

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Experimentales**

ACTIVIDADES HIDROLIZANTES DE FENIL VALERATO Y ACETILTIOCOLINA SENSIBLES A LOS ORGANOFOSFORADOS PARAOXON Y MIPAFOX EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

Trabajo Fin de Grado

Miriam González González

Elche, julio de 2015

Curso académico 2014-2015

Director: Miguel Ángel Sogorb Sánchez
Instituto de Bioingeniería
Unidad de Toxicología y Seguridad Química
Área de Toxicología

D. Miguel Ángel Sogorb Sánchez, Profesor Titular del Área de Toxicología de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

que doña Miriam González González, estudiante del Grado en Biotecnología por la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha realizado mi dirección el trabajo de investigación titulado **“Actividades hidrolizantes de fenil valerato y acetilcolina sensibles a los organofosforados paraoxon y mipafox en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y”** incluido en la memoria de este Trabajo Fin de Grado. Dicho trabajo se realizó en la Unidad de Toxicología y Seguridad Química del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expido y firmo la presente certificación,

En Elche, junio de 2015



Fdo. D. Miguel Ángel Sogorb Sánchez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutor, el Dr. Miguel Ángel Sogorb, la oportunidad de formar parte durante unos meses de su equipo, de abrirme las puertas de su laboratorio, por confiar en mí, por responderme a todas las dudas que me han ido surgiendo a lo largo del tiempo. Sin su ayuda este trabajo no hubiese sido posible. Has sido el mejor tutor que alguien pueda imaginar.

Quiero dar las gracias a Eva, por ayudarme siempre en todo lo que he podido necesitar en el laboratorio, por enseñarme tantas cosas y por tener una paciencia infinita en cultivos. Tú ayuda ha sido indispensable para la realización del TFG.

También me gustaría agradecer a Jorge Estévez y Eugenio Vilanova por sus consejos, comentarios y su incondicional ayuda. Y a Encarna por su ayuda y consejos, los cuales han sido muy valiosos para mí.

Y por supuesto, me gustaría agradecer especialmente a mis padres, Mari Carmen y Salustiano, la ayuda y confianza que han depositado en mí. A mi hermano Iván por empujarme hacia la Toxicología y más concretamente a este laboratorio, y también a mi hermano Alejandro, a Olga y a mis sobrinas y mi sobrino. No puedo olvidarme de mis abuelos, Anita, Amparo y Salustiano, que siempre me habéis apoyado y animado a seguir creciendo como persona.

No puedo terminar sin mencionar a mis geniales colegas, que me han acompañado durante estos cuatro años de grado, sé que la amistad que he forjado con vosotros va a ser para toda la vida.

Y especialmente agradecer a mis maravillosos amigos, que habéis estado al pie del cañón siempre, sin vosotros nada hubiese sido lo mismo. A Rojo, porque eres sencillamente genial y por esos temas de conversación infinitos, y por enseñarme que la vida guarda grandes sorpresas. A Alba por tus consejos existenciales, por darme tu opinión tanto en lo bueno y en lo malo, y por darme un punto de vista alternativo. A mi prima Adriana, porque para mí siempre has sido como una hermana, y gracias a ti soy quién soy. A Jota por levantarme el ánimo siempre, y por ayudarme siempre que lo he necesitado. Y a Caro, Kike y Sara, por vuestra amistad incondicional.

RESUMEN

La mayoría de las moléculas dianas de toxicidad de organofosforados (OPs) son serin esterases del sistema nervioso, aunque existen efectos adversos asociados a exposición crónica a OPs cuyas dianas de toxicidad todavía no han sido identificadas. En este trabajo se ha estudiado la sensibilidad al OP no neuropático paraoxon y al OP neuropático mipafox de las actividades hidrolizantes de fenilvalerato (PVasa) y acetiltiocolina (AChE) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y enteras y lisadas. El objetivo final era discriminar esterases, diferentes de las ya conocidas, como potenciales dianas de estos efectos de neurotoxicidad crónica. Tanto para paraoxón como para mipafox se discriminaron dos componentes de actividades hidrolizantes de PVasa de diferentes sensibilidades además de un componente totalmente resistente a ambos OPs. AChE presentó un único componente sensible a paraoxon y a mipafox, aunque la sensibilidad a paraoxon fue 3 órdenes de magnitud superior a la sensibilidad a mipafox, apareciendo además un componente AChE adicional totalmente resistente a mipafox. La comparación de resultados entre célula entera y célula lisada sugiere que la membrana plasmática pudiera estar ejerciendo un papel de barrera que disminuyera la biodisponibilidad de OPs. Esto último implica que la discriminación de las diferentes esterases se debería hacer en células lisadas, aunque los estudios destinados a determinar el papel fisiológico de estas esterases deberán ser realizados necesariamente en células cultivadas intactas.

Palabras clave: fenilvalerato esterasa, acetilcolinesterasa, neuroblastoma humano SH-SY5Y, neurotoxicidad, paraoxon, mipafox.

ABSTRACT

Most of the targets of toxicity of organophosphorus molecules (OPs) are serine esterases of the nervous system, although there are adverse effects associated with chronic exposure to OPs whose targets of toxicity have not yet been identified. This TFG has studied the sensitivity to the non-neuropathic OP paraoxon and to the neuropathic OP mipafox of the phenylvalerate (PVase) and acetylthiocholine (AChE) hydrolyzing activities in whole and lysed SH-SY5Y human neuroblastoma cells. The ultimate objective was to discriminate esterases as potential targets of these effects of chronic neurotoxicity. For both mipafox and paraoxon, two components of PVase of different sensitivities, as well as a totally resistant component to both OPs, were discriminated. AChE presented a single component sensitive to paraoxon and mipafox, although the sensitivity to paraoxon was 3 orders of magnitude greater than the sensitivity to mipafox, appearing also an additional component of AChE completely resistant to mipafox. The comparison of results between whole and lysed cells suggests that the plasma membrane could be exerting a role of barrier that decreases the bioavailability of OPs. It suggests that the discrimination of the different esterases should be performed with lysed cells, although the studies for determining the physiological role of the previously identified esterases must be done in intact cultured cells.

Key words: phenylvalerate esterase, acetylcholinesterase, SH-SY5Y human neuroblastoma, neurotoxicity, paraoxon, mipafox.

ABREVIATURAS

ACh = Acetilcolina (ACh)

AChE = Acetilcolinesterasa

BuChE = Butirilcolinesterasa

DMEM = Medio modificado Dulbecco-Eagle

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

NTE = Esterasa diana de neuropatía

OPs = Compuestos organofosforados

PV = Fenilvalerato

PVasa = Fenilvalerato esterasa

SDS = Dodecilsulfato sódico

UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Estructura química	2
1.2. Propiedades físico-químicas	2
1.3. Aplicaciones comerciales de los compuestos organofosforados y futuro	3
1.4. Toxicocinética de los compuestos organofosforados	3
1.5. Mecanismos moleculares de interacción entre OPs y proteínas	4
1.6. Efectos de los OPs sobre el sistema nervioso	5
1.7. Carboxilesterasas	6
1.7.1. Fenilvalerato esterasas y NTE	6
1.7.2. Colinesterasas	6
2. Antecedentes y objetivos	7
2.1. Carboxilesterasas hidrolizantes de fenilvalerato en cerebro de pollo	8
2.2. Carboxilesterasas hidrolizantes de acetilcolina en cerebro de pollo	8
2.3. Carboxilesterasas hidrolizantes de fenilvalerato en cerebro de pollo	8
2.4. Planteamiento de este TFG	8
2.5. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1. Tampones, inhibidores y sustratos de uso habitual	11
3.2. Equipos utilizados	11
3.3. Cultivo celular	12
3.3.1. Descongelación de células	12
3.3.2. Cultivo de células	13
3.3.3. Tripsinización	13
3.3.4. Congelación de células	14
3.3.5. Recuento de células viables mediante la cámara de Neubauer y azul tripano	14
3.4. Lisis celular	14
3.5. Ensayo para cuantificación de proteína	15
3.6. Ensayo de actividad fenilvalerato esterasa	16
3.7. Ensayo de actividad acetilcolinesterasa	17
3.8. Modelos matemáticos	18
4. Resultados	20
4.1. Lisado celular	21
4.2. Caracterización de la actividad hidrolizante de fenilvalerato en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	22

Índice

4.2.1. Sensibilidad al organofosforado paraoxon	22
4.2.2. Sensibilidad al organofosforado mipafox	24
4.3. Caracterización de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	26
4.3.1. Sensibilidad al organofosforado paraoxon	27
4.3.2. Sensibilidad al organofosforado mipafox	28
5. Discusión	29
5.1. Actividades hidrolizantes de fenilvalerato sensibles a paraoxon	30
5.2. Actividades hidrolizantes de fenilvalerato sensibles a mipafox	31
5.3. Actividades hidrolizantes de acetiltiocolina sensibles a paraoxon	32
5.4. Actividades hidrolizantes de acetiltiocolina sensibles a mipafox	32
6. Conclusiones y proyección futura	34
6.1. Conclusiones	35
6.2. Proyección futura	35
7. Bibliografía	37





1 INTRODUCCIÓN

1 Los compuestos organofosforados

1.1 Estructura química

La Figura 1 muestra la estructura química general de los compuestos organofosforados (OPs). Dichos compuestos pueden ser tanto ésteres, amidas, o derivados tiólicos del ácido fosfórico o el ácido fosfónico. Normalmente R_1 y R_2 son grupos alquilo o arilo, pudiendo unirse de forma directa o indirecta al fósforo central. R_1 puede estar unido directamente pero R_2 puede no estarlo, para formar fosfonatos. En el caso de los fosforamidatos, uno de los radicales debe de estar unido al átomo central de fósforo mediante un grupo $-NR_2$.

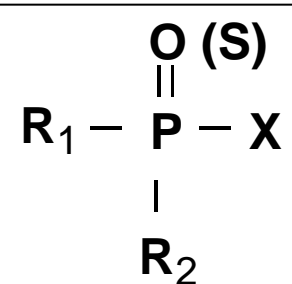


Figura 1: Estructura química básica de los compuestos organofosforados.

En cuanto al grupo saliente, o grupo X, existe una gran libertad en cuanto a su estructura química, pudiendo estar formados por grupos aromáticos, heterocíclicos o alifáticos. El grupo X se une al fósforo mediante un enlace de oxígeno o azufre, y se libera de éste cuando el OP interacciona de forma covalente con una proteína diana o cuando el OP es hidrolizado por una fosfotriesterasa en una reacción de detoxificación, siendo éste el origen de su denominación de "grupo saliente". Como se puede observar en la Figura 1, el átomo unido mediante un doble enlace al fósforo puede ser tanto un oxígeno como un azufre, lo que determinará que el OP resultante sea un fosfato o un fosfortioato, respectivamente (WHO, 1986).

1.2 Propiedades físico-químicas

Pese a que los OPs presentan propiedades químicas muy diversas, se pueden establecer ciertas características universales entre ellos, como por ejemplo:

- Son poco volátiles.
- Son sólidos o líquidos a temperatura ambiente.
- Son apolares, por lo que también son poco solubles en agua y solubles en otros disolventes apolares.
- Son estables a pHs cercanos a la neutralidad (se hidrolizan a velocidades significativas a pHs inferiores a 2 y superiores a 9).
- Su degradación ambiental se produce por hidrólisis, que puede ser tanto química como enzimática.
- Presentan una naturaleza electrofílica que propicia las sustituciones con reactivos nucleófilos. El agente nucleófilo puede ser iones hidroxilo (durante una hidrólisis a pH alcalino), aminoácidos de enzimas fosfotriesterasas (durante su detoxificación por hidrólisis), o grupos hidroxilo (-OH) de una serina perteneciente al centro activo de una B-esterasa (durante la inhibición de la misma). 4

1.3 Aplicaciones comerciales de los compuestos organofosforados y futuro

En la actualidad los OPs son ampliamente utilizados como plaguicidas, sobre todo desde que fueron eliminados del mercado los plaguicidas organoclorados. Su uso principal es como insecticidas, y en menor medida también como fungicidas, acaricidas y defoliantes. Los OPs se han utilizado ampliamente como agentes de control de insectos que actúan como vectores de enfermedades en humanos en áreas tropicales y también para el control doméstico de diversos insectos.

Los OPs se han utilizado también en diferentes aplicaciones industriales, como modificadores del plástico y aditivos del petróleo, formando parte de la composición de los retardantes de llama, pinturas y plásticos, etc.

Los OPs han tenido un uso terapéutico limitado, existiendo un tratamiento para el glaucoma basado en el organofosforado neuropático DFP, pero actualmente se encuentra también en desuso (Casida and Quistad, 2004).

Por último es destacable su uso como armas químicas, que se desarrollaron durante la Segunda Guerra Mundial, como son el gas sarín, el tabún y el somán, comúnmente conocidos como agentes nerviosos (Sato y Hosokawa, 2000).

1.4 Toxicocinética de los compuestos organofosforados

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud los aspectos generales más relevantes de la toxicocinética de OPs son (WHO., 1986):

- Absorción: los OPs pueden penetrar fácilmente las vías digestiva, respiratoria y cutánea, ya que su carácter lipofílico facilita su absorción a través de las membranas.
- Distribución: los OPs no se acumulan de manera significativa en ningún tejido del organismo, ya que son biotransformados de una manera muy eficaz en compuestos fácilmente eliminables por orina.
- Biotransformación: las principales reacciones de biotransformación de los OPs son la desulfuración oxidativa (substitución del átomo de azufre unido al átomo fósforo mediante doble enlace por un átomo de oxígeno) y la hidrólisis (ruptura de uno de los tres enlaces éster y liberación del grupo saliente).
- Eliminación: los OPs y sus productos de hidrólisis se eliminan de manera muy eficaz en orina.

Desde el punto de vista de su toxicidad los compuestos OPs pueden sufrir dos tipos de procesos metabólicos (WHO, 1986):

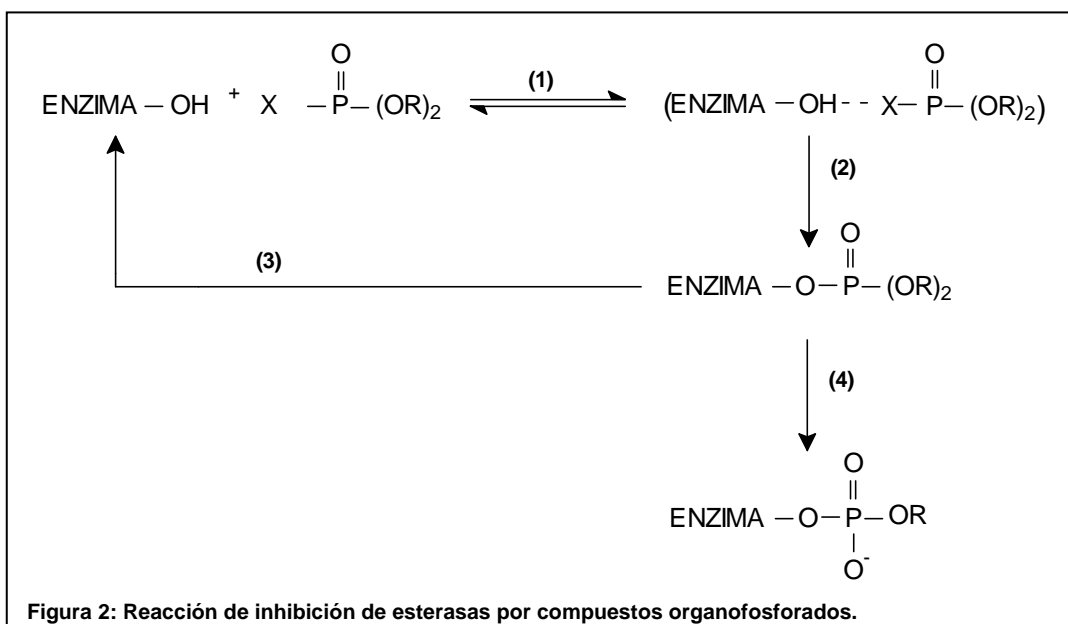
- Activación tóxica mediante desulfuración oxidativa, que genera productos con mayor capacidad fosforilante que los sustratos.
- Desactivación o detoxificación mediante hidrólisis enzimática por fosfotriesterasas, que generan productos que no son capaces de fosforilar esterasas diana.

1.5 Mecanismos moleculares de interacción entre OPs y proteínas

Como se ha expuesto con anterioridad los OPs presentan un carácter electrofílico que les permite reaccionar con los grupos hidroxilo de los aminoácidos de serina, tirosina y treonina, produciéndose una fosforilación irreversible de dichos aminoácidos.

El mecanismo de fosforilación de enzimas esterasas por OPs se muestra en la Figura 2, y en él podemos distinguir las siguientes hasta 4 etapas:

1. Formación del complejo OP- proteína de tipo Michaeliano.
2. Fosforilación de la enzima, con liberación del grupo saliente e inhibición de la actividad esterásica de la enzima fosforilada.
3. Reacción de reactivación, que puede ser tanto espontánea o inducida por un reactivo nucleófilo que produce un desplazamiento del fosforilo del centro activo regenerando enzima libre en su estado activo. Parte de la terapia clínica frente a la intoxicación por OPs se basa en la administración de oximas para tratar de inducir una reactivación de las enzimas inhibidas.
4. Reacción de envejecimiento (aging), dependiente del tiempo y de la estructura química del OP y que conlleva la pérdida de la capacidad de reactivación de la enzima por cualquier tipo de agente nucleofílico.



Las esterasas del sistema nervioso central son las dianas de toxicidad de los OPs más conocidas debido a que la fosforilación de la serina del centro activo de la acetilcolinesterasa (AChE) produce los efectos neurotóxicos en que se basa su uso como insecticidas.

1.6 Efectos de los OPs sobre el sistema nervioso.

El principal efecto tóxico que presentan los OPs se debe a la fosforilación no reversible de esterasas del sistema nervioso central. Existen diversas dianas de toxicidad conocidas, pero también existen casos en los que no se conocen. La Tabla 1 muestra los diferentes efectos neurológicos de los OPs así como las dianas y los síntomas.

Tabla 1: Efectos neurológicos de los compuestos organofosforados.

Efecto	Diana de toxicidad	Síntomas
Colinérgico	Acetilcolinesterasa	Miosis, vómitos, debilidad muscular, fasciculaciones, flacidez, dificultades respiratorias, arritmias cardíacas
Síndrome intermedio	Acetilcolinesterasa y posiblemente otras desconocidas	Parálisis y debilidad muscular de los miembros anteriores
Neuropatía retardada	Esterasa diana de neuropatía (NTE)	Flacidez, ataxia de miembros inferiores, parálisis
Disrupción de sistema cannabinoide	Ácido graso amido hidrolasa, monoacil glicerol lipasa	Sin efectos detectables, estudios realizados a nivel mecanístico
Efectos sobre el neurodesarrollo	Desconocidas	Problemas de aprendizaje
Efectos sobre el sistema nervioso central tras la exposición crónica	Desconocida	Depresión, fatiga, ansiedad, irritabilidad, problemas de memoria, déficit de atención
Potenciación de la neuropatía retardada	Desconocida	Los mismos que en la neuropatía retardada

AChE y NTE son las esterasas dianas de toxicidad de OPs mejor conocidas y estudiadas. La inhibición de AChE por fosforilación es el detonante de los conocidos efectos colinérgicos agudos, responsables de la actividad insecticida de los OPs y causantes de los síntomas de intoxicación aguda descritos en la Tabla 1. Parece que la fosforilación de AChE también podría estar implicada en un síndrome colinérgico menos conocido denominado síndrome intermedio, aunque en este caso AChE no sería la única diana de toxicidad. Por otra parte, la inhibición de Esterasa Diana de Neuropatía (NTE) por OPs y su posterior envejecimiento (reacción 4 en Figura 2) es el desencadenante de una neuropatía retardada cuyos síntomas se detallan en la Tabla 1.

Pero NTE y la AChE no son las únicas esterasas del sistema nervioso, y por lo tanto, los efectos neurotóxicos mostrados en la Tabla 1 con dianas todavía desconocidas podrían estar inducidos por la fosforilación de otras esterasas u otras proteínas del sistema nervioso. De hecho, los efectos de los OPs sobre el sistema nervioso central tras exposición crónica suponen un problema creciente de Salud Pública en el ámbito laboral. Así, en las últimas décadas, **un número creciente de estudios**

epidemiológicos han sugerido que la exposición a dosis repetidas de OP que no desencadenan toxicidad colinérgica pueden provocar a largo plazo efectos neurológicos y de comportamiento (Tabla 1), que afectan sobre todo al sistema nervioso central (Baltazar et al. 2014, entre otros). La diana o dianas de estos efectos crónicos son desconocidas hasta el momento (Tabla 1).

1.7 Carboxilesterasas

Las enzimas carboxilesterasas catalizan las reacciones de hidrólisis de ésteres carboxílicos, existiendo multitud de ellas en diferentes tejidos y organismos vivos. Existen diferentes clasificaciones pero resulta particularmente interesante la clasificación que se basa en su interacción con diferentes OPs. Aldridge (1953) estableció de acuerdo a este criterio los siguientes tres tipos de carboxilesterasas:

- A-esterasas: aquellas esterazas que hidrolizan tanto carboxilésteres como OPs. En esta categoría de esterazas el OP actuaría como sustrato del enzima, y no como su inhibidor.
- B-esterasas: aquellas esterazas que hidrolizan carboxilésteres (tanto endógenos como exógenos) y son inhibidas irreversiblemente por los OPs.
- C-esterasas: aquellas esterazas que no tienen ningún tipo de interacción con OPs.

1.7.1 Fenilvalerato esterazas y NTE

Las fenilvalerato esterazas (PVASas) son un grupo de carboxilesterasas (B-esterasas) que pueden ser estudiadas mediante la hidrólisis del carboxil éster fenilvalerato (PV). Dentro de este grupo encontramos NTE, que puede ser diferenciada de otras PVASas debido a su actividad resistencia a paraoxón y a su sensibilidad a mipafox.

1.7.2 Colinesterasas

Las colinesterasas se incluyen en el grupo de B-esterasas, siendo serin hidrolasas que se encargan de degradar el neurotransmisor acetilcolina (ACh). Se concentran principalmente en las sinapsis colinérgicas del cerebro y en las uniones neuromusculares. Existen dos tipos diferentes de colinesterasas en vertebrados, la acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), diferenciadas por su especificidad de sustrato (Kovarik et al., 2003). Mientras que se ha demostrado que la AChE desempeña una función de terminación de la neurotransmisión colinérgica en la hendidura sináptica y neuromuscular, no se conoce todavía hoy en día con claridad la función o funciones de la BuChE.



2 ANTECEDENTES y OBJETIVOS

2.1 Carboxilesterasas hidrolizantes de fenilvalerato en cerebro de pollo

El pollo es el modelo animal más ampliamente utilizado para el estudio de PVasas y AChE, probablemente porque también es la especie animal de elección para evaluar la capacidad de OPs de inducir neuropatía retardada. Mangas (2013) ha llevado a cabo una caracterización sistemática de las actividades PVasas en cerebro de pollo, encontrando que, sobre la base de su distinta sensibilidad a los OPs paraoxón, mipafox y a PMSF (este último no es un OP pero también inhibe PVasas), era posible distinguir hasta 3 diferentes componentes en la fracción soluble de cerebro de pollo y 4 en fracción de membranas del mismo sistema.

2.2 Carboxilesterasas hidrolizantes de acetilcolina en cerebro de pollo

Un estudio realizado en el laboratorio donde se desarrolló este TFG ha demostrado que algunas PVasa **son** también capaces de hidrolizar acetilcolina (Benabent, 2015). Dicho estudio también ha discriminado los componentes enzimáticos que hidrolizan acetilcolina en fracciones soluble y de membranas de cerebro de pollo utilizando los siguientes inhibidores: mipafox (OP inductor de neuropatía retardada), paraoxon (OP no inductor de neuropatía retardada), PMSF (agente promotor de neuropatía retardada), iso-OMPA (agente OP inhibidor irreversible específico de BuChE), etopropazina (agente no OP inhibidor reversible de BuChE) y BW284c51 (agente no OP inhibidor reversible específico de AChE). Este estudio identificó cuatro componentes colinesterásicos citosólicos y tres en membranas.

2.3 Detección de carboxilesterasas hidrolizantes de fenilvalerato y acetilcolina en cultivos celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Sogorb y colaboradores (2010) demostraron que las actividades carboxilesterasas hidrolizantes de PV y de acetilcolina se expresaban en cultivos de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Describieron también unas cinéticas de inhibición por diversos OPs comparables con las descritas en cerebro de pollo (modelo animal típicamente utilizado para el estudio de PVasas) y un envejecimiento de NTE inhibida por varios OPs también similar a lo descrito en el mismo modelo. Así pues, estos autores demostraron que las células SH-SY5Y son un buen modelo para el estudio *in vitro* de PVasa y AChE en muestras biológicas procedentes de humanos.

2.4 Planteamiento de este TFG

Atendiendo a lo descrito en esta anteriormente llegamos a la conclusión de que:

- 1 Existen una serie de efectos adversos inducidos por OPs cuyas dianas de toxicidad no están ni siquiera identificadas pero que serían presumiblemente estererasas de sistema nervioso;

2 Dichas esterasas no disponen de sustratos específicos y es necesario identificarlas sobre la base de sensibilidad a diferentes agentes inhibidores (OPs y no OPs);

3 El pollo es un modelo animal útil para el estudio de neuropatía retardada y su promoción, pero no necesariamente lo sería para estudiar efectos tóxicos derivados de exposición crónica a OPs como depresión, fatiga, ansiedad, irritabilidad, problemas de memoria, déficit de atención y otros como alteraciones en el neurodesarrollo, por lo que sería conveniente dar el salto a modelos celulares de origen humano;

4 Datos preliminares sugieren que las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expresan las esterasas dianas de OPs y al menos en lo tocante a las más conocidas (AChE y NTE) son inhibidas por OPs de manera comparable a cerebro de pollo. Además, también hemos de considerar que en células cultivadas la membrana plasmática celular está intacta y podría actuar como barrera dificultando la penetración de los OPs inhibidores al interior de la célula y alterando la discriminación de diferentes componentes esterásicos sobre la base de su sensibilidad y amplitud.

2.5 Objetivos

1 Discriminar las distintas actividades hidrolizantes de PV sobre la base de su sensibilidad al OP neuropático mipafox y al OP no neuropático paraoxón en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2 Discriminar las distintas actividades hidrolizantes de acetilcolina sobre la base de su sensibilidad al OP neuropático mipafox y al OP no neuropático paraoxón en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

3 Determinar si la presencia de la membrana plasmática intacta tiene algún efecto sobre los análisis de cinéticas de inhibición de carboxilesterasas sensibles a organofosforados.



3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tampones, inhibidores y sustratos de uso habitual

Tampón fosfato salino (PBS)/ EDTA 1mM pH 7.4. La preparación de la disolución se llevó a cabo mediante la disolución de PBS Dulbecco (instamed 9.55g/L) Biochromag en polvo, y la cantidad de EDTA necesaria, en agua destilada.

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) 50 mM / EDTA 1 mM pH 7.4. Se preparó disolviendo Tris y EDTA en agua destilada. El pH se ajustó a 7.4 con HCl concentrado y se conservó a temperatura ambiente.

Dietil p-nitrofenilfosfato (paraoxón): Adquirido de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España), con pureza superior al 90%. La disolución stock se preparó a 10 mM en acetona seca.

Fluoruro de N,N'-diisopropildiamindofosfororilo (mipafos): Se adquirió de LarkEnterprises (Webster, USA), con una pureza superior al 99%. Se preparó una disolución concentrada de 10 mM en tampón Tris 10 mM / Citrato 10 mM / EDTA 1mM pH 6.0 y se conservó a 4 °C.

Fenilvalerato: Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA), y se preparó una disolución stock PV en DMF 30mg/ml. Se añadió 250 µl de la disolución stock a 7500 µl de agua doblemente desionizada (miliQ). La concentración final fue de 1mg/ml.

Dodecilsulfato sódico (SDS): se adquirió de grado analítico de Panreac Química S. A. (Barcelona, España). Se preparó al 2% SDS en agua miliQ para ser utilizado en el ensayo de cuantificación de proteína.

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB): obtenido de Sigma-Aldrich Química S. A. (Madrid, España). Se utilizó junto a una solución de SDS 2%, para dar lugar a una disolución SDS 2%/DTNB 6 mM en tampón fosfato 0.1 M/ EDTA 1 mM, pH 7.4.

Aminoantipirina: Se preparó una disolución AAP 4 mg/ml/SDS 2% en tampón PBS 1mM EDTA a pH 7.4.

Ferrocianuro potásico: Se preparó una disolución al 2% (p/v) en agua.

Yoduro de acetilticolina (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.

3.2 Equipos utilizados

Equipos utilizados en cultivos celulares:

- Cabina de flujo laminar tipo II con filtro HEPA (Lab. Culture. ESCO class II Type A2).
- Incubador Selecta con 5% CO₂, y 37 °C.
- Centrifuga.
- Frascos de cultivo TPP de 75 ml con fondo adherente.
- Placas Corning tratadas P100.
- Pipeteador automático.
- Bomba de vacío, para extraer restos de medio.
- Pipetas Pasteur (vidrio) cortas y largas estériles.
- Pipetas desechables plásticas de 10 ml.
- Tubos Falcon de 15 ml.
- Baño de incubación termostatzado.

Equipo usado para la realización de ensayos enzimáticos:

- Lector de placas AD340C (BeckmanCoulter), para la lectura fotométrica.
- Termobloques.

3.3 Cultivo celular

La línea celular utilizada en todos los ensayos es SH-SY5Y neuroblastoma humano, y se obtuvo del banco europeo de células. Concretamente las células usadas en los ensayos provenían de un stock conservado en nitrógeno líquido, con pases que oscilaban desde 23 hasta 45. No se utilizaron pases superiores ya que se observaron cambios morfológicos sospechosos de una diferenciación.

3.3.1 Descongelación de células

Las células congeladas se descongelaron siguiendo el protocolo de descongelación CC04 del grupo de investigación de Toxicología y Salud Medioambiental de la UMH que consiste en:

1. Encender la lámpara ultravioleta de cabina y atemperar en el baño (37 °C durante unos 15 minutos) los reactivos que se van a utilizar posteriormente.
2. Añadir a un frasco de cultivo 8 ml el medio de cultivo específico de la línea celular que se va a descongelar.
3. Añadir a un tubo Falcon de 15 ml un volumen aproximado de 10 ml de medio de cultivo.
4. Extraer del tanque de N₂ líquido los crioviales conteniendo las células y descongelar incubando a 37 °C hasta que el criovial esté totalmente descongelado.

5. Añadir la suspensión celular en el tubo Falcon con 10 ml de medio para diluir el DMSO. Centrifugar el Falcon a 800 rpm durante 3 minutos para obtener el pellet de células en el fondo del tubo.
6. Eliminar el sobrenadante mediante bomba de vacío y una pipeta Pasteur

3.3.2 Cultivo de células

El precipitado celular obtenido tras la descongelación se resuspendió en medio de cultivo de células SH-SY5Y según lo descrito en el protocolo CC07 del grupo de investigación de Toxicología y Salud Medioambiental de la UMH que consiste en:

1. Preparar el medio de cultivo compuesto por 44.5% de medio modificado Dulbecco-Eagle (DMEM) complementado con 4500 mg glucosa/l, 44.5% de nutrientes HAMF12 con NaHCO_3 , 10% de suero fetal bovino descoplementado y 1% de preparado de antibióticos (5000 unidades de penicilina/ml, 5 mg de estreptomocina/ml y 10 mg de neomicina/ml).
2. Sembrar frascos de cultivo tratados de una capacidad total de 60 ml con 10 ml de medio de cultivo conteniendo la suspensión celular y cultivar a 37 °C y 5% CO_2 hasta que el cultivo alcance una confluencia del 90-95%.
3. Tripsinizar para realizar los experimentos de inhibición de esterasas o bien para resembrar en otros frascos e incrementar el número disponible de las mismas.

3.3.3 Tripsinización

El protocolo de tripsinización que se utilizó fue el CC09 del grupo de investigación de Toxicología y Salud Medioambiental de la UMH que consiste en lo siguiente:

1. Sacar las placas o frascos del incubador y situarlos en la campana de flujo laminar.
2. Extraer con una pipeta Pasteur y bomba de vacío el medio y añadir PBS para lavar las células.
3. Extraer el PBS y añadir 2 ml de tripsina recombinante bovina repartiendo bien e incubar 3 minutos.
4. Golpear la placa por un extremo para despegar las células del soporte y añadir el doble de volumen de medio de cultivo para parar la reacción.
5. Recoger la suspensión y situarla en un tubo Falcon de 15 ml.
6. Centrifugar a 800 rpm durante 3 minutos para obtener el pellet de células en el fondo del tubo.
7. Resuspender en medio de cultivo para obtener la densidad celular deseada.

3.3.4 Congelación de células

Cuando las células se dividieron en suficiente número, se procedió a su congelación en tanques de nitrógeno líquido para su conservación. La congelación se realizó siguiendo el protocolo CC03 del grupo de investigación de Toxicología y Salud Medioambiental de la UMH y que consiste en:

1. Resuspender el precipitado de células tripsinazadas según se describió anteriormente en el volumen deseado de medio de congelación para línea celular SH-SY5Y. Dicho medio consiste en de medio de cultivo estándar con 15% de suero fetal bovino (en lugar de 5%) y 5% de DMSO (que actuará como crioprotector). La densidad celular resultante tras la resuspensión fue de entre $1.5 \cdot 10^6$ y $3 \cdot 10^6$ células/ml.
2. Pipetear la suspensión celular en los viales de congelación.
3. Colocar los viales la cámara de congelación (este dispositivo permite una congelación lenta y constante tras ser introducido en un frigorífico a -80 °C durante 24 horas).
4. Introducir los viales en nitrógeno líquido trascurridas 24 horas.

3.3.5 Recuento de células viables mediante la cámara de Neubauer y azul tripán

Se utilizó azul de tripán para el ensayo de viabilidad celular. El azul de tripán es un colorante azoico que permite diferenciar las células viables de las no viables. Las células viables no presentan coloración azul, porque la membrana plasmática celular no permite su paso. Las células no viables presentan dicha tonalidad porque el azul de tripán es capaz de pasar su membrana, incorporándose al interior celular.

El azul tripán se utilizó con dos diferentes finalidades, por un lado se empleó para determinar la viabilidad de las células tras tripsinización realizada según se describe en la sección 3.3.3 de la memoria y por otro para comprobar si los procesos de lisis celular aplicados resultaban eficaces. En ambas situaciones se mezclaron 20 μ l de la suspensión celular con 20 μ l de una disolución azul tripán 0.4% en PBS y a continuación bien se determinó la cantidad de células viables en la disolución con una cámara Neubauer o bien se observó en el microscopio si las células mantenían intacta o no la membrana plasmática.

3.4 Lisis celular

Se ensayaron diversos protocolos para la lisis de las membranas celulares encontrándose que, o bien no eran totalmente efectivos y tras aplicarlos se observaba bajo microscopio que la lisis no era total, o bien eran demasiado energéticos y se observaba que el nivel de actividad PVasa del cultivo celular no lisado y lisado era diferente, lo que sugería que el uso del Politron había desnaturalizado algunas de las PVasas, lo cual era un efecto indeseable al ser uno de los objetivos de este TFG precisamente la caracterización de estas PVasas. Finalmente, el protocolo que lisado que resultó ser eficaz sin

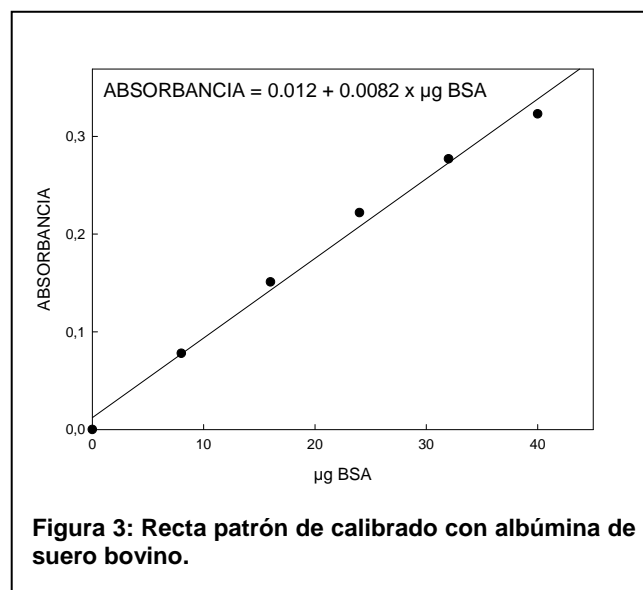
pérdidas significativas del nivel de actividades Pvasas consistió en la incubación de los cultivos celulares en tampón Tris 10 mM/EDTA 1 mM pH 7.4 en baño de hielo durante 35 minutos.

3.5 Ensayo para cuantificación de proteína

La cantidad de proteína contenida en las muestras fue determinada por el ensayo DC (Bio-Rad Laboratories) según las indicaciones del suministrador que incluyeron las siguientes etapas:

- Preparar las muestras mezclando 50 μ l de las mismas (o de cada uno de los tampones en el caso de los blancos) con 5 μ l de SDS en Tris 50mM/EDTA1mM pH=8, 50 μ l de reactivo A y 400 μ l de reactivo B.
- Mezclar la mezcla suavemente en el Vortex y dejar reaccionar durante 15 minutos.
- Transferir 250 μ l de cada muestra a un pocillo de placa de lectura.
- Medir la absorbancia a 650 nm (longitud de onda específica para registrar la absorbancia de la proteína con los reactivos del kit DC) y 750 nm (longitud de onda utilizada para para corregir absorbancias inespecíficas).

Al mismo tiempo que se realizaban las determinaciones de proteína de las muestras celulares se realizó una recta de calibrado utilizando como patrón albúmina de suero bovino. Las muestras de patrón se procesaron de manera idéntica a lo descrito en el párrafo anterior. Las cantidades de proteína patrón en las muestras de la recta de calibrado fueron de 0, 8, 16, 24, 32 y 40 μ g. La Figura 3 muestra un ejemplo de una recta de calibrado patrón obtenida en uno de los experimentos. La cantidad de proteína de cada muestra se determinó comparando la diferencia de absorbancia a 650 y 750 nm con la recta de calibrado de albúmina de suero bovino.

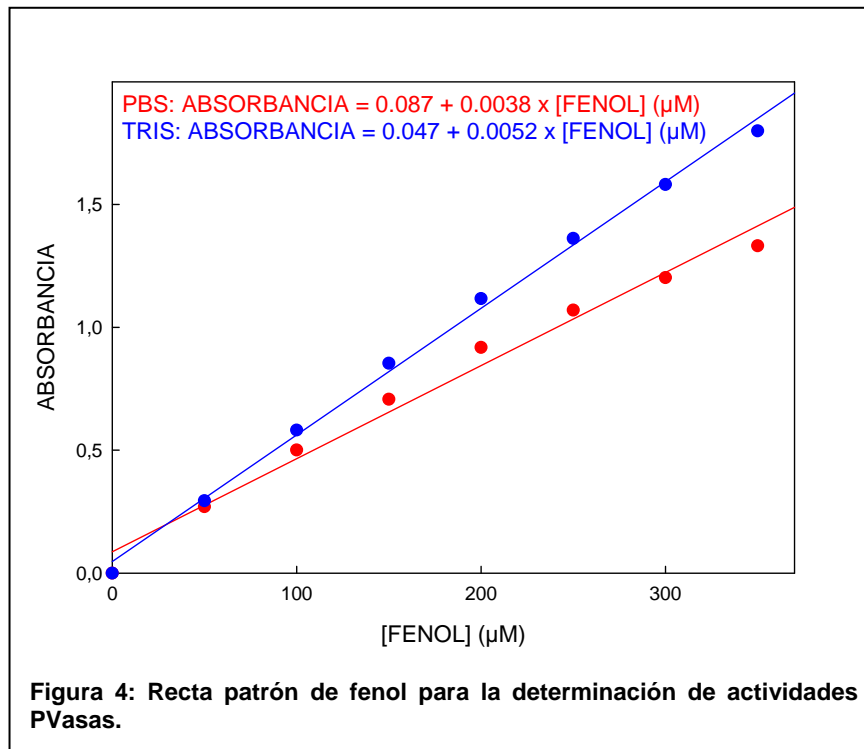


3.6 Ensayo de actividad fenilvalerato esterasa

La hidrólisis enzimática del sustrato PV se determinó de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Pipetear 20 μl del inhibidor correspondiente (o de tampón en el caso de los blancos) y disponerlos en los minitubos de un mililitro de volumen, en un termobloque a 37 °C, durante varios minutos para atemperar las células.
2. Tomar 100 μl de la preparación de células enteras o lisadas (100 μl del tapón en el caso de los blancos). Incubar durante 30 minutos a 37 °C. El volumen final de incubación es de 120 μl .
3. Añadir 100 μl del sustrato PV 1 mg/ml a todos los tubos, incluidos los blancos e incubar a 37 °C durante 30 minutos adicionales. El volumen final de reacción es de 220 μl .
4. Parar la reacción enzimática añadiendo 100 μl de disolución de SDS 2%/aminoantipirina 4 mg/ml. El SDS detiene la reacción desnaturalizando las enzimas y la aminoantipirina reacciona con el fenol liberado por hidrólisis del PV.
5. Añadir 50 μl de disolución de ferricianuro potásico al 2% (p/v) en agua. La formación del compuesto de color rojizo como consecuencia de la reducción del complejo fenol-aminoantipirina, puede ser medido en un espectrofotómetro.
6. Transferir 250 μl de la mezcla final a una microplaca de 96 pocillos, y medir su absorbancia a 510 nm.

Al mismo tiempo que se realizaban las determinaciones de actividades PVasas en las muestras celulares se realizó una recta de calibrado de fenol. Las muestras de fenol se procesaron de manera idéntica a lo descrito en el párrafo anterior para muestras celulares. Las concentraciones de fenol en las muestras de la recta de calibrado fueron de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 μM . La Figura 4 muestra un ejemplo de una recta de calibrado patrón obtenida en uno de los experimentos. La cantidad de fenol de cada muestra se determinó comparando la absorbancia a 510 nm con la recta de calibrado de fenol.



3.7 Ensayo de actividad acetilcolinesterasa

La determinación de actividades hidrolizantes de acetiltiocolina se realizó siguiendo un método desarrollado en nuestro laboratorio (Benabent, 2015) a través de una modificación del clásico método de Ellman. El ensayo incluyó las siguientes etapas:

1. Pipetear 20 μl del inhibidor correspondiente (o tampón en el caso de los blancos) en un minitubo de 1ml.
2. Adicionar 100 μl de la preparación de células enteras o lisadas o 100 μl del tapón correspondiente en el caso de los blancos. Incubar a 37 °C durante 30 minutos. El volumen final de incubación es de 120 μl .
3. Añadir 100 μl de sustrato acetiltiocolina 2.1 mM e incubar durante 30 minutos a 37 °C. El volumen final de reacción es de 220 μl .
4. Parar la reacción añadiendo 100 μl de disolución 2% SDS y 6 mM de DTNB en tampón fosfato.
5. Añadir 100 μl de tampón PBS (para células enteras) o Tris 10 mM (para células lisadas), en todos los tubos excepto en los blancos, donde se deben añadir 100 μl de células enteras o lisadas.
6. Disponer 250 μl de las mezclas en una microplaca de 96 pocillos y medir la absorbancia a 410 nm del 2-nitro-5-mercaptobenzoato (el compuesto formado por la reacción entre el DTNB y la tiocolina liberada).

3.8 Modelos matemáticos

Los datos obtenidos en los experimentos se ajustaron a diferentes modelos matemáticos mediante el programa de ordenador Sigma Plot (versión 8.0). El programa usa un algoritmo de Marquardt-Levenberg que busca valores de los parámetros a determinar de modo que la suma de los cuadrados de la diferencia entre el valor real y el valor predeterminado por la ecuación (residual) resulte mínima.

Los modelos matemáticos empleados fueron desarrollados por Estévez y Vilanova, 2009 asumiendo una inhibición irreversible y que para la inhibición de varios componentes enzimáticos, la actividad residual después de un tiempo de inhibición será la suma de las actividades residuales de cada componente enzimático. La fórmula general se adjunta a continuación:

$$E = E_1 + E_2 + \dots + E_R$$

Dependiendo del comportamiento de los sistemas enzimáticos los modelos matemáticos incluirán un distinto número de componentes. Concretamente los modelos utilizados fueron:

- Un componente sensible a la inhibición:

$$E = E_{1_0} \cdot e^{(-k'_1 \cdot I)}$$

- Un componente sensible y uno resistente:

$$E = E_{1_0} \cdot e^{(-k'_1 \cdot I)} + E_R$$

- Dos componentes sensibles:

$$E = E_{1_0} \cdot e^{(-k'_1 \cdot I)} + E_{2_0} \cdot e^{(-k'_2 \cdot I)} + E_R$$

- Dos componentes sensibles y uno resistente:

$$E = E_{1_0} \cdot e^{(-k'_1 \cdot I)} + E_{2_0} \cdot e^{(-k'_2 \cdot I)} + E_{3_0} \cdot e^{(-k'_3 \cdot I)}$$

En estos modelos E se define como la enzima libre activa, E_{1_0} como la amplitud del componente enzimático más sensible, E_{2_0} la amplitud del segundo componente enzimático, E_{3_0} como la amplitud del componente enzimático menos sensible, E_R como la amplitud del componente enzimático resistente, k'_1 la constante de inhibición de primer orden del primer componente enzimático y k'_2 la constante de inhibición de primer orden del segundo componente enzimático, k'_3 la constante de inhibición de primer orden del tercer componente enzimático e I la concentración de inhibidor utilizada.

En un sistema de tres componentes enzimáticos, dos sensibles (E_1 y E_2) y uno resistente (E_R), a una concentración de inhibidor (I) el comportamiento de las distintas curvas de inhibición se describe por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad} = 100 \cdot \frac{E}{E_0} = 100 \cdot \frac{E_{10} \cdot e^{(-k'_1 \cdot I)} + E_{20} \cdot e^{(-k'_2 \cdot I)} + E_R}{E_0}$$

Donde, E_{10} y E_{20} representan la proporción (amplitud) de los componentes sensibles de la enzima E_1 y E_2 , E_0 el control de actividad inicial (sin inhibidor), E la actividad para una concentración de inhibidor (I), k'_1 y k'_2 representan las constantes de inhibición de segundo orden (producto de la constante de inhibición de primer orden y el tiempo de inhibición, que fue siempre constante y de 30 minutos) para cada componente enzimático expresadas en μM^{-1} y E_R es la proporción del componente resistente (actividad residual resistente a las altas concentraciones de inhibidor empleadas). Los ajustes matemáticos del Sigma Plot se realizaron siguiendo algunas restricciones necesarias para que la solución tuviera un significado biológico. Dichas restricciones fueron: $k'_1, k'_2, E_{10}, E_{20}, E_R > 0$; y $(E_{10} + E_{20} + \dots + E_R) = 100$.

La concentración a la cual se inhibe un 50% de la actividad enzimática total del componente I_{50} para un tiempo de preincubación de 30 min se puede calcular mediante la ecuación:

$$I_{50} = \frac{\ln 2}{k'_1}$$

La comprobación de si los modelos matemáticos más complejos presentaron una mejora estadísticamente significativa con respecto a modelos más simples se realizó mediante un test de F realizado por el propio software Sigma Plot 8. El modelo seleccionado en cada caso fue aquel más sencillo que se ajustaba mejor a los datos experimentales.



4 RESULTADOS

4.1 Lisado celular

Para determinar si la presencia de la membrana plasmática intacta tiene algún efecto sobre los análisis de cinéticas de inhibición de carboxilesterasas sensibles a OPs (objetivo 3 de este TFG) era necesario optimizar un protocolo para el lisado celular que no implicara la desnaturalización de proteínas para evitar así la subsiguiente pérdida de actividades PVasas.

Se empleó en primer lugar un método similar al utilizado para homogeneizar cerebro de pollo (Mangas, 2013; Benabent, 2015). Dicho método consiste en suspender las células en tampón Tris 50 mM/EDTA 1mM dejándolas 10 minutos en hielo y aplicar a continuación dos pulsos de 10 segundos de duración en el Politron con una sonda PTA 10S al 70% de su potencia. Este protocolo era efectivo para conseguir el lisado de las células, pero la actividad enzimática de las preparaciones lisadas era inferior a la de los cultivos de células intactas, lo que sugería que el tratamiento con el Politron estaba desnaturalizando alguna de las PVasas que se deseaban estudiar.

Para conseguir el lisado celular las células se mantuvieron en baño de hielo durante 35 minutos resuspendidas en tampón Tris 10 mM/EDTA 1 mM pH 7.4 (sin tratamiento con Politron). Este método generó una preparación de células lisadas con un nivel actividad PVasa indistinguible del de una suspensión celular mantenida en baño de hielo durante 35 minutos pero previamente resuspendidas en PBS en lugar de en tampón Tris hipo-osmótico.

La Figura 5 muestra una fotografía de una suspensión de células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y en presencia de azul tripán tras incubación con PBS en baño de hielo durante 35 minutos. Se observan la mayoría de las células presentan una

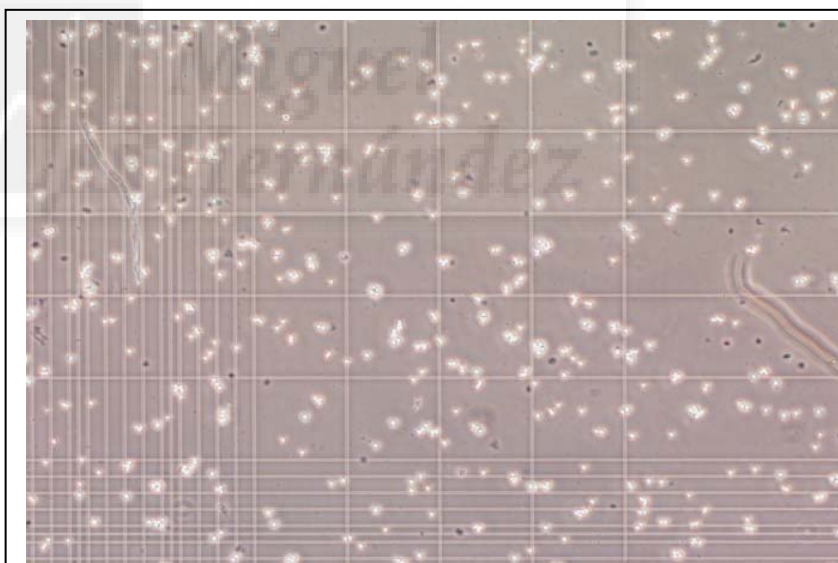


Figura 5: Suspensión de células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y tras incubación en PBS en baño de hielo durante 35 minutos. Se observa como la mayoría de las células excluyen de su interior el azul tripán, lo cual es indicativo de integridad de su membrana plasmática y de que son viables.

morfología redondeada y que excluyen de su interior el azul tripán, lo que indica que la membrana plasmática está intacta y la célula permanece viable.

La Figura 6 muestra una fotografía de una suspensión de células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y en presencia de azul tripán tras incubación con tampón Tris 10 mM / EDTA 1 mM pH 7.4 en baño

de hielo durante 35 minutos. Se observan la mayoría de las células son incapaces de excluir de su interior el azul tripán, lo que indica que la membrana plasmática está lisada y la célula no es viable.

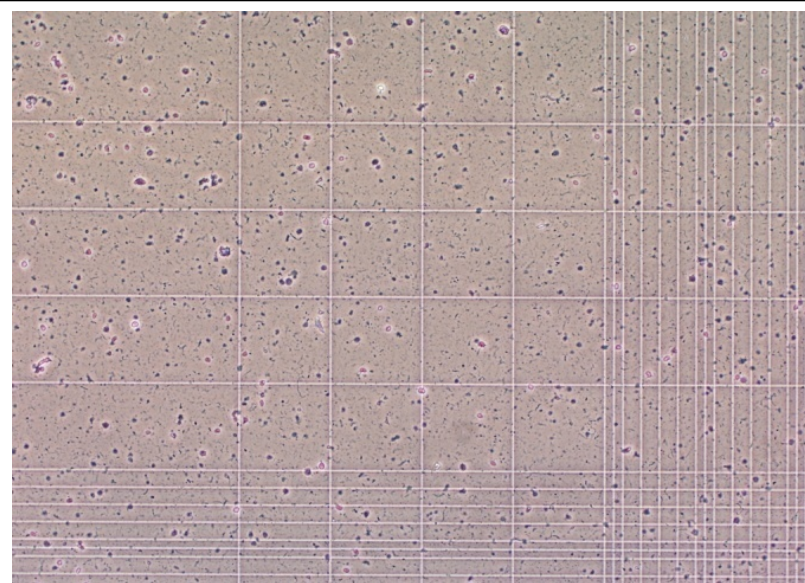


Figura 6: Suspensión de células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y tras incubación en tampón iso-osmótico en baño de hielo durante 35 minutos. Se observa como la mayoría de las células no excluyen de su interior el azul tripán, lo cual es indicativo de ruptura de su membrana plasmática y de su falta de viabilidad.

4.2 Caracterización de la actividad hidrolizante de fenilvalerato en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Las células mostraron actividad PVasa tanto intactas como lisadas. La actividad PVasa total media de células intactas fue de 4.40 ± 1.29 nmol fenol/30 min/ μ g proteína para un total de 7 cultivos independientes; mientras que la actividad PVasa total media de células lisadas (procedentes del mismo pase que las células intactas) fue de 5.06 ± 3.38 nmol fenol/30 min/ μ g proteína para un total de 7 cultivos independientes. Las diferencias de actividad no fueron estadísticamente significativas. Además, las actividades PVasas de ambas preparaciones fueron sensibles a paraoxon (un OP no neuropático) y a mipafox (un OP inductor de neuropatía retardada).

4.2.1 Sensibilidad al organofosforado paraoxon.

Célula entera

En tres experimentos independientes donde se ensayó la inhibición por paraoxon en células enteras en un rango de concentraciones entre 10 y 360 μ M se observó que el modelo matemático biológicamente plausible que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el de dos componentes sensibles (sin término independiente). La Tabla 2 muestra los parámetros matemáticos obtenidos en los ajustes de los citados tres experimentos independientes.

Tabla 2: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividades Pvasas de células intactas de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por paraoxon. Las concentraciones de paraoxón empleadas oscilaron entre 10 y 360 μM .

Parámetros	Datos individuales	media \pm d. e.
A_1 (%)	14/32/38	28 \pm 12
K_1 (μM^{-1})	0.186/0.088/0.193	0.156 \pm 0.059
IC_{50} componente 1 (μM)	3.73/7.88/3.59	5.07 \pm 2.44
A_2 (%)	86/68/61	72 \pm 13
K_2 (μM^{-1})	0.0040/0.0025/0.00357	0.0033 \pm 0.0008
IC_{50} componente 1 (μM)	173/277/194	214 \pm 55

El segundo componente ($K_2=0.0033 \mu\text{M}^{-1}$) posee una IC_{50} de 214 μM , por lo que no se encuentra totalmente inhibido por la concentración de paraoxon más alta ensayada (360 μM). Es por ello que se realizó un cuarto experimento donde se ensayaron concentraciones de paraoxon entre 2.5 y 1500 μM y donde el modelo matemático más sencillo y biológicamente plausible que se ajustó a los resultados experimentales fue el de dos componentes sensibles y un componente resistente a paraoxon. La Tabla 3 muestra los parámetros matemáticos resultantes del citado ajuste y la Figura 7 la representación de la actividad Pvasa en función de la concentración de paraoxon.

Tabla 3: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividades Pvasas de células intactas de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por paraoxon. Las concentraciones de paraoxón empleadas oscilaron entre 2.5 y 1500 μM .

A_r (%)	26
A_1 (%)	34
K_1 (μM^{-1})	0.441
IC_{50} componente 1 (μM)	1.57
A_2 (%)	40
K_2 (μM^{-1})	0.0023
IC_{50} componente 2 (μM)	301

Célula lisada

En los tres primeros experimentos independientes realizados (los ensayos se llevaban a cabo simultáneamente para los dos tipos de preparados celulares) ensayando concentraciones de paraoxon entre 10 y 360 μM el modelo matemático más sencillo biológicamente plausible fue el de un solo componente sensible ($K=0.0033\pm 0.0014 \mu\text{M}^{-1}$) sin componente resistente. En el experimento donde se ensayaron concentraciones de entre 2.5 y 1500 μM los resultados experimentales mostraron dos componentes sensible (Tabla 4, Figura 7).

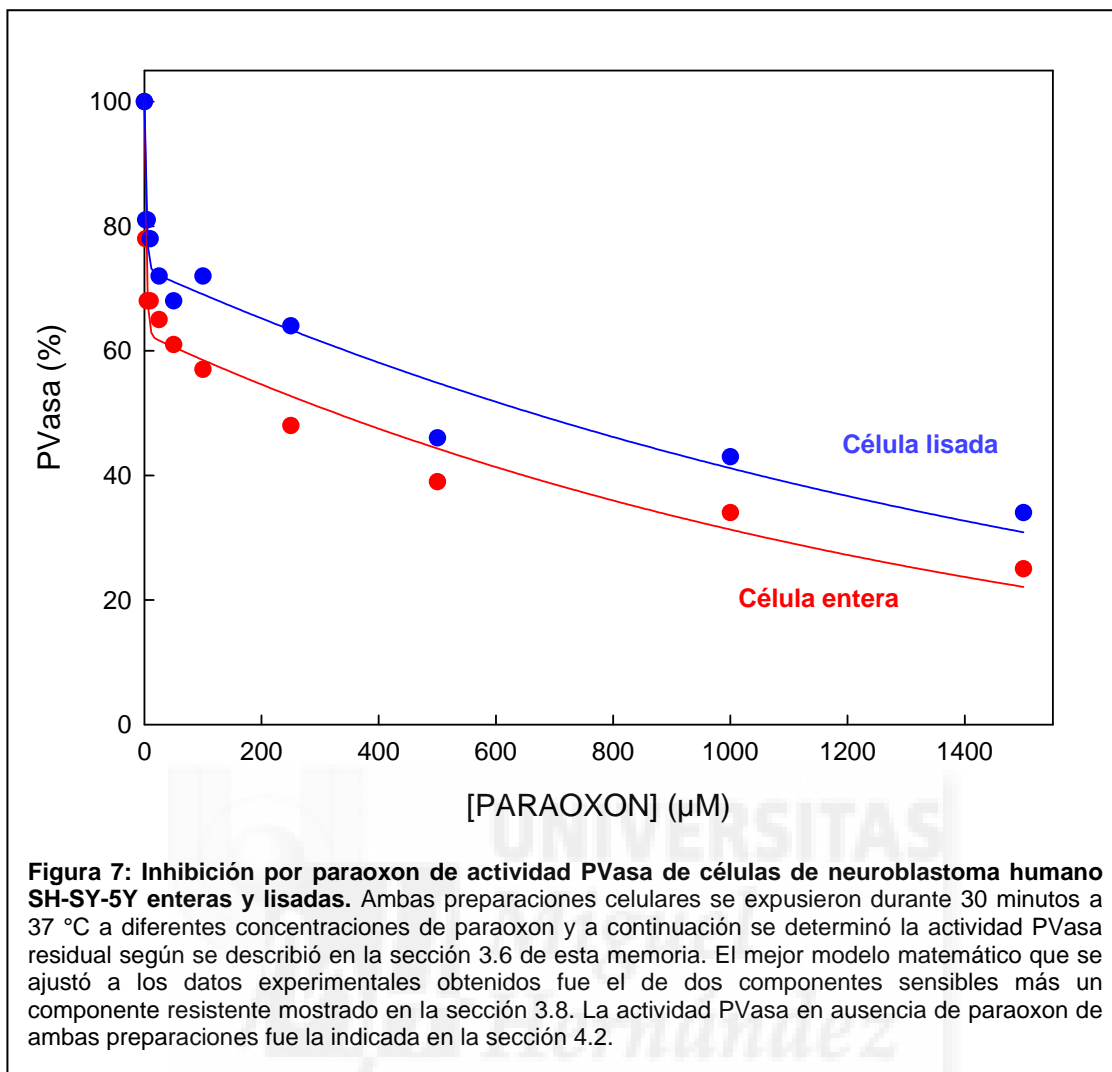


Tabla 4: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividades PVasas de células lisadas de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por paraoxon. Las concentraciones de paraoxon empleadas oscilaron entre 2.5 y 1500 µM.

A_r (%)	-
A_1 (%)	26
IC_{50} componente 1 (µM)	2.67
K_1 (µM ⁻¹)	0.33
A_2 (%)	73
K_2 (µM ⁻¹)	0.0058
IC_{50} componente 2 (µM)	120

4.2.1 Sensibilidad al organofosforado mipafox.

Célula entera

Se realizaron 4 experimentos independientes donde se observó que el modelo matemático más sencillo y biológicamente plausible que explicaba las observaciones experimentales correspondió al de dos componentes sensibles a mipafox y un componente resistente. La Tabla 5 muestra los

Resultados

parámetros matemáticos resultantes del citado ajuste y la Figura 8 la representación de uno de los 4 experimentos realizados de la actividad PVasa en función de la concentración de mipafox.

Tabla 5: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividades PVasas de células intactas de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por mipafox. Se muestran los datos correspondientes a los 4 experimentos independientes realizados.

Parámetros	Datos individuales	media \pm d. e.
A_r (%)	14/13/19/13	15 \pm 3
A_1 (%)	57/49/40/56	51 \pm 8
K_1 (μM^{-1})	0.064/0.043/0.155/0.157	0.105 \pm 0.060
IC_{50} componente 1 (μM)	10.8/16.2/4.47/4.42	8.98 \pm 5.68
A_2 (%)	29/38/41/31	35 \pm 6
K_2 (μM^{-1})	0.0048/0.0026/0.0061/0.0054	0.0047 \pm 0.0015
IC_{50} componente 2 (μM)	144/266/113/128	163 \pm 70

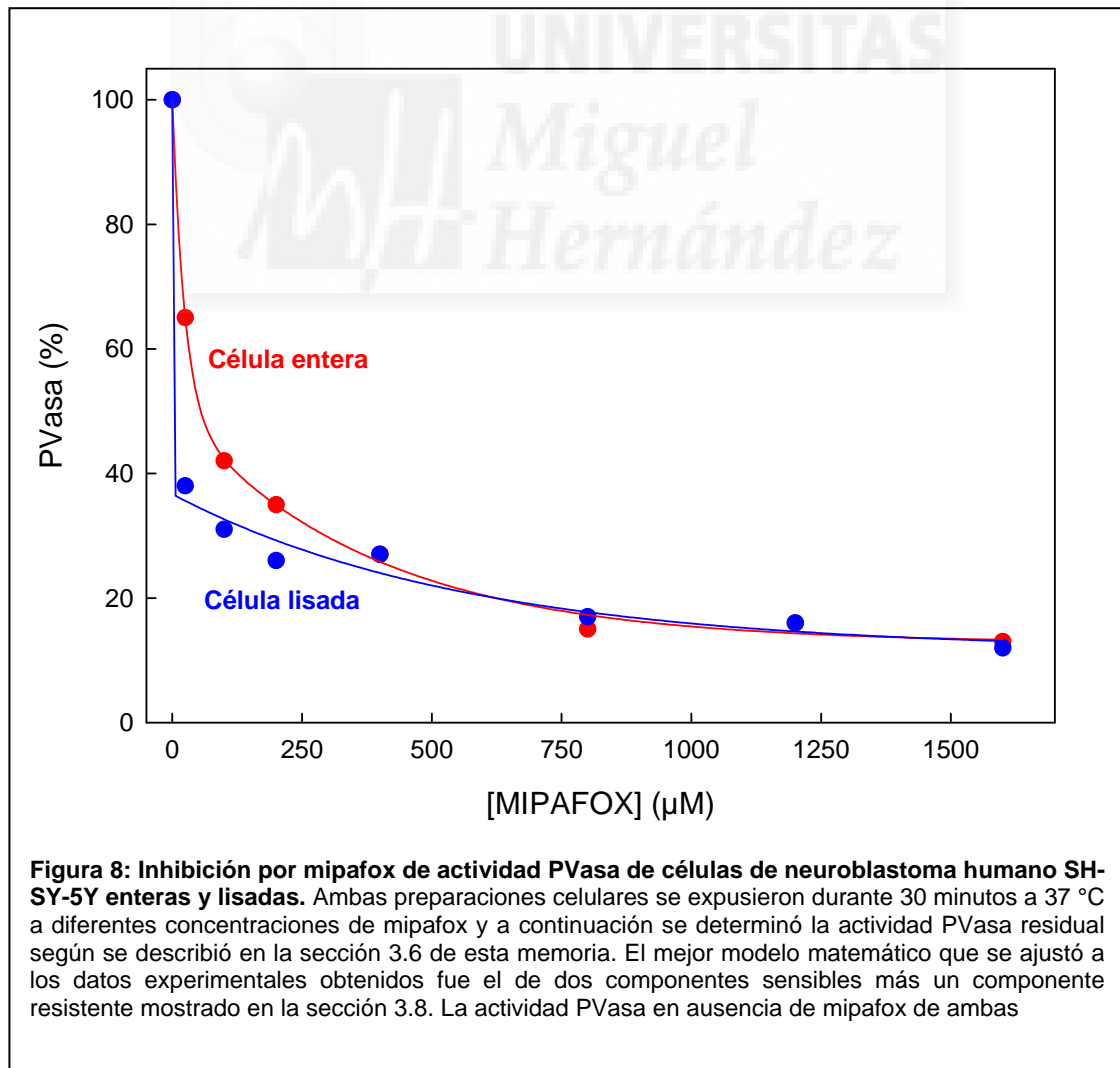


Figura 8: Inhibición por mipafox de actividad PVasa de células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y enteras y lisadas. Ambas preparaciones celulares se expusieron durante 30 minutos a 37 °C a diferentes concentraciones de mipafox y a continuación se determinó la actividad PVasa residual según se describió en la sección 3.6 de esta memoria. El mejor modelo matemático que se ajustó a los datos experimentales obtenidos fue el de dos componentes sensibles más un componente resistente mostrado en la sección 3.8. La actividad PVasa en ausencia de mipafox de ambas

Célula lisada

Para los tres primeros experimentos independientes realizados el modelo matemático más sencillo y biológicamente plausible que se ajustó mejor a los resultados experimentales fue el de un componente resistente más un componente sensible. La Tabla 6 muestra los parámetros matemáticos resultantes del citado ajuste y la Figura 8 la representación de uno de los 3 experimentos realizados de la actividad PVasa en función de la concentración de mipafox.

Tabla 6: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividades PVasas de células intactas de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por mipafox. Se muestran los datos correspondientes de 3 de los 4 experimentos independientes realizados que respondieron a este modelo. El cuarto de los experimentos realizados se ajustó a un modelo matemático más complejo según se muestra en la Tabla 7.

Parámetros	Datos individuales	media±d.e.
A_r (%)	11/21/21	18±6
A_1 (%)	89/79/79	82±6
K_1 (μM^{-1})	0.075/0.061/0.113	0.083±0.026
IC_{50} componente 1 (μM)	9.24/11.4/6.13	8.91±2.63

Sin embargo, el cuarto experimento mostró que el modelo más sencillo que se ajustó mejor a los resultados experimentales con plausibilidad biológica fue el de dos componentes sensibles más un componente resistente según muestra la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividades PVasas de células intactas de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por mipafox. Se muestran los datos del último de los 4 experimentos independientes realizados que no se ajustó al modelo matemático de un componente resistente más uno sensible según muestra la Tabla 6.

A_r (%)	19
A_1 (%)	62
K_1 (μM^{-1})	0.159
IC_{50} componente 1 (μM)	4.36
A_2 (%)	18
K_2 (μM^{-1})	0.0058
IC_{50} componente 2 (μM)	120

4.3 Caracterización de la actividad hidrolizante de acetilcolina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Las células mostraron actividad hidrolizante de acetilcolina tanto intactas como lisadas. No se dispuso de patrón de tiocolina que permitiera transformar los registros de absorbancia en moles de sustratos hidrolizados. Es por ello que la actividad en presencia de inhibidores se expresó en porcentaje con respecto a la actividad de los controles (en ausencia de inhibidores). La actividad de los controles se cuantificó en términos de relación entre el incremento de absorbancia a 410 nm producido por la hidrólisis de acetilcolina registrado según se indica en el apartado 3.7 de la

Resultados

Memoria y la absorbancia a 650 nm producida por la cantidad de proteína presente en la muestra determinada según se indica en la sección 3.5 de la Memoria.

La media de la ratio de absorbancias en muestras control de células intactas fue de 1.946 ± 0.199 para un total de 7 cultivos independientes; mientras que dicha ratio en células lisadas (procedentes del mismo pase que las células intactas) fue de 1.911 ± 0.313 para un total de 7 cultivos independientes. Es decir, que no hubieron diferencias estadísticamente significativas (t de Student) entre el nivel de actividad de células control lisadas y células control enteras. Además, las actividades hidrolizantes de acetilcolina de ambas preparaciones fueron sensibles a paraoxon (un OP no neuropático) y a mipafox (un OP inductor de neuropatía retardada).

4.3.1 Sensibilidad al organofosforado paraoxon.

Célula entera

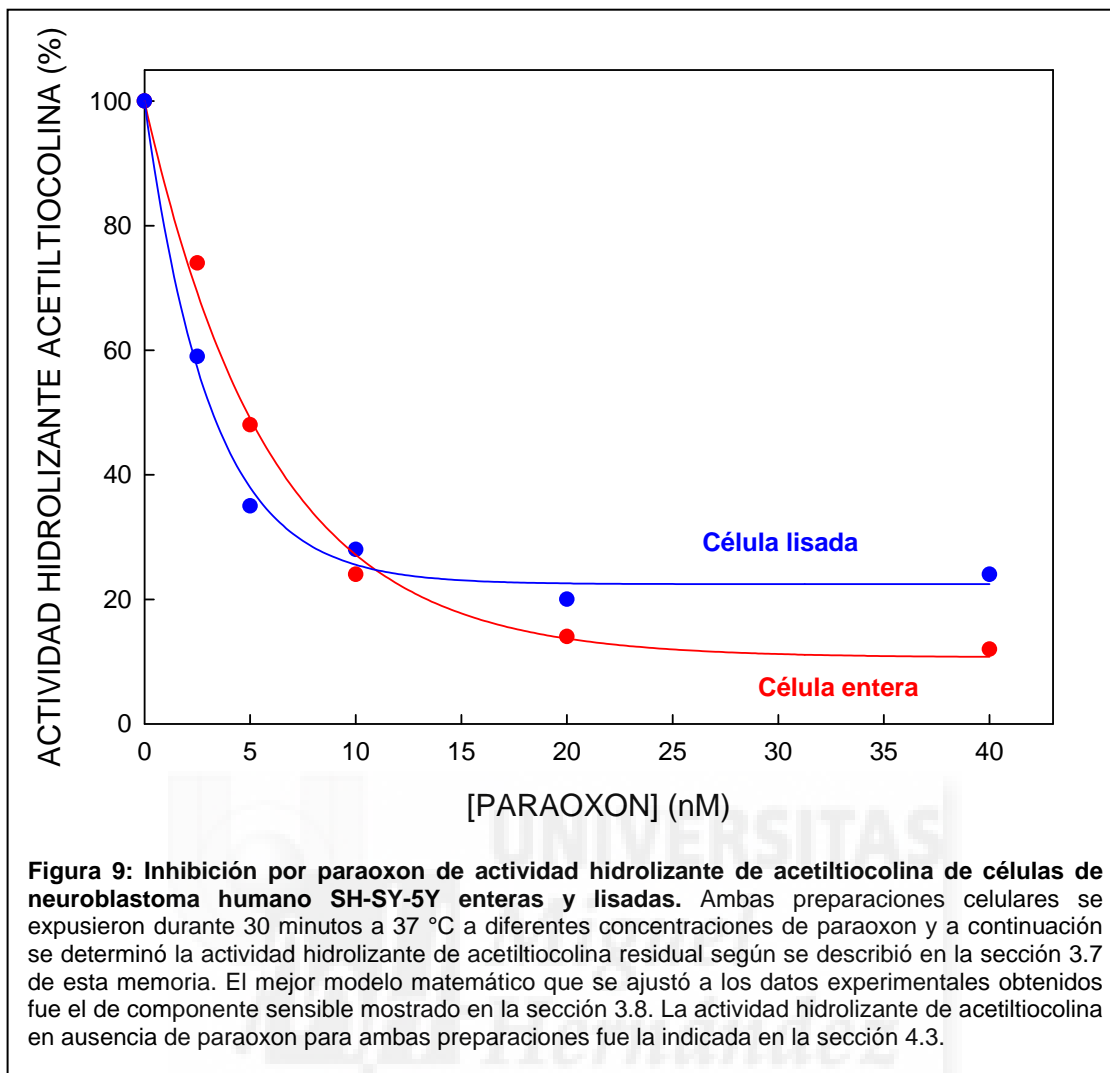
Se realizaron 3 experimentos independientes en total. En dos de ellos el modelo más sencillo que se ajustó mejor a los datos experimentales fue el de un componente sensible sin componente resistente. En cambio, en el tercer experimento el modelo más apropiado fue de un componente sensible y uno resistente, aunque la significación estadística de la mejora al pasar de uno a otro modelo fue pobre ($p < 0.03$). Esta falta de significación estadística nos llevó a considerar que los tres experimentos independientes respondieron a un modelo de un componente sensible del 100% de amplitud con una constante de inhibición de $0.095 \pm 0.036 \text{ nM}^{-1}$. La Figura 9 muestra uno de los 3 experimentos realizados.

Célula lisada

En este caso en dos de los tres experimentos independientes el modelo más sencillo que mejor se ajustó fue el de un componente sensible del 100% de amplitud y constante de inhibición de 0.108 nM^{-1} (media de ambos experimentos) sin componente resistente. La Figura 9 muestra uno de los 2 experimentos que se ajustaron a este modelo. En el tercer ensayo el modelo más sencillo que se ajustó a los datos empíricos obtenidos fue el de un componente sensible y uno resistente según se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividad hidrolizante de acetilcolina de células lisadas de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por paraoxon. Se muestran los datos del único de los experimentos realizados que no se ajustó al modelo matemático de un componente sensible sin término independiente.

A_r (%)	13
A_1 (%)	87
K_1 (nM^{-1})	0.095
IC_{50} componente 1 (nM)	7.30



4.3.2 Sensibilidad al organofosforado mipafox.

Célula entera

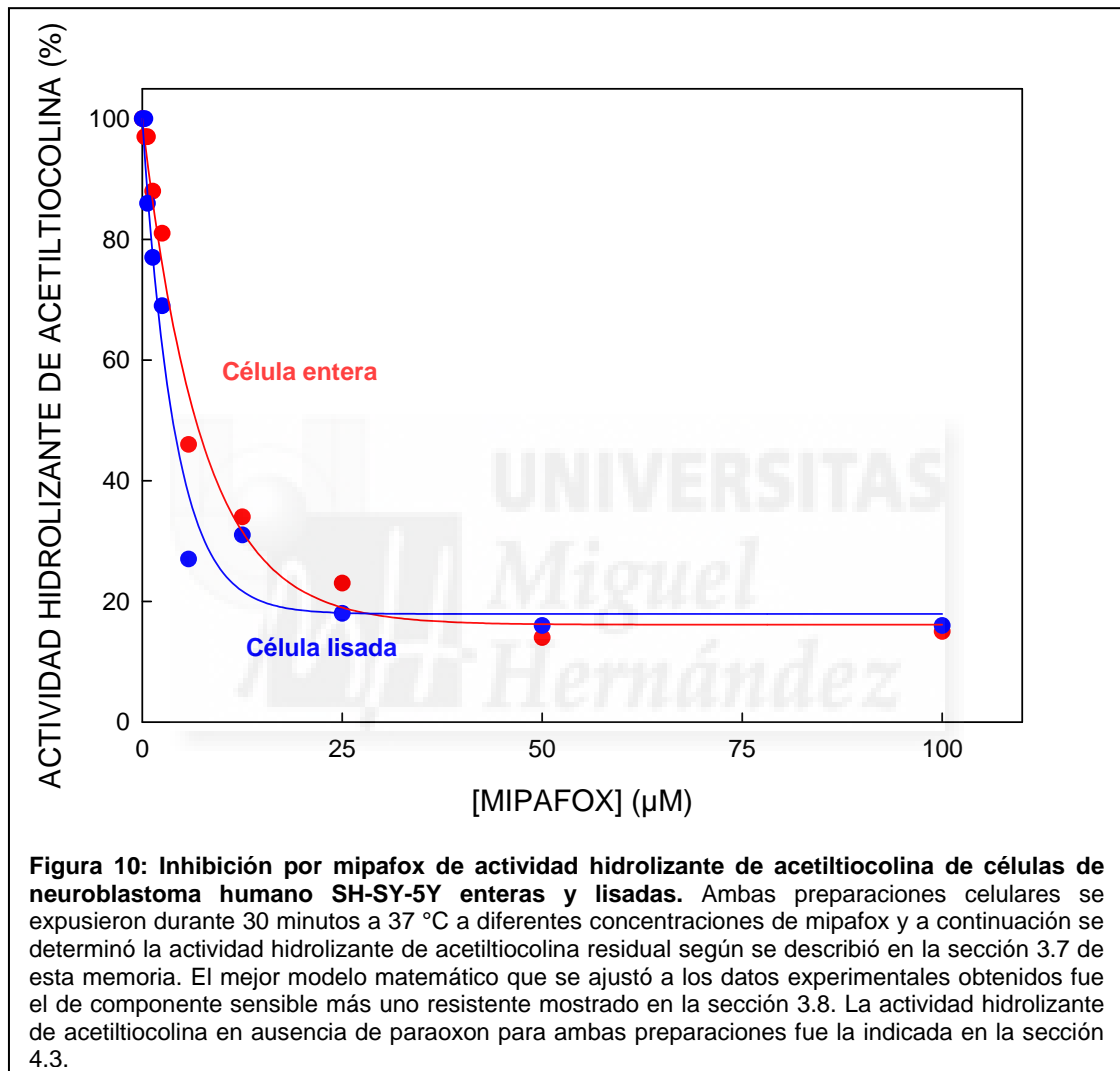
Se realizaron cuatro ensayos independientes y en todos ellos el modelo más sencillo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el de un componente sensible con un componente resistente. La Tabla 9 muestra los parámetros obtenidos en cada uno de los 4 experimentos realizados, mientras que la Figura 10 muestra a modo de ejemplo uno de los experimentos realizados.

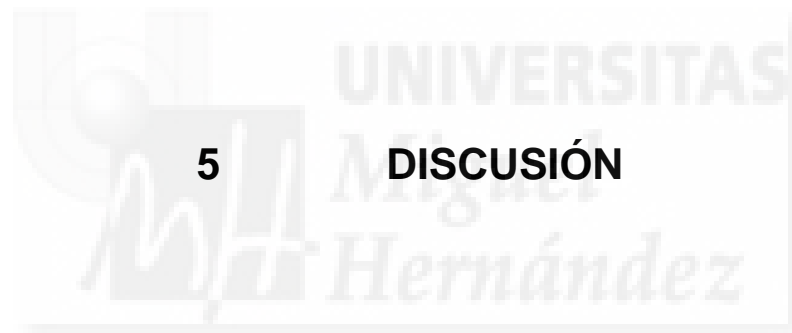
Tabla 9: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividades hidrolizantes de acetiltiocolina de células intactas de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por mipafox.

Parámetros	Datos individuales	media ± d. e.
A_r (%)	15/12/16/16	15±2
A_1 (%)	85/12/84/84	85±2
K_1 (μM^{-1})	0.071/0.190/0.072/0.135	0.117±0.057
IC_{50} componente 1 (μM)	9.76/3.65/9.63/5.13	7.04±3.12

Célula lisada

La inhibición de la actividad hidrolizante de acetiltiocolina por mipafox en células lisadas se ensayó simultáneamente con células enteras. Sin embargo, no se obtuvo una información consistente, ya que los datos experimentales obtenidos en los cuatro experimentos independientes realizados se ajustaron a modelos con diferente número de componentes.





Este trabajo ha demostrado que las células SH-SY5Y tanto en suspensión como lisadas expresan actividades hidrolizantes de PV y de acetilcolina y que además, éstas se inhiben por el OP neuropático paraoxon y por el OP neuropático mipafox.

Ehrich (1995) también demostró que las células de neuroblastoma SH-SY5Y poseían AChE, que se inhibía por una gran variedad de OPs, y NTE (un tipo particular de PVasa) que se inhibía solamente por OPs neuropáticos incluido el mipafox que también empleamos en este TFG. Un estudio algo posterior de este mismo grupo de investigación demostró que las PVasas y AChE de neuroblastoma de humano SH-SY5Y y de ratón NB41A3 se inhibía por 11 diferentes OPs, aunque en las células humanas las PVasas fueron más resistentes que la AChE para 9 de los 11 OPs, y para los 11 en el caso de las células de ratón (Ehrich and Correll, 1998).

Más recientemente el Grupo de Toxicología y Salud Medioambiental de la UMH demostró que la NTE expresada por las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y respondía de modo similar a la expresada en cerebro de pollo (modelo animal típicamente utilizado para ensayar *in vivo* la neuropatía retardada inducida por OPs) tanto en términos de inhibición como en términos de reactivación y envejecimiento, lo que permitía utilizar este modelo como método alternativo *in vitro* a la experimentación animal para la evaluación de la capacidad de los OPs de inducir neuropatía (Sogorb et al., 2010).

Así pues, este no es el primer trabajo que describe actividades PVasas y AChE inhibibles por OPs en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, pero sí es, hasta donde nosotros tenemos conocimiento, el primer intento de diseccionar los diferentes componentes de esterasas sensibles a OPs sobre la base de su sensibilidad a diferentes OPs.

5.1 Actividades hidrolizantes de fenilvalerato sensibles a paraoxon

Los experimentos iniciales permitieron establecer en célula intacta un modelo matemático que se ajustaba a los datos experimentales con 2 componentes sensibles sin término independiente, pero el ensayo que incluyó concentraciones de paraoxon inferiores a 10 μM permitió diseccionar mejor el componente más sensible, que en los experimentos iniciales había quedado parcialmente solapado con el componente más resistente.

Independientemente de las consideraciones estadísticas y matemáticas el comportamiento del sistema en célula intacta es biológicamente consistente con un componente resistente con IC_{50} de entre 214 y 300 μM y con una amplitud de alrededor del 70% (amplitud del componente A_2 en el modelo sin término independiente y suma de amplitudes de componentes A_2 y resistente en el modelo que considera un componente absolutamente resistente) más un componente más sensible de amplitud alrededor del 30% con IC_{50} de entre 1.5 y 5.0 μM . Este modelo también es consistente con lo publicado anteriormente por el Grupo de Toxicología y Salud Medioambiental de la UMH donde

Discusión

se encontró en este mismo modelo celular actividades Pvasas sensibles a paraoxon con una IC_{50} de 6 μM y una amplitud del 15%, siendo el 85% restante bastante más resistentes ($IC_{50}= 407 \mu M$) (Sogorb et al., 2010).

En los experimentos con célula lisada encontramos una situación similar a los de célula intacta. Es decir, cuando se ensayan concentraciones superiores a 10 μM un modelo que incluye un componente con IC_{50} de 120 μM (similar al componente mayoritario en célula intacta) y cuando se ensayan concentraciones inferiores a 10 μM se discrimina un componente de una amplitud de alrededor del 30% mucho más sensible, es decir, con una IC_{50} de 2 μM .

La Tabla 10 muestra un resumen global de los parámetros matemáticos de los modelos que mejor se ajustan a los resultados experimentales.

Tabla 10: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividad hidrolizante de Pvasas en células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por paraoxon. Se muestran los datos del modelo matemático más complejo capaz de explicar los resultados con plausibilidad biológica.

	Sensible 1			Sensible 2			Resistente
	A (%)	k (μM^{-1})	IC_{50} (μM)	A (%)	k (μM^{-1})	IC_{50} (μM)	Ar
Célula intacta	34	0.441	1.6	40	0.00233	301	26
Célula lisada	26	0.33	2.7	73	0.0058	120	-

Se puede observar que la IC_{50} del componente más resistente en la célula intacta es aproximadamente 2.5 veces superior al de la célula lisada. Esto sugiere que en la célula intacta las membranas pudieran estar ejerciendo algún tipo de efecto barrera que disminuyera la biodisponibilidad del OP, lo que explicaría la mayor IC_{50} . Para el caso del componente sensible, con IC_{50} esta diferencia no se observa probablemente porque la sensibilidad del sistema no sea suficiente para discriminar los efectos de dos concentraciones separadas del orden de una unidad de μM .

5.2 Actividades hidrolizantes de fenilvalerato sensibles a mipafox

La Tabla 11 resume todos los parámetros matemáticos de los modelos experimentales que mejor se ajustaron a los resultados experimentales obtenidos durante el estudio de la inhibición de actividad hidrolizante de PV por mipafox.

Tabla 11: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividad hidrolizante de Pvasas en células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por mipafox. Se muestran los datos del modelo matemático más complejo capaz de explicar los resultados con plausibilidad biológica. N indica el número de experimentos (cultivos) independientes realizados.

	Sensible 1			Sensible 2			Resistente
	A (%)	k (μM^{-1})	IC_{50} (μM)	A (%)	k (μM^{-1})	IC_{50} (μM)	Ar
Célula intacta (n=4)	51	0.105	9.0	35	0.0047	163	15
Célula lisada (n=3)	82	0.083	8.9	-	-	-	18
Célula lisada (n=1)	62	0.159	4.3	18	0.0058	120	19

Como se observa en cualquiera de los casos aparece un componente absolutamente resistente a mipafox de una amplitud de entre 15 y 19%. Además, de entre los componentes sensibles el mayoritario tiene una IC_{50} de entre 4.3 y 9 μM y dependiendo del experimento en las células lisadas apareció un componente de mayor sensibilidad ($IC_{50} = 120 \mu\text{M}$) y similar al detectado en célula intacta ($IC_{50} = 163 \mu\text{M}$). Estos datos sugieren que las membranas plasmáticas están ejerciendo de barrera para la difusión del mipafox al interior de la célula, lo que provoca la aparición del componente de amplitud 35%. Este efecto desaparece en célula lisada y solamente se manifestó en uno de los 4 experimentos independientes realizados, lo que podría explicarse considerando que tal vez, en ese único experimento por causas que desconocemos el lisado de las células no fue igual de eficaz que en los otros 3, provocando la aparición de dicho componente resistente.

5.3 Actividades hidrolizantes de acetiltiocolina sensibles a paraoxon

La Tabla 12 resume todos los parámetros matemáticos de los modelos experimentales que mejor se ajustaron a los resultados experimentales obtenidos durante el estudio de la inhibición de actividad hidrolizante de acetiltiocolina por paraoxon.

Tabla 12: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividad hidrolizante de acetiltiocolina en células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por paraoxon. Se muestran los datos del modelo matemático más complejo capaz de explicar los resultados con plausibilidad biológica. N indica el número de experimentos (cultivos) independientes realizados.

		Sensible 1			Sensible 2			Resistente
		A (%)	k (nM^{-1})	IC_{50} (nM)	A (%)	k (nM^{-1})	IC_{50} (nM)	Ar
Célula	intacta	100	0.095	8.1	-	-	-	-
(n=3)								
Célula	lisada	100	0.108	9.3	-	-	-	-
(n=2)								
Célula	lisada	87	0.095	7.3	-	-	-	13
(n=1)								

Se observa un solo componente sensible a paraoxón con una IC_{50} de 7-9 nM. No tenemos una explicación para la aparición del componente resistente en uno de los experimentos con célula lisada.

5.4 Actividades hidrolizantes de acetiltiocolina sensibles a mipafox

No fue posible establecer conclusiones con respecto a los experimentos de inhibición de actividad hidrolizante de acetiltiocolina por mipafox en célula lisada y no tenemos una explicación para justificar estos resultados. Sin embargo, en célula lisada el modelo matemático que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el de un componente resistente y uno sensible según se indica en la Tabla 13.

Tabla 12: Parámetros matemáticos que se ajustan a la inhibición de actividad hidrolizante de acetilcolina en células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y por mipafox. Se muestran los datos del modelo matemático más complejo capaz de explicar los resultados con plausibilidad biológica. N indica el número de experimentos (cultivos) independientes realizados.

		Sensible 1			Sensible 2			Resistente
		A (%)	k (μM^{-1})	IC ₅₀ (μM)	A (%)	k (μM^{-1})	IC ₅₀ (μM)	Ar
Célula	intacta	85	0.117	7.0	-	-	-	15
(n=3)								

Es de destacar que la amplitud del componente resistente es muy similar a la del componente resistente a mipafox de la actividad PVasa, de igual modo que las IC₅₀ de los componentes sensibles de ambas actividades fueron también muy similares (del orden de unidades de μM). Esto sugiere una cierta similitud o solapamiento entre el grupo de esterasas hidrolizantes de PV y acetilcolina sensibles a mipafox, de modo similar a como se ha descrito recientemente en cerebro de pollo (Benabent, 2015).



6 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA



6.1 CONCLUSIONES

1 Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expresan actividades hidrolizantes de fenil valerato y acetilcolina inhibibles por paraoxon y mipafox.

2 Se han discriminado varios componentes sensibles y resistentes al organofosforado no neuropático paraoxon y al organofosforado neuropático mipafox, lo cual sugiere que las células de neuroblastoma SH-SY5Y pueden ser un buen modelo para la discriminación de esterasas en sistema nervioso humano.

3 Los resultados sugieren que las membranas plasmáticas podrían estar ejerciendo en algunos casos un efecto que disminuyera la biodisponibilidad de los organofosforados y en consecuencia aparecieran componentes enzimáticos más resistentes de los detectados en células lisadas.

4 La conclusión 3 sugiere que los estudios experimentales para la discriminación de las diferentes esterasas sensibles a organofosforados se deberían realizar en células lisadas en lugar de en células intactas, aunque los estudios destinados a determinar el papel fisiológico de estas esterasas deberán ser realizados necesariamente en células cultivadas intactas.

6.2 PROYECCIÓN FUTURA

La proyección de este TFG a largo plazo debería considerar las siguientes tareas:

1 Ampliar la caracterización de las esterasas hidrolizantes de acetilcolina y PV utilizando células lisadas y, además de paraoxon y mipafox, un mayor número de agentes inhibidores, como por ejemplo DFP (organofosforado inhibidor de NTE e inductor de neuropatía retardada), PMSF (agente promotor de neuropatía retardada inducida por OPs), iso-OMPA (inhibidor irreversible considerado específico de butirilcolinesterasa), etopropazina (inhibidor reversible considerado específico de butirilcolinesterasa) y BW284c51 (inhibidor reversible considerado específico de acetilcolinesterasa).

2 Aplicar los modelos de análisis más complejos desarrollados por Estévez y Vilanova (2009) que incluyen la posibilidad de analizar efectos como la inhibición simultánea y concurrente con el sustrato, la reactivación y otros.

3 Aplicar técnicas de proteómica para la purificación e identificación de las diferentes fracciones de esterasas caracterizadas.

4 Analizar si las esterasas identificadas pueden estar implicadas en los mecanismos moleculares desencadenantes de efectos de neurotoxicidad crónica y al neurodesarrollo atribuidos a OPs.

5 Realizar todo lo anterior en otros modelos celulares no neuronales de sistema nervioso, como por ejemplo glía, ya que no podemos descartar que las dianas de toxicidad crónica de los OPs estuvieran localizadas en algún tipo de célula de sistema nervioso diferente a las neuronas.





Aldridge WN. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem. J.* 1953; 53:117–124.

Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes Bastos M, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):85-103.

Benabent M. 2015. Carboxilesterasas y colinesterasas de cerebro de pollo: interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche. Accesible en RediUMH (<http://dspace.umh.es/>)

Casida JE, Quistad GB. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(8):983-98.

Ehrich M, Correll L. Inhibition of carboxylesterases in SH-SY5Y human and NB41A3 mouse neuroblastoma cells by organophosphorus esters. *J Toxicol Environ Health A.* 1998;53(5):385-99.

Ehrich M. Using neuroblastoma cell lines to address differential specificity to organophosphates. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22(4):291-2.

Estevez J, Vilanova E. Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: esterases and organophosphorus compounds. *Crit Rev Toxicol.* 2009;39(5):427-48.

Kovarik Z, Radić Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Taylor P. Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochem J.* 2003;373(Pt 1):33-40.

Mangas I. 2013. Brain carboxylesterases interacting with organophosphorus compounds: Kinetic characterization and approaches to purification and molecular identification. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche. Accesible en RediUMH (<http://dspace.umh.es/>)

Satoh T, Hosokawa M. Organophosphates and their impact on the global environment. *Neurotoxicology.* 2000;21(1-2):223-7.

Sogorb MA, González-González I, Pamies D, Vilanova E. An alternative in vitro method for detecting neuropathic compounds based on acetylcholinesterase inhibition and on inhibition and aging of neuropathy target esterase (NTE). *Toxicol In Vitro.* 2010;24(3):942-52.

Bibliografía

World Health Organization. Organophosphorus insecticides: a general introduction (EHC 63, 1986), 1986. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm>

