

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Grado en Ciencias Ambientales

Curso 2022/2023

Instituto de Bioingeniería, Área de Toxicología

Trabajo de Fin de Grado

**Interacciones de Acetilcolina y Acetilcolina en las actividades
Fenilvaleratoesterasa y Fenilacetatoesterasa de la
Acetilcolinesterasa humana recombinante.**

Paula Ruz Pérez

Estudiante de Ciencias Ambientales

Tutor: Jorge Estévez Domènech

Elche, junio 2023

ÍNDICE

0. RESUMEN.....	3-4
1. INTRODUCCIÓN.....	5-11
1.1. Compuestos organofosforados.....	5
1.2. Carboxilesterasas.....	8
1.3. Colinesterasas.....	8
1.4. Sustratos.....	10
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1. Actividad FAc esterasa de hAChE.....	12
2.2. Actividad PVasa de hAChE.....	12-14
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15-21
4.1. Tampones y reactivos utilizados.....	15
4.2. Material biológico	16
4.3. Equipos utilizados.....	17
4.4. Microensayo de actividad colinesterasa.....	17
4.5. Microensayo de actividad FAc esterasa.....	18
4.6. Curva de calibrado del método colorimétrico de fenol.....	18
4.7. Curva de calibrado del método colorimétrico de tiocolina.....	18
4.8. Pretratamiento de hAChE con AtCh o ACh y ultrafiltración.....	19
4.9. Pretratamiento de hAChE con PV o FAc y ultrafiltración.....	20
4.10. Modelos matemáticos y análisis de datos.....	21
5. RESULTADOS.....	21-37
6. DISCUSIÓN.....	38-40
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.....	41-42
8. BIBLIOGRAFÍA.....	43-44

0. RESUMEN

Algunos compuestos organofosforados son sustancias activas de numerosos productos insecticidas y biocidas donde la diana principal de estos compuestos es la acetilcolinesterasa (AChE). Se conoce que la AChE humana recombinante presenta actividad fenilacetato esterasa (FAc esterasa) y actividad fenilvalerato esterasa (PVasa). La acetiltiocolina (AtCh) a bajas concentraciones aumenta actividad PVasa e inhibe esta actividad en altas concentraciones. Sin embargo, la actividad FAc esterasa es inhibida a bajas concentraciones de AtCh. Se ha sugerido que la potenciación o inhibición de estas actividades son causadas por la tiocolina liberada en el sitio activo, donde AtCh podría actuar como un caballo de Troya.

En este trabajo se demuestra que la interacción de la tiocolina liberada en el centro activo modifica permanentemente este mismo alterando la actividad PVasa y FA esterasa. Los resultados aportados en este trabajo ayudarán a comprender el papel en la cinética con sustratos, compuestos organofosforados y el proceso catalítico en toxicidad.

Palabras clave: acetilcolinesterasa (AChE), fenilacetato (FAc), acetiltiocolina (AtCh).

ABSTRACT

Some organophosphorus compounds are active substances in numerous insecticides and biocidal products, where the main target of these compounds is acetylcholinesterase (AChE). It is known that recombinant human AChE exhibits phenylacetate esterase (FAc esterase) activity and phenylvalerate esterase (PVase) activity. Acetylthiocholine (AtCh) at low concentrations increases PVase activity and inhibits this activity at high concentrations. However, FAc esterase activity is inhibited at low concentrations of AtCh. It has been suggested that the enhancement or inhibition of these activities is caused by thiocholine released at the active site, where AtCh could act as a Trojan horse.

This study demonstrates that the interaction of thiocholine released at the active center permanently modifies it, thereby altering PVase and FAc esterase activity. The results presented in this study will help understand the role of kinetics with substrates, organophosphorus compounds, and the catalytic process in toxicity.

Keywords: acetylcholinesterase (AChE), phenylacetate (FAc), acetylthiocholine (AtCh).

ABREVIATURAS

AAP Aminoantipirina

DTNB Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

AChE Acetilcolinesterasa DMF Dimetilformamida

ACh Acetilcolina

OPs Organofosforados AtCh Acetilcolina

FAc Fenilacetato

PV fenilvalerato o valerato de fenilo

PVasa fenilvalerato esterasa

FAc esterasa Fenilacetato esterasa

BSA Albúmina de suero bovino

SDS Dodecilsulfato sódico

TP Tampón fosfato.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los compuestos Organofosforados

Los compuestos organofosforados (OPs) forman un gran grupo de sustancias de síntesis como amidas, ésteres y derivados tiólicos del ácido fosfórico y fosfónico. La estructura química general de los OPs que inhiben a esterasas se puede observar en la **Figura 1.1**. Estos compuestos presentan un átomo central de fósforo (P) y un enlace fosfórico (P=O) o fosforotioato (P=S). La X corresponde a un grupo saliente que puede tener diferentes estructuras dentro de diversos grupos alifáticos, aromáticos o heterocíclicos. Este grupo sufre una sustitución nucleofílica por el oxígeno cuando el inhibidor reacciona con el grupo –OH del centro activo de la proteína inhibida.

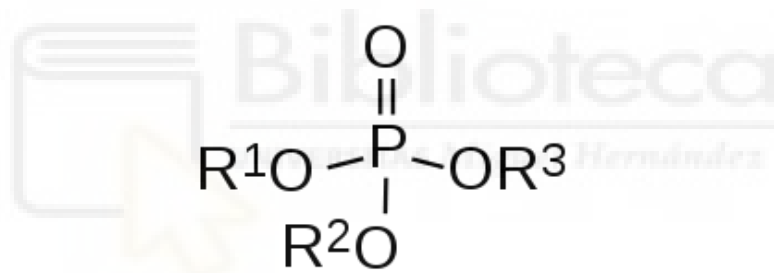


Figura 1.1: estructura química general de los organofosforados. R¹ y R² son grupos arilo o aquilo simples. R³ corresponde al "grupo saliente", y coincide con aquel que puede tener diversas naturalezas químicas. El uso más común de los organofosforados ha sido en el ámbito de la agricultura como plaguicida. Estos han sido empleados como insecticidas, fungicidas y acaricidas para combatir plagas y eliminar vectores de enfermedades y a nivel doméstico (Instituto nacional de toxicología 1996). Cabe destacar que su uso se está viendo disminuido en países desarrollados, sin embargo, su importancia podría mantenerse durante décadas debido a su eficacia y bajo costo (Casida y Durkin., 2013). Se ha observado que los OPs pueden afectar a humanos mediante la fosforilación de esterasas vitales, causando diversas enfermedades neurotóxicas.

1.1.1 Reacciones de interacción entre organofosforados y esterasas.

El lugar bioquímico del mecanismo molecular de los efectos biológicos de los OPs generalmente implican el grupo hidroxilo de proteínas y consecuentemente se produce la inhibición de esterasas mediante la fosforilación. Este mecanismo es común en todas ellas y se explica en la **figura 1.2**.

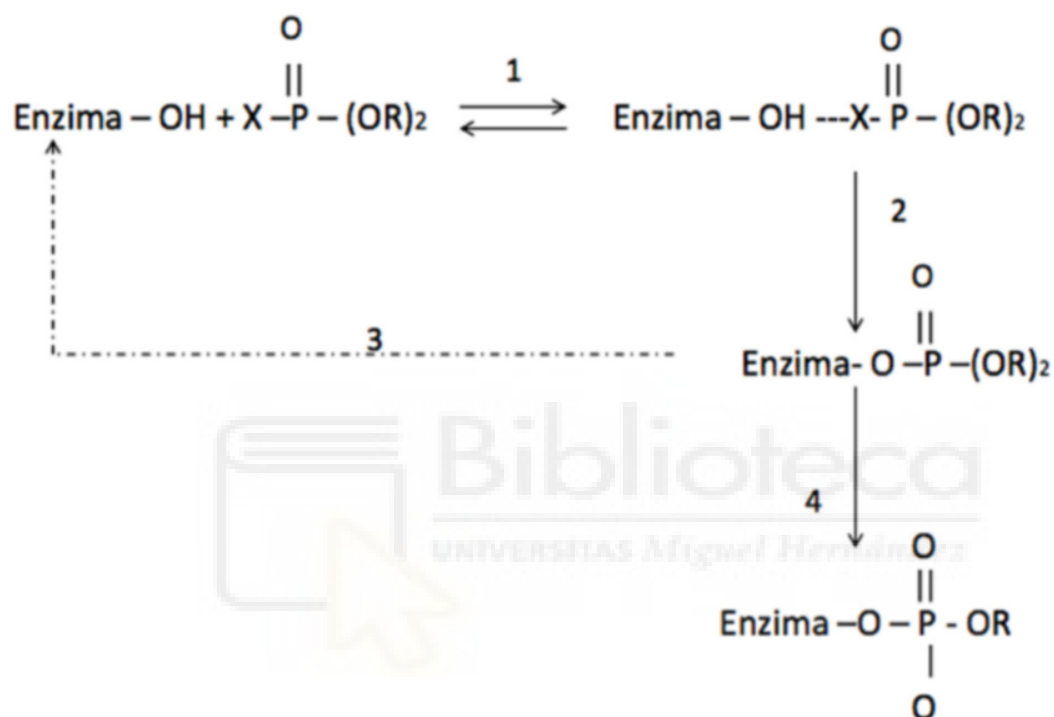


Figura 1.2: Mecanismo general de esterasas por organofosforados (OPs). Cuando se ha formado el complejo de tipo michaeliano entre la enzima y el OP (1), se fosforila un residuo de serina de la enzima perdiéndose el grupo saliente X (2). A partir de aquí pueden darse dos vías: la de reactivación (3), 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.

1.1.2 Efectos tóxicos generados por los OPs.

Los efectos que generalmente se observan a consecuencia de la exposición a organofosforados son, en gran parte, resultado de la combinación del tipo de exposición (aguda/crónica), la intensidad (dosis o concentración) y la/s especie/s química/s implicadas

(categoría toxicológica) (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo, 1999). La toxicidad de los OPs se resume en:

- Inhibición de acetilcolinesterasa humana (hAChE) del sistema nervioso produciendo efectos tóxicos inmediatos, comúnmente conocidas como intoxicaciones agudas.
- 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, 1982).
- Otros efectos sobre el sistema respiratorio y órganos como hígado, riñón, médula ósea, sistema inmunitario etc., por mecanismos no muy conocidos.

En la **Tabla 1.1** se resumen diferentes síntomas relacionados con los efectos tóxicos más característicos causados por la fosforilación de esterasas.

Tabla 1.1 toxicidad de los organofosforados relacionada con la inhibición de esterasas.

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

1.2 Carboxilesterasas

Las carboxilesterasas son enzimas de la familia de las esterasas que se encargan de la hidrólisis de ésteres carboxílicos. Hay varios tipos de carboxilesterasas y fueron clasificadas por Aldridge (1953) dependiendo de su interacción con los compuestos organofosforados (OPs).

- **A Esterasas:** los compuestos OPs interacciona con con el grupo funcional -SH y forman un enlace P=S que es fácilmente hidrolizado por H₂O, por lo que no son inhibidos.
- **B Esterasas:** los compuestos OPs interacciona con el grupo funcional -OH y forman un enlace P=O este no es hidrolizado por H₂O, por lo que son inhibidos.
- **C Esterasas:** no tienen ningún tipo de interacción con compuestos OPs.

1.3 Colinesterasas

Las colinesterasas pertenecen al grupo de las esterasas de tipo B. Estas enzimas contienen un residuo de serina en su centro activo y su función es hidrolizar ésteres de colina como la acetilcolina, butirilcolina, succinilcolina, etc. Su principal sustrato es la acetilcolina un neurotransmisor que se encuentra principalmente en los espacios sinápticos de las uniones neuromusculares.

En vertebrados existen dos tipos de colinesterasas, la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (BuChE, EC 3.1.1.8). Ambas enzimas se distinguen por su especificidad de sustrato (Kovarik et al., 2003). Se ha establecido que la AChE tiene un papel importante en la 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 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**

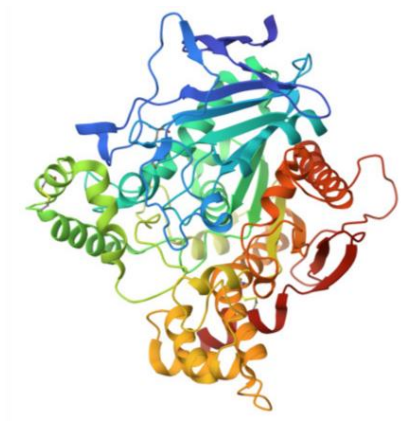


Figura 1.3: Estructura tridimensional acetilcolinesterasa humana (Protein Data Base) (<https://www.rcsb.org/>)

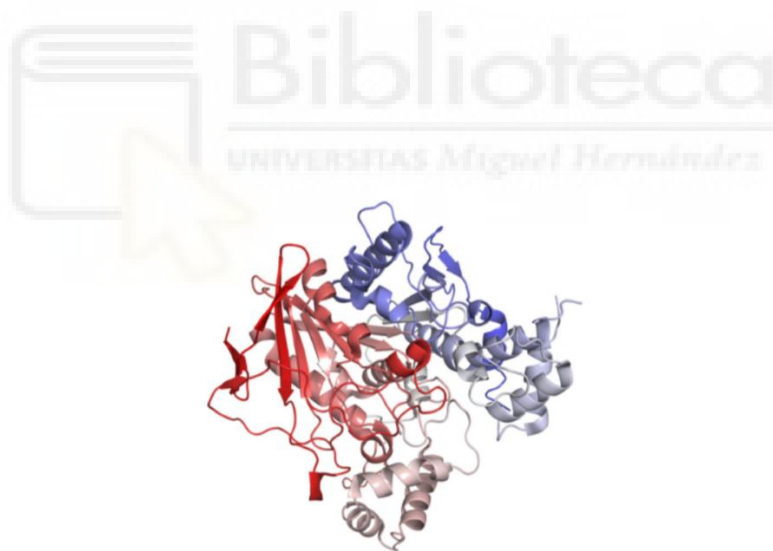


Figura 1.4: Estructura tridimensional butirilcolinesterasa humana (Protein Data Base) (<https://www.rcsb.org/>)

1.4 Sustratos de la Acetilcolinesterasa

La hAChE se considera una enzima evolutivamente perfecta, porque todos los pasos del recambio de sustrato: la asociación del sustrato, las transformaciones químicas y la disociación del producto proceden a velocidades similares (Töugu, 2001). La característica más notable de las colinesterasas es la facilidad para encontrar y acomodar la carga catiónica del sustrato fisiológico. Las interacciones electrostáticas que se dan entre la enzima y las cargas positivas que contienen las moléculas del ligando desempeñan un papel importante en el reconocimiento y la unión de sustratos catiónicos e inhibidores por parte de estas enzimas. Sin embargo, la contribución de estas interacciones al reconocimiento molecular del sustrato fisiológico no debe sobreestimarse al analizar el poder catalítico de la enzima, ya que la hAChE se caracteriza por una especificidad de sustrato considerablemente amplio y la enzima es capaz de hidrolizar sustratos neutros con altas velocidades de reacción.

1.4.1 Acetiltilocolina y acetilcolina

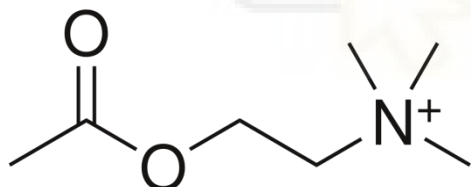


Figura 1.5: estructura química de acetiltiocolina

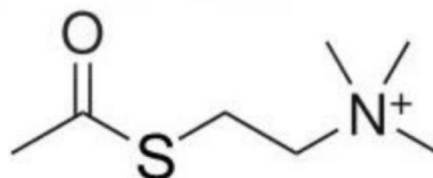


Figura 1.6: estructura química de acetilcolina

La hAChE tiene capacidad de hidrolizar tanto acetilcolina (ACh) como acetiltiocolina (AtCh) (actividad acetilcolinesterasa), ambos sustratos son ejemplos de sustratos con carga positiva. La enzima es capaz de hidrolizar la ACh (**Figura 1.6**) a una velocidad muy alta, acercándose al límite superior permitido por la difusión del sustrato y la maquinaria catalítica de las enzimas de serina. Sin embargo, la AtCh (**Figura 1.5**) es el sustrato que se usa habitualmente en estudios de hAChE, pues al contrario que en el caso de la ACh, el grupo tiol permite que sus productos puedan ser evaluados directamente mediante técnicas espectrofotométricas. Un

estudio microcalorimétrico realizado en 2017 por investigadores de la Universidad de Minas Gerais concluyó que la hidrólisis de ambos sustratos por la AChE presenta ligeras diferencias en las constantes debidas a las distintas interacciones con la enzima, siendo más altas para el sustrato natural, la acetilcolina. Aunque el ensayo espectrofotométrico tradicional es el más viable de utilizar, este trabajo muestra valores cinéticos comparables entre ACh y AtCh, aunque no exactamente idénticos, y cualquier aproximación, incluso si va acompañada de un error, es correcta (Alves de Almeida, 2017).

1.4.2 Fenilvalerato y fenilacetato

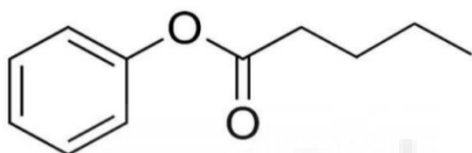


Figura 1.7: Estructura química **fenilvalerato**

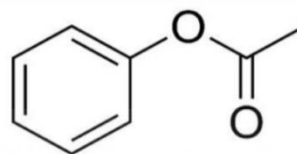


Figura 1.8: Estructura química **fenilacetato**

El fenilvalerato (PV) (Figura 1.7) es un sustrato neutro que se usa para detectar la esterasa diana de neuropatía (NTE). Recientemente se ha descrito que la acetilcolinesterasa humana recombinante (hAChE) presenta actividad fenilvalerato esterasa (PVasa) para este sustrato (Romo, 2017; Terol, 2018).

Por otro lado, el fenilacetato (FAC) (Figura 1.8) es un sustrato neutro usado comúnmente en ensayos con hAChE (E. Reiner y V. Simeon, 1977), por lo que se conoce que esta enzima presenta actividad fenilacetato esterasa (FAC esterasa).

2. ANTECEDENTES

2.1 Actividad FAc esterasa de HAcHE

Poveda (2021) realizó diferentes estudios de interacción de AChE humana con FAc como sustrato. Ella demostró que la actividad FAc esterasa se inhibió ligeramente en presencia de concentraciones muy bajas de AtCh (0,02 mM de AtCh frente a 0,25 mM de FAc) a partir de un tiempo teórico de inflexión de aproximadamente 3,5 minutos, donde toda la AtCh se había hidrolizado por completo. Estos resultados indican, que la reducción de la actividad FAc esterasa una vez que la AtCh se ha hidrolizado completamente, sugiere que uno de los productos de reacción, la tiocolina, podría ser responsable de esta inhibición, sin embargo, no se observó inhibición de la actividad FAc esterasa en presencia de tiocolina en el medio de reacción. Se propuso que la inhibición observada es causada por la tiocolina, que no abandona el centro activo una vez que la AtCh se ha hidrolizado.

2.2 Actividad PVasa de HAcHE

El estudio realizado por (Romo 2017) investigó las diferentes colinesterasas utilizando PV como sustrato. Se observó que tanto la hBuChE como la hAcHE mostraban actividad PVasa, pero la hBuChE presentaba una actividad superior a la hAcHE .

(Terol 2018), estudió la actividad PVasa en la AChE humana utilizando ensayos de competición entre PV y AtCh. Uno de los resultados más relevantes de estos estudios fue observado en experimentos de actividad PVasa en presencia de AtCh a bajas concentraciones. Se observó que a partir de un tiempo teórico de inflexión donde la AtCh se hidrolizaba totalmente, la actividad PVasa se incrementaba, superando la velocidad alcanzada por controles en ausencia de AtCh (ver figura 2.1; Estevez. et al., 2019).

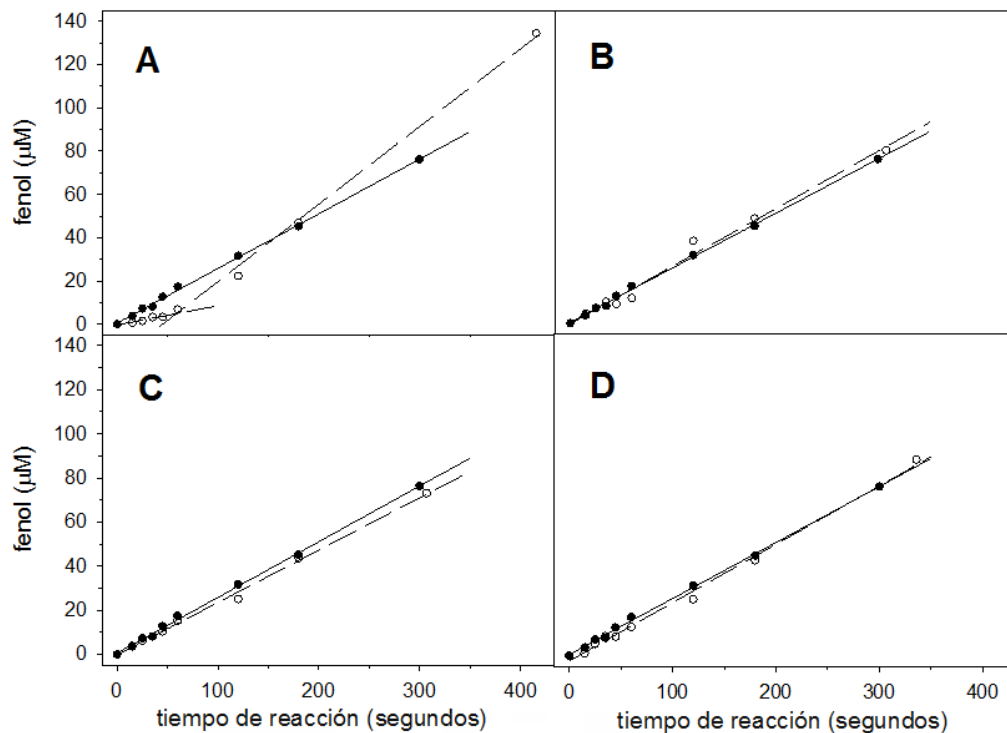


Figura 2.1 Dependencia temporal de la actividad de la PVasa en ausencia y presencia de AtCh, tCh, Ac o tCh y Ac. Se muestra un ejemplo de los experimentos independientes realizados. Cada punto representa una medición triplicada. Se ensayaron 5 nM de hAChE (en volumen de reacción) en presencia de 3 mM de PV en diferentes tiempos de reacción y a 37°C. Los círculos negros representan la producción de fenol en ausencia de AtCh, tCh, Ac o tCh y Ac. Las líneas rectas representan la regresión lineal en todos los paneles. Los círculos blancos indican la producción de fenol en presencia de 0.5 mM de AtCh (Panel A), 0.5 mM de tCh (Panel B), 0.5 mM de Ac (Panel C) y 0.5 mM de tCh y Ac (Panel D). Las líneas discontinuas representan las regresiones lineales. Las pendientes (tasas) se muestran en la tabla (Estevez.et al., 2019)

Se demostró que esta activación estaba causada por la tiocolina, que no abandonaba el centro activo una vez que la AtCh se había hidrolizado totalmente. Este producto de reacción interactuaba dentro del centro activo e incrementaban la actividad PVasa. En este caso, la AtCh actuaba como un "caballo de Troya", ya que podía acceder fácilmente al centro activo, liberando tiocolina, que a su vez interactuaban dentro del sitio activo para aumentar la actividad PVasa.

Estos hallazgos proporcionaron información importante sobre los mecanismos de acción de las colinesterasas y la forma en que la hidrólisis de la AtCh puede influir en la actividad enzimática.

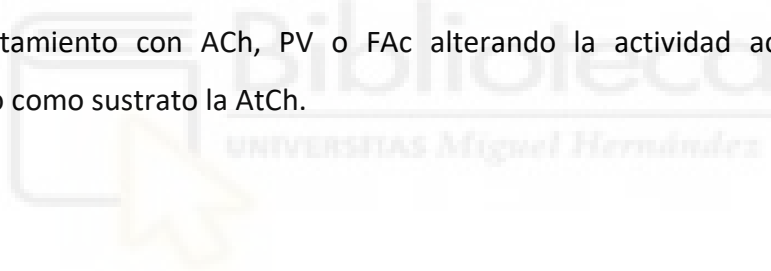
3. OBJETIVOS

Objetivo general

- Confirmar que el pretratamiento con diferentes sustratos con hAChE modifica el centro activo alterando la actividad con otros sustratos.

Objetivos específicos

- Demostrar que el centro activo de la hAChE está modificado permanentemente tras el pretratamiento con AtCh o ACh alterando la actividad PVasa y FAc esterasa.
- Demostrar que el centro activo de la hAChE está modificado permanentemente tras el pretratamiento con ACh, PV o FAc alterando la actividad acetilcolinesterasa utilizando como sustrato la AtCh.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TAMPONES Y REACTIVOS UTILIZADOS

- **Albúmina de suero bovino (BSA).** (Pureza 96%) se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. Se preparó una disolución (1 mg/ml) en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4. Se utilizó para preparar las disoluciones de enzima y los blancos de los ensayos.
- **Agua ultrapura (MQ).** Se obtuvo a partir de agua purificada por ósmosis inversa (Elix 3 de Millipore) que se ultrapurificó con el equipo (miliQ Element de Millipore).
- **Tampón fosfato (TP).** Dihidrofosfato de sodio monohidratado 0,1 M pH 7,4. Se preparó disolviendo dihidrofosfato de sodio monohidratado en agua MQ. El pH se ajustó a 7,4 con NaOH concentrado y se conservó a temperatura ambiente.
- **Dodecilsulfato sódico (SDS) y 4 aminoantipirina (AAP).** Se adquirieron de grado analítico de Panreac Química S.A. y Sigma-Aldrich Química S.A. respectivamente. Se preparó una disolución de SDS 2% - AAP 10 mM 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.
- **Dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).** Se adquirieron de grado analítico de Panreac Química S.A. y Sigma-Aldrich Química S.A. 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 una botella de cristal topacio para evitar la degradación del DTNB.
- **Fenilacetato (FAC).** Se adquirió de la empresa Panreac Química S.A. Para los ensayos de actividad FAC esterasa se preparó una disolución de concentración 1,7 M en N-dimetilformamida (DMF) y en metanol a partir de FAC puro. Se conservó en nevera a 4°C, siendo estable durante meses. Para su utilización como sustrato se prepararon disoluciones, inmediatamente antes de uso, a las concentraciones requeridas del ensayo, de forma que el porcentaje de DMF no fuera superior al 1% para que no se viera alterada la actividad enzimática.
- **Fenilvalerato (PV).** Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA). Para los ensayos de actividad fenilvalerato esterasa se preparó una disolución concentrada de 300 mg/ml (1715'5 mM) en N, N-dimetilformamida (DMF) y se conservó en nevera a 4°C, siendo estable

durante meses. Para su utilización como sustrato se prepararon disoluciones, inmediatamente antes de uso, a las concentraciones requeridas del ensayo, de forma que el porcentaje de DMF no fuera superior al 3% para que no se viera alterada la actividad enzimática.

- **Fenol.** Se adquirió de grado analítico de Panreac Química S.A. Se preparó una disolución de concentración 1 M, a partir de la cual se prepararon las concentraciones necesarias inmediatamente antes del ensayo realizado en agua ultrapura.
- **Ferricianuro potásico (K₃Fe (CN)₆).** Se adquirió de grado analítico de Panreac Química S.A. Se preparó una disolución al 2% en agua destilada y se conservó a temperatura ambiente. Se utilizó una botella de cristal topacio para evitar degradación por luz.
- **Yoduro de acetilticolina (AtCh).** (Pureza superior al 99%). Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. Para su uso como sustrato, se preparó, inmediatamente antes de su uso, a la concentración necesaria en función del ensayo realizado (en agua ultrapura) para minimizar su degradación por hidrólisis espontánea.
- **Yoduro de tiocolina.** (Pureza superior al 95%). Se adquirió de BOC Sciences (USA). Para su utilización, se preparó a la concentración requerida en función del ensayo realizado, en agua ultrapura.

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- **Acetilcolinesterasa humana recombinante (hAChE).** Se adquirió de R&D SYSTEMS a biotechne brand distribuida por VITRO.S.A. Las soluciones enzimáticas se prepararon a diferentes concentraciones dependiendo del ensayo realizado, con BSA 0,1 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y comprobando su actividad antes de cada ensayo.

4.3 EQUIPOS UTILIZADOS

- **Estación automatizada Biomek 2000 (Beckman-Coulter).** Esta estación de trabajo robotizada se utilizó para realizar todas las medidas de actividades enzimáticas mediante microensayo, a fin de minimizar el consumo de muestra, permitiendo además la automatización de los ensayos, la realización simultánea de un número elevado de muestras y garantizando la reproducibilidad de los volúmenes y tiempos. Está equipada con pipetas multicanal (8x) con capacidad entre 20-200 μL , dos termobloques de aluminio termostatzado para 8x12 minitubos de 1 mL con un controlador de temperatura electrónico y una microplaca de 96 pocillos para su posterior lectura fotométrica.
- **Lector de placas.** Para la lectura fotométrica se utilizó el lector de placas AD 340 C (Beckman Coulter) y el lector de placas Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek).
- **Centrífugas.** se utilizó la centrífuga Allegra 21R de Beckman Coulter.
- **Filtros de centrifugación.** Se utilizaron filtros Ultracel 50 K de Millipore para eliminar los diferentes sustratos de los pretratamientos.

4.4 MICROENSAYO DE ACTIVIDAD COLINESTERASA

Se mezclaron 100 μL de una solución con enzima a la concentración deseada en BSA 0,1% y 100 μL de BSA 0,1 % en el caso de los controles, con 100 μL de sustrato a 37°C. La reacción se paró al tiempo de reacción deseado en cada ensayo, añadiendo 100 μL de SDS 2% / DTNB 6 mM. A continuación, se añadieron 100 μL de BSA 0,1% a las muestras y 100 μL de enzima a los controles. Se midió la absorbancia a 405 nm.

El método está basado en el ensayo descrito por Benabent et al. (2014) para la determinación de actividad colinesterasa en cerebro.

4.5 MICROENSAYO DE ACTIVIDAD FENILACETATO ESTERASA.

Se mezclaron 90 μL de una solución con enzima en BSA 0,1% a la concentración deseada, descritas posteriormente en resultados y 90 μL de BSA 0,1 % en el caso de los blancos, con 90 μL de sustrato a 37°C. La reacción se paró al tiempo de reacción deseado en cada ensayo, añadiendo 90 μL de SDS 2% / AAP 10 mM. A continuación, se añadieron 45 μL de ferricianuro potásico, tanto a las muestras como a los blancos. Se midió la absorbancia a 510 nm. El método colorimétrico utilizado está basado en el método de medida de fenol adaptado por Johnson (1977) para el ensayo de NTE y optimizado en el laboratorio de toxicología (Escudero et al. 1997, Mangas et al. 2012).

4.6 CURVA DE CALIBRADO DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE FENOL.

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 realizaron utilizando 10 concentraciones crecientes de fenol en el rango de 0 y 0,5 mM en un volumen de reacción de 350 μL preparadas en agua ultrapura a partir de una concentración de 1 mM. A 200 μL de cada una de las disoluciones estándar de fenol se le añadieron 100 μL de BSA 0,1%, 100 μL de SDS 2% / AAP 10 mM y 50 μL de ferricianuro potásico. Se transfirieron 250 μL de cada muestra a una placa de 96 pocillos, se midió la absorbancia a 510 nm.

4.7 CURVA DE CALIBRADO DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE TIOLINA.

Se realizó una curva de calibrado del método colorimétrico de tiocolina. Se utilizaron 10 concentraciones de tiocolina preparadas en agua ultrapura, en un rango de 0 y 0,667 mM en un volumen de reacción de 400 μL . A 100 μL de las distintas disoluciones de tiocolina se les añadió 100 μL de BSA 1%, 100 μL de SDS/DTNB y 100 μL de BSA 1%. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm.

4.8 PRETRATAMIENTO DE hAChE CON AtCh o ACh Y POSTERIOR ULTRAFILTRACIÓN.

Pretratamiento con AtCh o ACh

Para la realización de los ensayos de ultrafiltración se utilizaron termobloques de aluminio a la temperatura óptima de la enzima 37°C. En tubos de ensayo se colocaron 310µL de la enzima a una concentración de 40 nM junto a 310 µL de los diferentes sustratos (acetiltiocolina o acetilcolina en agua ultrapura a concentración 2mM). Se incluyeron en el ensayo controles y blancos. El tiempo de tratamiento fue de 15 minutos en ambos casos. A continuación, se extrajo una alícuota de 100 µL y se diluyó hasta alcanzar la concentración deseada para medir la actividad fenilvalerato esterasa o fenilacetato esterasa tras el tratamiento.

Ultrafiltración y posterior dilución

Un volumen de 500 µL de las muestras preparadas en el paso anterior (muestras pretratadas y blancos), se colocaron en filtros (Ultracel 50K de Milipore). A estas se les añadió TP a pH 7,4 hasta llegar a un volumen final de 12 mL. Acto seguido se centrifugó a 9000 x g durante 30 minutos a 4°C. El material retenido se diluyó nuevamente con TP hasta alcanzar 12 mL y se procedió a ultrafiltrar. Se realizó este proceso tres veces y finalmente se llevó a la concentración de enzima requerida para cada ensayo con BSA 0,1%. La concentración residual estimada de AtCh y ACh tras el proceso de ultrafiltración y dilución se especifica 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 PV asa y FAc esterasa de acuerdo a los siguientes tiempos: 0, 6, 10 y 15 minutos.

4.9 PRETRATAMIENTO DE hAChE CON PV o FAC POSTERIOR ULTRAFILTRACIÓN.

Pretratamiento con PV o FAC

Para la realización de los ensayos de ultrafiltración se utilizaron termobloques de aluminio a la temperatura óptima de la enzima 37°C. En tubos de ensayo se colocaron 80µL de la enzima a una concentración de 10 nM junto a 80 µL de los diferentes sustratos (fenilvalerato o fenilacetato en agua ultrapura a concentración 6mM y 1mM respectivamente). Se incluyeron en el ensayo controles y blancos. El tiempo de tratamiento fue de 15 minutos en ambos casos. A continuación, se extrajo una alícuota de 20 µL y se diluyó hasta alcanzar la concentración de hAChE deseada para medir la actividad acetilcolinesterasa tras el tratamiento.

Ultrafiltración y posterior dilución

Un volumen de 100 µL de las muestras preparadas en el paso anterior (muestras pretratadas y blancos), se colocaron en filtros (Ultracel 50K de Milipore). A estas se les añadió TP a pH 7,4 hasta llegar a un volumen final de 12 mL. Acto seguido se centrifugó a 9000 x g durante 30 minutos a 4°C. El material retenido se diluyó nuevamente con TP hasta alcanzar 12 mL y se procedió a ultrafiltrar. Se realizó este proceso tres veces y finalmente se llevó a la concentración de enzima requerida para cada ensayo con BSA 0,1%. La concentración residual estimada de FaC y PV tras el proceso de ultrafiltración y dilución se especifica 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, 6, 10 y 15 minutos.

4.10 ANÁLISIS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.

4.10.1 ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados de los ensayos se analizaron con el programa SigmaPlot versión 13.0 (Systat Software Inc, Chicago, USA) para Windows con el objetivo de obtener información tanto cualitativa como cuantitativa sobre el mecanismo de interacción con el sustrato. Este módulo crea gráficos directos lineales, gráficos secundarios e informes numéricos.

5. RESULTADOS

5.1 Curva de calibrado de fenol

Se realizó una curva de calibrado de fenol para seguidamente calcular la concentración de fenol producida en los experimentos de actividad PVasa y FAc esterasa. Los resultados se muestran en la **figura 5.2**.

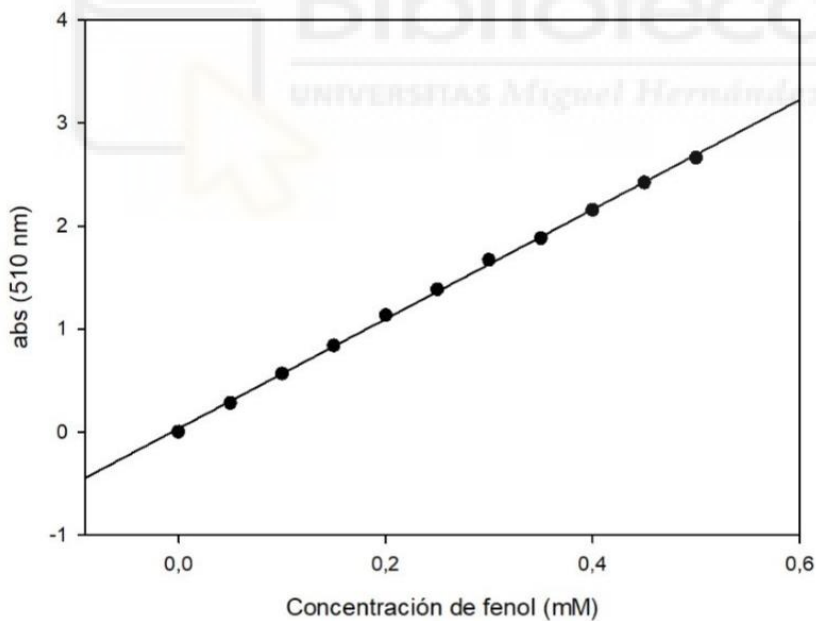


Figura 5.2 Curva de calibrado de fenol.

La ecuación de la recta de calibrado de fenol obtenida mediante el programa SigmaPlot fue:

$$\text{Absorbancia} = 0,0327 + 5,3226 * \text{concentración}$$

5.2 Curva de calibrado de tiocolina.

Se realizó la curva de calibrado de tiocolina para el posterior cálculo de la concentración de tiocolina producida en los experimentos de actividad acetilcolinesterasa. Los resultados se muestran en la **figura 5.3**

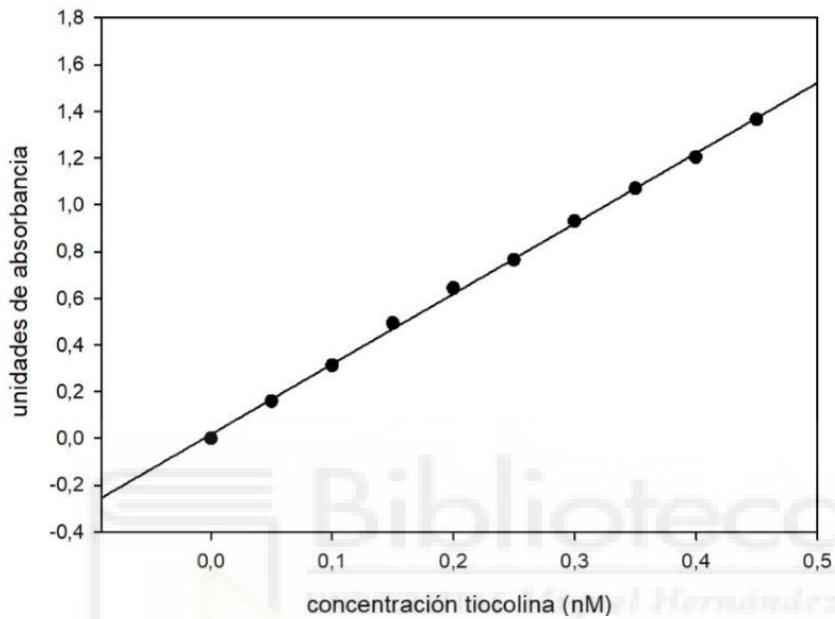


Figura 5.3: Curva de calibrado de tiocolina

La ecuación de la recta que se determinó con el programa SigmaPlot fue:

$$\text{Absorbancia} = 0,015 + 3,02 * \text{concentración}$$

5.3 Actividad acetilcolinesterasa en hAChE en presencia de AtCh

Se estudió la actividad acetilcolinesterasa para la hAChE recombinante con la concentración de hAChE a 0,1875 nM en el volumen de reacción con una mezcla de 1 mM de FAc y 0,02 mM de AtCh para los siguientes tiempos de reacción: 0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 10 Y 15 minutos. A partir de los 4-6 minutos aproximadamente la concentración de tiocolina alcanzada es de 0,025 mM, que correspondería a la totalidad de concentración de AtCh utilizada; de modo que asumimos que toda la AtCh está hidrolizada a partir de este tiempo.

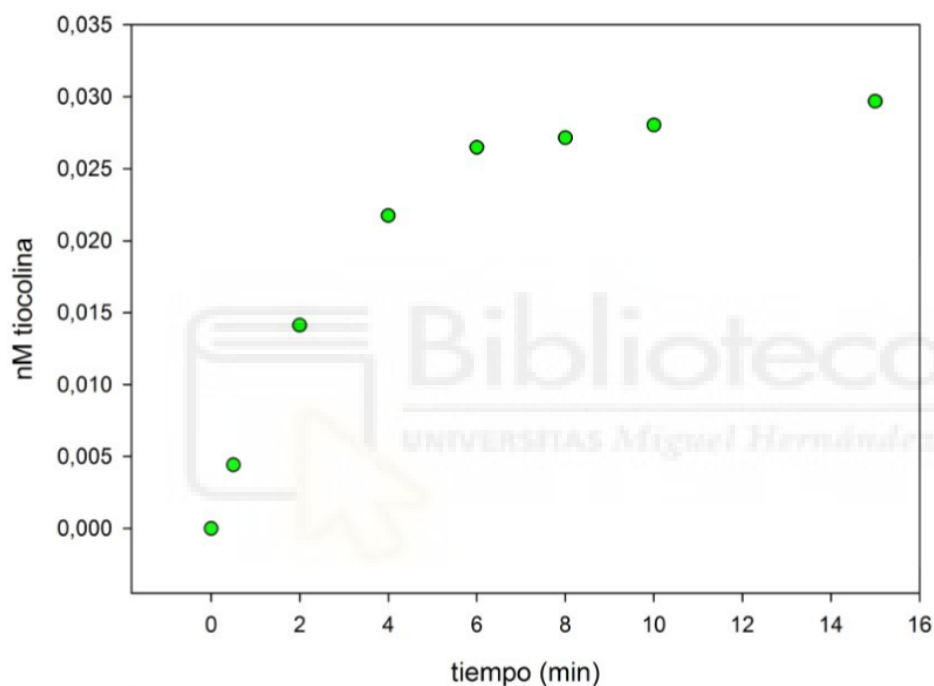


Figura 5.4 Actividad colinesterasa para hAChE. Ensayo realizado en presencia de 0,02 mM de AtCh y 1 mM de FAc (puntos verdes).

5.4 Actividad FAc esterasa de AChE humana en presencia de AtCh.

Se realizó un ensayo para estudiar la actividad FAc esterasa de la hAChE a una concentración de 0,1875 nM con 1 mM de FAc y 0,02 mM de AtCh en volumen de reacción. Se dejó reaccionar durante los siguientes tiempos: 0, 0,5, 2, 4, 6, 8 10, 12 y 15 min. Como control se siguió el mismo procedimiento usando 1 mM de FAc sin AtCh. Los datos se muestran en la

Figura 5.5 y los parámetros de los ajustes lineales y el tiempo teórico de inflexión en la **tabla 5.1**

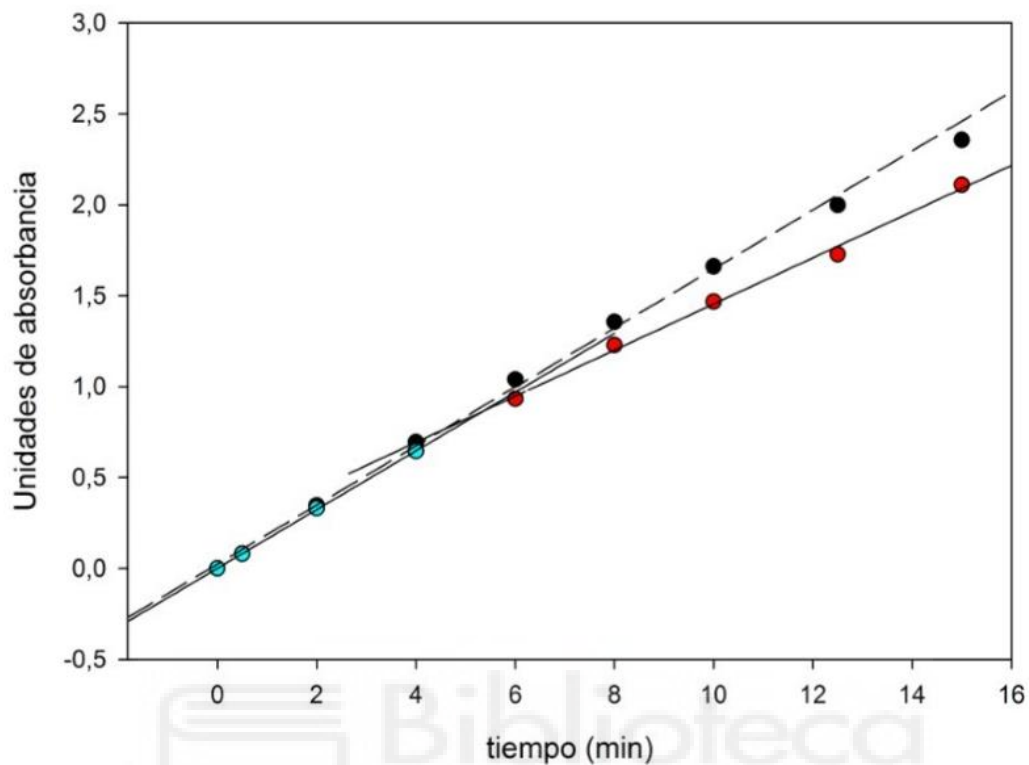


Figura 5.5: Actividad FAc esterasa de hAChE en ausencia de AtCh (puntos negros) y en presencia de 0,02 mM de AtCh (puntos azules y rojos). La recta discontinua es la línea de tendencia asociada a los puntos negros, la recta de puntos azules es la línea de tendencia asociada a los cuatro primeros tiempos de la mezcla de sustratos (0, 0,5, 2 Y 4 min) y la recta de los puntos rojos está asociada a los cinco últimos tiempos de este mismo ensayo (6, 8, 10, 12 y 15 min). El tiempo teórico de inflexión es el punto de corte entre las dos líneas de tendencia de los puntos rojos, a partir del cual se observa un cambio de pendiente al analizar los tiempos como rectas independientes. Para el cálculo de este punto se igualó la concentración de fenol de las rectas roja y azul y se extrapoló este punto. Este experimento se repitió con las condiciones mencionadas en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1 Se muestran las condiciones en las que se realizó el ensayo y el tiempo teórico de inflexión extrapolado del experimento. Fase 1 velocidad a tiempos bajos de reacción (0, 0,5, 2 Y 4 min) en los cuales no se observa ningún efecto con respecto al control y fase 2 velocidad a tiempos mayores de reacción (6, 8, 10, 12 y 15 min), en los cuales se observa una reducción de velocidad respecto al control.

Condiciones	Pendiente de la recta	Tiempo teórico de inflexión
[hAChE] = 0,1875 mM	Sin AtCh = 0,1624	5,3 minutos
[FAc] = 1 mM	Con AtCh fase 1 =0,1614	
[AtCh] = 0,02 mM	Con AtCh fase 2 =0,1269	

5.5 Actividad PVasa tras tratamiento con AChI o AtCh y posterior ultrafiltración.

5.5.1 Actividad PVasa de hAChE pretratada con AtCh.

Se estudió la actividad PVasa a concentración 5 nM de hAChE en volumen de reacción en muestras pretratadas previamente con AtCh, a una concentración de 2 mM durante 15 min. y ultrafiltradas posteriormente. Se realizó el ensayo para los tiempos de reacción 2, 6, 10 y 15 minutos. Como control se siguió el mismo procedimiento en ausencia de AtCh y presencia de agua ultrapura.

Se observó que la muestra pretratada con AtCh (puntos azules) presenta una mayor pendiente y consecuentemente una mayor velocidad que el control (puntos rojos). Los resultados se muestran en la **figura 5.6 y las tablas 5.2.**

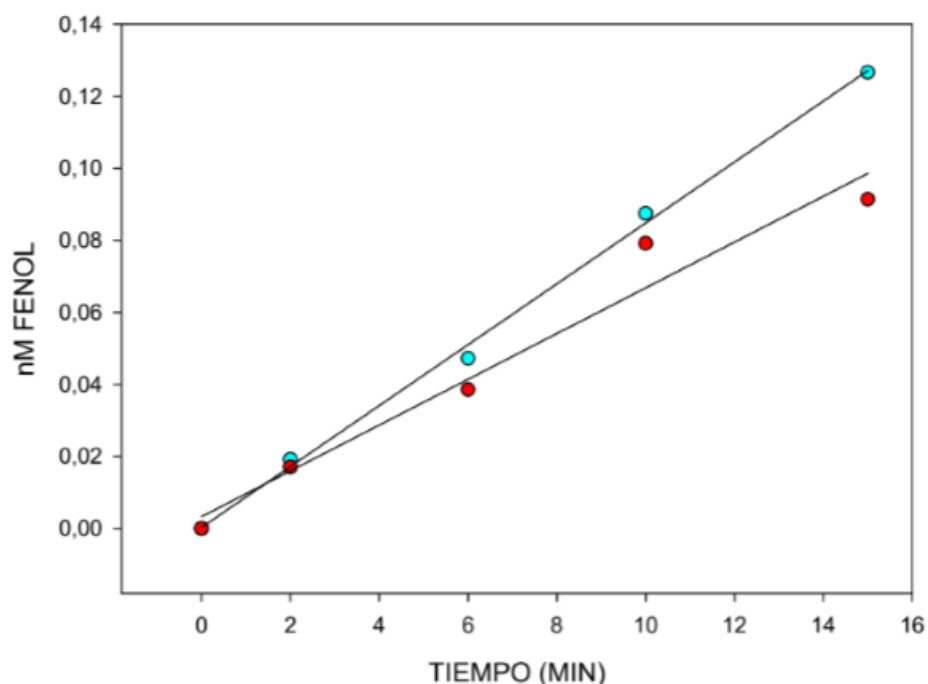


Figura 5.6: Actividad PVasa pretratada con 2 mM de AtCh (puntos azules) y control (puntos rojos).

Tabla 5.2 A: velocidades y % de recuperación de muestra pretratada con AtCh y control.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD DE LA MUESTRA PRETRATADA (nM fenol/min)	% RECUPERACIÓN CONTROL	% RECUPERACIÓN MUESTRA PRETRATADA
1	0,0025	0,0063	68,53%	68,30%
2	0,0064	0,0085	70,21%	66,23%
3	0,0106	0,0120	93,35%	65,63%

Para comparar las muestras y los controles las pendientes de las rectas se han llevado a un % de recuperación teórica del 100%, obteniendo así los resultados de la tabla 5.2 B.

Si aproximamos y consideramos que la recuperación de la actividad es del 100% podríamos estimar la velocidad con esta recuperación y comparar la velocidad con esta circunstancia. Teniendo en cuenta el % de recuperación del control para evitar las ' de los productos de reacción en las muestras no ultrafiltradas, esta aproximación se realiza de acuerdo con la siguiente deducción: La recuperación de actividad después de la ultrafiltración viene dada

por la ecuación 1, donde X es la recuperación, E es la concentración de enzima antes de la ultrafiltración y E' es la concentración de enzima después de la ultrafiltración.

$$X = \frac{E' \cdot 100}{E}$$

Ecuación 1

Despejando E

$$E = \frac{E' \cdot 100}{X}$$

Ecuación 2

Teniendo en cuenta que la velocidad de formación de producto antes de la ultrafiltración es definida por la ecuación 3, donde S es la concentración de sustrato

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot E \cdot S$$

Ecuación 3

y que la ecuación 4 define la velocidad de formación de producto después de la ultrafiltración

$$\frac{dP'}{dt} = k \cdot E' \cdot S$$

Ecuación 4

podemos sustituir la ecuación 2 en la ecuación 3

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k \cdot E' \cdot 100}{X} \cdot S = \frac{100}{X} \cdot k \cdot E' \cdot S$$

obteniendo la relación entre la velocidad de la formación de producto antes de la ultrafiltración y después del proceso de ultrafiltración.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{100}{X} \cdot \frac{dP'}{dt}$$

Ecuación 5

Por lo que la ecuación 5, nos permite aproximar la velocidad de formación de producto que obtendremos si la recuperación de actividad fuese el 100%.

Tabla 5.2 B: Velocidades teóricas con un % de recuperación del 100%.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD MUESTRA (nM fenol/min)
1	0,00365	0,00919
2	0,00911	0,01210
3	0,01136	0,01285

La concentración residual de AtCh después de las ultrafiltraciones fue de $6,1 \times 10^{-5} \mu\text{M}$.

5.5.2 Actividad PVasa de hAChE pretratada con ACh

Se estudió la actividad PVasa a concentración 5 nM de hAChE en volumen de reacción en muestras pretratadas previamente con ACh, a una concentración de 2 mM durante 15 min. y ultrafiltradas posteriormente. Se realizó el ensayo para los tiempos de reacción 2, 6, 10 y 15 minutos. Como control se siguió el mismo procedimiento en ausencia de ACh y presencia de agua ultrapura.

Se observó que la muestra pretratada con ACh (puntos azules) presenta una mayor pendiente y consecuentemente una mayor velocidad que el control (puntos rojos). Los resultados se muestran en la **figura 5.7 y las tablas 5.3**.

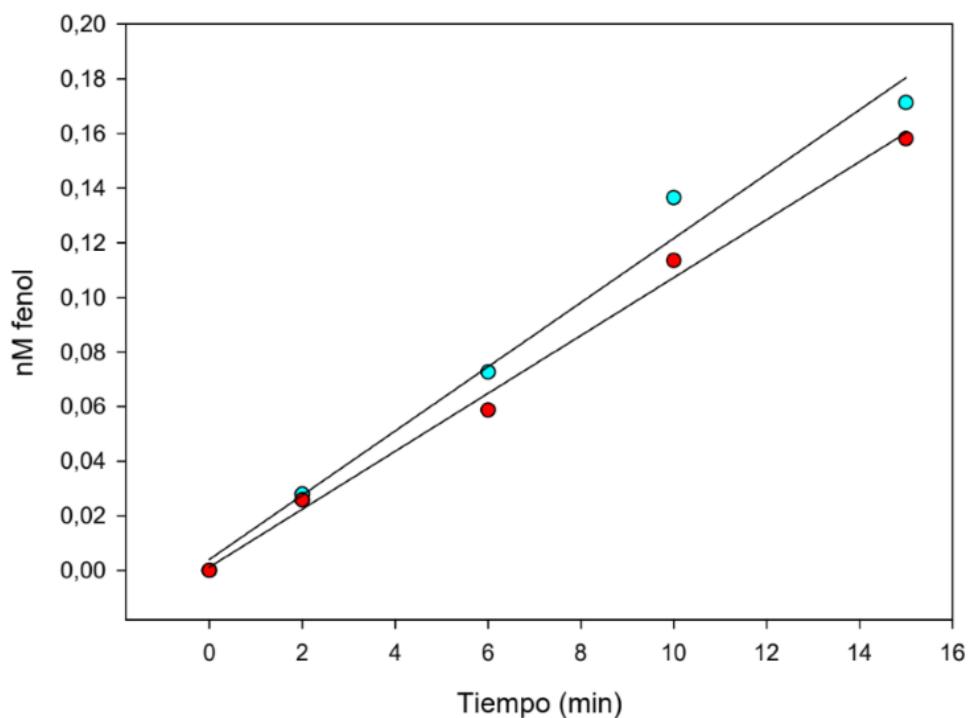


Figura 5.7: Actividad PVasa en función del tiempo tratada con 2 mM de ACh (puntos azules) y control (puntos rojos)

Tabla 5.3 A: velocidades y % de recuperación de muestra pretratada con ACh y control.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD DEL CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD DE LA MUESTRA PRETRATADA (nM fenol/min)	% RECUPERACIÓN CONTROL	% RECUPERACIÓN MUESTRA PRETRATADA
1	0,0106	0,0118	93,35%	66,49%
2	0,0236	0,0259	80,03%	101,27%
3	0,0106	0,0111	54,54%	57,10%

Para poder realizar una comparativa entre las muestras y los controles las pendientes de las rectas se han llevado a un % de recuperación teórico del 100% obteniendo así los resultados mostrados en la **tabla 5.3 B**

TABLA 5.3 B: Velocidades teóricas con un % de recuperación del 100%.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD MUESTRA (nM fenol/min)
1	0,01136	0,01264
2	0,0293	0,03236
3	0,1943	0,02035

La concentración residual de ACh después de las ultrafiltraciones fue de $4,1 \times 10^{-4} \mu\text{M}$.

5.6 Actividad FAc esterasa tratamiento y posterior ultrafiltración con ACh o AtCh.

5.6.1 Actividad FAc esterasa de muestra pretratada con ACh

Se estudió la actividad P_Vasa a concentración 0,185 nM de hAChE en volumen de reacción en muestras pretratadas previamente con ACh, a una concentración de 2 mM durante 15 minutos y ultrafiltradas posteriormente. Se realizó el ensayo para los tiempos de reacción 2, 6, 10 y 15 minutos. Como control se siguió el mismo procedimiento en ausencia de ACh y presencia de agua ultrapura.

Se observó que la muestra pretratada con ACh (puntos azules) presenta una pendiente mayor a la del control (puntos rojos). Los resultados se muestran en la **figura 5.8 y las tablas 5.4.**

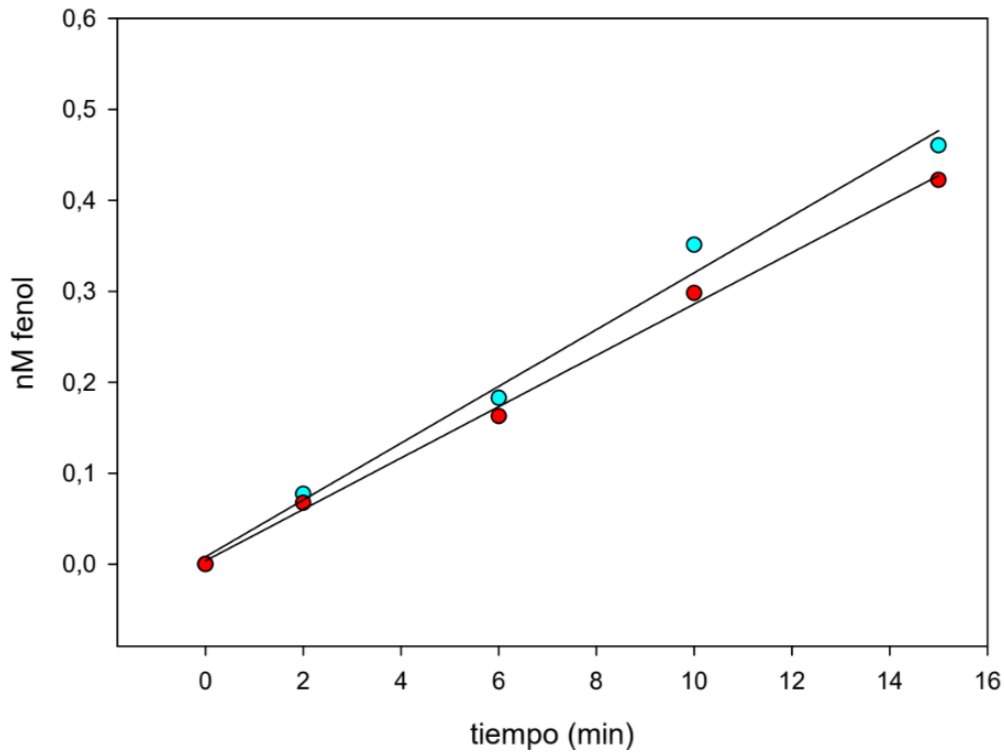


Figura 5.8: Actividad FAc esterasa pretratada con 2 mM de ACh (puntos azules) y control (puntos rojos)

TABLA 5.4: velocidades y % de recuperación de muestra pretratada con ACh y control.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD DEL CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD DE LA MUESTRA PRETRATADA (nM fenol/min)	% RECUPERACIÓN DEL CONTROL	% RECUPERACIÓN DE LA MUESTRA PRETRATADA
1	0,0136	0,0148	67,40%	86,18%
2	0,0282	0,0312	50,42%	67,69%
3	0,0199	0,0202	72,22%	68,02%

Para poder realizar una comparativa entre las muestras y los controles las pendientes de las rectas se han llevado a un % de recuperación teórico del 100% obteniendo así los resultados mostrados en la **tabla 5.4 B**

TABLA 5.4 B: Velocidades teóricas con un % de recuperación del 100%.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD MUESTRA (nM fenol/min)
1	0,0201	0,02189
2	0,036	0,04629
3	0,0275	0,04006

5.6.2 Actividad FAc esterasa de muestra pretratada con AtCh

Se estudió la actividad FAc esterasa a concentración 0,185 nM de hAChE en volumen de reacción en muestras pretratadas previamente con AtCh, a una concentración de 2 mM durante 15 min. y ultrafiltradas posteriormente. Se realizó el ensayo para los tiempos de reacción 2, 6, 10 y 15 minutos. Como control se siguió el mismo procedimiento en ausencia de AtCh y presencia de agua ultrapura.

Se observó que el control (puntos rojos) presenta una mayor pendiente y consecuentemente una mayor velocidad que la muestra pretratada con AtCh (puntos azules). Los resultados se muestran en la **figura 5.9** y **las tablas 5.5**.

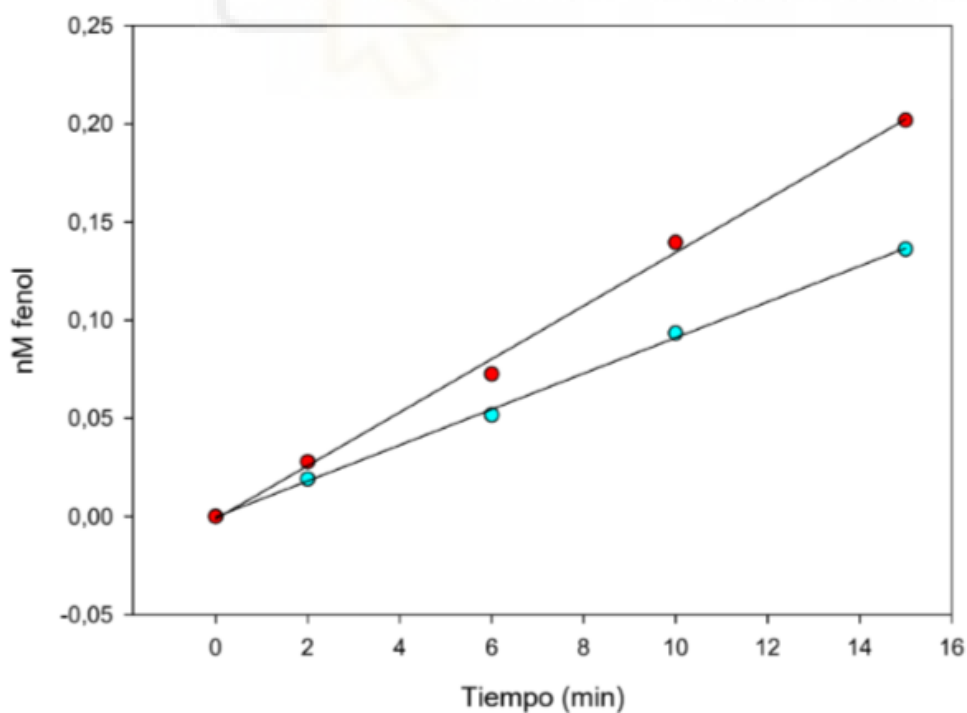


Figura 5.9 A actividad FAc esterasa pretratada con 2 mM de AtCh (puntos azules) y control (puntos rojos).

Tabla 5.5 A: velocidades y % de recuperación de muestra pretratada con AtCh y control.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD MUESTRA PRETRATADA (nM fenol/min)	% RECUPERACIÓN CONTROL	% RECUPERACIÓN MUESTRA PRETRATADA
1	0,0083	0,0065	68%	69%
2	0,0110	0,0066	67,59%	66,12%
3	0,0136	0,0091	67,40%	76,11%

Para comparar las muestras y los controles las pendientes de las rectas se han llevado a un % de recuperación teórica del 100%, obteniendo así los resultados de la tabla 5.5 B.

Tabla 5.5 B: Velocidades teóricas con un % de recuperación del 100%.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD MUESTRA (nM fenol/min)
1	0,0120	0,00956
2	0,0162	0,00976
3	0,0201	0,01350

5.7 Actividad acetilcolinesterasa tras tratamiento y posterior ultrafiltración con ACh.

Se estudió la actividad acetilcolinesterasa a concentración 0,05 nM de hAChE en volumen de reacción en muestras pretratadas previamente con ACh, a una concentración de 2 mM durante 15 min. y ultrafiltradas posteriormente. Se realizó el ensayo para los tiempos de reacción 2, 6, 10 y 15 minutos. Como control se siguió el mismo procedimiento en ausencia de ACh y presencia de agua ultrapura.

Se observó que el control (puntos rojos) presenta una pendiente similar que la muestra pretratada con AtCh (puntos azules). Los resultados se muestran en la **figura 5.10** y las **tablas 5.6**.

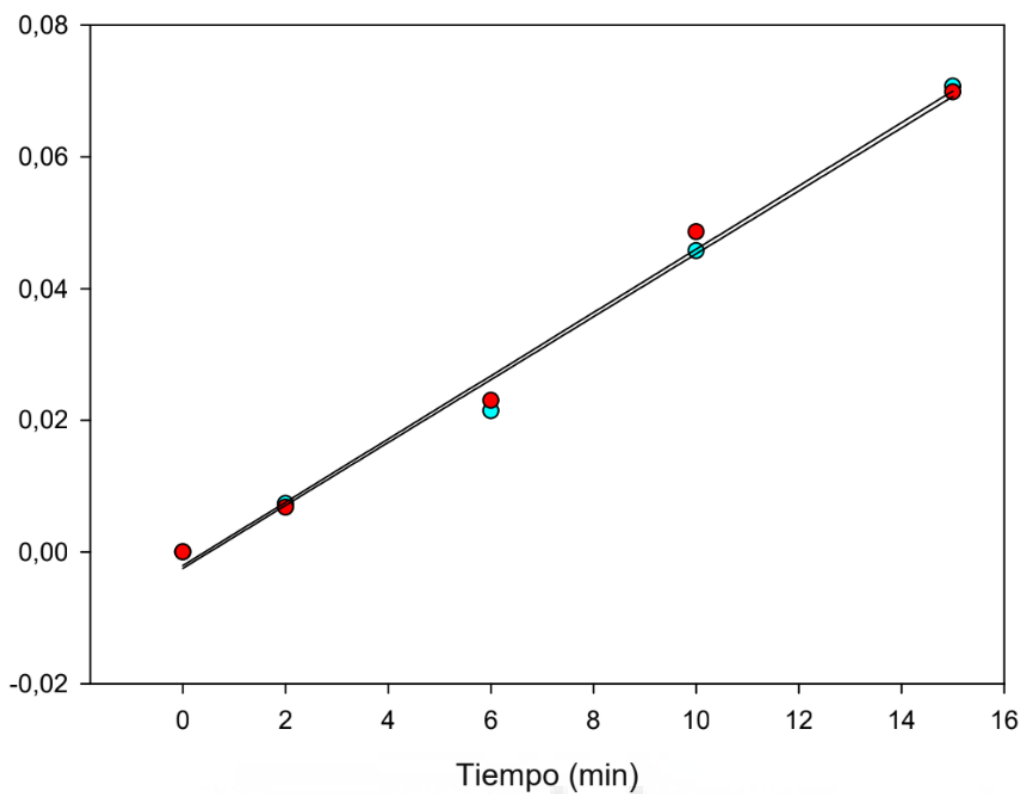


Figura 5.10 Actividad Acetilcolinesterasa pretratada con 2 mM de ACh (puntos azules) y control (puntos rojos)

Tabla 5.6 A: velocidades y % de recuperación de muestra pretratada con ACh y control.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD DEL CONTROL	VELOCIDAD DE LA MUESTRA PRETRATADA	% RECUPERACIÓN DEL CONTROL	% RECUPERACIÓN DE LA MUESTRA PRETRATADA
1	0,0066	0,0052	55,11	37,96
2	0,0048	0,0048	36,65	29,03

Tabla 5.6 B: Velocidades teóricas con un % de recuperación del 100%.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL	VELOCIDAD MUESTRA
1	0,0119	0,009
2	0,0131	0,0131

5.8 Actividad acetilcolinesterasa tras tratamiento y posterior ultrafiltración con PV o FAc.

5.8.1 Actividad acetilcolinesterasa de muestra pretratada con PV

Se estudió la actividad Acetilcolinesterasa a concentración 0,05 nM de hAChE en volumen de reacción en muestras pretratadas previamente con PV, a una concentración de 3 mM durante 15 min. y ultrafiltradas posteriormente. Se realizó el ensayo para los tiempos de reacción 2, 6, 10 y 15 minutos. Como control se siguió el mismo procedimiento en ausencia de PV y presencia de agua ultrapura.

Se observó que el control (puntos rojos) presenta una mayor pendiente idéntica que la muestra pretratada con PV (puntos azules). Los resultados se muestran en la **figura 5.11** y las **tablas 5.7**.

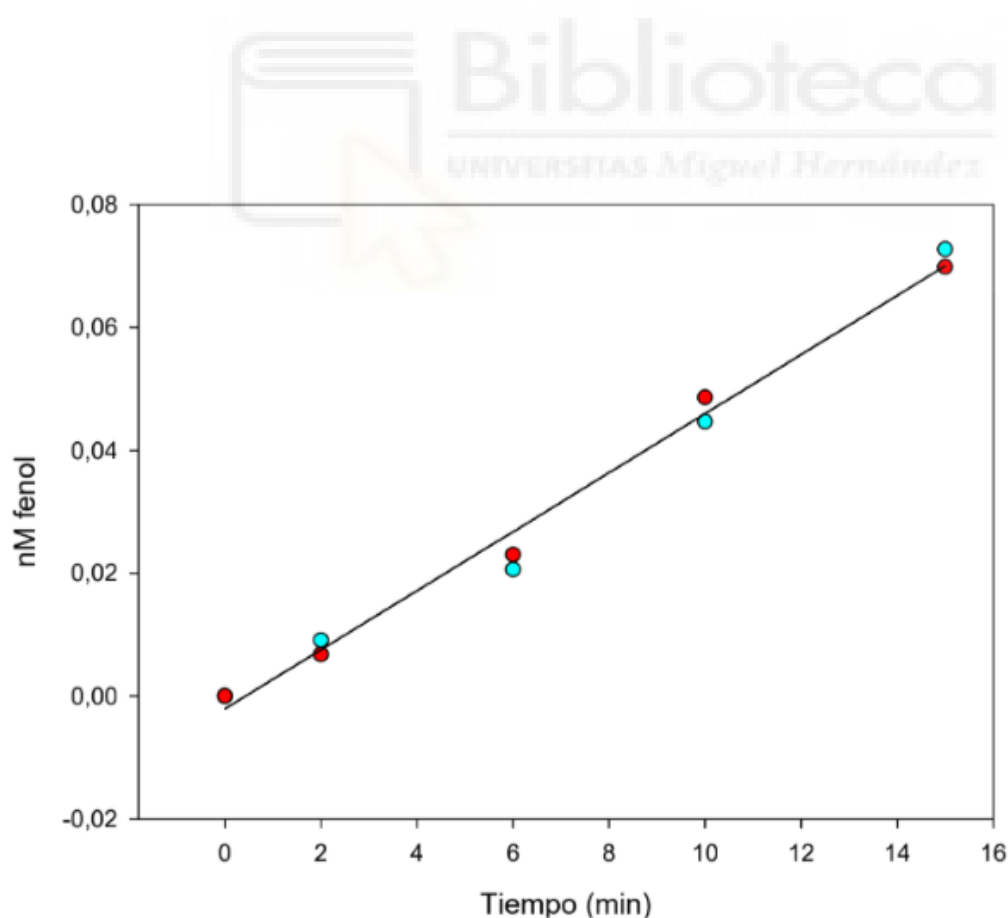


Figura 5.11 Actividad Acetilcolinesterasa pretratada con 3 mM de PV (puntos azules) y control (puntos rojos).

Tabla 5.7 A: velocidades y % de recuperación de muestra pretratada con PV y control.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD MUESTRA PRETRATADA (nM fenol/min)	% RECUPERACIÓN CONTROL	% RECUPERACIÓN MUESTRA PRETRATADA
1	0,0066	0,0039	55,12	39,65
2	0,0048	0,0048	36,63	32,96

Tabla 5.7 B: Velocidades teóricas con un % de recuperación del 100%.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD MUESTRA (nM fenol/min)
1	0,011978	0,0079
2	0,013433	0,0131

La concentración residual de PV después de las ultrafiltraciones fue de $5,5 \times 10^{-4} \mu\text{M}$.

5.8.2 Actividad acetilcolinesterasa de muestra pretratada con FAc

Se estudió la actividad Acetilcolinesterasa a concentración 0,05 nM de hAChE en volumen de reacción en muestras pretratadas previamente con FAc, a una concentración de 1 mM durante 15 min. y ultrafiltradas posteriormente. Se realizó el ensayo para los tiempos de reacción 2, 6, 10 y 15 minutos. Como control se siguió el mismo procedimiento en ausencia de AtCh y presencia de agua ultrapura.

Se observó que el control (puntos rojos) presenta una pendiente similar y consecuentemente una velocidad parecida a la muestra pretratada con AtCh (puntos azules). Los resultados se muestran en la **figura 5.12 y las tablas 5.8**.

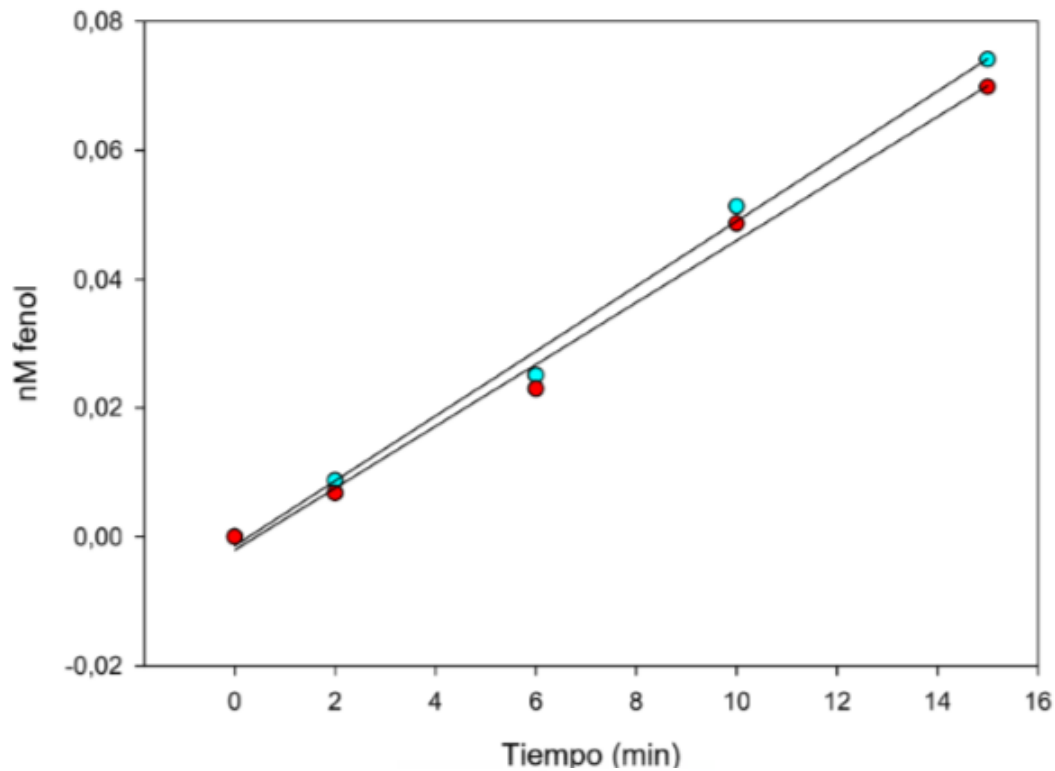


Figura 5.12 Actividad Acetilcolinesterasa pretratada con 1 mM de FAc (puntos azules) y control (puntos rojos).

Tabla 5.8 A: velocidades y % de recuperación de muestra pretratada con FAc y control.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD DEL CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD DE LA MUESTRA PRETRATADA (nM fenol/min)	% RECUPERACIÓN DEL CONTROL	% RECUPERACIÓN DE LA MUESTRA PRETRATADA
1	0,0066	0,0071	55,09	59,21
2	0,0048	0,0050	36,64	33,17

Tabla 5.8 B: Velocidades teóricas con un % de recuperación del 100%.

EXPERIMENTO	VELOCIDAD DEL CONTROL (nM fenol/min)	VELOCIDAD DE LA MUESTRA (nM fenol/min)
1	0,011978	0,0128
2	0,013433	0,0136

La concentración residual de FAc después de las ultrafiltraciones fue de $3,2 \times 10^{-4} \mu\text{M}$.

6. DISCUSIÓN

6.1 Actividad FAc esterasa en presencia de ACh y AtCh

El experimento de actividad FAc en presencia de AtCh (Figura 5.5) mostró que a partir de un tiempo teórico de inflexión (5,3 minutos) la actividad FAc esterasa se veía inhibida ligeramente en presencia de AtCh a concentraciones muy bajas (0,02 mM de AtCh frente a 1 mM de FAc). En las mismas condiciones, la actividad acetilcolinesterasa en presencia de FAc (Figura 5.4) mostró que entre 4-5 minutos de reacción todo el sustrato (AtCh) se había hidrolizado totalmente. Los resultados muestran que la reducción de la actividad FAc esterasa se observa una vez la AtCh se ha hidrolizado totalmente, es decir, está producida por uno de los productos de reacción, la tiocolina. Esta observación apoya los resultados obtenidos por (Poveda 2021), que describió el mismo efecto a un tiempo teórico de inflexión de 4,6 minutos.

Se observó una activación producida por la tiocolina (Terol 2018; Estevez et al., 2019), que podría no abandonar el sitio activo una vez que la AtCh se hubiera hidrolizado totalmente, interaccionando dentro del sitio activo e incrementando la actividad PVasa. Estas diferencias en el comportamiento de ambos sustratos con la hAChE podrían ser debido a su diferente estructura química (Figura 1.3).

6.2 Actividad PVasa tras ultrafiltración en muestras pretratadas con ACh o AtCh.

El experimento de actividad PVasa en presencia de AtCh (Figura 5.9) mostró que la velocidad de la actividad PVasa se incrementa en las muestras una vez eliminada la AtCh del medio (tabla 5.2 A). Las velocidades obtenidas, aproximando que la recuperación de proteína tras el proceso de ultrafiltración fuese el 100%, refleja que la velocidad de la actividad PVasa aumenta en las muestras pretratadas.

Esta aproximación es coherente si consideramos que la pérdida de proteína es homogénea en todos los filtros, ya que, se ha descrito que la pérdida de AChE puede deberse a que ésta, puede quedarse adherida en las superficies de los recipientes de plástico (datos no publicados). Teniendo en cuenta que la superficie de los filtros es de plástico y que la superficie de contacto con la disolución de proteína es igual en todos los filtros, podemos

estimar que la pérdida de proteína será similar en todos ellos. El porcentaje de recuperación para realizar esta aproximación sería el de las muestras no pretratadas porque la Ch podría interaccionar con la actividad PVasa en las muestras no ultrafiltradas alterando así el porcentaje de recuperación de las muestras ultrafiltradas (Estevez. et al., 2019).

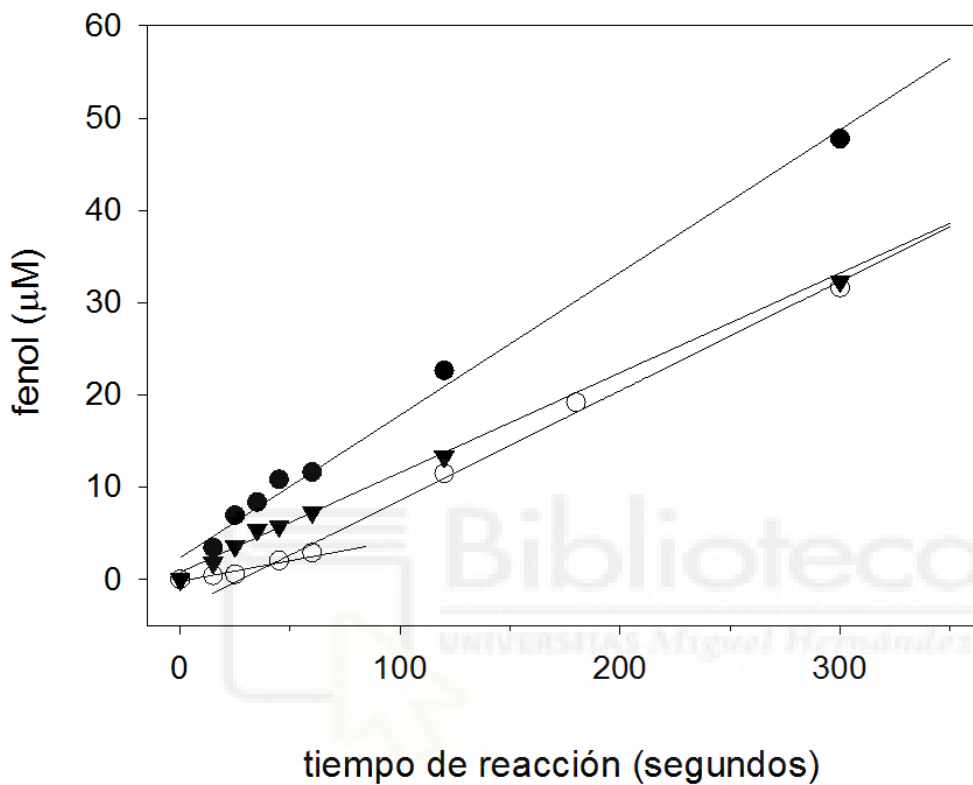


Figura 6.1 Dependencia temporal de la actividad de la PVasa en ausencia y presencia de ACh o Ch. Se ensayaron 5 nM de hAChE en volumen de reacción en diferentes tiempos de reacción. Los círculos negros representan la hidrólisis de PV en ausencia de ACh o Ch. Los círculos blancos representan la hidrólisis de PV en presencia de 0.5 mM de ACh. Los triángulos negros representan la hidrólisis de PV en presencia de 0.5 mM de Ch (Estevez. et al., 2019).

El incremento de PVasa en muestras tratadas con AtCh se ha observado en el trabajo de (Terol 2018) y por (Estévez et.al) donde se observa que la actividad PVasa, una vez que la AtCh era totalmente hidrolizada, era superior a la velocidad alcanzada en muestras donde no había AtCh. En este trabajo se demuestra, que las alteraciones en el centro activo tras el pretratamiento con AtCh, es permanente ya que se ha eliminado casi totalmente la tiocolina del medio de reacción.

6.3 Actividad FAc esterasa tras ultrafiltración en muestras pretratadas con ACh o AtCh.

El experimento de actividad FAc esterasa en presencia de AtCh (Figura 5.9) mostró que la velocidad de la actividad FAc esterasa disminuye en las muestras una vez eliminada la AtCh del medio (tabla 5.5 A). Las velocidades obtenidas, aproximando que la recuperación de proteína tras el proceso de ultrafiltración fuera el 100%, (tabla 5.5 B) confirman que la velocidad de la actividad FAc esterasa disminuye en las muestras pretratadas. Estos resultados indican que el pretratamiento de las muestras con AtCh tiene un efecto inhibitor en la actividad de la FAc esterasa. Las muestras pretratadas con AtCh señalan una disminución de la velocidad de reacción de la enzima, lo cual se refleja en la pendiente menos pronunciada en la gráfica. Esto no es debido a la competencia, ya que la concentración residual después de la ultrafiltración fue de $6,1 \times 10^{-5} \mu\text{M}$.

En los experimentos con muestras pretratadas con ACh no se observan diferencias significativas en la velocidad de la muestra pretratada y el control (figura 5.8) y (tablas 5.4 A, B), por lo que la colina no altera la actividad FAc esterasa.



6.4 Actividad acetilcolinesterasa tras ultrafiltración en muestras pretratadas con ACh, PV o FAc.

El experimento de actividad acetilcolinesterasa en presencia de ACh (Figura 5.10) mostró que la velocidad de la actividad acetilcolinesterasa no se ve afectada en las muestras una vez eliminada la ACh del medio (tabla 5.6 A). Las velocidades obtenidas, aproximando que la recuperación tras el proceso de ultrafiltración fuese el 100%, (tabla 5.6 B) confirman que la velocidad de la actividad acetilcolinesterasa es prácticamente idéntica en la muestra pretratada y en el control (5.6 B)

En las muestras pretratadas con PV o FAc se obtienen similares resultados (figuras 5.11 y 5.12)

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

7.1 Conclusiones

1. Se confirma que las AtCh se hidroliza totalmente en un tiempo de reacción entre 4-5 min según las condiciones experimentales realizadas en este trabajo.
2. Los experimentos con actividad PVasa tras ultrafiltración de muestras pretratadas con AtCh muestran un incremento de actividad frente a muestras no pretratadas indicando que la tCh liberada en el centro activo modifica éste de manera permanente modificando la actividad PVasa.
3. Los experimentos con actividad PVasa tras ultrafiltración de muestras pretratadas con ACh muestran un incremento de actividad frente a muestras no pretratadas indicando que la Ch liberada en el centro activo modifica éste de manera permanente modificando la actividad PVasa.
4. Los experimentos con actividad FAc esterasa tras ultrafiltración de muestras pretratadas con ACh muestran un incremento de actividad frente a muestras no pretratadas indicando que la Ch liberada en el centro activo modifica éste de manera permanente modificando la actividad FAc esterasa.
5. Los experimentos con actividad FAc esterasa tras ultrafiltración de muestras pretratadas con AtCh muestran una inhibición de actividad frente a muestras no pretratadas indicando que la tCh liberada en el centro activo modifica éste de manera permanente modificando la actividad FAc esterasa.
6. Los experimentos con actividad acetilcolinesterasa tras ultrafiltración de muestras pretratadas con ACh utilizando la AtCh como sustrato no muestran alteraciones significativas de actividad frente a muestras no pretratadas.
7. Los experimentos con actividad acetilcolinesterasa tras ultrafiltración de muestras pretratadas con PV utilizando la AtCh como sustrato no muestran alteraciones significativas de actividad frente a muestras no pretratadas.

8. Los experimentos con actividad acetilcolinesterasa tras ultrafiltración de muestras pretratadas con FAc utilizando la AtCh como sustrato no muestran alteraciones significativas de actividad frente a muestras no pretratadas.

7.2 proyecciones futuras

- Estudiar muestras pretratadas de hAChE con AtCh y ACh con espectrometría de masas para ver si hay cambios irreversibles en la estructura de la hAChE.
- Realizar estudios con muestras pretratadas con FAc, PV, AtCh y ACh de colinesterasas (AChE, BuChE), de diferentes especies recombinantes y no recombinantes.



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.
- ✓ Alves de Almeida, P.A., Novato, E., Beirão, P. (2017). Microcalorimetric Study of Acetylcholine and Acetylthiocholine Hydrolysis by Acetylcholinesterase. April 2017 *Advances in Enzyme Research* 2017(5):1-12 DOI:10.4236/aer.2017.51001
- ✓ Benabent M, Vilanova E, Mangas I, Sogorb MA, Estevez J. (2014). Interaction between substrates suggests a relationship between organophosphorus-sensitive phenylvalerate and acetylcholinesterase activities in chicken brain. *Toxicol Lett.* Oct 15;230(2):132-8
- ✓ Casida, J.E., Durkin, K.A. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol. Interact.* 2013 Mar 25;203(1):221-5.
- ✓ Escudero M.A., Vilanova E., (1997). Purification and characterisation of naturally soluble neuropathy target esterase from chicken sciatic nerve by HPLC and Western blot. *J. Neurochem.* 69:1975-82.33
- ✓ Estévez J, Rodrigues de Souza F, Romo M, Mangas I, Costa Franca TC, Vilanova E. (2019). Interactions of human butyrylcholinesterase with phenylvalerate and acetylthiocholine as substrates and inhibitors: kinetic and molecular modeling approaches. *Arch Toxicol.* 2019 May;93(5):1281-1296. doi: 10.1007/s00204-019-02423-8. Epub 2019 Mar 15. PMID: 30877329
- ✓ Johnson M.K. (1969b). A phosphorylation site in brain and delayed neurotoxic effects of some organophosphorus compounds. *Biochem. J.* 111, 487-495.
- ✓ Johnson, M.K. The delayed neuropathy caused by some organophosphorus esters: mechanism and challenge. 1977 *CRC Crit. Rev. Toxicol* 3:289-316.
- ✓ Kovarik Z., Radić Z., Berman HA., Simeong-Rudolf 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):33-40.
- ✓ Lockridge, O.; Duysen, E.G.; Voelker, T.; Thomson, C.M.; Schopfer, L.M. Life without acetylcholinesterase: the implications of cholinesterase inhibitor toxicity in AChE-knockout mice. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 2005 May; 19(3):463-9.
- ✓ Mangas I, Vilanova E., Estevez J. (2012a). NTE and non NTE esterases in brain membrane: Kinetic characterization with organophosphates. *Toxicology* 297 (2012) 17– 25.
- ✓ Poveda A. (2019) Trabajo de fin de grado: Interacción de la acetilcolina en la actividad fenilacetato esterasa de la acetilcolinesterasa humana. Universidad Miguel Hernández de Elche. 40pp.
- ✓ Reiner E and Simeon V (1977). Competition between substrates for acetylcholinesterase and cholinesterase. *Biochim Biophys Acta.* 480(1):137-142
- ✓ Romo M. (2017) Trabajo de fin de grado: Actividad fenilvalerato esterasa en la butirilcolinesterasa humana. Universidad Miguel Hernández de Elche. 40pp.
- ✓ Terol M. Actividad fenilvalerato esterasa en la acetilcolinesterasa humana recombinante. Universidad Miguel Hernández de Elche. 56pp.

- ✓ Töugu, V. (2001) Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents* 1(2):155-170 DOI:10.2174/1568015013358536

