



Instituto de Bioingeniería
UNIVERSITAS Miguel Hernández

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biotecnología

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Curso académico 2024-2025

Interacciones del reactivo DTNB en colinesterasas y de la acetiltiocolina en las actividades fenilvaleratoesterasa y fenilacetatoesterasa de la butirilcolinesterasa humana

Autor: Guillermo Gordo Martín

Tutor: Jorge Estévez Domenech

Departamento: Biología Aplicada

Índice:

1.1 Carboxilesterasas.....	6
1.1.1. Colinesterasas.....	6
1.2. Acetilcolina y acetiltiocolina como sustratos para AChE.....	8
1.3. Fenilvalerato, fenilacetato y fenilvaleratoesterasas.....	9
1.3.1. BChE como fenilvaleratoesterasa.	10
1.4. El método de Ellman.	10
2.2 Inhibición de la actividad FAc esterasa por presencia de tiocolina como producto de la reacción de hidrólisis de ATCh.....	13
2.3 Grupo cromóforo ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB).	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	15
4.1 Tampones y reactivos utilizados.	15
4.2 Material biológico.	17
4.3 Equipos utilizados.	18
4.4 Microensayo de actividad colinesterasa.....	18
4.5 Microensayo de actividad fenilvaleratoesterasa.....	19
4.6 Ensayo de inhibición de colinesterasas por DTNB.....	20
4.7 Ensayo de actividad Fenilacetato esterasa de BChE humana recombinante en presencia de AtCh o tCh.	21
4.8 Ensayo de actividad Fenilvalerato esterasa de BChE humana recombinante en presencia de AtCh o tCh o Acetato (Ac).....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1 Interacción del fenilvalerato en presencia de AtCh, tCh o acetato (Ac) en la actividad fenilvaleratoesterasa de la BChEh recombinante.....	23
5.2 Interacción del fenilacetato con AtCh y tCh en la actividad FAc-esterasa de la BChEh recombinante.	24
5.4 Interacción del DTNB con la actividad acetilcolinesterasa en función del tiempo.	26
5.5 Interacción del DTNB en la actividad acetilcolinesterasa con AChE recombinante a distintos tiempos.....	27
6. DISCUSIÓN.....	28
6.1. Interacción de la AtCh con la actividad PVasa de la BChEh recombinante.....	28
6.2. Interacción de la AtCh con la actividad FAc esterasa de la BChEh recombinante.	28

6.3. Interacción del DTNB con la actividad acetilcolinesterasa en colinesterasas humanas.	29
6.3.2. Interacción de diferentes concentraciones de DTNB en AChE.	32
6.4 Consideraciones finales.....	33
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.	34
7.1 Conclusiones	34
7.2 Proyecciones futuras.	34
8. BIBLIOGRAFÍA.....	35



0. RESUMEN

Se ha visto en trabajos previos que la acetiltiocolina (AtCh) a bajas concentraciones aumenta actividad fenilvalerato esterasa (PVasa) en acetilcolinesterasa recombinante humana (AChE) y se inhibe a altas concentraciones. Sin embargo, la actividad fenilacetato esterasa (FAc esterasa) es inhibida a bajas concentraciones de AtCh. La potenciación o inhibición de estas actividades son causadas por la tiocolina liberada en el sitio activo, donde AtCh podría actuar como un caballo de Troya. En este trabajo se han evaluado la actividad PVasa y FAc esterasa en presencia de AtCh con butirilcolinesterasa (BChE) recombinante humana en condiciones similares de ensayo. Los resultados muestran que no se observan interacciones de la AtCh con la actividad PVasa en dichas condiciones experimentales. Por otro lado, se ha visto que el DTNB, reactivo cromogénico utilizado para medir la actividad colinesterasa con colinesterasas en ensayos en continuo (sin detener la reacción), produce cierta inhibición de esta actividad. En este trabajo se han realizado experimentos a tiempo fijo (parando la reacción) para poder determinar la influencia del DTNB en la actividad colinesterasa con AChE y BChE humanas. Se ha observado que hay inhibición de la actividad colinesterasa por DTNB cuyos resultados sugieren que existe un mecanismo más complejo que una inhibición reversible simple en BChE mientras que se ha observado una inhibición leve con AChE que sugiere que la inhibición es reversible.

Palabras clave: fenilvalerato esterasa, fenilacetato esterasa, DTNB, acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BChE), inhibición reversible.

ABSTRACT

Previous studies have shown that acetylthiocholine (AtCh) at low concentrations increases phenyl valerate esterase (PVase) activity in recombinant human acetylcholinesterase (AChE) and is inhibited at high concentrations. However, phenylacetate esterase (FAc esterase) activity is inhibited at low concentrations of AtCh. The potentiation or inhibition of these activities is caused by the thiocholine released in the active site, where AtCh could act as a Trojan horse. In this work, PVase and FAc esterase activity have been evaluated in the presence of AtCh with recombinant human butyrylcholinesterase (BChE) under similar assay conditions. The results show that no

interactions of AtCh with PVase activity are observed under these experimental conditions. On the other hand, it has been observed that DTNB, the chromogenic reagent used to measure cholinesterase activity in continuous assays (without stopping the reaction), produces some inhibition of this activity. In this work, fixed-time experiments (stopping the reaction) have been carried out in order to determine the influence of DTNB on cholinesterase activity with human AChE and BChE. It has been observed that there is inhibition of cholinesterase activity by DTNB, and the results suggest a mechanism more complex than simple reversible inhibition in BChE, while a mild inhibition has been observed with AChE that suggests the inhibition is reversible.

Keywords: phenylvalerate esterase, phenylacetate esterase, DTNB, acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), reversible inhibition.

Abreviaturas:

- AAP: aminoantipirina
- AChE: acetilcolinesterasa
- ACh: acetilcolina
- AtCh: acetiltiocolina
- BChE: butirilcolinesterasa
- BChEh: butirilcolinesterasa humana
- BChEr: butirilcolinesterasa recombinante
- AChEr: acetilcolinesterasa recombinante
- BSA: albúmina de suero bovino
- DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
- FAc: fenilacetato
- Ac: acetato
- SDS: dodecilsulfato sódico
- OPs: organofosforados
- CbEs: carboxilesterasas
- PV: fenilvalerato
- PVasa: fenilvaleratoesterasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Carboxilesterasas.

Las carboxilesterasas (CbEs) son enzimas que forman parte del grupo de las esterasas, cuya función principal es catalizar la hidrólisis de ésteres carboxílicos. Existen diferentes tipos de estas enzimas, y Aldridge (1953) las clasificó según su interacción con los compuestos organofosforados (OPs):

- **A-esterasas:** Son capaces de hidrolizar tanto ésteres carboxílicos como OPs, sin que estos últimos ejerzan efecto inhibitorio.
- **B-esterasas:** Catalizan la hidrólisis de ésteres carboxílicos y son inhibidas de forma irreversible por los OPs.
- **C-esterasas:** No interactúan con los OPs de ninguna manera.

Las CbEs del tipo B actúan sobre los compuestos aciloésteres, realizando un ataque nucleofílico mediante el grupo -OH de la serina o tirosina, lo que da lugar a la formación de un enlace que será posteriormente hidrolizado por agua. Esta reacción se completa con la hidrólisis del grupo acetilo, lo que permite que la enzima se recupere y quede disponible para iniciar nuevamente el ciclo catalítico (Aldridge y Reiner, 1972; WHO, 1986a; Ballantyne y Mars, 1992). Dentro de este grupo se incluyen las colinesterasas.

1.1.1. Colinesterasas.

Las colinesterasas (ChEs) son enzimas serín hidrolasas, una familia de esterasas del tipo B-esterasas. Contienen un resto de serina en el sitio activo e hidrolizan ésteres de colina, tales como acetilcolina, butirilcolina, succinilcolina, entre otros

Existen dos tipos diferentes de colinesterasas en vertebrados: la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa (BChE), también conocida como pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o colinesterasa de suero. Se diferencian principalmente por su especificidad de sustrato (Kovarík et al., 2003). Mientras que se ha demostrado que la AChE cumple una función en la terminación

de la neurotransmisión colinérgica en la hendidura sináptica y neuromuscular, el papel fisiológico de la BChE no está completamente claro. Algunos estudios sugieren que la BChE podría estar involucrada en procesos de detoxificación, aunque su ausencia o bajos niveles en ciertos individuos aparentemente no tienen consecuencias (Lockridge, O. et al., 2005). La estructura de ambas enzimas se ilustra en las **Figuras 1.4 y 1.5**.



Figura 1.1: Estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa humana.

Imagen obtenida de Protein Data Base

(<http://www.rcsb.org/>)

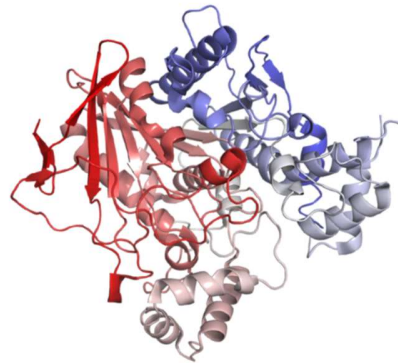


Figura 1.2: Estructura tridimensional de la butirilcolinesterasa humana.

Imagen obtenida de Protein Data Base

(<http://www.rcsb.org/>)

AChE y BChE 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 ARNm. El gen que codifica la BChE, aunque sea diferente, está estructuralmente relacionado con el de la AChE (Lockridge, 1987).

Los centros activos de las AChEs y de las BChEs son similares respecto al centro del éster, aunque las principales diferencias de especificidad entre AChE y BChE son el sitio catalítico, el subsitio de la colina sobre el centro activo y el sitio periférico regulatorio (Taylor y Rádic, 1994).

El sustrato natural de la AChE es la acetilcolina (un neurotransmisor), aunque también es capaz de hidrolizar butirilcolina, β -metiltiocolina, propionilcolina y a los análogos tiocolina de los tres

compuestos, igual que la BChE, aunque ésta última no actúa sobre la β -metiltiocolina (Repetto, 1995; Alles y Hawes, 1940), y sí con la butirilcolina, siendo 4 veces más rápida que con la acetilcolina (Massoulie et al, 1993 y 2005).

Otra forma de distinguir ambas enzimas es por sus inhibidores. La BChE 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 pero no de BChE. Además, AChE también experimenta un efecto de inhibición por exceso de sustrato (Rádics y Taylor, 2006), contrariamente a la BChE, que es activada por el mismo (Masson et al, 1993). Esta activación está mediada por la presencia, ya descrita, de dos sitios de unión para AtCh: el sitio catalítico y el periférico regulatorio. (Cauet G et al, 1987 y Mason et al, 1993).

1.2. Acetilcolina y acetiltiocolina como sustratos para AChE.

La AChE es capaz de hidrolizar tanto acetiltiocolina (AtCh) como acetilcolina (ACh), siendo ambas moléculas ejemplos de sustratos con carga positiva. La enzima es capaz de hidrolizar la ACh (**Figura 1.6 A**) a una velocidad muy alta, llegando a acercarse al límite superior permitido por la difusión del sustrato y la maquinaria catalítica de las enzimas de serina. A pesar de esto, la AtCh (**Figura 1.6 B**) es el sustrato habitualmente usado en estudios realizados con AChE, pues su grupo tiol permite la evaluación directa de los productos de reacción mediante técnicas espectrofotométricas.

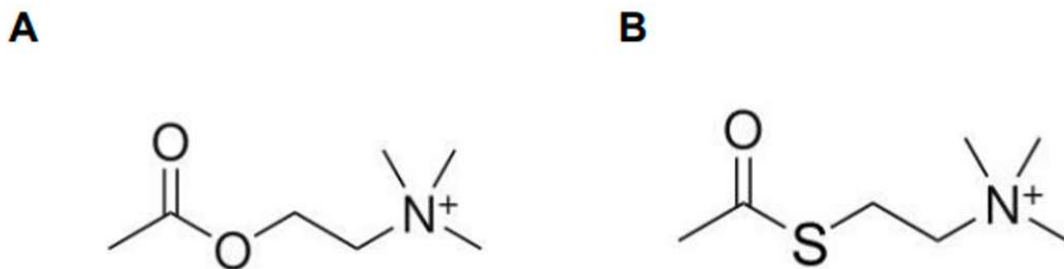


Figura1.6: estructuras químicas de la ACh (A) y la AtCh (B)

En un estudio microcalométrico realizado en 2017 por investigadores de la Universidad de Minas Gerais se concluyó que la hidrólisis de ambos sustratos por la AChE presentaba ligeras diferencias en las constantes, que eran debidas a interacciones distintas con la enzima, siendo más alta la constante correspondiente al sustrato natural, la ACh. Aunque el ensayo espectrofotométrico tradicional es más viable de utilizar, este trabajo muestra valores cinéticos comparables, aunque no idénticos, entre ACh y AtCh, haciendo que cualquier aproximación sea válida incluso acompañada de error (Alves de Almeida, 2017).

1.3. Fenilvalerato, fenilacetato y fenilvaleratoesterasas.

El fenilvalerato (**Figura 1.3**) ha sido el sustrato utilizado para la identificación y caracterización de la diana de neuropatía retardada (NTE; Johnson 1975; Chemnitius et al. 1983; Carrington y Abou-Donia 1984; Vilanova 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; 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 (Organophosphate-Induced Delayed Neuropathy)) y a su sensibilidad a mipafox (fosforamidato inductor de OPIDN).

Estudios recientes han descrito que la acetilcolinesterasa recombinante humana (hAChE) presenta actividad fenilvalerato esterasa (PVasa) para este sustrato (Terol, 2018; Estévez et al. 2022) y esta misma actividad fue identificada en BChE humana (Romo, 2017; Estévez et al., 2019).

El fenilacetato (FAc) (**Figura 1.4**) es un sustrato neutro que es usado comúnmente en ensayos cinéticos con hAChE (E. Reiner y V. Simeon, 1977)

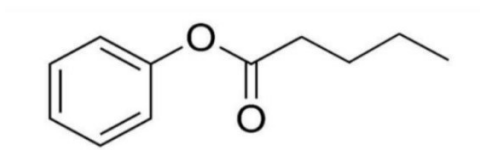


Figura 1.3: estructura química del fenilvalerato

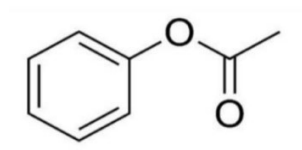


Figura 1.4: estructura química del fenilacetato

1.3.1. BChE como fenilvaleratoesterasa.

La butirilcolinesterasa humana purificada (hBChE) ha demostrado poseer actividad PVasa. Esta propiedad, observada previamente en modelos animales como el pollo, se confirmó también en humanos, donde la hBChE mostró una sensibilidad a inhibidores organofosforados (Romo, 2017; Estévez et al., 2019) comparable a la observada en su actividad colinesterasa (ChE) (Vellom et al., 1993; Radic et al., 1993).

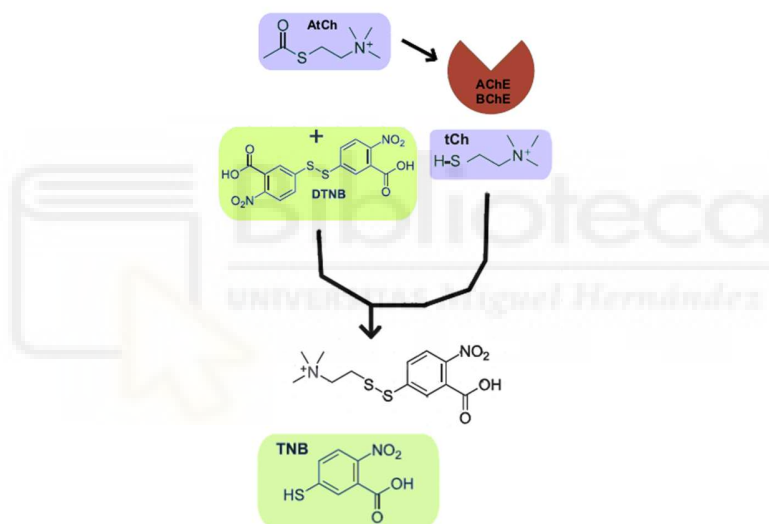
A nivel cinético, la interacción entre PV y AtCh no se ajustó a los modelos clásicos de competición entre sustratos, sino que a un modelo de inhibición reversible parcial mixta (Estévez et al., 2019). Además, los datos sugirieron la existencia de un sitio alternativo de unión para el PV —denominado "sitio PV"— en las proximidades del residuo Asn289, distinto del sitio catalítico convencional. Los estudios de modelado molecular y dinámica estructural apoyaron estas observaciones, mostrando que tanto PV como acetilcolina (ACh) pueden unirse tanto al sitio catalítico como al sitio PV con afinidades similares. Estos hallazgos apuntan a un mecanismo complejo de interacción sustrato-enzima, donde el PV puede actuar también como inhibidor no competitivo de la hidrólisis de ACh, destacando así la versatilidad funcional de la hBChE (Estévez et al., 2019).

1.4. El método de Ellman.

El método de Ellman es el ensayo más usado para medir la actividad colinesterasa debido a su bajo coste, su rapidez y su fiabilidad (Dingova et al., 2014). Lo particular de este método es que la

medición la realizamos en continuo mientras se da la reacción, lo que significa que el DTNB está presente junto con el sustrato y que en ningún momento se detiene la reacción.

Este método consiste en realizar un ensayo de 2 reacciones (**Figura 1.5**) en el que la primera reacción, la enzima con actividad colinesterasa (AChE o BChE) hidroliza el tioéster en un producto intermediario de tiocolina (TCh). A continuación, se produce la segunda reacción entre TCh y el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) en la que se obtiene un producto amarillento, el 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). La intensidad del color es proporcional a la concentración de ACh hidrolizada.



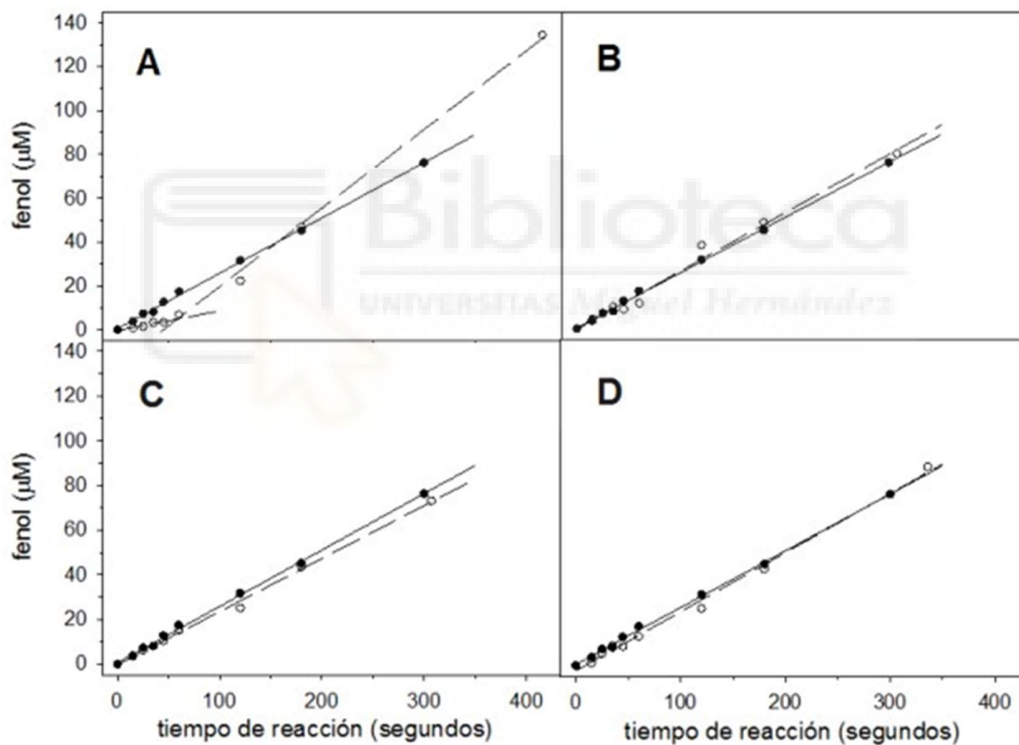
Método de Ellman

Figura 1.5: muestra el método de Ellman original. Tenemos en el medio el sustrato AtCh, junto con DTNB y la enzima (AChE ó BChE). Se produce la hidrólisis de la AtCh y se produce tCh, que reacciona con el DTNB generando como producto secundario el TNB. La intensidad del color producida por el TNB es proporcional al nivel de tCh generado.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Actividad PVasa en AChE.

Terol (2018) estudió la actividad PVasa en acetilcolinesterasa humana (hAChE) mediante ensayos de competición entre PV y AtCh. Uno de los resultados más relevantes de estos ensayos fue el observado en experimentos de actividad PVasa en presencia de AtCh a bajas concentraciones, pues se observó que, a partir de un tiempo teórico de inflexión en el que la AtCh era hidrolizada por completo, la actividad PVasa de la enzima se incrementaba, superando incluso la velocidad alcanzada por controles en ausencia de AtCh (**Figura 2.1**).



Se sugirió que la AtCh estaría actuando como un "caballo de Troya", al poder acceder fácilmente al centro activo y liberar tCh, que interactuaría dentro de este sitio activo para aumentar la actividad PVasa y se vio que la presencia de tCh no producía inhibición de actividad PVasa. Se abaló que la acetilcolina (ACh) interactúa con la actividad PVasa de forma similar a AtCh, pero en este caso, la colina (Ch) liberada al medio de reacción inhibe la actividad PVasa. Por tanto, los productos liberados en el sitio activo podrían desempeñar un papel importante en las reacciones de hidrólisis de distintos sustratos en sistemas biológicos.

2.2 Inhibición de la actividad FAc esterasa por presencia de tiocolina como producto de la reacción de hidrólisis de ATCh.

Estudios previos (Poveda, 2021; Ruz, 2023; Estévez 2025) han evidenciado que la hidrólisis de acetiltiocolina (a concentraciones muy bajas), puede inducir una ligera inhibición de la actividad fenilacetato-esterasa (FAc-esterasa) en la acetilcolinesterasa humana recombinante. Esta inhibición no parece deberse a la AtCh en sí misma, sino a uno de sus productos de hidrólisis, la tiocolina, cuya permanencia en el sitio activo podría interferir con la hidrólisis del fenilacetato. No obstante, la ausencia de efecto inhibitorio cuando la tiocolina se añade directamente al medio de reacción sugiere que dicha interacción solo se produce en un contexto dependiente de la hidrólisis de AtCh. Este fenómeno contrasta con lo descrito en la bibliografía, donde se observó un efecto activador de los productos de la hidrólisis de AtCh sobre la actividad fenilvalerato-esterasa (Terol, 2018; Ruz, 2023), lo que resalta la relevancia de la estructura del sustrato en la modulación enzimática.

2.3 Grupo cromóforo ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB).

El DTNB, también conocido como reactivo de Ellman es comúnmente utilizado para ensayos que miden la actividad colinesterasa (Ellman et al., 1961). Esto es debido a que este grupo cromóforo reacciona con los grupos sulfhidrilo dando lugar al anión TNB, que se puede cuantificar usando el coeficiente de extinción de TNB ($14.150 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm) (Thermo Fisher Scientific, s.f.)

Las limitaciones de este método radican en la sensibilidad del DTNB a la luz, la inestabilidad de este reactivo en disolución con el tiempo, el elevado ruido de fondo en muestras biológicas debido a la interacción con grupos sulfhidrilo (-SH) libres, y que este ensayo posee una baja sensibilidad de detección que nos impide detectar bajas actividades colinesterasa (Dingova et al., 2014).

Debido a estas limitaciones, Benabent et al., (2014) propusieron un nuevo tipo de ensayo modificado del método de Ellman, en el que la reacción con el sustrato estaba en ausencia de DTNB, la reacción se detenía y se añadía DTNB, obteniendo unos valores de actividad AChE mayores a los obtenidos mediante el método de Ellman original. La diferencia entre las actividades obtenidas fue explicada porque el DTNB interaccionaba con la proteína al encontrarse en el medio en el método de Ellman original.

En el estudio de Dingova et al., 2014 se observó que el DTNB interfería con la actividad BChE, causando una lectura errónea de los resultados cuando se trabaja con una baja actividad BChE durante largos periodos de tiempo. Se realizó un ensayo de Ellman para BChE humana purificada con butiriltiocolina y un nuevo ensayo de Ellman modificado en el que no se añadía el DTNB durante la reacción sino después, y también se evaluó la variación de la densidad óptica cuando el método de Ellman se realizaba a diferentes concentraciones de DTNB. Los resultados determinaron que para estudios en los que hay valores altos de actividad BChE no son significativos, sin embargo sí que deberían tenerse en cuenta para bajos valores de actividad BChE en los que hay un gran ruido de fondo, causando un efecto inhibitorio de la actividad BChE.

Además Pohanka et al., (2009) y Šinko et al.,(2007) realizaron estudios con oximas (compuestos usados como antídotos en intoxicaciones por exposición a organofosforados, que inhiben la actividad colinesterasa) para comprobar la fiabilidad del método de Ellman en estas situaciones y observaron que estos compuestos realizan un proceso de oximolisis al reaccionar con la AtCh, mediante el cual se forma tiocolina y de forma indirecta el ion TNB, dando lugar a mediciones erróneas de la actividad colinesterasa. Los resultados obtenidos determinaron que no es confiable emplear el método de Ellman cuando exista exposición a oximas ya que si la oximólisis ocurre más rápido que la propia reacción de Ellman (tiocolina + DTNB), se estará malinterpretando la cinética real del sistema.

3. OBJETIVOS

Objetivo general.

El objetivo general de este trabajo es determinar si hay interacción de la AtCh o tCh con la actividad PVasa y FAc esterasa de BChE recombinante humana tal como con AChE humana y estudiar la interacción del DTNB con BChE y AChE recombinantes humanas

Objetivos específicos.

- Comprobar si los productos de reacción de la AtCh interaccionan con la actividad PVasa de la BChE recombinante humana de manera similar a como lo hace con AChE recombinante humana.
- Comprobar si los productos de reacción de la AtCh interaccionan con la actividad FAc esterasa de la BChE recombinante humana de manera similar a como lo hace con AChE recombinante humana.
- Determinar el grado de inhibición del DTNB en la actividad acetilcolinesterasa en la BChE humana.
- Determinar el grado de inhibición del DTNB en la actividad acetilcolinesterasa en la AChE humana.
- Estudiar si la inhibición de DTNB en actividad acetilcolinesterasa de BChE es progresiva con el tiempo y por lo tanto irreversible o si no lo es y por lo tanto, reversible.
- Estudiar si la inhibición de DTNB en actividad acetilcolinesterasa de AChE es progresiva con el tiempo y por lo tanto irreversible o si no lo es y por lo tanto, reversible.

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. (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.

- **Tampón fosfato. Dihidrofosfato de sodio monohidratado 0,1 M, pH 7,4:** Se preparó disolviendo dihidrofosfato de sodio monohidratado en agua ultrapura (MQ). El pH se ajustó a 7,4 con NaOH concentrado y se conservó a temperatura ambiente.
- **Acetato sódico anhidro (CH_3COONa):** Se adquirió de Sigma-Aldrich S.A. Para su utilización, se preparó a la concentración requerida en función del ensayo realizado, en agua ultrapura.
- **Dodecilsulfato sódico (SDS) y 4-aminoantipirina (AAP):** Se adquirieron de grado analítico (PanReac). Se preparó una disolución de SDS al 2% y AAP a 10 mM en tampón Tris 50 mM/EDTA 1 mM a pH 8,0. Se conservó a temperatura ambiente en botella de topacio para evitar la degradación de la AAP, debido a su fotosensibilidad.
- **Dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB):** El SDS se adquirió de PanReac Química S.A. (Barcelona, España) y el DTNB de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Se preparó una disolución de SDS al 2% y DTNB a 6 mM en tampón fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM, pH 7,4, conservándose a temperatura ambiente en una botella de topacio para evitar la degradación del DTNB.
- **Fenilvalerato (PV):** Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA). Para los ensayos de actividad fenilvalerato esterasa se preparó una disolución concentrada de 300 mg/ml (1715,5 mM) en N,N-dimetilformamida (DMF) y se conservó en nevera a 4 °C, manteniéndose estable durante meses. Para su utilización como sustrato, se prepararon disoluciones con agua destilada inmediatamente antes del uso, a las concentraciones requeridas en cada ensayo, asegurando que el porcentaje final de DMF no superase el 1% para no alterar la actividad enzimática.
- **Ferricianuro potásico ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$):** Se adquirió de grado analítico (PanReac). Se preparó una disolución al 2% en agua destilada y se conservó a temperatura ambiente.

- **Yoduro de acetiltiocolina (AtCh):** Pureza superior al 98%. Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Para su uso como sustrato, se preparó inmediatamente antes de su utilización, a la concentración necesaria en función del ensayo realizado, utilizando agua ultrapura para minimizar su degradación por hidrólisis espontánea.
- **Yoduro de tiocolina:** Pureza superior al 95%. Se adquirió de BOC Sciences (USA). Para su utilización, se preparó a la concentración requerida en función del ensayo realizado, en agua ultrapura.
- **Fenilacetato (FAc):** Se adquirió de la empresa Panreac Química S.A. Se preparó una disolución en agua ultrapura a concentración 4mM a partir de un stock de FAc de concentración 1,7M en N,N-dimetilformamida (DMF) y en metanol.

4.2 Material biológico.

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.

- **Butirilcolinesterasa humana (hButChE) recombinante proveniente de células HEK293:** Se adquirió de BIOSYSTEMS ACRO. Se prepararon disoluciones en BSA 0,1 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 a la concentración deseada en cada experimento.
- **Acetilcolinesterasa humana recombinante proveniente de células HEK.** Adquirida de Prospe Protein Specialists. Para el ensayo se preparó una disolución en BSA 0,1% en tampón fosfato a concentración 0,2nM (0,1nM en volumen de reacción).

4.3 Equipos utilizados.

- **Termobloques de aluminio:** Con capacidad para 8 x 12 minitubos de 1mL y un controlador de temperatura electrónico.
- **Lector de placas:** Para la lectura fotométrica se utilizó el lector de placas AD 340 C (Beckman Coulter).

4.4 Microensayo de actividad colinesterasa.

Se utilizó el método descrito en Benavent et al. (2014), representado en la **Figura 4.1**, en el que se mezclaron 90 μ L de una solución de enzima a la concentración deseada (1), preparada en BSA al 1%, con 90 μ L de AtCh a la concentración correspondiente (2). Transcurrido el tiempo de reacción especificado en cada ensayo, se detuvo la reacción mediante la adición de 90 μ L de una disolución de SDS al 2% y DTNB a 6 mM (3). Posteriormente, se añadieron 90 μ L de BSA al 1% a las muestras, o bien 90 μ L de enzima en el caso de los controles (4). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 405 nm (5).

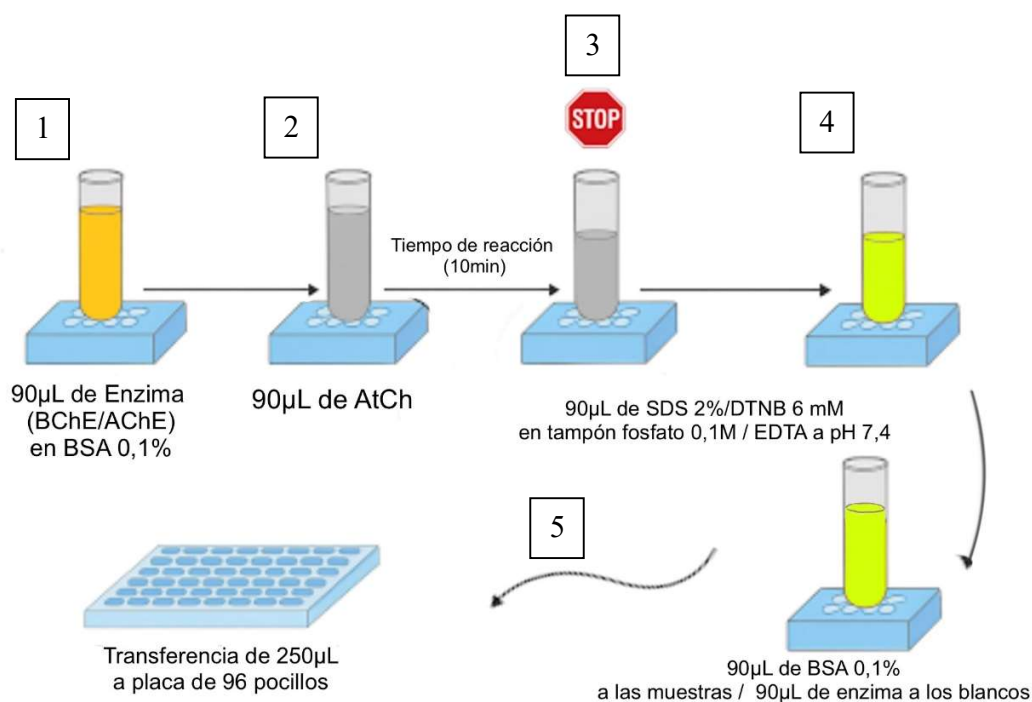


Figura 4.1: esquema del microensayo de actividad colinesterasa

4.5 Microensayo de actividad fenilvaleratoesterasa.

El método colorimétrico empleado se basa en la técnica de medición de fenol adaptada por Johnson (1977) para la actividad de NTE, posteriormente optimizada en el laboratorio (Escudero et al., 1997; Mangas et al., 2012a), se ha representado en la **Figura 4.2**.

Para el microensayo de actividad PVasa, en el primer paso se mezclaron 90 µL de una solución enzimática a la concentración deseada en BSA al 1% (1) con 90 µL de una disolución de sustrato (PV) (2), manteniéndose ambas soluciones a 37 °C en minitubos de plástico de 1 mL. Una vez transcurrido el tiempo de reacción establecido en cada experimento, la reacción se detuvo añadiendo 90 µL de una disolución de SDS al 2% y AAP a 10 mM (3). A continuación, se agregaron 45 µL de ferricianuro potásico a cada muestra y a los respectivos blancos (4). La absorbancia se registró a 510 nm (5).

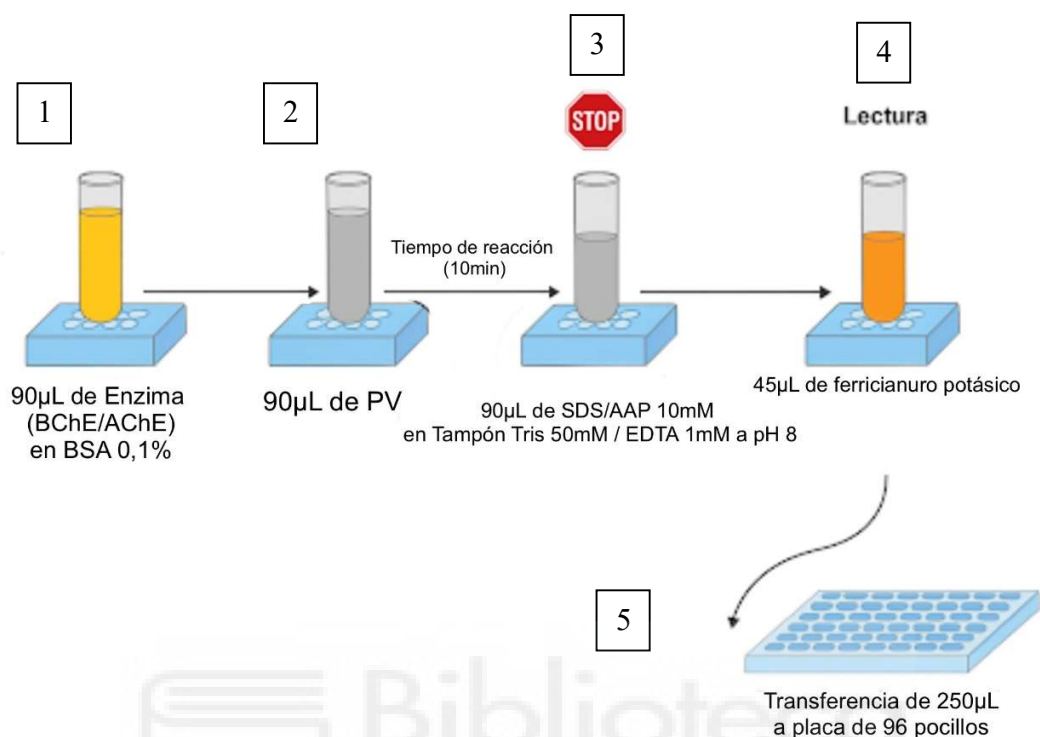


Figura 4.2: esquema del microensayo de actividad fenilvaleratoesterasa

4.6 Ensayo de inhibición de colinesterasas por DTNB.

Para este ensayo se preparó una disolución de BChE (1,42nM en volumen de reacción) o de AChE (0,1nM en volumen de reacción) en BSA al 0,1%.

Primero se incubaron 10µL de DTNB (1) a concentraciones ascendentes desde 0mM a 2,4mM en volumen de reacción (0, 0.00234375, 0.0046875, 0.009375, 0.01875, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4) en tampón fosfato (Tpi) a pH 7,4 (blancos igual, pero con Tpi a pH 7,4) con 90µL (3nM) de enzima durante 30 minutos dentro de los termobloques a 37°C en minitubos de 1mL (2). Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 90µL de AtCh a 2mM y se dejó transcurrir la reacción durante 10 minutos (3). Finalmente la reacción fue detenida con 90µL de SDS/DTNB 6mM (4). Para corregir la absorbancia debida a cualquier interacción que puedan tener los grupos tiol de la enzima con el DTNB, también se añadieron una vez parada la reacción, 90µL de BSA a

los minitubos que originalmente tenían enzima y se añadieron 90µL de enzima a los tubos blancos que solo contenían BSA (5). Se pasaron 250µL a microplaca y se midió la absorbancia a 405nm (6).

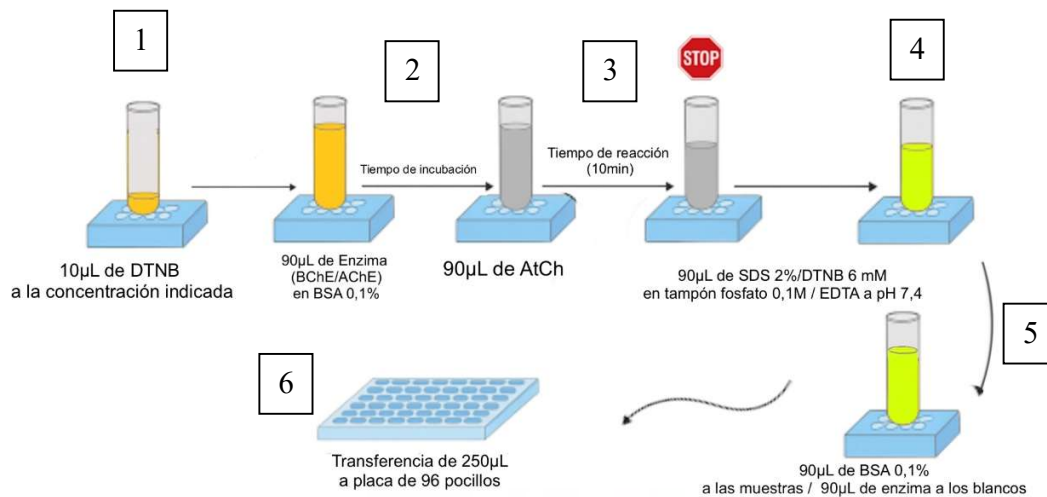


Figura 4.3: esquema del ensayo de inhibición de colinesterasas por DTNB

4.7 Ensayo de actividad Fenilacetato esterasa de BChE humana recombinante en presencia de AtCh o tCh.

Para este experimento se preparó una disolución de FAc (2mM), una disolución de AtCh a concentración 0,08mM y otra disolución de tCh a 0,08mM. Las concentraciones en volumen de reacción (180µL) son de 1mM para el FAc y de 0,02mM para la AtCh y la tCh. Primero se añaden 90µL de FAc (2mM) o 90µL de una mezcla de FAc (2mM) junto con AtCh o tCh (0,02mM) (1). Luego se añadieron 90µL de ButChE (BSA 0,1% para los blancos) (2) y se dejó reaccionar durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, la reacción fue detenida añadiendo 90µL de SDS AAP (3) y finalmente se añadieron 45µL de ferricianuro potásico (4). Para medir la actividad se transfirieron 250µL a una microplaca de 96 pocillos y se tomaron los valores de absorbancia a 510nm (Ver Figura 4.4).

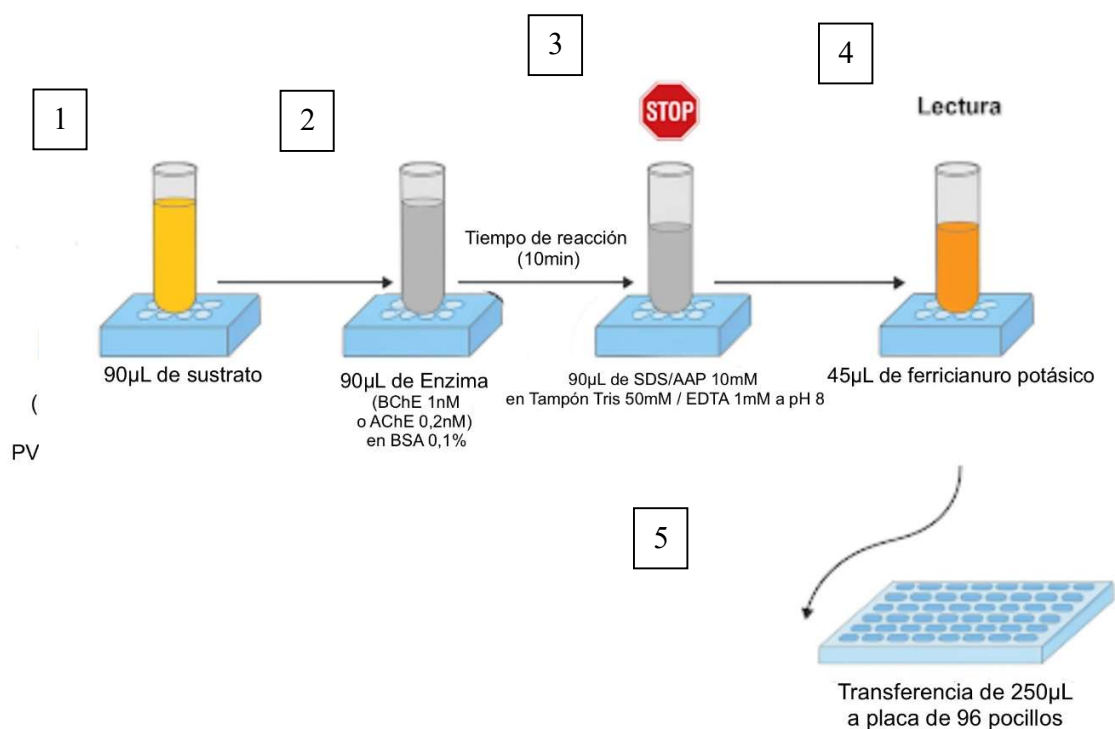


Figura 4.4: esquema del ensayo de actividad PVasa o FAc esterasa en presencia de otros sustratos.

4.8 Ensayo de actividad Fenilvalerato esterasa de BChE humana recombinante en presencia de AtCh o tCh o Acetato (Ac).

La BChE recombinante humana se preparó a una concentración de 0,5nM en volumen de reacción (disolución 1nM). Las concentraciones en volumen de reacción fueron de 3mM para PV y de 0,02mM para el producto correspondiente (AtCh, tCh o Ac).

En la **Figura 4.4** se representa un esquema el procedimiento, se prepararon 90µL de cada condición mezclando cada reactivo con la disolución de PV (1) y se les añadieron 90µL de BChE (BSA 0,1% en los blancos) (2) y se dejó reaccionar por un tiempo de reacción de 15 minutos. Transcurrido este tiempo, la reacción fue detenida añadiendo 90µL de SDS AAP (3) y finalmente se añadieron 45µL de ferricianuro potásico (4). Para medir la actividad se transfirieron 250µL a una microplaca de 96 pocillos y se tomaron los valores de absorbancia a 510nm.

5. RESULTADOS

5.1 Interacción del fenilvalerato en presencia de AtCh, tCh o acetato (Ac) en la actividad fenilvaleratoesterasa de la BChEh recombinante.

En la **Figura 5.1** se muestran los resultados obtenidos de uno de los ensayos de actividad fenilvalerato esterasa de BChE humana recombinante en presencia de AtCh, tCh o Ac de un total de tres experimentos independientes.

Se puede observar una ligera variación cuando el PV se encuentra en presencia de AtCh en comparación con el control (PV). No se obtuvieron diferencias significativas de la actividad PVasa en las distintas condiciones.

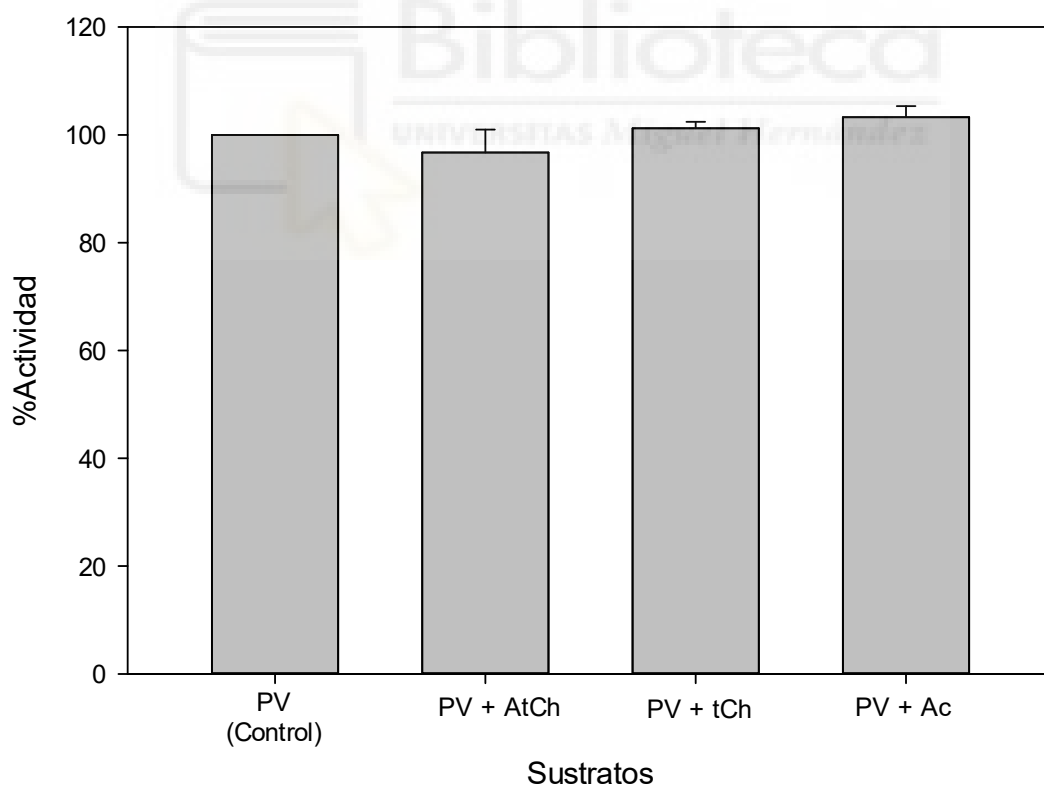


Figura 5.1: Ensayo de actividad PVasa de BChE en presencia de AtCh, tCh o Ac: se comparó la actividad PVasa obtenida tras incubar durante 10 minutos con AtCh, tCh y Ac (todos 0,02mM en volumen de reacción) Se tomó como control la reacción que

solo tenía PV como sustrato y se tomó su valor como referencia (100%) para el cálculo de los porcentajes. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida de las muestras. (n = 3)

5.2 Interacción del fenilacetato con AtCh y tCh en la actividad FAc-esterasa de la BChEh recombinante.

Se evaluó el efecto del fenilacetato (FAc) sobre la actividad FAc-esterasa de la BChEh recombinante en presencia de los compuestos acetiltiocolina (AtCh) y tiocolina (tCh). En la **Figura 5.2**, se observó que se alcanzaron niveles de actividad muy cercanos al 100% para las condiciones ensayadas y que la variabilidad fue <2%.

No se obtuvieron diferencias significativas de actividad respecto al control.

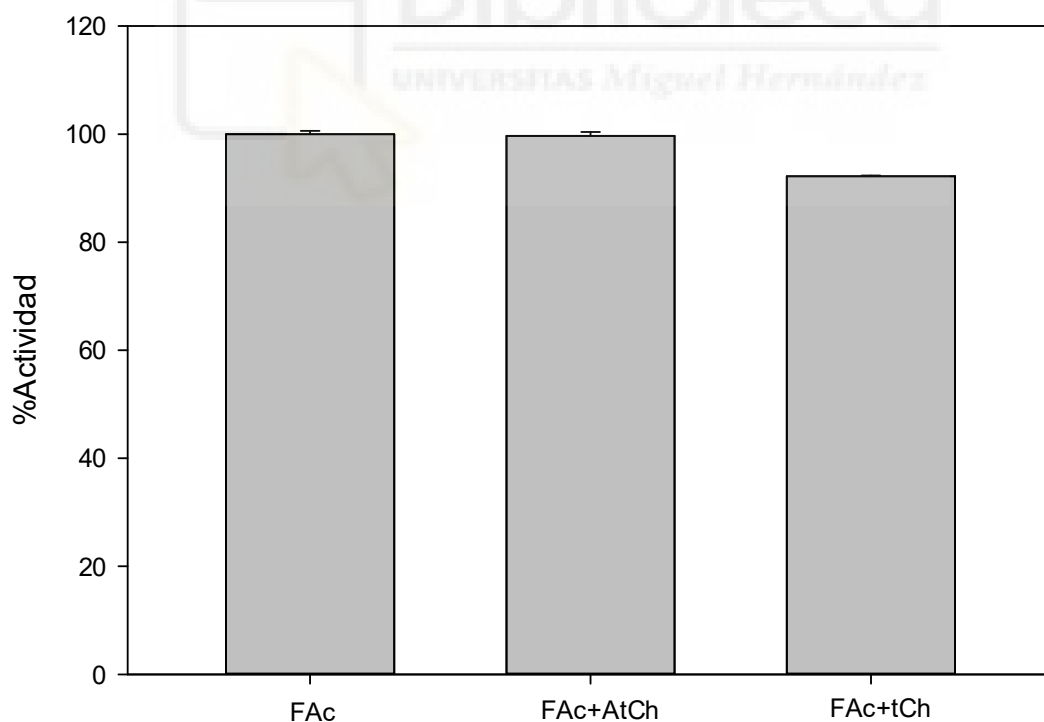


Figura 5.2: Ensayo de actividad FAc-esterasa con AtCh/tCh ([BChE] de 0,5nM). Se comparó la actividad FAc-esterasa observadas tras incubar FAc (1mM en volumen de reacción) junto con AtCh o tCh (0,02mM

en volumen de reacción) Se tomó como control el valor de observancia obtenido en la reacción que únicamente contenía FAc como sustrato (100%) para el cálculo de los porcentajes. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida. (n = 3)

5.3 Interacción del grupo cromóforo DTNB a diferentes concentraciones con la actividad acetilcolinesterasa de la BChEh recombinante.

En la **Figura 5.3** se muestran los resultados de uno de un total de tres ensayos independientes.

Se muestra una disminución progresiva de la actividad acetilcolinesterasa conforme aumenta la concentración de DTNB, llegando a un mínimo de actividad de alrededor del 70%.

Como se observa en el panel **A** de la **Figura 5.3**, el mínimo de actividad se alcanza a una concentración de alrededor de 0,5 mM de DTNB.

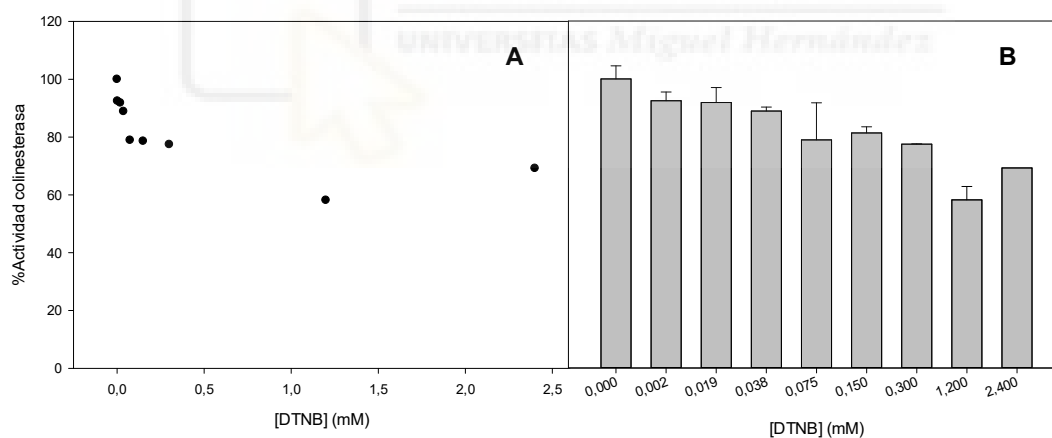


Figura 5.3: Ensayo de actividad colinesterasa en BChE con distintas concentraciones de DTNB a 30 minutos. La actividad colinesterasa está referida a la obtenida sin presencia de DTNB. Las barras de error del panel **B** representan la desviación estándar obtenida. (n = 3)

5.4 Interacción del DTNB con la actividad acetilcolinesterasa en función del tiempo.

La **Figura 5.4** muestra los resultados de uno de los experimentos realizados de un total de tres experimentos independientes.

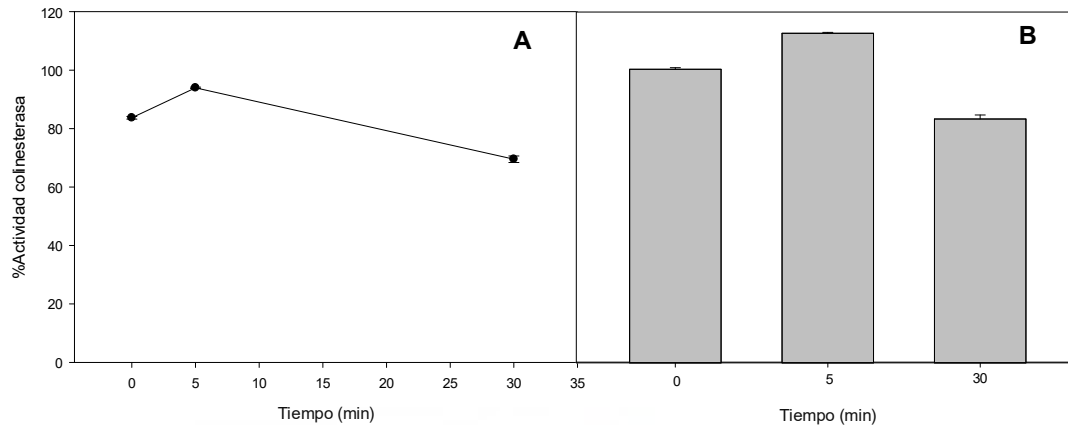


Figura 5.4: Ensayo de actividad acetilcolinesterasa en BChE, incubación con DTNB (2,4mM en volumen de reacción) a distintos tiempos. Valores obtenidos de la actividad colinesterasa en BChEh recombinante (0,5nM en volumen de reacción) cuando la enzima se incubó con DTNB 2,4mM en volumen de reacción a tiempos de 0, 5 y 30 minutos. Se tomó como referencia para el cálculo de los porcentajes la actividad obtenida sin DTNB. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida. (n = 3)

Tal como se observa, hay una variación de la actividad acetilcolinesterasa progresiva con el tiempo, hay una inhibición cuando el sustrato se encuentra en presencia de DTNB (tiempo de incubación con BChE de 0 minutos), hay un incremento de actividad (respecto al tiempo de 0 minutos de incubación) a los 5 minutos de incubación y hay una inhibición progresiva hasta alcanzar un 70% de actividad para una incubación de 30 minutos.

5.5 Interacción del DTNB en la actividad acetilcolinesterasa con AChE recombinante a distintos tiempos.

La **Figura 5.5** muestra los resultados de uno de un total de cuatro experimentos independientes.

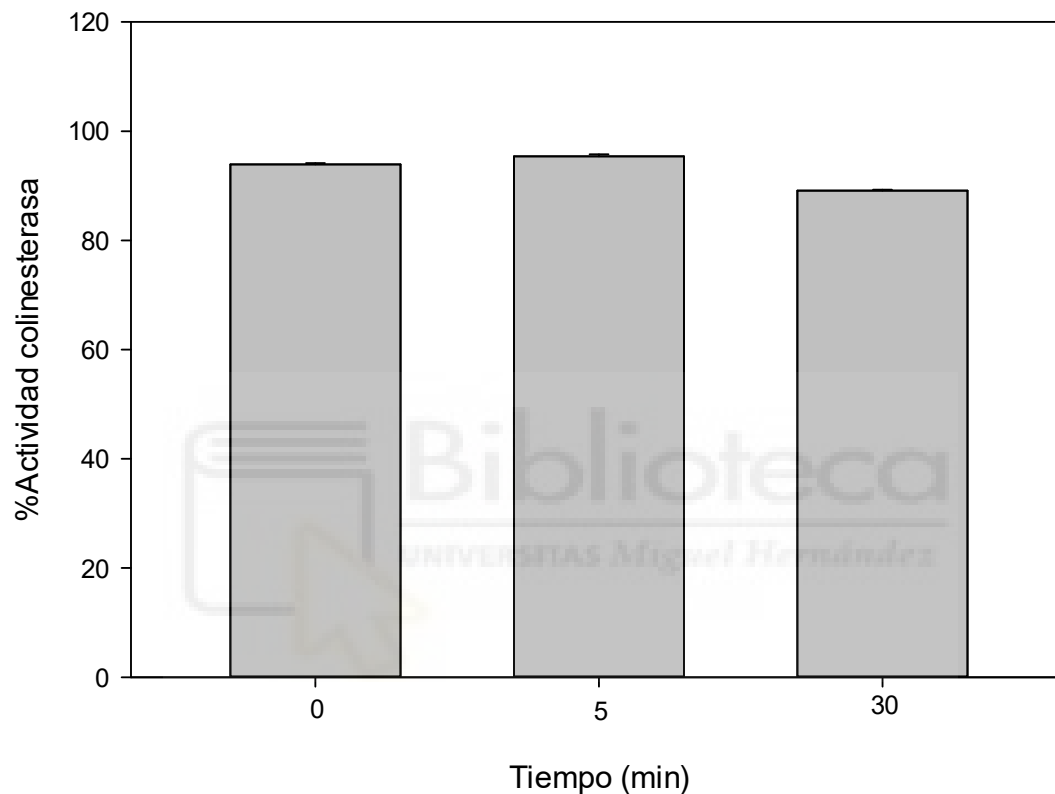


Figura 5.5: Ensayo de actividad acetilcolinesterasa en AChE, incubación con DTNB (2,4mM en volumen de reacción) a distintos tiempos. Se muestra la gráfica de los valores obtenidos de la actividad colinesterasa en AChEh (0,1nM en volumen de reacción) cuando el sustrato se incubó con DTNB 2,4mM en volumen de reacción a tiempos de 0, 5 y 30 minutos. Se tomó como control de referencia para el cálculo de los porcentajes la actividad obtenida sin DTNB para cada tiempo. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida. (n = 4)

Como se muestra en la **Figura 5.5**, se observó una ligera inhibición llegando a valores de un 90% de actividad acetilcolinesterasa tras una incubación con DTNB durante 30 minutos. Los resultados sugieren que la inhibición no es progresiva con el tiempo.

6. DISCUSIÓN.

6.1. Interacción de la AtCh con la actividad PVasa de la BChEh recombinante.

En trabajos anteriores se ha descrito un aumento en la actividad PVasa de la hrAChE pretratada con AtCh (Terol, 2018; Estévez et al., 2022). Se vio que la actividad PVasa en presencia de AtCh a bajas concentraciones, se incrementaba, superando incluso la velocidad alcanzada por controles en ausencia de AtCh (ver **Figura 2.1**), a partir de un tiempo teórico de inflexión en el que la AtCh era hidrolizada por completo. Con el fin de mostrar si este mismo efecto ocurre en otras colinesterasas, se estudió con BChE bajo condiciones experimentales similares.

Los resultados muestran que hay una ligera variación cuando el PV se encuentra en presencia de AtCh (ver **Figura 5.1**), esta ligera disminución en la actividad en la condición con AtCh en comparación con el control (PV) puede deberse a la variabilidad experimental. Por tanto, la BChE no sufriría aumento de la actividad PVasa en estas condiciones experimentales.

Este trabajo demuestra que el efecto del incremento de la actividad PVasa a bajas concentraciones de AtCh no ocurre con todas las colinesterasas. No es descartable que a otras concentraciones de AtCh o que en presencia de otros sustratos la alteración de la actividad PVasa se pueda observar en BChE.

6.2. Interacción de la AtCh con la actividad FAc esterasa de la BChEh recombinante.

En estudios anteriores se ha descrito una alteración de la actividad FAc esterasa de la hrAChE pretratada con AtCh (Poveda, 2021; Ruz, 2023; Estévez 2025). Se vio que la actividad FAc esterasa en presencia de bajas concentraciones de AtCh, a partir de un punto teórico de inflexión, se producía una ligera inhibición de la actividad. Además, se observó que la inhibición de actividad FAc esterasa se producía cuando se eliminaba la AtCh del medio. (Ver **Figura 6.1**).

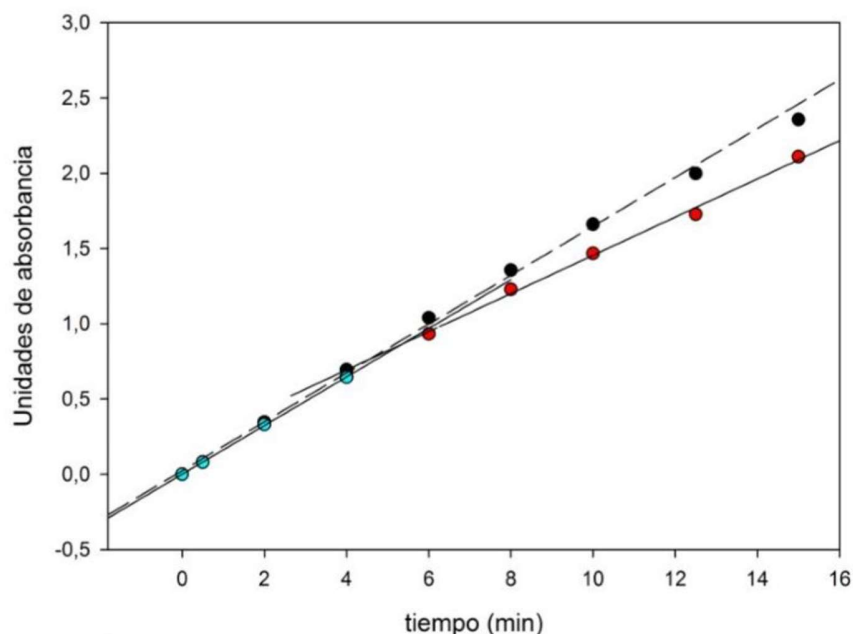


Figura 6.1 (Ruz, 2023): Actividad FAc esterasa de hAChE en ausencia de AtCh (puntos negros) y en presencia de 0,02 mM de AtCh (puntos azules y rojos). La recta discontinua es la línea de tendencia asociada a los puntos negros, la recta de puntos azules es la línea de tendencia asociada a los cuatro primeros tiempos de la mezcla de sustratos (0, 0,5, 2 Y 4 min) y la recta de los puntos rojos está asociada a los cinco últimos tiempos de este mismo ensayo (6, 8, 10, 12 y 15 min). El tiempo teórico de inflexión es el punto de corte entre las rectas, se corresponde con el tiempo donde se ha hidrolizado toda la tiocolina.

Con el fin de mostrar si este mismo efecto se produce en otras colinesterasas se realizó un experimento similar en BChE (ver **Figura 5.2**) donde se alcanzaron niveles de actividad muy cercanos al 100%, aunque podemos ver una disminución de la actividad <8% en la condición con FAc + tCh, esta puede deberse a la variabilidad experimental.

Teniendo en cuenta los resultados como un conjunto se puede considerar que no hay alteración de la actividad FAc esterasa en presencia de AtCh a bajas concentraciones. (Ver **Figura 5.2**).

6.3. Interacción del DTNB con la actividad acetilcolinesterasa en colinesterasas humanas.

El DTNB o ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) es un reactivo cromogénico que reacciona con grupos sulfhidrilo para producir un producto coloreado (TNB^-) que proporciona un método fiable

para medir cisteínas reducidas y otros sulfhidrilos libres en solución (Thermo Fisher Scientific, s.f.). También es conocido como reactivo de Ellman debido a su uso en el método de Ellman (ver **Figura 1.5**), siendo el más utilizado para realizar ensayos en continuo para medir actividad colinesterasa.

Tal como se vio en el estudio realizado por Dingova et al. (2014), el DTNB puede interferir en la actividad de la butirilcolinesterasa (BChE), generando lecturas erróneas en los resultados cuando se trabaja con niveles bajos de actividad en periodos prolongados. Con el objetivo de observar como afecta la adición de DTNB a la actividad colinesterasa, estos autores compararon la actividad obtenida mediante el método de Ellman (la tiocolina se hidroliza y se mide sin detener la reacción) con una variante del método en el que el DTNB se añadía una vez detenida la reacción. Los resultados obtenidos indicaron que, en condiciones de alta actividad enzimática, esta interferencia no resulta significativa; no obstante, en situaciones de baja actividad BChE, el ruido de fondo generado puede inducir un efecto inhibitorio apreciable sobre la actividad medida, por lo que es un factor que debe considerarse en este tipo de ensayos. Se observó que en el ensayo de Ellman, el uso del DTNB, presenta el inconveniente de interactuar con los grupos sulfhidrilo libres presentes en la muestra y puede afectar la actividad de las colinesterasas.

En este trabajo se ha utilizado un método de punto final (Benavent et al, 2014) para la medida de la actividad colinesterasa, en este método, el sustrato estaba en ausencia de DTNB, la reacción se detenía y se añadía DTNB, obteniendo unos valores de actividad AChE mayores a los obtenidos mediante el método de Ellman original. La diferencia entre las actividades obtenidas fue explicada porque el DTNB interactuaba con la proteína al encontrarse en el medio en el método de Ellman original. Por tanto, el método usado en este trabajo permite estudiar la interacción del DTNB con la enzima.

6.3.1. Interacción de diferentes concentraciones de DTNB en BChE.

6.3.1.1. Ensayos a diferentes concentraciones de DTNB

Los resultados obtenidos de los ensayos de interacción del grupo cromóforo DTNB a diferentes

concentraciones con la actividad acetilcolinesterasa de la BChEh recombinante sugieren que se produce una inhibición dependiente de la concentración de DTNB (ver **Figura 5.3**) hasta llegar a un 70% de la actividad colinesterasa para la concentración más alta de DTNB (2,4mM en volumen de reacción), aunque podemos observar los efectos de esta interacción a partir de una concentración de 0,5mM de DTNB (en volumen de reacción) alcanzando niveles de actividad del 80%.

Hay una variación de la actividad colinesterasa a partir de una concentración 0,5mM de DTNB hasta la máxima concentración, esta variación solo es de un 10%, demostrando que, a partir de 0,5mM ya se está alcanzando la máxima inhibición por DTNB.

En estudios anteriores (Dingova et al, 2014) se observó una inhibición de la actividad colinesterasa en BChE que determinaron que fue específica de especie, porque dicha inhibición fue observada en la BChE humana y de ratón, pero no en la de rata ni en la de perro. Esta inhibición fue explicada realizando un alineamiento de secuencias en el que se vieron diferencias en la secuencia aminoacídica entre especies. Los autores dedujeron que, debido a la variación de determinados residuos, se producía una interacción con el DTNB que impedía la entrada de sustrato.

6.3.1.2. Alteración progresiva con el tiempo de la actividad acetilcolinesterasa con DTNB.

Como se ha visto en los experimentos de actividad colinesterasa en función del tiempo en presencia de DTNB, existe una alteración progresiva dependiente del tiempo (ver **Figura 5.4**) a tiempo 0 minutos (no hay tiempo de incubación con DTNB con la enzima) se observa una inhibición de un 20% de actividad colinesterasa respecto al control sin DTNB, esta inhibición se podría explicar porque es la inhibición que se produce en el tiempo de reacción enzima-sustrato (10 minutos) (ver **Materiales y métodos 4.4.**). En el tiempo de 5 minutos de incubación se observa un ligero incremento de la actividad acetilcolinesterasa. Las observaciones sugieren que posiblemente el mecanismo de reacción sea más complejo que una simple inhibición reversible por una sustancia: En una primera etapa (ver I en **Figura 6.1**), el DTNB podría inhibir la actividad enzimática de manera reversible, posteriormente es posible que su degradación enzimática o química interfiera explicando la recuperación parcial de actividad (ver II en **Figura 6.1**) y en una tercera etapa los

productos de degradación del DTNB produzcan de nuevo la inhibición de la actividad (ver III en **Figura 6.1**).

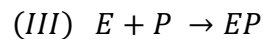


Figura 6.1: Posibles reacciones compatibles que explicarían los resultados obtenidos de inhibición progresiva con el tiempo, donde E se refiere a la enzima, P al producto y EP a un complejo formado por ambos. (K_i hace referencia a la constante de inhibición reversible)

Los resultados de este trabajo demuestran que la interacción del DTNB con BChE no es tan sencilla como una inhibición reversible simple. Nuevos estudios cinéticos más complejos deben realizarse para estudiar el comportamiento cinético del DTNB en función del tiempo.

6.3.2. Interacción de diferentes concentraciones de DTNB en AChE.

En este trabajo se ha estudiado si el DTNB produce algún tipo de interacción con la actividad colinesterasa en AChE.

En los resultados obtenidos (ver **Figura 5.5**) se observó una inhibición de alrededor del 10% en la actividad acetilcolinesterasa, no siendo una inhibición tan significativa como en BChE. La alteración no es progresiva con el tiempo, por tanto, se trataría de una inhibición reversible.

Los resultados de este trabajo sugieren que el DTNB interacciona de manera diferente dependiendo de la colinesterasa.

6.4 Consideraciones finales.

Los resultados de este trabajo demuestran que la presencia de AtCh a bajas concentraciones no modifica significativamente la actividad PVasa ni FAc esterasa de BChE humana recombinante, lo que sugiere que la acetiltiocolina no interactúa con BChE de la misma manera que con AChE o que esta interacción no es apreciable en condiciones experimentales similares. Posteriores estudios deben realizarse alterando las condiciones experimentales de butirilcolina o acetilcolina para asegurarse de que no hay interacción con ninguno de los productos de estos sustratos tal como ocurre con la BChE recombinante humana.

Este trabajo también ha demostrado que hay una interacción de DTNB (grupo cromogénico utilizado de manera estándar para evaluar la actividad colinesterasa de diferentes colinesterasas) principalmente con BChE y en menor grado con AChE humanas apoyando los resultados que se han obtenido en la bibliografía. En principio, este tipo de interacción es más compleja que una inhibición reversible para BChE y es reversible para AChE. Los resultados de este trabajo también demuestran que no es conveniente utilizar DTNB como cromóforo junto con el sustrato en ensayos de actividad en continuo, ya que el DTNB puede alterar las reacciones con inhibidores, sustrato o indeterminadas. Se aconseja utilizar un método de punto final, es decir, un método donde se pare la reacción y se añada el DTNB como grupo cromóforo para poder medir la actividad colinesterasa de colinesterasas tal como se describe en Benavent et al. 2014, ya que el DTNB no interaccionaría con la reacción enzimática.

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.

7.1 Conclusiones

- El producto de la AtCh no interacciona con la actividad PVasa en BChEr humana en las mismas condiciones de ensayo utilizadas con AChEr humana.
- El producto de la AtCh no interacciona con la actividad FAc esterasa en BChEr humana en las mismas condiciones de ensayo utilizadas con AChEr humana.
- El DTNB interacciona con la actividad acetilcolinesterasa de la BChE humana alcanzando un máximo de inhibición de alrededor de un 20% a la concentración máxima ensayada en este trabajo.
- El DTNB interaccionó con la actividad acetilcolinesterasa de la AChE humana alcanzando un máximo de inhibición de un 10% a la concentración usada en este trabajo.
- El mecanismo de interacción de DTNB con BChE puede ser más complejo que una inhibición reversible pudiendo estar implicados otras reacciones con productos de reacción del DTNB.
- Una inhibición reversible es compatible con la interacción del DTNB con AChE.
- No es aconsejable utilizar el método Ellman en continuo.

7.2 Proyecciones futuras.

- Estudiar BChE recombinante humana con otras concentraciones AtCh o ACh además de utilizar otros sustratos para ver si la hidrólisis se modifica.

- Realizar experimentos más complejos con DTNB y colinesterasas eliminando el DTNB del medio una vez transcurrido un tiempo de incubación para determinar si existe reversibilidad en ausencia de DTNB.
- Realizar experimentos con productos de reacción con el DTNB y tCh para determinar si estos productos tienen interaccionan con las colinesterasas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aldridge, W. N. (1953). Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, 53(1), 110–117.
- Aldridge, W. N., & Reiner, E. (1972). Acylated amino acids in inhibited B-esterases. In A. Neuberger & E. L. Tatum (Eds.), *Enzyme inhibitors as substrates* (pp. 170–175). North-Holland Publishing Company.
- Benabent, M. (2014). Carboxilesterasas y colinesterasas de cerebro de pollo: Interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos (Tesis doctoral). Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Benabent, M., Vilanova, E., Mangas, I., Sogorb, M. Á., & Estévez, J. (2014). Interaction between substrates suggests a relationship between organophosphorus-sensitive phenylvalerate- and acetylcholine-hydrolyzing activities in chicken brain. *Toxicology Letters*, 230(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.004>
- Bourne, Y., Taylor, P., & Marchot, P. (1995). Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: Crystal structure of the complex. *Cell*, 83(3), 503–512. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90128-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90128-0)
- Carrington, C. D., & Abou-Donia, M. B. (1984). The correlation between the recovery rate of neurotoxic esterase activity and sensitivity to organophosphorus-induced delayed neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 75(2), 350–357.
- Cauet, G., Friboulet, A., & Thomas, D. (1987). *Biochemical Cell Biology*, 65.

- Céspedes, M. V., Escudero, M. A., Barril, J., Sogorb, M. A., Vicedo, J. L., & Vilanova, E. (1997). Discrimination of carboxylesterases of chicken neural tissue by inhibition with neuropathic and non-neuropathic organophosphorus compounds and neuropathy promoter. *Chemico-Biological Interactions*, 106(3), 191–200. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00072-6)
- Chemnitius, J. M., Haselmeyer, K. H., & Zech, R. (1983). Neurotoxic esterase: Identification of two isoenzymes in hen brain. *Archives of Toxicology*, 53(3), 235–244. <https://doi.org/10.1007/BF00349148>
- Dingova, D., Leroy, J., Check, A., Garaj, V., Krejci, E., & Hrabovska, A. (2014). Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Analytical Biochemistry*, 462, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.031>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Escudero, M. A., & Vilanova, E. (1997). Purification and characterisation of naturally soluble neuropathy target esterase from chicken sciatic nerve by HPLC and Western blot. *Journal of Neurochemistry*, 69(5), 1975–1982. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69051975.x>
- Estévez, J., García-Pérez, A. G., Barril, J., & Vilanova, E. (2004). The inhibition of the high sensitive peripheral nerve soluble esterases by mipafox. *Toxicology Letters*, 151(1), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.02.012>
- Estévez, J., & 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), 427–448. <https://doi.org/10.1080/10408440902814023>
- 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. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1–3), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.02.018>

- Estévez, J., García-Pérez, A., Barril, J., & Vilanova, E. (2011). Inhibition with spontaneous reactivation of carboxyl esterases by organophosphorus compounds: Paraoxon as a model. *Chemical Research in Toxicology*, 24(1), 135–143. <https://doi.org/10.1021/tx1002687>
- Estévez, J., Barril, J., & Vilanova, E. (2012). Kinetics of inhibition of soluble peripheral nerve esterases by PMSF: A non-stable compound that potentiates the organophosphorus-induced delayed neurotoxicity. *Archives of Toxicology*, 86(5), 767–777. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0783-7>
- Estévez, J., Terol, M., Sogorb, M. Á., & Vilanova, E. (2022). Interactions of human acetylcholinesterase with phenyl valerate and acetylthiocholine: Thiocholine as an enhancer of phenyl valerate esterase activity. *Chemico-Biological Interactions*, 351, 109764. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109764>
- Estévez, J., Poveda, M. A., Ruz, P., Benalal, C. A., Gordo, G., Estevan, C., Sogorb, M. Á., & Vilanova, E. (2025). Las modificaciones permanentes en la acetilcolinesterasa humana por acetiltiocolina o acetilcolina modifican la hidrólisis de sustratos neutros: acetato de fenilo y valerato de fenilo como ejemplos. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2025.110984>
- Glynn, P., Read, D. J., Guo, R., Wylie, S., & Johnson, M. K. (1994). Synthesis and characterization of a biotinylated organophosphorus ester for detection and affinity purification of a brain serine esterase: Neuropathy target esterase. *Biochemical Journal*, 301(2), 551–556.
- Glynn, P., Holton, J. L., Nolan, C. C., Read, D. J., Brown, L., Hubbard, A., & Cavanagh, J. B. (1998). Neuropathy target esterase: Immunolocalization to neuronal cell bodies and axons. *Neuroscience*, 83(1), 295–302.
- Johnson, M. K. (1969). A phosphorylation site in brain and delayed neurotoxic effects of some organophosphorus compounds. *Biochemical Journal*, 111, 487–495.
- Johnson, M. K. (1975). The delayed neuropathy caused by some organophosphorous esters: Mechanism and challenge. *Critical Reviews in Toxicology*, 3, 289–316.
- Johnson, M. K. (1977). Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. *Archives of Toxicology*, 37(2), 113–115.

- Kovarik, Z., Radić, Z., Berman, H. A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., & Taylor, P. (2003). Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochemical Journal*, 373(1), 33–40. <https://doi.org/10.1042/BJ20021862>
- Kovarik, Z., Ciban, N., Radić, Z., Simeon-Rudolf, V., & Taylor, P. (2006). Active site mutant acetylcholinesterase interactions with 2-PAM, HI-6, and DDVP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(3), 973–978. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.056>
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E. G., Masson, P., & Lockridge, O. (2005). Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, 70(11), 1673–1684. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.09.002>
- Lockridge, O., Bartels, C. F., Vaughan, T. A., Wong, C. K., Norton, S. E., & Johnson, L. L. (1987). Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(2), 549–557.
- Mangas, I., Vilanova, E., & Estévez, J. (2012). NTE and non-NTE esterases in brain membrane: Kinetic characterization with organophosphates. *Toxicology*, 297, 17–25.
- Massoulié, J., Bon, S., Perrier, N., & Falasca, C. (2005). The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chemico-Biological Interactions*, 157–158, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.002>
- Pohanka, M., Hrabínová, M., Kuca, K., & Cerný, J.-P. (2009). Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 2869–2879. <https://doi.org/10.3390/ijms10072869>
- Poveda Sebastián, M. A. (2021). Interacción de la acetiltiocolina en la actividad fenilacetato esterasa de la acetilcolinesterasa humana (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Miguel Hernández de Elche. <https://dspace.umh.es/handle/11000/6536>
- Radić, Z., Pickering, N. A., Vellom, D. C., Camp, S., & Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and

butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32(45), 12074–12084. <https://doi.org/10.1021/bi00096a018>

- Reiner, E., & Simeon, V. (1977). Competition between substrates for acetylcholinesterase and cholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 480(1), 137–142. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(77\)90328-x](https://doi.org/10.1016/0005-2744(77)90328-x)
- Repetto, M. (1995). Toxicología básica. Díaz de Santos.
- Romo Ibáñez, M. (2017). Actividad fenilvalerato esterasa en la butirilcolinesterasa humana (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Miguel Hernández de Elche. <https://dspace.umh.es/handle/11000/4144>
- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., et al. (1986). Estructura primaria de la acetilcolinesterasa de Torpedo californica deducida a partir de su secuencia de ADNc. *Nature*, 319, 407–409. <https://doi.org/10.1038/319407a0>
- Šinko, G., Čalić, M., Bosak, A., & Kovarik, Z. (2007). Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical Biochemistry*, 370(2), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.07.004>
- Taylor, P., & Radić, Z. (1994). The cholinesterases: From genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34, 281–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.34.040194.001433>
- Terol, M. (2022). Actividad fenilvalerato esterasa en la acetilcolinesterasa humana recombinante (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Terol González, M. (2018). Actividad fenilvalerato esterasa en la acetilcolinesterasa humana recombinante (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Miguel Hernández de Elche. <https://dspace.umh.es/handle/11000/6536>
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/22582>
- Vellom, D. C., Radić, Z., Li, Y., Pickering, N. A., Camp, S., & Taylor, P. (1993). Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 32(1), 12–17. <https://doi.org/10.1021/bi00052a003>