



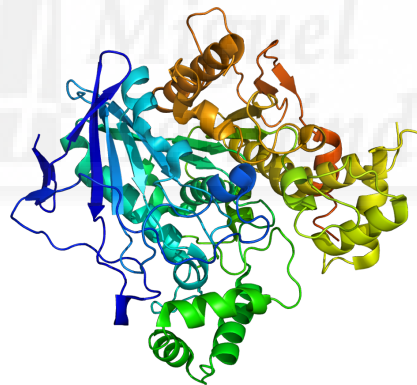
Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández



ACTIVIDAD FENILVALERATO ESTERASA EN LA BUTIRILCOLINESTERASA HUMANA

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biotecnología
Facultado de Ciencias Experimentales
Curso 2016-2017



Realizado por: María Romo Ibáñez

Tutor: Jorge Estévez Domènech, Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández de Elche | Departamento de Biología Aplicada

Área de toxicología

ÍNDICE

ÍNDICE

0. Resumen.....	0
1. Introducción.....	1
1.1 Los compuestos organofosforados.....	1-3
1.2 Las carboxilesterasas.....	3-4
2. Antecedentes.....	5-6
3. Objetivos.....	7
4. Materiales y Métodos.....	8-15
4.1 y 4.2 Tampones, reactivos y material biológico utilizado.....	8-9
4.3 Equipos utilizados.....	9-10
4.4 y 4.5 Microensayos de actividad colinesterasa y PVasa	10
4.6 Microensayo de competición entre sustratos.....	10-11
4.7 y 4.8 Curvas de calibrado de fenol y tiocolina.....	11-12
4.9 Ensayo de reactivación enzimática tras inhibición con paraoxon.....	12-13
4-10 Modelos matemáticos y análisis de los datos.....	13-15
5. Resultados.....	16-27
5.1 y 5.2 Actividad PVasa y del tiempo de reacción.....	16-20
5.3 Actividad PVasa en BuChE humana.....	21-23
5.4 Actividad colinesterasa en BuChE humana.....	24-26
5.5 Ensayo de reactivación de actividad de BuChE tras inhibir con paraoxon.....	26-27
6. Discusión.....	28-34
6.1 Optimización condiciones del ensayo.....	28
6.2 Actividad PVasa en otras colinesterasas.....	28
6.3. Mecanismos de reacción.....	29-31
6.4 Reactivación enzimática tras inhibición con paraoxon.....	31
7. Conclusiones y proyecciones futuras.....	32-33
8. Bibliografía.....	34-37
Anexos.....	38-39

ABREVIATURAS

BuChE: butirilcolinesterasa

AChE: acetilcolinesterasa

PVasa: fenilvalerato esterasa

PV: fenilvalerato o valerato de fenilo

RESUMEN

RESUMEN

Se ha descrito que la butirilcolinesterasa (BuChE) humana presenta actividad PVasa. No se han caracterizado sus propiedades y parámetros cinéticos para la actividad PVasa ni se ha estudiado la interacción entre sustratos para las actividades PVasa y colinesterasa.

En este trabajo se pretende caracterizar cinéticamente la actividad fenilvalerato esterasa de la enzima BuChE humana purificada de suero, y estudiar el tipo de interacción entre dos de los sustratos hidrolizados por esta enzima: el fenilvalerato y la acetiltiocolina. Este trabajo muestra que los dos sustratos no compiten en el mismo centro mediante un mecanismo de Michaelis-Menten, sugiriendo la posibilidad de la existencia de dos centros activos diferentes para cada sustrato. Los resultados muestran que la actividad PVasa presenta un mecanismo de Michaelis-Menten, mientras que la actividad acetilcolinesterasa, como indicaba la bibliografía, se rige por un mecanismo bifásico de activación por sustrato.

Palabras clave: Butirilcolinesterasa (BuChE), fenilvalerato (PV), acetilcolinesterasa (AChE), paraoxon

ABSTRACT

It has been described that the human butyrylcholinesterase (BuChE) presents phenylvalerate esterase activity. Its kinetics properties and parameters have not already been determined for phenylvalerate esterase activity, so as the interaction between substrates for both activities, the phenylvalerate esterase and the acetylcholinesterase ones.

The objective of this study is to characterize kinetically the activity phenylvalerate activity of the human purified BuChE enzyme from plasmatic serum and to study the interaction between two of the substrates hydrolyzed by this enzyme: the phenylvalerate and the acetylthiocholine. In this work is shown that both substrates do not compete for the same active center by a Michaelis-Menten mechanism, suggesting the possibility of the existence of two different active centers for each substrate. The results show that the phenylvalerate activity follows a Michaelis-Menten mechanism, while the acetylcholinesterase activity, as the bibliography indicates, is ruled by a biphasic mechanism activated by substrate.

Key words: butyrylcholinesterase (BuChE), phenylvalerate (PV), acetylcholinesterase (AChE), paraoxon

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los compuestos organofosforados inhibidores de esterasas

1.1.1. Características químicas

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

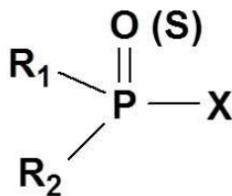


Figura 1.1. Estructura química general de los compuestos organofosforados. R1 y R2 son normalmente grupos arilo o alquilo simples. El grupo X es el llamado “grupo saliente” y puede tener una gran variedad de naturalezas químicas.

A lo largo de la historia, los OPs se han empleado para muchos propósitos, destacando su uso como plaguicidas y armas químicas. Son una de las clases de insecticidas más utilizadas actualmente y su importancia probablemente continúe, pues son efectivos y de bajo costo (Casida y Durkin., 2013). Sin embargo, se ha visto que los OPs pueden afectar a humanos, causando múltiples desordenes neurotóxicos. En la **Tabla 1** se describe la toxicidad de organofosforados y se relaciona con la inhibición de las esterasas. La acción tóxica de los OPs se puede resumir en:

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

Tabla 1. Toxicidad de organofosforados relacionada con la inhibición de las esterasas.

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

INTRODUCCIÓN

1.1.2. Reacciones de interacción con esterasas

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

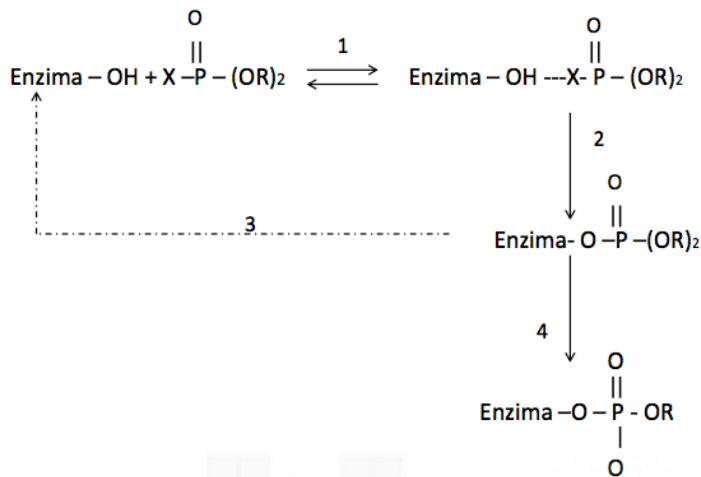


Figura 1.2. Mecanismo general de esterasas por organofosforados (OPs).

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

1.1.3. Dianas moleculares no identificadas

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

1.2. Carboxilesterasas

1.2.1. Tipos de carboxilesterasas

Las enzimas carboxilesterasas (CbEs) pertenecen al grupo de las esterasas encargadas de catalizar reacciones de hidrólisis de ésteres carboxílicos. Hay varios tipos de enzimas CbEs, y Aldridge (1953)

INTRODUCCIÓN

las clasificó en función de su interacción con los compuestos OPs:

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

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

1.2.2. Colinesterasas

Las colinesterasas son enzimas serinohidrolasas, una familia de esterasas tipo de las B-esterasas. Contienen un resto de serina en el sitio activo e hidrolizan ésteres de colina, tales como acetilcolina, butirilcolina, succinilcolina, etc. Sin embargo, el principal sustrato es el neurotransmisor acetilcolina, ya que se concentran mayoritariamente en las señales colinérgicas del cerebro y en las uniones neuromusculares.

Existen dos tipos diferentes de colinesterasas en vertebrados, la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (BuChE), también llamada pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o colinesterasa de suero (EC 3.1.1.8). Se diferencian por su especificidad de sustrato (Kovarik et al., 2003). Mientras que se ha demostrado que la AChE desempeña una función de terminación de la neurotransmisión colinérgica en la hendidura sináptica y neuromuscular, no se conoce bien el papel fisiológico que desempeña la BuChE. Algunos datos sugieren que la BuChE participa en procesos de detoxificación, su ausencia o bajos niveles en determinados individuos, aparentemente no supone consecuencias (Lockridge, O. et al, 2005). La estructura de ambas enzimas se representa en las **Figuras 1.4 y 1.5**.

Ambas enzimas son codificadas por genes distintos, y se ha demostrado que un único gen codifica la AChE (Schumacher et al., 1986; Massoulié et al., 1993; Taylor y Rádic, 1994), y que la gran diversidad molecular se debe al procesamiento del mRNA. El gen que codifica BuChE, aunque sea diferente, está estructuralmente relacionado con el de la AChE (Lockridge, 1987).

Los centros activos de las AChEs y de las BuChEs son similares respecto al centro del éster, aunque las principales diferencias de especificidad entre AChE y BuChE son el saco acilo del centro activo, el subsitio de la colina sobre el centro activo y el sitio aniónico periférico (Taylor y Rádic, 1994).

El sustrato natural de la AChE es la acetilcolina, aunque también es capaz de hidrolizar butirilcolina, β -metiltiocolina, propionilcolina y a los análogos tiocolina de los tres compuestos, mientras que la BuChE

INTRODUCCIÓN

no actúa sobre la β -metiltiocolina (Repetto, 1995; Alles y Hawes, 1940). En mamíferos la BuChE hidroliza la butirilcolina 4 veces más rápido que a la acetilcolina (Massoulié et al, 1993 y 2005).

Otra forma de distinguir ambas enzimas es por sus inhibidores. La BuChE es inhibida por la etopropazina y el iso-OMPA que no influyen en la AChE de mamíferos (Vellom et al, 1993; Radic et al, 1993), mientras que el BW284C51 es un fuerte inhibidor de la AChE. Además, esta última también experimenta un efecto de inhibición por exceso de sustrato (Radic y Taylor, 2006), contrariamente a la BuChE que es activada por el mismo (Masson et al, 1993). También se ha descrito que la BuChE se activa por exceso de acetiltiocolina (Masson et al, 1993). Esta activación está mediada por la descrita presencia de dos sitios de unión para acetiltiocolina: el sitio catalítico y el periférico regulatorio. (Cauet G et al, 1987 y Mason et al, 1993).

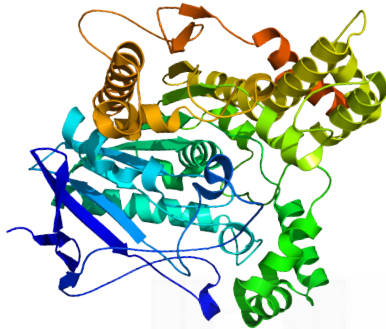


Figura 1.4. Estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa humana. Imagen obtenida de Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>)

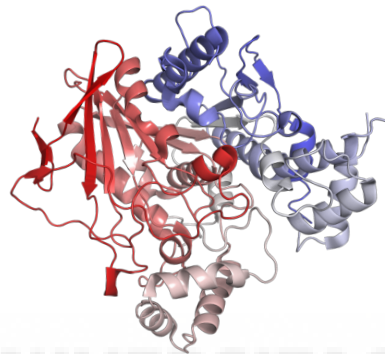


Figura 1.5. Estructura tridimensional de la butirilcolinesterasa humana. Imagen obtenida de Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>)

1.2.3. Fenilvalerato esterasas y NTE

El fenilvalerato ha sido el sustrato usado para la identificación y caracterización de la diana de neuropatía retardada (NTE; Johnson 1975; Chemnitiu et al. 1983; Carrington and Abou-Donia 1984; Vilanova et al. 1990; Glynn et al. 1994, 1998) y otras serin hidrolasas de tejido nervioso y cerebro (Céspedes et al. 1997; Escudero et al. 1997; Barril et al. 1999; Estévez et al. 2004, 2010, 2011).

Las fenilvalerato esterasas (PVASas) son un grupo de carboxilesterasas (B-esterasas) que pueden ser estudiadas mediante la hidrólisis del carboxílico fenilvalerato (PV). Dentro de este grupo encontramos NTE, que puede ser diferenciada de otras PVASas debido a su resistencia a paraoxón (organofosforado no inductor de OPIDN) y a su sensibilidad a mipafox (fosforamidato inductor de OPIDN).

2. ANTECEDENTES

2.1. Discriminación de componentes enzimáticos con actividad PVasa

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

En los últimos años en nuestro laboratorio se han llevado a cabo una serie de trabajos con el objetivo de caracterizar proteínas con actividad PVasa. Las investigaciones se han realizado en cerebro de pollo, debido a que es el modelo experimental de la OPIDN, se utilizaron como modelos los compuestos neurotóxicos: paraoxon, mipafox y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonil); y han proporcionado evidencias de que la mayoría de esterasas que hidrolizan fenilvalerato son altamente sensibles a uno o varios de estos inhibidores.

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

Se detectaron componentes susceptibles, diferenciados por sus constantes de inhibición y reactivación (Mangas, I. et al, 2011; 2012a; 2012b; 2013a) aplicando la estrategia y los modelos cinéticos descritos previamente por Estévez y Vilanova (2009). Estos modelos cinéticos se habían usado para discriminar esterasas sensibles en nervio periférico y suero de pollo (Estévez et al, 2004; 2009; 2010; 2011; 2012; García et al 2003). Este procedimiento experimental ha demostrado ser una herramienta de utilidad para identificar biomarcadores potenciales de la exposición o toxicidad de OPs. De esta manera, se discriminaron experimentalmente tres componentes enzimáticos con actividad PVasa en fracción soluble de cerebro de pollo: E α , E β , y E γ .

Mangas y colaboradores (Mangas et al. 2012) sugirieron que las propiedades cinéticas de actividad PVasa de E α con OPs son compatibles con ser una diana con fenómenos de potenciación del PMSF en OPIDN y en los efectos a exposiciones de bajas dosis de OPs.

2.1.1. PVasas y colinesterasas

Benabent et al. (2014) mostraron que el fenilvalerato inhibió parcialmente la actividad colinesterasa en fracción soluble de cerebro de pollo, y viceversa; la acetiltiocolina (AtCh) muestra cierta inhibición en los componentes de actividad PVasa.

Este escenario sugiere que los componentes PVasa pueden contener enzimas que hidrolicen acetiltiocolina. Mediante análisis proteómico, se demostró que la fracción enriquecida con el

ANTECEDENTES

componente E α de actividad PVasa contiene BuChE (Mangas et al. 2016).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la enzima BuChE humana tiene actividad PVasa (Mangas et al. 2017). Además, los inhibidores mipafox, PMSF e iso-OMPA parecen actuar de manera similar para ambas actividades. Sin embargo, el paraoxon actúa de manera diferente (ver **Tabla 2**), sugiriendo un mecanismo más complejo (datos no publicados). Se estudió la inhibición de la BuChE con paraoxon obteniendo una I₅₀ para PVasa aproximadamente 3 veces mayor que para colinesterasa. Este hecho sugiere, o bien la presencia de distintos centros activos para los dos sustratos, o bien para la unión del paraoxon con la enzima o que exista un proceso de reactivación espontánea de la actividad. Se ha descrito en CbEs de pollo (Estévez et al. 2011) que puede haber reactivación espontánea tras inhibición con paraoxon, lo que puede alterar la estimación de los parámetros cinéticos en ambas actividades si no se considera este efecto. No se conoce ningún estudio en el que se haya visto reactivación de la BuChE humana inhibida por paraoxon.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la inhibición por paraoxon de las actividades PVasa y colinesterasa. Se muestra la constante de inhibición (k) y el I₅₀ para ambas actividades.

Experimento	Actividad PVasa		Actividad colinesterasa	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
k (nM ⁻¹ ·min ⁻¹)	0,0019	0,0019	0,0065	0,0055
I ₅₀ (nM)	12,44	10,61	3,56	4,24

2.2. Inhibidor utilizado

Fosfato de O,O-dietil O-(4-nitrofenilo) (paraoxon)

El paraoxon, (**Figura 1.6**) es el metabolito activo del plaguicida paratión y el compuesto representativo del grupo dietil de los plaguicidas OPs (Worek et al., 2004). El paratión fue desarrollado por Farben en 1940 y es usado como insecticida, principalmente en cultivos hortofrutícolas, algodón y trigo. Su toxicidad aguda es: en ratas: DL50 oral (M): 13 mg/kg; (F): 3.6 mg/kg y se ha reportado una dosis oral de 3-5 mg/kg usualmente fatal en humanos (FAO report., 1969).

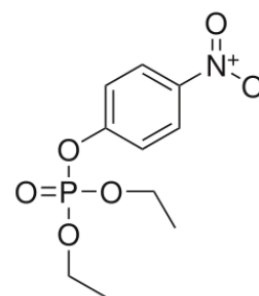


Figura 1.6. Estructura química del paraoxon (Número CAS 311-45-5)

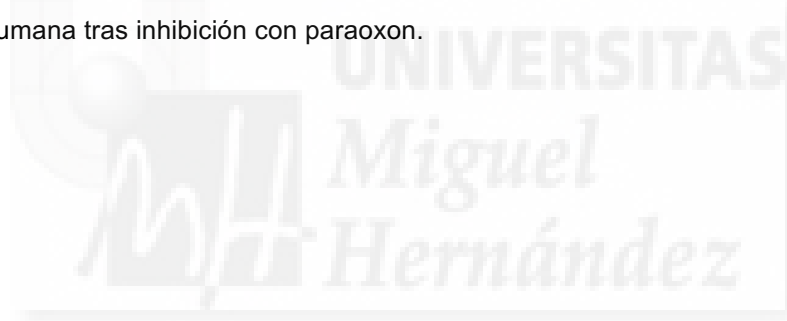
OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es caracterizar cinéticamente la actividad hidrolizante del fenilvalerato y la interacción entre fenilvalerato y acetiltiocolina en las actividades PVasa y colinesterasa en BuChE humana.

3.1. Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones óptimas para diseñar los ensayos de interacción entre sustratos en actividades PVasa y colinesterasa con BuChE humana.
2. Estudiar la cinética de la actividad PVasa en colinesterasas de diferentes especies.
3. Caracterizar la interacción entre sustratos en actividades fenilvalerato esterasa y colinesterasa de BuChE humana.
4. Determinar la existencia de la reactivación espontánea de las actividades PVasa y colinesterasa en BuChE humana tras inhibición con paraoxon.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tampones y reactivos utilizados

Tampón fosfato: dihidrofosfato de sodio monohidratado 0,1 M pH 7.4. Se preparó disolviendo dihidrofosfato de sodio monohidratado en agua destilada. El pH se ajustó a 7.4 con NaOH concentrado y se conservó a temperatura ambiente.

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

Albúmina de suero bovino (BSA). (Pureza 96%) se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Se preparó en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4. Se utilizó para preparar las disoluciones de enzima y los blancos de las mismas.

Yoduro de acetiltiocolina (AtCh). (Pureza superior al 98%) Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S. A. (Madrid, España). Para su utilización 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.

Dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). Se adquirieron de grado analítico de Panreac Química S. A. (Barcelona, España) y Sigma-Aldrich Química S. A. (Madrid, España) respectivamente. Se preparó una disolución de SDS 2% / DTNB 6 mM en tampón fosfato 0.1 M / EDTA 1 mM, pH 7.4 y se conservó a temperatura ambiente en botella de topacio para evitar la degradación del DTNB.

Dietyl p-nitrofenilfosfato (paraoxon). (Pureza superior al 90%) Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S. A. (Madrid, España). Se preparó una disolución concentrada 10 mM en acetona seca y se conservó a -20 °C.

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

Fenilvalerato (PV). Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA). Para los ensayos de actividad se preparó una disolución concentrada de 30 mg/ml (150 mM) en N,N-dimetilformamida (DMF) y se conservó en nevera a 4°C, siendo estable durante meses. Para su utilización como sustrato se prepararon disoluciones, inmediatamente antes de su uso, a las concentraciones requeridas en el ensayo, de forma que el porcentaje de DMF no fuera superior al 3% para que no se viera alterada la actividad enzimática.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

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.

Fenol cristalizado PA (Panreac). Se preparó una disolución de 1 mM a partir de la cual se diluyeron las diferentes concentraciones para realizar la curva de calibrado en agua ultrapura.

4.2. Material biológico

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

Butirilcolinesterasa humana (hButChE). Aislada de plasma humano y proporcionada por Douglas Cerasoli [USAM- RICD (US Army Medical Research Institute of Chemical Defense), Aberdeen Proving Ground, MD, USA].

Butirilcolinesterasa (C. 3.1.1.8) de suero de caballo (BuChE sc) liofilizada, ≥ 10 unidades/mg de proteína, C7512, adquiridos de Sigma-Aldrich. Se preparó un stock a 3 mg/ml en Tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4.

Acetilcolinesterasa (C. 3.1.1.7) de anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*) (AChE ae) Tipo V-S, liofilizada, más de 1,000 unidades/mg de proteína, C2888, adquiridos de Sigma-Aldrich Química S. A. (Madrid, España). Se preparó un stock a 1mg/ml en tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4.

Las soluciones enzimáticas se prepararon a diferentes concentraciones, según lo requiriese el ensayo a realizar, con BSA 1% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4 y comprobando su actividad antes de realizar cada ensayo. Las concentraciones enzimáticas se refieren a la concentración de sitios catalíticos, i.e., monómeros.

4.3. Equipos utilizados

Estación automatizada Biomek 2000 (Beckman-Coulter): esta estación de trabajo se utilizó para realizar todas las medidas de actividades enzimáticas mediante microensayo, a fin de minimizar el consumo de muestra, permitiendo además la automatización la realización simultánea de un número elevado de muestras y garantizando la reproducibilidad de los volúmenes y tiempos. Estuvo equipada con pipetas multicanal (8x) con capacidad entre 20-200 μ l, dos termobloques de aluminio termostático para 8x12 minitubos de 1 mL con un controlador de temperatura electrónico, y una microplaca de 96 pocillos para la lectura fotométrica.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Centrífugas: se utilizó la centrífuga Allegra 21R equipada con un rotor 54180 de Beckman Coulter.

Filtros de centrifugación Amicon Ultra de 0,5 mL. Ultracel 10K proporcionados por Millipore. Se utilizaron para eliminar el paraoxon de la disolución enzimática en el ensayo de reactivación tras inhibición con paraoxon.

4.4. Microensayo de actividad colinesterasa

Se mezclaron 120 μ L de una solución con enzima a la concentración deseada (0,5 nM en reacción) en BSA 1% con 120 μ L de otra solución con el sustrato. Pasado el tiempo de reacción, especificado en cada ensayo, se detiene el proceso añadiendo 120 μ L de SDS 2% / DTNB (6 mM) y, posteriormente, se añadieron 120 μ L de BSA 1% a las muestras o enzima en el caso de los blancos. 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 de cerebro.

4.5. Microensayo de actividad PVasa

Se mezclaron 120 μ L de una solución con enzima a la concentración deseada (0,5 nM en reacción) en BSA 1% con 120 μ L de otra solución con el sustrato. Pasado el tiempo de reacción, especificado en cada ensayo, se detuvo el proceso añadiendo 120 μ L de SDS 2% / AAP (0,25 mg/mL) y, posteriormente, se añadieron 60 μ L de ferricianuro potásico. Se midió la absorbancia a 510 nm.

El método colorimétrico utilizado está basado en el método de medida de fenol adaptado por Jonhson (1977) para el ensayo de NTE y optimizado en nuestro laboratorio (Escudero et al. 1997, Mangas et al. 2012a)

4.6. Microensayo de competición entre sustratos.

El ensayo para actividad PVasa se realizó en termobloques de aluminio a 37°C (temperatura óptima de la enzima). Se dispuso en minitubos de 1 mL 120 μ L de enzima (**B** en **Figura 4.1**) . Se añadieron 120 μ L (**1** en **Figura 4.1** y **Figura 4.2**) de preparación de sustrato (**A** en **Figura 4.1** y **Figura 4.2**) (fenilvalerato y acetiltiocolina en agua ultrapura a diferentes concentraciones). El tiempo de reacción fue de 5 minutos y 25 segundos. La reacción se paró añadiendo 120 μ L de una solución que contenía

MATERIALES Y MÉTODOS

SDS 2% / AAP (0.25 mg/ml) (**2 en Figura 4.1**). Posteriormente se añadieron 60 μL de Ferricianuro potásico (**3 en Figura 4.1**). La reacción de actividad colinesterasa se paró añadiendo 120 μL de una solución que contenía SDS 2% / DTNB 6 mM (**2 en Figura 4.2**) y posteriormente se añadió 120 μL de BSA 1% (**3 en Figura 4.2**). Un volumen de 300 μL de la mezcla fue transferido automáticamente a una microplaca de 96 pocillos (**4 en Figura 4.1 y Figura 4.2**). Se midió la absorbancia a 510 nm para actividad PVasa y a 405 nm para actividad colinesterasa. Controles de hidrólisis espontánea (BSA 1%) fueron incluidos en el mismo proceso automatizado.

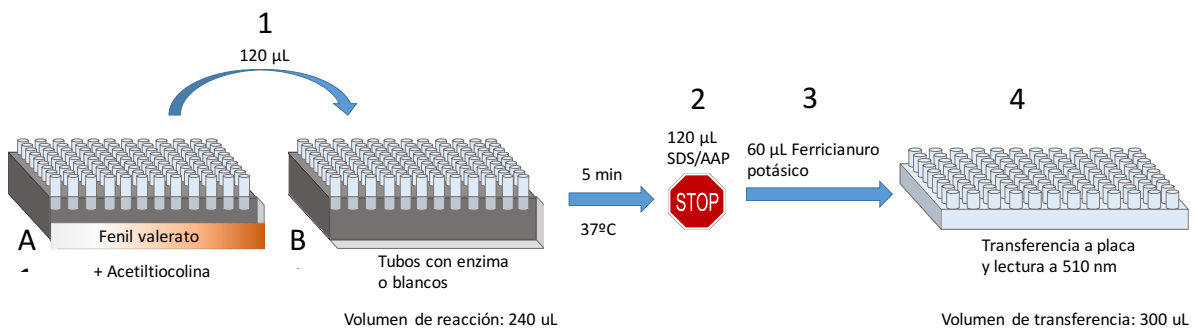


Figura 4.1. Esquema del ensayo de competición entre sustratos de actividad PVasa. En A se dispone el sustrato y en B la enzima en la mitad de los tubos y BSA 1% en la otra mitad.



Figura 4.2. Esquema del ensayo de competición entre sustratos de actividad colinesterasa. En A se dispone el sustrato y en B la enzima en la mitad de los tubos y BSA 1% en la otra mitad.

La actividad en $\mu\text{M}/\text{min}$ fue calculada a partir de la curva de calibrado hecha con estándares de fenol, para el caso de actividad PVasa, y de tiocolina para actividad colinesterasa.

4.7. 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 realizó utilizando 9 concentraciones crecientes de fenol en el rango de 0 y 0,5 mM preparadas en agua ultrapura a partir de una concentración de 1 mM. A 120 μL del estándar de fenol se le añadieron 120 μL de BSA 1%, 120 μL de SDS 2% / AAP y 60 μL de ferricianuro potásico. Se transfirieron 300 μL de cada muestra a una placa de 96 pocillos, se midió la absorbancia a 510 nm.

4.8. Curva de calibrado del método colorimétrico de tiocolina

Se realizó una curva de calibrado del método colorimétrico. Se utilizaron 12 concentraciones de tiocolina preparadas en agua ultrapura, en un rango de 0 y 0,667 mM. A 120 μL de las disoluciones de tiocolina se les añadió 120 μL de BSA 1%, 100 μL de SDS/DTNB y 120 μL de BSA 1%. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm.

4.9. Ensayo de reactivación enzimática tras la inhibición con paraoxon

Inhibición con paraoxon

Se utilizaron las condiciones del microensayo de actividad colinesterasa y PVasa descritas anteriormente. En primer lugar, se prepararon muestras de enzima, de las cuales se incubaron 600 μL con 60 μL de paraoxon a 10 mM durante 30 min a 37 °C. Se incluyeron en el ensayo controles sin inhibir y blancos.

Pasado el tiempo de incubación, se retiraron 100 μL de cada tubo y se llevaron a un volumen final de 1 mL con BSA 1% en tampón fosfato, del cual se separaron 3 alícuotas de 100 μL para la medida de actividad PVasa y otras 3 para colinesterasa (**1 en Figura 4.2**).

Ultrafiltración y posterior dilución

Un volumen de 500 μL de cada una de las muestras inhibidas y sin inhibir preparadas en el paso anterior de cada tubo, se colocó en filtros (Ultracel 10K de Millipore) y se centrifugó a 14000 x g durante 15 minutos a 4°C. El material retenido se diluyó con tampón fosfato a 4°C hasta alcanzar 500 μL y se procedió a ultrafiltrar de nuevo. Este proceso se realizó tres veces en total (**3 en Figura 4.2**). El material retenido en el filtro se llevó a un volumen de 5 mL con tampón fosfato / BSA 1%. La concentración residual estimada final de paraoxon tras el proceso de ultrafiltración y dilución fue de $8,503 \cdot 10^{-5}$ nM.

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 200 μL de cada muestra (muestra inhibida y controles) para medir la actividad PVasa y colinesterasa de acuerdo a los siguientes tiempos: 0, 20, 40, 90 y 160 minutos (**4 en Figura 4.2**).

MATERIALES Y MÉTODOS

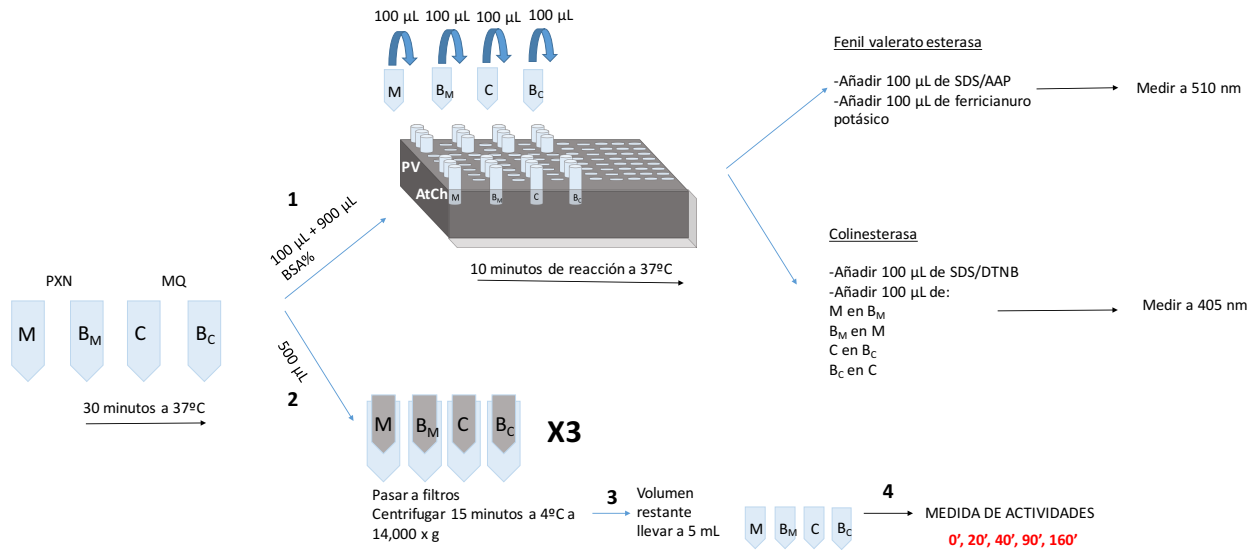


Figura 4.3. Esquema representativo del ensayo de reactivación enzimática de la ButChE humana tras su previa inhibición con paraoxon. M representa al tubo con la muestra incubado con paraoxon, y B_M a su blanco. C representa al control, con muestra sin incubado con paraoxon y B_C a su respectivo blanco.

4.10. Modelos matemáticos y análisis de los datos

4.10.1. Análisis de los datos

Los resultados de los ensayos cinéticos de actividad de sustratos se analizaron con el módulo Exploratory E-K del programa SigmaPlot versión 12.5. (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.

A partir de regresiones no lineales el software compara diferentes mecanismos enzimáticos (Hill, Michaelis-Menten, activación por el sustrato, inhibición por el sustrato, isoenzima y modelo bifásico) y proporciona los parámetros cinéticos (V_{max} , índice de Hill, K_M ...). Las ecuaciones de los modelos estudiados se muestran en la **Figura 4.4**.

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

A
$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_M + S}$$

B
$$v = \frac{V_{max} \cdot S^n}{K_M^n + S^n}$$

C
$$v = V_{max1} \cdot \frac{S/K_{M1}}{1 + S/K_{M1}} + V_{max2} \cdot \frac{S/K_{M2}}{1 + S/K_{M2}}$$

D
$$v = \frac{V_1 \cdot S + V_2 \cdot \frac{S^2}{K_{SS}}}{K_M + S + \frac{S^2}{K_{SS}}}$$

Figura 4.4. Ecuaciones de los tres modelos representativos que mejor se ajustaban a los datos. En la imagen **A** se muestra la ecuación de Michaelis-Menten, donde v es la velocidad enzimática, V_{max} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción, $[S]$ es la concentración de sustrato y K_M es la constante de Michaelis-Menten, que representa la concentración de sustrato para la que la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} .

En la imagen **B** se muestra la ecuación de Hill, en la que K_M^n es la constante de Michaelis-Menten y n es el número de sitios de unión al sustrato por molécula de enzima.

En la imagen **C** se muestra la ecuación típica de una isoenzima, donde V_{max1} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción por el complejo 1, K_{M1} es la constante de Michaelis-Menten del complejo 1, V_{max2} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción por el complejo 2, y K_{M2} es la constante de Michaelis-Menten del complejo 2.

En la imagen **D** se muestra la ecuación típica de un modelo bifásico, donde V_{max1} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción en una primera fase, K_M es la constante de equilibrio a concentraciones de S bajas, V_{max2} es la velocidad máxima alcanzada en la segunda fase, y K_{SS} es la constante de equilibrio a concentraciones de S altas, que corresponde a la reacción de la **Figura 4.5**.

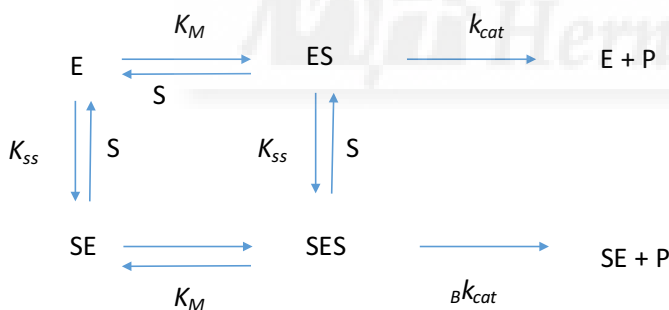


Figura 4.5. Reacción bifásica, donde E es la concentración de enzima, S la de sustrato y P la de producto. Las constantes de equilibrio de la reacción se muestran en mayúsculas y las catalíticas en minúsculas. Su ecuación se muestra en el apartado D de la **Figura 4.4**.

4.10.2. Análisis matemático de los datos de los experimentos de competición entre sustratos

Los datos obtenidos en los experimentos de competición entre sustratos, tanto colinesterasa como PVasa, se sometieron a análisis mediante el programa Sigma Plot 12.5. Se utilizó el algoritmo de Marquardt-Levenberg que busca los valores de los parámetros a determinar de tal modo que la suma de los cuadrados de la diferencia entre el valor real y el predeterminado por la ecuación (residual) resulte mínima (Marquardt, 1963; Shrager, 1970, 1972; Nash 1979; Press et al., 1986).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos se procesaron con la ecuación matemática deducida del modelo de dos sustratos que compiten por el mismo centro activo de acuerdo a la reacción cinética de Michaelis-Menten (**Ecuación 1**) (Cornish-Bowden 2004).

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S1]}{K_{M1} \cdot \left(1 + \frac{[S2]}{K_{M2}}\right) + [S1]} \quad [\text{Ec 1}]$$

Ecuación 1. Ecuación de Cornish-Bowden. La ecuación mostrada describe un mecanismo de competición entre dos sustratos de tipo Michaeliano, y es la que se utilizará para ajustar los datos experimentales en el ensayo de competición entre sustratos, donde v es la velocidad enzimática, V_{\max} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción, $[S1]$ es la concentración del sustrato 1, K_{M1} es la constante de Michaelis-Menten del sustrato 1, K_{M2} es la constante de Michaelis-Menten del sustrato 2 y $[S2]$ es la concentración del sustrato 2.



5. RESULTADOS

5.1. Actividad PVasa de AChE y BuChE

5.1.1. Actividad a diferentes concentraciones de fenilvalerato

Se ensayó la actividad hidrolizante de fenilvalerato para la AChE y la BuChE humanas, a una concentración de 1 nM de enzima en el volumen de reacción con el sustrato, para concentraciones ascendentes de fenilvalerato. Los resultados se muestran en la **Figura 5.1**.

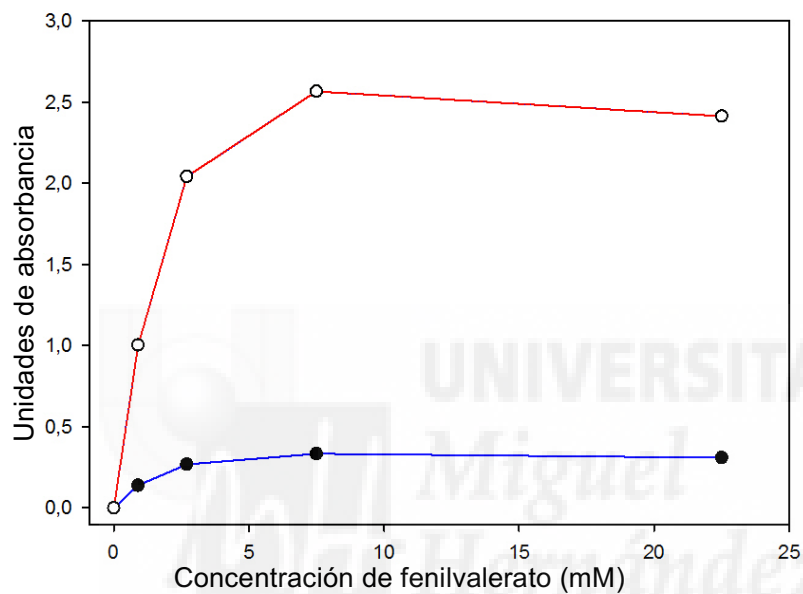


Figura 5.1. Actividad PVasa de AChE (azul) y BuChE humanas (rojo). Se utilizaron varias concentraciones de fenilvalerato comprendidas entre 0 y 22,5 mM en reacción durante 10 minutos a 37°C. La actividad se ensayó tal y como se muestra en Materiales y Métodos, ensayo de actividad PVasa.

Se observó actividad PVasa para ambas enzimas y la máxima actividad fue a una concentración de fenilvalerato de **7,5 mM** en reacción para ambas enzimas en las condiciones estudiadas. La BuChE presentó mayor actividad que la AChE.

5.1.2. Actividad en función de la concentración de enzima

Se ensayaron diferentes concentraciones de AChE y BuChE humanas y se estudió la actividad PVasa para 7,5 mM de fenilvalerato en un tiempo de reacción de 10 minutos. Los resultados se muestran en la **Figura 5.2**.

RESULTADOS

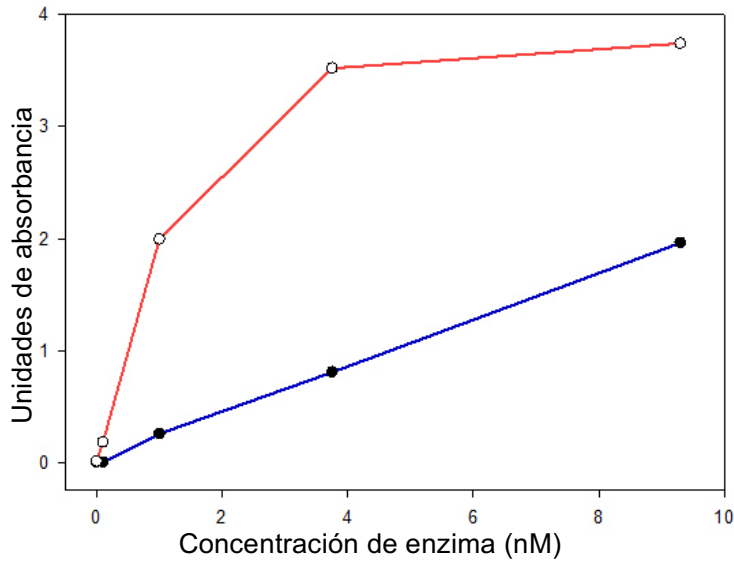


Figura 5.2. Actividad PVasa de AChE (azul) y BuChE humanas (rojo). Se utilizaron varias concentraciones de enzima comprendidas entre 0 y 9,3 nM en reacción y 7,5 mM finales de fenilvalerato, durante 10 minutos a 37°C. La actividad se ensayó tal y como se muestra en Materiales y Métodos, ensayo de actividad fenilvalerato esterasa.

La máxima actividad en la BuChE se alcanzó prácticamente a la concentración de 3,75 nM en el volumen de reacción. La AChE no alcanza la máxima actividad a ninguna de las concentraciones ensayadas. La BuChE mostró mayor actividad que la AChE.

Se estudió también la actividad PVasa en AChE de anguila eléctrica y BuChE de caballo. Los resultados se muestran en las **Figuras 5.3** y **5.4**. La AChE de anguila eléctrica no muestra actividad PVasa y la BuChE de caballo mostró menor actividad que las AChE y BuChE humanas (**Figura 5.5**).

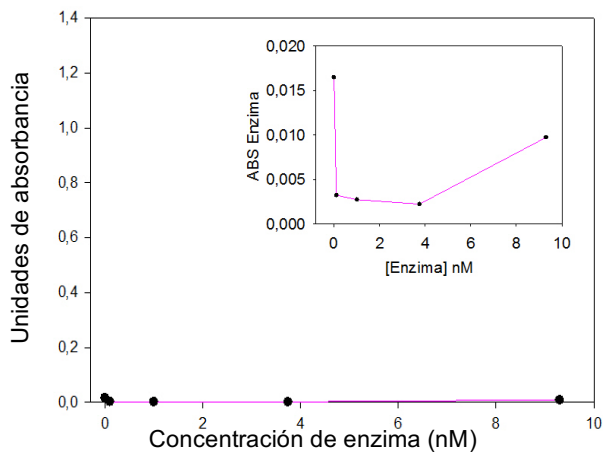


Figura 5.3. Actividad PVasa para AChE de anguila eléctrica. Se ensayaron concentraciones de enzima comprendidas entre 0 y 9,3 nM y la concentración de fenilvalerato de 7,5 mM en reacción a 10 minutos a 37°C.

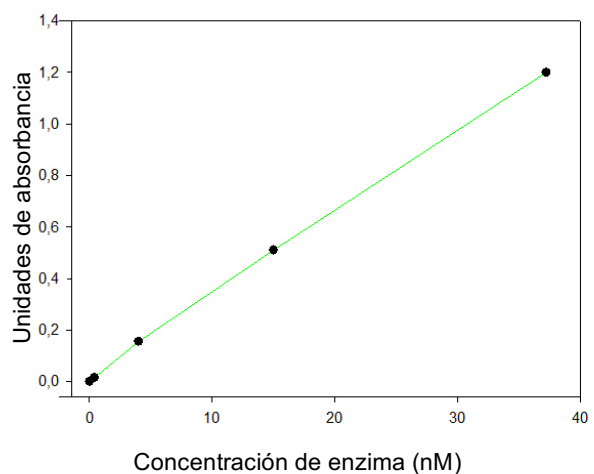


Figura 5.4. Actividad PVasa para BuChE de caballo. Se ensayaron concentraciones de enzima comprendidas entre 0 y 37,225 nM y la concentración de fenilvalerato de 7,5 mM en reacción en 10 minutos de reacción a 37°C.

RESULTADOS

En la **Figura 5.5** se compara la actividad PVasa en colinesterasas de las especies ensayadas.

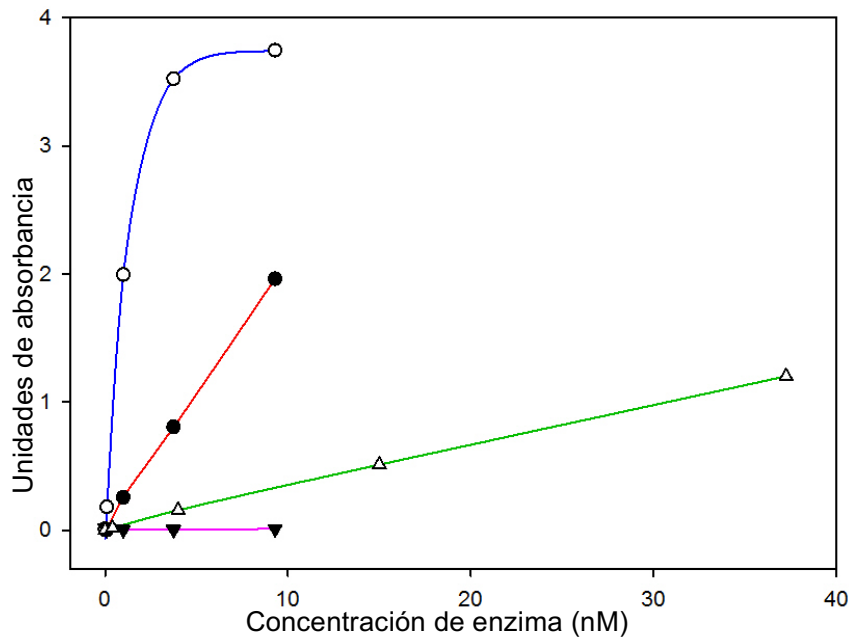


Figura 5.5. Comparación de actividades. Se ensayaron varias concentraciones de enzima con 7,5 mM de fenilvalerato durante 10 minutos a 37°C. Enzimas: BuChE humana (azul), AChE humana (rojo), AChE anguila eléctrica (rosa) y BuChE de caballo (verde).

5.2. Actividad según el tiempo de reacción

5.2.1. Actividad PVasa en BuChE humana

Para la determinación del tiempo óptimo de reacción para el ensayo de competición se ensayaron diferentes tiempos de reacción en diferentes condiciones: 1 nM de BuChE humana, y concentraciones de fenilvalerato de 0,25 mM, 0,5 mM y 22,5 mM en el volumen de reacción (enzima + sustrato). Los resultados se muestran en las **Figuras 5.6** y **5.7**.

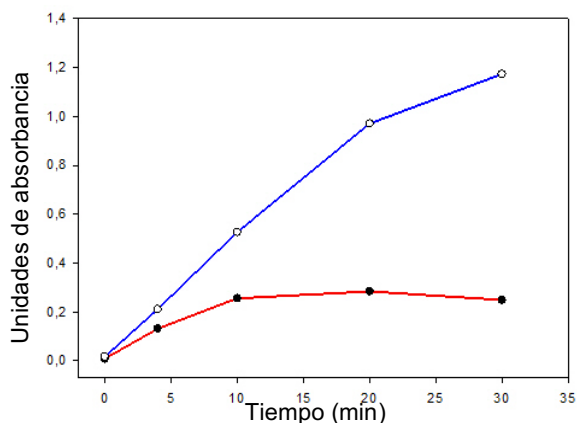


Figura 5.6. Actividad PVasa. Se ensayaron concentraciones de fenilvalerato de 0,5 (rojo) y 22,5 (azul) mM en el volumen de reacción, y se midió la actividad a los 0, 4, 10, 20 y 30 minutos, a una concentración de enzima de 1 nM final.

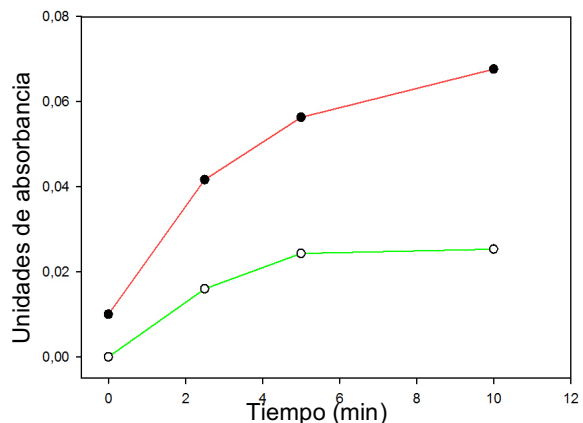


Figura 5.7. Actividad PVasa. Se ensayaron concentraciones de fenilvalerato de 0,5 (rojo) y 0,25 (verde) mM en el volumen de reacción, y se midió la actividad a 0, 2, 5 y 10 minutos, a una concentración de enzima de 1 nM final.

RESULTADOS

La actividad PVasa se mostró lineal (velocidad de reacción constante) en el rango de 10 minutos solamente con 22,5 mM de sustrato. Para conseguir mantener la actividad lineal en el rango de 0 a 5 minutos de reacción se repitieron los ensayos con una concentración de enzima en reacción de 0,5 nM. Los resultados se muestran en la **Figura 5.8**. La actividad se mantiene lineal en un rango de 10 minutos para las condiciones descritas.

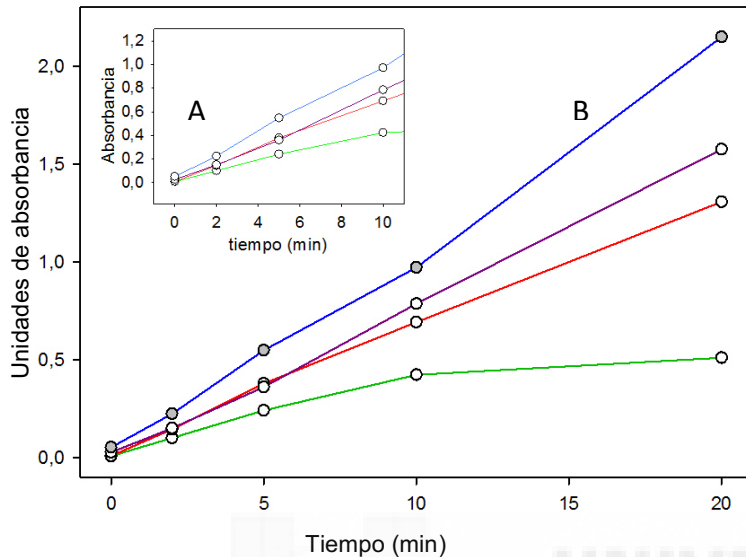


Figura 5.8. Actividad PVasa. Se ensayaron concentraciones de fenilvalerato de 22,5 (azul), 1 (morado), 0,5 (rojo) y 0,25 (verde) mM en reacción, y se midió la actividad a 0, 2, 5, 10 y 20 minutos, a una concentración de enzima de 0,5 nM en reacción junto con el sustrato (B). La parte A es una ampliación en un rango de 10 minutos en la que se muestra la linealidad de la actividad enzimática.

5.2.2. Actividad colinesterasa en BuChE humana en función del tiempo

En este ensayo se utilizó una concentración de enzima de 0,5 nM final en reacción y 0,25, 0,5, 1 y 22,5 mM de acetiltiocolina en reacción. Los resultados se muestran en las **Figuras 5.9 y 5.10**.

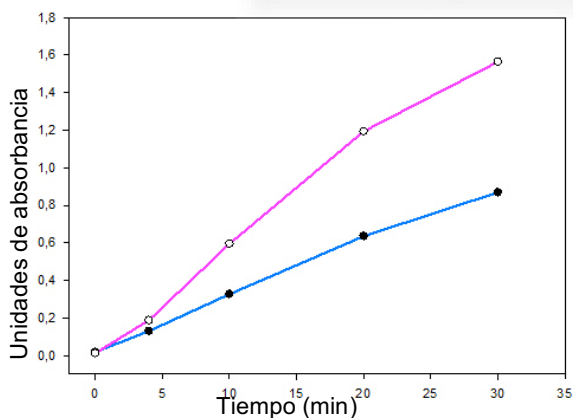


Figura 5.9. Actividad colinesterasa. Se utilizaron unas concentraciones de acetiltiocolina de 1 (morado) y 22,5 (azul) mM en el volumen de reacción y se midió la actividad a los 0, 4, 10, 20 y 30 minutos, a una concentración de enzima de 0,5 nM final.

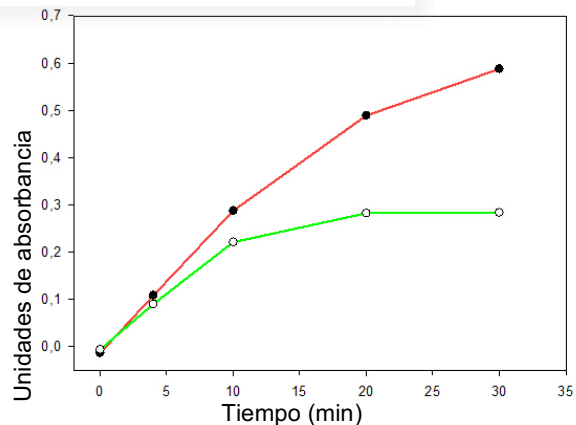


Figura 5.10. Actividad colinesterasa. Se utilizaron unas concentraciones de acetiltiocolina de 0,5 (rojo) y 0,25 (verde) mM en el volumen de reacción y se midió la actividad a los 0, 4, 10, 20 y 30 minutos, a una concentración de enzima de 0,5 nM final.

Para actividad colinesterasa, la actividad de la BuChE es lineal (velocidad constante) en un rango de 10 minutos para concentraciones de acetiltiocolina comprendidas entre 0,25 y 22,5 mM en el volumen de reacción, junto con la enzima.

RESULTADOS

5.2.3. Actividad PVasa en AChE humana en función del tiempo

Se realizó el ensayo utilizando una concentración de enzima en reacción de 3,75 nM; siendo 0,2 y 7,5 mM la concentración de fenilvalerato en reacción. Se midió la actividad a diferentes tiempos: 0, 4, 10 y 20 minutos. y, tal y como se observa, hay actividad PVasa en la AChE humana (**Figura 5.11**).

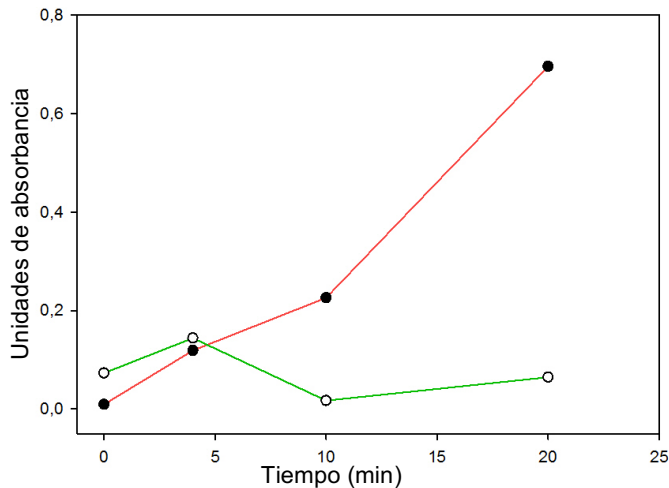


Figura 5.11. Actividad PVasa para la AChE humana. Se utilizaron dos concentraciones de fenilvalerato 7,5 (rojo) y 0,2 (verde) mM a 37°C.

5.2.4. Actividad colinesterasa en AChE humana en función del tiempo

Se ensayaron 3,75 nM de enzima en reacción y 1 mM de acetiltiocolina en reacción (volumen enzima + sustrato). Los tiempos de reacción a los que se midió la actividad fueron de 0, 4, 10 y 20 minutos. Se realizó el ensayo de actividad colinesterasa descrito en materiales y métodos pero con variaciones: los volúmenes de reacción fueron 20 μ L de enzima o BSA, 20 μ L de sustrato, 40 μ L de SDS/DTNB y 20 μ L de enzima o BSA 1% en tampón fosfato. Los resultados se muestran en la **Figura 5.12**.

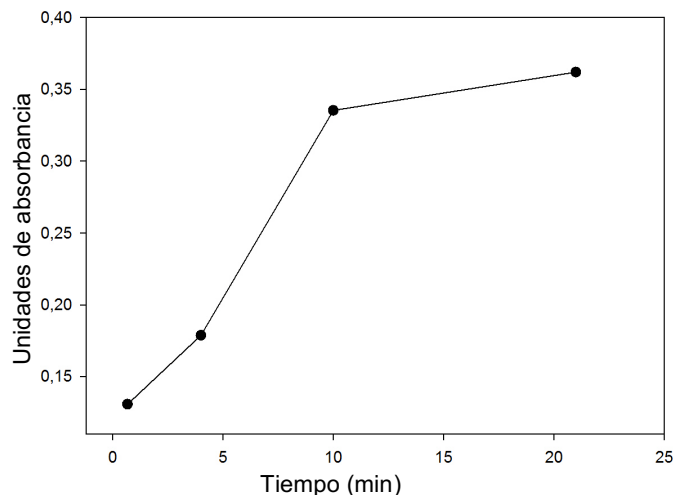


Figura 5.12. Actividad colinesterasa de la AChE humana. Se utilizó una concentración de acetiltiocolina de 1 mM en reacción, y una de AChE de 3,75 nM en reacción. El ensayo se realizó parando la reacción a diferentes tiempos a 37°C.

La actividad se mantiene lineal (velocidad constante) en el intervalo de 0 a 10 minutos de reacción aproximadamente en esas condiciones.

RESULTADOS

5.3. Actividad PVasa en BuChE humana

5.3.1. Curva de calibrado de fenol

Se realizó la curva de calibrado de fenol para el posterior cálculo de los resultados del experimento de competición. Se ensayaron diferentes concentraciones de fenol, comprendidas entre 0 y 0,5 mM en reacción durante 5 minutos a 37°C, de acuerdo al ensayo de actividad PVasa, pero sin añadir enzima, sino BSA 1% en su lugar. Los resultados se muestran en la **Figura 5.13**.

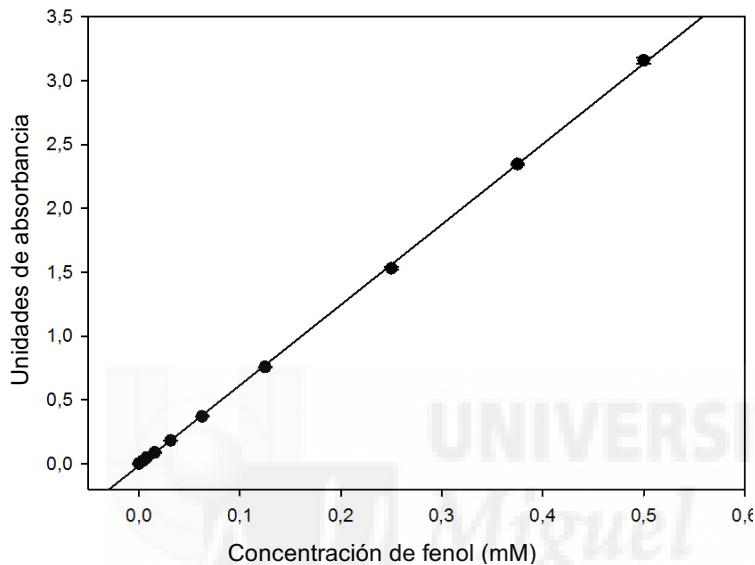


Figura 5.13. Curva de calibrado de fenol. ($R^2 = 0,999$).

La ecuación de la recta que se determinó al ajustar los datos con el programa SigmaPlot con la recta de calibrado para fenol fue la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = -0,0135 + 6,2938 \cdot \text{concentración}$$

5.3.2. Actividad PVasa en BuChE humana

En la **Figura 5.14**, se muestran los datos obtenidos tras reaccionar diferentes concentraciones de fenilvalerato con 0,5 nM de BuChE, en volumen de reacción, y 5 minutos y 25 segundos de tiempo de reacción. Los datos se analizaron de acuerdo con diferentes modelos descritos en Materiales y Métodos y el mejor fue el correspondiente al mecanismo de reacción de Michaelis-Menten, según el criterio de ALCc. Los parámetros aparecen mostrados en la **Tabla 3**.

RESULTADOS

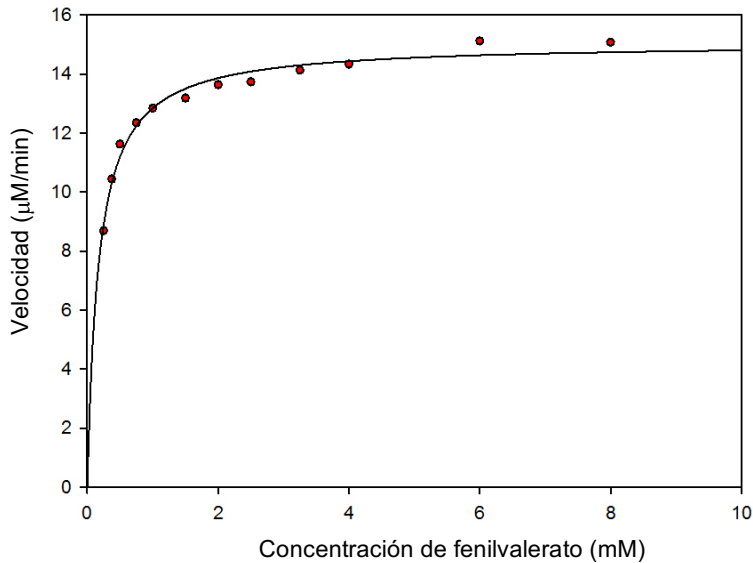


Figura 5.14. Ajustes al mecanismo de reacción. Se muestran los resultados del análisis de los datos de acuerdo al mecanismo de Michaelis-Menten, mejor mecanismo según el criterio de AICc con el software SigmaPlot. ($R^2 = 0,977$).

Tabla 3. Parámetros obtenidos del ajuste de Michaelis-Menten. K_M es la constante de Michaelis-Menten del ensayo de PVasa y la V_{max} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción. Se muestran los parámetros deducidos de 5 experimentos independientes.

K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	k_{cat} (constante catalítica) (min^{-1})
0,23 / 0,17 / 0,096 / 0,17 / 0,21	9,5 / 7,2 / 14 / 15 / 16	19000 / 14800 / 28800 / 30200 / 32000

5.3.3. Ensayo de competición con acetilticolina. Actividad PVasa en BuChE humana

Se realizó el microensayo de competición entre sustratos para actividad PVasa descrito en materiales y métodos. Se ajustó la ecuación de Cornish-Bowden descrita en de Materiales y métodos a los datos, (**Figura 5.15**) Se realizó el ajuste en tres dimensiones de acuerdo con Estévez et al (2004). Los parámetros obtenidos en el ajuste se muestran y en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Parámetros obtenidos para el mecanismo descrito. K_{M1} es la constante de Michaelis-Menten del ensayo de PVasa de competición y la V_{max} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción. La K_{M2} es la constante de Michaelis-Menten estimada para experimento de competición de actividad colinesterasa. Se muestran los parámetros deducidos de 5 experimentos independientes.

K_{M1} (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_{M2} (mM)
0,18 / 0,35 / 0,26 / 0,10 / 0,34	11,0 / 7,6 / 6,2 / 10,0 / 14,0	4,9 / 7,6 / 9,1 / 4,2 / 18,0

RESULTADOS

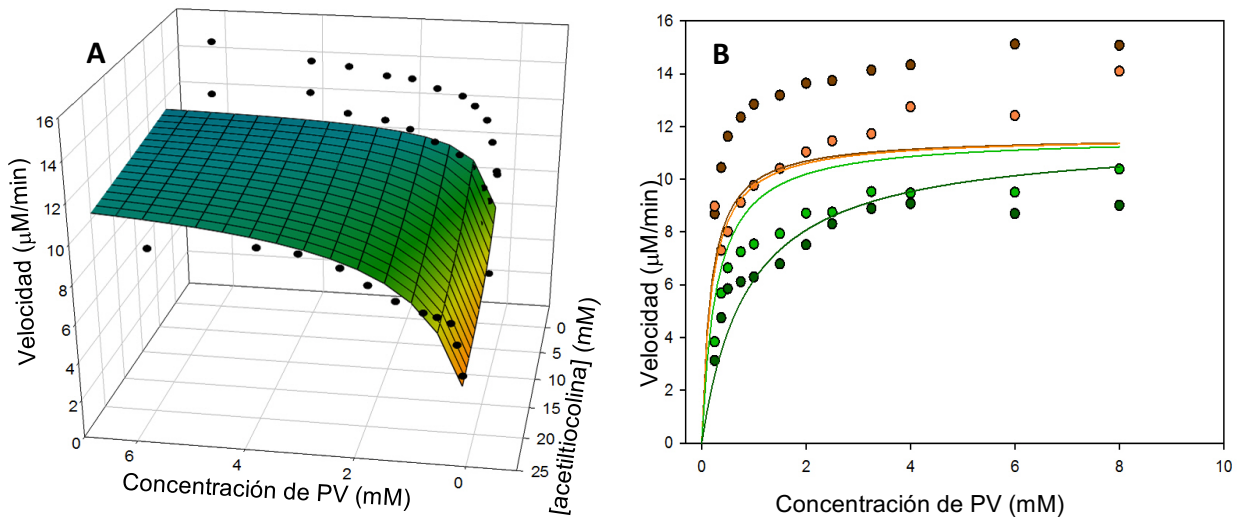


Figura 5.15. Cinética de la actividad PVasa de la BuChE humana. Concentraciones de fenilvalerato: entre 0,25 y 8 mM durante 5 minutos a 37°C. Concentraciones de acetiltiocolina: 0 (marrón), 0,5 (naranja), 3 (verde) y 20 (verde oscuro) mM en un volumen de reacción de 240 µL. En la imagen **A** está la superficie del ajuste 3D según la ecuación de Cornish-Bowden, y en la imagen **B** está la representación de curvas lineales obtenidas del ajuste 3D. ($R^2 = 0,7809$).

Posteriormente se analizaron los datos de la actividad PVasa tratando la acetiltiocolina como un inhibidor reversible. Se probaron, mediante el software SigmaPlot diferentes mecanismos (competitivo total, competitivo parcial, no competitivo parcial, no competitivo total, mixto parcial, mixto total, acompetitivo parcial y acompetitivo total), siendo el modelo que mejor se ajustaba el de mixto parcial según el criterio de ALCC. (**Figura 5.16** y **Tabla 5**).

K_M (mM)	0,27 / 0,20 / 0,12 / 0,18 / 0,23
V_{max} (µM/min)	9,7 / 7,4 / 14,0 / 15,0 / 16,0
K_i	0,42 / 0,48 / 0,53 / 0,33 / 0,19
Alpha	2,3 / 2,8 / 1,2 / 2,4 / 2,4
Beta	0,60 / 0,71 / 0,61 / 0,62 / 0,85

Tabla 5. Parámetros obtenidos. Parámetros obtenidos para el mecanismo de competición descrito. K_M es la constante catalítica del ensayo de PVasa de competición y la V_{max} es la velocidad máxima alcanzada. La K_i es la constante de inhibición. Alpha y beta son factores de parcialidad. Se muestran los parámetros deducidos de 5 experimentos independientes.

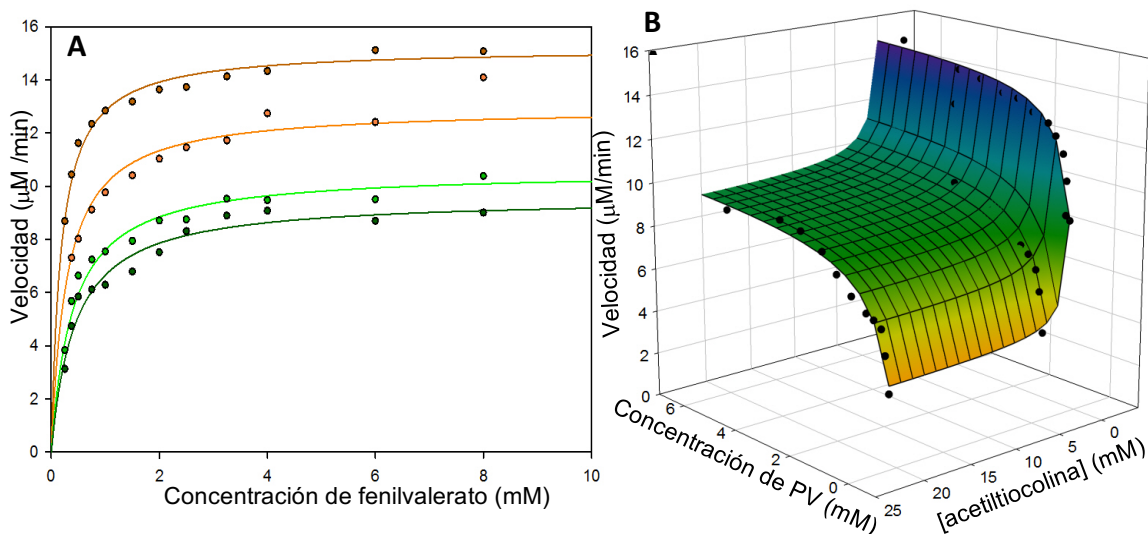


Figura 5.16. Modelo mixto parcial de actividad PVasa. Los datos del ensayo de competición entre sustratos con acetiltiocolina. Concentraciones de acetiltiocolina: 0 (marrón), 0,5 (naranja), 3 (verde) y 20 mM (verde oscuro). ($R^2 = 0,9808$). En imagen **A** vemos la representación lineal y en la **B** el tridimensional

RESULTADOS

5.4. Actividad colinesterasa de BuChE humana

5.4.1. Curva de calibrado de tiocolina

Se realizó la curva de calibrado de tiocolina para el posterior cálculo de los resultados del experimento de competición. Se ensayaron diferentes concentraciones de tiocolina, comprendidas entre 0 y 0,667, mM durante 5 minutos a 37°C en las mismas condiciones que el ensayo de actividad colinesterasa, pero sin añadir enzima, sino BSA 1% en su lugar (**Figura 5.17**).

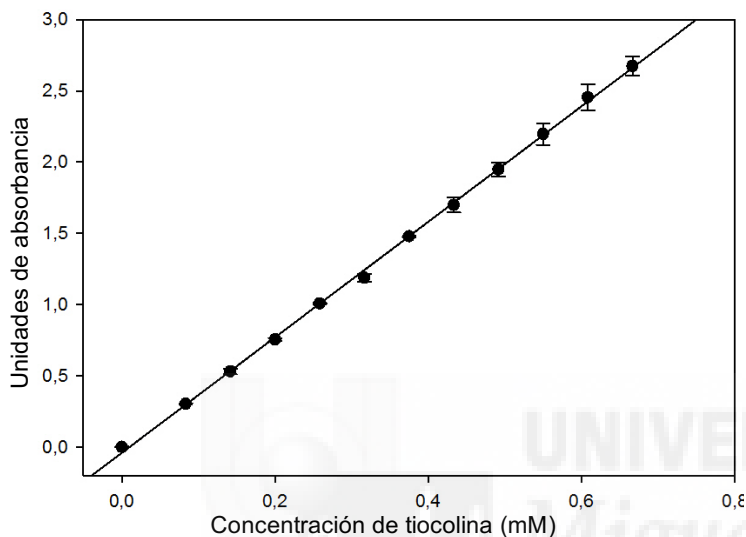


Figura 5.17. Curva de calibrado de tiocolina. ($R^2 = 0,999$).

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

$$\text{Absorbancia} = -0,0411 + 4,0543 \cdot \text{concentración}$$

5.3.2. Estudio de actividad colinesterasa de BuChE humana

En la **Figura 5.18**, se observa el análisis de los datos según los modelos matemáticos correspondientes a diferentes reacciones enzimáticas, mediante el software SigmaPlot. El mejor ajuste, de acuerdo al criterio de ALCc y con una R^2 de 0,9997, es el correspondiente al mecanismo bifásico por activación por sustrato, cuya ecuación se muestra en la **Figura 4.3**, apartado D de Materiales y Métodos. El segundo mejor ajuste fue el correspondiente al mecanismo de isoenzima, y el tercero, según este criterio, a Hill. Los parámetros se muestran en la **Tabla 6**.

RESULTADOS

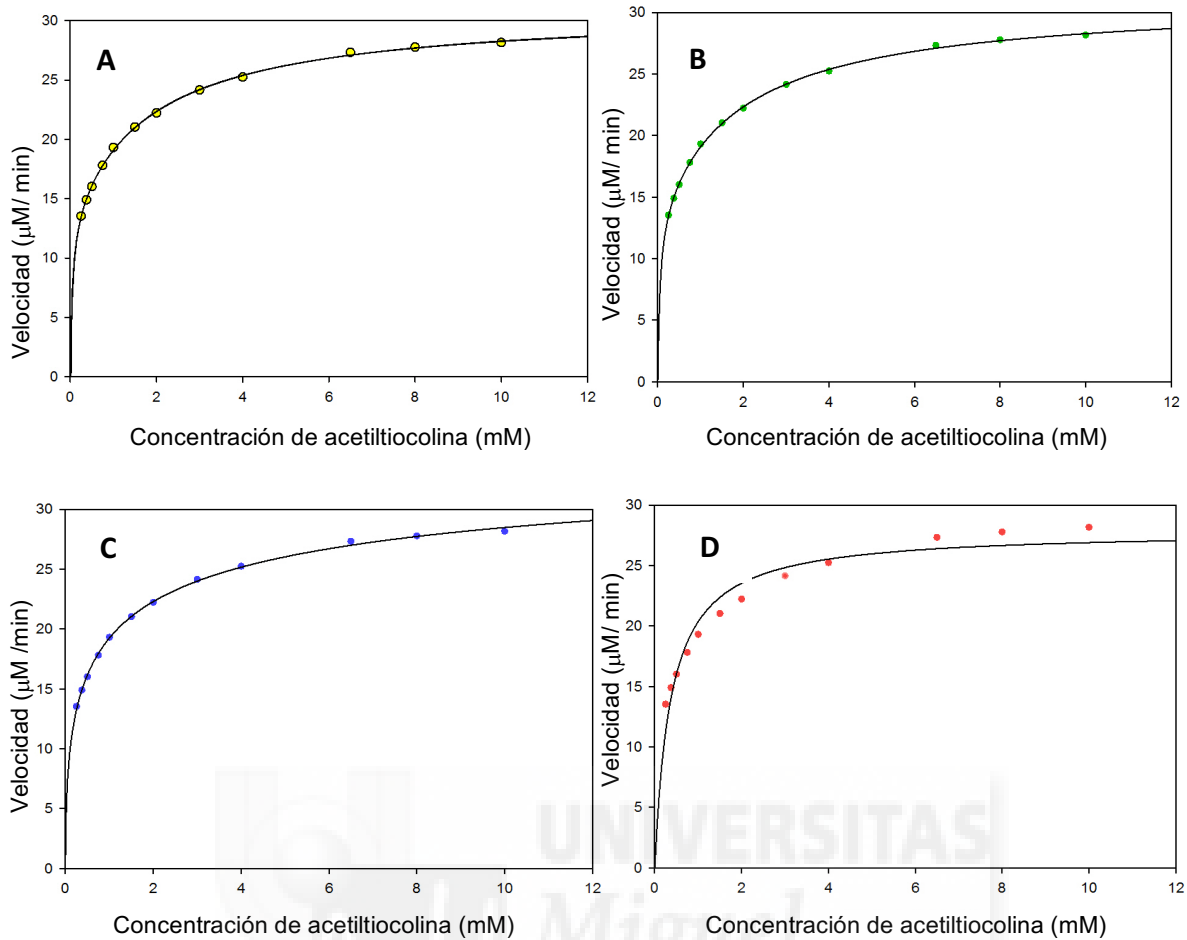


Figura 5.18. Ajustes al mecanismo de reacción. Se muestran los resultados del ajuste de los datos a tres mecanismos según el criterio de ALCC: **A** bifásico, **B** Isoenzima, **C** Hill y **D** Michaelis-Menten.

Tabla 6. Parámetros de los diferentes mecanismos de reacción. La K_{M1} corresponde a la constante de Michaelis-Menten de un único componente, V_{max1} a la velocidad máxima alcanzada en la reacción en ese único componente, la K_{M2} sería la constante de Michaelis-Menten del segundo componente y la V_{max2} sería la velocidad máxima del segundo componente. Se muestran los parámetros deducidos de 3 experimentos independientes. En el caso de bifásico, V_{max1} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción en una primera fase, S es la concentración de sustrato, K_{M1} (sería equivalente a la K_M de modelo bifásico) es la constante de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato, V_{max2} es la velocidad máxima alcanzada en la segunda fase, y K_{M2} es la constante de Michaelis-Menten a altas concentraciones de sustrato (en modelo bifásico sería equivalente a la K_{SS}).

Mecanismo	K_{M1} (mM)	V_{max1} (μ M/min)	K_{M2} (mM)	V_{max2} (μ M/min)	Índice Hill
Bifásico	0,04 / 0,09 / 0,05	13 / 17 / 14	1,8 / 2,3 / 1,3	31 / 32 / 32	-----
Isoenzima	0,05 / 0,10 / 0,05	13 / 17 / 13	1,1 / 2,2 / 1,9	18 / 15 / 17	-----
Hill	0,42 / 0,47 / 0,57	33 / 35 / 36	-----	-----	0,54 / 0,63 / 0,89
Michaelis-Menten	0,38 / 0,37 / 0,37	28 / 29 / 30	-----	-----	-----

RESULTADOS

5.3.3. Competición con acetiltiocolina. Actividad colinesterasa de BuChE humana

Se realizó el microensayo de competición entre sustratos para actividad colinesterasa. Los datos se analizaron con la ecuación de Cornish-Bowden descrita en Materiales y métodos (**Figura 5.19**). Se realizó el ajuste en tres dimensiones de acuerdo a Estévez et al (2004) (**Figura 5.19.B**) y los parámetros en la **Tabla 7**.

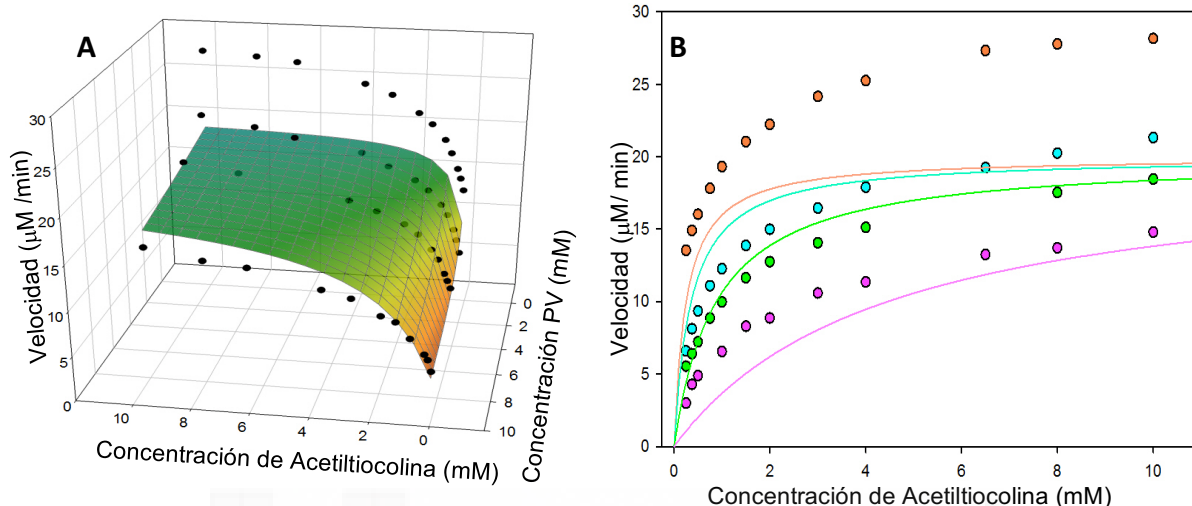


Figura 5.19. Cinética de la actividad colinesterasa para la BuChE. Concentraciones de acetiltiocolina: entre 0,25 y 22,5 mM, durante 5 minutos a 37°C. Concentraciones de fenilvalerato: 0 (naranja), 0,5 (azul), 3 (verde) y 8 (fucsia) mM en un volumen de reacción de 240 μL . En la imagen **A** está la superficie del ajuste 3D según la ecuación de Cornish-Bowden, y en la imagen **B** está la representación de curvas lineales obtenidas del ajuste 3D. ($R^2 = 0,946$).

Tabla 7. Parámetros obtenidos para el mecanismo de competición descrito. La K_{M1} es la constante de Michaelis-Mente obtenida en el experimento de actividad colinesterasa de competición y la V_{max} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción. La K_{M2} propuesta es la constante que deberíamos obtener en el experimento de competición de actividad PVasa para que nuestros datos sean compatibles con el mecanismo propuesto. Se muestran los parámetros deducidos de 3 experimentos independientes.

K_1 (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_2 (mM)
0,25 / 0,24 / 0,27	20 / 23 / 26	1,2 / 1,2 / 1,5

5.5. Ensayo de reactivación de la BuChE tras inhibición con paraoxon

Se inhibió la BuChE con paraoxon a 10 mM durante 30 minutos y, posteriormente, se midió su actividad PVasa y colinesterasa a diferentes tiempos de reactivación.

Los resultados mostrados en las **Figuras 5.20** y **5.21** indican que no hay reactivación espontánea para las actividades PVasa y colinesterasa.

Los porcentajes de recuperación de actividad de las muestras control, tras el proceso de ultrafiltración y dilución, están en torno al 71 al 87 %. La concentración residual estimada de paraoxon tras el proceso fue de $8,503 \cdot 10^{-5}$ nM.

RESULTADOS

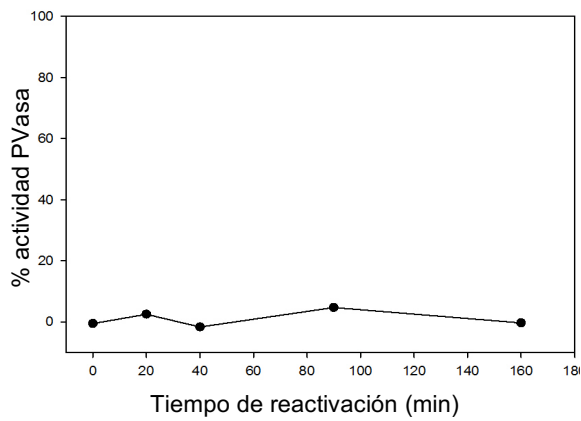


Figura 5.20. Reactivación de actividad PVasa de la BuChE. Se midió la actividad en un período de tiempo de reactivación comprendido entre 0 y 160 minutos, tras la previa inhibición con paraoxon.

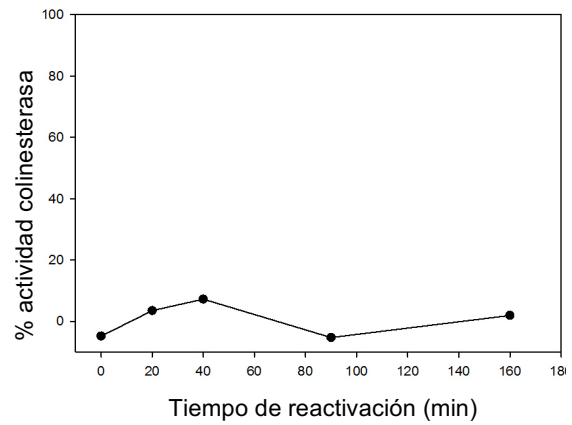


Figura 5.20. Reactivación de actividad colinesterasa de la BuChE. Se midió la actividad en un período de tiempo de reactivación comprendido entre 0 y 160 minutos, tras la previa inhibición con paraoxon.



6. DISCUSIÓN

6.1. Optimización de las condiciones del ensayo para las diferentes actividades

Actividad Fenilvalerato esterasa (PVasa)

Se han estudiado las condiciones óptimas para el estudio de actividad PVasa y colinesterasa de la BuChE humana. A 3,75 nM de BuChE se alcanzó la máxima actividad a 10 minutos de reacción.

Las mejores condiciones de ensayo en las que se obtuvieron un rango de actividades medibles, y donde la velocidad fue constante a las concentraciones de sustratos utilizadas, son para 0,5 nM de BuChE hasta 10 minutos. Es necesario que los experimentos estén en condiciones de estado estacionario y, para ello, la velocidad de formación de productos debe ser constante.

De acuerdo con estos resultados, se usó, para el resto de experimentos, una concentración de enzima de 0,5 nM y 5 minutos de reacción enzima-sustrato.

Actividad colinesterasa

Se concluyó que una concentración de 0,5 nM de BuChE a 10 minutos de reacción enzima-sustrato garantizaba una velocidad de formación de productos constante.

6.2. Actividad PVasa en otras colinesterasas

Se estudió también la actividad PVasa en AChE humana, AChE de anguila eléctrica y BuChE de caballo. La AChE humana mostró actividad PVasa, aunque menos que la BuChE humana.

La BuChE de caballo mostró actividad, aunque menos que la AChE humana.

La AChE de anguila eléctrica no mostró actividad PVasa.

Por tanto, y según los resultados experimentales, se observa que el nivel de actividad PVasa de las colinesterasas es dependiente de la especie de procedencia y del tipo de enzima.

DISCUSIÓN

6.3. Mecanismos de reacción

6.3.1. Actividad PVasa

Cinética de reacción

Se aplicaron varios modelos matemáticos, correspondientes a diferentes reacciones enzimáticas para analizar los resultados (apartado 4.10). El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de ALCC fue el correspondiente a un mecanismo de Michaelis-Menten, con una K_M en un rango entre 0,096 y 0,23 mM y una k_{cat} entre 14800 y 32000 min^{-1} . Mangas et al. (2017) reportaron valores de K_M para actividad PVasa en BuChE humana de 0,52/0,72 mM, y una k_{cat} de 45900/49200 min^{-1} , similar a la obtenida en este trabajo.

Estudio de competición entre sustratos

Los experimentos para estudiar la interacción entre los sustratos fenilvalerato y acetiltiocolina en la BuChE humana se analizaron con la ecuación de Cornish-Bowden para dos sustratos de tipo Michaelis-Menten que interaccionan en el mismo centro activo. Este modelo no se ajusta bien. Por otro lado, la K_M estimada para la actividad PVasa es similar a la obtenida cuando no hay acetiltiocolina en el medio (apartado 5.3.3), y la K_M deducida para actividad colinesterasa en el ensayo de actividad PVasa es muy diferente a la obtenida en el ensayo de actividad colinesterasa (apartado 5.4).

Sin embargo, de acuerdo con la ecuación de Cornish-Bowden de competición entre sustratos, a medida que aumenta la concentración de sustrato de la actividad que se mide, la competición por el otro sustrato es menor, hasta que, a concentraciones muy grandes de ese sustrato, la actividad apenas aparecería alterada. En el experimento se puede observar que a concentraciones altas de fenilvalerato (8 mM) y muy bajas de acetiltiocolina (0,5 mM) la actividad permanece constante por debajo de la V_{max} . No hay tendencia a alcanzar la V_{max} a pesar de que la concentración de fenilvalerato es mucho mayor a la de acetiltiocolina. Esto, junto con los parámetros obtenidos por el ajuste, nos indica que la acetiltiocolina podría no estar interaccionando como un sustrato, sino como un inhibidor reversible. Analizando los datos obtenidos como una interacción de un sustrato y un inhibidor reversible, el mejor ajuste de acuerdo con el criterio de ALCC es mixto parcial (**Figura 6.1**), cuya ecuación se muestra en la **Figura 6.2**, y observándose en la **Figura 5.16** que el modelo se ajustó bien a los datos. Este modelo consiste en una inhibición competitiva más otra inhibición cuando ya se ha unido el sustrato. La reacción no se inhibe del todo, se ralentiza, al ser parcial. Esto indica que el sitio activo de hidrólisis del fenilvalerato podría ser diferente al sitio activo de hidrólisis de acetiltiocolina, ya que ésta parece actuar como un inhibidor reversible de la actividad PVasa.

DISCUSIÓN

ecuación de Michaelis-Menten y el otro de acuerdo a la ecuación de activación por sustrato bifásica, intenta explicar el comportamiento observado.

De acuerdo con la ecuación de la **Figura 6.3**, si hubiera una competición entre sustratos en un mismo centro activo, a medida que aumentase la concentración de acetiltiocolina, la competición de fenilvalerato sería menor, hasta que, a concentraciones muy grandes de acetiltiocolina la actividad apenas aparecería alterada. Se observó que a concentraciones altas de acetiltiocolina (10 mM) y muy bajas de fenilvalerato (0,5 mM) la actividad permanece constante por debajo de la V_{max} . No hay tendencia a alcanzar la V_{max} a pesar de que la concentración de acetiltiocolina es mucho mayor a la de fenilvalerato, Este hecho indica que el fenilvalerato podría estar actuando como un inhibidor reversible en el centro de hidrólisis de la acetiltiocolina.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{E0 \cdot (k_{cat} + b k_{cat} \cdot S^2 \cdot \frac{1}{K_{SS}})}{S + \frac{K_M \cdot S + S^2}{K_{SS}} + K_M + \frac{K_M \cdot S'}{K'_M}}$$

Figura 6.3. Ecuación deducida, donde se describe un mecanismo de competición en el que un sustrato se hidroliza de forma michaeliana y el otro de acuerdo al modelo bifásico. E0 es la concentración de enzima inicial, P la de producto y S la de sustrato.

6.3.3 Conclusiones de los resultados de competición

Los datos obtenidos en los experimentos de competición entre sustratos son compatibles con que el fenilvalerato y la acetiltiocolina actúan como inhibidores reversibles en las actividades colinesterasa y PVasa, respectivamente, y no parece haber indicios de que exista una competición verdadera. Esto es compatible con que los centros activos de hidrólisis de ambos sustratos podrían ser diferentes.

6.4. Reactivación de BuChE inhibida con paraoxon

Los datos de experimentos de nuestro laboratorio mostrados en Antecedentes (datos no publicados), mostraron que el paraoxon interaccionaba de forma diferente con ambas actividades indicando dos posibles situaciones: a) el paraoxon interaccionaba en diferentes sitios y b) el modelo matemático utilizado para ajustar los datos de inhibición con paraoxon en ambas actividades no es el adecuado porque el mecanismo molecular asociado es más complejo. También se mostró que la actividad PVasa en fracción soluble de nervio periférico de cerebro de pollo era capaz de reactivarse después de ser inhibida con paraoxon (Barril et al. 1999). En estas situaciones la reactivación espontánea era necesario ser incluida en el modelo matemático para ajustar correctamente los datos de inhibición con paraoxon de la actividad PVasa en fracción soluble de nervio periférico de pollo (Estévez et al. 2012).

En nuestro experimento no se observó reactivación de las actividades PVasa y colinesterasa de la BuChE tras inhibida con paraoxon para poder estudiar si este fenómeno molecular podría ser la causa de la diferencia de sensibilidad al paraoxon de ambas actividades. Esto sugiere que la reactivación no es la causa de diferentes constantes de inhibición en las actividades. Por lo tanto, se sugiere que el

DISCUSIÓN

paraoxon pueda estar interaccionando en sitios diferentes para ambas actividades y, por lo tanto, sugiere que el fenilvalerato y la acetiltiocolina se hidrolizan en sitios diferentes.



7. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES FUTURAS

7.1. Conclusiones

1. Se han establecido las siguientes variables experimentales óptimas para los experimentos de competición entre sustratos en actividad PVasa y colinesterasa de la BuChE humana; tiempo de reacción de 5 minutos, concentración de enzima de 0,5 nM y 37°C.
2. Se mostró que la actividad PVasa varía entre especies y entre colinesterasas, presentando mayor actividad según el siguiente orden: BuChE humana, AChE humana, BuChE de caballo y AChE de anguila eléctrica.
3. La actividad hidrolizante del fenilvalerato por la BuChE humana ha mostrado seguir un mecanismo de Michaelis-Menten, con una K_M comprendida entre 0,23 y 0,096 mM y una V_{max} en el rango de 7,2 y 16,0 $\mu\text{M}/\text{min}$.
4. Los ensayos de interacción con ambos sustratos sugieren que el mecanismo no se ajusta a una competición entre sustratos basada en un modelo de Michaelis-Menten.
5. El ensayo de actividad PVasa en presencia de acetilcolina sugiere que la acetilcolina está interaccionando como un inhibidor reversible según la reacción mixta parcial.
6. El ensayo de actividad colinesterasa en presencia de fenilvalerato sugiere que el fenilvalerato interacciona como un inhibidor reversible.
7. Los resultados obtenidos en este trabajo son compatibles con un centro activo diferente para fenilvalerato y acetilcolina, o con un modelo más complejo.
8. Las actividades PVasa y colinesterasa de BuChE humana no han mostrado reactivación tras la previa inhibición con paraoxon.

7.2. Proyecciones futuras

- Estudio estructural de la BuChE humana con los sustratos acetilcolina y fenilvalerato unidos a los centros activos mediante modelos *in silico* y/o mediante cristalografía de rayos X
- Caracterización de la actividad hidrolizante del fenilvalerato en AChE humana, ya que ha mostrado que sí es capaz de hidrolizar este sustrato.

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES FUTURAS

- Diseñar diferentes experimentos cinéticos con otros inhibidores específicos para poder profundizar más en el mecanismo molecular.
- Deducir las ecuaciones cinéticas correspondientes a los posibles mecanismos propuestos.



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):110g7.
- 📖 Aldrige WN. y Reiner E. (1972) Acylated amino acids in inhibited Bgesterases. In:Neuberger A., Tatum E.L., (Eds), *Enzyme inhibitors as substrates.* NorthgHolland Publishing Company, Amsterdam, pp170g175.
- 📖 Alles, GA. y Hawes, R.C. (1940). *J. Biol. Chem*,133 pp 375g390
- 📖 Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control.* 19, 716–723.
- 📖 Ballantyne, B., Marrs, T.C., (1992). *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates.* Butterworth–Heinemann, Oxford.
- 📖 Barril, J., Estévez, J., Escudero, M.A., Céspedes, M.V., Ñíguez, N., Sogorb, M.A., Monroy, A., Vilanova E., (1999). Peripheral nerve soluble esterases are spontaneously reactivated after inhibition by paraoxon: implications for a new definition of neuropathy esterase. *Chemico-biological interactions*, 119-120:541-50.
- 📖 Benabent M. (2014) Tesis doctoral: Carboxilesterasas y colinesterasas de cerebro de pollo: interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos. Universidad Miguel Hernández de Elche. 260pp.
- 📖 Benabent M, Vilanova E, Mangas I, Sogorb MÁ, Estévez J. (2014). Interaction between substrates suggests a relationship between organophosphorus-sensitive phenylvalerate-g and acetylcholinehydrolyzing activities in chicken brain. *Toxicol Lett.* Oct 15;230(2):132g8
- 📖 Benabent M, Vilanova E, Sogorb MÁ, Estévez J. (2014b). Cholinesterase assay by an efficient fixed time endpoint method.*MethodsX.* Nov 4;1:258g63.
- 📖 Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M.G., Cuendet, M., Pezuto, J.M., Santarsiero, B.D., Mesecar, A.D., 2010. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem. J.* 429, 273–282.
- 📖 Carrington CD, Abou-Donia MB (1984) The correlation between the recovery rate of neurotoxic esterase activity and sensitivity to organophosphorus-induced delayed neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 75(2):350–357
- 📖 Casida, J.E., Durkin, K.A. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol. Interact.* 2013 Mar 25;203(1):221-5.
- 📖 Cauet, G., Friboulet, A. And Daniel Thomas (1987). *Biochem. Cell Biol.* Vol. 65. 1987
- 📖 Céspedes, M.V.; Escudero, M.A.; Barril, J.; Sogorb, M.A.; Vicedo, J.L.; Vilanova, E. Discrimination of carboxylesterases of chicken neural tissue by inhibition with a neuropathic, non-neuropathic organophosphorus compounds and neuropathy promoter. *Chemico- Biological Interactions.* Volum 106, Issue 3, 24 October 1997, Pages 191–200.
- 📖 Chemnitius JM, Haselmeyer K.H., Zech R (1983) Neurotoxic esterase. Identification of two isoenzymes in hen brain. *Arch Toxicol* 53(3):235–244
- 📖 Cornish-Bowden A (2004) In principles of enzyme kinetics, 3rd edn. In: Cornish-Bowden A (ed) Portland Press, pp 36–39
- 📖 COT Report, 1999. Organophosphates. A report of the committee on Toxicology of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. UK Department of Health, London.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Estévez J, GarcíagPérez AG, Barril J, Pellín M, Vilanova E. (2004). The inhibition of the high sensitive peripheral nerve soluble esterases by mipafox. A new mathematical processing for the kinetics of inhibition of esterases by organophosphorus compounds. *Toxicol Lett.* Jun 15;151(1):171g81.
- Estévez J., y Vilanova E., (2009). Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: Esterases and organophosphorus compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 39 (5):427g448.
- Estévez J., Barril, J., Vilanova E. (2010). Inhibition with spontaneous reactivation and the “ongoing inhibition” effect of esterases by biotinylated organophosphorus compounds: S9B as a model. *Chem.g Biol. Interact.* 187 (1-3), 397-402.
- Estévez J., GarcíagPérez A., Barril J., Vilanova, E. (2011). Inhibition with spontaneous reactivation of carboxyl esterases by organophosphorus compounds: paraoxon as a model. *Chem. Res. Toxicol.* 2011 (24), 135-143.
- Estévez J., Barril J., Vilanova E. (2012). Kinetics of inhibition of soluble peripheral nerve esterases by PMSF: a nongstable compound that potentiates the organophosphorusinduced delayed neurotoxicity. *Arch. Toxicol.* 86, 767-777.
- Fišar,Z., Hroudová, J., Raboch, J., 2010. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 31(5), 645-656.
- GarcíagPérez, A.G.; Barril, J.; Estévez, J.; Vilanova, E.(2003). Properties of phenyl valerate esterase activities from chicken serum are comparable with soluble esterases of peripheral nerves in relation with organophosphorus compounds inhibition. *Toxicol Lett.* Apr 30;142(1g2):1g10.
- Glynn P, Read DJ, Guo R, Wylie S, Johnson MK (1994) Synthesis and characterization of a biotinylated organophosphorus ester for detection and affinity purification of a brain serine esterase: neuropathy target esterase. *Biochem J* 301(Pt 2):551-556.
- Glynn P, Holton JL, Nolan CC, Read DJ, Brown L, Hubbard A, Cavanagh JB (1998) Neuropathy target esterase: immunolocalization to neuronal cell bodies and axons. *Neurosci* 83(1):295-302
- Jamal, A., N. Ayub, M. Usman and A.G. Khan. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance Zn and Ni uptake from contaminated soil by soybean and lentil. *Int. J. Phytorem.*, 4: 205-221
- Johnson M.K. (1969b). A phosphorylation site in brain and delayed neurotoxic effects of some organophosphorus compounds. *Biochem.J.* 111, 487g495.
- Johnson MK (1974). The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. *J Neurochem.* Oct;23(4):785g9.
- Johnson, M.K. The delayed neuropathy caused by some organophosphorous esters: mechanism and challenge. 1975 CRC. *Crit. Rev. Toxicol* 3:289-316.
- Johnson M.K., Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. 1977 *Arch Toxicol*; 37(2):113-5.
- Johnson MK. (1982). The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. *Rev Biochem Toxicol*; 4: 141g212.
- Li, X.Q., Andersson, T.B., Ahlström, M., Weidolf, L.,. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs Omeprazole, Esomeprazole, Lansoprazole, Pantoprazole and Rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug. Metab. Dispos* 2004. 32, 821-827.

BIBLIOGRAFÍA

- Lockridge, O., & Schopfer, L. M. (2006). Biomarkers of organophosphate exposure. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds* (pp. 703-711).
- Lotti, M., Caroldi, S., Capodicasa, E., and Moretto, A., 1991. Promotion of organophosphate-induced delayed polyneuropathy by phenylmethanesulfonyl fluoride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108, 234-241.
- Mangas I., Vilanova E., Estevez J. (2011). Kinetics of the inhibitory interaction of organophosphorus neuropathy inducers and nonginducers in soluble esterases in the avian nervous system. *Toxicol. App. Pharmacol.* 256, 360g368.
- Mangas I., Vilanova E., Estévez J. (2012a). NTE and non NTE esterases in brain membrane: Kinetic characterization with organophosphates. *Toxicology* 297 (2012) 17- 25.
- Mangas I., Vilanova E., Estévez J., (2012b). Phenylmethylsulfonyl Fluoride a Potentiator of Neuropathy, alter the interaction of organophosphorus compounds with soluble brain esterases. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2393g2401.
- Mangas I., Vilanova E., Estévez, J. (2013a). Kinetic interactions of a neuropathy potentiator phenylmethylsulfonyl fluoride) with the neuropathy target esterase and other membrane bound esterases. *Arch Toxicol* DOI 10.1007/s00204g013g1135g0.
- Mangas I., Vilanova E., Estévez, J. (2017). Phenyl valerate esterase activity of human butyrylcholinesterase. *Arch Toxicol* DOI 10.1007/s00204-017-1946-5.
- Marquardt, D.W. (1963). An algorithm for LeastSquares Estimation of Nonlinear Parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, Vol. 11, No 2 Jun. 431g441.
- Lockridge O. (1987). Aminoacid sequence of human cholinesterase. *Gov Rep Announce*, Index 87,21.
- Kovarik Z., Radić Z., Berman HA., SimeongRudolf V., Reiner E. y Taylor P. (2003). Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *The Biochemical journal*, 373(Pt 1):33g40.
- Lockridge, O.; Duysen, E.G.; Voelker, T.; Thomson, c.m.; Schopfer, L.M. Life without acetylcholinesterase: the implications of cholinesterase inhibitor toxicity in AChE- knowout mice. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 2005 May; 19(3):463-9.
- Mangas I, Radić Z, Taylor P, Ghassemian M, Candela H, Vilanova E, Estévez J. (2016). Butyrylcholinesterase identification in a phenylvalerate esterase-enriched fraction sensitive to low mipafox concentrations in chicken brain. *Arch Toxicol.* 2016 Feb 2. [Epub ahead of print].
- Masson, Adkins, Gouet, and Osaka (1993). Recombinant Human Butyrylcholinesterase G390V, the Fluoride-2 variant, expressed in Chinese hamster ovary cells, is a low affinity variant. *The journal of biological chemistry*.
- Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E. y Vallette F.g.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41, 31g91.
- Massoulié J., Bon S., Perrier N. y Falasca C (2005) The Cgterminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact* 157g158:3.14.
- McDaniel, Virginia C Moser, Differential profiles of cholinesterase inhibition and neurobehavioral effects in rats exposed to fenamiphos or profenofos, *Neurotoxicology and Teratology*, Volume 26, Issue 3, May-June 2004, Pages 407-415
- Nash JC (1979). *Compact Numerical Methods for Computers: Linear Algebra and Function Minimisation*. Adam Hilger, Bristol. Second Edition, 1990, Bristol: Institute of Physics Publications.

BIBLIOGRAFÍA

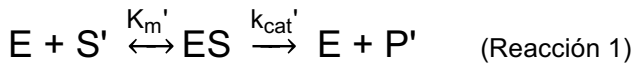
- Radz, Z. y Taylor, P. (2006). Structure and Function of Cholinesterases. Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds. Cap. 12 pp 161g186. Ed.R.C. Gupta. Elsevier, Inc.
- Radz Z., Pickering N.A., Vellom D.C., Camp S. y Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32, 12074– 12084.
- Repetto, M. (1995) Toxicología Avanzada. Ed. Díaz de Santos.
- Schumacher M., Camp S., Maulet Y., Newton M., MacPhee Quigley K., Taylor S., Firedmann T. y Taylor P. (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* 319, 407g409.
- Shrager, R.I. (1970). Nonlinear regression with linear constraints: An extension of the magnified diagonal method. *Journal of the ACM*, Vol. 17 Issue 3, July.
- Shrager, R. I. (1972). Quadratic programming for nonlinear regression. *Comm. ACM*. 15:41g45.
- Sogorb M.A., Vilanova E., Carrera V. (2004). Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicol Lett.* 151 (1), 219g233.
- Taylor P. y Radz Z. (1994). The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34:281– 320.
- Terry, A.V., 2012a. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 134, 355– 365.
- Press W.H., Flannery B.P., Teukolsky S.A., Vetterling W.T. (1986) *Numerical Recipes: the Art of Science Computing*. Cambridge University Press, U.K.
- Pope, C.N., and Padilla, S., 1990. Potentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity by phenylmethylsulfonyl fluoride. *J. Toxicol. Environ. Health* 31, 261–273.
- Vellom DC, Radz Z, Ying L, Pickering NA, Camp S y Taylor P. (1993). Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 32:12g17.
- Vilanova E., Barril J., Carrera V., Pellin MC. (1990). Soluble and particulate forms of the organophosphorus neuropathy target esterase in hen sciatic nerve. *J Neurochem.* Oct;55(4):1258g65.
- Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. (2004). Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2237g2248.
- Worek F., Aurbek N., Koller M., Becker, C., Eyer C., Thiermann H. (2007). Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. *Biochem. Pharmacol.*
- World Health Organisation (WHO). (1986a) Properties and analytical methods pp23g29. En: *Organophosphorus Insecticides: A general Introduction*. Geneva.

ANEXOS

ANEXO 1

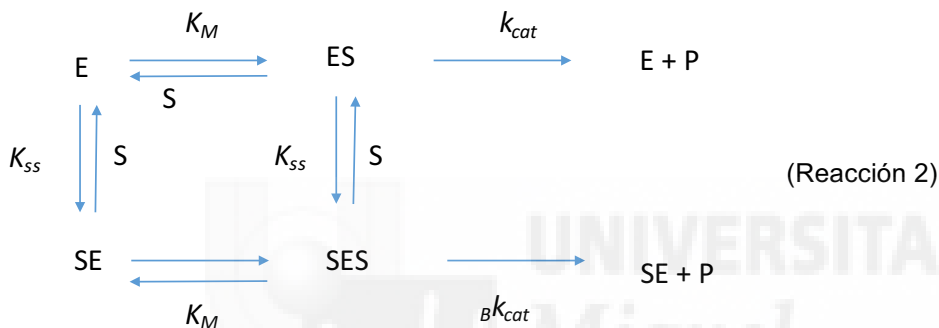
Competición entre sustratos donde la hidrólisis de uno de ellos es mediada por una reacción con activación por sustrato y la hidrólisis del otro el otro sustrato es mediada por una reacción de Michaelis-Menten. Las reacciones propuestas en este modelo son:

Para un sustrato (PV), reacción de Michaelis-Menten,



Siendo E la enzima libre, S' un sustrato (PV), K_m' la constante de Michaelis-Menten, ES el complejo michaeliano, k_{cat}' es la constante catalítica para la reacción, P' el producto de la reacción.

Para el otro sustrato (acetiltiocolina), reacción de activación por sustrato bifásica:



Siendo S el otro sustrato (acetiltiocolina), K_m la constante de Michaelis-Menten para concentraciones bajas de sustrato, ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato, bk_{cat} es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, S_pE el complejo activado enzima-sustrato y S_pES el complejo michaeliano con la enzima activada. Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$K_m = \frac{E \cdot S}{ES} \quad (a); \quad K_m = \frac{S_pE \cdot S}{S_pES} \quad (b); \quad K_{SS} = \frac{ES \cdot S}{S_pES} \quad (c); \quad K_{SS} = \frac{E \cdot S}{E S_p} \quad (d) \quad \text{y} \quad K_m' = \frac{E \cdot S'}{ES'} \quad (f)$$

La variación del producto formado en la reacción 2 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + bk_{cat} \cdot S_pES \quad (g)$$

El balance de masas es definido de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E_0 = E + ES + S_pE + S_pES + ES' \quad (h)$$

Siendo E_0 la concentración de encima inicial. Despejando ES en (h) obtenemos:

$$ES = E_0 - ES_p - E - S_pES - ES' \quad (i)$$

ANEXOS

De acuerdo con (b): $ESp = \frac{E \cdot S}{K_{SS}}$ (j)

De acuerdo con (c): $SpES = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}}$ (k)

De acuerdo con (a): $E = \frac{K_M \cdot ES}{S}$ (l)

Y de acuerdo con (f): $ES' = \frac{E \cdot S'}{K_M'}$ (m)

Sustituyendo (l) en (j) obtenemos: $ESp = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}}$ (n)

Sustituyendo (l) en (m) obtenemos: $ES' = \frac{1}{K_M'} \cdot \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot S'$ (o)

Sustituyendo (n), (k), (l) y (o) en (h) obtenemos:

$$ES = E_0 - ES \cdot \left(\frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{K_M}{S} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{K_M \cdot S'}{K_M' \cdot S} \right)$$

Y despejando ES de la anterior ecuación obtenemos:

$$ES = \frac{E_0}{1 + \left(\frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{K_M}{S} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{K_M \cdot S'}{K_M' \cdot S} \right)}$$
 (p)

Sustituyendo (p) y (k) en (g) se obtiene:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot \frac{E_0}{1 + \left(\frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{K_M}{S} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{K_M \cdot S'}{K_M' \cdot S} \right)} + bk_{cat} \cdot \frac{E_0 \cdot S \cdot \frac{1}{K_{SS}}}{1 + \left(\frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{K_M}{S} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{K_M \cdot S'}{K_M' \cdot S} \right)}$$

Reagrupando la anterior ecuación obtenemos:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{E_0 \cdot (k_{cat} + bk_{cat} \cdot S^2 \cdot \frac{1}{K_{SS}})}{S + \frac{K_M \cdot S + S^2}{K_{SS}} + K_M + \frac{K_M \cdot S'}{K_M'}}$$