

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE



**FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA SEMIPREPARATIVA DE ALTA
RESOLUCIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN TOXICIDAD DE
COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS**

Departamento de Biología Aplicada

Facultad CC. Experimentales

Grado en Biotecnología

Autora: Ana Peral Clement

Tutor: Jorge Estévez Domènech

Curso 2014 - 2015

RESUMEN

La exposición a niveles bajos de compuestos organofosforados (OPs) puede causar efectos neurológicos a largo plazo y afectar a funciones cognitivas en dominios experimentales de humanos y animales. Su acción en las dianas conocidas no puede explicar la mayoría de estos efectos. En trabajos previos se han discriminado cinéticamente carboxilesterasas solubles ($E\alpha$, $E\beta$, $E\gamma$) de cerebro de pollo, que hidrolizaban fenilvalerato como sustrato, con propiedades cinéticas a OPs diferentes. Se realizó una purificación parcial mediante técnicas de exclusión molecular y se obtuvieron tres fracciones (S1, S2 y S3). $E\alpha$ apareció localizada en la fracción S1. También se ha sugerido que la proteína responsable de la actividad fenilvalerato esterasa $E\alpha$ podría ser butirilcolinesterasa, una proteína hidrolizante de acetilcolina.

En este trabajo se ha desarrollado un método de fraccionamiento de exclusión molecular de los componentes esterásicos de fracción soluble de cerebro pollo en cromatografía semipreparativa de alta resolución. La fracción soluble de cerebro de pollo se ha separado en 28 fracciones diferentes. Se ha monitorizado la actividad fenilvalerato esterasa y acetilcolinesterasa. Estas fracciones se han agrupado en cuatro subfracciones, denominadas S1, S2, S3 y S4. Dichas subfracciones son coincidentes con las obtenidas en trabajos anteriores. El pico de mayor actividad de acetilcolinesterasa apareció en la fracción S1 y además este pico tuvo la misma constante de reparto y peso molecular que el pico obtenido en esa fracción S1 en actividad fenilvalerato esterasa, el cual corresponde con la actividad fenilvalerato esterasa $E\alpha$. Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis que la actividad fenilvalerato esterasa $E\alpha$, podría ser una proteína hidrolizante de acetilcolina.

ABSTRACT

Low level exposure to organophosphorus compounds (OPs) may cause long-term neurological effects and affect specific cognition domains in experimental animals and humans. Action on known targets cannot explain most of these effects by. In previous works, soluble carboxylesterases ($E\alpha$, $E\beta$, $E\gamma$) of chicken brain have been kinetically discriminated, with different OPs kinetic properties. Phenyl valerate esterases were fractionated by gel permeation chromatography into three fractions (S1, S2 and S3). $E\alpha$ appeared located in the S1 fraction. Moreover it has been suggested that the protein responsible of $E\alpha$ phenyl valerate esterase activity could be butyrylcholinesterase, an acetylthiocholine-hydrolyzing protein.

In this work, a fractionation method of the soluble esterase components was developed by high-performance semipreparative chromatography. The soluble chicken brain fraction was separated into 28 different fractions in size exclusion chromatography. Monitoring the phenyl valerate esterase activity and acetylcholinesterase activity, these fractions were pooled into four subfractions, called S1, S2, S3 and S4. That ones were like the ones at previous works.

The peak with more acetylcholinesterase activity was the one at S1 fraction, and also that peak had the same distribution constant and molecular weight than the peak obtained in that S1 fraction on the phenyl valerate esterase activity, which corresponds with $E\alpha$ phenyl valerate esterase activity. The results of this study support the hypothesis that the $E\alpha$ phenyl valerate esterase activity could be an acetylthiocholine-hydrolyzing protein.

PALABRAS CLAVE: Compuestos organofosforados, fenilvalerato esterasa, acetilcolinesterasa, cromatografía.

ABREVIATURAS

AAP	Aminoantipirina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
BSA	Albúmina de suero bovino
DMF	N,N-dimetilformamida
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HPLC	High performance liquid chromatography
I50	Dosis de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad enzimática
kD	Coeficiente de distribución
km	Constante de Michaelis
NTE	Esterasa diana de neuropatía
OPIDN	Neuropatía retardada inducida por organofosforados
OPs	Compuestos organofosforados
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PV	Fenilvalerato
PVasa	Fenilvalerato esterasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Los compuestos organofosforados	5
1.2. Neurotoxicidad de OPs.....	5
1.2.1. Efecto colinérgico agudo.....	6
1.2.2. Síndrome intermedio	7
1.2.3. Efecto neurotóxico retardado. La neuropatía retardada inducida por OPs (OPIDN)	8
2. ANTECEDENTES.....	9
Dianas moleculares potenciales no conocidas de la toxicidad de OPs	9
Sensibilidad de las esterasas a los OPs en tejido nervioso	9
2.1. Separación de las dianas esterásicas de los compuestos organofosforados en cerebro de pollo por cromatografía preparativa	10
2.2. Interacción de fenilvalerato o acetiltiocolina, con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina o fenilvalerato respectivamente	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivos específicos.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1. Tampones de uso habitual	13
4.2. Equipos utilizados.....	13
4.3. Preparación del tejido	14
4.4. Medida de actividad fenilvalerato esterasa	19
4.5. Medida de actividad acetilcolinesterasa.....	20
4.7. Medida de proteína.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Método automatizado en microensayo de actividad fenilvalerato esterasa y colinesterasa	24

5.2. Perfil cromatográfico de exclusión molecular en fracción soluble de cerebro de pollo.....	25
6. DISCUSIÓN.....	31
6.1. Perfil cromatográfico de proteínas	31
6.2. Perfiles cromatográficos de actividad fenilvalerato esterasa y acetilcolinesterasa	31
7. CONCLUSIONES.....	34
8. BIBLIOGRAFÍA.....	35



1. Introducción

1.1. Los compuestos organofosforados

Los compuestos organofosforados (OPs) son sustancias químicas que han sido usadas para muchos propósitos, mayoritariamente como plaguicidas y armas químicas. Sin embargo, el uso de OPs como plaguicidas, se ha visto mermado en los países desarrollados. No obstante, los OPs continúan siendo una de las clases de insecticidas más utilizadas actualmente. Estos compuestos pueden causar múltiples desordenes neurotóxicos, algunos de ellos con dianas moleculares definidas (crisis colinérgica, neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN) y síndrome intermedio), y otros 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.).

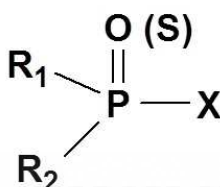


Figura 1.1. Estructura química general de los compuestos organofosforados. R1 y R2 son normalmente grupos arilo o alquilo simples. Grupo X es el llamado “grupo saliente” y puede ser una gran variedad de grupos.

En esencia, los OPs son ésteres de ácido fosfórico con variaciones de combinaciones de oxígeno, carbono, sulfuro o nitrógeno unido. La estructura química general de los OPs (ver **figura 1.1**) está compuesta por un átomo central de fósforo (P) y el enlace fosfórico característico (P=O) o el enlace 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.

1.2. Neurotoxicidad de OPs

Los compuestos organofosforados pueden producir múltiples efectos neurotóxicos distintos dependiendo de la dosis, frecuencia de exposición, tipo de OP, y los factores del huésped, donde influye la susceptibilidad y sensibilidad de éste. Algunos de ellos tienen mecanismo y diana molecular conocidos y otros no. Entre estos efectos se incluyen: el efecto colinérgico agudo, el síndrome intermedio y OPIDN (ver **tabla 1.1**).

Efectos	Síntomas	Aparición de la sintomatología	Implicación
Colinérgicos	<p><i>Muscarínicos:</i> broncoconstricción, vómitos..</p> <p><i>Nicotínicos:</i> fatiga, temblor involuntario, debilidad muscular, parálisis de los músculos respiratorios.</p> <p><i>Derivados del SNC:</i> ansiedad, confusión mental, convulsiones, depresión de los centros respiratorios...</p>	inmediata	AChE
Síndrome intermedio	<i>Afección muscular:</i> parada respiratoria, debilidad muscular (músculos flexores del cuello, proximales de las extremidades).	24-96 h	hiperestimulación de receptores nicotínicos
Neurotoxicidad retardada	<i>Afectación motora:</i> debilidad muscular y parálisis flácida (zona distal extremidades inferiores), avanza de forma retrógrada.	2-3 semanas	NTE

Tabla 1.1. Efectos neurotóxicos y síntomas observados ante la exposición a OPs.

1.2.1. Efecto colinérgico agudo

Después de la absorción del OP se produce un síndrome colinérgico debido a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) del sistema nervioso (Ecobichon, 1996). El mecanismo de acción de la AChE en el sistema nervioso se basa en que esta enzima produce la ruptura de la acetilcolina (ACh) liberada en las terminaciones sinápticas, convirtiéndola en acetato y colina. De esta manera deja de estimular al receptor colinérgico (nicotínico y/o muscarínico), interrumpiendo la neurotransmisión (ver **figura 1.2**). La inhibición de la AChE por un OP impide la ruptura de la ACh dejando un exceso de la misma en las sinapsis colinérgicas que sigue ejerciendo su efecto sobre sus receptores muscarínicos y nicotínicos.

La gravedad de la intoxicación depende del grado de inhibición de la AChE y de la velocidad con que es inhibida la enzima. La aparición de los primeros síntomas de crisis colinérgica aguda varía entre 5 minutos y 24 horas después de la absorción. Como consecuencia de la inhibición de AChE se observa un cuadro clínico de intoxicación característico: síntomas muscarínicos, síntomas nicotínicos, y en casos graves pueden aparecer síntomas por daño del sistema nervioso central (SNC) (Solé-Violan et al., 1985):

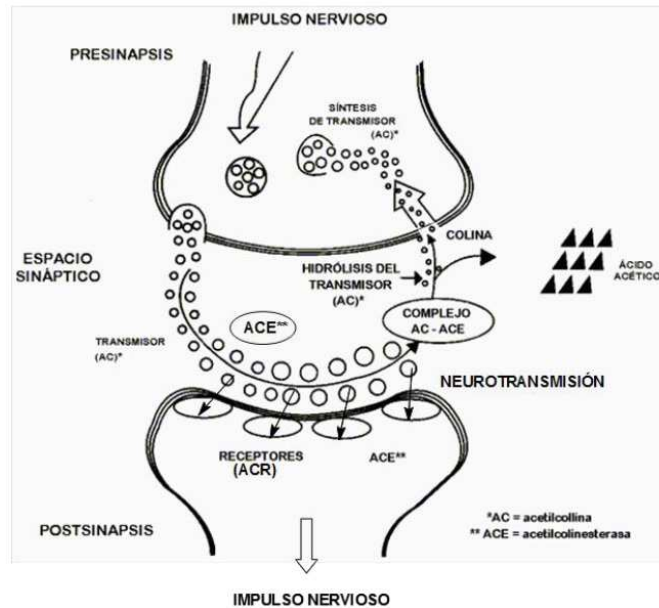


Figura 1.2. Transmisión del impulso nervioso en la sinapsis colinérgica.

- *Síntomas muscarínicos*: presión en el pecho, respiración jadeante, broncoconstricción, incremento de las secreciones bronquiales, salivación, lagrimeo, sudoración, vómitos, calambres abdominales, diarrea, miosis, etc.
- *Síntomas nicotínicos*: fatiga, debilidad moderada, temblor involuntario y fasciculaciones, calambres, debilidad muscular, cianosis, etc.
- *Síntomas derivados de alteraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC)*: ansiedad, mareo, depresión del nivel de consciencia, depresión respiratoria, etc. Las intoxicaciones severas pueden incluir fallo respiratorio, inconsciencia, confusión, convulsiones y muerte.

Dependiendo del OP, la dosis y la ruta de exposición, todos estos síntomas pueden ocurrir en diferentes combinaciones. Los síntomas derivados de alteraciones en el sistema nervioso central aparecen en los casos más graves de intoxicación.

1.2.2. Síndrome intermedio

Después de la recuperación de la crisis aguda causada por los efectos tóxicos inmediatos, se ha descrito un patrón característico de afección muscular y otros hallazgos asociados que se ha reconocido en ocasiones como una entidad clínica aparte (De Bleecker, 1995) y se ha denominado "síndrome intermedio" (Senanayake y Karalliedde, 1987).

El patrón clínico fundamental de este síndrome es la debilidad muscular que aparece a las 24-96 horas de la exposición a ciertos OPs. Afecta predominantemente a los músculos proximales de las extremidades y flexores del cuello, así como a los músculos inervados por los pares craneales (Senanayake y Karalliedde, 1987). Todo lo contrario de lo que ocurre en la

polineuropatía retardada, en la cual la parálisis se limita a los músculos distales de los miembros mientras que los nervios craneales y musculatura respiratoria están indemnes.

El curso clínico del síndrome intermedio conlleva un riesgo de muerte debido a la depresión respiratoria asociada por parálisis de la musculatura respiratoria al tercer o quinto día. El efecto es debido al exceso de acumulación de ACh en la unión neuromuscular que ocurre con una larga exposición seguida de una interacción transmisor-receptor prolongada.

1.2.3. Efecto neurotóxico retardado. La neuropatía retardada inducida por OPs (OPIDN)

Algunos compuestos OPs, además de una intoxicación colinérgica y/o un síndrome intermedio, ejercen otro efecto neurodegenerativo sobre el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) que se conoce como “neuropatía retardada inducida por organofosforados” (OPIDN) (Johnson, 1969, 1982; Yelamos et al., 1992).

Esta neuropatía aparece entre la 2ª y la 4ª semana (periodo de latencia) tras la exposición a determinados OPs. Este síndrome no tiene ninguna relación con la inhibición de AChE, sino que se relaciona con la fosforilación y posterior modificación específica (envejecimiento o “aging”) de la proteína conocida como diana de la neuropatía retardada (NTE) por algunos OPs. (Johnson, 1982, 1987; Johnson y Glynn, 2001; Jokanovic et al., 2002). Los OPs capaces de producir este efecto se denominan “neuropáticos” o inductores de neuropatía.

Si los OPs no neuropáticos, inhibidores de NTE, se administran previamente a un OP neurotóxico ejercen una acción protectora de la capacidad de inducir OPIDN por este último (Johnson, 1987; Lotti, 1991).

La OPIDN se caracteriza por ser una polineuropatía sensitivo-motora con una degeneración axónica (axonopatía), de predominio distal que afecta fundamentalmente a los nervios periféricos (Johnson, 1980), con evolución retrógrada y ascendente. En la médula espinal, el daño se encuentra en la parte superior de los axones ascendentes y en la parte inferior de los axones descendentes (Johnson, 1982; Lotti, 1991).

Se caracteriza por un daño extenso en nervios periféricos y médula espinal pero raras veces en cerebro. Los síntomas clínicos de la OPIDN incluyen hormigueo, parestesias y ataxia, pérdida de tono muscular, debilidad progresiva en las rodillas y pérdida progresiva de la respuesta refleja (Lotti et al., 1984; Jokanovic et al., 2002).

La potenciación de la neuropatía es un efecto neurotóxico causado por algunos inhibidores esterásicos. Cuando los potenciadores se administran junto a los OPs en las gallinas, causan OPIDN, lo que aumenta la neurotoxicidad (Pope y Padilla, 1990; Lotti et al., 1991). A pesar de todos los esfuerzos realizados ni el mecanismo ni la diana de la potenciación son conocidos. Se ha informado de que, dada la naturaleza química de los promotores, la diana tiene que ser una esterasa similar a NTE, y que es probable que hidrolice el mismo sustrato (Moretto et al., 1994; Céspedes et al., 1997).

2. Antecedentes

Dianas moleculares potenciales no conocidas de la toxicidad de OPs

Existen muchos sistemas enzimáticos capaces de interactuar con OPs específicos, y la existencia de dianas no colinérgicas, no neuropáticas ha sido esclarecido por diversos estudios: (1) ratones knockout AChE que no muestran ninguna actividad AChE en tejido y son sensibles a la toxicidad de OP (Lockridge y Schöpfer, 2006); (2) los efectos de diana secundaria no son específicos de inhibidores de la AChE, observados en peces cebras (Behra et al., 2004); (3) diferentes plaguicidas organofosforados causan diversos grados de toxicidad a pesar de tener niveles similares de inhibición de AChE (Pope, 1999); (4) dosis bajas de inhibidores de OPs producen efectos distintos que dependen de la identidad del OP (Moser, 1995). Además de las colinesterasas conocidas y NTE, se han observado otras proteínas capaces de unirse covalentemente a OPs en ensayos experimentales: otras esterasas de serina, receptores muscarínicos y otras dianas desconocidas (Casida y Quistad, 2004; Nomura et al., 2008; Nomura y Casida, 2011; Richards et al., 1999, 2000; Murray et al., 2003, 2005). La mayoría de las dianas moleculares de OPs identificadas hasta la fecha son esterasas, y dilucidar la naturaleza y el significado funcional de la sensibilidad de las esterasas por los OPs en el sistema nervioso central con el fin de encontrar nuevas proteínas diana, es una tarea importante de investigación.

Sensibilidad de las esterasas a los OPs en tejido nervioso

Se han desarrollado y aplicado modelos cinéticos para identificar la unión de las enzimas con OPs en preparados biológicos complejos. Estos modelos analizan la inhibición de sistemas multi-enzimáticos, la reactivación espontánea de un sistema enzimático inhibido, la hidrólisis química del inhibidor y la inhibición durante el tiempo de reacción del sustrato. Se ha prestado especial atención a las fenilvalerato esterasas (PVasa), ya que el fenilvalerato (PV) fue el sustrato utilizado para la identificación previa de NTE (Johnson, 1969), en fracción soluble de cerebro de pollo (animal modelo de neurotoxicidad donde la esterasa diana de neuropatía, NTE, fue aislada y descrita por primera vez) que interactúan con los OPs (Mangas et al., 2011, 2012b; Estévez et al., 2013). Mediante estos modelos cinéticos se han discriminado diferentes componentes enzimáticos en tejido nervioso de pollo con diferentes sensibilidades a OPs. Estas esterasas son altamente sensibles a OPs, y se han descrito en las fracciones solubles de nervio periférico, cerebro y suero de pollo (Barril et al., 1999; García-Pérez et al., 2003; Estévez et al., 2004, 2010, 2011, 2012; Estévez y Vilanova, 2009; Mangas et al., 2011, 2012), y en la fracción de membrana de cerebro de pollo (Mangas et al., 2012a, b). Se ha sugerido que estas esterasas pueden desempeñar papeles potenciales en toxicidad y / o la desintoxicación durante la exposición continuada de organofosforados a baja concentración.

Algunos estudios publicados sugieren que la exposición a bajos niveles de OP puede causar efectos neurológicos en la exposición a largo plazo. Mangas et al., (2011) estudiaron la interacción con OPs (inhibición, reactivación espontánea y el efecto de "ongoing inhibition") en PVasa solubles de cerebro de pollo utilizando OPs modelo como el mipafox (inhibidor inductor

de neuropatía), paraoxon (inhibidor no inductor de efectos neuropáticos) y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) como potenciador de neuropatía.

En esos trabajos se discriminaron tres componentes enzimáticos de PVasa. Estos componentes esterásicos se han denominado: E α , el cual es altamente sensible a mipafox y paraoxon, pero resistente a PMSF, y se reactiva espontáneamente cuando se preinhibe con paraoxon; E β , el cual es sensible a paraoxon y PMSF, pero resistente a mipafox; E γ , el cual es resistente a paraoxon, sensible a mipafox y PMSF (Mangas et al., 2011, 2012b; Estévez et al., 2013). Esta última fracción se le ha denominado "NTE soluble" o S-NTE (Vilanova et al., 1990). La alta sensibilidad de E α a paraoxon y mipafox sugiere que podría jugar un papel en la toxicidad cuando existe una exposición a OPs a una baja concentración y durante un largo periodo de tiempo, y que puede ser relevante sólo en la exposición crónica ya que se reactiva espontáneamente después de la inhibición con paraoxon. E α es menos sensible a mipafox o a paraoxon después de pre-exposición a PMSF (Mangas et al., 2012b). Por otra parte, el componente E α pierde su capacidad de reactivación espontánea después de la exposición previa a PMSF. E γ se vuelve menos sensible a mipafox o paraoxon después de la preincubación con PMSF (Mangas et al., 2012a; Estévez et al., 2013). Se ha sugerido que tales interacciones pueden estar relacionadas con la potenciación del efecto OPIDN (Mangas et al., 2012b; Estévez et al., 2013.).

2.1. Separación de las dianas esterásicas de los compuestos organofosforados en cerebro de pollo por cromatografía preparativa

I. Mangas et al. (2014) realizaron una purificación parcial con varios pasos utilizando métodos de separación de proteínas nativas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography). En primer lugar se realizó una cromatografía de exclusión molecular, seguido de una cromatografía de intercambio iónico. Esto permitió obtener fracciones con diferentes comportamientos frente a los inhibidores previamente nombrados. La fracción soluble cerebro de pollo fue fraccionada analizando la actividad total esterásica medida de proteínas y actividades enzimáticas E α , E β y E γ de las subfracciones adquiridas.

Por cromatografía de exclusión molecular se obtuvieron 30 fracciones las cuales se repartieron en tres subfracciones globales denominadas S1, S2, S3. La fracción S1 con un volumen de elución (Ve) de 4.50 ml a 6.00 ml, la cual contiene una mezcla de actividades E α y E β . La fracción S2 Ve de 6.01 ml a 8.50 ml y contiene principalmente actividad E β . Y por último la fracción S3 con Ve de 8.51 ml a 9.00 ml, y comprende una mezcla de actividad E γ y E β . Casi toda la actividad E α estaba localizada en la fracción S1.

Cada una de estas fracciones se separó posteriormente en más de cinco por cromatografía de intercambio aniónico. Se obtuvieron así fracciones enriquecidas con los diferentes componentes enzimáticos de interés toxicológico. La fracción más característica fue S1D1, obtenida a partir de la fracción S1, debido a su alto factor de purificación y su contenido de casi toda la actividad fenilvalerato esterasa, E α .

2.2. Interacción de fenilvalerato o acetiltiocolina, con la actividad hidrolizante de acetiltiocolina o fenilvalerato respectivamente

Benabent et al. (2014) estudiaron la interacción de acetilcolina con la actividad enzimática PVasa en fracción soluble de cerebro de pollo.

Se observó inhibición en la actividad PVasa E α (actividad PVasa resistente a PMSF) con diferentes concentraciones de acetiltiocolina. El modelo de inhibición al que mejor se ajustó los datos fue el modelo de inhibición no competitiva (constante de Michaelis (k_m), constante de inhibición (k_i)) ($k_m = 0.12-0.22$ mM, $k_i = 6.6-7.6$ mM). La actividad hidrolizante de acetiltiocolina en esas mismas condiciones operacionales fue inhibida por PV mediante una inhibición competitiva ($k_m = 0.09-0.11$ mM, $k_i = 1.7-2.2$ mM).

La actividad PVasa E β (actividad PVasa resistente a 25 μ M mipafox) no fue afectada por la presencia de acetiltiocolina, mientras que la actividad hidrolizante de acetiltiocolina resistente a 25 μ M de mipafox sí mostró inhibición competitiva en presencia de PV ($k_m = 0.05-0.06$ mM, $k_i = 0.44-0.58$ mM).

La actividad PVasa E γ (actividad PVasa resistente a paraoxon) no fue incluida en el estudio debido a que, a las concentraciones de paraoxon establecidas, la actividad AChE estaba totalmente inhibida.

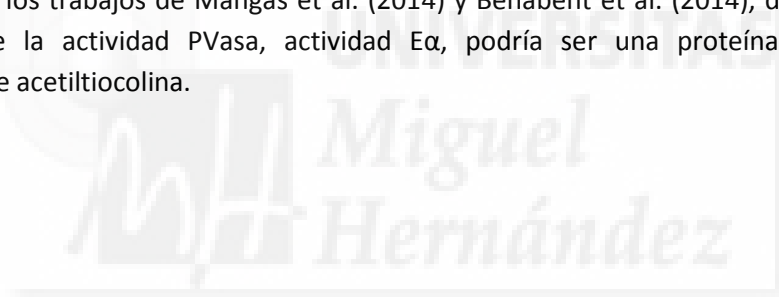
En ese trabajo se utilizó inhibidores selectivos de AChE o butirilcolinesterasa en actividad PVasa. Los resultados de todo ese trabajo sugirieron que la actividad E α , podría ser butirilcolinesterasa, una proteína con actividad hidrolizante de acetiltiocolina.

3. Objetivos

El objetivo general es estudiar el perfil de actividad hidrolizante de acetiltiocolina en las proteínas separadas por cromatografía de exclusión molecular en fracción soluble de cerebro de pollo.

3.1. Objetivos específicos

- 1.- Estudiar, mediante HPLC de exclusión molecular, la distribución de la actividad fenilvalerato esterasa frente al volumen de elución en fracción soluble de cerebro de pollo.
- 2.- Estudiar, mediante HPLC de exclusión molecular, la distribución de la actividad acetilcolinesterasa frente al volumen de elución en fracción soluble de cerebro de pollo.
- 3.- Establecer si existe o no relación entre los perfiles de actividades PVasa y AChE del perfil cromatográfico de exclusión molecular y si los resultados apoyan o no los resultados mostrados en los trabajos de Mangas et al. (2014) y Benabent et al. (2014), donde se sugirió que parte de la actividad PVasa, actividad E α , podría ser una proteína con actividad hidrolizante de acetiltiocolina.



4. Materiales y métodos

4.1. Tampones de uso habitual

Tris pH 7.5 (tris(hidroximetil)aminometano 50 mM / EDTA 1 mM / HCl, pH 8.0); Se preparó disolviendo tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y ácido elitendiaminotetraacético (EDTA) en agua destilada. El pH se ajustó a 7.5 con HCl concentrado y se conservó a temperatura ambiente. Se utilizó como eluyente en el cromatógrafo. Fue necesaria su filtración antes de su uso, con un filtro de 0.1 μm .

Tris pH 8 (tris(hidroximetil)aminometano 50 mM / EDTA 1 mM / HCl, pH 8.0); Se preparó disolviendo Tris y EDTA en agua destilada. El pH se ajustó a 8.0 con HCl concentrado y se conservó a temperatura ambiente.

Tampón fosfato (dihidrofosfato de sodio monohidratado 0.1 M / EDTA 1 mM, pH 7.4); Se preparó disolviendo dihidrofosfato de sodio monohidratado y EDTA en agua destilada. El pH se ajustó a 7.4 con NaOH concentrado y se conservó a temperatura ambiente.

4.2. Equipos utilizados

Cromatógrafo de alta resolución

Para el proceso de purificación de proteínas se utilizó un equipo UFLC Shimadzu. El equipo estuvo dotado de un inyector automático, un sistema de flujo y un detector de longitud de onda ultravioleta/visible (UV/VIS). Los cromatogramas fueron registrados y analizados por el programa de ordenador LabSolution.

También se provisionó con una columna de 300 x 7.8 mm BioSep-SEC-s3000 (part no: 00h-2146-KO), para la realización de una cromatografía de exclusión molecular, a través de la cual se eluyó la muestra y esta se recolectó, tras su paso por el detector, en un colector automático de fracciones modelo SIL-20AHT / 20AHT controlado desde el software del cromatógrafo.

Estación automatizada Biomek 2000

Se utilizó la estación de trabajo Biomek 2000 (Beckman-Coulter) para realizar las medidas de actividades enzimáticas mediante microensayo. Se utilizó este equipo con el fin de minimizar el consumo de muestra, permitiéndose además mediante la automatización, la realización simultánea de un número elevado de muestras.

Se equipó con pipetas (8x) con capacidad entre 20-200 μl , un accesorio de aluminio termostático para 8x12 minitubos de 1 ml con un controlador de temperatura electrónico y una microplaca de 96 pocillos para la lectura fotométrica.

Lector de placas

Para la lectura fotométrica se utilizó el lector de placas AD 340 C (Beckman Coulter).

Centrífugas

Se utilizó una ultracentrífuga Optima LE 80 K con un rotor 70 Ti de Beckman Instruments (España) para el fraccionamiento subcelular.

También se utilizó la centrifuga Allegra™ 21R de Beckman Instruments para concentrar la muestra.

4.3. Preparación del tejido

Obtención del material biológico

El material biológico que sirvió de base para la realización de los experimentos fue cerebro de pollo de edad comprendida entre 38 y 45 días y peso aproximado de 3 kilogramos cuya disección se describe más adelante. Para la realización de los experimentos fue necesaria la obtención de muestras de 15 pollos.

Los cerebros se obtuvieron de pollos de uso comercial (*Gallus domesticus*) y fueron proporcionados por un matadero industrial de aves. Inmediatamente después de sacrificar a los animales eran transportados en frío hasta el laboratorio donde se obtenían las cabezas y se procedía a la disección y extracción del cerebro.

Las muestras de cerebro, se obtuvieron a partir de pollos cuyo proceso de sacrificio fue, el aturdimiento por baño eléctrico de alrededor de 10 segundos. Y desangre durante aproximadamente 3 minutos.

Disección y homogeneización del tejido

Se extrajo el cerebro tras separar las meninges y se desechó la parte proximal de la médula que permanecía unida al tallo cerebral tal y como se observa en la **figura 4.1**. El cerebro se mantuvo en tampón Tris a pH 8 a una temperatura de entre 0 y 5°C durante no más de 1 hora hasta su homogeneización. El homogeneizado se preparó a una concentración de tejido de 200 mg/mL en tampón Tris pH 8. En el proceso de homogeneización se utilizó el Politron (Kinematica GmbH, Alemania) con una sonda PTA 10 S a un 70% de su potencia (durante 3 ciclos a 30 segundos).



Figura 4.1. Extracción de cerebro. La figura muestra el cerebro de pollo una vez extraído tras separar las meninges, tal y como se detalla en Materiales y métodos, apartado 4.3, Disección y homogeneización del tejido.

Fraccionamiento subcelular

Se usó una versión modificada del método desarrollado por Escudero et al. (1995), para el fraccionamiento del tejido. El tejido homogeneizado a pH 8 fue centrifugado, por la ultracentrífuga Optima LE 80 K, a 100000 x g durante 60 min (4°C) para obtener el sobrenadante final o fracción soluble (S), el cual se llevó al volumen original del homogeneizado con tampón Tris pH 8. Tal y como indica la **figura 4.2**.

La fracción soluble se alicuotó en crioviales a la concentración equivalente al material procedente de 200 mg/mL de tejido fresco original y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

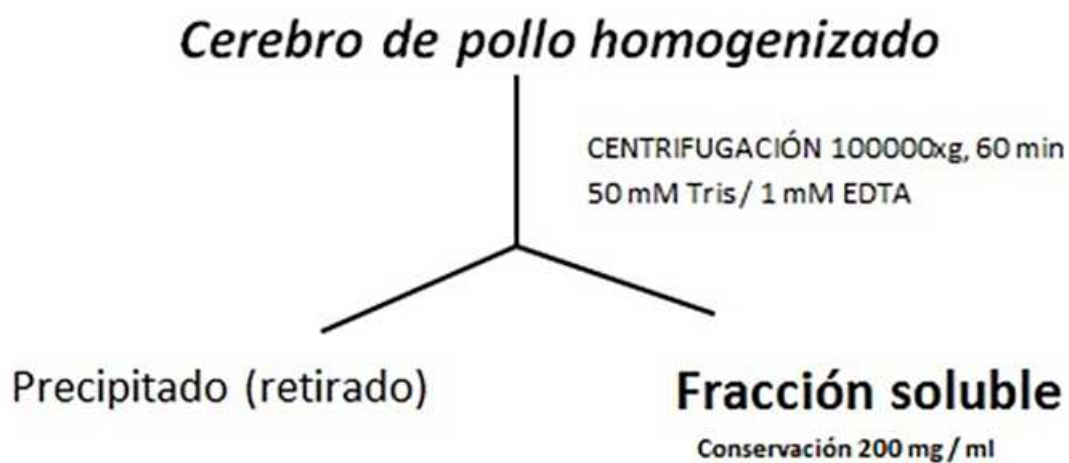


Figura 4.2. Esquema del método fraccionamiento subcelular de cerebro de pollo.

Ultrafiltración para concentrar la proteína

Se filtró un volumen de 5 ml de fracción soluble de cerebro de pollo, con una concentración de 200 mg/ml, a través de los filtros Ultracel-Amicon Ultra-15 (Milipore Corporation, Spain, tamaño de poro de 10 kDa). Se utilizó la centrifuga Allegra™ 21R, a 4000 x g a 4°C, para concentrar las muestras hasta un volumen de 1600 mg/ml en el tiempo requerido. En este caso se utilizó muestras de fracción soluble de cerebro de pollo que inicialmente se encontraban a una concentración de 200 mg/ml. La concentración final fue de 1600-1700 mg/ml. Posteriormente el volumen resultante fue filtrado a través de los filtros Anallypore, PES-Membran de 0.2 μM e introducido en los viales del cromatógrafo.

Fraccionamiento

Se realizó una cromatografía semipreparativa líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), en un equipo UFLC Shimadzu con recolector de fracciones a 4°C, como se indica a continuación.

La técnica utilizada para la separación y caracterización de sustancias fue la **cromatografía de exclusión molecular**. La temperatura requerida para la realización de ésta fue a 4°C en una columna de 300 x 7.8 mm BioSep-SEC-s3000 (part no: 00H-2146-KO), utilizando como buffer Tris 50 mM / EDTA 1 mM pH 7.5. Se realizó una inyección por cada experimento de 200 μl durante el proceso de cromatografía de exclusión molecular. La muestra se eluyó a través de la columna utilizando Tris 50 mM / EDTA 1 mM pH 7.5 a una velocidad de elución de 1 ml/min. Se obtuvieron 28 x 0.5 ml fracciones por cada inyección. Las fracciones fueron recolectadas en tubos de ensayo. Durante el proceso, constantemente, se midió la absorbancia a 280 nm.

El volumen muerto se determinó por el volumen de elución de Azul de dextrano ($V_M = 5.187$ ml). El volumen de elución de la anhidrasa carbónica ($V_e = 11.963$) la cual se utilizó para calcular el volumen de inclusión ($V_i = V_e - V_M = 6.776$). La columna se calibró utilizando un estándar de proteínas (Gel Filtration Markers Kit-Sigma Aldrich para proteínas de 29 kDa a 700 kDa); Albúmina de suero bovino (BSA), (66,000 kDa); Tiroglobulina bovina, (669,000 kDa); Alcohol deshidrogenasa, (150,000 kDa); β-amilasa, (200,000 kDa); Anhidrasa carbónica, (29,000 kDa); Azul dextrano, (2,000,000 kDa). Los pesos moleculares fueron calculados realizando comparaciones con la curva de calibrado usando un estándar de proteínas (MW-GF-1000 Kit, Sigma Chem. Co.) y comparando el logaritmo del peso molecular, $\log(PM)$, con el coeficiente de distribución ($k_D = V_e / V_o$) en una gráfica. El resultado fue una gráfica lineal (ver **figura 4.3**).

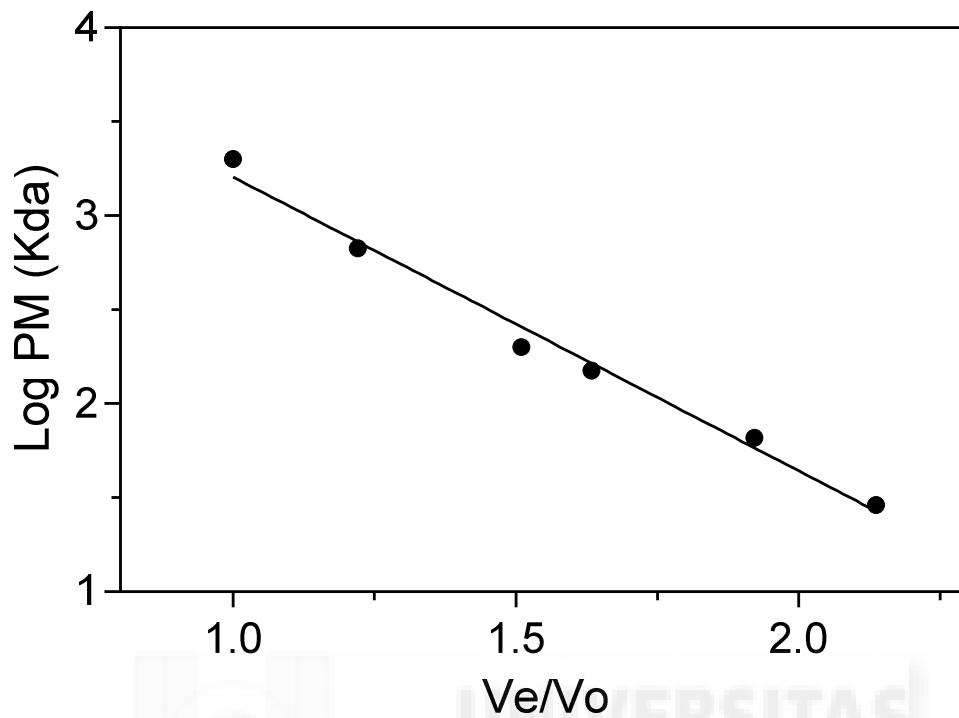


Figura 4.3. Curva de calibrado de la columna cromatográfica. Se realizó una cromatografía de exclusión molecular a 4°C en una columna BioSep-SEC-s3000, con buffer Tris 50 mM pH 7.5. La columna se calibró usando un estándar de proteínas (Gel Filtration Markers Kit-Sigma Aldrich para proteínas de 29-700 kDa) y se representó en log (PM) contra (kD). Albúmina de suero bovino 66,000 PM; Alcohol deshidrogenasa, 150,000 PM; β-amilasa, 200,000 PM; Azul de dextrano, 2,000,000 PM; Anhidrasa carbónica, 29,000 PM; Tiroglobulina bovina, 669,000 PM. El coeficiente de correlación fue 0.977.

La **figura 4.4** muestra un diagrama del proceso de fraccionamiento. El método de preparación consiste en dos etapas, las cuales se encuentran descritas detalladamente en el apartado de Materiales y métodos:

1. Fraccionamiento subcelular: ultracentrifugación y ultrafiltración.
2. Cromatografía semipreparativa de alta resolución de exclusión molecular.

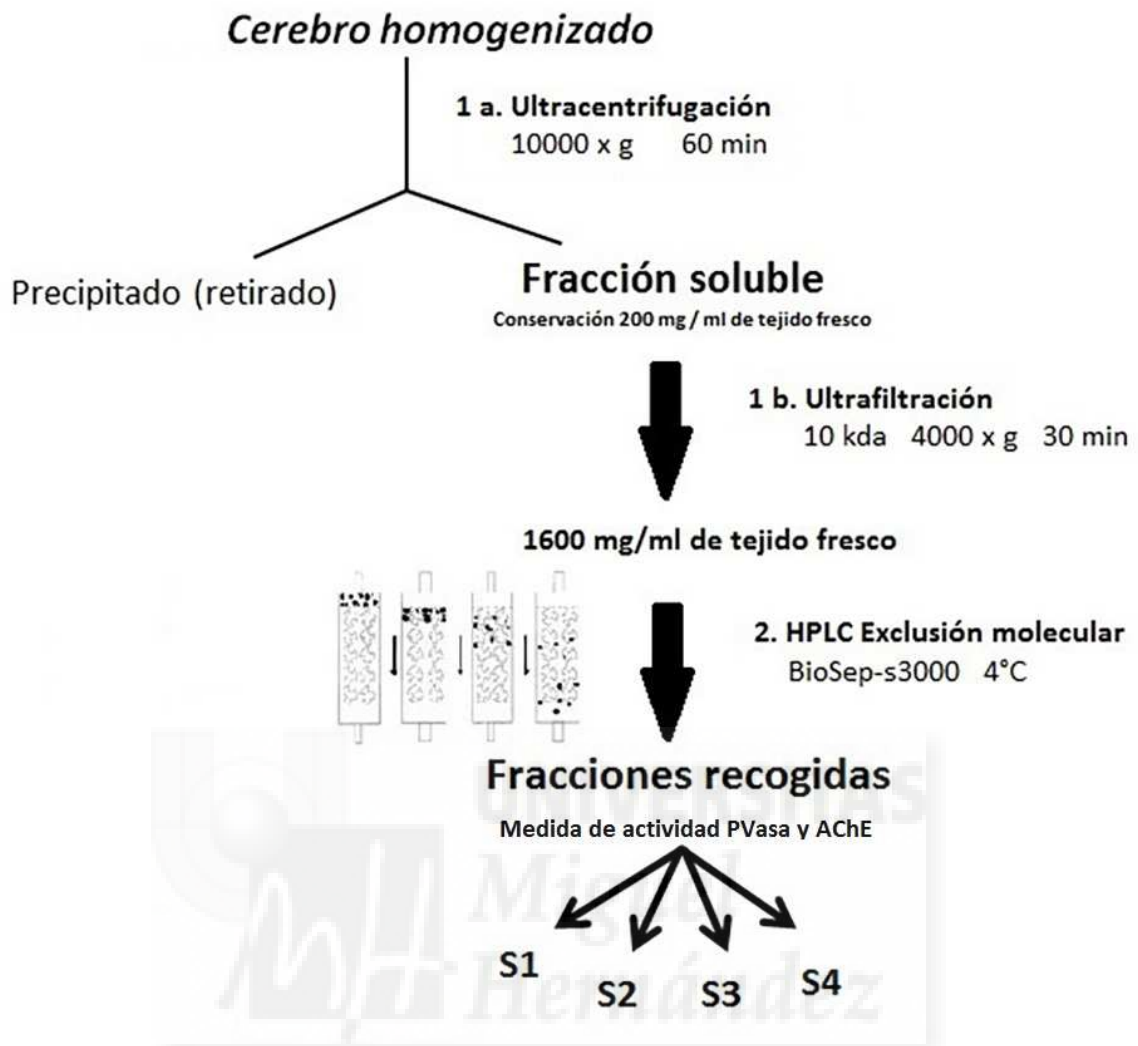


Figura 4.4. Proceso de fraccionamiento de esterasas solubles en cerebro de pollo. Un volumen de 5 ml de fracción soluble de cerebro de pollo (a una concentración de 200 mg tejido fresco/ml) fue descongelado a temperatura ambiente (1) y fue concentrado por ultrafiltración con un filtro Miliporo de 10 kDa a 4°C, hasta un volumen de 0.625 ml. Se realizó una cromatografía de exclusión molecular en HPLC (2). El procedimiento se desarrolló a 4°C en 300 x 7.8 mm BioSep-SEC-s3000. Después de realizar una inyección de 200 µL, con el buffer de elución 50 mM Tris / 1 mM EDTA pH 7.5, y con una velocidad de elución de 1 ml/min se obtuvieron 28 x 0.5 ml fracciones en cada una de las inyecciones. Después de analizar la actividad PVasa y AChE en estas fracciones, se distribuyeron en cuatro subfracciones llamadas, S1, S2, S3, S4.

4.4. Medida de actividad fenilvalerato esterasa

Disoluciones preparadas

Fenilvalerato (PV). Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA). Para los ensayos de actividad se preparó una disolución concentrada de 30 mg/ml (150 mM) en N,N-dimetilformamida (DMF) y se conservó en nevera a 4°C, siendo estable durante meses. Para su utilización como sustrato en los ensayos de medida de actividad PVasa se preparó inmediatamente antes de su uso una dilución 1/30 (v/v) en agua.

Dodecilsulfato sódico (SDS) y 4 aminoantipirina (AAP). Se adquirieron de grado analítico de proveedores locales. Se preparó una disolución de SDS 2% - AAP 0.25 mg/ml en tampón Tris 50 mM / EDTA 1 mM a pH 8.0. Se conservó a temperatura ambiente en botella de topacio para evitar la degradación de la AAP, ya que es fotosensible.

Ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$). Se adquirió de grado analítico de proveedores locales. Se preparó una disolución al 1% en agua destilada y se conservó a temperatura ambiente.

Microensayo de actividad fenilvalerato esterasa

Todo el proceso se llevó a cabo automáticamente usando la estación automatizada Biomek 2000, programada por el software de la misma. El proceso fue el siguiente, tal y como indica la **figura 4.5**:

El proceso se realizó en un accesorio de aluminio termostatzado, ya que la temperatura idónea para la reacción enzima-sustrato es de 37°C. Se dispuso en los minitubos 100 µl de muestra de las 28 fracciones recogidas por el cromatógrafo, se añadieron 100 µl de preparación de sustrato (PV 0.97 mg/ml en agua destilada, preparado a partir de una solución concentrada de 30 mg/ml en DMF). La mezcla de reacción (200 µl) se incubó durante 10 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo 100 µl de una solución que contenía SDS 2% / AAP (0.25 mg/ml). Posteriormente se añadió 50 µl de $K_3Fe(CN)_6$ (40 mg/ml en agua destilada). 350 µl de la mezcla fueron transferidos automáticamente a una microplaca de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 510 nm. Controles de hidrólisis espontánea (muestras sin tejido) fueron incluidos en el mismo proceso automatizado. Además se preparó dos controles con la muestra inyectada en el cromatógrafo, la cual se encontraba a una concentración de 1600-1700 mg/ml, pero para evitar la saturación de la reacción fue necesaria una dilución, la cual fue de 75 veces (8.66 µl de control en 641.33 µl de tampón Tris 50 mM a pH 7.5). La actividad en nmol/min fue calculada a partir de la curva de calibrado hecha con estándares de fenol. El método colorimétrico utilizado está basado en el método de medida de fenol adaptado por Jonhson (1977) para el ensayo de NTE.

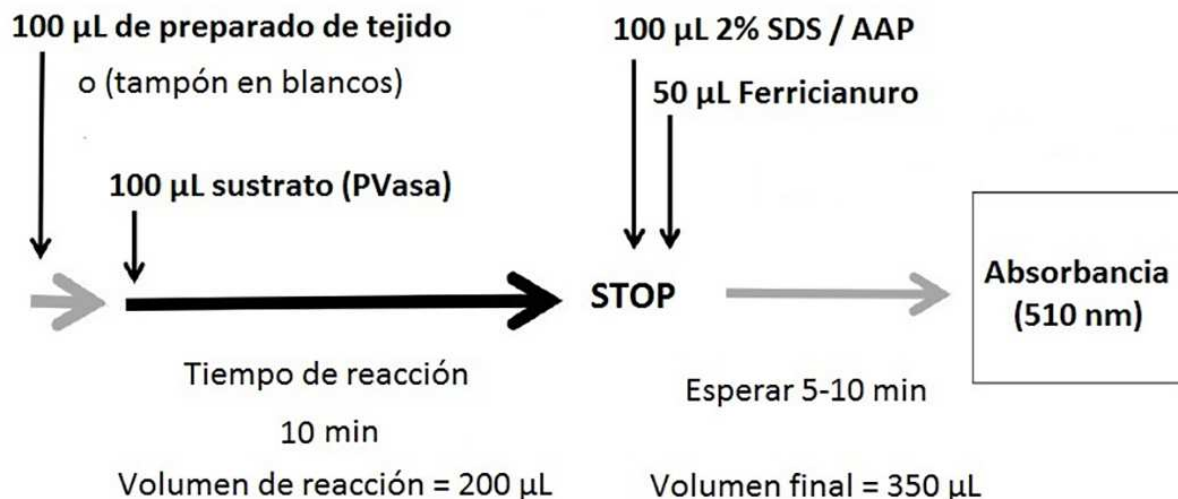


Figura 4.5. Esquema del proceso utilizado para la medida de actividad fenilvalerato esterasa.

Observando la **figura 4.7** se puede comprobar visualmente cómo será el perfil de actividad PVasa, una vez medidas las absorbancias, ya que las fracciones con tonos rojos más elevados son las que tienen una actividad mayor.

Curva calibrado del método colorimétrico

Se realizó una curva de calibrado del método colorimétrico basado en el método de medida de fenol adaptado por Johnson (1977) para el ensayo de NTE. Se realizó utilizando 4 concentraciones crecientes de fenol preparadas en agua a partir de una concentración de 1 mM (200-150-100-50 µM).

Se utilizaron las diluciones preparadas a las diferentes concentraciones de fenol de medida de PVasa. A 200 µl del estándar de fenol se le añadieron 100 µl de SDS 2% / AAP para parar la reacción y 50 µl de ferricianuro potásico para un volumen final de 350 µl. Se midió la absorbancia de cada una de las muestras y los resultados se ajustaron al mejor modelo.

4.5. Medida de actividad acetilcolinesterasa

Disoluciones preparadas

Yoduro de acetiltiocolina (ActCh). (Pureza superior al 98%) Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S. A. (Madrid, España). Para su utilización como sustrato en los ensayos de medida de actividad acetilcolinesterasa se preparó inmediatamente antes de su uso a una concentración de 2.1 mM (en agua ultrapura) para minimizar su degradación por hidrólisis espontánea.

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 6 mM en tampón fosfato 0.1 M / EDTA 1 mM, pH 7.4 y se conservó a temperatura ambiente en botella de topacio para evitar la degradación del DTNB, ya que es fotosensible.

Microensayo de actividad colinesterasa

Todo el proceso se llevó a cabo automáticamente usando la estación automatizada Biomek 2000, programada por el software de la misma. El microensayo está basado en el ensayo descrito por Benabent et al. (2014) tal y como detalla la **figura 4.6**.

El proceso se realizó en un accesorio de aluminio termostatzado, ya que la temperatura idónea para la reacción enzima-sustrato es de 37°C. Se dispuso en los minitubos 100 µl de muestra de las 28 fracciones recogidas por el cromatógrafo, 100 µl de tampón fosfato para los blancos. Se añadieron 100 µl de preparación de sustrato (acetiltiocolina 2.1 mM en agua ultrapura). La mezcla de reacción (200 µl) se incubó durante 10 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo 100 µl de una solución que contenía SDS al 2% y 6 mM de DTNB en tampón fosfato. Posteriormente se añadió 100 µl de tampón fosfato para las muestras y 100 µl de la preparación de tejido a los blancos. 300 µl de la mezcla fueron transferidos automáticamente a una micro placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia (la reacción entre tiocolina y DTNB produce 2-nitro-5-mercaptobenzoato, un compuesto amarillo que puede medirse a 405 nm). Además se preparó dos controles con la muestra inyectada en el cromatógrafo, la cual se encontraba a una concentración de 1600-1700 mg/ml, pero para evitar la saturación de la reacción fue necesaria una dilución, la cual fue de 75 veces (8.66 µl de control en 641.33 µl de tampón Tris 50 mM a pH 7.5) y se le aplicó el mismo tratamiento que a las muestras con tejido. La actividad en nmol/min fue calculada a partir de la curva de calibrado hecha con estándares de tiocolina.

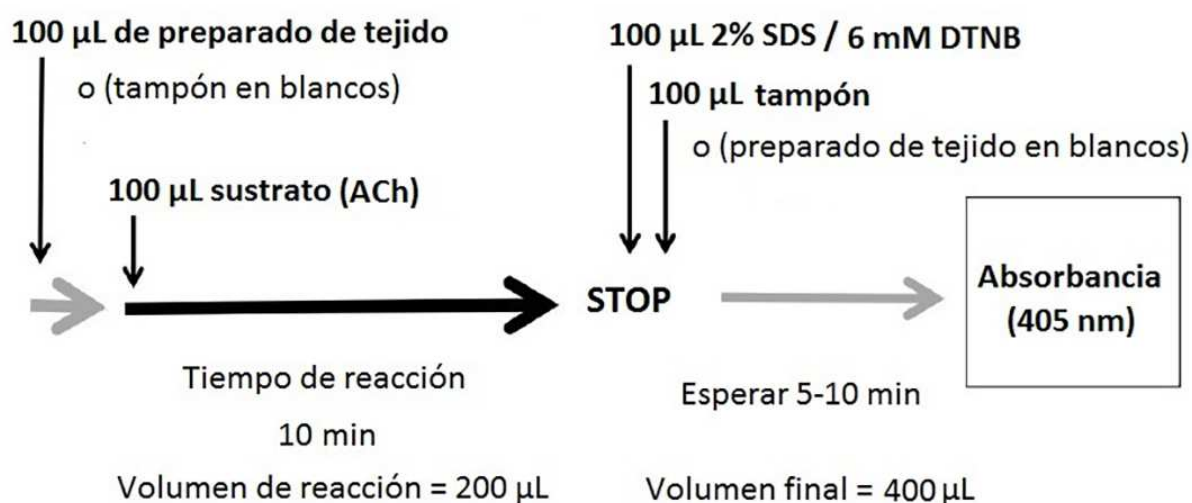


Figura 4.6. Esquema del proceso utilizado para la medida de actividad colinesterasa.

De igual forma que ocurre con PVasa, en la **figura 4.7**, se puede observar los pocillos con más actividad AChE con un tono amarillento más intenso, aproximadamente desde E6 hasta E7.

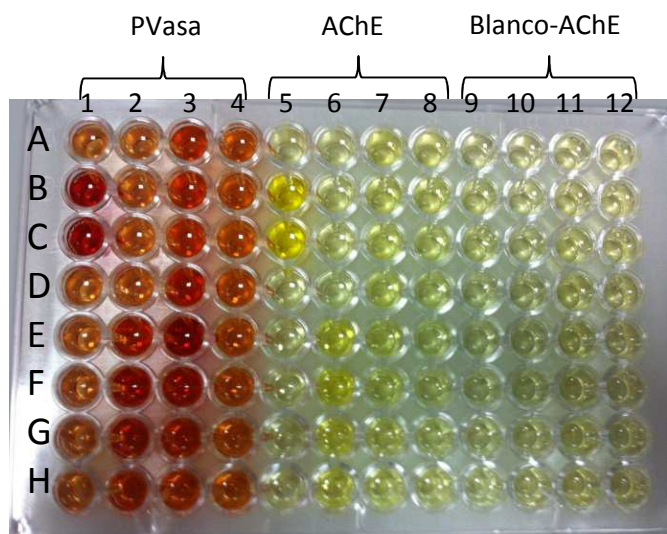


Figura 4.7. Microensayo de actividad fenilvalerato esterasa y actividad colinesterasa. Se muestra una placa de ensayo de 96 pocillos. El proceso está realizado en la estación automatizada Biomek 2000. La explicación del proceso se encuentra detallada en Materiales y métodos, apartados 4.5 y 4.6. La actividad **PVasa** está ensayada en los pocillos A1 - H4. A1 es el blanco, con ausencia de PV. **AChE**, se corresponde con los pocillos A5 - H8. Por último tenemos **Blanco-AChE**, donde el tejido se añade al final del proceso.

Curva calibrado del método colorimétrico

Se realizó una curva de calibrado del método colorimétrico basado en el método de medida de tiocolina descrito por Benabent et al. (2014). Se realizó utilizando 4 concentraciones crecientes de tiocolina preparadas en agua a partir de una concentración de 0.93 mM (0.09-0.14-0.18-0.23 mM).

A 220 ml del estándar de tiocolina se le añadieron 200 ml de tampón fosfato a 37°C. Después de 10 min se añadió 200 ml de SDS 2% / 6mM DTNB, y se le añadió 200 ml de tampón fosfato / BSA para un volumen final de 820 µl. Se midió la absorbancia a 410 nm de cada una de las muestras.

4.7. Medida de proteína

Las determinaciones de cantidad de proteína se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976). Para la determinación de proteína se utilizó Reactivo de Bradford, ya preparado, con no más de dos meses de antigüedad y se conservó a temperatura ambiente.

El método fue modificado y adaptado para microensayo. Se añadieron 60 μl de agua MiliQ en una microplaca de 96 pocillos, después 10 μl de muestra de las 28 fracciones recogidas por el cromatógrafo, las cuales se mezclaron con el agua. Posteriormente, se añadieron 180 μl de disolución de reactivo de Bradford y después de 5 min se midió la absorbancia a 620 nm con el lector de microplacas. Este proceso se realizó por duplicado, además se preparó blancos, utilizando Tris a pH 7.5. También se realizó el mismo proceso para la muestra control, diluida 75 veces, tal y como se indica en los apartados de medida de actividades.

Diferentes patrones con BSA de concentraciones conocidas y blancos se incluyeron en el proceso. La cantidad de proteína se calculó usando la curva de calibrado con BSA. Se realizó utilizando tres concentraciones crecientes de BSA preparadas en agua a partir de una concentración de 50 mg/ml (15, 30, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se utilizaron 70 μl de estas preparaciones y se les añadió 180 μl de Bradford. El proceso se realizó por triplicado y además se usó un blanco con 70 μl de agua. Posteriormente, se midió la absorbancia a 620 nm.

Tal y como muestra la **figura 4.8**, se puede observar las fracciones que presentan mayor cantidad de proteína de un color azul más intenso, de la A3 a la F3, ya que el colorante Azul Brillante Coomasie se une a la proteína generando este color.

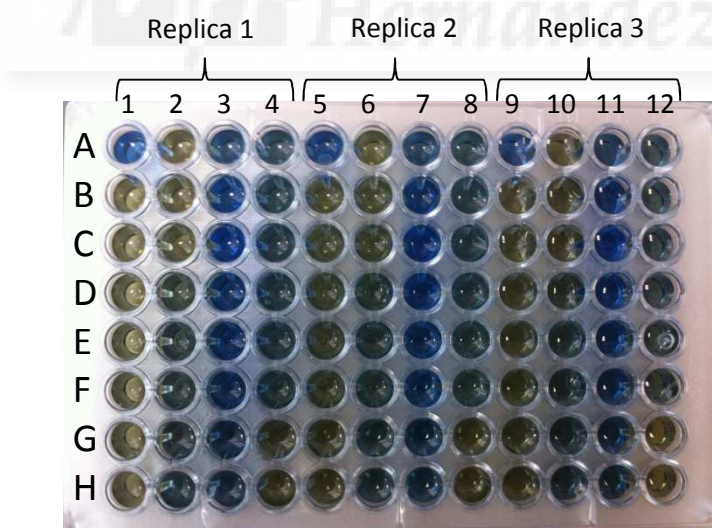


Figura 4.8. Microensayo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Se muestra una placa de ensayo de 96 pocillos. La explicación del proceso se encuentra detallada en Materiales y métodos, apartado 4.7. Se realizó la medición de proteínas, de las muestras recogidas por el cromatógrafo, por el método de Bradford y por triplicado. A1 muestra el control realizado, donde se observa una tonalidad azul más intensa. B1 muestra el blanco, sin muestra de proteínas. Y partir de C1 hasta G4 podemos observar las 28 fracciones recogidas con el cromatógrafo.

5. Resultados

5.1. Método automatizado en microensayo de actividad fenilvalerato esterasa y colinesterasa

Curva de calibrado del método colorimétrico de actividad fenilvalerato esterasa

La **figura 5.1** muestra la curva de calibrado con estándares de fenol y las condiciones descritas en el apartado de Materiales y métodos con el fin de establecer la actividad PVasa en nmol/min por mg de tejido fresco. El método colorimétrico se basó en el método de medida de fenol, adaptado al ensayo de NTE, de Johnson et al. (1977). Los parámetros de regresión resultantes fueron $y_0 = -0.4354$, $m = 184.91$ y $R^2 = 0.9997$.

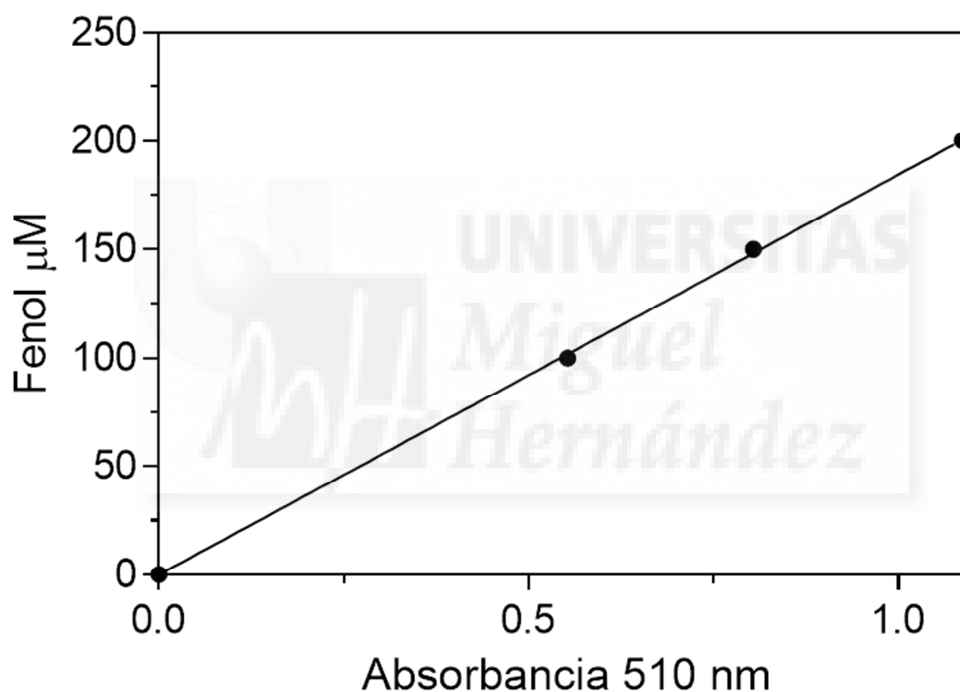


Figura 5.1. Curva de calibrado de fenol. 200 μ l de fenol fueron incubados a 37°C en 10 min. Posteriormente fueron añadidos 100 μ l de SDS 2% / AAP y 50 μ l de ferricianuro. Las absorbancias se midieron a 510 nm. La gráfica muestra las absorbancias corregidas con los blancos (una solución sin fenol, pero que si contiene el resto de componentes descritos).

Curva de calibrado del método colorimétrico de actividad colinesterasa

La **figura 5.2** muestra los resultados obtenidos. Se añadió un volumen de 220 ml de tampón de fosfato y 200 ml de SDS al 2% / 6 mM DTNB a 200 ml de la solución de tiocolina indicada en el apartado de Materiales y métodos. Se midió la absorbancia a 410 nm. La **figura 5.2** muestra que la absorbancia a 410 nm es directamente proporcional a la concentración de tiocolina (a 0.93 mM).

Los parámetros de regresión lineal fueron $y_0 = 0.569$, $m = 10.668$ y $R^2 = 0.9951$. La gráfica muestra la diferencia de absorbancia cuando es corregida con los blancos (una solución sin tiocolina, pero que si contiene el resto de componentes descritos). Los parámetros de regresión resultantes fueron $y_0 = 0.016$, $m = 10.514$ y $R^2 = 0.9994$.

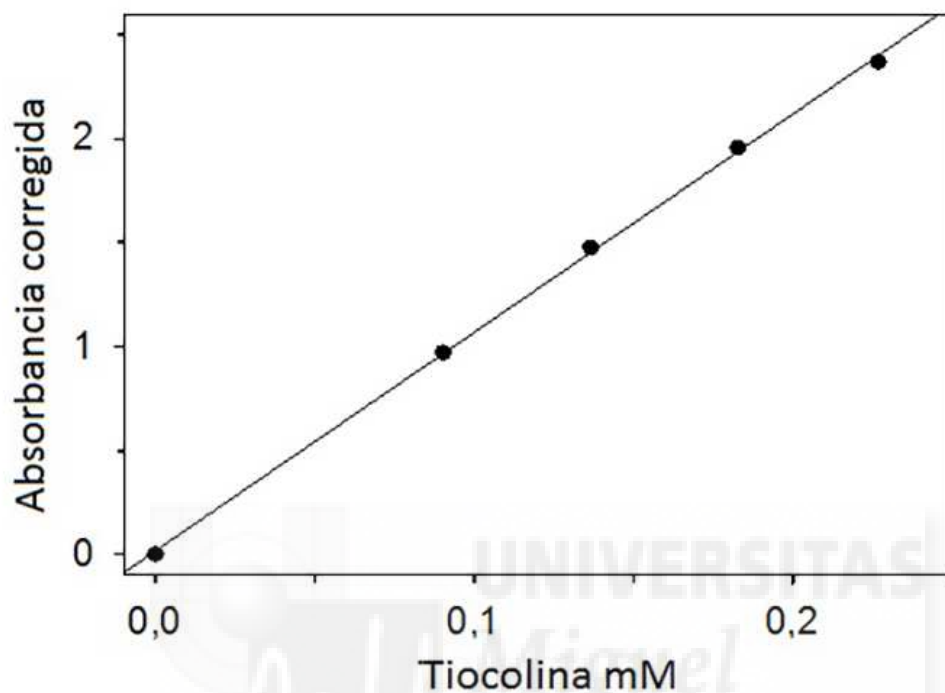


Figura 5.2. Curva de calibrado de tiocolina. 220 ml de tiocolina fueron incubados a 37°C en 10 min con 200 ml de tampón fosfato. Posteriormente fueron añadidos 200 ml de SDS 2% / 6mM DTNB. Además se añadió 200 ml de tampón fosfato / BSA. Las concentraciones de tiocolina para un volumen de 820 ml fueron 0, 0,09, 0,14, 0,18 y 0,23mM Las absorbancias se midieron a 410 nm.

5.2. Perfil cromatográfico de exclusión molecular en fracción soluble de cerebro de pollo

Se realizaron tres experimentos individuales. Se obtuvieron tres perfiles cromatográficos de absorbancia 280 nm, proteínas y actividad PVasa y AChE. Los perfiles cromatográficos fueron muy parecidos en todos los experimentos.

La **tabla 5.1** indica los valores de purificación para cada uno de los componentes enzimáticos.

Fracción	Volumen (ml)	Actividad (nmol/min)/actividad específica (U/mg) Factor de purificación		Proteína (mg)
		PVasa	AChE	
1. Extracto soluble	0.2	176.9/6.5	5770.1/210.6	27.4
2. S1	2.5	21.3/13.6 2.1	809.7/515.7 2.4	1.6
3. S2	2	30.5/5.9 0.9	462.8/90.0 0.4	5.1
4. S3	2	37.9/6.1 0.9	292.4/46.9 0.2	6.2
5. S4	4	19.4/5.1 0.8	444.9/113.2 0.5	3.8
6. Total		109.1	2009.7	16.8
Rendimiento (%)		61.7	34.8	61.2

Tabla 5.1. Valores de purificación para el fraccionamiento de la actividad de fenilvalerato esterasa y acetilcolinesterasa por cromatografía en fracción soluble de cerebro de pollo. Se preparó 10 mg de tejido concentrado por ultrafiltración. Se indica la actividad (nmol/min), la actividad específica (U/mg) y el factor de purificación en relación con el extracto soluble original.

Perfil de actividad fenilvalerato esterasa

La **figura 5.4** muestra el perfil de actividad de fenilvalerato esterasa de las 28 fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular, muestra cuatro picos perfectamente diferenciados. El primero de ellos muestra su máximo de actividad a un volumen de 5.5 ml con un coeficiente de distribución (kD) igual a 1.06, por lo que el peso molecular (PM) resultante es aproximadamente 1201 kDa. El segundo de ellos muestra su máximo a 7.5 ml con kD = 1.45 y PM es de aproximadamente 332 kDa. El tercer pico que se observa, tiene su máximo punto de actividad a un volumen de elución de 9 ml y es el pico que presenta mayor actividad (nmol fenol/min/ml) con kD = 1.74 y PM es aproximadamente 126 kDa.

Las diferentes fracciones se reunieron, después de considerar la actividad total del perfil PVasa, en cuatro subfracciones: S1, S2, S3, S4. La fracción S1 de Ve de 4.5 ml a 6.5 ml, un pico se encuentra a 5.5 ml; la fracción S2 de Ve de 6.5 ml a 8.5 ml, un pico se encuentra a 7.5 ml; la fracción S3 de Ve de 8.5 ml a 10.5 ml, un pico se encuentra a 9 ml; la fracción S4 de Ve de 10.5 a 14.5, sin pico característico. Observando la **figura 5.5** se puede distinguir esta separación en subfracciones.

De la **tabla 5.1**, podemos extraer que el rendimiento de la actividad PVasa total es del 62% aproximadamente. Además la fracción S3 presenta la mayor actividad PVasa, 38 nmol/min. Sin embargo, el factor de purificación presenta su máximo en la fracción S1, el cual fue de 2.1.

Perfil de actividad acetilcolinesterasa

La **figura 5.4** muestra el perfil de actividad acetilcolinesterasa. Esta figura muestra dos picos bien diferenciados de actividad AChE. El primero de ellos presenta su máximo de actividad a un volumen de elución de 5.5 ml con la máxima actividad AChE y un coeficiente de distribución de 1.06 y peso molecular de aproximadamente 1201 kDa. El segundo pico que se observa tiene el máximo a un volumen de 11.5 ml y un $k_D = 2.22$ y un PM de aproximadamente 25 kDa.

En este caso se separaron las diferentes fracciones con el mismo criterio que en el perfil de actividad de PVasa.

Para la actividad AChE se distribuyeron los componentes y el perfil proteico tal y como se indica a continuación: la fracción S1 comienza en un volumen de elución de 4.5 ml hasta 6.5 ml y el pico de actividad se encontró a 5.5 ml. La fracción S2: Ve de 6.5 ml a 8.5 ml, donde no se apreció con claridad ningún pico. La fracción S3: Ve de 8.5 ml a 10.5 ml, donde no se apreció con claridad ningún pico. La fracción S4: Ve de 10.5 a 14.5, donde se encuentra un pico a 11.5 ml. La **figura 5.5** muestra de forma visual esta separación en subfracciones.

La **tabla 5.1** nos indica las características de purificación de las fracciones S1, S2, S3 y S4. Para el perfil de AChE se obtuvo un rendimiento del 35% aproximadamente. Además la máxima actividad se encuentra en la fracción S1 con 810 nmol/min, tal y como se ha comentado anteriormente. Por último, decir, que el factor de purificación presentó su máximo en esta misma fracción, el cual fue de 2.4.

Perfil de proteínas

Se realizó una curva estándar de BSA, esta se muestra en la **figura 5.3**. Las concentraciones de albúmina utilizadas para el método de Bradford y las condiciones del proceso, se encuentran descritas en el apartado de Materiales y métodos. Los parámetros de regresión resultantes fueron $y_0 = -4.2434$, $m = 353.89$ y $R^2 = 0.9648$.

La **tabla 5.1** muestra el contenido en proteínas del control, muestra inyectada en el cromatógrafo para su posterior fraccionamiento por HPLC de exclusión molecular, y de las 28 fracciones obtenidas, agrupadas en las subfracciones S1, S2, S3, S4. Para así, con estos datos calcular el rendimiento de proteínas, que en este caso fue de 61%.

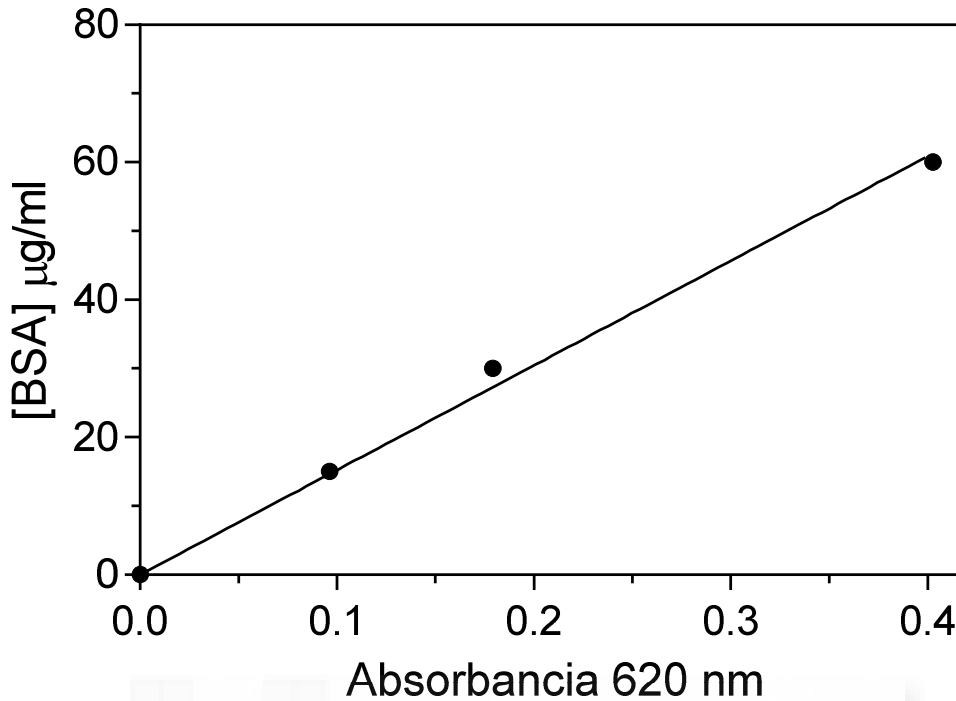


Figura 5.3. Curva estándar de Albumina de suero bovino (BSA) por el método de Bradford. A 70 µl de las preparaciones a distintas concentraciones de BSA, se añadió 180 µl de reactivo Bradford. Tras 5 min de espera se midió la absorbancia a 620 nm. La gráfica muestra las absorbancias corregidas con los blancos (una solución sin BSA).

De la **tabla 5.1**, podemos deducir que la fracción S3 es la fracción que mayor número de miligramos de proteína presenta, 6.24 mg. Lo cual se corresponde con el volumen de elución de 8.5 ml a 10.5 ml del perfil de proteínas mostrado en la **figura 5.4**.

La **figura 5.4** muestra el perfil de proteínas y el perfil de absorbancia a 280 nm de los diferentes cromatogramas realizados.

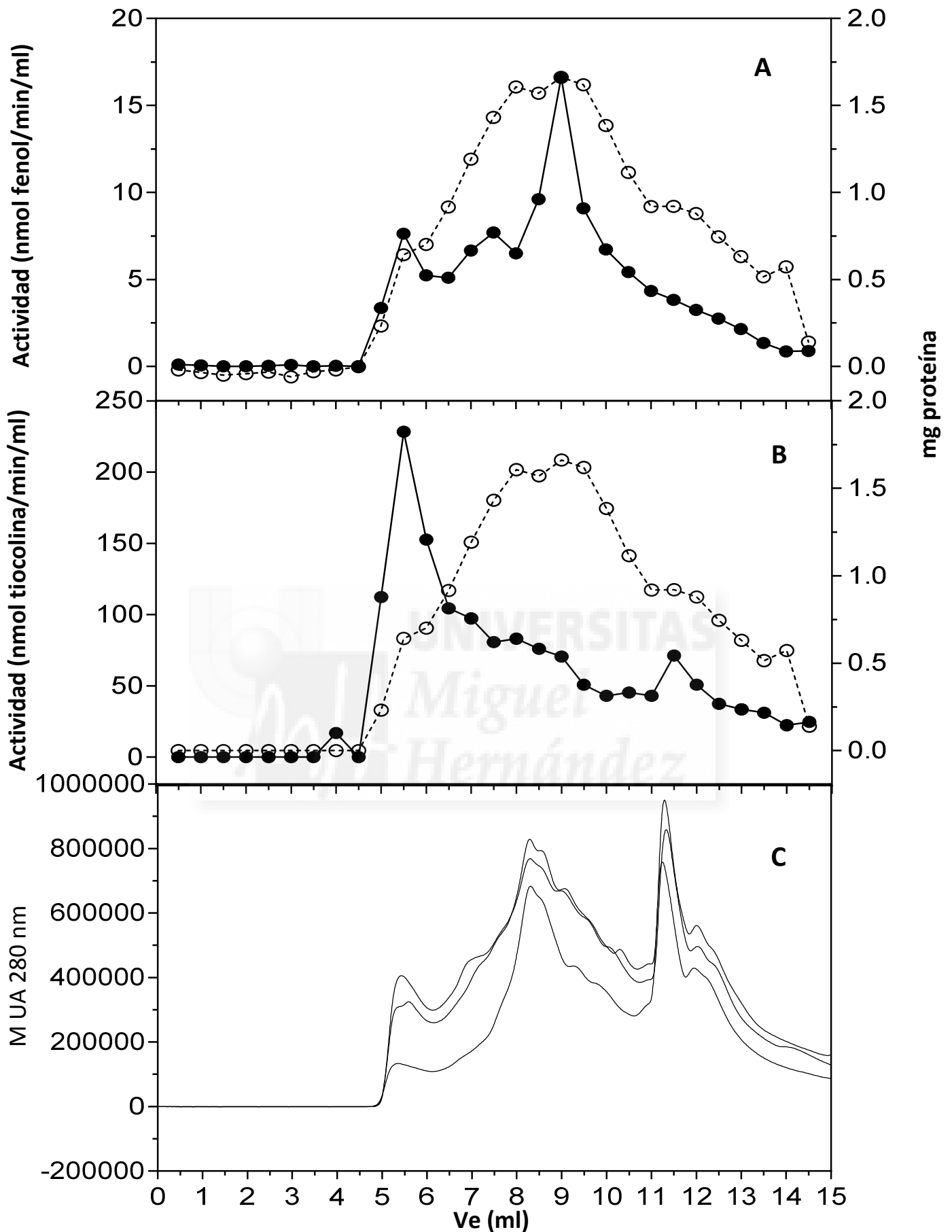


Figura 5.4. Cromatografía de exclusión molecular en una columna BioSep-s3000, de fracción soluble de cerebro de pollo. De las 28 fracciones obtenidas a partir de una cromatografía de exclusión molecular. Actividad **A**: actividad total de PVasa en $\text{nmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$. Actividad **B**: actividad total de AChE en $\text{nmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$. La línea punteada en A y B corresponde con la proteína y se encuentra expresada en mg totales por el método de Bradford. **C** corresponde con la absorbancia (280 nm) de los diferentes cromatogramas realizados.

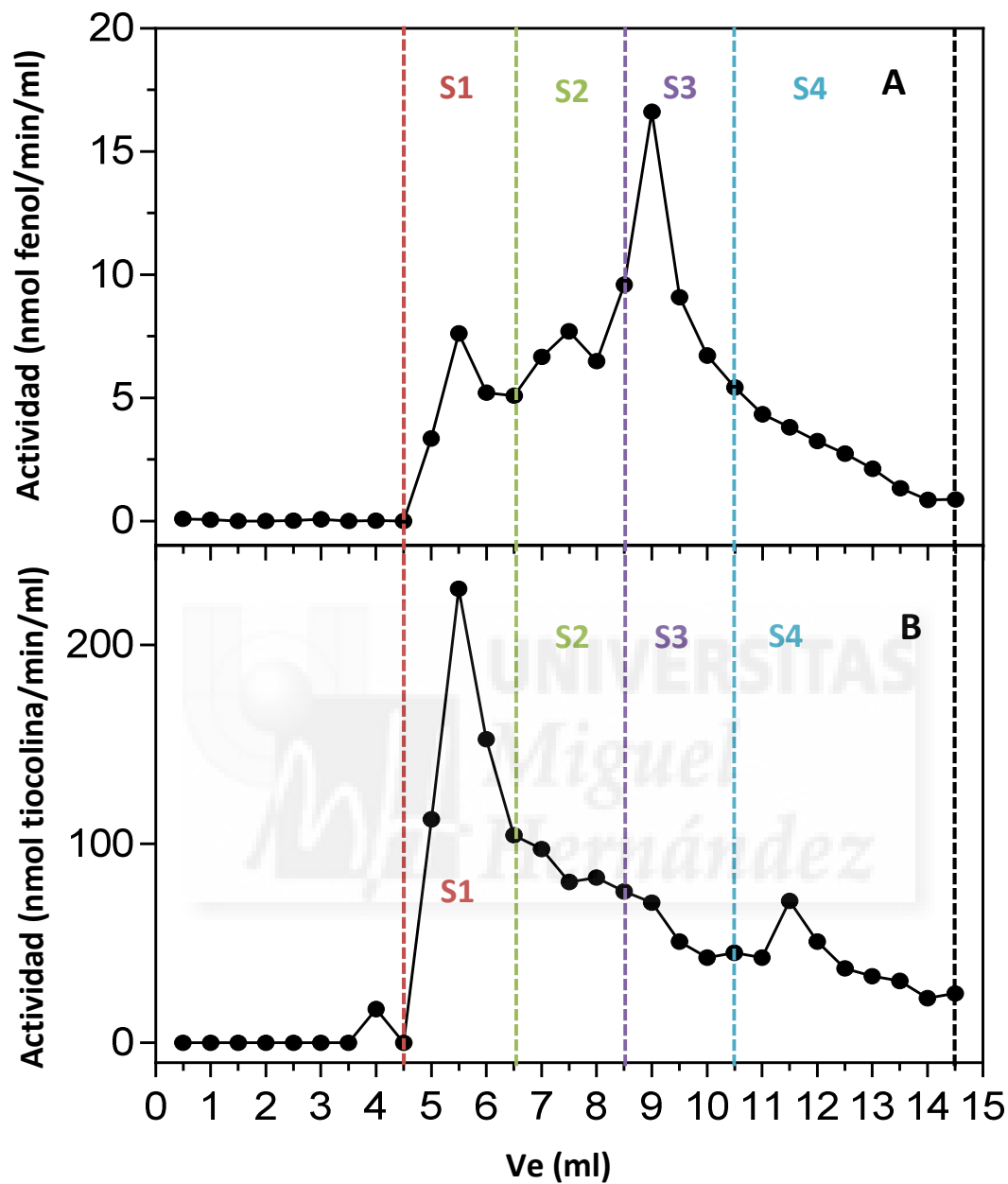


Figura 5.5. En estas gráficas se muestra de forma clara la diferente separación de las 28 fracciones recogidas por el cromatógrafo. **A** se corresponde con la actividad PVasa y **B** se corresponde con la actividad AChE. Se detalla la separación en subfracciones las cuales incluyen los picos más característicos de cada perfil. Ambos perfiles se separaron en cuatro subfracciones, denominadas S1, S2, S3 y S4. Desde la línea discontinua roja hasta la verde se encuentra la fracción S1, desde la línea verde a la morada la fracción S2, de la morada hasta la azul se observa la fracción S3 y de la línea azul hasta la negra se encuentra la fracción S4.

6. Discusión

Las esterasas altamente sensibles a compuestos organofosforados han sido discriminadas cinéticamente en el cerebro de pollo y su inhibición ha sido relacionada con efectos neurotóxicos de dianas moleculares desconocidas (neurotoxicidad a largo plazo del sistema nervioso central, efectos neuroconductuales y efectos neuropsicológicos, potenciación de OPIDN, etc.). Con el fin de vincular estos conjuntos de proteínas muy sensibles a OPs con su relevancia toxicológica y biológica, fue necesario realizar un procedimiento de separación y aislamiento de estas proteínas para identificar molecularmente estas entidades enzimáticas (Mangas et al., 2011, 2012a,b; Estévez et al., 2011, 2012, 2013).

En este trabajo, se ha realizado un prefraccionamiento por HPLC de exclusión molecular midiendo la actividad fenilvalerato esterasa y acetilcolinesterasa.

6.1. Perfil cromatográfico de proteínas

El perfil cromatográfico de absorbancia a 280 nm, fue reproducible, ya que los 3 cromatogramas que se obtuvieron a partir de las inyecciones de fracción soluble de cerebro de pollo, mostraron perfiles similares (ver **figura 5.4**).

El rendimiento en la cuantificación de las proteínas fue de un 61% de recuperación. Puede haber ocurrido pérdida de proteína en el proceso cromatográfico realizado o en el empaquetamiento de la precolumna o columna.

6.2. Perfiles cromatográficos de actividad fenilvalerato esterasa y acetilcolinesterasa

Se han puesto muchos esfuerzos para aislar las dianas que interaccionan con los compuestos organofosforados por métodos de separación de proteínas. Mangas et al. (2014), pudo separar una gran proporción de actividad E α la cual se correspondía con la fracción S1D1 obtenida mediante una cromatografía HPLC de intercambio iónico a partir de la fracción S1.

En este trabajo la fracción soluble de cerebro de pollo fue separada en cuatro subfracciones distintas de actividad PVasa y de actividad AChE, llamadas S1, S2, S3 y S4. Estas fracciones se agruparon conforme a los distintos picos que se pueden observar en el perfil (ver **figura 5.5**) y fueron parecidas a las fracciones separadas por Mangas et al. (2014), para actividad PVasa.

Según la actividad PVasa podemos encontrar tres picos de actividades máximas (ver **figura 5.4**), en los volúmenes de elución 5.5 ml, 7.5 ml y 9ml. El primero de ellos está incluido en la fracción S1 y se encontraría localizado entre los volúmenes de elución 4.5 ml y 6.5 ml. El segundo de ellos está incluido en la fracción S2, situado entre 6.5 ml y 8.5 ml. y el tercero, con mayor actividad PVasa, está incluido en la fracción S3, situado entre 8.5 ml y 10.5 ml. Además, el perfil de actividad PVasa fue comparable al perfil obtenido por Mangas et al. (2014), en fracción soluble y los volúmenes de elución son muy parecidos a los establecidos para dichos picos por Mangas et al. (2014).

La recuperación de la actividad PVasa fue del 62%, probablemente debido al proceso cromatográfico realizado o problemas con el empaquetamiento de la precolumna o columna, sin embargo esto no afectó a la identificación de los picos de actividades.

La mayoría de actividad recuperada en el caso de PVasa fue en la fracción S3 (alrededor de un 37% de actividad total). Seguido de la fracción S2 con un 30% total de recuperación y por último S1 con un 20% de recuperación. En la fracción S4 no se observó actividad enzimática. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Mangas et al. (2014).

Con respecto a la actividad AChE, se pudo observar (ver **figura 5.4**) un pico con gran actividad enzimática. Este pico está incluido en la fracción S1, con su máximo en el volumen de elución 5.5 ml. Este pico comprende desde 4.5 ml a 6.5 ml. Sin embargo, existe actividad AChE a lo largo de todo el volumen de elución, pero sin picos característicos, solo se observa otro pico a 11.5 ml, el cual corresponde a un pico situado en el perfil de 280 nm.

La recuperación de la actividad AChE en este caso fue de un 35% mucho menor que en el caso de PVasa. El bajo rendimiento podría estar causado por el proceso cromatográfico realizado, por problemas en el empaquetamiento de la precolumna o columna o por una degradación de la actividad durante el proceso de purificación.

La mayoría de la actividad recuperada para AChE fue en la fracción S1 con un 40% de actividad. Seguido de la fracción S2 con un 23% de actividad de recuperación, la fracción S3 con una recuperación del 15%. Y por último la fracción S4 con una recuperación del 22%.

Comparando los perfiles de actividades PVasa y AChE, en la fracción S1, coinciden los dos picos de actividades PVasa y AChE y además coinciden con un pico del perfil cromatográfico de 280 nm (ver **figura 5.4**).

Este pico de actividad PVasa incluido en la fracción S1, posee la misma constante de reparto y el mismo peso molecular estimado que el pico incluido en la misma fracción en el perfil de actividad AChE, lo que sugiere que podría tratarse de la misma proteína o el mismo conjunto de proteínas.

Con respecto al factor de purificación (ver **tabla 5.1**) se presentó el máximo en la fracción S1 del perfil de actividad Pvasa coincidiendo así con el máximo factor de purificación del perfil de actividad AChE.

De acuerdo con Mangas et al. (2014) casi toda la actividad Pvasa E α se encuentra localizada en la fracción S1. En este trabajo se ha demostrado que esta actividad E α coincide con una actividad AChE lo que apoya la conclusión de Benabent et al. (2014), que E α podría ser una proteína hidrolizante de acetilcolina, ya que el pico de actividad AChE en la fracción S1, tiene la misma constante de distribución que el pico de actividad Pvasa en dicha fracción, sugiriendo que una misma proteína podría tener ambas actividades.

Los datos obtenidos en este trabajo abre las puertas a futuros trabajos de investigación de fraccionamiento y purificación de las fenilvalerato esterases en cerebro de pollo, teniendo en cuenta la actividad colinesterasa como una herramienta para la discriminación de algunos componentes enzimáticos de actividad Pvasa.



7. Conclusiones

1.- Se ha estudiado la distribución de la actividad fenilvalerato esterasa de fracción soluble de cerebro de pollo en un perfil cromatográfico de exclusión molecular y se ha obtenido un perfil de actividad PVasa y proteínas similar al que obtuvieron Mangas et al. (2014). Se ha podido distinguir tres picos, el primero con un máximo de actividad a un volumen de elución de 5.5 ml ($kD = 1.06$, $PM = 1201$ kDa), el segundo a un V_e de 7.5 ml ($kD = 1.45$, $PM = 332$ kDa) y el tercero a un volumen de elución de 9 ml ($kD = 1.74$, $PM = 126$ kDa).

2.- Se ha estudiado la distribución de la actividad hidrolizante de acetilcolina en fracción soluble de cerebro de pollo en un perfil cromatográfico de exclusión molecular. Se ha podido distinguir 2 picos de actividad colinesterasa con máximos a un V_e de 5.5 ml ($kD = 1.06$, $PM = 1201$ kDa) y el segundo a un V_e de 11.5 ml ($kD = 2.22$, $PM = 25$ kDa).

3.- El material recogido tras la cromatografía fue agrupado en 4 fracciones (S1, S2, S3 y S4) de acuerdo a los picos observados de actividad PVasa.

4.- Los perfiles de actividades fenilvalerato esterasa y colinesterasa indican que hay un pico definido en ambos perfiles de actividad con la misma constante de distribución y volumen de elución. Este pico está incluido en la fracción S1, en volúmenes de elución entre 4.5 ml y 6.5 ml y con un máximo de actividad en 5.5 ml en ambas actividades.

5.- Una gran proporción de actividad acetilcolina aparece en la fracción S1.

6.- Los datos obtenidos en este trabajo apoyan el trabajo de Benabent et al. 2014, donde concluyó que la actividad E_α podría ser butirilcolinesterasa, una proteína hidrolizante de acetiltiocolina.

8. Bibliografía

Barril, J., Estévez, J., Escudero, M.A., Céspedes, M.V., Níguez, N., Sogorb, M.A., Mon-roy, A., Vilanova, E., (1999). Peripheral nerve soluble esterases are spontaneously reactivated after inhibition by paraoxon: implications for a new definition of neuropathy target esterase. *Chem. Biol. Interact.* 119–120 (May), 541–550.

Behra, M., Etard, C., Cousin, X., Strähle, U., (2004). The use of zebrafish mutants to identify secondary target effects of acetylcholine esterase inhibitors. *Toxicol.Sci.* 77 (February (2)), 325–333.

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.

Benabent, M., Vilanova, E., Mangas, I., Sogorb, M.A., Estévez, J., (2014). Cholinesterase assay by an efficient fixed time endpoint method. *MethodsX* 1 (2014) 258–263.

Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal.Biochem.* 72 (May), 248–254.

Casida, J.E., Quistad, G.B., (2004). Organophosphate toxicology: safety aspects of non-acetylcholinesterase secondary targets. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 983–998.

Céspedes, M.V., Escudero, M.A., Barril, J., Sogorb, M.A., Vicedo, J.L., Vilanova, E., (1997). Discrimination of carboxylesterases of chicken neural tissue by inhibition with neuropathic, non-neuropathic organophosphorus compounds and neuropathy promoter. *Chem. Biol. Interact.* 106 (October (3)), 191–200.

De Blecker, J.L. (1995) The intermediate syndrome in organophosphate poisoning: an overview of experimental and clinical observations. *Journal of toxicology. Clinical toxicology*, 33(6):683-6.

Ecobichon, D.J., (1996). Toxic effects of pesticides. In: Casarett & Doull's Toxicology. The basic Science of poisons. CD Klaasen (ed), McGraw-Hill, New York, pp:643-89.

Escudero M. A., Barril J., Tormo N., and Vilanova E. (1995) Separation of two forms of neuropathy target esterase in the soluble fraction of the hen sciatic nerve. *Chem. Biol. mt.* 97, 247–255.

Estévez, J., Mangas, I., Sogorb, M.Á., Vilanova, E., (2013). Interactions of neuropathy inducers and potentiators/promoters with soluble esterases. *Chem. Biol. Inter-act.* 203 (1), 245–250.

Estévez, J., 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.

Estévez, J., Barril, J., 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, 397–402.

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-Pérez, A., Barril, J., Pellín, M.C., Vilanova, E., (2004). The inhibition of the high sensitive Peripheral nerve soluble esterases by Mipaflox. 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.* 24, 135–143.

García-Pérez, A.G., Barril, J., Estévez, J., Vilanova, E., (2003). 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.* 142 (April (1–2)), 1–10.

Johnson, M.K., (1969). The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of phosphorylation site as an esterase. *The biochemical journal*, 114(4):711-7.

Johnson M.K., (1977). Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. *Arch Toxicol.* 1977 Jun 18; 37(2):113-5.

Johnson, M.K., (1980). Delayed neurotoxicity induced by organophosphorus compounds. Areas of understanding and ignorance. *Developments in toxicology and environmental science*, 8:27-38.

Johnson, M.K., (1982). The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. *Reviews in biochemical toxicology*, 4:141-212.

Johnson, M.K., (1987). Receptor or enzyme: the puzzle of NTE and organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *TIPS*, 8(5):174-9.

Johnson, M.K., Glynn, P., (2001). Neuropathy Target Esterase. In: *Handbook of Pesticide Toxicology* (2), Chapter 47. Ed: Kreiger R. 2001. Academic Press, pp:953-65.

Jokanovic, M., Stukalov, P.V., Kosanovic, M., (2002). Organophosphate induced delayed polyneuropathy. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, 1(6):593-602.

Lockridge, O., Schopfer, L.M., (2006). Biomarkers of exposure. In: Gupta (Ed.), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Academic Press, San Diego, pp. 703–715.

Lotti, M., (1991). The Pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Critical reviews in toxicology*, 21(6):465-87.

- Lotti, M., Becker, C.E., Aminoff, M.J., (1984). Organophosphate polyneuropathy: pathogenesis and prevention. *Neurology*, 34(5):658-62.
- Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., (2011). Kinetics of the inhibitory interaction of organophosphorus neuropathy inducers and non-inducers in soluble esterases in the avian nervous system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256 (November (3)),360–368.
- Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., (2012a). NTE and non-NTE esterases in brain membrane: kinetic characterization with organophosphates. *Toxicology* 297 (July(1–3)), 17–25.
- Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., (2012b). Phenylmethylsulfonyl fluoride, a potentiator of neuropathy, alters the interaction of organophosphorus compounds with soluble brain esterases. *Chem. Res. Toxicol.* 25 (November (11)),2393–2401.
- Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., Benabent, M., (2014). Separating esterase targets of organophosphorus compounds in the brain by preparative chromatography. *Toxicology Letters* 225 (2014) 167– 176.
- Moretto, 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. *Toxicology and applied pharmacology*, 129(1):133-37.
- Moser, V.C., (1995). Comparisons of the acute effects of cholinesterase inhibitors using a neurobehavioral screening battery in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 17(November–December (6)), 617–625, PMID: 8747743.
- Murray, A., Rathbone, A.J., Ray, D.E., (2003). Characterisation of non-acetylcholinesterase actions of organophosphates by identification of novel protein targets of action. *Br. Neurosci. Assoc. Abstr.* 17, 136.
- Murray, A., Rathbone, A.J., Ray, D.E., (2005). Novel protein targets for organophosphorus pesticides in rat brain. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19 (May (3)),451–454.
- Nomura, D.K., Blankman, J.L., Simon, G.M., Fujioka, K., Issa, R.S., (2008). Activation of endocannabinoid system by organophosphorus nerve agents. *Nat. Chem. Biol.* 4, 373–378.
- Nomura, D.K., Casida, J.E., (2011). Activity-based protein profiling of organophosphorus and thiocarbamate pesticides reveals multiple serine hydrolase targets in mouse brain. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2808–2815.
- Pope, C.N., (1999). Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev.* 2 (April–June (2)),161–181.
- Pope, C.N., Padilla, S., (1990). Potentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity by phenylmethylsulfonyl fluoride. *Journal of toxicology and environmental health*, 31(4):261-73.

Richards, P.G., Johnson, M.K., Ray, D.E., (2000). Identification of acylpeptide hydro-lase as a sensitive site for reaction with organophosphorus compounds and apotential target for cognitive enhancing drugs. *Mol. Pharmacol.* 58, 577–583.

Richards, P.G., Johnson, M.K., Ray, D.E., Walker, C., (1999). Novel protein targets for organophosphorus compounds. *Chem. Biol. Interact.* 119–120 (1999), 503–511.

Senanayake, N., Karalliedde, L., (1987). Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. *The new england journal of medicine*, 316(13):761-3.

Solé-Violan, J., Martínez, J., Molinero, F., Marco, J.M., Rubio, R., Rodríguez, I., (1985). Neurologic manifestations in acute poisoning by organophosphorus insecticides. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 85(6):217-20.

Vilanova, E., Barril, J., Carrera, V., Pellin, M.C., (1990). Soluble and particulate forms of the organophosphorus neuropathy target esterase in hen sciatic nerve. *J. Neurochem.* 55 (October (4)), 1258–1265.

Yelamos F., Díez F., Martín, J.C., Blanco, J.L., García, M.J., Lardelli, A., Peña J.F., (1992). Intoxicaciones agudas por insecticidas organofosforados en la provincia de Almería. Estudio de 187 casos. *Medicina clínica (Barcelona)*, 98:681-4.

