



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Grado en Biotecnología

Curso 2024/2025

Instituto de Bioingeniería, Área de Toxicología

Trabajo de Fin de Grado

Interacción de retardantes de llama organobromados con carboxilesterasas de suero:

TBBPA como modelo

Carmen Garijo García

Estudiante de Biotecnología

Tutor: Jorge Estévez Domènech

Elche, julio 2025

ÍNDICE

0. RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Retardantes de llama.....	6
1.1.1. Principales familias de retardantes de llama bromados (BFRs) y su toxicidad.....	6
1.1.2. TBBPA.....	7
1.2. Carboxilesterasas.....	8
1.2.1. Tipos de carboxilesterasas.....	8
1.2.2. Colinesterasas.....	8
1.2.3. Fenilvalerato y fenilacetato.....	10
1.3. Fosfotriesterasas.....	11
1.3.1. Paraoxonasa 1 (PON1)	11
2. ANTECEDENTES.....	12
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1. Tampones y reactivos utilizados.....	13
4.2. Material biológico.....	15
4.3. Equipos utilizados.....	15
4.4. Microensayo de actividad fenilvalerato esterasa y fenilacetato esterasa.....	15
4.5. Determinación de la concentración óptima del disolvente para los ensayos.....	16
4.6. Ensayo de actividad enzimática a distintos tiempos con FV y FAc.....	17
4.7. Evaluación del efecto inhibidor del TBBPA sobre BChE a distintos tiempos de incubación.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Actividad FVasa y FAc-esterasa en presencia de TBBPA proveniente de un stock con etanol como disolvente.....	18
5.2. Evaluación de la interferencia de disolventes usados en el stock en la actividad FVasa y FAc-esterasa en suero humano o de pollo.....	20
5.2.1. Etanol como disolvente.....	20
5.2.2. Dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente.....	23

5.2.3. Metanol como disolvente.....	26
5.3. Interacción de TBBPA con la actividad FVasa y FAc-esterasa a distintos tiempos.....	28
5.4. Evaluación del efecto inhibidor del TBBPA sobre butirilcolinesterasa (BChE) a distintos tiempos de incubación.....	30
6. DISCUSIÓN.....	32
6.1 Interacción del TBBPA con carboxilesterasas de suero en presencia de etanol.....	32
6.2 Interacción del etanol con las carboxilesterasas en los sueros estudiados....	34
6.3. Interacción de otros disolventes (DMSO y metanol) con carboxilesterasas.....	35
6.4. Interacción de TBBPA en la actividad de carboxilesterasas en suero.....	36
6.5. Interacción de TBBPA sobre butirilcolinesterasa (BuChE).....	37
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.....	38
7.1. Conclusiones.....	38
7.2. Proyecciones futuras.....	39
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39

0. RESUMEN.

Los retardantes de llama bromados, como el tetrabromobisfenol A (TBBPA), son contaminantes capaces de interferir en enzimas clave para la detoxificación, como las carboxilesterasas. En este trabajo se evaluó la interacción del TBBPA con las actividades fenilvalerato esterasa (FVasa) y fenilacetato esterasa (FAc-esterasa) en suero humano y de pollo, analizando su posible uso como biomarcadores de exposición ambiental. También se estudiaron los efectos de los disolventes utilizados como stocks (etanol, metanol y DMSO) y la influencia del EDTA para diferenciar enzimas dependientes de calcio, como la paraoxonasa. Los resultados mostraron que el etanol altera la actividad carboxilesterasa de manera dependiente de la concentración y podría modular la interacción del TBBPA con estas enzimas, mientras que metanol y DMSO a concentraciones $\leq 0,01\%$ no mostraron interferencias. El TBBPA aumentó la actividad FAc-esterasa en suero humano usando DMSO como stock, sin afectar a FVasa. Estos resultados sugieren que la actividad FAc-esterasa en suero humano podría emplearse como biomarcador de exposición a TBBPA, aunque se requieren estudios adicionales para confirmar su aplicabilidad.

Palabras clave: TBBPA, carboxilesterasas, FVasa, FAc-esterasa, suero humano, suero de pollo.

ABSTRACT.

Brominated flame retardants, such as tetrabromobisphenol A (TBBPA), are contaminants capable of interfering with key detoxifying enzymes like carboxylesterases. This study evaluated the interaction of TBBPA with FVasa and FAc-esterase activities in human and chicken serum, assessing their potential as environmental exposure biomarkers. The effects of stock solvents (ethanol, methanol, and DMSO) and EDTA were also analyzed to differentiate calcium-dependent enzymes such as paraoxonase. Results showed that ethanol altered carboxylesterase activity in a concentration-dependent manner and may modulate TBBPA interactions, whereas methanol and DMSO at $\leq 0.01\%$ had no significant effects. TBBPA increased FAc-esterase activity in human serum when DMSO was used as stock, without affecting FVasa. These results suggest that FAc-esterase activity in human serum could be used as a biomarker of TBBPA exposure, although further studies are needed to confirm its applicability.

Keywords: TBBPA, carboxylesterases, FVasa, FAc-esterase, human serum, chicken serum.

ABREVIATURAS

AAP Aminoantipirina

BuChE Butirilcolinesterasa

BSA Albúmina de suero bovino

EDTA Ácido etilendiaminotetracético

EtOH Etanol

FAc Fenilacetato

FAc-esterasa Fenilacetato esterasa

FCN Ferricianuro potásico (K₃Fe(CN)₆)

FV Fenilvalerato

FVasa Fenilvalerato esterasa

SDS Dodecilsulfato sódico

SH Suero humano

SP Suero de pollo

TBBPA Tetrabromobisfenol A

TRIS Tris (hidroximetil) aminometano

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Retardantes de llama.

Los retardantes de llama abarcan un grupo amplio y diverso de compuestos utilizados para impedir los incendios o, al menos, retrasar su propagación. Hay tres categorías principales de retardantes de llama químicos: (i) hidrocarburos halogenados, (ii) compuestos organofosforados y (iii) productos inorgánicos, a menudo basados en hidróxidos metálicos (Vos et al., 2003).

1.1.1. Principales familias de retardantes de llama bromados (BFRs) y su toxicidad.

Los retardantes de llama bromados son compuestos químicos ampliamente utilizados para reducir la inflamabilidad de materiales como plásticos, textiles y componentes electrónicos. Sin embargo, muchas de estas sustancias han sido objeto de preocupación por su toxicidad, persistencia en el ambiente y capacidad de bioacumulación. En la **tabla 1** se muestran las principales familias de BFRs, sus ejemplos comunes y efectos tóxicos conocidos. (EFSA,2011).

Tabla 1. Familias de BFRs.

Familia de BFRs	Ejemplos comunes	Toxicidad principal
Tetrabromobisfenoles	TBBPA, TBBPA-bis (allyl éter), TBBPA-bis (2,3-DBP éter)	Alteraciones tiroideas, efectos hepáticos, neurotoxicidad, alteración endocrina
Polibromodifenil éteres (PBDEs)	BDE-47, BDE-99, BDE-209	Bioacumulación, neurotoxicidad en desarrollo, disrupción endocrina
Polibromobifenilos (PBBs)	Hexabromobifenilo, Decabromobifenilo	Possible carcinogénesis, toxicidad hepática y reproductiva
Hexabromociclododecano (HBCD)	HBCD	Toxicidad sobre el desarrollo, efectos sobre SNC e hígado

Éteres bromados derivados del TBBPA	TBBPA-bis (2,3-DBP éter), TBBPA-bis (allyl éter)	Similares al TBBPA, algunos con mayor bioacumulación
-------------------------------------	--	--

1.1.2. TBBPA.

Este compuesto se emplea principalmente como retardante reactivo, unido covalentemente a resinas epoxi y de policarbonato. También se utiliza como retardante de llama aditivo en la fabricación de resinas de acrilonitrilo-butadieno-estireno (ABS), poliestireno de alto impacto (HIPS) y resinas fenólicas. Los derivados de TBBPA pueden usarse como intermediarios, tanto reactivos como aditivos, en la producción de polímeros. Cuando se emplean como retardantes aditivos, el TBBPA y/o sus derivados pueden lixiviarse de los productos y liberarse al medio ambiente. (EFSA,2011)

1.1.2.1. Características químicas.

Existen diversos derivados de TBBPA diseñados para ajustar la resistencia al fuego de plásticos de ingeniería. En la tabla 2 se reúnen algunos de los derivados indicando su naturaleza química y su principal uso. (EFSA,2011)

Tabla 2. Derivados de TBBPA.

Figura	Compuesto	Tipo químico	Uso principal
	TBBPA (Tetrabromobisfenol A (2,2-bis(3,5-dibromo-4-hidroxifenil) propano))	Fenol bromado (sin enlace éster)	Reactivos en resinas epoxi y policarbonato; aditivo en ABS/HIPS
	TBBPA-bME (Tetrabromobisfenol A bis (metil éter))	Éter metílico	Subproducto ambiental / metabolito
	TBBPA-bDiBPrE (Tetrabromobisfenol A bis (2,3-dibromopropil éter))	Éter di-dibromopropílico	Aditivo en poliolefinas y HIPS

	<p>T BBPA- bOHEE(Tetrabromobisfenol A bis (2-hidroxietil éter))</p>	Éter di-(2-hidroxietil)	Aditivo en poliésteres
	<p>TBBPA- bGE(Tetrabromobisfenol A bis (glicidil éter) (también conocido como TBBPA diglicidil éter o TBBPA-DGE))</p>	Éter di-glicidílico (reactivo)	Retardante reactivo en resinas epoxi

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. Aldridge (1953) las clasificó en función de su interacción con los compuestos organofosforados (OPs):

- A-esterasas: hidrolizan ésteres carboxílicos y OPs sin ser inhibidas por éstos.
- B-esterasas: hidrolizan ésteres carboxílicos y son inhibidas por OPs irreversiblemente.
- C-esterasas: no interactúan con OPs.

Las carboxilesterasas tipo B catalizan la hidrólisis de compuestos acilo-ésteres mediante un ataque nucleofílico del grupo –OH de serina o tirosina, formando un enlace intermediario que posteriormente es hidrolizado por agua. Este mecanismo permite la recuperación y disponibilidad de la enzima para iniciar un nuevo ciclo catalítico (Aldridge y Reiner, 1972; WHO, 1986a; Ballantyne y Mars, 1992). Dentro del grupo de las CbEs tipo B se encuentran también las colinesterasas.

1.2.2. Colinesterasas.

Las colinesterasas (ChEs) son enzimas serín hidrolasas, una subfamilia de B-esterasas relevantes en la toxicología de retardantes de llama, especialmente aquellos de tipo organofosforado o bromado. Estas enzimas poseen un residuo de serina en su sitio activo y catalizan la hidrólisis de ésteres de colina, incluyendo acetilcolina, butirilcolina y succinilcolina. No obstante, el principal sustrato de estas enzimas es el

neurotransmisor acetilcolina, abundante en señales colinérgicas cerebrales y uniones neuromusculares.

En vertebrados se distinguen dos tipos de colinesterasas: la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE), también denominada pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o colinesterasa de suero. Ambas se diferencian principalmente por su especificidad hacia el sustrato (Kovarik et al., 2003). Mientras la AChE tiene una función clave en la terminación de la neurotransmisión colinérgica en sinapsis y uniones neuromusculares, el rol fisiológico de la BuChE no es tan claro. Sin embargo, algunos estudios sugieren su participación en procesos de detoxificación de compuestos xenobióticos, incluidos retardantes de llama; además, individuos con bajos niveles o ausencia de BuChE aparentemente no muestran consecuencias graves (Lockridge, O. et al, 2005). La estructura de ambas enzimas se representa en las Figuras 1.3. y 1.4.

Estas colinesterasas están codificadas por genes diferentes, habiéndose demostrado que la AChE está codificada por un único gen (Schumacher et al., 1986; Massoulié et al., 1993; Taylor y Rádic, 1994), cuya diversidad molecular surge del procesamiento diferencial del ARNm. Por otra parte, el gen que codifica la BuChE, aunque es diferente, presenta relación estructural con el gen de la AChE (Lockridge, 1987).

Los sitios activos de ambas enzimas son similares en cuanto al núcleo éster; sin embargo, existen diferencias importantes en el saco acilo, el subsituto de colina y el sitio aniónico periférico, aspectos fundamentales al evaluar la interacción con retardantes de llama (Taylor y Rádic, 1994).

El sustrato natural para la AChE es la acetilcolina, aunque también hidroliza butirilcolina, β -metiltiocolina, propionilcolina y sus análogos tiocolina, mientras que la BuChE no actúa sobre la β -metiltiocolina (Repetto, 1995; Alles y Hawes, 1940). Es importante destacar que en mamíferos la BuChE hidroliza la butirilcolina aproximadamente cuatro veces más rápido que la acetilcolina (Massoulie et al., 1993 y 2005).

Otra forma relevante de distinguir ambas enzimas en el contexto de la toxicidad de retardantes de llama es mediante sus inhibidores específicos: La BuChE es inhibida por la etopropazina y el iso-OMPA, compuestos que no afectan significativamente a la AChE de mamíferos (Vellom et al., 1993; Radic et al., 1993). En cambio, el compuesto BW284C51 es un inhibidor potente y selectivo de la AChE. Además, esta última experimenta un efecto inhibitorio ante concentraciones altas de sustrato (Rádic y Taylor,

2006), mientras que la BuChE es activada por exceso de acetiliocolina (AtCh) (Masson et al., 1993). Esta activación está mediada por dos sitios de unión diferenciados para el AtCh: el sitio catalítico y el sitio periférico regulatorio (Cauet G et al., 1987; Masson et al., 1993).

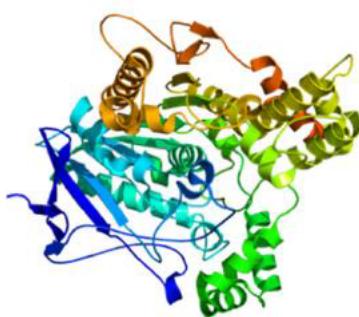


Figura 1.3. Estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa humana.
Imagen obtenida de Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>)

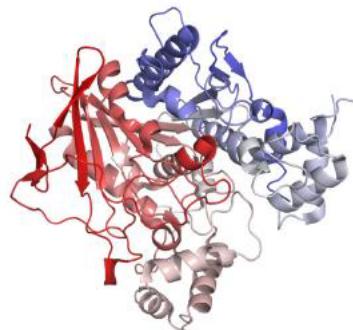


Figura 1.4. Estructura tridimensional de la butirilcolinesterasa humana.
Imagen obtenida de Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>)

1.2.3. Fenilvalerato y fenilacetato.

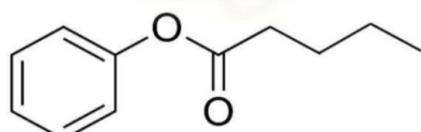


Figura 1.7: Estructura química fenilvalerato

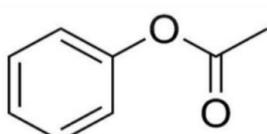


Figura 1.8: Estructura química fenilacetato

El fenilvalerato (Figura 1.7) ha sido el sustrato usado para la identificación y caracterización de la diana de neuropatía retardada (NTE; Johnson 1975; Chemnitius et al. 1990; Glynn et al. 1994, 1998) y otras serín hidrolasas de tejido nervioso y cerebro (Céspedes et al. 1997; Escudero et al. 1997; Bariil et al. 1999; Estévez et al. 2004, 2010,2011).

Recientemente se ha descrito que la acetilcolinesterasa humana recombinante (hAChE) presenta actividad fenilvalerato esterasa (PVasa) para este sustrato (Romo, 2017; Terol, 2018); (Estévez et al. 2022)

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

1.3. Fosfotriesterasas.

Las fosfotriesterasas son una familia de enzimas caracterizadas por su capacidad para hidrolizar enlaces éster fosforados, presentes en numerosos compuestos organofosforados (OPs). Aunque no pertenecen a la familia de las carboxilesterasas clásicas, comparten con ellas la función catalítica de romper enlaces éster, lo cual justifica su inclusión en este trabajo como parte del estudio enzimático implicado en la biotransformación de xenobióticos (Caldwell & Raushel, 1991).

Entre las fosfotriesterasas más estudiadas se encuentra la enzima producida por *Pseudomonas diminuta*, ampliamente investigada por su capacidad para degradar pesticidas organofosforados. Debido a su elevada eficiencia catalítica, se ha propuesto su aplicación en biotecnología ambiental, especialmente para la eliminación de residuos de OPs en aguas contaminadas (Caldwell & Raushel, 1991).

Otra enzima destacada es la HDCPasa, identificada en tejidos de gallina tras comprobarse que una disolución de hexil-DCP perdía capacidad inhibidora sobre la acetilcolinesterasa (AChE) después de incubarse con hígado y plasma de esta especie. Estos hallazgos sugieren un metabolismo activo de OPs en aves, comparable al observado en modelos murinos (Díaz-Alejo et al., 1990).

1.3.1 Paraoxonasa 1 (PON1).

Entre las fosfotriesterasas presentes en humanos, la paraoxonasa 1 (PON1) destaca por su papel central en la detoxificación plasmática. Según Lockridge et al. (2005), el plasma humano contiene principalmente tres esterasas activas en concentraciones funcionalmente relevantes: la butirilcolinesterasa (BChE), la albúmina y la PON1. Contrario a lo que ocurre en otras especies animales (ratón, rata, caballo, etc.), en humanos no se ha detectado carboxilesterasa (CES1) en plasma, lo que limita las enzimas plasmáticas responsables de la hidrólisis de compuestos tipo éster a las tres mencionadas.

PON1 es una enzima dependiente de calcio, asociada de forma estable a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Su actividad enzimática requiere la presencia de dos iones de calcio: uno estructural, necesario para mantener la conformación

tridimensional de la proteína, y otro catalítico, esencial para su acción hidrolítica (Draganov & La Du, 2004).

Desde el punto de vista funcional, PON1 actúa como una fosfotriesterasa que puede hidrolizar compuestos organofosforados como el paraoxón (metabolito activo del pesticida paratión), además de lactonas, arilésteres y diversos productos de oxidación lipídica. Por tanto, cumple un papel clave en la defensa enzimática frente a xenobióticos, especialmente en humanos, donde la ausencia de CES1 en plasma limita las opciones de biotransformación (Lockridge et al., 2005).

2. ANTECEDENTES.

El estudio de las interacciones de bisfenoles y sus derivados con enzimas tipo B-esterasas ha cobrado un creciente interés en toxicología humana y ambiental. Investigaciones recientes en especies marinas han demostrado que compuestos como el TBBPA, BPA-E y BPF pueden interferir con la actividad de carboxilesterasas (CE), especialmente en tejidos como hígado, cerebro y gónadas (Solé et al., 2024; Solé et al., 2022)

Se evaluó la actividad de B-esterasas (carboxilesterasas y acetilcolinesterasa) en distintos órganos de lubina y merluza. La lubina mostró mayor actividad de carboxilesterasas y una menor relación AChE/CE, lo que sugiere una mayor capacidad de defensa frente a compuestos químicos. A través de ensayos *in vitro*, se comprobó que bisfenoles como BPA, BPF, BPA-E y especialmente TBBPA interfieren con estas enzimas, afectando funciones clave en metabolismo, reproducción y sistema nervioso. Dado que los bisfenoles están asociados a la contaminación por microplásticos, estos resultados refuerzan la importancia de caracterizar biomarcadores en peces antes de usarlos para evaluar exposiciones a contaminantes emergentes. [Solé et al. (2024)]

Por otro lado, analizaron la actividad de esterasas plasmáticas en tortugas marinas (*Caretta caretta*), concluyendo que estas enzimas pueden actuar como biomarcadores no invasivos de exposición a contaminantes emergentes como los aditivos plásticos. Se observó inhibición significativa de las CE tras la exposición a TBBPA, BPA y BPF en ensayos *in vitro*. [Solé et al. (2022)]

Además, se advirtió sobre la limitada información disponible respecto a los niveles de TBBPA en muestras humanas, más allá de la leche materna, y la falta de datos sobre sus derivados. Esta preocupación resalta la necesidad de seguir investigando

biomarcadores sensibles en matrices como el suero humano, dada su exposición a través de alimentos y el medio ambiente. [EFSA (2011)].

3. OBJETIVOS.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es evaluar la interacción del tetrabromobisfenol A (TBBPA) con las actividades fenilvalerato esterasa (FVasa) y fenilacetato esterasa (FAc-esterasa) en suero humano y suero de pollo, con el fin de determinar si estas actividades carboxilesterasas pueden considerarse como potenciales biomarcadores de exposición a este compuesto.

Objetivos específicos

- Estudiar si las condiciones experimentales descritas en la bibliografía para evaluar la interacción del TBBPA con carboxilesterasas en tejidos animales son aplicables al suero humano y al suero de pollo.
- Estudiar la interacción del etanol, metanol y dimetilsulfóxido (disolventes comúnmente empleados para la preparación de stocks de TBBPA) con las actividades FVasa y FAc-esterasa, para comprobar su viabilidad como disolventes para stocks, en ensayos con suero humano y suero de pollo.
- Evaluar la interacción del TBBPA con las actividades FVasa y FAc-esterasa en suero humano y suero de pollo, utilizando como disolvente para el stock de TBBPA el seleccionado según los ensayos de este trabajo.
- Comprobar si la butirilcolinesterasa humana (enzima integrante del grupo de las carboxilesterasas con actividad FVasa y FAc-esterasa) presenta interacción con el TBBPA, con el objetivo de confirmar o descartar su implicación como posible biomarcador de exposición a este compuesto.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Tampones y reactivos utilizados.

- **Albúmina de suero bovino (BSA):**(Pureza 96%) se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. Se preparó una disolución (1 mg/ml) en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4. Se utilizó para preparar las disoluciones de enzima y los blancos de los ensayos.

- **Dimetilsulfóxido (DMSO):** Pureza superior al 99,5%. Se adquirió de Sigma-Aldrich. Para su uso, se preparó a la concentración requerida en función del ensayo realizado.
- **Dodecilsulfato sódico (SDS) y 4-aminoantipirina (AAP):** Se adquirieron de grado analítico de Panreac Química S.A. y Sigma-Aldrich Química S.A. respectivamente. Para su uso se preparó una disolución de SDS 2% / AAP 10 mM en tampón Tris 50 mM pH 8; esta mezcla se conservó a temperatura ambiente en botella topacio.
- **Etanol:** Absoluto. Se adquirió de J.T.Baker. Para su uso se preparó a la concentración requerida en función del ensayo realizado.
- **Fenilvalerato:** Se adquirió de Lark Enterprises. Una disolución concentrada de PV 1715,5 mM en N,N'-dimetilformamida se conservó en nevera a 4°C. En su utilización como sustrato en los ensayos de actividad PVasa, inmediatamente antes de usarlo, se hizo la dilución necesaria en agua destilada para obtener una concentración de PV en reacción de 3 mM.
- **Fenilacetato (FAc):** Se adquirió de la empresa Panreac Química S.A. Para los ensayos de actividad FAc esterasa se preparó una disolución de concentración 1,7 M en N-dimetilformamida (DMF). Se conservó en nevera a 4°C, siendo estable durante meses. Para su utilización como sustrato se prepararon disoluciones con agua destilada a una concentración final de 1mM en reacción.
- **Ferricianuro potásico (K₃Fe (CN)6):** Se adquirió de grado analítico de Panreac Química S.A. Se preparó al 2 % en agua y se conservó a temperatura ambiente.
- **Tampón tris pH 8 EDTA:** Tris 50 mM / EDTA 1 mM / HCl; pH 8. Se preparó con Tris 50 mM y EDTA 1 mM en agua destilada y se ajustó el pH a 8,00 utilizando HCl concentrado. Se conservó a temperatura ambiente.
- **Tampón tris pH 8:** Tris 50 mM / HCl; pH 8. Se preparó con Tris 50 mM mM en agua destilada y se ajustó el pH a 8,00 utilizando HCl concentrado. Se conservó a temperatura ambiente.
- **Tetrabromobisfenol A (TBBPA):** Se adquirió de A.DR. EHRENSTOFER. Se preparó un stock de 1,53M (300uL) en DMSO y se conservó a 4°C. A partir de este stock se preparó una concentración de 11mM diluyendo en el H₂O en cada ensayo de inhibición a diferentes tiempos para llegar a una concentración final de 1mM.
- **Metanol:** Absoluto. Se adquirió de J.T.Baker. Para su uso, se preparó a la concentración requerida en función del ensayo realizado.

4.2. Material biológico.

- **Suero humano puro:** Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. y se conservó a -20 °C. Cada día se preparó la dilución necesaria en el tampón correspondiente. Para los ensayos con suero humano (SH) se utilizó una concentración final de 6 µL/mL. No obstante, para los ensayos con SH sin EDTA, realizados específicamente para el sustrato fenilacetato (FAc), se trabajó con una concentración final de 1 µL/mL.
- **Suero pollo puro:** Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. Se conservó en nevera a -20°C y se preparó cada día la dilución necesaria para obtener una concentración en reacción de 20 µL/mL en el tampón necesario.
- **Butirilcolinesterasa humana (hButChE) recombinante proveniente de células HEK293:** Se adquirió de BIOSYSTEMS ACRO. Se preparó un stock con BSA 0,1 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4.

4.3. Equipos utilizados.

- **Lector de placas.** Para la lectura fotométrica se utilizó el lector de placas AD 340 C (Beckman Coulter) y el lector de placas Cytaion 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek).
- **Termobloques:** Equipo para calentar muestras en diferentes contenedores o tubos sin utilizar líquidos. Con capacidad para 8 x 12 minitubos de 1mL y un controlador de temperatura electrónico.

4.4. Microensayo de actividad fenilvalerato esterasa y fenilacetato esterasa.

Se añadieron 100 µL de una disolución de suero (con o sin EDTA), ajustada para obtener una concentración final de 6 µL/mL en el caso del suero humano o de 20 µL/mL para el suero de pollo, mientras que en los ensayos realizados con fenilacetato (FAc) la concentración de suero humano se redujo a 1 µL/mL. Estos 100 µL se preincubaron en microtubos de 1 mL junto con 10 µL de agua destilada (control) o del inhibidor o disolvente en estudio (DMSO, etanol o metanol), preparados a la concentración necesaria para que en la mezcla final de 110 µL se alcancaran las concentraciones deseadas (**Figura 4.1. apartado 1**). Las mezclas se preincubaron durante 30 minutos a 37°C y, posteriormente, se añadieron 100 µL de una solución de sustrato (**Figura 4.1. apartado 2**): fenilvalerato (6 mM) en agua destilada, preparado a partir de una solución concentrada de 1715,5 mM en DMF, o fenilacetato (2 mM) en agua destilada, preparado a partir de una solución concentrada de 1700 mM en DMF.

La mezcla de reacción, con un volumen total de 210 μ L, se incubó durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ L de una disolución de SDS 2% / AAP 10 mM en tampón Tris 50 mM pH 8 (**Figura 4.1. apartado 3**). A continuación, se añadieron 50 μ L de ferricianuro de potasio (FCN) a 40 mg/mL (**Figura 4.1. apartado 4**)

Finalmente, 250 μ L de cada muestra fueron transferidos automáticamente a una microplaca de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a 510 nm.

Las características específicas de cada condición experimental se detallan en la sección de resultados.

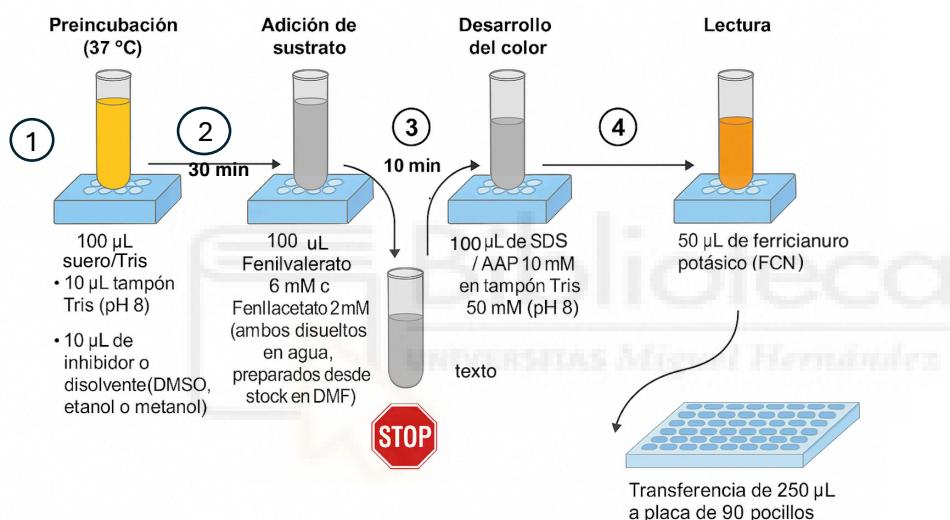


Figura 4.1. Esquema ensayo de actividad FAc y PV

4.5. Determinación de la concentración óptima del disolvente para los ensayos.

Se evaluó la posible interferencia de distintos disolventes (dimetilsulfóxido o metanol) sobre suero humano o suero de pollo mediante un ensayo en el que se midió la hidrólisis de fenilvalerato (FV) o fenilacetato (FAc) en presencia de concentraciones crecientes del disolvente, expresadas en porcentaje en volumen (0%, 0,1%, 1%, 3%, 5%, 6%, 8%, 10% y 100%).

En cada condición, se añadieron 10 μ L del disolvente correspondiente (DMSO, metanol) en tubos de 1 mL, o 10 μ L de agua destilada en el caso del control. Posteriormente, se añadió 100 μ L de suero con EDTA o sin EDTA. En paralelo, se

preparó un blanco añadiendo 100 μ L de tampón Tris 50 mM pH 8,0. (También con EDTA o sin EDTA)

Las muestras se preincubaron durante 30 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se añadieron 100 μ L del sustrato (fenilvalerato 6 mM o fenilacetato 2 mM, preparados como se describe en el apartado anterior). La mezcla final de reacción (210 μ L) se incubó durante 10 minutos a 37 °C.

La reacción se detuvo añadiendo 100 μ L de una disolución de SDS al 2% / AAP 10 mM en tampón Tris 50 mM pH 8,0. A continuación, se añadieron 50 μ L de ferricianuro sódico al 2% (40 mg/mL). Finalmente, 250 μ L de cada muestra fueron transferidos a una microplaca de 96 pocillos para la medición de la absorbancia a 510 nm.

4.6. Ensayo de actividad enzimática a distintos tiempos con FV y FAc.

Se midieron las actividades FV y FAc a distintos tiempos de incubación indicado en resultados.

Cada ensayo se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 4.4, manteniéndose constantes todos los parámetros experimentales salvo el tiempo de preincubación con el TBBPA a 500uM en volumen de reacción, que fue la variable modificada.

4.7. Evaluación del efecto inhibidor del TBBPA sobre BChE a distintos tiempos de incubación.

El ensayo se diseñó para evaluar la interacción entre la butirilcolinesterasa (BChE) y el TBBPA en condiciones controladas, utilizando una concentración final de 2 nM de BChE (equivalente a 1 nM en la mezcla de reacción) y una concentración final de TBBPA de 500 μ M en volumen de reacción.

Se añadieron 10uL del inhibidor (TBBPA) a la concentración de 500uM o agua destilada en caso del control. A continuación, se incorporó 90uL de la proteína (BChE) o, en su caso, albúmina sérica bovina (BSA) como blanco, ambas previamente atemperadas a 37°C. La incubación se llevó a cabo durante 30 y 45 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 100uL del sustrato correspondiente (Fenilvalerato (6 mM) en agua destilada, preparado a partir de una solución concentrada de 1715,5 mM en DMF; o fenilacetato (2 mM) en agua destilada, preparado a partir de una solución concentrada de 1700 mM en DMF, también previamente atemperado).

La reacción enzimática se permitió durante 10 minutos, tras lo cual se detuvo mediante la adición de 100uL de SDS-AAP. Posteriormente, se incorporó 50uL de ferricianuro potásico al 2%.

Finalmente, 250 μ L de cada muestra fueron transferidos a una microplaca de 96 pocillos para la medición de la absorbancia a 510 nm.

5. RESULTADOS.

5.1. Actividad FVasa y FAc-esterasa en presencia de TBBPA proveniente de un stock con etanol como disolvente.

Se analizó la actividad fenilvalerato esterasa y fenilacetato esterasa en suero humano (SH) y de pollo (SP) en presencia de TBBPA a una concentración de 100 μ M en volumen de reacción, proveniente de un stock 10 mM en etanol. La concentración de etanol (EtOH) en volumen de reacción fue del 1%.

5.1.1. Actividad FVasa en suero humano en presencia de TBBPA.

La figura 5.1.1 muestra los datos obtenidos en experimentos de actividad FVasa en SH en presencia de TBBPA.

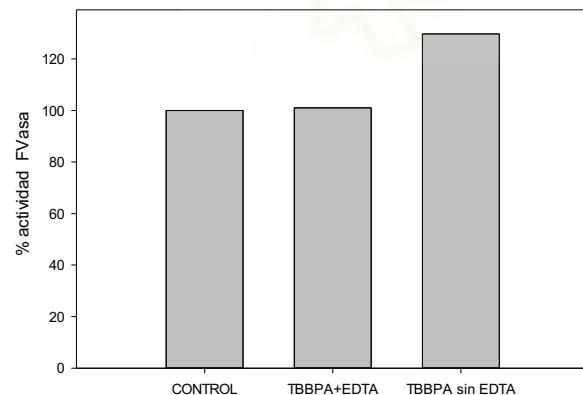


Figura 5.1.1. Interacción del TBBPA en la actividad FVasa de las muestras en suero humano en presencia y ausencia de EDTA.

Como se observa, la actividad FVasa en presencia de EDTA Y TBBPA no presenta diferencias significativas sin embargo, se observa un aumento de actividad superior al 120% en ausencia de EDTA y presencia de TBBPA.

5.1.2. Actividad FAc-esterasa en suero humano en presencia de TBBPA.

La Figura 5.1.2 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de actividad FAc-esterasa en SH en presencia de TBBPA.

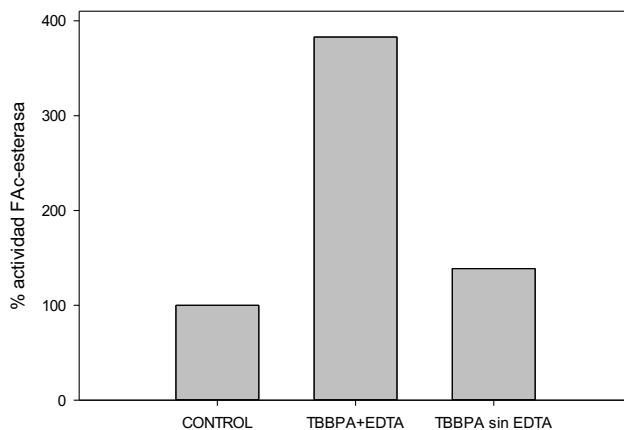


Figura 5.1.2. Interacción del TBBPA en la actividad FAc-esterasa de las muestras en suero humano en presencia y ausencia de EDTA.

Se observa un aumento significativo de actividad de casi un 400 % en presencia de EDTA y TBBPA, mientras que en ausencia de EDTA el aumento es más leve, en torno al 140% con respecto al control.

5.1.3. Actividad FVasa en suero de pollo en presencia de TBBPA.

La Figura 5.1.3 recoge los datos de actividad FVasa en SP en presencia de TBBPA.

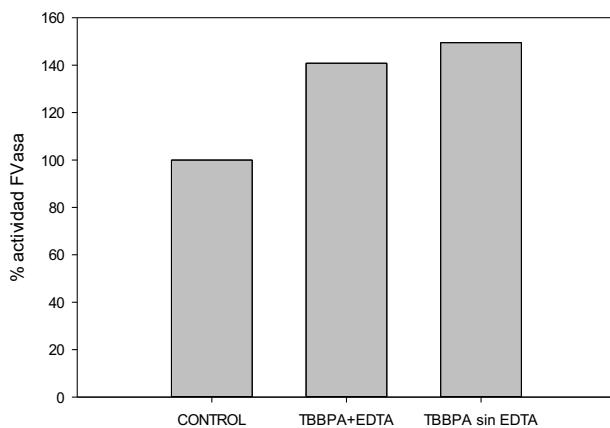


Figura 5.1.3. Interacción del TBBPA en la actividad FVasa de las muestras en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA.

Como se observa, la actividad FVasa aumenta en ambas condiciones. En presencia de EDTA y TBBPA se detecta un aumento de aproximadamente un 140%, mientras que en ausencia de EDTA y en presencia de TBBPA el aumento es de alrededor un 145% respecto al control.

5.1.4. Actividad FAc-esterasa en suero de pollo en presencia de TBBPA.

La Figura 5.1.4 muestra la actividad FAc-esterasa en suero de pollo en presencia de TBBPA.

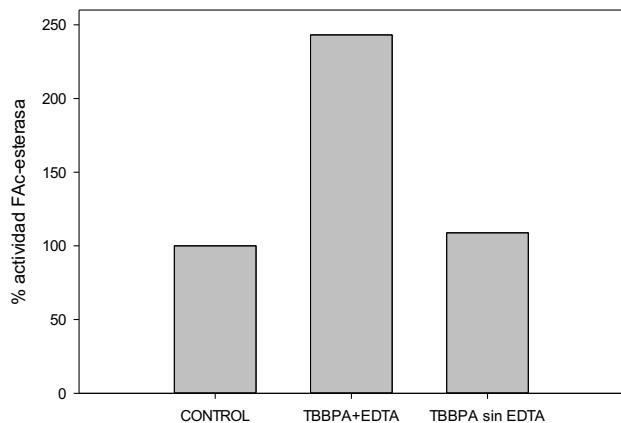


Figura 5.1.4. Interacción del TBBPA en la actividad FAc-esterasa de las muestras en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA.

Como se observa, en presencia de EDTA y TBBPA se detecta un aumento significativo de actividad, de aproximadamente un 240% respecto al control, mientras que en ausencia de EDTA no se observan diferencias significativas, manteniéndose la actividad cercana al 100%.

5.2. Evaluación de la interferencia de disolventes usados en el stock en la actividad FVasa y FAc-esterasa en suero humano o de pollo.

Se evaluó la actividad FVasa y FAc-esterasa en presencia de diferentes disolventes usados como stocks para TBBPA en suero humano y suero de pollo

5.2.1. Etanol como disolvente.

Para todos los tipos de experimentos se utilizaron muestras que fueron ensayadas con etanol al 9,09% o etanol al 1% en volumen de reacción en ausencia y presencia de EDTA.

5.2.1.1. Actividad FVasa en suero humano.

La figura 5.2.1.1. muestra la interacción del etanol en la actividad FVasa en suero humano en presencia y ausencia de EDTA

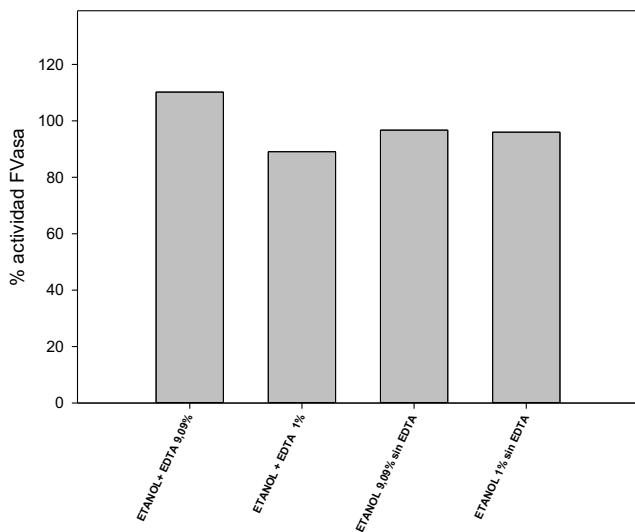


Figura 5.2.1.1. Interacción del etanol en la actividad FVasa en suero humano en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FVasa está referida a un control sin etanol.

Se observa interacción con la actividad FVasa en presencia de etanol en suero humano, apreciándose una inhibición del 10% en las muestras de etanol 1% con EDTA y un incremento del 10% en las muestras de etanol 9,09% con EDTA.

5.2.1.2. Actividad FAc-esterasa en suero humano.

La figura 5.2.1.2. muestra la interacción del etanol en la actividad FAc-esterasa en suero humano en presencia y ausencia de EDTA

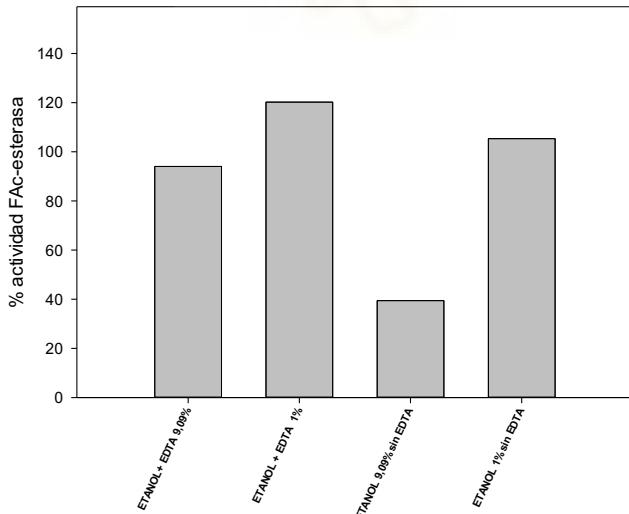


Figura 5.2.1.2. Interacción del etanol en la actividad FAc-esterasa del disolvente en suero humano en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FAc-esterasa está referida a un control sin etanol.

Como se observa, en presencia de etanol al 9,09% y sin EDTA, la actividad FAc-esterasa disminuye significativamente hasta aproximadamente un 40% respecto al control. Por otro lado, en presencia de EDTA con etanol al 1%, la actividad aumenta hasta aproximadamente un 120% respecto al control.

5.2.1.3. Actividad FVasa en suero de pollo.

La Figura 5.2.1.3. muestra la actividad FVasa en suero de pollo con etanol en presencia y ausencia de EDTA.

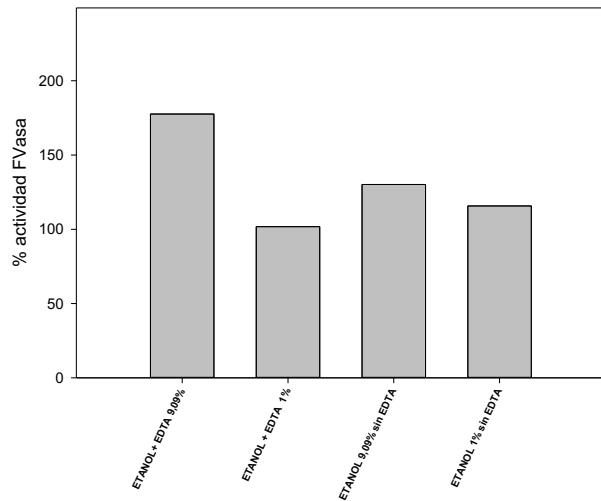


Figura 5.2.1.3. Interacción del etanol en la actividad FVasa del disolvente en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FVasa está referida a un control sin etanol.

Como se observa, cuando se utiliza etanol al 9,09%, la actividad FVasa aumenta aproximadamente un 175% en presencia de EDTA y un 130% en ausencia de EDTA. Por otro lado, con etanol al 1%, la actividad se mantiene cercana al 100% en presencia de EDTA, mientras que en ausencia de EDTA se observa un aumento de actividad de aproximadamente un 120% respecto al control.

5.2.1.4. Actividad FAc-esterasa en suero de pollo.

La Figura 5.2.1.4 muestra la actividad FAc-esterasa en suero de pollo en presencia de etanol.

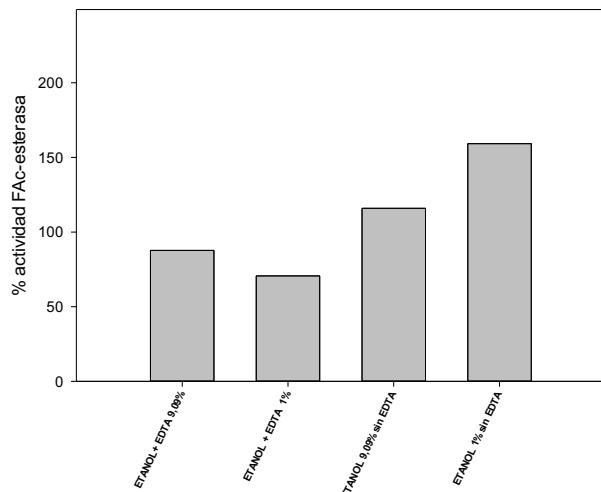


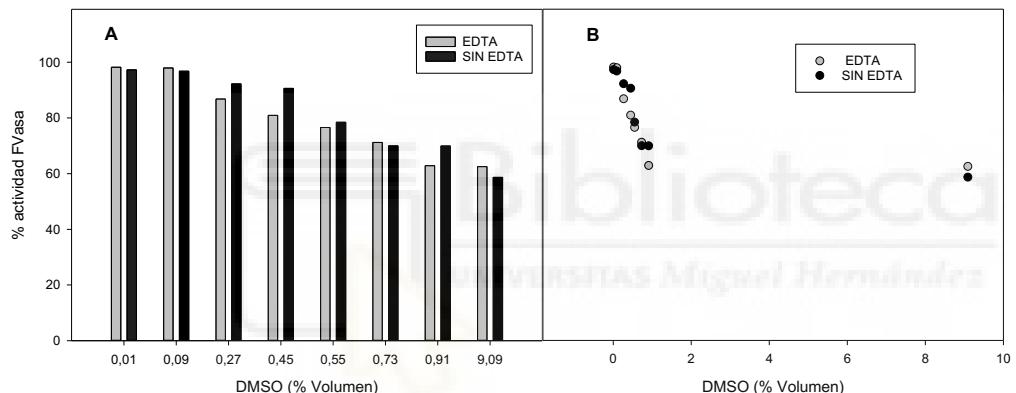
Figura 5.2.1.4. Interacción del etanol en la actividad FAc-esterasa del disolvente en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FAc-esterasa está referida a un control sin etanol.

Como se observa, con etanol al 1% en presencia de EDTA la actividad disminuye significativamente, reduciéndose hasta aproximadamente un 65% respecto al control, mientras que en ausencia de EDTA la actividad aumenta notablemente, alcanzando aproximadamente un 160%. Por otro lado, con etanol al 9,09% en presencia de EDTA se observa una ligera disminución de la actividad, situándose por debajo del 100%, mientras que en ausencia de EDTA la actividad aumenta moderadamente, alcanzando aproximadamente un 115% respecto al control.

5.2.2. Dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente.

5.2.2.1. Actividad FVasa en suero humano.

La figura 5.2.2.1 muestra los datos obtenidos de la interacción de DMSO en la actividad FVasa en SH en presencia o ausencia de EDTA.



Figuras 5.2.2.1. Interacción del DMSO en la actividad FVasa del disolvente en suero humano en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FVasa está referida a un control sin DMSO.

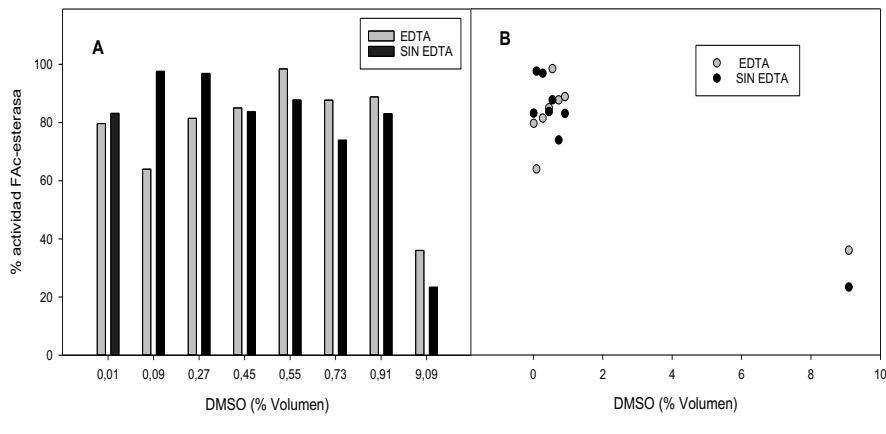
A) Se muestran los datos obtenidos en diagrama de barras

B) Se muestra el % de actividad en función del % DMSO en el volumen de reacción.

En la **figura 5.2.2.1 panel A** se observa que tanto en presencia como ausencia de EDTA a concentraciones bajas de DMSO en volumen de reacción no altera significativamente la actividad FVasa. La **figura 5.2.2.1. panel B** muestra una disminución progresiva en la actividad FVasa conforme aumenta la concentración de DMSO llegando a un mínimo de actividad de alrededor del 60% en presencia y ausencia de EDTA.

5.2.2.2. Actividad FAc-esterasa en suero humano.

La figura 5.2.2.2. muestra los datos obtenidos de la interacción de DMSO en la actividad FAc-esterasa en SH en presencia o ausencia de EDTA.



Figuras 5.2.2.2. Interacción del DMSO en la actividad FAc-esterasa del disolvente en suero humano en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FAc-esterasa está referida a un control sin DMSO.

A) Se muestran los datos obtenidos en diagrama de barras

B) Se muestra el % de actividad en función del % DMSO en el volumen de reacción

En la **figura 5.2.2.2. panel A** se muestra que, a concentraciones bajas de DMSO (0–1%), la actividad FAc-esterasa se mantiene elevada, con valores entre el 64% y el 98%, sin grandes diferencias entre presencia o ausencia de EDTA. Sin embargo, al aumentar la concentración de DMSO, en la **figura 5.2.2.2. panel B** se aprecia una disminución progresiva de la actividad enzimática, siendo este efecto más marcado a concentraciones entre el 8–9%, donde la actividad cae por debajo del 40%, con una ligera reducción adicional en ausencia de EDTA.

5.2.2.3. Actividad FVasa en suero de pollo.

La figura 5.2.2.3 muestra los datos obtenidos de la interacción de DMSO en la actividad FVasa en SP en presencia o ausencia de EDTA.

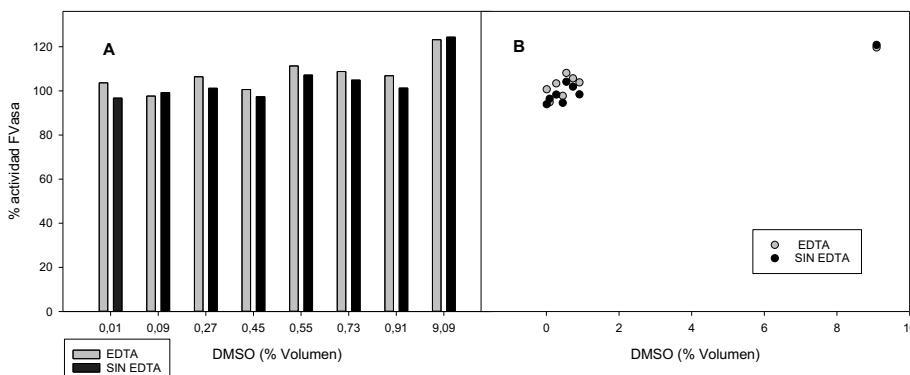


Figura 5.2.2.3 Interacción del DMSO en la actividad FVasa del disolvente en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA. La actividad Fvasa está referida a un control sin DMSO.

A) Se muestran los datos obtenidos en diagrama de barras

B) Se muestra el % de actividad en función del % DMSO en el volumen de reacción

En ambos paneles (A y B) de la **figura 5.2.2.3** se observa que, a concentraciones bajas de DMSO, la actividad FVasa se mantiene estable, con valores próximos al 100% tanto en presencia como en ausencia de EDTA. No obstante, a medida que la concentración de DMSO aumenta, se aprecia una ligera tendencia ascendente en la actividad enzimática, alcanzando incrementos pronunciados a concentraciones más elevadas de DMSO.

5.2.2.4. Actividad FAc-esterasa en suero de pollo.

La Figura 5.2.2.4 recoge los datos obtenidos de la interacción de DMSO en la actividad FAc-esterasa en SP en presencia y ausencia de EDTA.

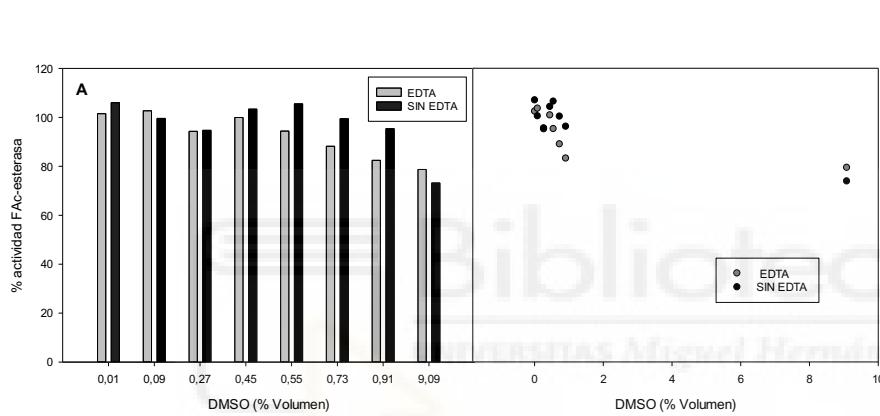


Figura 5.2.2.4. Interacción del DMSO en la actividad FAc-esterasa del disolvente en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FAc-esterasa está referida a un control sin DMSO.

A) Se muestran los datos obtenidos en diagrama de barras

B) Se muestra el % de actividad en función del % DMSO en el volumen de reacción

En la **figura 5.2.2.4 panel A** se observa que tanto en presencia como ausencia de EDTA a concentraciones bajas de DMSO en volumen de reacción no altera significativamente la actividad FVasa. La **figura 5.2.2.1.panel B** muestra una disminución progresiva en la actividad FVasa conforme aumenta la concentración de DMSO llegando a un mínimo de actividad de alrededor del 80% en presencia y ausencia de EDTA.

5.2.3. Metanol como disolvente.

5.2.3.1. Actividad FVasa en suero humano.

La figura 5.2.3.1 muestra los datos obtenidos de la interacción de metanol en la actividad FVasa en SH en presencia o ausencia de EDTA.

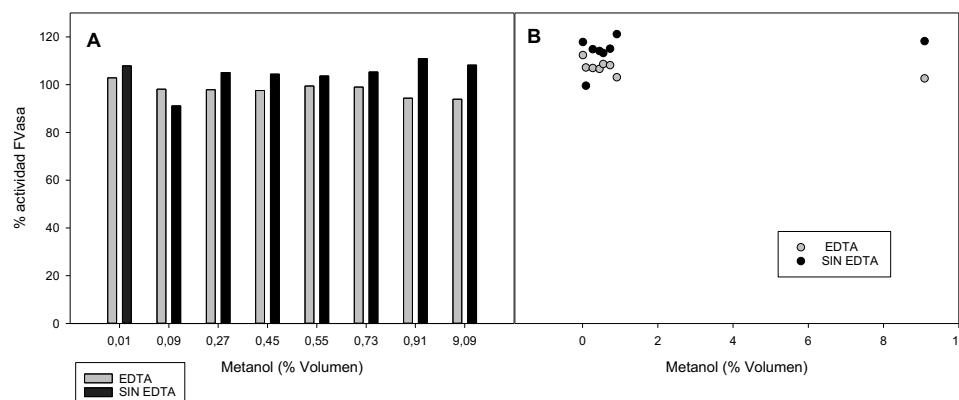


Figura 5.2.3.1 Interacción del metanol en la actividad FVasa del disolvente en suero humano en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FVasa está referida a un control sin metanol.

A) Se muestran los datos obtenidos en diagrama de barras

B) Se muestra el % de actividad en función del % metanol en el volumen de reacción

En la **Figura 5.2.3.1 panel A y B** se muestra que, la actividad se mantiene constante y cercana al 100% en todo el rango de concentraciones evaluadas, sin variaciones significativas bajo ninguna de las condiciones.

5.2.3.2. Actividad FAc-esterasa en suero humano.

La figura 5.2.3.2 muestra los datos obtenidos de la interacción de metanol en la actividad FAc-esterasa en SH en presencia o ausencia de EDTA.

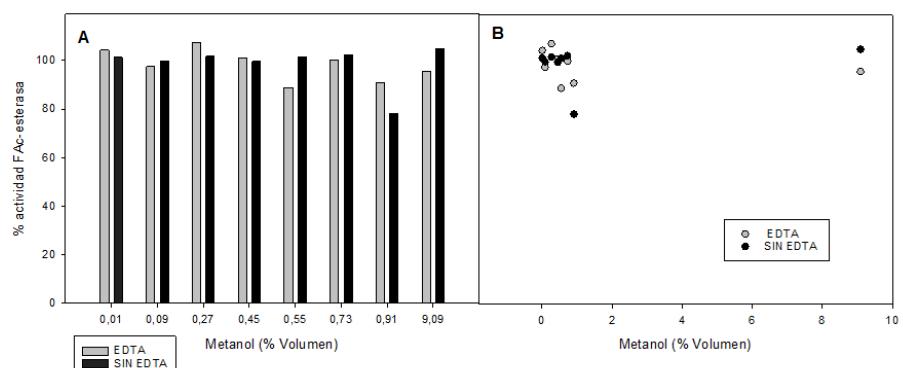


Figura 5.2.3.2. Interacción del metanol en la actividad FAc-esterasa en suero humano en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FAc-esterasa está referida a un control sin metanol.

A) Se muestran los datos obtenidos en diagrama de barras

B) Se muestra el % de actividad en función del % metanol en el volumen de reacción

Según la **Figura 5.2.3.2** vemos que, en general, la actividad permanece estable a concentraciones bajas e intermedias de metanol.

5.2.3.3. Actividad FVasa en suero de pollo.

La figura 5.2.3.3 muestra los datos obtenidos de la interacción de metanol en la actividad FVasa en SP en presencia o ausencia de EDTA.

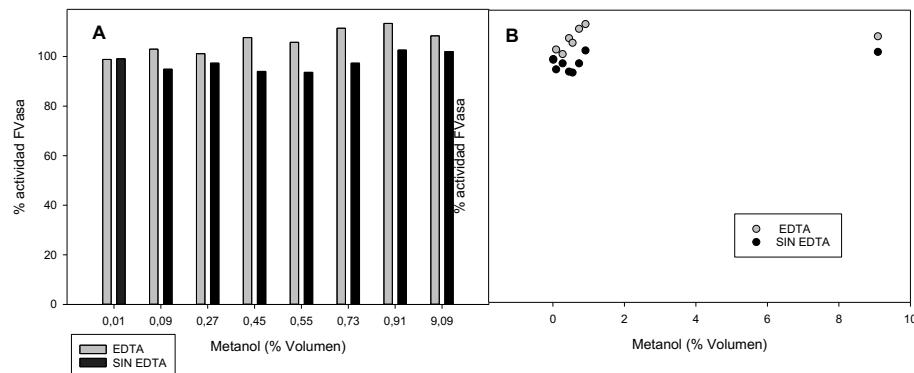


Figura 5.2.3.3. Interacción del metanol en la actividad FVasa en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FVasa está referida a un control sin metanol.

A) Se muestran los datos obtenidos en diagrama de barras

B) Se muestra el % de actividad en función del % metanol en el volumen de reacción

Los resultados reflejan que la actividad se mantiene cercana al 100% en todas las concentraciones de metanol evaluadas, sin cambios relevantes.

5.2.3.4. Actividad FAc-esterasa en suero de pollo.

La Figura 5.2.3.4 recoge los datos de la interacción de metanol en la actividad FAc-esterasa en SP en presencia y ausencia de EDTA

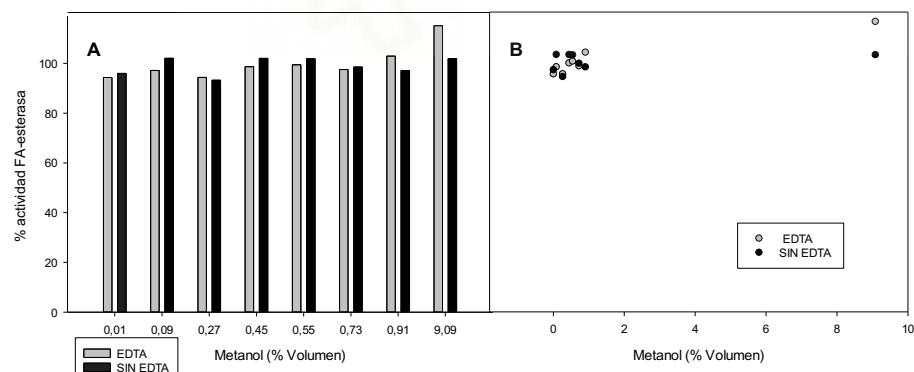


Figura 5.2.3.4. Interacción del metanol en la actividad FAc-esterasa en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA. La actividad FAc-esterasa está referida a un control sin metanol.

A) Se muestran los datos obtenidos en diagrama de barras

B) Se muestra el % de actividad en función del % metanol en el volumen de reacción

En la figura 5.2.3.4. se aprecia que la actividad se mantiene relativamente constante a lo largo del rango de concentraciones de metanol. A bajas e intermedias concentraciones, no se observan cambios marcados, mientras que a concentraciones altas (cercanas al 10%) se evidencia un leve aumento en la actividad, más notable en presencia de EDTA.

5.3. Interacción de TBBPA con la actividad FVasa y FAc-esterasa a distintos tiempos.

Con el objetivo de evaluar el efecto inhibitorio del TBBPA sobre la actividad enzimática en condiciones fisiológicas, se diseñó un experimento en el que se midieron las actividades FVasa y FAc-esterasa en distintos tiempos de incubación, los cuales se indican en cada figura correspondiente. Para la preparación del stock se utilizó DMSO, resultando en una concentración residual de 0.006% en el volumen total de reacción. La concentración final de TBBPA en la reacción fue de 500 μ M.

5.3.1. Actividad FVasa en suero humano.

La figura 5.3.1. muestra los datos obtenidos de la interacción de TBBPA en la actividad FVasa en SH en presencia o ausencia de EDTA.

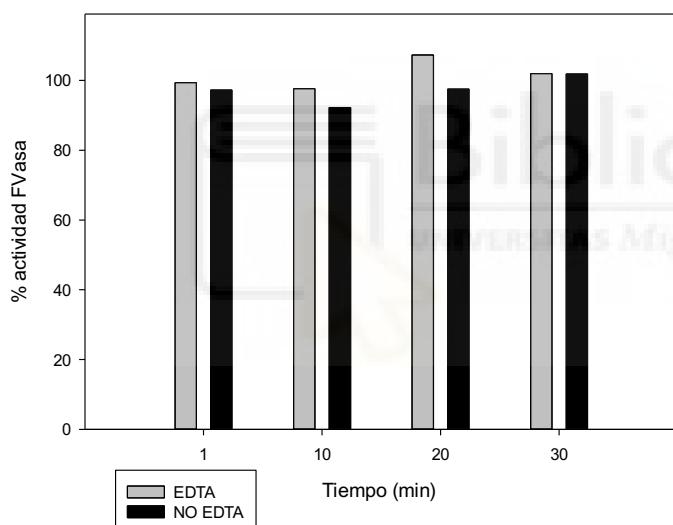
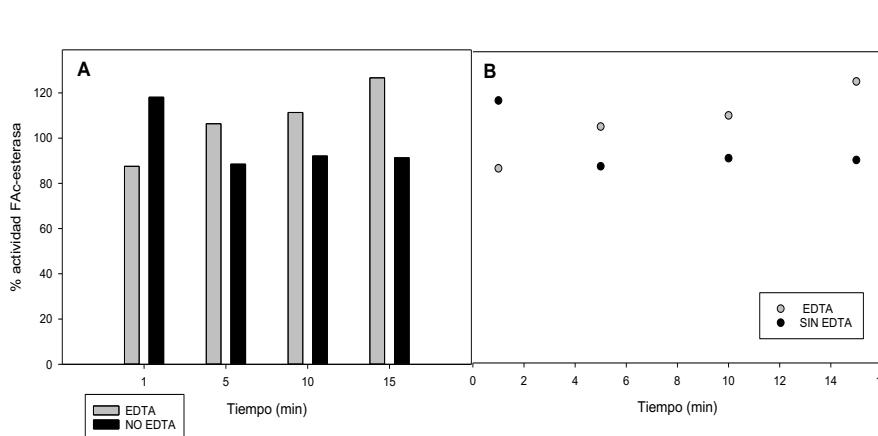


Figura 5.3.1. Interacción del TBBPA en la actividad FVasa de la muestra en suero humano en presencia y ausencia de EDTA a tiempos 1, 10, 20 y 30 minutos. La actividad FVasa está referida a un control sin TBBPA del 100%.

La figura 5.3.1 muestra que la actividad FVasa en suero humano se mantiene estable y cercana al 100% en todos los tiempos de incubación evaluados, sin evidenciar dependencia del tiempo.

5.3.2. Actividad FAc-esterasa en suero humano.

La figura 5.3.2. muestra los datos obtenidos de la interacción de TBBPA en la actividad FAc-esterasa en SH en presencia o ausencia de EDTA.



En la **figura 5.3.2.** se aprecia una clara dependencia del tiempo, ya que a medida que aumenta el tiempo de incubación, la actividad FAc-esterasa en presencia de EDTA muestra un incremento progresivo, mientras que en ausencia de EDTA la actividad disminuye con el tiempo.

5.3.3. Actividad FVasa en suero de pollo.

La figura 5.3.3. muestra los datos obtenidos de la interacción de TBBPA en la actividad FVasa en SP en presencia o ausencia de EDTA.

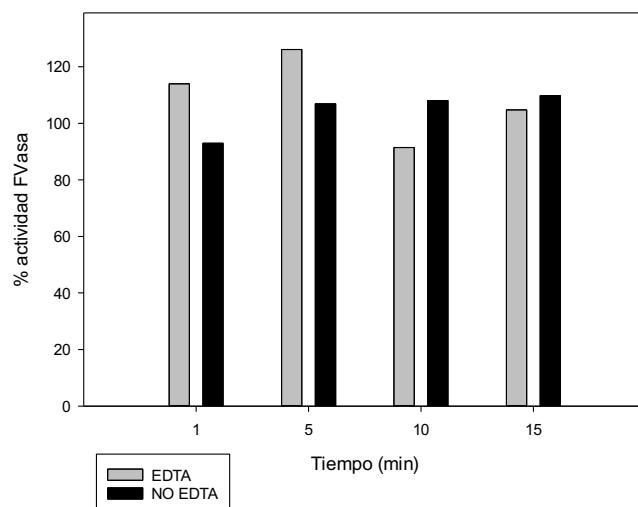


Figura 5.3.3. Interacción del TBBPA en la actividad FVasa de la muestra en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA a tiempos 1, 5,10 y 15 minutos. La actividad FVasa está referida a un control sin TBBPA.

La **figura 5.3.3** no muestra variaciones significativas de la actividad FVasa a lo largo de los diferentes tiempos de incubación. Las fluctuaciones observadas se mantienen dentro de un rango aproximado del $\pm 20\%$.

5.3.4. Actividad FAc-esterasa en suero de pollo.

La Figura 5.3.4 recoge los datos de la interacción del TBBPA en la actividad FAc-esterasa en SP en presencia y ausencia de EDTA.

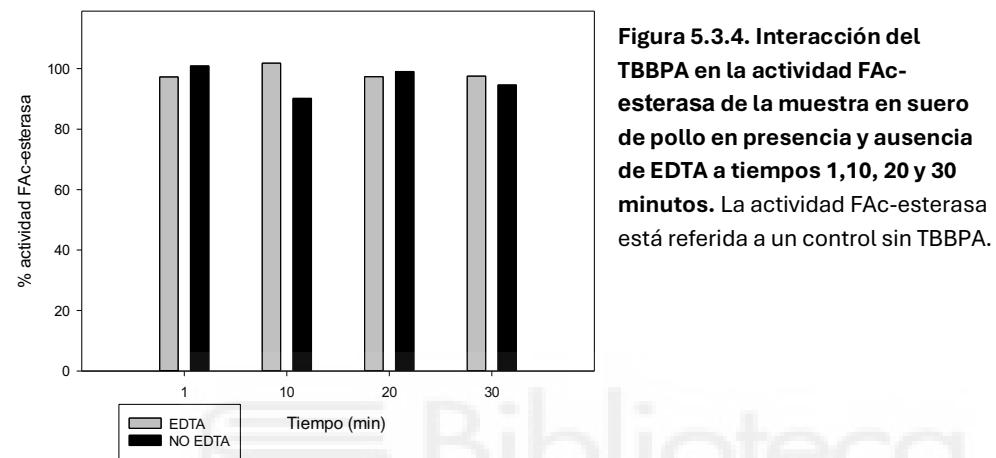


Figura 5.3.4. Interacción del TBBPA en la actividad FAc-esterasa de la muestra en suero de pollo en presencia y ausencia de EDTA a tiempos 1, 10, 20 y 30 minutos. La actividad FAc-esterasa está referida a un control sin TBBPA.

En la **figura 5.3.4.** la actividad enzimática se mantiene cercana al 100% en todos los tiempos de incubación evaluados, sin variaciones relevantes.

5.4. Evaluación del efecto inhibidor del TBBPA sobre butirilcolinesterasa (BChE) a distintos tiempos de incubación.

Se realizaron ensayos con una concentración de enzima (BChE) de 2nM y dos tiempos de incubación (30 y 45 minutos). En estas condiciones, se evaluó el efecto inhibidor del TBBPA en esta enzima tras la adición del sustrato FV o FAc. Las figuras siguientes muestran los resultados. La concentración final de TBBPA en la reacción fue de 500 μM .

5.4.1. Actividad FVasa en butirilcolinesterasa.

La Figura 5.4.1 muestra los datos de la interacción del TBBPA en la actividad FVasa en BChE.

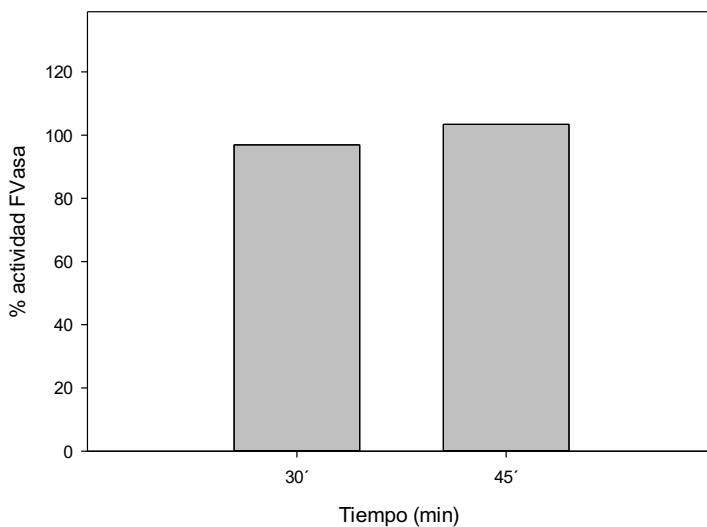


Figura 5.4.1. Interacción del TBBPA en la actividad FVasa en butirilcolinesterasa.

La actividad FVasa está referida a un control sin TBBPA.

La figura 5.4.1. muestra que la actividad FVasa observada se mantiene cercana al 100% para ambos tiempos de incubación (30 y 45 minutos).

5.4.2. Actividad FAc-esterasa en butirilcolinesterasa.

La Figura 5.4.2. muestra los datos de la interacción del TBBPA en la actividad FAc-esterasa en BChE.

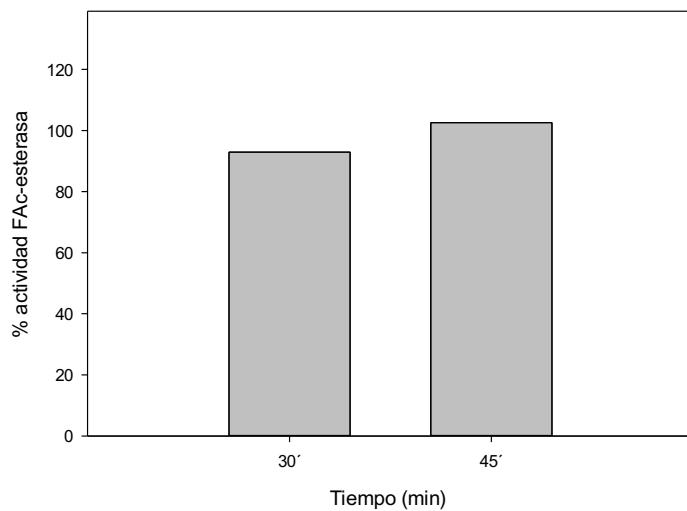


Figura 5.4.2. Interacción de la actividad FAc-esterasa en butirilcolinesterasa. La actividad FAc-esterasa está referida a un control sin TBBPA.

Al igual que en la gráfica anterior, la **figura 5.4.2.** muestra que la actividad enzimática se mantiene cercana al 100% en ambos tiempos de incubación (30 y 45 minutos), esta vez frente al sustrato FAc.

6. DISCUSIÓN.

6.1 Interacción del TBBPA con carboxilesterasas de suero en presencia de etanol (según condiciones experimentales descritas en la bibliografía)

En el presente trabajo se ha evaluado la posible interacción del TBBPA con las carboxilesterasas presentes en suero humano y de pollo. Sole et al. (2024) demostraron que en peces marinos (lubina y merluza), el TBBPA es capaz de inhibir significativamente las B-esterasas en diferentes tejidos como hígado y plasma, proponiéndolas como biomarcadores potenciales de exposición a aditivos plásticos, observándose una inhibición marcada especialmente con TBBPA frente a otros derivados de bisfenol A. En ese estudio, los stocks de TBBPA fueron preparados en etanol.

Por otro lado, Sole et al. (2022) estudiaron las carboxilesterasas plasmáticas de tortuga boba (*Caretta caretta*) como biomarcadores de exposición a contaminantes plásticos, demostrando que el TBBPA provocaba una inhibición clara de la actividad carboxilesterasa en estudios in vitro.

Estos trabajos justifican la elección del TBBPA en el presente TFG, dado su uso extensivo como retardante de llama en plásticos y su persistencia y bioacumulación en ecosistemas acuáticos.

Además, según Sole et al. (2022), se comprobó que el etanol utilizado como disolvente stock no interfería en la actividad enzimática de las muestras, lo que respalda su uso en los estudios de interacción de TBBPA con las carboxilesterasas en diferentes especies. Por ello, se realizaron experimentos para evaluar la interacción del TBBPA proveniente de un stock preparado en etanol, estimándose una concentración residual de etanol en el volumen de reacción en los experimentos de aproximadamente el 1%.

6.1.1. Interacción del TBBPA con carboxilesterasas en suero humano.

En este trabajo se analizó la actividad FVasa y FAc-esterasa en suero humano (SH) en presencia de TBBPA, tanto con EDTA como sin él, con el objetivo de evaluar su posible aplicación como biomarcadores de exposición a este compuesto.

El EDTA se utilizó como agente quelante porque captura los iones calcio presentes en la muestra. Esto es importante ya que algunas ester-hidrolasas, como la paraoxonasa (PON1), necesitan calcio para funcionar, por lo que su actividad se inhibe cuando se añade EDTA. Según Li et al. (2005), la paraoxonasa está presente en el suero humano. Por tanto, al comparar los resultados en presencia y ausencia de EDTA, podemos diferenciar si la actividad medida proviene de enzimas dependientes de calcio, como PON1, o de otras ester-hidrolasas, como las carboxilesterasas, que no requieren calcio para su actividad.

Los resultados mostraron que en la **actividad FVasa (Figura 5.1.1)**, el TBBPA no interaccionaba con la actividad en presencia de EDTA, mientras que en ausencia de EDTA se detectó un aumento de la actividad superior al 120% respecto al control.

En el caso de la **actividad FAc-esterasa (Figura 5.1.2)**, se observó un incremento cercano al 400% en presencia de EDTA y TBBPA, mientras que en ausencia de EDTA el aumento fue más moderado, alcanzando aproximadamente un 140%.

6.1.2. Interacción del TBBPA con carboxilesterasas en suero de pollo.

Se evaluó la actividad FVasa y FAc-esterasa en suero de pollo (SP) en presencia de TBBPA, considerando que las aves, y especialmente las gallinas, son modelos relevantes en toxicología ambiental, ya que son animales altamente sensibles a sustancias químicas ambientales (Fossi et al., 1998). Su comportamiento alimenticio implica la ingestión directa de contaminantes presentes en el suelo, sedimentos o pienso (Kim et al., 2019), y además ocupan un lugar clave en la cadena alimentaria, lo que las convierte en bioindicadores importantes de la contaminación ambiental (Burger & Gochfeld, 2001).

Los resultados mostraron que, para la actividad FVasa (Figura 5.1.3), en presencia de EDTA y TBBPA se detectó un aumento de aproximadamente un 140%, mientras que en ausencia de EDTA el incremento fue similar, alcanzando un 145%. En el caso de la actividad FAc-esterasa (Figura 5.1.4), se observó un aumento del 240%

en presencia de EDTA, mientras que en ausencia de EDTA no se detectaron cambios significativos, manteniéndose la actividad cercana al control.

6.1.3. Consideraciones finales de la interacción del TBBPA con las actividades FVasa y FAc-esterasa en suero.

Los resultados obtenidos sugieren que el TBBPA puede interactuar con las actividades enzimáticas FVasa y FAc-esterasa en suero humano, aumentando su actividad. La marcada diferencia observada en presencia y ausencia de EDTA apoya la hipótesis de que diferentes tipos de ester-hidrolasas, como la paraoxonasa, están contribuyendo a estas actividades (Li et al., 2005).

Sin embargo, se ha descrito que el etanol puede modificar la actividad de enzimas como la acetilcolinesterasa eritrocitaria, mostrando un efecto protector frente a su inhibición por organofosforados, reduciendo su sensibilidad en presencia de un 5% de etanol (Fekonja et al., 2007; Estévez et al., 2024; O'Brien, 1956). Este efecto protector del etanol no descarta que también pueda interactuar sobre las carboxilesterasas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el etanol podría modular la interacción del TBBPA con las carboxilesterasas en suero humano y de pollo, alterando su actividad y potencialmente modificando su toxicidad. Aunque en estudios previos con animales marinos no se ha observado que el etanol interactúe con carboxilesterasas u otras enzimas (Solé et al., 2022; 2024), no se puede descartar que en suero humano y de pollo sí pueda tener efectos sobre estas actividades enzimáticas. Por ello, se refuerza la necesidad de evaluar este tipo de interacciones de manera más amplia en diferentes modelos biológicos y condiciones experimentales.

6.2. Interacción del etanol con las carboxilesterasas en los sueros estudiados.

Para evaluar si el etanol interfiere en la actividad de las carboxilesterasas, se realizaron ensayos en suero humano y suero de pollo utilizando dos concentraciones de etanol: una cercana a la empleada en el apartado 5.1 (1%) y otra más alta (9,09%) en volumen de reacción.

En suero humano, los resultados (**Figuras 5.2.1.1 y 5.2.1.2**) muestran que el etanol genera efectos diferenciados según la actividad enzimática analizada y la condición de EDTA. Para la actividad FVasa (**Figura 5.2.1.1**), se observa una ligera inhibición del 10% con etanol al 1% en presencia de EDTA, mientras que con etanol al

9,09% y EDTA se detecta un aumento del 10%. En la actividad FAc-esterasa (**Figura 5.2.1.2**), en presencia de etanol al 9,09% y sin EDTA, la actividad disminuye marcadamente hasta un 40% respecto al control, mientras que en presencia de EDTA con etanol al 1% se observa un aumento de la actividad hasta un 120%.

En suero de pollo, la interacción también es evidente (**Figuras 5.2.1.3 y 5.2.1.4**). Para la actividad FVasa (**Figura 5.2.1.3**), se incrementa aproximadamente un 175% con etanol al 9,09% en presencia de EDTA y un 130% en ausencia de EDTA; con etanol al 1%, la actividad se mantiene estable en presencia de EDTA, pero aumenta un 120% en ausencia de EDTA. Para la actividad FAc-esterasa (**Figura 5.2.1.4**), con etanol al 1% y EDTA la actividad disminuye hasta un 65% respecto al control, mientras que en ausencia de EDTA se incrementa hasta un 160%. Con etanol al 9,09% en presencia de EDTA se observa una leve disminución por debajo del control, mientras que sin EDTA se registra un aumento moderado hasta un 115%.

Estos resultados confirman que el etanol sí interacciona en la actividad de las carboxilesteras tanto en suero humano como en suero de pollo, con efectos dependientes de la concentración de etanol y la presencia de EDTA. A su vez, no se puede descartar que el etanol pueda influir también en la interacción del TBBPA con estas enzimas, modificando su interacción en las actividades medida en los ensayos.

6.3. Interacción de otros disolventes (DMSO y metanol) con carboxilesterasas.

Con el objetivo de evaluar la posible interacción de los disolventes utilizados con la actividad de las carboxilesterasas, se realizaron ensayos utilizando DMSO y metanol a distintas concentraciones en volumen de reacción, tanto en suero humano como en suero de pollo.

En el caso del DMSO, su uso se seleccionó debido a que estudios previos (Cato et al., 2014; Int. J. Mol. Sci., 2022) demostraron que, a concentraciones bajas, no interfería con la actividad enzimática ni con la viabilidad celular, siendo además ampliamente empleado en toxicología por su baja toxicidad y su capacidad para facilitar la entrada de compuestos hidrofóbicos como el TBBPA en las células. En este trabajo, los resultados confirmaron que DMSO no mostró interferencias significativas a concentraciones bajas ($\leq 0,01\%$); sin embargo, a concentraciones más elevadas se observaron efectos diferenciados: en suero humano, la actividad FVasa (**Figura 5.2.2.1**) y la FAc-esterasa (**Figura 5.2.2.2**) disminuyeron progresivamente, alcanzando un 60% y menos del 40% respectivamente a concentraciones altas. Por el contrario, en suero de pollo la actividad FVasa (**Figura 5.2.2.3**) mostró un aumento progresivo con la

concentración de DMSO, mientras que la FAc-esterasa (**Figura 5.2.2.4**) presentó una inhibición progresiva a medida que aumentaba la concentración. Estos resultados confirman que DMSO es adecuado como disolvente stock a bajas concentraciones, aunque a concentraciones elevadas puede alterar la actividad enzimática medida.

En cuanto al metanol, se seleccionó como posible disolvente stock por su alta estabilidad en ensayos enzimáticos y por su uso generalizado en la preparación de stocks de TBBPA en estudios previos(Copeto et al. (2024)), donde se emplearon soluciones stock de TBBPA en metanol asegurando concentraciones residuales bajas , consideradas no interferentes. En este estudio, los resultados mostrados en las **Figuras 5.2.3.1, 5.2.3.2, 5.2.3.3 y 5.2.3.4** indican que el metanol no tuvo efectos significativos sobre la actividad FVasa ni FAc-esterasa, tanto en suero humano como en suero de pollo, manteniéndose la actividad enzimática cercana al 100% del control en todas las concentraciones evaluadas. Por tanto, estos resultados confirman que **el metanol es adecuado como disolvente stock cuando se utiliza a bajas concentraciones**. Sin embargo, se sabe que el metanol puede participar en sustituciones nucleofílicas, lo que potencialmente podría alterar la composición del stock de TBBPA, afectando a la interpretación de los resultados. Además, se ha visto que el metanol puede interaccionar con carboxilesterasas tal como se ha descrito que interacciona con acetilcolinesterasa (O'Brien, 1956). Por lo que en este trabajo se eligió el DMSO como disolvente stock.

6.4. Interacción de TBBPA en la actividad de carboxilesterasas en suero.

Para evaluar la posible interacción del TBBPA con las actividades carboxilesterasa en suero, se realizaron ensayos utilizando TBBPA disuelto en DMSO como disolvente stock, elegido por las razones mencionadas en el apartado anterior.

6.4.1. Actividad FVasa en suero humano y de pollo.

En ambos casos, suero humano y suero de pollo, la actividad FVasa no mostró cambios significativos en presencia de TBBPA (**Figuras 5.3.1. y 5.3.3.**). La actividad se mantuvo cercana al 100% en todos los tiempos de incubación evaluados, sin evidenciar interacción relevante ni dependencia del tiempo, confirmando que TBBPA no altera la actividad FVasa medida en estas condiciones.

6.4.2. Actividad FAc-esterasa en suero de pollo.

De forma similar, la actividad FAc-esterasa en suero de pollo (**Figura 5.3.4.**) no presentó variaciones importantes en presencia de TBBPA. Los resultados mostraron

que la actividad se mantuvo estable en todos los tiempos de incubación, sin indicios de interacción significativa ni alteración progresiva, manteniéndose cercana a los valores control en todas las condiciones evaluadas.

6.4.3. Actividad FAc-esterasa en suero humano.

Sin embargo, en el caso de la actividad FAc-esterasa en suero humano (**Figura 5.3.2.**) se observó una clara dependencia del tiempo. A medida que aumentaba el tiempo de incubación, la actividad mostró un incremento progresivo en presencia de EDTA, mientras que en ausencia de EDTA la actividad disminuyó con el tiempo.

Estos resultados sugieren que la interacción de TBBPA con esta actividad enzimática provoca una alteración progresiva de la FAc-esterasa en suero humano, por lo que sería necesario estudiarlo más profundamente para comprender los mecanismos implicados y evaluar si esta actividad enzimática podría utilizarse como biomarcador de exposición o efecto del TBBPA en suero humano.

6.5. Interacción de TBBPA sobre butirilcolinesterasa (BuChE).

La BuChE es una de las principales esterasas plasmáticas, junto con la paraoxonasa y la actividad esterasa de la albúmina. Se ha descrito que presenta actividad FVasa (Estévez et al (2005)), y según Rebeca Rastoll (2021), la mayor parte de la actividad FVasa en suero humano podría deberse principalmente a la butirilcolinesterasa.

Por ello, en este estudio se analizó la posible interacción del TBBPA con la butirilcolinesterasa humana, evaluando sus actividades FVasa y FAc-esterasa. Los resultados obtenidos (**Figura 5.4.1** y **Figura 5.4.2**) mostraron que no se observó interacción significativa del TBBPA con ninguna de las dos actividades a los tiempos estudiados.

En el caso de la actividad FVasa, estos resultados concuerdan con lo observado en los ensayos realizados en suero humano, donde tampoco se detectó interacción con TBBPA. Esto refuerza la hipótesis de que, dado que la mayor parte de la actividad FVasa en suero humano es atribuida a la butirilcolinesterasa, la ausencia de interacción en la enzima se refleja también en las muestras de suero.

Sin embargo, en el caso de la actividad FAc-esterasa, aunque no se observó interacción del TBBPA con la butirilcolinesterasa en estos ensayos, en los experimentos

realizados con suero humano sí se detectó un efecto. Este hallazgo sugiere que la butirilcolinesterasa no sería la enzima responsable de la variación observada en la actividad FAc-esterasa en suero humano, y que podrían estar implicadas otras carboxilesterasas diferentes que hidrolizan este sustrato. Por tanto, estas otras enzimas podrían resultar de interés como biomarcadores potenciales de exposición al TBBPA.

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.

7.1. Conclusiones.

- El TBBPA, en condiciones experimentales descritas en la bibliografía (en presencia de etanol), interacciona con las carboxilesterasas de suero humano y de pollo tanto en presencia como en ausencia de EDTA.
- El etanol interfiere en las actividades FVasa y FAc-esterasa en suero humano y en suero de pollo, con efectos detectados tanto en presencia como en ausencia de EDTA.
- El DMSO, a concentraciones menores o iguales al 0,01% en volumen de reacción, no interfiere con las actividades FVasa ni FAc-esterasa en suero humano ni en suero de pollo, independientemente de la presencia de EDTA.
- El metanol no interfiere con las actividades FVasa ni FAc-esterasa en suero humano ni en suero de pollo, a ninguna de las concentraciones evaluadas, y tampoco en presencia o ausencia de EDTA.
- El TBBPA, utilizando DMSO en concentraciones $\leq 0,01\%$ como disolvente stock, no interacciona con la actividad FVasa en suero de pollo ni en suero humano, ni con la actividad FAc-esterasa en suero de pollo, tanto en presencia como en ausencia de EDTA. Sin embargo, en la actividad FAc-esterasa de suero humano se observa una interacción dependiente del tiempo, mostrando un incremento progresivo en presencia de EDTA y una disminución en ausencia de EDTA.
- La actividad FVasa y FAc-esterasa de la butirilcolinesterasa humana no se modificó con la exposición a TBBPA.
- Se sugiere que las carboxilesterasas responsables de la actividad FAc-esterasa en suero humano, distintas de la butirilcolinesterasa, podrían considerarse candidatas como posibles biomarcadores de exposición a TBBPA.

7.2. Proyecciones futuras

- Profundizar en la identificación de las carboxilesterasas implicadas en la actividad FAc-esterasa alterada por TBBPA, para su posible aplicación como biomarcadores de exposición.
- Evaluar la influencia del etanol en estudios toxicológicos con TBBPA, dado su potencial modulador de la actividad enzimática.
- Extender estos estudios a otras especies de interés ambiental para confirmar la utilidad de estas actividades enzimáticas como biomarcadores de exposición a retardantes de llama bromados.
- Realizar ensayos similares con otras sustancias retardantes de llama, como DCP, en suero humano y suero de pollo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Solé M, Omedes S, Brandts I, Estévez J. B-esterases activities in several tissues of the marine fish: sea bass and hake, as potential biomarkers of bisphenol A derivatives. *J Environ Exposure Assess.* 2024;3:9. doi:10.20517/jeea.2023.52.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and its derivatives in food. *EFSA Journal.* 2011;9(12):2477. doi:10.2903/j.efsa.2011.2477.
- Solé M, Bassols A, Labrada-Martagón V. Plasmatic B-esterases as potential biomarkers of exposure to marine plastics in loggerhead turtles. *Environ Res.* 2022;213:113639. doi:10.1016/j.envres.2022.113639.
- Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, Lockridge O. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(11):1673-1684. doi:10.1016/j.bcp.2005.08.012.
- Fossi MC, Leonzio C, Focardi S, Casini S. Biomarkers for the assessment of exposure and effects of xenobiotics in wild birds. *Ecotoxicology.* 1998;7(1):31-41. doi:10.1023/A:1008821018941.
- Kim MJ, Noh HJ, Kim SJ, Lee CH, Kim SH, Lee IS. Heavy metal concentrations in soils and factors affecting metal accumulation in Korean free-range chickens. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;167:354-362. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.10.017.

- Burger J, Gochfeld M. Effects of chemicals and pollution on seabirds. In: Schreiber EA, Burger J, eds. *Biology of Marine Birds*. Boca Raton: CRC Press; 2001:485-525.
- Ruz P. Interacciones de acetiltiocolina y acetilcolina en las actividades fenilvaleratoesterasa y fenilacetatoesterasa de la acetilcolinesterasa humana recombinante [Trabajo de Fin de Grado]. Elche, España: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2023.
- Terol M. Actividad fenilvalerato esterase en la acetilcolinesterasa humana recombinante [Trabajo de Fin de Grado]. Elche, España: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2022.
- Rastoll Javaloyes R. Determinación de la actividad fenilvaleratoesterasa en suero humano y caracterización preliminar de su naturaleza enzimática [Trabajo de Fin de Grado]. Elche, España: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2021.
- Estévez J, Brandts I, Omedes S, Solé M. Inhibition with simultaneous spontaneous reactivation and aging of acetylcholinesterase by organophosphorus compounds: Demeton-S-methyl as a model. *Chem Biol Interact.* 2024;380:110591. doi:10.1016/j.cbi.2024.110591.
- Copeto P, Solé M, Estévez J, Omedes S. Toxicity, accumulation and biotransformation of TBBPA in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.* 2024;258:106543. doi:10.1016/j.aquatox.2024.106543.
- Senobar Imanian M, Ghasemi Z, HosseiniMehr SJ. Efficient removal of tetrabromobisphenol A by a novel magnetic Fe–S/CuS nanocomposite: Performance, reusability, and toxicity assessment. *J Hazard Mater.* 2024;452:131170. doi:10.1016/j.jhazmat.2023.131170.
- Cato MC, Wang J, Puschner B, Poppenga RH. Determination of tetrabromobisphenol A in human serum by HPLC with fluorescence detection. *J Anal Toxicol.* 2014;38(6):361-365. doi:10.1093/jat/bku043.
- Kisała J, Tomaszewska A, Barylyak A, Bobitski Y, Balawejder M. Photocatalytic degradation of tetrabromobisphenol A on magnetite catalysts vs. ozonolysis method: Process efficiency and toxicity assessment of disinfection by-products. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3438. doi:10.3390/ijms23073438.