



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

Grado en Biotecnología

Curso 2024/2025

**Instituto de Bioingeniería, Área de Toxicología**

Trabajo de Fin de Grado



**Interacción de acetilcolina en la actividad fenilvalerato  
esterasa de la acetilcolinesterasa humana recombinante e  
inhibición con inhibidores irreversibles**

**Carlos Ami Benalal Álvarez**

Estudiante de Biotecnología

Tutor: Jorge Estévez Domènech

Elche, junio 2025

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 0. RESUMEN.....   | 2  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 5  |
| 1.1. Los compuestos organofosforados inhibidores de esterasas.....                    | 5  |
| 1.2. Carboxilesterasas.....   | 7  |
| 1.3. Sustratos de la AChE.....  | 8  |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 11 |
| 2.1. Actividad PVasa de hAChE.....  | 11 |
| 2.2. Aumento de la actividad PVasa de hrAChE tras pretratamiento con AtCh.....        | 12 |
| 3. OBJETIVOS.....   | 13 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 14 |
| 4.1. Tampones y reactivos utilizados.....   | 14 |
| 4.2. Material biológico.....  | 15 |
| 4.3. Equipos utilizados.....  | 15 |
| 4.4. Curva de calibrado del método colorimétrico de fenol.....                        | 15 |
| 4.5. Competición entre sustratos en hrAChE proveniente de células HEK.....            | 16 |
| 4.6. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa.....                              | 16 |
| 4.7. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa tras pretratamiento con AtCh..... | 17 |
| 4.8. Actividad PVasa de la hrAChE concentraciones variables de PV.....                | 19 |
| 4.9. Modelos matemáticos y análisis de datos.....                                     | 20 |
| 5. RESULTADOS.....  | 21 |
| 5.1. Curva de calibrado de fenol.....   | 21 |
| 5.2. Competición entre sustratos en hrAChE proveniente de células HEK.....            | 22 |
| 5.3. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa.....                              | 22 |
| 5.4. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa tras pretratamiento con AtCh..... | 25 |
| 5.5. Actividad PVasa de la hrAChE a concentraciones variables de PV.....              | 27 |
| 6. DISCUSIÓN.....   | 29 |
| 6.1. Actividad PVasa en hrAChE proveniente de células HEK.....                        | 29 |
| 6.2. Inhibición de la actividad PVasa por paraoxón.....                               | 30 |
| 6.3. Inhibición de la actividad PVasa por mipafox.....                                | 31 |
| 6.4. Actividad PVasa.....   | 34 |
| 6.5. Consideraciones finales.....   | 35 |
| 7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.....   | 37 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA.....  | 39 |

## 0. RESUMEN

Algunos compuestos organofosforados (OPs) son utilizados en productos insecticidas y biocidas cuya diana principal es la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La AChE humana recombinante (hrAChE) presenta tanto actividad fenilacetato esterasa (FAC esterasa) como fenilvalerato esterasa (PVasa). La incubación de la hrAChE con acetiltiocolina (AtCh) o acetilcolina (ACh) produce un aumento de la actividad PVasa de la enzima. Para explicar esto, se ha propuesto que la tiocolina (tCh) liberada en el sitio activo induce un cambio en la estructura de este, de manera que la AtCh actuaría como un “caballo de Troya”.

En este trabajo se demuestra que la modificación del centro activo por la tCh puede alterar la inhibición de la actividad PVasa producida por algunos OPs y se definen las constantes cinéticas de la inhibición tras el pretratamiento con AtCh. Los resultados aportados en este trabajo ayudarán a comprender la importancia de la modificación del centro activo inducida por la tCh de cara a la interacción de la enzima con ciertos inhibidores irreversibles.

**Palabras clave:** acetilcolinesterasa (AChE), fenilvalerato (PV), acetiltiocolina (AtCh).

### ABSTRACT

Some organophosphorus compounds (OPs) are used in insecticides and biocidal products whose main target is the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Human recombinant acetylcholinesterase (hrAChE) exhibits both phenylacetate esterase (FAC esterase) and phenyl valerate esterase activities. Incubation of hrAChE with acetylthiocholine (AtCh) or acetylcholine (ACh) results in an increase in the enzyme's PVase activity. As an explanation, it has been proposed that the thiocholine liberated in the active site induces a structural change therein, acting as a “Trojan horse”.

This study demonstrates that the modification in the active site by tCh can alter the inhibition of PVase activity caused by some OPs and defines the kinetic constants of inhibition after pretreatment with AtCh is performed. The results presented in this study will contribute to a better understanding of the role of the modification of the active site produced by tCh in the enzyme's interaction with certain irreversible inhibitors.

**Keywords:** acetylcholinesterase (AChE), phenyl valerate (PV), acetylthiocholine (AtCh).

## **ABREVIATURAS**

**AAP** Aminoantipirina

**AChE** Acetilcolinesterasa

**DMF** Dimetilformamida

**ACh** Acetilcolina

**AtCh** Acetiltiocolina

**tCh** Tiocolina

**OP** Organofosforado

**AtCh** Acetiltiocolina

**FAc** Fenilacetato

**PV** fenilvalerato o valerato de fenilo

**PVasa** fenilvalerato esterasa

**FAc esterasa** Fenilacetato esterasa

**BSA** Albúmina de suero bovino

**SDS** Dodecilsulfato sódico

**TP** Tampón fosfato.

**FeCN** Ferricianuro potásico ( $K_3Fe(CN)_6$ )

**Tris** Tris(hidroximetil)aminometano

**HEK** Células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293)

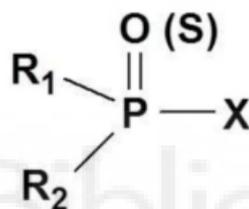
**CHO** Células derivadas de ovario de hámster chino (*Chinese Hamster Ovary*)

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Los compuestos organofosforados inhibidores de esterasas.

#### 1.1.1. Características químicas.

Los compuestos organofosforados (OPs) conforman un gran grupo de sustancias de síntesis tales como amidas, ésteres y derivados tiólicos del ácido fosfórico y fosfónico. La estructura química general de los OPs que inhiben a esterasas se puede observar en la **Figura 1.1**. Esta se compone de un átomo central de fósforo (P) y un enlace fosfórico (P=O) o tiofosfórico (P=S). En dicha estructura, la X corresponde al grupo saliente, que puede tomar una gran variedad de formas en diversos grupos alifáticos, aromáticos o heterocíclicos. Cuando un compuesto inhibidor reacciona con el grupo -OH del centro activo de una proteína, este grupo saliente sufre una sustitución nucleofílica por el oxígeno.

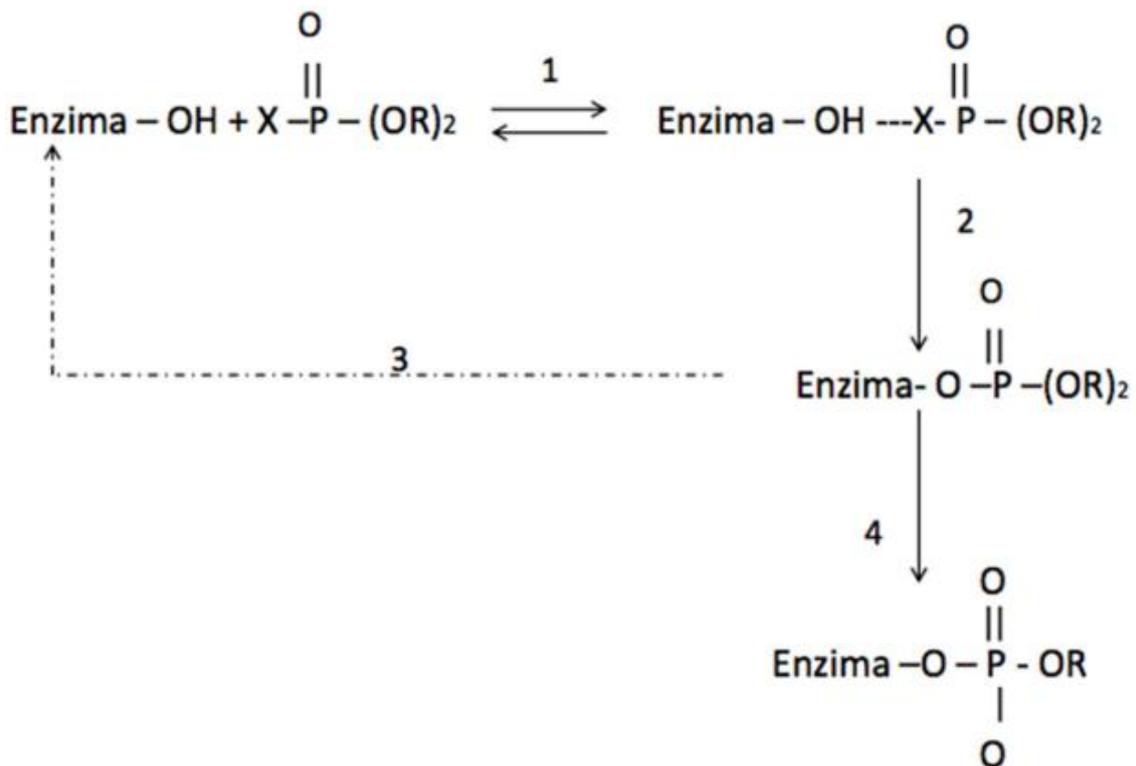


**Figura 1.1. Estructura química general de los compuestos organofosforados.**  $R_1$  y  $R_2$  son normalmente grupos arilo o alquilo simples. X representa el “grupo saliente”, que puede tener una gran variedad de naturalezas químicas.

Los OPs han sido comúnmente utilizados como insecticidas, fungicidas y acaricidas en el sector de la agricultura, destinados a combatir plagas y eliminar vectores de enfermedades (Instituto Nacional de Toxicología, 1996). Aunque su uso está disminuyendo sobre todo en países desarrollados, es probable que sigan siendo relevantes durante décadas por su eficacia y bajo costo (Casida y Durkin, 2013).

#### 1.1.2. Reacciones de interacción entre organofosforados y esterasas.

El mecanismo molecular de los efectos biológicos producidos por un OP implica generalmente el grupo hidroxilo (-OH) de una proteína, y tiene como consecuencia la inhibición de las esterasas mediante su fosforilación. Este mecanismo de reacción es común en todas ellas y se muestra en la **Figura 1.2**.



**Figura 1.2. Mecanismo general de inhibición de esterasas por organofosforados (OPs).** Cuando se ha formado el complejo de tipo michaeliano entre la enzima y el OP (1), se fosforila un residuo de serina de la enzima y se pierde el grupo saliente X (2). Desde aquí puede seguirse la vía de reactivación (3), en la que la enzima se produce la recuperación de la enzima; o la reacción de envejecimiento (4), en la que se rompe el enlace R-O-P, perdiéndose un grupo R y formándose un residuo fosfórico con carga negativa (Johnson, 1975). La reacción 3 puede ser una reactivación espontánea o inducida por reactivos nucleofílicos.

### 1.1.3. Efectos tóxicos generados por los OPs.

Los efectos observados como consecuencia de la exposición a OPs son, en gran parte, resultado de la combinación del tipo de exposición (aguda o crónica), la intensidad (dosis o concentración) y las especies químicas implicadas en esta exposición (categoría toxicológica) (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo, 1999).

Se ha descrito que los OPs pueden afectar a humanos al fosforilar esterasas vitales, pudiendo causar gran variedad de enfermedades neurotóxicas. En la **Tabla 1.1** se recogen los efectos tóxicos de los compuestos organofosforados en relación a la esterasa inhibida en cada caso. La acción tóxica de estos compuestos puede ser resumida en:

- Inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) del sistema nervioso, produciendo efectos tóxicos inmediatos.

- Inhibición de la esterasa diana de neuropatía (NTE), causando efectos neurotóxicos retardados. La inhibición de esta esterasa y el posterior envejecimiento producen la neuropatía retardada inducida por OPs (OPIDN) (Johnson, 1969).
- Otros efectos sobre órganos como pulmón, hígado, riñón, médula ósea, sistema inmunitario etc., por mecanismos no muy conocidos.

**Tabla 1.1. Toxicidad de organofosforados relacionada con la inhibición de las esterasas.**

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

## **1.2. Carboxilesterasas.**

### **1.2.1. Tipos de carboxilesterasas.**

Las carboxilesterasas son enzimas de la familia de las esterasas que catalizan la hidrólisis de ésteres carboxílicos. Las carboxilesterasas fueron clasificadas por Aldridge (1953) en función de su interacción con los OPs.

- A-esterasas: hidrolizan ésteres carboxílicos y OPs sin llegar a ser inhibidos por estos.
- B-esterasas: hidrolizan ésteres carboxílicos y son inhibidas irreversiblemente por OPs.
- C-esterasas: no tienen ningún tipo de interacción con compuestos OPs.

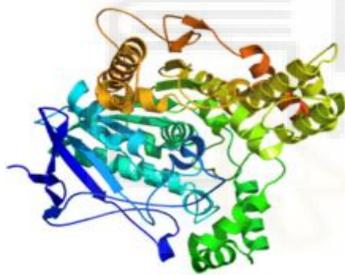
### **1.2.2. Colinesterasas.**

Las colinesterasas (ChEs) son enzimas serín hidrolasas, una familia de esterasas perteneciente a las B-esterasas. Estas carboxilasas contienen un residuo de serina en

el sitio activo y catalizan la hidrólisis de ésteres de colina, como son la acetilcolina (ACh), la butirilcolina (BuCh) o la succinilcolina, entre otros. Sin embargo, el principal sustrato de las colinesterasas es la ACh, un neurotransmisor, ya que estas carboxilasas se concentran principalmente en las señales colinérgicas cerebrales y en las uniones neuromusculares.

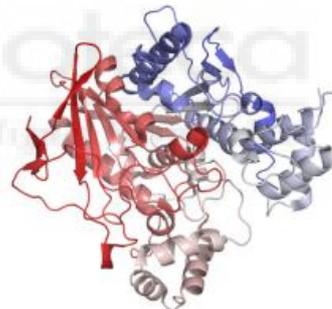
Existen dos tipos de colinesterasas en vertebrados, que se diferencian principalmente por su especificidad de sustrato (Kovarik et al., 2003): la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (BuChE), pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o colinesterasa de suero (EC 3.1.1.8).

Aunque se ha demostrado el papel de la AChE en la terminación de la neurotransmisión colinérgica que sucede en la hendidura sináptica y neuromuscular, el papel fisiológico de la BuChE no se conoce del todo. Algunos datos sugieren que la BuChE podría participar en procesos de detoxificación, pero su ausencia total o parcial en determinados individuos no parece tener consecuencias (Lockridge et al., 2005). Las estructuras de ambas enzimas están representadas en las **Figuras 1.4 y 1.5**.



**Figura 1.4. Estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa humana.**

Imagen obtenida de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>)



**Figura 1.5. Estructura tridimensional de la butirilcolinesterasa humana.**

Imagen obtenida de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>)

### **1.3. Sustratos de la AChE.**

La AChE se considera una enzima evolutivamente perfecta, pues todos los pasos de recambio de sustrato (asociación del sustrato, transformaciones químicas y disociación del producto) se producen a velocidades similares (Tōugu, 2001). La característica más destacable de las colinesterasas es su facilidad para encontrar y acomodar la carga catiónica del sustrato fisiológico. Las interacciones electrostáticas que se producen entre la enzima y las cargas positivas de las moléculas de ligando desempeñan un papel

importante en el reconocimiento y la unión de sustratos e inhibidores por parte de estas enzimas. Sin embargo, no debe sobreestimarse la contribución de estas interacciones al reconocimiento molecular del sustrato fisiológico al analizar el poder catalítico de la enzima, puesto que la AChE se caracteriza por una amplia especificidad de sustrato y la capacidad de hidrolizar sustratos de carga neutra a altas velocidades de reacción.

### 1.3.1. Acetiltiocolina y acetilcolina.

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.

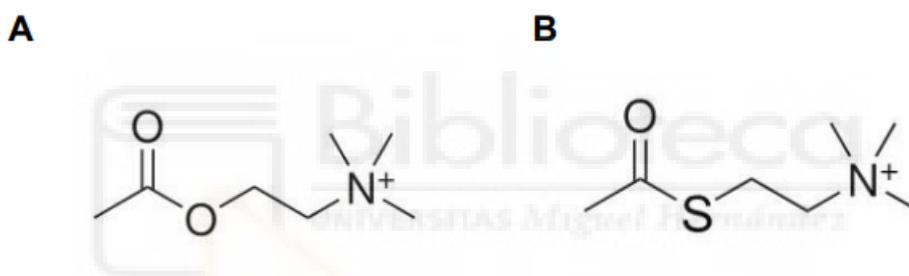


Figura 1.6. Estructuras químicas de la ACh (A) y la AtCh (B).

En un estudio microcalorimétrico 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).

### 1.3.2. Fenilvalerato y fenilacetato.

El fenilvalerato (PV) (**Figura 1.7 A**), como se ha mencionado anteriormente, es un sustrato neutro usado en la detección de NTE. Recientemente, se ha descrito la presencia de actividad fenilvalerato esterasa (PVasa) para este sustrato en la

butirilcolinesterasa humana (hBuChE) y la acetilcolinesterasa humana recombinante (hrAChE) (Romo, 2017; Terol, 2018).

Por otro lado, el fenil acetato (FAc) (**Figura 1.7 B**) es un sustrato neutro comúnmente usado en ensayos con hAChE (Reiner y Simeon, 1977), por lo que se conoce que esta enzima presenta actividad FAc esterasa.

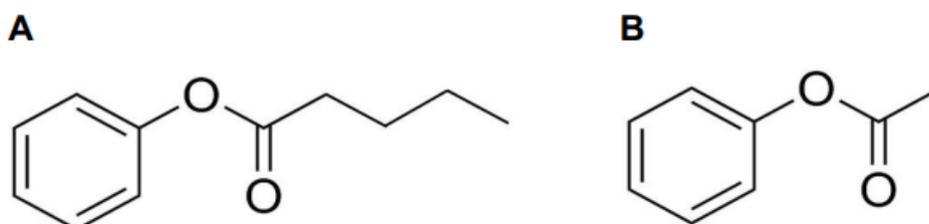


Figura 1.7. Estructuras químicas del PV (A) y el FAc (B).



## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. Actividad PVasa de hAChE.

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).

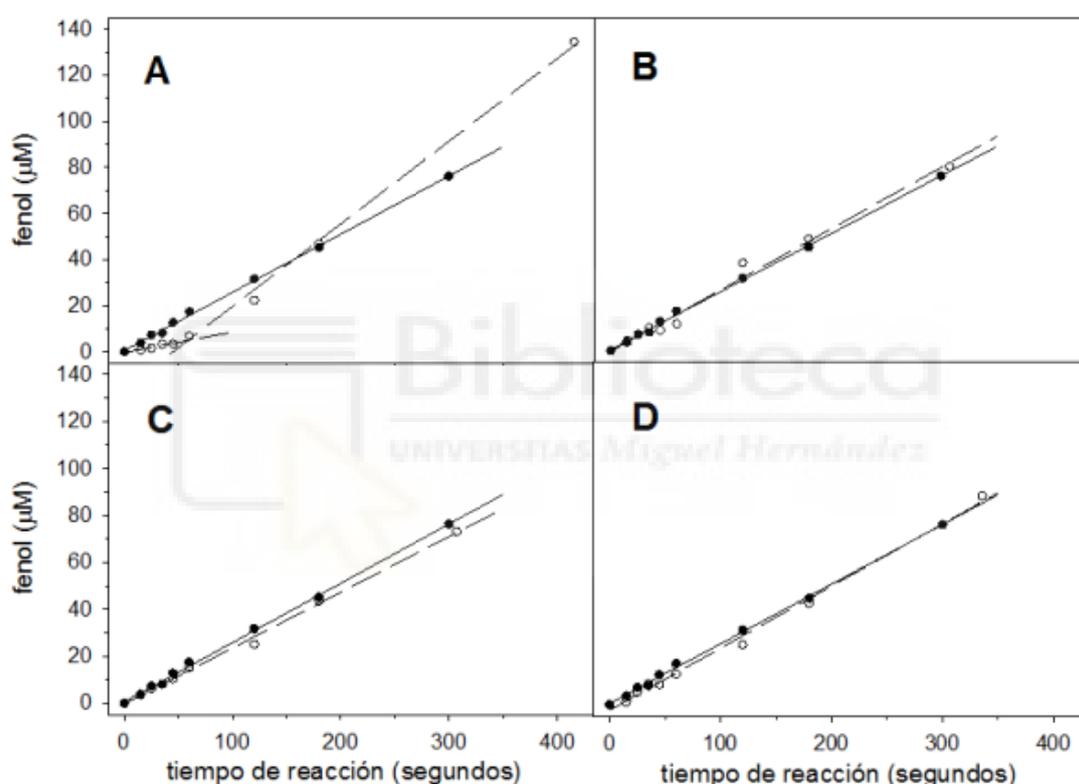


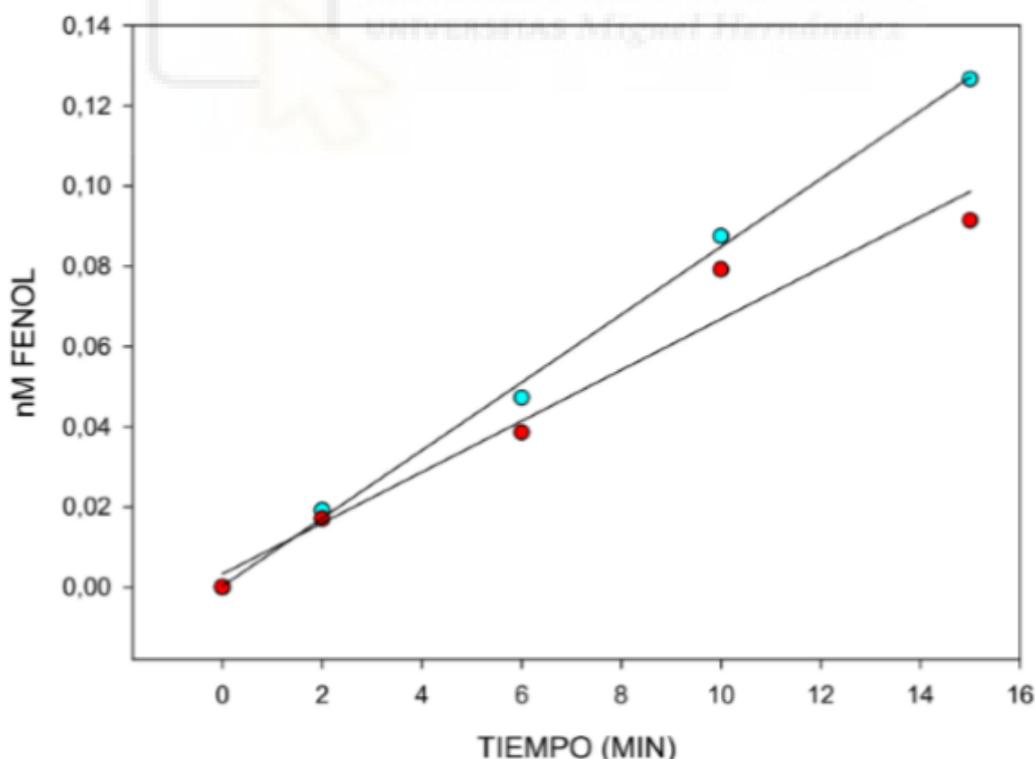
Figura 2.1. Dependencia temporal de la actividad PVasa en ausencia y presencia de acetiltiocolina (AtCh), tiocolina (tCh), acetato (Ac) o tCh y Ac (Estévez et al., 2022). Se muestra un ejemplo de los experimentos independientes realizados. Cada punto representa una medición triplicada. Se ensayaron 5 nM de hAChE (en volumen de reacción) en presencia de 3 mM de PV a diferentes tiempos de reacción y a 37°C. Los círculos negros representan la producción de fenol en ausencia de AtCh, tCh, Ac o tCh y Ac. Las líneas rectas representan la regresión lineal en todos los paneles. Los círculos blancos indican la producción de fenol en presencia de 0,5 mM de AtCh (Panel A), 0,5 mM de tCh (Panel B), 0,5 mM de Ac (Panel C) y 0,5 mM de tCh y Ac (Panel D). Las líneas discontinuas representan las regresiones lineales.

Se pudo demostrar que esta activación estaba causada por al menos una molécula de tCh, que no llegaba a abandonar el centro activo una vez hidrolizada totalmente la AtCh. Así, este producto de reacción interactuaba dentro de este, incrementando la actividad PVasa de la enzima. De esta forma, 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.

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

## **2.2. Aumento de la actividad PVasa de la hrAChE tras pretratamiento con AtCh.**

En los ensayos realizados por Ruz (2023) se observó que el incremento de la actividad PVasa de la hrAChE que se produce tras el pretratamiento con AtCh se mantenía una vez purificada la enzima mediante ultrafiltración, lo que implica que este cambio en la actividad se debe a modificaciones permanentes en la estructura del centro activo producidos por las moléculas de tCh resultantes de la hidrólisis del sustrato. Estos resultados también se observaron con moléculas de ACh (**Figura 2.2**).



**Figura 2.2. Actividad PVasa de enzima pretratada con AtCh y filtrada (puntos azules) y control (puntos rojos) (Ruz, 2023).**

Estos hallazgos demostraron que el aumento descrito de la actividad PVasa tras el pretratamiento con AtCh se debía a la interacción permanente de la tCh en el centro activo.

### **3. OBJETIVOS.**

#### *Objetivo general.*

El objetivo general de este trabajo es comprobar que las interacciones con AtCh en hrAChE proveniente de células CHO observadas en trabajos anteriores son extensibles a otras hrAChEs y a otros tipos de reacción, como las de inhibición covalente irreversible.

#### *Objetivos específicos.*

- Comprobar que la modificación del centro activo por AtCh sucede en otras hrAChE de origen distinto a las células CHO, utilizando hrAChE proveniente de células HEK.
- Comprobar si la modificación del centro activo por AtCh modifica la interacción de la hrAChE con compuestos organofosforados, utilizando mipafox y paraoxón como compuestos modelo.
- Caracterizar la actividad PVasa en muestras de hrAChE pretratadas con AtCh.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. Tampones y reactivos utilizados.

- **Albúmina de suero bovino (BSA).** (Pureza 96%) se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. (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 estas.
- **Tampón fosfato pH 7,4 (TP).** Dihidrofosfato de sodio monohidratado 0,1 M pH 7,4. Se preparó disolviendo Dihidrofosfato de sodio monohidratado en agua destilada. El pH se ajustó a 7,4 con NaOH concentrado y se conservó a temperatura ambiente.
- **Dodecilsulfato sódico (SDS) y 4-aminoantipirina (AAP).** Se adquirieron de grado analítico (PanReac). Se preparó una disolución de SDS 2% - AAP 10 mM en tampón Tris 50 mM/EDTA 1 mM a pH 8,0. Se conservó a temperatura ambiente en botella de topacio para evitar la degradación de la AAP, que es fotosensible.
- **Fenilvalerato (PV).** Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA). Para los ensayos de actividad PVasa se preparó una disolución concentrada de 300 mg/mL (1715,5 mM) en N,N-dimetilformamida (DMF) y se conservó en nevera a 4 °C, siendo esta estable durante meses. Para su utilización como sustrato se prepararon diluciones, inmediatamente antes de su uso, a las concentraciones requeridas para el ensayo, de forma que el porcentaje de DMF no fuera superior al 3%, con el fin de no alterar la actividad enzimática.
- **Fenol.** Se adquirió de grado analítico de Panreac Química S.A. Se preparó una disolución de concentración 1 M, a partir de la cual se prepararon las concentraciones necesarias inmediatamente antes del ensayo realizado en agua destilada.
- **Ferricianuro potásico ( $K_3Fe(CN)_6$ ).** Se adquirió de grado analítico (PanReac). Se preparó una disolución al 2% en agua destilada y se conservó a temperatura ambiente.
- **Yoduro de acetilticolina (AtCh).** (Pureza superior al 99%). Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. Para su uso como sustrato se preparó inmediatamente antes de su uso a la concentración necesaria en función del ensayo realizado (en agua destilada), para minimizar su degradación por hidrólisis espontánea.
- **Dietil p-nitrofenil fosfato (paraoxón):** (pureza superior al 90%) Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. Se preparó una disolución concentrada de 10 mM

en acetona seca y se conservó a 4°C. A partir de este stock se prepararon las concentraciones necesarias diluyendo en agua destilada.

- **N,N'-Diisopropil fosforamido fluoridato (mipaflox):** (pureza superior al 99%) Se adquirió de Lark Enterprises. Se partió de un stock de 10 mM en tampón Tris/citrato 10 mM pH 6.0 conservado en la nevera a 4°C. A partir de este stock se prepararon las concentraciones necesarias diluyendo en agua destilada.

#### **4.2. Material biológico.**

- **Acetilcolinesterasa humana recombinante proveniente de células CHO.** Se adquirió de R&D SYSTEMS a biotechne brand. Las soluciones enzimáticas se prepararon a diferentes concentraciones dependiendo del ensayo realizado, con BSA 0,1 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y comprobando su actividad antes de cada ensayo.
- **Acetilcolinesterasa humana recombinante proveniente de células HEK.** Se adquirió de Prospec Protein Specialists. Las soluciones enzimáticas se prepararon a diferentes concentraciones dependiendo del ensayo realizado, con BSA 0,1 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y comprobando su actividad antes de cada ensayo.

#### **4.3. Equipos utilizados.**

- **Termobloques de aluminio.** Con capacidad para 8 x 12 minitubos de 1 mL y un controlador de temperatura electrónico.
- **Lector de placas.** Para la lectura fotométrica se utilizó el lector de placas AD 340 C (Beckman Coulter) y el lector de placas Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek).
- **Centrífugas.** Se utilizó la centrífuga Allegra 21R de Beckman Coulter.
- **Filtros de centrifugación.** Se utilizaron filtros Ultracel 10 K de Millipore para eliminar la AtCh y los productos de reacción en los ensayos con pretratamiento.

#### **4.4. Curva de calibrado del método colorimétrico de fenol.**

Se realizó una curva de calibrado del método colorimétrico basado en el método de medida de fenol adaptado por Johnson (1975) para el ensayo de NTE. Se llevó a cabo utilizando 10 concentraciones crecientes de fenol en el rango de 0 y 0,5 mM. Las

soluciones se prepararon en agua destilada a partir de una de concentración *stock* de fenol 1000 mM.

A 100  $\mu\text{L}$  de disolución de fenol se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de BSA 0,1%, siendo el volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de SDS 2% / AAP 10 mM y 50  $\mu\text{L}$  de ferricianuro potásico. Por último, 250  $\mu\text{L}$  de cada muestra fueron transferidos a una placa de 96 pocillos, donde se midió su absorbancia a 510 nm.

#### **4.5. Competición entre sustratos en hrAChE proveniente de células HEK.**

El ensayo se realizó en termobloques de aluminio a 37 °C (temperatura óptima de la enzima). En minitubos de 1 mL se dispusieron 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de hrAChE (para alcanzar una concentración 2,5 nM en el volumen de reacción con el sustrato) o 100  $\mu\text{L}$  de BSA 0,1% (blancos). Posteriormente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de PV (3 mM en volumen de reacción) o 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla de PV y AtCh (3 mM y 0,5 mM en volumen de reacción, respectivamente). Después de 10 minutos, se pararon las reacciones añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de SDS 2% / AAP 10 mM. A continuación, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de ferricianuro potásico a cada minitubo y se transfirieron 250  $\mu\text{L}$  del contenido a una microplaca de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 510 nm.

La actividad (en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) se calculó a partir de la curva de calibrado obtenida con estándares de fenol.

#### **4.6. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa.**

El ensayo se realizó en termobloques de aluminio a 37 °C (temperatura óptima de la enzima). En minitubos de 1 mL se dispusieron 90  $\mu\text{L}$  de una disolución de hrAChE (para alcanzar una concentración 2,5 nM en el volumen de reacción con el sustrato) o 90  $\mu\text{L}$  de BSA 0,1% (blancos). Estos volúmenes se preincubaron durante 30 minutos con 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de inhibidor. Se utilizaron 18 concentraciones de dos inhibidores distintos: mipafox o paraoxón. Las concentraciones alcanzadas en el volumen de reacción en cada caso fueron las siguientes:

- Mipafox (0-100  $\mu\text{M}$ ): 0-0,2-5-1-1,5-2-3-4-6-7-8-10-15-20-30-40-50-100  $\mu\text{M}$ .
- Paraoxón (0-100 nM): 0-0,2-5-1-1,5-2-3-4-6-7-8-10-15-20-30-40-50-100 nM.

Tras la incubación con el inhibidor se añadieron 90  $\mu\text{L}$  de una disolución de PV para alcanzar una concentración 3 mM en el volumen de reacción. Después de 10 minutos,

se pararon las reacciones añadiendo 90  $\mu\text{L}$  de una disolución de SDS 2% / AAP 10 mM. A continuación, se añadieron 45  $\mu\text{L}$  de ferricianuro potásico a cada minitubo y se transfirieron 250  $\mu\text{L}$  del contenido a una microplaca de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 510 nm.

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de actividad con respecto a un control con total actividad (sin inhibidor).

#### **4.7. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa tras pretratamiento con AtCh.**

##### **Pretratamiento con AtCh.**

Se utilizaron termobloques de aluminio a 37 °C (temperatura óptima de la enzima). En minitubos de 1 mL se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de una disolución 60 nM de hrAChE en BSA 0,1% junto con 300  $\mu\text{L}$  de otra 2 mM de AtCh en agua destilada y se dejó reaccionar durante 20 minutos, de manera que la AtCh fuese totalmente hidrolizada. A continuación, se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla para medir la actividad PVasa tras el pretratamiento, pero antes de la ultrafiltración.

A este volumen se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de PV para alcanzar una concentración 3 mM en el volumen de reacción. Después de 10 minutos, se pararon las reacciones añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de SDS 2% / AAP 10 mM. A continuación, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de ferricianuro potásico a cada minitubo y se transfirieron 250  $\mu\text{L}$  del contenido a una microplaca de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 510 nm.

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de actividad con respecto a un control con total actividad (sin inhibidor).

##### **Ultrafiltración y posterior dilución.**

Los 500  $\mu\text{L}$  de disolución obtenidos en el paso anterior se colocaron en filtros (Ultracel 10K de Milipore) previamente lavados con TP pH 7,4. Estos filtros se centrifugaron a 14000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El material retenido en el filtro tras cada ultrafiltración se llevó hasta un volumen de 500  $\mu\text{L}$  con TP pH 7,4 y se centrifugó nuevamente, repitiéndose este proceso cuatro veces en total. Tras la cuarta ultrafiltración, se reconstituyó nuevamente el material filtrado con TP pH 7,4 hasta un volumen de 500  $\mu\text{L}$  y, finalmente, se diluyó con BSA 0,1% hasta el volumen necesario para el ensayo de actividad, en el cual se utilizó una concentración de hrAChE de 3,8 nM en volumen de reacción.

### Medida de la inhibición tras pretratamiento y ultrafiltración.

La solución de hrAChE pretratada y sometida a ultrafiltración se utilizó para hacer un ensayo de inhibición a tiempo fijo con mipafox o paraoxón siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado 4.6.

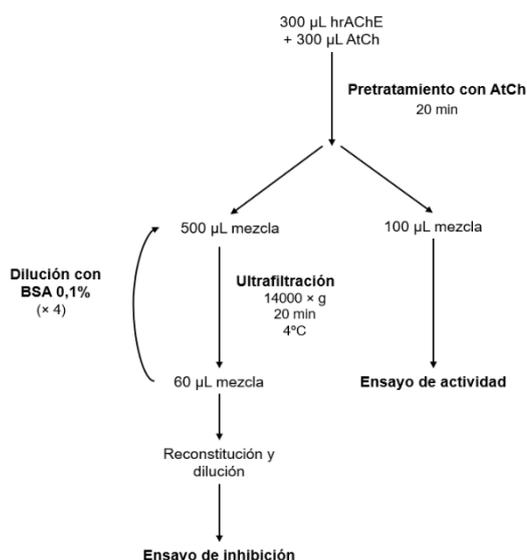
De esta manera, el ensayo se realizó en termobloques de aluminio a 37 °C (temperatura óptima de la enzima). En minitubos de 1 mL se dispusieron 90 µL de la disolución de hrAChE pretratada y ultracentrifugada (tubos de reacción) o 90 µL de BSA 0,1% (blancos). Estos volúmenes se preincubaron durante 30 minutos con 10 µL de una disolución de inhibidor. Se utilizaron 18 concentraciones de dos inhibidores distintos: mipafox o paraoxón. Las concentraciones en volumen de reacción utilizadas en cada caso fueron las siguientes:

- Mipafox (0-100 µM): 0-0,2-5-1-1,5-2-3-4-6-7-8-10-15-20-30-40-50-100 µM.
- Paraoxón (0-100 nM): 0-0,2-5-1-1,5-2-3-4-6-7-8-10-15-20-30-40-50-100 nM.

Tras la incubación con el inhibidor se añadieron 90 µL de una disolución 3 mM de PV en el volumen de reacción preparada en agua destilada. Después de 10 minutos, se pararon las reacciones añadiendo 90 µL de una disolución de SDS 2% / AAP 10 mM. A continuación, se añadieron 45 µL de ferricianuro potásico a cada minitubo y se transfirieron 250 µL del contenido a una microplaca de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 510 nm.

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de actividad con respecto a un control con total actividad (sin inhibidor).

Este proceso aparece esquematizado en la **Figura 4.1**.



**Figura 4.1. Esquema del procedimiento seguido en los ensayos de inhibición con pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración.**

#### **4.8. Actividad PVasa de la hrAChE concentraciones variables de PV.**

##### **4.8.1. Actividad PVasa de la hrAChE.**

El ensayo se realizó en termobloques de aluminio a 37 °C (temperatura óptima de la enzima). En minitubos de 1 mL se añadieron 90 µL de una disolución de hrAChE en TP (para alcanzar una concentración 2,5 nM en el volumen de reacción con el sustrato) o BSA 0,1% (blancos). Posteriormente se añadieron 90 µL de una disolución de PV, obteniendo un volumen final de 180 µL, y se dejó reaccionar durante 10 minutos. Las concentraciones de PV alcanzadas en el volumen de reacción en cada caso fueron las siguientes:

- PV (0,25-6 mM): 0,25-0,375-0,5-0,75-1-1,5-2-2,5-3,25-4-6 mM.

Después de estos 10 minutos, se pararon las reacciones añadiendo 90 µL de una disolución de SDS 2% / AAP 10 mM. A continuación, se añadieron 45 µL de ferricianuro potásico a cada minitubo y se transfirieron 250 µL del contenido a una microplaca de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 510 nm.

La actividad (en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) se calculó a partir de la curva de calibrado obtenida con estándares de fenol.

##### **4.8.2. Actividad PVasa de la hrAChE tras pretratamiento con AtCh.**

El ensayo se realizó en termobloques de aluminio a 37 °C (temperatura óptima de la enzima). Primeramente, preparó una disolución de hrAChE y AtCh para alcanzar unas concentraciones 5 nM y 1 mM en el volumen de reacción, respectivamente, y se dejó reaccionar por 20 minutos, de manera que la AtCh fuese hidrolizada en su totalidad. Posteriormente, se transfirieron 90 µL de esta disolución o BSA 0,1% (blancos) a minitubos de 1 mL y se añadieron 90 µL de una disolución de PV para alcanzar una concentración final de enzima de 2,5 nM en el volumen de reacción con el sustrato. El tiempo de reacción fue de 10 minutos y las concentraciones de PV alcanzadas en el volumen de reacción en cada caso fueron las siguientes:

- PV (0,25-6 mM): 0,25-0,375-0,5-0,75-1-1,5-2-2,5-3,25-4-6 mM.

Después de estos 10 minutos, se pararon las reacciones añadiendo 90 µL de una disolución de SDS 2% / AAP 10 mM. A continuación, se añadieron 45 µL de ferricianuro potásico a cada minitubo y se transfirieron 250 µL del contenido a una microplaca de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 510 nm.

La actividad (en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) se calculó a partir de la curva de calibrado obtenida con estándares de fenol.

#### **4.9. Modelos matemáticos y análisis de datos.**

##### **4.9.1. Análisis de los datos.**

Los resultados de los ensayos se analizaron mediante el programa SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc, Chicago, USA) para Windows, con el objetivo de obtener información cualitativa y cuantitativa sobre los mecanismos de interacción entre enzimas, sustratos e inhibidores. Este módulo crea gráficos directos lineales, gráficos secundarios e informes numéricos.

##### **4.9.2. Ensayos de inhibición.**

En este apartado se exponen los modelos empleados (Estévez y Vilanova, 2009). Para la inhibición de varios componentes enzimáticos:

$$E = E1_0 \cdot e^{-k1 \cdot I} + E2_0 \cdot e^{-k2 \cdot I} + \dots + E_R$$

Donde  $E_0$  es el control de actividad inicial (sin inhibidor),  $E$  es la actividad para una concentración de inhibidor  $I$ ;  $E_1$ ,  $E_2$  y  $E_3$  representan el contenido relativo de los componentes sensibles;  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  representan las constantes exponenciales para esos mismos componentes y  $E_R$  es el contenido relativo del componente resistente (actividad residual que resiste a las altas concentraciones de inhibidor empleadas).

La  $I_{50}^{30}$  fue calculada como  $\frac{\ln 2}{k_1}$  para un tiempo de preincubación de 30 minutos y se aplicaron las siguientes restricciones:  $k_1 > 0$ ,  $k_2 > 0$ ,  $k_3 > 0$ ,  $k_a > 0$ ,  $k_r > 0$ ,  $A_1 > 0$ ,  $A_2 > 0$  y  $E1_0 + E2_0 + \dots + E_R = 100$ . Para cada ensayo de inhibición, los puntos se ajustaron a los siguientes modelos matemáticos:

- Un componente enzimático sensible:

$$E = E_0 \cdot e^{-k \cdot 30 \cdot I}$$

- Un componente enzimático sensible y uno resistente:

$$E = E1_0 \cdot e^{-k \cdot 30 \cdot I} + E_R$$

- Dos componentes enzimáticos sensibles:

$$E = E1_0 \cdot e^{-k1 \cdot 30 \cdot I} + E2_0 \cdot e^{-k2 \cdot 30 \cdot I}$$

- Dos componentes enzimáticos sensibles y uno resistente:

$$E = E1_0 \cdot e^{-k1 \cdot 30 \cdot I} + E2_0 \cdot e^{-k2 \cdot 30 \cdot I} + E_R$$

- Tres componentes enzimáticos sensibles:

$$E = E1_0 \cdot e^{-k1 \cdot 30 \cdot t} + E2_0 \cdot e^{-k2 \cdot 30 \cdot t} + E3_0 \cdot e^{-k3 \cdot 30 \cdot t}$$

Para comprobar que la mejora del ajuste más complejo frente al más sencillo era significativa, se realizó un test de la F con el programa SigmaPlot 14.0.

#### 4.9.3. Ensayos de actividad PVasa.

El modelo matemático utilizado para ajustar los datos fue el de una hipérbola, ya que el comportamiento observado para la hidrólisis del PV es el correspondiente al modelo de Michaelis-Menten (Estévez et al., 2022). La ecuación asociada al modelo es la siguiente:

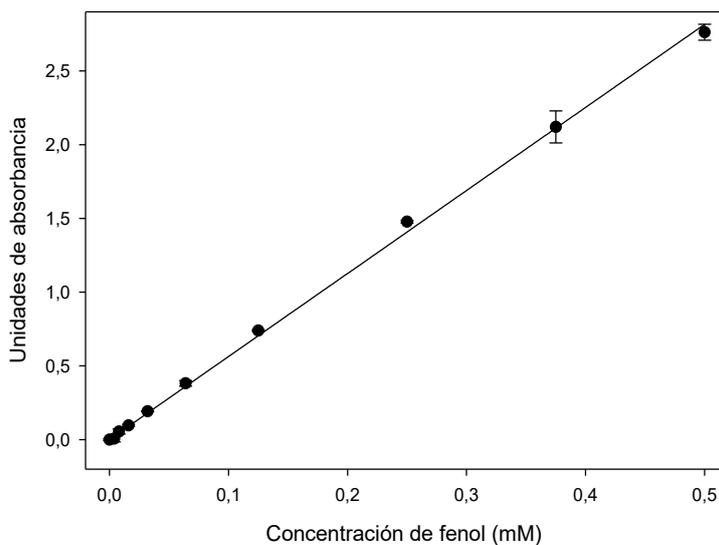
$$V = k_{cat} \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Donde  $V$  es la velocidad de la reacción en un momento dado,  $k_{cat}$  es la constante catalítica,  $[E]_0$  representa la concentración total de enzima,  $[S]$  representa la concentración de sustrato y  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten. En esta ecuación, la velocidad máxima de la reacción ( $V_{m\acute{a}x}$ ) se obtendría de  $k_{cat} \cdot [E]_0$ .

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Curva de calibrado de fenol.

Se realizó una curva de calibrado de fenol con el objetivo calcular la concentración de fenol resultante en los experimentos de actividad PVasa. Los resultados se muestran en la **Figura 5.1**.



**Figura 5.1. Curva de calibrado de fenol. ( $R^2 = 0,999$ ).** Las barras muestran la desviación estándar.

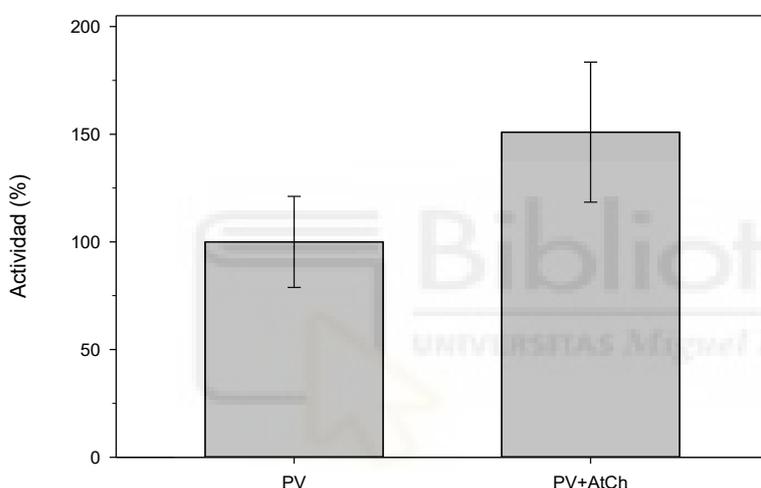
La ecuación de la recta de calibrado de fenol obtenida mediante el programa SigmaPlot fue:

$$\text{Absorbancia} = 5,6315 \cdot \text{Concentración}$$

## **5.2. Competición entre sustratos en hrAChE proveniente de células HEK.**

Se comparó la actividad PVasa de disoluciones de hrAChE proveniente de células HEK. A algunas de las disoluciones se les añadió PV y a otras una mezcla de PV y AtCh. Ambas se dejaron reaccionar durante 10 minutos.

Los datos obtenidos en el ensayo se muestran en la **Figura 5.2**, en la que la actividad de las disoluciones a las que solo se les había añadido PV se toman como el 100% de actividad.



**Figura 5.2. Actividad PVasa de las muestras expresada en porcentaje.** Las barras representan la desviación estándar.

## **5.3. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa.**

Se incubó una disolución de hrAChE durante 30 minutos con distintas concentraciones de los inhibidores mipafox y paraoxón y se estudió la actividad PVasa de la enzima tras 10 minutos de reacción con PV.

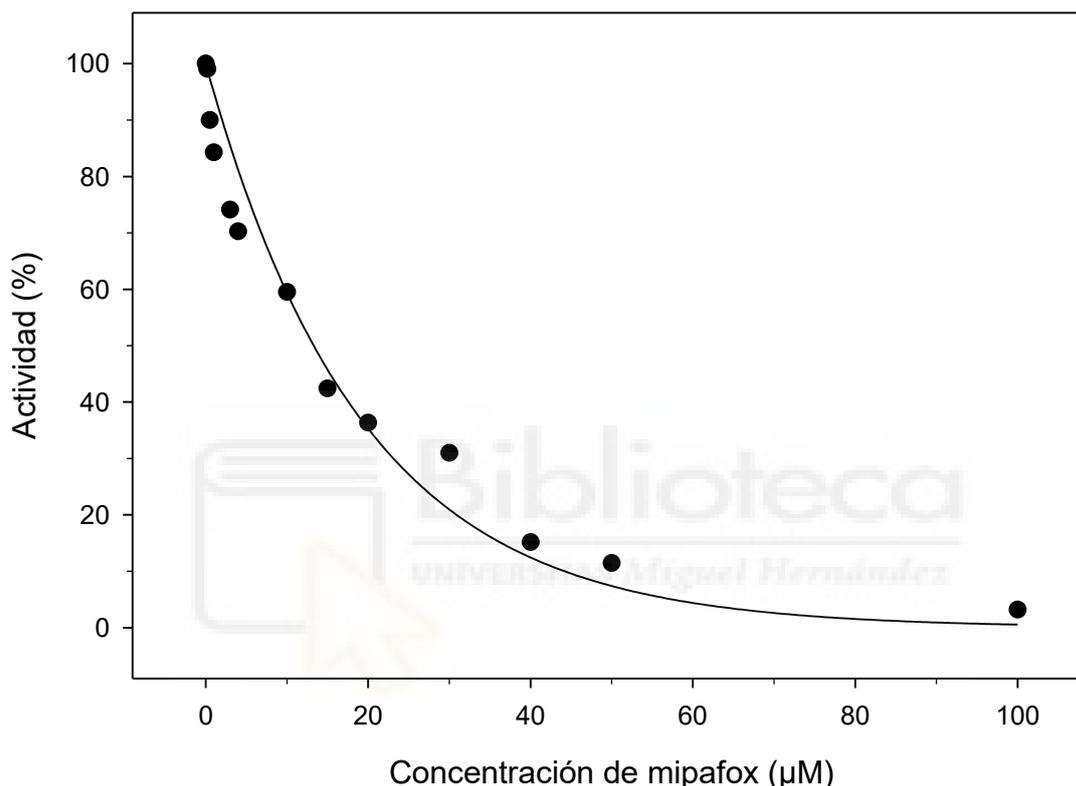
### **5.3.1. Inhibición por mipafox.**

Se realizaron en total dos ensayos independientes. Los datos de uno de ellos y la curva del mejor ajuste (según el test de la F) se muestran en la **Figura 5.3**.

Los puntos se ajustaron a los modelos matemáticos expuestos en el apartado de *Materiales y métodos*, siendo el mejor ajuste (según el test de la F) el modelo de un componente sensible:  $E = E1_0 \cdot e^{-k \cdot 30 \cdot I}$ .

**Tabla 5.1. Media y desviación estándar de los parámetros y componentes de actividad PVasa de la hrAChE** obtenidos del ajuste al mejor modelo exponencial (según el test de la F) de la curva de inhibición a concentraciones variables de mipafox durante un tiempo fijo de 30 minutos, mostrada en la **Figura 5.3**. Siendo  $E$  el porcentaje del componente,  $k_i$  la constante de inhibición e  $I_{50}^{30}$  la dosis de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad enzimática en 30 minutos.

| Componente | E (%) | $k_i$ ( $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) | $I_{50}^{30}$ ( $\mu\text{M}$ ) |
|------------|-------|--|---------------------------------|
| 1          | 100   | $2,362\cdot 10^{-5} \pm 7,539\cdot 10^{-6}$    | $17,177 \pm 5,482$              |



**Figura 5.3. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa de hrAChE a diferentes concentraciones de mipafox.** El ensayo se realizó siguiendo la descripción del mismo apartado de *Materiales y métodos*. Los porcentajes de actividad están referidos a la muestra sin inhibición, que tenía una concentración de inhibidor  $0 \mu\text{M}$ .

La **Tabla 5.1** muestra la media y la desviación estándar de los parámetros obtenidos tras el ajuste.

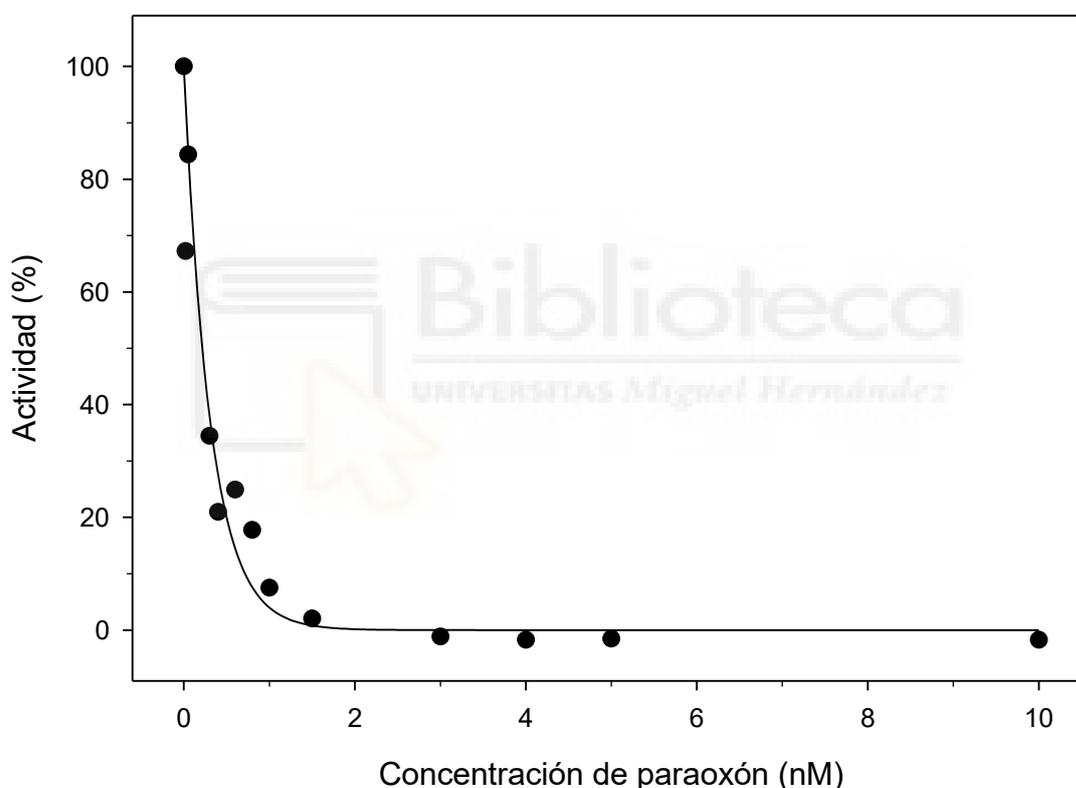
### 5.3.2. Inhibición por paraoxón.

Se realizaron en total tres experimentos independientes. Los datos de uno de ellos y la curva del mejor ajuste (según el test de la F) se muestran en la **Figura 5.4**.

Los puntos se ajustaron a los modelos matemáticos expuestos en el apartado de *Materiales y Métodos*, siendo el mejor ajuste (según el test de la F) el modelo de un componente sensible:  $E = E_0 \cdot e^{-k \cdot 30 \cdot t}$ .

**Tabla 5.2. Media y desviación estándar de los parámetros y componentes de actividad PVasa de la hrAChE** obtenidos del ajuste al mejor modelo exponencial (según el test de la F) de la curva de inhibición a concentraciones variables de paraoxón durante un tiempo fijo de 30 minutos, mostrada en la **Figura 5.4**. Siendo  $E$  el porcentaje del componente,  $k_i$  la constante de inhibición e  $I_{50}^{30}$  la dosis de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad enzimática en 30 minutos.

| Componente | E (%) | $k_i$ (nM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )   | $I_{50}^{30}$ (nM) |
|------------|-------|--|--------------------|
| 1          | 100   | $1,27 \cdot 10^{-3} \pm 4,621 \cdot 10^{-4}$ | $0,329 \pm 0,107$  |



**Figura 5.4. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa de hrAChE a diferentes concentraciones de paraoxón.** El ensayo se realizó siguiendo la descripción del apartado de *Materiales y métodos*. Los porcentajes de actividad están referidos a la muestra sin inhibición, que tenía una concentración de inhibidor 0 nM.

La **Tabla 5.2** muestra la media y la desviación estándar de parámetros obtenidos tras el ajuste.

#### **5.4. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa tras pretratamiento con AtCh.**

Se estudió la actividad PVasa de disoluciones de hrAChE pretratadas durante 20 minutos con AtCh y ultrafiltradas posteriormente. La hrAChE ultrafiltrada finalmente se incubó durante 30 minutos con distintas concentraciones de los inhibidores mipafox y paraoxón y se estudió su actividad PVasa tras 10 minutos de reacción con PV.

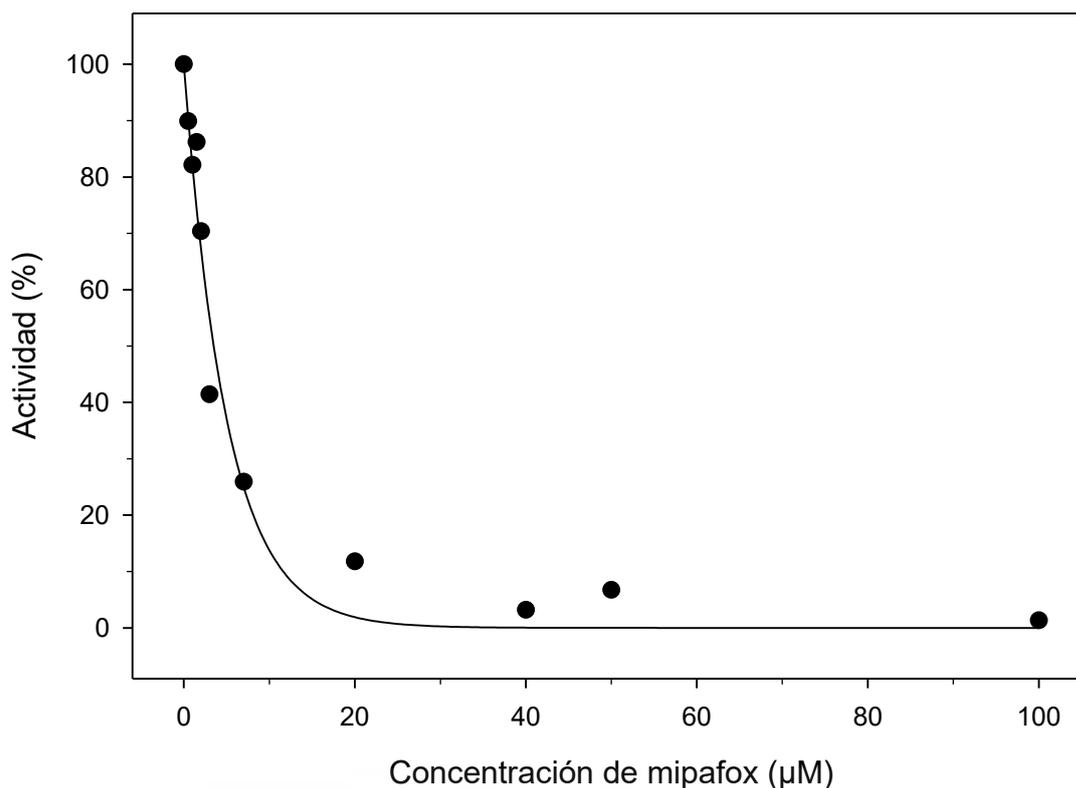
##### **5.4.1. Inhibición por mipafox tras pretratamiento con AtCh y ultrafiltración.**

Se realizaron en total dos ensayos independientes. Los datos de uno de ellos y la curva del mejor ajuste (según el test de la F) se muestran en la **Figura 5.5**.

Los puntos se ajustaron a los modelos matemáticos expuestos en el apartado de *Materiales y métodos*, siendo el mejor ajuste (según el test de la F) el modelo de un componente sensible:  $E = E1_0 \cdot e^{-k \cdot 30 \cdot I}$ .

**Tabla 5.3. Media y desviación estándar de los parámetros y componentes de actividad PVasa de la hrAChE** obtenidos del ajuste al mejor modelo exponencial (según el test de la F) de la curva de inhibición a concentraciones variables de mipafox durante un tiempo fijo de 30 minutos, tras pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración, mostrada en la **Figura 5.5**. Siendo  $E$  el porcentaje del componente,  $k_i$  la constante de inhibición e  $I_{50}^{30}$  la dosis de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad enzimática en 30 minutos

| <b>Componente</b> | <b>E (%)</b> | <b><math>k_i</math> (<math>\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}</math>)</b> | <b><math>I_{50}^{30}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b> |
|-------------------|--------------|---|--|
| 1                 | 100          | $7,581 \cdot 10^{-5} \pm 4,855 \cdot 10^{-5}$                               | $6,389 \pm 4,092$  |



**Figura 5.5.** Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa de hrAChE pretratada con AtCh a diferentes concentraciones de mipafox. El ensayo se realizó siguiendo la descripción del apartado de *Materiales y métodos*. Los porcentajes de actividad están referidos a la muestra sin inhibición, que tenía una concentración de inhibidor 0 µM.

La **Tabla 5.3** muestra la media y la desviación estándar de los parámetros obtenidos tras el ajuste.

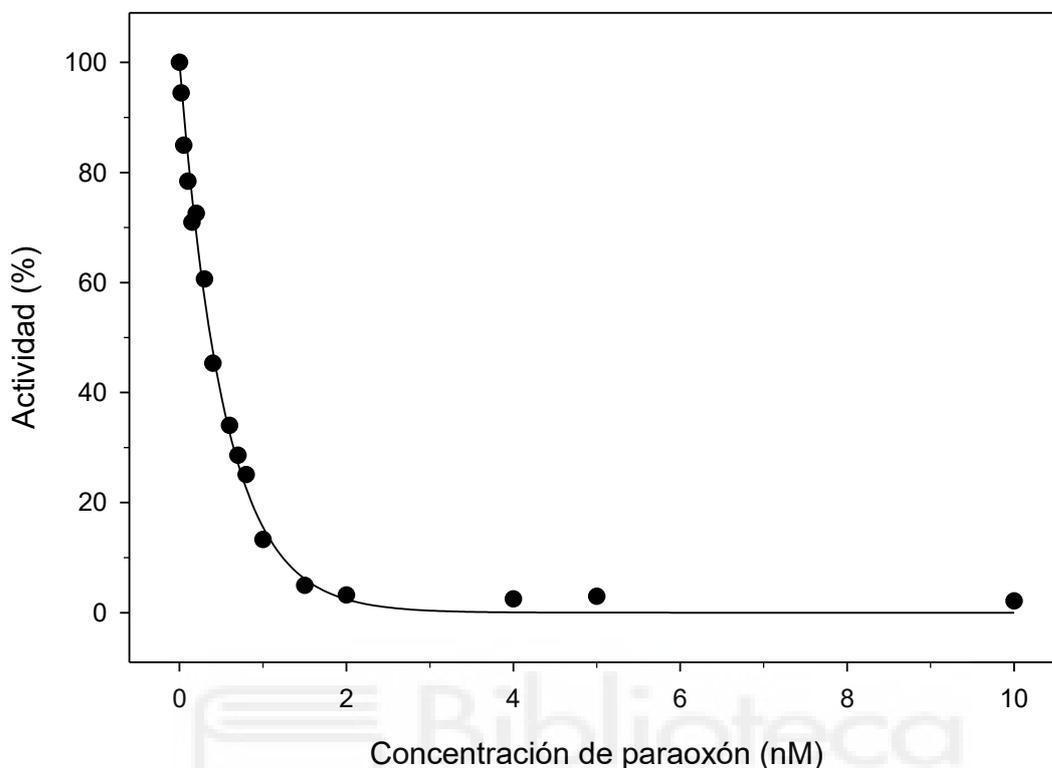
#### 5.4.2. Inhibición por paraoxón tras pretratamiento con AtCh y ultrafiltración.

Se realizaron en total dos experimentos independientes. Los datos de uno de ellos y la curva del mejor ajuste (según el test de la F) se muestran en la **Figura 5.6**.

Los puntos se ajustaron a los modelos matemáticos expuestos en el apartado de *Materiales y métodos*, siendo el mejor ajuste (según el test de la F) el modelo de un componente sensible:  $E = E1_0 \cdot e^{-k \cdot 30 \cdot I}$ .

**Tabla 5.4.** Media y desviación estándar de los parámetros y componentes de actividad PVasa de la hrAChE obtenidos del ajuste al mejor modelo exponencial (según el test de la F) de la curva de inhibición a concentraciones variables de paraoxón durante un tiempo fijo de 30 minutos, tras pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración, mostrada en la **Figura 5.6**. Siendo  $E$  el porcentaje del componente,  $k_i$  la constante de inhibición e  $I_{50}^{30}$  la dosis de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad enzimática en 30 minutos.

| Componente | E (%) | $k_i$ ( $\text{nM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )  | $I_{50}^{30}$ (nM) |
|------------|-------|---|--------------------|
| 1          | 100   | $9,098 \cdot 10^{-4} \pm 1,758 \cdot 10^{-4}$ | $0,431 \pm 0,083$  |



**Figura 5.6.** Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa de hrAChE pretratada con AtCh a diferentes concentraciones de paraoxón. El ensayo se realizó siguiendo la descripción del apartado de *Materiales y métodos*. Los porcentajes de actividad están referidos a la muestra sin inhibición, que tenía una concentración de inhibidor 0 nM.

La **Tabla 5.4** muestra la media y la desviación estándar de los parámetros obtenidos tras el ajuste.

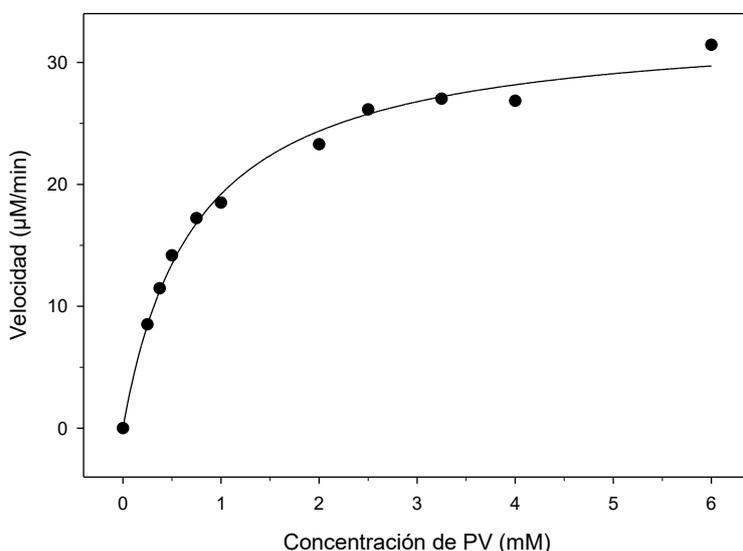
### **5.5. Actividad PVasa de la hrAChE a concentraciones variables de PV.**

Se estudió la variación de la actividad PVasa en disoluciones de hrAChE sin pretratamiento o pretratadas con AtCh tras 10 minutos de reacción con concentraciones de PV variables.

#### **5.5.1. Actividad PVasa de la hrAChE.**

Se realizaron en total dos experimentos independientes. Los datos de uno de ellos y la curva del mejor ajuste (según el test de la F) se muestran en la **Figura 5.7**.

Los datos se analizaron según el modelo cinético de Michaelis-Menten, el cual describe una función hiperbólica cuya ecuación se presenta en el apartado 4.9.3 de *Materiales y métodos*.



**Figura 5.7. Ajustes al mecanismo de reacción.** Se muestran los resultados del análisis de los datos ajustados de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten con el software SigmaPlot. ( $R^2 = 0,9919$ ).

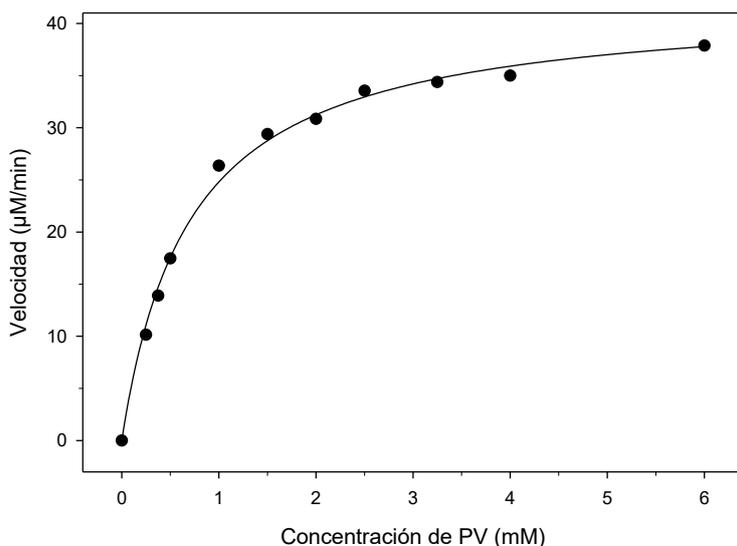
**Tabla 5.5. Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del ajuste al modelo de Michaelis-Menten.**  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten,  $V_{m\acute{a}x}$  es la velocidad máxima alcanzada en la reacción y  $k_{cat}$  es la constante catalítica. Se muestran la media y la desviación estándar de los parámetros obtenidos a partir de dos experimentos independientes.

| $K_m$ (mM)        | $V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) | $k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) |
|-------------------|---|---------------------------------|
| $0,673 \pm 0,093$ | $30,017 \pm 4,743$                                      | $12007 \pm 1897$                |

### 5.5.2. Actividad PVasa de la hrAChE tras pretratamiento con AtCh.

Se realizaron en total dos experimentos independientes. Los datos de uno de ellos y la curva del mejor ajuste (según el test de la F) se muestran en la **Figura 5.8**.

Los datos se analizaron según el modelo cinético de Michaelis-Menten, el cual describe una función hiperbólica cuya ecuación se presenta en el apartado 4.9.3 de *Materiales y métodos*.



**Figura 5.8. Ajustes al mecanismo de reacción.** Se muestran los resultados del análisis de los datos de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten con el software SigmaPlot. ( $R^2 = 0,9961$ ).

**Tabla 5.6. Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del ajuste al modelo de Michaelis-Menten.**  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten,  $V_{m\acute{a}x}$  es la velocidad máxima alcanzada en la reacción y  $k_{cat}$  es la constante catalítica. Se muestran la media y la desviación estándar de los parámetros obtenidos a partir de dos experimentos independientes.

| $K_m$ (mM)        | $V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) | $k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) |
|-------------------|---|---------------------------------|
| $0,655 \pm 0,065$ | $38,43 \pm 5,328$                                       | $15372 \pm 2131$                |

## 6. DISCUSIÓN.

### 6.1. Actividad PVasa en hrAChE proveniente de células HEK.

Las células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) son unas de las células utilizadas de forma generalizada en biotecnología para la producción de proteínas recombinantes. En ensayos anteriores se describió un aumento en la actividad PVasa de la hrAChE proveniente de estas células al ser pretratada con AtCh (Terol, 2018; Estévez et al., 2022). Con el fin de obtener resultados concluyentes en este trabajo, era necesario comprobar en un inicio si este incremento en la actividad PVasa sucedía de forma similar en otras hrAChEs de diferente origen como, por ejemplo, la proveniente de células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293 o, simplemente, HEK). Esta línea celular, como también sucede con las CHO, es ampliamente utilizada en la producción biotecnológica de proteínas recombinantes.

De esta manera, se puede observar que la hrAChE proveniente de células HEK también sufre el aumento de la actividad PVasa en presencia de AtCh descrito previamente en la bibliografía con hrAChE proveniente de células CHO. La **Figura 5.2** muestra cómo se

alcanza hasta un 50% más de actividad PVasa cuando la AtCh está presente en el medio de reacción junto con el PV.

Estos resultados apoyan la idea de que el efecto de incremento de actividad PVasa puede ocurrir en todas las hrAChE, independientemente del origen, al menos en líneas celulares de mamíferos.

## **6.2. Inhibición de la actividad PVasa por paraoxón.**

El paraoxón es el metabolito activo del paratión, un compuesto organofosforado empleado como insecticida desde hace varias décadas por su capacidad para inhibir de forma irreversible la AChE. Su acción genera síntomas de tipo muscarínico y colinérgico, aunque no produce OPIDN.

### **6.2.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh.**

Los resultados del experimento de inhibición a tiempo fijo con paraoxón sin pretratamiento con AtCh (**Figura 5.4**) indican la existencia de un componente sensible al inhibidor (100%) con una  $I_{50}^{30}$  media de  $0,329 \pm 0,107$  nM y una  $k_i$  media de  $1,27 \cdot 10^{-3} \pm 4,621 \cdot 10^{-4}$  nM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> (**Tabla 6.1**).

Los valores de la  $k_i$  obtenidos se encuentran dentro del rango de entre 0,083 y  $6 \cdot 10^{-6}$  nM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> descrito por Kousba et al. (2004) en AChE de cerebro de rata. De estos valores de  $k_i$  se obtiene un rango de valores para la  $I_{50}^{30}$  dentro de los cuales también están comprendidos los obtenidos en este trabajo (**Tabla 6.1**). Concretamente este rango es de entre 64,18 y 0,0046 nM.

Asimismo, Rosenfeld y Sultatos (2006) describieron, trabajando en hrAChE y usando AtCh como sustrato, un rango de valores de entre 0,0081 y  $5 \cdot 10^{-5}$  nM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> para la  $k_i$ , de los que se deducen unos valores para la  $I_{50}^{30}$  entre 7,702 y 0,048 nM. Al igual que en el caso anterior, los datos obtenidos de  $I_{50}^{30}$  y de  $k_i$  en este trabajo se encuentran comprendidos en el rango.

Por último, los resultados también se encuentran dentro del rango descrito por Kardos y Sultatos (2000) en AChE de cerebro de conejo, que obtuvieron una  $k_i$  de entre  $4,44 \cdot 10^4$  y  $4,44 \cdot 10^{-5}$  nM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>. De estos valores de la  $k_i$  se calculan unos para la  $I_{50}^{30}$  comprendidos entre 8,664 y 0,866 nM, de manera que estos vuelven a ser comparables con los obtenidos en los experimentos de inhibición realizados en este trabajo (**Tabla 6.1**).

Los datos de la media y la desviación estándar obtenidos en estos experimentos aparecen recogidos en la **Tabla 6.1**, junto con los de los ensayos de inhibición tras pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración.

### 6.2.2. Inhibición tras pretratamiento con AtCh y ultrafiltración.

Los resultados del experimento de inhibición a tiempo fijo con paraoxón tras pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración (**Figura 5.6**) indican la existencia de un componente sensible al inhibidor (100%) con una  $I_{50}^{30}$  media de  $0,431 \pm 0,083$  nM y una  $k_i$  media de  $9,098 \cdot 10^{-4} \pm 1,758 \cdot 10^{-4}$  nM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>.

De la misma manera que en el apartado anterior, estos resultados son comparables con los presentes en la bibliografía (Kousba et al., 2004; Rosenfield y Sultatos, 2006; Kardos y Sultatos, 2000).

Los datos de la media y la distribución estándar de los parámetros obtenidos en estos ensayos de inhibición aparecen recogidos en la **Tabla 6.1**, junto con los correspondientes a los ensayos de inhibición sin pretratamiento ni ultrafiltración discutidos en el apartado anterior.

**Tabla 6.1. Interpretación global de los parámetros obtenidos en los experimentos de inhibición de la actividad PVasa con paraoxón.** Se muestran las medias de los valores de la  $I_{50}^{30}$  y la  $k_i$  obtenidos de los experimentos independientes realizados.

|  | Enzima sin pretratar                         | Enzima pretratada                             |
|--|--|---|
| $I_{50}^{30}$ (nM)                         | $0,329 \pm 0,107$                            | $0,431 \pm 0,083$                             |
| $k_i$ (nM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ) | $1,27 \cdot 10^{-3} \pm 4,621 \cdot 10^{-4}$ | $9,098 \cdot 10^{-4} \pm 1,758 \cdot 10^{-4}$ |

### 6.2.3. Conclusiones acerca de la inhibición por paraoxón.

Como se puede observar en los resultados, los parámetros de inhibición obtenidos son muy similares entre sí y, en ambos casos, comparables con los descritos en fuentes bibliográficas, indicando que no hay diferencias significativas en la interacción de la enzima con el inhibidor organofosforado paraoxón tras la interacción de la tCh en el centro activo de la enzima.

### 6.3. Inhibición de la actividad PVasa por mipafox.

El mipafox es un fosoramidato empleado como inhibidor de esterasas, conocido por su capacidad para inducir OPIDN y utilizado con frecuencia para evaluar la actividad de la NTE.

### 6.3.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh.

Los resultados del experimento de inhibición a tiempo fijo con mipafox sin pretratamiento con AtCh (**Figura 5.3**) indican la existencia de un componente sensible al inhibidor (100%) con una  $I_{50}^{30}$  media de  $17,177 \pm 5,482 \mu\text{M}$  y una  $k_i$  media de  $2,362 \cdot 10^{-5} \pm 7,539 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (**Tabla 6.2**).

Los parámetros obtenidos en este trabajo difieren de los descritos por Kropp y Richardson (2003), que trabajaron con AChE proveniente microsomas de cerebro de pollo y AtCh como sustrato, siendo la  $k_i$  alrededor de tres veces menor y la  $I_{50}^{30}$  tres veces superior (**Tabla 6.2**). En el trabajo mencionado se describió una  $k_i$  de  $7,15 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , de la que se calcula una valor de la  $I_{50}$  de  $5,386 \mu\text{M}$ .

Los datos de la media y la desviación estándar de los datos obtenidos en estos experimentos aparecen resumidos en la **Tabla 6.2**, junto con los de los ensayos de inhibición tras pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración.

### 6.3.2. Inhibición tras pretratamiento con AtCh y ultrafiltración.

Los resultados del experimento de inhibición a tiempo fijo con mipafox tras pretratamiento con AtCh y ultrafiltración (**Figura 5.5**) indican la existencia de un componente sensible al inhibidor (100%) con una  $I_{50}^{30}$  media de  $6,389 \pm 4,092 \mu\text{M}$  y una  $k_i$  media de  $7,581 \cdot 10^{-5} \pm 4,855 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (**Tabla 6.2**).

Los parámetros obtenidos en el experimento con pretratamiento y ultrafiltración son similares con los descritos por Kropp y Richardson (2003) utilizando AChE proveniente de microsomas de cerebro de pollo y AtCh como sustrato.

Los datos de la media y la distribución estándar de los parámetros obtenidos en estos ensayos de inhibición aparecen recogidos en la **Tabla 6.2**, junto con los correspondientes a los ensayos de inhibición sin pretratamiento ni ultrafiltración discutidos en el apartado anterior.

**Tabla 6.2. Interpretación global de los parámetros obtenidos en los experimentos de inhibición de la actividad PVasa con mipafox.** Se muestran las medias de los valores de la  $I_{50}^{30}$  y la  $k_i$  obtenidos de los experimentos independientes realizados.

|  | Enzima sin pretratar                        | Enzima pretratada                           |
|--|---|---|
| $I_{50}^{30}$ ( $\mu\text{M}$ )                | $17,177 \pm 5,482$                          | $6,389 \pm 4,092$                           |
| $k_i$ ( $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) | $2,362\cdot 10^{-5} \pm 7,539\cdot 10^{-6}$ | $7,581\cdot 10^{-5} \pm 4,855\cdot 10^{-5}$ |

### 6.3.3. Conclusiones acerca de la inhibición por mipafox.

Al llevar a cabo los ensayos con muestras pretratadas con AtCh, se obtienen valores semejantes a los descritos en los experimentos de la bibliografía (Kropp y Richardson, 2003), realizados con enzima purificada. Como se ha evidenciado, los parámetros de inhibición de la enzima pretratada con AtCh y ultrafiltrada varían, de manera que esta resulta más sensible a la inhibición por mipafox tras el pretratamiento con AtCh. La inhibición se hace en ausencia de sustratos (**Figura 6.1**), por lo que estos no interfieren en la reacción de inhibición y, por lo tanto, los valores de las  $k_i$  e  $I_{50}^{30}$  no dependen del sustrato utilizado, sino que solo dependen de la naturaleza del inhibidor y son parámetros comparables con los descritos en la bibliografía.

Teniendo en cuenta esto, los resultados apoyan la idea de que la proteína recombinante pretratada con AtCh se modifica para alcanzar la configuración que tendría *in vivo*, de manera que este pretratamiento sería necesario a la hora de realizar experimentos cuyos resultados pretendan ser extrapolados a las interacciones de algunos organofosforados con las AChE *in vivo*, en los que este pretratamiento sucedería de forma natural con ACh tras el proceso de síntesis y maduración de la enzima.



**Figura 6.1. Programación típica en un experimento de inhibición con el método de tiempo fijo de fin de reacción (Estévez et. al., 2024).** La preparación con la enzima se trata con un inhibidor (primera flecha vertical) y se preincuba durante el tiempo de inhibición ( $t_i$ ). Después, el sustrato se añade (segunda flecha vertical) y se incuba durante el tiempo de sustrato ( $t_s$ ) para permitir la reacción enzima—sustrato y medir la enzima activa residual. Por último, la reacción con el sustrato se para (tercera flecha vertical) y se añade un reactivo de color antes de medir la

absorbancia. La actividad normalmente se presenta como un porcentaje de la actividad enzimática inhibida comparada con la actividad sin el inhibidor. La adición de un sustrato normalmente para la inhibición debido a la dilución y a la protección competitiva del sustrato.

#### **6.4. Actividad PVasa.**

La actividad PVasa en hrAChE tiene un comportamiento michaeliano, tal y como fue descrito por Estévez et al. (2022), por lo que la cinética de la reacción se ajustó, en todos los casos, de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten, cuya ecuación y parámetros se describen en el apartado 4.9.4 de *Materiales y métodos*.

##### **6.4.1. Actividad PVasa sin pretratamiento con AtCh.**

De los resultados del experimento de actividad PVasa sin pretratamiento con AtCh (**Figura 5.7**) se obtienen los siguientes valores cinéticos medios: una  $K_m$  de  $0,673 \pm 0,093$  mM, una  $V_{m\acute{a}x}$  de  $30,017 \pm 4,743$   $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  y una  $k_{cat}$  de  $1200,682 \pm 189,703$   $\text{min}^{-1}$ .

Los datos de la media y la distribución estándar de los parámetros obtenidos en los ensayos de actividad PVasa sin pretratamiento con AtCh aparecen recogidos en la **Tabla 6.3**, junto con los correspondientes a los ensayos de actividad PVasa con pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración.

##### **6.4.2. Actividad PVasa tras pretratamiento con AtCh y ultrafiltración.**

De los resultados del experimento de actividad PVasa tras pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración (**Figura 5.8**) se obtienen los siguientes valores cinéticos medios: una  $K_m$  de  $0,655 \pm 0,065$  mM, una  $V_{m\acute{a}x}$  de  $38,43 \pm 5,328$   $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  y una  $k_{cat}$  de  $1537,212 \pm 213,123$   $\text{min}^{-1}$ .

Los datos de la media y la desviación estándar de los parámetros obtenidos de estos experimentos con pretratamiento y ultrafiltración evidencian el aumento de actividad PVasa por la interacción con tCh descrito por Estévez et al. (2022), donde se observa un incremento de la actividad PVasa en presencia de AtCh.

Por tanto, los datos recopilados en este trabajo apoyan las observaciones realizadas, obteniendo  $V_{m\acute{a}x}$  y  $k_{cat}$  mayores en las muestras pretratadas que en aquellas no pretratadas.

Los datos de la media y la distribución estándar de los parámetros obtenidos en estos ensayos de actividad PVasa tras pretratamiento con AtCh y posterior ultrafiltración

aparecen recogidos en la **Tabla 6.3**, junto con los correspondientes a los ensayos de actividad PVasa sin pretratamiento ni ultrafiltración discutidos en el apartado anterior.

**Tabla 6.3. Interpretación global de los parámetros obtenidos en los experimentos de actividad PVasa con concentraciones variables de PV.** Se muestran las medias de los valores de la  $K_m$ , la  $V_{m\acute{a}x}$  y la  $k_{cat}$  obtenidos de los experimentos independientes realizados.

|   | Enzima sin pretratar | Enzima pretratada  |
|---|----------------------|--------------------|
| $K_m$ (mM)  | 0,673 ± 0,093        | 0,655 ± 0,065      |
| $V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) | 30,017 ± 4,743       | 38,43 ± 5,328      |
| $k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )                         | 1200,682 ± 189,703   | 1537,212 ± 213,123 |

Además, los datos obtenidos apoyan las conclusiones del trabajo de Ruz (2023), donde se proponía que la interacción de la tCh en el centro activo era permanente, lo que se demostraba llevando a cabo una ultrafiltración tras el pretratamiento con AtCh, de manera que se eliminaban del medio tanto la AtCh residual como los productos de reacción.

### **6.5. Consideraciones finales.**

De los ensayos realizados en este trabajo se puede deducir que el efecto de la AtCh sobre la actividad PV de AChEs ocurre en proteínas recombinantes humanas provenientes de líneas celulares de mamíferos y, posiblemente, en otras provenientes de bacterias.

Los ensayos de interacción con compuestos OPs nos muestran que la interacción de la tCh liberada en el centro activo de la enzima lo modifica, alterando la inhibición por algunos compuestos organofosforados, siendo la estructura química de los OPs el factor determinante de este fenómeno. De cualquier manera, el centro activo se modifica de forma permanente, tal y como se ha descrito en Ruz (2023).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la inhibición por mipafox de la hrAChE modificada por tCh es comparable a la inhibición por mipafox de la AChE de tejidos de animales, por lo que es posible que la tCh liberada produzca en la enzima un proceso de posmaduración dirigida por el sustrato y, por tanto, la modificación del centro activo por la tCh puede extenderse a las AChEs no recombinantes en etapas de posmaduración.

Por último, en este trabajo se han descrito por primera vez los datos cinéticos de la actividad PVasa en hrAChE pretratadas con AtCh.

Los resultados de este trabajo sugieren que la tCh liberada en el centro activo de la AChE podría jugar un papel importante en las reacciones con inhibidores o sustratos y podría tener importantes implicaciones en el uso de hrAChE en aplicaciones biotecnológicas. Por tanto, se aconseja, a la hora de trabajar con hrAChEs, realizar un pretratamiento con AtCh seguido de una ultrafiltración para asegurar que sus propiedades y características estructurales son lo más cercanas posible a las de la enzima *in vivo*.



## 7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.

### 7.1. Conclusiones.

- La hrAChE proveniente de células HEK se comporta de manera similar a la hrAChE proveniente de células CHO. Se sugiere que el comportamiento de la hrAChE es similar en proteínas provenientes de células de mamíferos.
- Los experimentos de inhibición con paraoxón en muestras sin pretratamiento con AtCh muestran un solo componente sensible, con unos valores de la  $k_i$  de  $1,27 \cdot 10^{-3} \pm 4,621 \cdot 10^{-4} \text{ nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  y de la  $I_{50}^{30}$  de  $0,329 \pm 0,107 \text{ nM}$ .
- Los experimentos de inhibición con paraoxón en muestras tras pretratamiento con AtCh muestran un solo componente sensible, con unos valores de la  $k_i$  de  $9,098 \cdot 10^{-4} \pm 1,758 \cdot 10^{-4} \text{ nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  y de la  $I_{50}^{30}$  de  $0,431 \pm 0,083 \text{ nM}$ .
- No se observan diferencias en la inhibición con paraoxón entre muestras pretratadas con AtCh y sin pretratar.
- Los experimentos de inhibición con mipafox en muestras sin pretratamiento con AtCh muestran un solo componente sensible, con unos valores de la  $k_i$  de  $2,362 \cdot 10^{-5} \pm 7,539 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  y de la  $I_{50}^{30}$  de  $17,177 \pm 5,482 \mu\text{M}$ .
- Los experimentos de inhibición con mipafox en muestras tras pretratamiento con AtCh muestran un solo componente sensible, con unos valores de la  $k_i$  de  $7,581 \cdot 10^{-5} \pm 4,855 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  y de la  $I_{50}^{30}$  de  $6,389 \pm 4,092 \mu\text{M}$ .
- En las muestras pretratadas con AtCh, la hrAChE resulta más sensible a la inhibición por mipafox.
- La diferencia de la interacción de los compuestos OPs con hrAChE en muestras pretratadas con AtCh depende fundamentalmente de la estructura química del inhibidor.
- La actividad PVasa de la hrAChE sigue un mecanismo de Michaelis-Menten, con una  $K_m$  de  $0,673 \pm 0,093 \text{ mM}$ , una  $V_{\text{máx}}$  de  $30,017 \pm 4,743 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$  y una  $k_{\text{cat}}$  de  $12007 \pm 1897 \text{ min}^{-1}$ .
- La actividad PVasa de la hrAChE pretratada con AtCh sigue un mecanismo de Michaelis-Menten, con una  $K_m$  de  $0,655 \pm 0,065 \text{ mM}$ , una  $V_{\text{máx}}$  de  $38,43 \pm 5,328 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$  y una  $k_{\text{cat}}$  de  $15372 \pm 2131 \text{ min}^{-1}$ .
- No se observan variaciones en la  $K_m$  entre muestras pretratadas y sin pretratar. Sin embargo, se observa un incremento en la  $k_{\text{cat}}$  y  $V_{\text{máx}}$  en muestras pretratadas.
- Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la hrAChE debe interaccionar con AtCh para tener un comportamiento similar al de la AChE no recombinante presente en organismos vivos.

- A partir de los resultados obtenidos, se aconseja pretratar la hrAChE con AtCh a la hora de realizar ensayos enfocados a aplicaciones biotecnológicas

## **7.2. Proyecciones futuras.**

- Estudiar muestras de hrAChE pretratadas con AtCh y ACh con espectrometría de masas para ver si hay cambios irreversibles en la estructura de la hrAChE.
- Realizar estudios con muestras pretratadas con AtCh y ACh de colinesterasas recombinantes y no recombinantes de diferentes especies, incluyendo recombinantes de origen bacteriano.



## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J.* 1953;53(1):110-117. doi:10.1042/bj0530110
- de Almeida Neves PA, Silva E, Beirão PS. Microcalorimetric study of acetylcholine and acetylthiocholine hydrolysis by acetylcholinesterase. *Adv Enzyme Res.* 2017;5(1):1–12. doi:10.4236/aer.2017.51001.
- Casida JE, Durkin KA. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol Interact.* 2013;203(1):221-225. doi:10.1016/j.cbi.2012.08.002
- Estévez J, Pizarro L, Marsillach J, Furlong C, Sogorb MA, Richter R, Vilanova E. Inhibition with simultaneous spontaneous reactivation and aging of acetylcholinesterase by organophosphorus compounds: demeton-S-methyl as a model. *Chem Biol Interact.* 2024;387:110789. doi:10.1016/j.cbi.2023.110789
- Estévez J, Terol M, Sogorb MÁ, Vilanova E. Interactions of human acetylcholinesterase with phenyl valerate and acetylthiocholine: Thiocholine as an enhancer of phenyl valerate esterase activity. *Chem Biol Interact.* 2022;351:109764. doi:10.1016/j.cbi.2021.109764
- Estevez J, Vilanova E. Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: esterases and organophosphorus compounds. *Crit Rev Toxicol.* 2009;39(5):427-448. doi:10.1080/10408440802412309
- Johnson MK. A phosphorylation site in brain and the delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem J.* 1969;111(4):487-495. doi:10.1042/bj1110487
- Johnson MK. The delayed neuropathy caused by some organophosphorus esters: mechanism and challenge. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1975;3(3):289-316. doi:10.3109/10408447509079861
- Kardos SA, Sultatos LG. Interactions of the organophosphates paraoxon and methyl paraoxon with mouse brain acetylcholinesterase. *Toxicol Sci.* 2000;58(1):118-126. doi:10.1093/toxsci/58.1.118
- Kousba AA, Sultatos LG, Poet TS, Timchalk C. Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. *Toxicol Sci.* 2004;80(2):239–248. doi:10.1093/toxsci/kfh163
- Kovarik Z, Radić Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Taylor P. Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochem J.* 2003;373(Pt 1):33-40. doi:10.1042/BJ20021862
- Kropp T, Richardson R. Relative inhibitory potencies of chlorpyrifos oxon, chlorpyrifos methyl oxon, and mipafox for acetylcholinesterase versus neuropathy target esterase. *J Toxicol Environ Health A.* 2003;66(12):1145–1157. doi:10.1080/15287390306360

- Lockridge O, Duysen EG, Voelker T, Thompson CM, Schopfer LM. Life without acetylcholinesterase: the implications of cholinesterase inhibitor toxicity in AChE-knockout mice. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005;19(3):463-469. doi:10.1016/j.etap.2004.12.008
- Reiner E, Simeon V. Competition between substrates for acetylcholinesterase and cholinesterase. *Biochim Biophys Acta.* 1977;480(1):137-142. doi:10.1016/0005-2744(77)90328-x
- Romo M. Actividad fenilvalerato esterasa en la butirilcolinesterasa humana [Trabajo de Fin de Grado]. Elche, España: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2017.
- Rosenfeld C, Sultatos L. Concentration-dependent kinetics of acetylcholinesterase inhibition by the organophosphate paraoxon. *Toxicol Sci.* 2006;90(2):460–469. doi:10.1093/toxsci/kfj094
- 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 esterasa en la acetilcolinesterasa humana recombinante [Trabajo de Fin de Grado]. Elche, España: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2018.
- Tōugu V. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. *Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents.* 2001;1(2):155–170. doi:10.2174/1568015013358536.