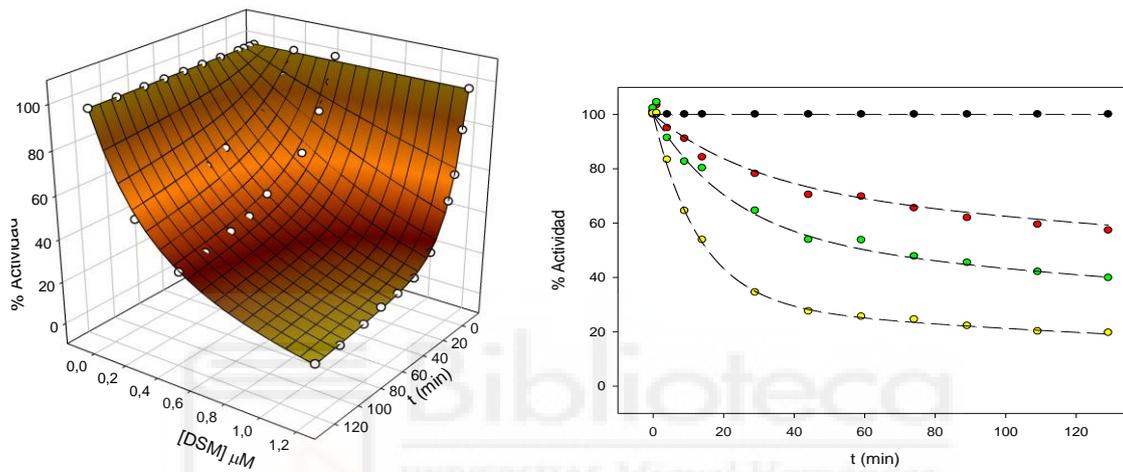


Figura 5.2. Cinética de inhibición de la AChE humana por DSM en ausencia de EtOH. Concentraciones de DSM: 0 (negro), 0.25 (rojo), 0.5 (verde), 1.25 (Amarillo) μM en un volumen de reacción de 240 μL . En la imagen A está la superficie del ajuste 3D y en la imagen B está la representación de curvas de nivel obtenidas del ajuste 3D. Las curvas se ajustan a una ecuación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento simultáneos para un componente sensible.

5.1.3. Ensayo reactivación por ultrafiltración tras inhibición con DSM

Se inhibió la hAChE 2,64 nM con DSM a 220 μM durante 30 minutos a 37°C y, posteriormente, se midió su actividad colinesterasa a diferentes tiempos de reactivación.

Siendo I la concentración residual estimada de DSM tras el proceso (0,046 μM en dos de los tres ensayos y 0,018 μM en el otro). Los resultados se muestran en la **Figura 5.3.** y los parámetros en la **Tabla 5.3.** el mejor ajuste según el test de la F fue una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece simultáneamente, [Ec.6].

$$E = \frac{k_s}{\sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \cdot EI_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} - \frac{k_s}{\sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \cdot EI_0 \cdot e^{\frac{-(a+k_s+k_g) + \sqrt{(a+k_s+k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} \quad [\text{Ec.6}]$$

RESULTADOS

Siendo “a” la constante de inhibición por la concentración de inhibidor ($k_i \cdot I$) y k_r y k_g las constantes de reactivación espontánea y envejecimiento respectivamente. La $I_{50}(30\text{min})$ (concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad en 30 minutos; **Tabla 5.3.**) fue obtenida aplicando la ecuación 6 en una hoja de cálculo con los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

Tabla 5.3. Parámetros obtenidos. k_i es la constante de inhibición. k_s es la constante de reactivación. k_g es la constante de envejecimiento. Se muestran los parámetros estimados de tres experimentos independientes. E_1 es la actividad inicial.

	$E_1(\%)$	$k_i (\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1})$	$k_s (\text{min}^{-1})$	$k_g (\text{min}^{-1})$	$I_{50} (\mu\text{M})$
	10,86	0,0265	0,009	0,0046	1,17
	21,65	0,0457	0,010	0,0021	1,66
	13,51	0,0253	0,013	0,0093	0,45
Media	15,34	0,0325	0,0107	0,0053	0,71*
Desviación estándar	5,62	0,0114	0,0025	0,0037	

* El dato que se muestra es la I_{50} obtenido con la ecuación 6 en una hoja de cálculo con las medias de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

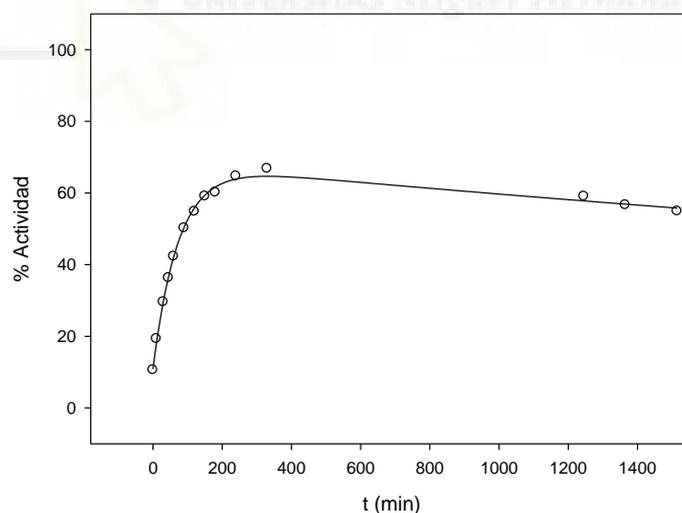


Figura 5.3. Reactivación por ultrafiltración de actividad colinesterasa de la AChE tras sr inhibida por DSM en ausencia de EtOH. Se midió la actividad en un período de tiempo de reactivación comprendido entre 0 y 1560 minutos, tras la previa inhibición con DSM. La curva se ajusta a una ecuación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento simultáneos para un componente sensible.

RESULTADOS

5.1.4 Ensayo reactivación por dilución tras inhibición con DSM

Se inhibió la hAChE 10 nM con DSM a 107 μM durante 30 minutos a 37°C y, posteriormente, se midió su actividad colinesterasa a diferentes tiempos de reactivación tras diluir hasta alcanzar 8 mL.

Siendo I la concentración residual estimada de DSM tras el proceso (0,286 μM). Los resultados se muestran en la **Figura 5.4.** y los parámetros en la **Tabla 5.4.** el mejor ajuste según el test de la F fue una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece, [Ec.6].

La $I_{50}(30\text{min})$ (concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad en 30 minutos; **Tabla 5.4.**) fue obtenida aplicando la ecuación 6 en una hoja de cálculo con los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. ($50\pm 0.01\%$)

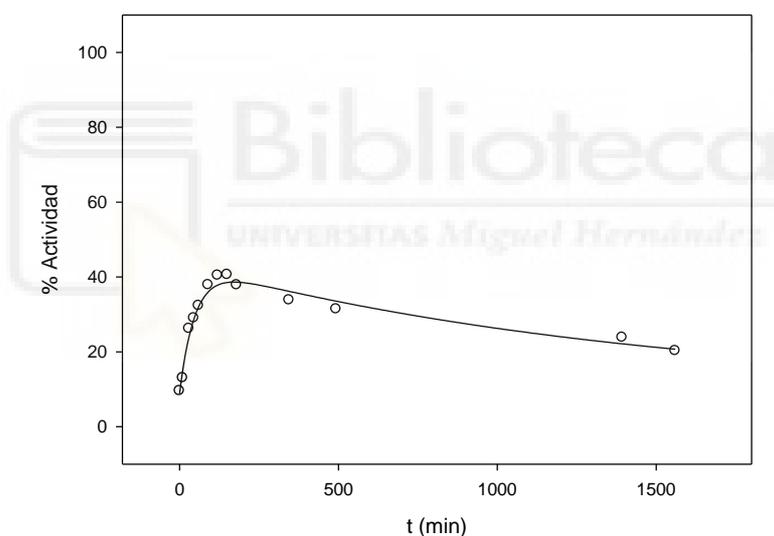


Figura 5.4. Reactivación por dilución de actividad colinesterasa de la AChE tras ser inhibida por DSM en ausencia de EtOH. Se midió la actividad en un período de tiempo de reactivación comprendido entre 0 y 1560 minutos, tras la previa inhibición con DSM. La curva se ajusta a una ecuación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento simultáneos para un componente sensible.

En otro ensayo se inhibió 500 μL de hAChE 2,527 nM con 50 μL de DSM a 220 μM durante 30 minutos y, posteriormente, se midió su actividad colinesterasa a diferentes tiempos de reactivación tras diluir hasta alcanzar 7,52 mL.

Siendo I la concentración residual estimada de DSM tras el proceso (1,46 μM). Los resultados se muestran en la **Figura 5.5.** y los parámetros en la **Tabla 5.4.** el mejor ajuste según el test de la F fue una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece simultáneamente, [Ec.6].

RESULTADOS

La $I_{50}(30\text{min})$ (concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad en 30 minutos; **Tabla 5.4.**) fue obtenida aplicando la ecuación en una hoja de cálculo con los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

Tabla 5.4. Parámetros obtenidos. k_i es la constante de inhibición. k_s es la constante de reactivación. k_g es la constante de envejecimiento. Se muestran los parámetros estimados de tres experimentos independientes. E_1 es la actividad inicial.

	E_1 (%)	k_i ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	k_s (min^{-1})	k_g (min^{-1})	I_{50} (μM)
	8,88	0,0439	0,0075	0,0011	0,53
		0,0334	0,0152	0,0045	0,69
		0,0310	0,0101	0,0089	0,96
Media	-	0,0361	0,0109	0,0048	0,64*
Desviación estándar	-	0,0068	0,0039	0,0039	

* El dato que se muestra es la I_{50} obtenida con la ecuación 6 en una hoja de cálculo con las medias de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

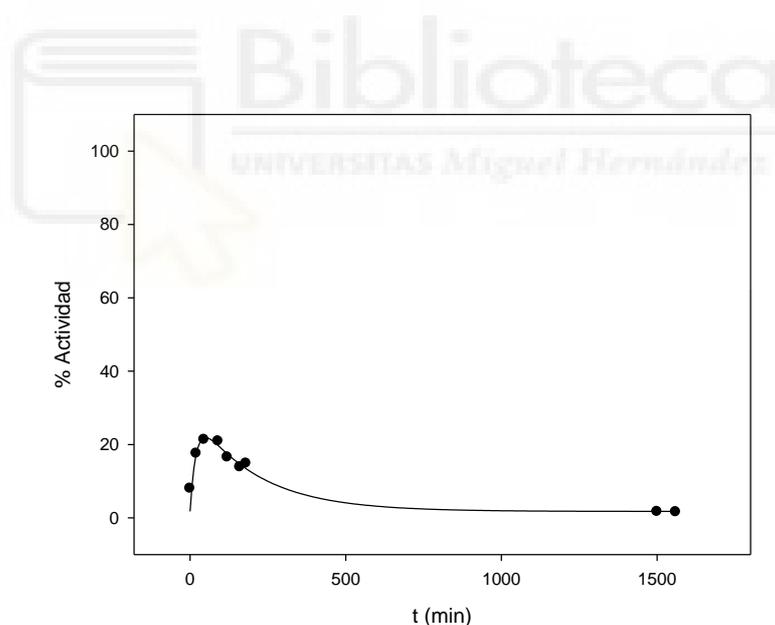


Figura 5.5. Reactivación por dilución de actividad colinésterasa de la AChE tras ser inhibida por DSM en ausencia de EtOH. Se midió la actividad en un período de tiempo de reactivación comprendido entre 0 y 1560 minutos, tras la previa inhibición con DSM. La curva se ajusta a una ecuación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento simultáneos para un componente sensible.

5.2. Ensayos de acetilcolinesterasa preparada en BSA con un 5% de EtOH.

5.2.1. Ensayo cinética de inhibición

Se incubaron muestras de enzima 0,194 nM (0,0824 nM en reacción) con un 5% de etanol con DSM a 4 concentraciones finales diferentes (0, 0.5, 2, 20 μ M) durante 12 tiempos (de 0 a 120 minutos) a 37°C. Posteriormente se midió su actividad colinesterasa. Los resultados se muestran en la **Figura 5.6.** y los parámetros en la **Tabla 5.5.** el mejor ajuste según el test de la F fue una ecuación correspondiente a dos componentes enzimáticos uno sensible (E2) que se inhibe, se reactiva y envejece simultáneamente y otro que se inhibe en el tiempo de reacción enzima-sustrato (E1), [Ec.7].

$E =$

$$\left((E1 \cdot e^{-k1 \cdot I \cdot t}) \cdot e^{-ko \cdot I} \right) + \left(\frac{(a - k_s - k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2 \cdot \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \right) \cdot E2 \cdot e^{\frac{-(a + k_s + k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} - \left(\frac{(a - k_s - k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2 \cdot \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}} \right) \cdot E2_0 \cdot e^{\frac{-(a + k_s + k_g) + \sqrt{(a + k_s + k_g)^2 - 4 \cdot a \cdot k_g}}{2} \cdot t} \quad [Ec.7]$$

Siendo “a” la constante de inhibición del componente E2 por la concentración de inhibidor ($k_i \cdot I$) y k_s y k_g las constantes de reactivación espontánea y envejecimiento del componente E2 respectivamente, y k_1 y k_o las constantes de inhibición aparente y “ongoing inhibition” del componente E1 respectivamente. La $I_{50}(30min)$ (concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad en 30 minutos; **Tabla 5.5.**) fue obtenida aplicando la ecuación 7 en una hoja de cálculo con los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 \pm 0.01 %)

RESULTADOS

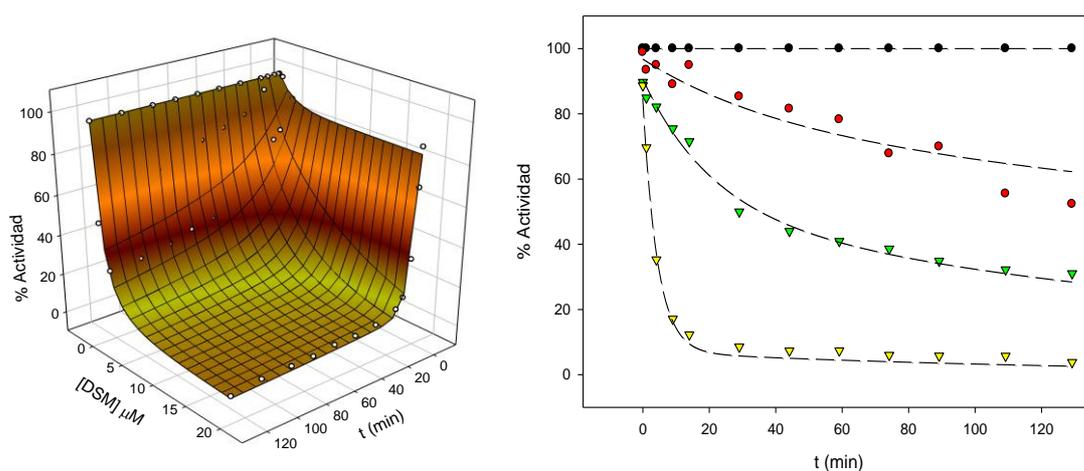


Figura 5.6. Cinética de la inhibición de la AChE humana por DSM en presencia de EtOH. Concentraciones de DSM: 0 (negro), 0.25 (rojo), 0.5 (verde), 1.25 (Amarillo) μM en un volumen de reacción de 240 μL . En la imagen A está la superficie del ajuste 3D y en la imagen B está la representación de curvas de nivel obtenidas del ajuste 3D. Las curvas se ajustan a una ecuación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento simultáneos para dos componentes sensibles.

Tabla 5.5. Parámetros obtenidos. k_i es la constante de inhibición. k_s es la constante de reactivación. k_g es la constante de envejecimiento. k_1 es la constante aparente de inhibición del componente 1(B). k_o es la constante aparente de "ongoing inhibition". Se muestran los parámetros estimados de dos experimentos independientes.

Componente	E (%)	$k_i/k_1(\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	$k_s(\text{min}^{-1})$	$k_g(\text{min}^{-1})$	$k_o(\mu\text{M}^{-1})$	$I_{50}(\mu\text{M})$
E1	17,94	0,0356			0,16	0,64
	15,16	0,0352			0,48	0,65
E2	82,05	0,0132	0,0226	0,0092		1,79
	84,84	0,0106	0,0179	0,0084		2,24
Media	Media E1	16,55	0,0354		0,32	0,65*
Desviación estándar	Desviación estándar E1	1,97	0,0003		0,22	
Media	Media E2	83,45	0,0119	0,0202	0,0088	1,99*
Desviación estándar	Desviación estándar E2	1,97	0,0019	0,0033	0,0006	

* El dato que se muestra es la I_{50} obtenida con la ecuación 7 en una hoja de cálculo con las medias de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

RESULTADOS

5.2.2. Ensayo reactivación por ultrafiltración tras inhibición con DSM

Se inhibió la hAChE 2,64 nM, con un 5% de EtOH, con DSM a 220 μM durante 30 minutos y, posteriormente, se midió su actividad colinesterasa a diferentes tiempos de reactivación.

Siendo I la concentración residual estimada de DSM tras el proceso (0,046 μM). Los resultados se muestran en la **Figura 5.7.** y los parámetros en la **Tabla 5.6.** el mejor ajuste según el test de la F fue una ecuación correspondiente a un componente enzimático, uno que se inhibe, se reactiva y envejece simultáneamente, [Ec.6].

La $I_{50}(30\text{min})$ (concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad en 30 minutos; **Tabla 5.6.**) fue obtenida aplicando la ecuación 6 en una hoja de cálculo con los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. ($50\pm 0.01\%$)

Tabla 5.6. Parámetros obtenidos de todos los experimento de reactivación en presencia de etanol. k_i es la constante de inhibición. k_s es la constante de reactivación. k_g es la constante de envejecimiento.

	El(%)	k_i ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	k_s (min^{-1})	k_g (min^{-1})	I_{50} (μM)
Ultrafiltración	26,80	0,0123	0,0134	0,0052	1,91
Dilución	19,92	0,0210	0,0170	0,0021	1,11
Media**	23,36	0,0167	0,0152	0,0036	1,40
Desviación estándar**	4,87	0,0061	0,0025	0,0022	

* El dato que se muestra es la I_{50} obtenida con la ecuación 6 en una hoja de cálculo con las medias de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. ($50\pm 0.01\%$)

**Media y desviación estándar de todos los experimento de reactivación en presencia de etanol.

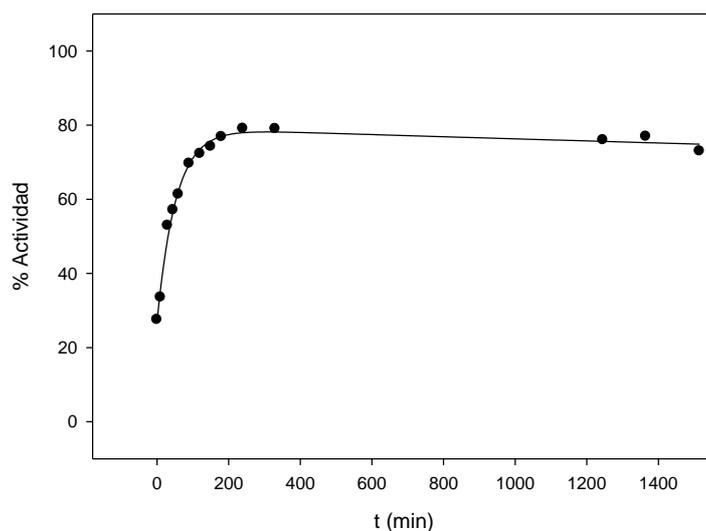


Figura 5.7. Reactivación por ultrafiltración de actividad colinesterasa de la AChE tras ser inhibida por DSM en presencia de EtOH. Se midió la actividad en un período de tiempo de reactivación comprendido entre 0 y 1600 minutos, tras la previa inhibición con DSM. La curva se ajusta a una ecuación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento para un componente sensible.

RESULTADOS

5.2.3 Ensayo reactivación por dilución tras inhibición con DSM

Se inhibió la hAChE 2.527 nM, con un 5% de EtOH, con DSM a 107 μM durante 30 minutos y, posteriormente, se midió su actividad colinesterasa a diferentes tiempos de reactivación.

Siendo I la concentración residual estimada de DSM tras el proceso (0,286 μM). Los resultados se muestran en la **Figura 5.8.** y los parámetros en la **Tabla 5.6.** el mejor ajuste según el test de la F fue una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece simultáneamente, [Ec.6].

La $I_{50}(30\text{min})$ (concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad en 30 minutos; **Tabla 5.6.**) fue obtenida aplicando la ecuación 6 en una hoja de cálculo con los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

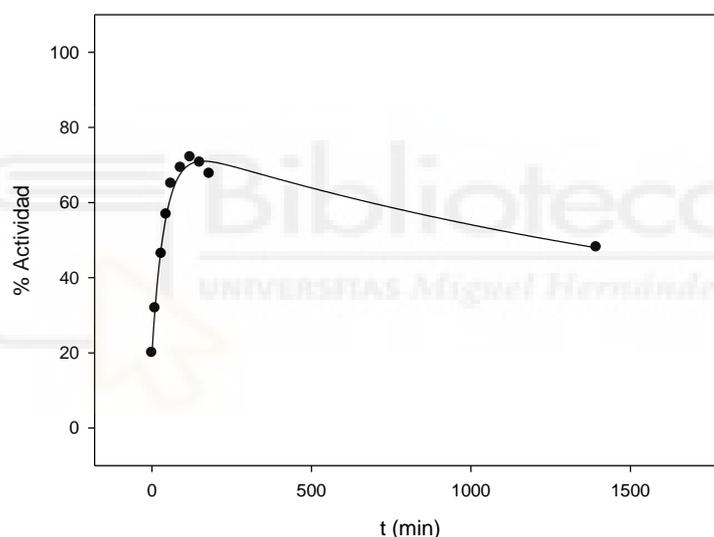


Figura 5.8. Reactivación por dilución de actividad colinesterasa de la AChE tras ser inhibida por DSM en presencia de EtOH. Se midió la actividad en un período de tiempo de reactivación comprendido entre 0 y 1560 minutos, tras la previa inhibición con DSM de enzima. La curva se ajusta a una ecuación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento para un componente sensible.

6. DISCUSIÓN

El etanol (EtOH) ha sido ampliamente utilizado para solubilizar organofosforados (OP) no solubles en agua en ensayos con colinesterasas (O'Brien 1955). Su uso ha sido extendido a OPs hidrosolubles, como muestra el trabajo de Bazire et al. (2011), que utilizaron DSM con AChE en disolución de BSA 5% EtOH.

En este trabajo se ha estudiado la interacción de DSM con AChE en presencia o ausencia de EtOH.

6.1. Interacción de DSM con AChE en ausencia de EtOH

Ensayo de inhibición a tiempo fijo:

Se aplicaron varios modelos matemáticos para analizar los resultados (apartado 4.10.). El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de test de la f fue el correspondiente a una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece y otro componente resistente (3%) (**Figura 5.1.**), con una constante de inhibición (k_i) media de $0,0331 \pm 0,0089 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, una constante de reactivación espontánea (k_s) media de $0,0328 \pm 0,0210 \text{min}^{-1}$, una constante de envejecimiento media (k_g) de $5,67 \cdot 10^{-12} \pm 6,99 \cdot 10^{-12} \text{min}^{-1}$ y una I_{50} media de $0,71 \mu\text{M}$ (**Tabla 5.1.**). Se observa que la actividad va disminuyendo conforme aumenta la concentración de inhibidor ensayada.

Tabla 6.1. Parámetros obtenidos. k_i es la constante de inhibición. k_s es la constante de reactivación. k_g es la constante de envejecimiento fijada. Se muestran los parámetros estimados de tres experimentos independientes.

	E (%)	k_i ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_s (min^{-1})	k_g (min^{-1})	I_{50} (nM)	R (%)
	96,91	0,0145	0,0302	0,0051	1,64	3,08
	96,28	0,0424	0,0254	0,0051	0,55	3,72
	96,47	0,0349	0,0214	0,0051	0,69	3,53
Media	96,56	0,0306	0,0257	0,0051	0,76*	3,44
Desviación estándar	0,32	0,0144	0,0044	-		0,32

* El dato que se muestra es la I_{50} obtenida con la ecuación 4 en una hoja de cálculo con las medias de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

Las constantes cinéticas k_i y k_s son semejantes a las obtenidas en los experimentos de reactivación tras ultrafiltración y dilución (**Tabla 5.3.** y **Tabla 5.4.**) y los experimentos cinéticos de inhibición (**Tabla 5.2.**), sin embargo k_g es bastante más pequeña. Este hecho es debido a que el tiempo de inhibición (30 min) no es suficientemente grande para poder detectar envejecimiento y por lo tanto con estas condiciones experimentales no se puede estimar k_g . Si fijamos k_g como la media de las k_g obtenidas en todos los experimentos de reactivación en ausencia de EtOH ($0,005 \text{min}^{-1}$) y

DISCUSIÓN

realizamos de nuevo el ajuste obtenemos las constantes mostradas en la **Tabla 6.1.**, que son semejantes a las obtenidas en todos los experimentos.

Ensayo de inhibición progresiva con el tiempo:

La conclusión principal del análisis de la simple observación de las curvas de inhibición que se deduce del experimento cinético de inhibición de hAChE en presencia de DSM, es la existencia de una inhibición progresiva con el tiempo (**Figura 5.2.**). Este hecho demuestra que la inhibición es covalente y de acuerdo con ello, en principio irreversible. (Aldridge and Reiner, 1972).

Se aplicaron varios modelos matemáticos para analizar los resultados (apartado 4.10.). El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de test de la f fue el correspondiente a una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece. (**Figura 5.2.**), con una k_i media de $0,0422 \pm 0,0016 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, una k_s media de $0,0201 \pm 0,0003 \text{min}^{-1}$ y k_g media de $0,0043 \pm 0,0008 \text{min}^{-1}$ y una I_{50} media de $0,55 \mu\text{M}$ (**Tabla 5.2.**). Resultado comparable con las constantes obtenidas en los experimentos de reactivación (**Tabla 5.3.** y **Tabla 5.4.**) y los experimentos de inhibición a tiempo fijo (**Tabla 5.1.**).

Se observa que la actividad a este tiempo va disminuyendo conforme aumenta la concentración de inhibidor ensayada.

Ensayo de reactivación por ultrafiltración tras inhibición con DSM:

La conclusión principal del análisis de la simple observación de las curvas de reactivación, es la existencia de una pérdida de actividad con el tiempo tras alcanzar la máxima reactivación de actividad (**Figura 5.3.**), debido al efecto del envejecimiento y a la inhibición por la concentración de DSM residual.

Se aplicaron varios modelos matemáticos para analizar los resultados (apartado 4.10.). El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de test de la f fue el correspondiente a una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece. (**Figura 5.3.**), con una k_i media de $0,0325 \pm 0,0114 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, una k_s media de $0,0107 \pm 0,0025 \text{min}^{-1}$ y k_g media de $0,0053 \pm 0,0037 \text{min}^{-1}$ y una I_{50} media de $0,71 \mu\text{M}$ (**Tabla 5.3.**).

Ensayo de reactivación por dilución tras inhibición con DSM:

La conclusión principal del análisis de la simple observación de las curvas de reactivación, es la existencia de una pérdida de actividad con el tiempo tras alcanzar la máxima reactivación de actividad (**Figura 5.4.** y **Figura 5.5.**), debido al efecto del envejecimiento y de la inhibición por la concentración de DSM residual.

Se aplicaron varios modelos matemáticos para analizar los resultados (apartado 4.10.). El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de test de la f fue el correspondiente a una ecuación

DISCUSIÓN

correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece. (**Figura 5.4. y Figura 5.5.**), con una k_i media de $0,0361 \pm 0,0068 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, una k_s media de $0,0109 \pm 0,0039 \text{min}^{-1}$ y k_g media de $0,0048 \pm 0,0039 \text{min}^{-1}$ y una I_{50} media de $0,64 \mu\text{M}$ (**Tabla 5.4.**).

Conclusión de los resultados de los experimentos en ausencia de etanol en el medio:

En ausencia de EtOH la AChE en presencia de DSM se inhibe irreversiblemente, se reactiva espontáneamente, y simultáneamente envejece. Se han obtenido unos parámetros cinéticos semejantes en todos los experimentos realizados, obteniendo una k_i en un rango de $0,0325$ - $0,0422 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, una k_s en un rango de $0,0107$ - $0,0328 \text{min}^{-1}$, una k_g entre $0,0043$ - $0,0053 \text{min}^{-1}$ y una I_{50} $0,55$ - $0,71 \mu\text{M}$.

6.2. Interacción de DSM con AChE en presencia de EtOH

Ensayo de inhibición progresiva con el tiempo:

Se aplicaron varios modelos matemáticos correspondientes para analizar los resultados (apartado 4.10.). El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de test de la f fue el correspondiente a una ecuación correspondiente a dos componentes enzimáticos sensibles, uno mayoritario que se inhibe, se reactiva y envejece (83%) con una k_i media de $0,0119 \pm 0,0019 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, una k_s media de $0,0202 \pm 0,0033 \text{min}^{-1}$ y k_g $0,0088 \pm 0,0006 \text{min}^{-1}$ (**Tabla 5.5.**). La k_g para el componente mayoritario es inferior a la obtenida en los experimentos de reactivación (**Tabla 5.6. y Tabla 5.7.**), sin embargo, si prefijamos k_g como la media de las obtenidas en los experimentos de reactivación ($0,0036 \text{min}^{-1}$) y realizamos un nuevo ajuste obtenemos constantes similares a los experimentos de reactivación (**Tabla 6.2.**).

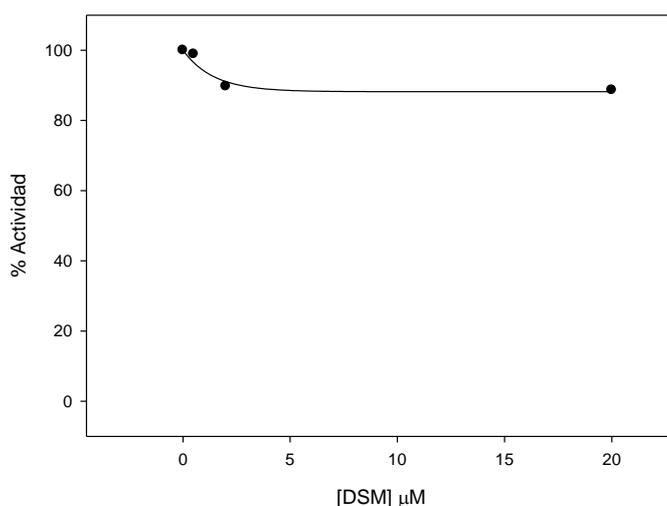


Figura 6.1. Cinética de la inhibición de la AChE humana por DSM en presencia de EtOH. Inhibición aparente del componente E1 en el tiempo de reacción enzima-sustrato

DISCUSIÓN

Se obtuvo otro componente muy sensible que se inhibe en el tiempo de reacción enzima-sustrato (17%) (**Figura 6.1.**) con una k_1 media de $0,0354 \pm 0,0003 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ y k_0 de $0,32 \pm 0,22 \mu\text{M}^{-1}$ (**Tabla 5.5.**). Es muy probable que este último se reactive y envejezca, sin embargo hay muy pocos puntos en esta zona para poder confirmar esta hipótesis, k_1 es la constante de inhibición aparente y es similar a las obtenidas en ausencia de etanol.

Como se observa en la **Figura 5.6.** la actividad acetilcolinesterasa a tiempo 0 de inhibición no es el 100 %, lo que implica que hay una inhibición significativa durante el tiempo de reacción con el sustrato, un efecto de "ongoing inhibition" o inhibición adicional (Estévez y Vilanova., 2009). Se observa que la actividad a este tiempo va disminuyendo conforme aumenta la concentración de inhibidor ensayada.

Tabla 6.2. Parámetros obtenidos. k_i es la constante de inhibición. k_s es la constante de reactivación. k_g es la constante de envejecimiento fijada. k_1 es la constante aparente de inhibición del componente 1(B). k_0 es la constante de inhibición aparente del efecto "ongoing inhibition". Se muestran los parámetros estimados de dos experimentos independientes. La sexta columna muestra los la k_g fijada con el valor obtenido experimentalmente en los experimentos de reactivación.

Componente	E (%)	$K_i/k_1 (\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1})$	$k_s (\text{min}^{-1})$	$k_g (\text{min}^{-1})$	$k_0 (\mu\text{M}^{-1})$	$I_{50} (\mu\text{M})$
E1	18,46	0,0360			0,17	0,64
	15,31	0,0340			0,48	0,65
E2	81,54	0,0123	0,0158	0,0036		1,79
	84,69	0,0101	0,0133	0,0036		2,24
Media	Media E1	16,88	0,0350		0,33	0,66*
Desviación estándar	Desviación estándar E1	2,23	0,0014		0,22	
Media	Media E2	83,11	0,0112	0,0146	0,0036	2,10*
Desviación estándar	Desviación estándar E2	2,23	0,0016	0,0017	-	

* El dato que se muestra es la I_{50} obtenida con la ecuación 4 en una hoja de cálculo con las medias de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos y realizando sucesivas iteraciones con diferentes valores de I hasta conseguir un valor muy próximo a 50 % de actividad. (50 ± 0.01 %)

Ensayos de reactivación tras inhibición con DSM:

La conclusión principal del análisis de la simple observación de las curvas de reactivación, es la existencia de una pérdida de actividad con el tiempo tras alcanzar la máxima reactivación de actividad (**Figura 5.7.** y **Figura 5.8.**), debido al efecto del envejecimiento y de la concentración residual de DSM.

DISCUSIÓN

Se aplicaron varios modelos matemáticos para analizar los resultados (apartado 4.10.). El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de test de la f fue el correspondiente a una ecuación correspondiente a un componente enzimático que se inhibe, se reactiva y envejece. (**Figura 5.7.** y **Figura 5.8.**), con una k_i de $0,0167 \pm 0,0061 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, una k_s de $0,0152 \pm 0,0025 \text{min}^{-1}$ y k_g de $0,0036 \pm 0,0022 \text{min}^{-1}$ y una I_{50} media de $1,40 \mu\text{M}$ (**Tabla 5.6.**).

Se observa que mientras las constantes de reactivación espontánea y envejecimiento son comparables a las obtenidas en el mismo ensayo sin EtOH en el medio, la constante de inhibición es mucho menor con un 5% de EtOH presente.

Conclusión de los resultados de los experimentos en presencia de etanol en el medio:

Las contantes estimadas nos permiten deducir una I_{50} que indica que en presencia de EtOH la actividad AChE es más resistente a la inhibición con DSM que en ausencia de EtOH.

En presencia de EtOH hemos obtenido unos parámetros cinéticos semejantes en todos los experimentos, obteniendo una k_i en un rango de $0,0119$ - $0,0167 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, una k_s en un rango de $0,0152$ - $0,0202 \text{min}^{-1}$, una k_g entre $0,0036$ - $0,0088 \text{min}^{-1}$ y una I_{50} $1,40$ - $2,10 \mu\text{M}$.

6.3. Consideraciones finales

De los resultados obtenidos se observa que en presencia de EtOH la AChE es más resistente a la inhibición por DSM que en ausencia de EtOH, al menos cuatro veces. Observaciones parecidas con otros OPs en presencia de EtOH fueron publicadas por Fekonja et al. (2007) y O'Brien (1955).

Las contantes cinéticas obtenidas en ausencia de etanol son semejantes a las obtenidas por Worek et al. (1999) en condiciones parecidas ($k_s=0,017 \text{min}^{-1}$; $k_g= 0,003 \text{min}^{-1}$).

Las diferencias obtenidas por Bazire et al. frente al trabajo de Worek et al. puede ser a causa de que usaban EtOH en el medio, siendo posible que el EtOH o alguna de sus impurezas puedan ser la causa de las incertidumbres observadas por Bazire et al.

Por primera vez se han estimado parámetros cinéticos en experimentos donde se observa inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento simultáneos con una concentración residual de DSM importante, siendo el perfil de las curvas obtenidas similar al perfil de las teorizadas por Mangas (2010).

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

7.1. Conclusiones

1. La inhibición de hAChE por DSM en ausencia y presencia de EtOH es progresiva con el tiempo, y por tanto covalente.
2. La hAChE en ausencia de EtOH es cuatro veces más sensible a la inhibición con DSM que en presencia de EtOH. La constante estimada de inhibición es de alrededor de 0,0325-0,0422 y una I_{50} alrededor de 0,55-0,71 en ausencia de EtOH y una k_i de 0,0119-0,0167 con una I_{50} de 1,4-2,1.
3. La hAChE inhibida por DSM se reactiva espontáneamente tanto en ausencia como en presencia de EtOH, siendo su k_s muy similar en ambos casos, alrededor de 0,0107-0,0328.
4. La hAChE inhibida por DSM es capaz de ser envejecida tanto en presencia como en ausencia de EtOH, y su k_g es parecida, alrededor de 0,0036-0,0088.
5. El modelo teórico cinético que describe una situación de inhibición, reactivación espontánea y envejecimiento simultáneos ha sido útil y reproduce bien los datos experimentales obtenidos.
6. De estos resultados se deriva que el EtOH tiene un efecto protector en la inhibición por OPs.
7. Las incertidumbres propuestas en el trabajo de Bazire et al. (2011) pueden ser debidas a la interacción de EtOH en la reacción de inhibición.

7.2. Proyecciones futuras

- Estudiar interacción de hAChE con otros inhibidores en ausencia y presencia de EtOH.
- Estudio estructural de esos organofosforados con hAChE en ausencia y presencia de EtOH (ongoing inhibition).
- Estudio estructural de la AChE humana recombinante con DSM y EtOH unidos a los centros activos mediante modelos in silico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Aldridge, WN., (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.
- 📖 Aldridge WN. y Reiner E. (1972) Acylated amino acids in inhibited cholinesterases. In: Neuberger A., Tatum E.L., (Eds), *Enzyme inhibitors as substrates*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp170-175.
- 📖 Ballantyne, B., Marrs, T.C., (1992). *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- 📖 Bazire A., Gillon E., Lockridge O., Vallet V., y Nachon F., (2011). The kinetic study of the inhibition of human cholinesterases by demeton-S-methyl shows that cholinesterase-based titration methods are not suitable for this organophosphate. *Elsevier* 10.1016/j.tiv.2011.01.006
- 📖 Benabent M. (2014) Tesis doctoral: Carboxilesterasas y colinesterasas de cerebro de pollo: interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos. Universidad Miguel Hernández de Elche. 260pp.
- 📖 Bevington, P.R. (1969). *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, McGraw-Hill, New York, 1969.
- 📖 Casida, J.E., Durkin, K.A. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol. Interact.* 2013 Mar 25;203(1):221-5.
- 📖 COT Report, 1999. *Organophosphates. A report of the committee on Toxicology of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment*. UK Department of Health, London.
- 📖 Estevez J., (2003). *Carboxilesterasas solubles de nervio periférico: modelos cinéticos de interacción con organofosforados*. Tesis Doctoral, Universidad Miguel Hernández.
- 📖 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
- 📖 Ota Fekonja, Majda Zorec-Karlovšek, Manale El Kharbili, Didier Fournier & Jure Stojan (2007) Inhibition and protection of cholinesterases by methanol and ethanol, *Journal of*

BIBLIOGRAFÍA

- Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22:4, 407-415, DOI: 10.1080/14756360601143857
- 📖 Jamal, A., N. Ayub, M. Usman and A.G. Khan. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance Zn and Ni uptake from contaminated soil by soybean and lentil. *Int. J. Phytorem.*, 4: 205-221
- 📖 Johnson M.K. (1969b). A phosphorylation site in brain and delayed neurotoxic effects of some organophosphorus compounds. *Biochem.J.* 111, 487g495.
- 📖 Johnson, M.K. The delayed neuropathy caused by some organophosphorous esters: mechanism and challenge. 1975 CRC. *Crit. Rev. Toxicol* 3:289-316.
- 📖 Kovarik Z., Radić Z., Berman HA., SimeongRudolf V., Reiner E. y Taylor P. (2003). Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *The Biochemical journal*, 373(Pt 1):33g40.
- 📖 Lockridge, O., & Schopfer, L. M. (2006). Biomarkers of organophosphate exposure. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds* (pp. 703-711).
- 📖 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.
- 📖 Marquardt, D.W. (1963). An algorithm for LeastSquares Estimation of Nonlinear Parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, Vol. 11, No 2 Jun. 431g441.
- 📖 McDaniel, Virginia C Moser, Differential profiles of cholinesterase inhibition and neurobehavioral effects in rats exposed to fenamiphos or profenofos, *Neurotoxicology and Teratology*, Volume 26, Issue 3, May–June 2004, Pages 407-415
- 📖 Mangas I. (2010). Interacciones de las carboxilesterasas solubles de cerebro con organofosforados. Trabajo de Fin de Máster, Universidad Miguel Hernández, Universitat de València.
- 📖 Nash JC (1979). *Compact Numerical Methods for Computers: Linear Algebra and Function Minimisation*. Adam Hilger, Bristol. Second Edition, 1990, Bristol: Institute of Physics Publications.

BIBLIOGRAFÍA

- 📖 O'Brien R.D. (1955). Protection of cholinesterases by ethanol against inhibition by organophosphates in vitro. Science Service Laboratory, University Sub Post Office, London, Canada) J. Biol. Chem. 1956, 219:927-931.
- 📖 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.
- 📖 Repetto, M. (1995) Toxicología Avanzada. Ed. Díaz de Santos.
- 📖 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.
- 📖 Shragar, R.I. (1970). Nonlinear regression with linear constraints: An extension of the magnified diagonal method. Journal of the ACM, Vol. 17 Issue 3, July.
- 📖 Shragar, R. I. (1972). Quadratic programming for nonlinear regression. Comm. ACM. 15:41g45.
- 📖 Silman I, Futerman AH (1987) Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. Eur J Biochem 170:11-22.
- 📖 Sogorb M.A., Viniegra S., Reig J.A., Vilanova E., (1994). Partial characterization of neuropathy target esterase and related phenyl valerate esterases from bovine adrenal medulla. Journal of Biochemistry of Toxicology, 9:145-152.
- 📖 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.
- 📖 Terry, A.V., 2012a. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential noncholinergic mechanisms. Pharmacol. Ther. 134, 355– 365.
- 📖 World Health Organisation (WHO). (1986a) Properties and analytical methods pp23g29. En: Organog phosphorus Insecticides: A general Introduction. Geneva.

BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Worek F., Diepold C., Eyer P. (1999). Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: inhibition, reactivation, and aging kinetics. Springer-Verlag Arch Toxicol (1999) 73: 7±14

