



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Grado en Biotecnología

Curso 2025/2026

Instituto de Bioingeniería, Área de Toxicología

Trabajo de Fin de Grado

**Interacción de inhibidores irreversibles de las
actividades fenilvaleratoesterasa y fenilacetatoesterasa
en acetilcolinesterasa humana pretratada con
acetiltiocolina.**

Lola Godoy Martínez

Estudiante de Biotecnología

Tutor: Jorge Estévez Domènech

Elche, Julio 2026

ÍNDICE

0. RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Compuestos organofosforados inhibidores de esterasas	5
1.2. Carboxilesterasas	7
1.2.1. Colinesterasas	8
1.3. Sustratos de AChE	9
1.3.1. Acetilcolina y acetilcolina	9
1.3.2. Fenilvalerato y fenilacetato	10
1.4. Inhibidores organofosforados	10
1.4.1. Mipafox y metamidofos	10
2. ANTECEDENTES	11
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Tampones y reactivos utilizados	12
4.2. Material biológico	13
4.3. Equipos utilizados	13
4.4. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa	13
4.5. Inhibición a tiempo fijo de la actividad FAc esterasa	14
4.6. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa y FAc esterasa tras pretratar con AtCh	14
4.7. Modelos matemáticos y análisis de datos	15
4.7.1. Ensayos de inhibición	15
5. RESULTADOS	17
5.1. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa	17
5.1.1. Inhibición por mipafox	17
5.1.2. Inhibición por metamidofos	19
5.2. Inhibición a tiempo fijo de la actividad FAc esterasa	21
5.2.1. Inhibición por mipafox	21
5.2.2. Inhibición por metamidofos	23
6. DISCUSIÓN	25
6.1. Inhibición por mipafox	25
6.1.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh	25
6.1.2. Inhibición con pretratamiento con AtCh y ultrafiltración	26
6.1.3. Conclusiones acerca de la inhibición con mipafox	26
6.2. Inhibición por metamidofos	28
6.2.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh	28
6.2.2. Inhibición con pretratamiento con AtCh y ultrafiltración	29
6.2.3. Conclusiones acerca de la inhibición con metamidofos	29
6.3. Consideraciones finales	30
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS	31
7.1. Conclusiones	31
7.2. Proyecciones a futuro	32
8. BIBLIOGRAFÍA	33

0. RESUMEN

Ciertos compuestos organofosforados (OPs) se emplean como insecticidas y biocidas, dirigidos específicamente contra la enzima acetilcolinesterasa (AChE). En su forma recombinante humana (hrAChE), esta enzima exhibe actividad tanto de fenilacetato esterasa (FAc esterasa) como de fenilvalerato esterasa (PVasa). Asimismo, se ha observado que al incubar la enzima con acetiltiocolina (AtCh), se incrementa su actividad PVasa. La hipótesis actual sugiere un mecanismo tipo “caballo de Troya”, donde la tiocolina liberada en la reacción modifica estructuralmente el centro activo. En trabajos previos observaron diferencias de la sensibilidad en la inhibición con mipafox de la actividad PVasa en muestras pretratadas y sin pretratar.

Este trabajo se corrobora las observaciones mostradas en trabajos anteriores y demuestra como la modificación del centro activo por la tCh también puede alterar la inhibición FAc esterasa producida por algunos compuestos organofosforados fosforamidatos. Aportando de esta manera que la naturaleza del inhibidor y el sustrato son muy importantes para explicar las diferencias en muestras pretratadas y no con AtCh.

Palabras clave: acetilcolinesterasa (AChE), fenilvalerato (PV), fenilacetato (FAc), acetilcolina (AtCh)

ABSTRACT

Certain organophosphorus compounds (OPs) are used as insecticides and biocides, specifically targeting the enzyme acetylcholinesterase (AChE). In its recombinant human form (hrAChE), this enzyme exhibits both phenylacetate esterase (FAc esterase) and phenylvalerate esterase (PVasa) activity. Furthermore, it has been observed that incubating the enzyme with acetylthiocoline (AtCh) increases its PVasa activity. The current hypothesis suggests a ‘Trojan horse’-type mechanism, whereby the thiocoline released during the reaction structurally modifies the active site. Previous studies observed differences in the sensitivity of PVasa activity to inhibition by mipafox between pre-treated and untreated samples.

This study corroborates the observations reported in previous work and demonstrates how the modification of the active site by AtCh can also alter the inhibition of FAc esterase produced by certain organophosphorus phosphoramidate compounds. It thus contributes to the understanding that the nature of the inhibitor and the substrate are crucial in explaining the differences between samples pre-treated and not pre-treated with AtCh.

Keywords: acetylcholinesterase (AChE), phenyl valerate (PV), phenyl acetate (FAc), acetylthiocholine (AtCh)

ABREVIATURAS

AAP Aminoantipirina

AChE Acetilcolinesterasa

DMF Dimetilformamida

AtCh Acetiltiocolina

tCh Tiocolina

OP Organofosforado

FAc Fenilacetato

PV Fenilvalerato

PVasa Fenilvalerato esterasa

FAc esterasa Fenilacetato esterasa

BSA Albúmina de suero bovino

SDS Dodecilsulfato sódico

TP Tampón fosfato

FeCN Ferrocianuro potásico

HEK Células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293)



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Compuestos organofosforados inhibidores de esterasas

Los denominados compuestos organofosforados (OPs) agrupan una extensa familia de moléculas sintéticas, entre las que se encuentran los ésteres, amidas y derivados tiólicos de los ácidos fosfónico y fosfórico. Aquellos OPs son capaces de bloquear la acción de las esterasas que comparten una arquitectura molecular característica como se indica en la **Figura 1.1**: un átomo central de fósforo unido mediante doble enlace a un oxígeno ($P = O$) o a un azufre ($P = S$). Asimismo, cuentan con una porción denominada “grupo saliente” (representada habitualmente como X), cuya naturaleza puede ser alifática, aromática o heterocíclica. El mecanismo de inhibición de estas sustancias ocurre cuando dicho grupo saliente es reemplazado mediante una sustitución nucleofílica por el oxígeno del residuo $-OH$ presente en el sitio activo de la proteína diana.

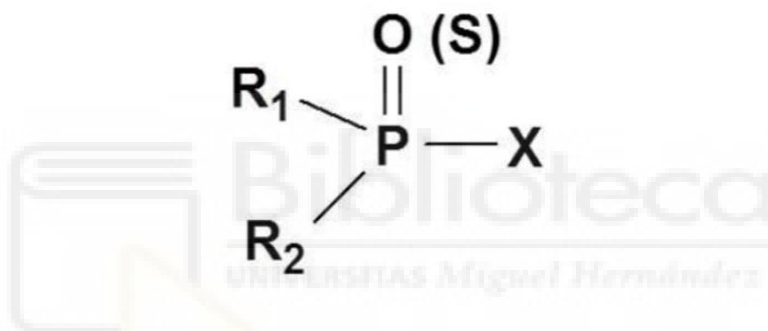


Figura 1.1. Estructura química de los compuestos organofosforados. Los sustituyentes R_1 y R_2 corresponden por lo general a cadenas alquílicas o anillos arílicos sencillos, mientras que la entidad X denota el “grupo saliente”, caracterizado por una notable diversidad estructural.

En el ámbito agrícola, las OPs han encontrado una amplia aplicación como agentes insecticidas, acaricidas y fungicidas, orientados principalmente al control de plagas y a la erradicación de vectores de diversas patologías (Instituto Nacional de Toxicología, 1996). A pesar de que se observa una tendencia a la baja en su empleo, especialmente en las naciones desarrolladas, sus notables niveles de eficacia y su competitividad económica sugieren que mantendrán su vigencia en el mercado durante las próximas décadas (Casida y Durkin, 2013).

A nivel molecular, el modo de acción que desencadena los efectos biológicos de un compuesto organofosforado se fundamenta en la interacción con el residuo hidroxilo ($-OH$) de una proteína diana. Este proceso deriva en la inactivación de las esterasas a través de una reacción de fosforilación, un mecanismo bioquímico uniforme y compartido por este grupo de enzimas, cuyo esquema se detalla en la **Figura 1.2**.

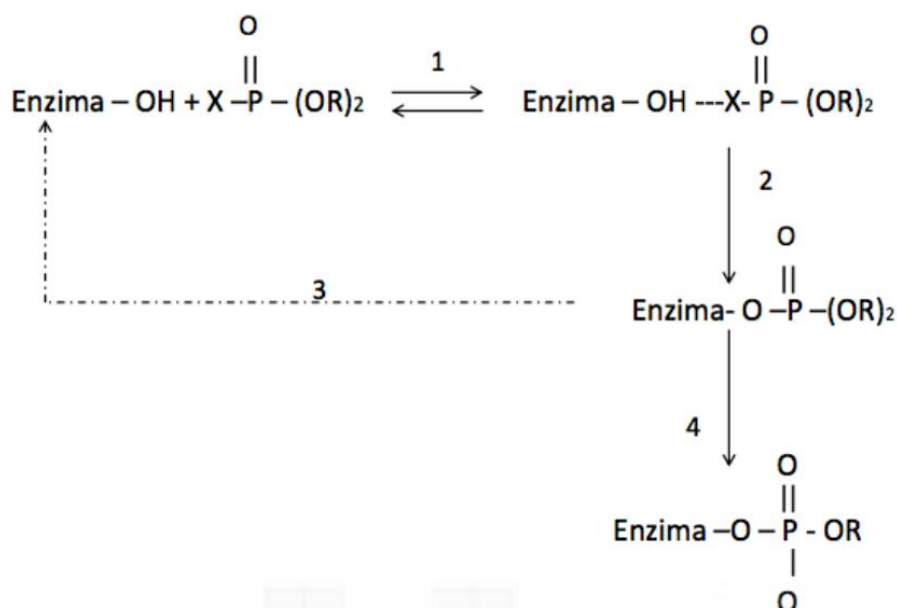


Figura 1.2. Mecanismo general de inhibición de esterasas por organofosforados (OPs). Tras la asociación inicial en forma de complejo tipo Michaelis entre la entidad enzimática y el OP (1), ocurre la fosforilación de un resto de serina en el sitio activo, acompañada de la liberación del grupo saliente X (2). A partir de este intermediario, el sistema puede evolucionar hacia dos escenarios distintos: la ruta de reactivación (3), mediante la cual se restituye la funcionalidad de la enzima de manera espontánea o mediada por agentes nucleofílicos; o bien, el proceso de envejecimiento (4), caracterizado por la ruptura del enlace $R-O-P$, la escisión de un sustituyente R y la consecuente generación de un residuo fosfórico anicónico (Johnson, 1975).

Las manifestaciones clínicas derivadas del contacto con compuestos OP se encuentran fuertemente condicionadas por una interacción de factores, entre los que destacan la modalidad de la exposición (ya sea de carácter agudo o crónico), la magnitud de la dosis o concentración, y las propiedades químicas particulares de los agentes involucrados, lo que define su perfil toxicológico (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 1999). En el organismo humano, se ha determinado que el impacto de los OP radica en su capacidad para fosforilar esterasas esenciales, un fenómeno que desencadena un amplio espectro de patologías neurotóxicas. En la **Tabla 1.1** se sistematizan los efectos nocivos de estas sustancias en función de la enzima diana que resulta inhibida, pudiendo sintetizarse su actividad tóxica en los siguientes puntos:

- Inactivación de la acetilcolinesterasa (AChE) en el sistema nervioso, lo que desencadena manifestaciones de toxicidad inmediata.
- Inhibición de la esterasa diana de neuropatía (NTE), responsable de efectos neurotóxicos de aparición tardía. El bloqueo de esta enzima, sumado a su posterior proceso de envejecimiento, da origen a la neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN) (Johnson, 1969).

- Alteraciones multisistémicas en órganos como el hígado, riñón, pulmón, médula ósea y el sistema inmune, mediadas por vías fisiopatológicas que aún no se han esclarecido por completo.

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

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

1.2. Carboxilesterasas

Dentro del grupo de las esterasas, las carboxilesterasas destacan por su actividad catalítica en la hidrólisis de enlaces éster carboxílicos. De acuerdo con la clasificación fundamental propuesta por Aldridge (1953), estas enzimas se dividen en base a su reactividad ante los organofosforados en las siguientes subfamilias:

- Las **A-esterasas** conservan su actividad hidrolítica sobre los ésteres carboxílicos y los OPs debido a que no experimentan procesos de inhibición por estos últimos.
- Las **B-esterasas** son capaces de hidrolizar ésteres carboxílicos, pero susceptibles a una inactivación irreversible inducida por su unión a los OPs.
- Las **C-esterasas** son aquellas que muestran una neutralidad completa, careciendo de afinidad o interacción con los compuestos OPs.

1.2.1. Colinesterasas

Dentro de las B-esterasas, las colinesterasas (ChEs) se definen como serín hidrolasas que presentan un residuo de serina catalítica en su sitio activo. Su función principal es la hidrólisis de ésteres de colina (como ACh, BuCh o succinilcolina), mostrando su afinidad predominante por el neurotransmisor acetilcolina (ACh), dadas sus elevadas concentraciones en las uniones neuromusculares y en las regiones de señalización colinérgica del sistema nervioso central.

Atendiendo a los criterios de especificidad de sustrato descritos por Kovarik et al. (2003), los vertebrados expresan dos isoformas distintas.

- **Acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7)**, representada en la **Figura 1.3**, es la responsable directa de la terminación del impulso nervioso colinérgico en la hendidura sináptica y la placa motora.

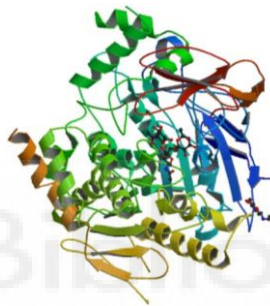


Figura 1.3. Estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa.

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

- **Butirilcolinesterasa (BuChE, EC 3.1.1.8)**, representada en la **Figura 1.4**, es conocida como colinesterasa plasmática o pseudocolinesterasa. A diferencia de la AChE, su rol fisiológico permanece parcialmente indeterminado; si bien se asocia a procesos de detoxificación celular, su ausencia o polimorfismos nulos no comprometen de forma aparente la viabilidad del organismo (Lockridge et al., 2005).

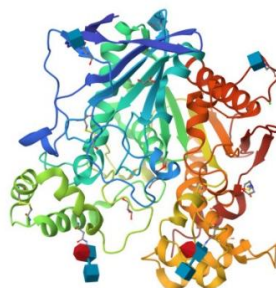


Figura 1.4. Estructura tridimensional de la butirilcolinesterasa.

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

1.3. Sustratos de AChE

La enzima AChE está catalogada como una enzima con un nivel de evolución óptimo, dado que las etapas moleculares de su ciclo catalítico, las cuales comprenden la asociación del sustrato, los cambios químicos y la liberación del producto, se suscitan a velocidades análogas, alcanzando un estado cercano a la perfección cinética (Tougu, 2001). El rasgo físico más distintivo de las colinesterasas radica en la arquitectura de su sitio activo, idónea para atraer y albergar la naturaleza catiónica de su sustrato nativo. En este sentido, las fuerzas electrostáticas establecidas entre la proteína y las cargas positivas del ligando ejercen una función determinante en los procesos de reconocimiento y acoplamiento, tanto de sustratos como de agentes inhibidores. No obstante, al evaluar la capacidad catalítica global de la enzima, la magnitud de estas interacciones electrostáticas no debe sobredimensionarse; la AChE exhibe una notable promiscuidad de sustrato, siendo capaz de procesar moléculas electroquímicamente neutras con elevadas velocidades de reacción.

1.3.1. Acetiltiocolina y acetilcolina

La AChE posee la capacidad de hidrolizar sustratos con carga positiva como la acetilcolina (ACh) y la acetiltiocolina (AtCh), indicadas en la **Figura 1.5**. La degradación del sustrato nativo, el cual es la ACh, transcurre a una velocidad excepcionalmente elevada, aproximándose al límite difusional teórico impuesto para las serín hidrolasas. No obstante, en el ámbito experimental se emplea preferentemente la AtCh, esto se debe a que la presencia del grupo tiol reacciona permitiendo la monitorización directa y en tiempo real de los productos de reacción mediante técnicas espectrofotométricas. A este respecto, un análisis microcalorimétrico desarrollado por Alves de Almedia (2017) en la Universidad de Minas Gerais determinó que la hidrólisis de ambos compuestos exhibe discrepancias sutiles en sus constantes cinéticas, derivadas de una afinidad diferencial con el sitio activo de la enzima, siendo superior la constante de afinidad hacia la ACh. A pesar de estas variaciones, dicho estudio valida el uso del ensayo espectrofotométrico convencional, concluyendo que, si bien los parámetros cinéticos de la ACh y la AtCh no son idénticos, resultan estrechamente comparables y asumibles dentro del margen de error metodológico.

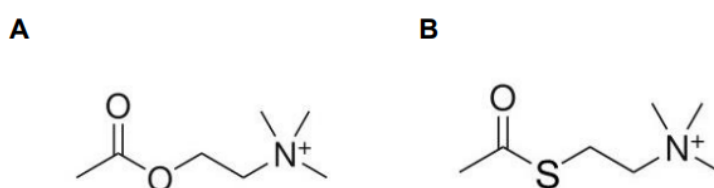


Figura 1.5. Estructura de la ACh (A) y AtCh (B).

1.3.2. Fenilvalerato y fenilacetato

El fenilvalerato (PV), cuya estructura se indica en la **Figura 1.6**, constituye un sustrato de carga neutra empleado de manera estandarizada en la determinación de la NTE. A día de hoy, se ha documentado que tanto la butilcolinesterasa humana (hBuChE) como la acetilcolinesterasa humana recombinante (hrAChE) exhiben capacidad hidrolítica frente a este compuesto, describiéndose así una actividad intrínseca tipo fenilvalerato esterasa (PVasa) en ambas macromoléculas (Mangas et al., 2017; Estévez et al., 2022).

De manera análoga, el fenilacetato (FAc) representado en la **Figura 1.6**, es otro sustrato neutro frecuentemente integrado en los ensayos de caracterización funcional de la hAChE (Reiner y Simeon, 1977). Este hecho constata que dicha enzima posee de igual modo una actividad fenilacetato esterasa perfectamente descrita en la literatura.

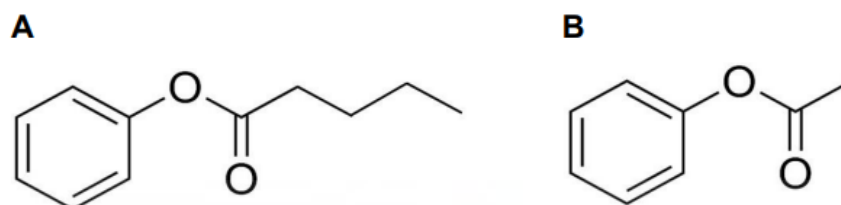


Figura 1.6. Estructura de PV (A) y FAc (B).

1.4. Inhibidores organofosforados

1.4.1. Mipafox y metamidofos

El mipafox (**Figura 1.7**) (fluoruro de N,N'-diisopropilfosfordiamida MPFX) se utilizó como un insecticida organofosforado que se asocia con la toxicidad colinérgica aguda y posterior neurotoxicidad retardada en humanos. Usado para discriminar NTE de otras carboxilesterasas. Actúa como inhibidor irreversible de la acetilcolinesterasa (Estévez et al., 2004; Mangas et al., 2012).

El metamidofos (**Figura 1.7**) (fosforamidotioato de O,S-dimetilo) es un insecticida-acaricida organofosforado altamente utilizado en agricultura y caracterizado por la elevada peligrosidad ya que actúa como un potente inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (Iannacone et al., 2008; Wang et al., 2009). Se identifica principalmente como el metabolito activo y producto de degradación del acefato, poseyendo una toxicidad mayor a este último. Químicamente, se caracteriza por ser una sustancia hidrofílica conocida por causar un síndrome colinérgico agudo, por lo que su uso como plaguicida agrícola está prohibido en varios países.

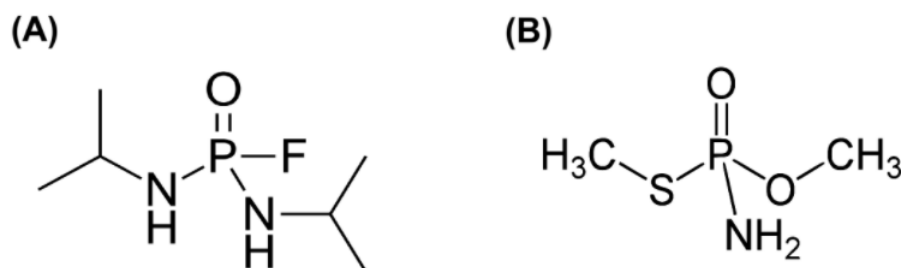


Figura 1.7. Estructura mipafox (A) y metamidofos (B).

Ambos están considerados como compuestos organofosforados fosforamidatos.

2. ANTECEDENTES

Benalal (2025) analizó la actividad PVasa en AChE humana pretratada y sin pretratar con AtCh proveniente de células HEK frente a distintos inhibidores organofosforados, concretamente paraoxón y mipafox.

Los resultados mostraron que, en presencia de paraoxón, la respuesta inhibitoria fue comparable entre las muestras pretratadas y no pretratadas. En cambio, en presencia de mipafox, la enzima pretratada presentó una sensibilidad inhibitoria notablemente mayor, evidenciando que el pretratamiento alteraba la inhibición con mipafox.

3. OBJETIVOS

Objetivo general.

El objetivo general de este trabajo es comprobar si hay diferencias de sensibilidad de las actividades carboxilesterasas con compuestos fosforamidatos, como se ha observado en trabajos anteriores.

Objetivos específicos.

- Comprobar si la modificación del centro activo por AtCh modifica la interacción de la hrAChE con compuestos fosforamidatos, utilizando como compuestos modelo el mipafox y el metamidofos, y con el carboxilester fenilvalerato (PV) como sustrato.
- Comprobar si la modificación del centro activo por AtCh modificación la interacción de la hrAChE con compuestos fosforamidatos, utilizando como compuestos modelo el mipafox y el metamidofos, y con el carboxilester fenilacetato (FAc) como sustrato.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tampones y reactivos utilizados

- Albúmina de suero bovino (BSA). (Pureza 96%) se obtuvo de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Se disolvió una concentración 0,1% de albúmina en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 y se conservó en nevera a 4 °C.
- Tampón fosfato pH 7,4 (TP). Dihidrofostato de sodio monohidratado 0,1 M pH 7,4. Se preparó una disolución de dihidrofostato de sodio monohidratado en agua destilada y se ajustó el pH a 7,4 usando NaOH concentrado. Se conservó a temperatura ambiente.
- Dodecilsulfato sódico (SDS) y 4-aminoantipirina (AAP). Se adquirieron de grado analítico (PanReac). Se preparó una disolución SDS 2% - AAP 10 mM en tampón Tris 50 mM/EDTA 1 mM a pH 8,0. Se almacenó a temperatura ambiente en botella de topacio para evitar la degradación de la AAP, debido a su sensibilidad a la luz.
- Ferrocianuro 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.
- 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). Se conservó en nevera a 4 °C, siendo estable durante meses. Para su uso, se prepararon disoluciones a la concentración necesaria para el estudio justo antes de su utilización.
- Fenilacetato (FAC). Se adquirió de la empresa Panreac Química S.A. Para los ensayos de actividad FAC esterasa se preparó una disolución de concentración 1,7 M en N-dimetilformamida (DMF). Se conservó en nevera a 4 °C, siendo estable durante meses. Para su uso, se prepararon disoluciones a la concentración necesaria para el estudio justo antes de su utilización.
- Yoduro de acetilcolina (AtCh). (Pureza superior al 99%). Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. Para su utilización 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.
- N,N-Diisopropil fosforamido fluoridato (mipafox). (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.
- Tiofosforamidato de O,S-dimetilo (metamidofos). (Pureza superior al 99%) Se adquirió de Merck KGaA. Se partió de un stock de 1 M en DMF, conservado en congelador a -20 °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 HEK. Se adquirió de Prospecc 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).
- 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. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa

El ensayo tuvo lugar a 37 °C gracias al uso de termobloque, de manera que la enzima estuviera a su temperatura óptima. En minitubos de 1mL se dispusieron 90 µL de una disolución hAChE (concentración 2,5 nM en el volumen de reacción) o 90 µL de BSA 0,1% (blancos). Se preincubaron durante 30 minutos con 10 µL de una disolución de inhibidor.

El ensayo se realizó con 18 concentraciones de dos inhibidores distintos: mipafox o metamidofos. Para ello, se prepararon las siguientes concentraciones (en volumen de reacción):

- Mipafox o metamidofos (0 – 100 µM): 0 – 0,2 – 0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 3 – 4 – 6 – 7 – 8 – 10 – 15 – 20 – 30 – 40 – 50 – 100 µM

Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 90 µL de una disolución PV (concentración 3mM en volumen de reacción). Se dejó reaccionar durante 10 minutos y tras ese tiempo se añadieron 90 µL de SDS 2%/ AAP 10 mM, para detener la reacción. Después, se añadieron 45 µL de ferrocianuro potásico a cada minitubo y se transfirieron 250 µL a microplaca de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 510 nm.

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

4.5. Inhibición a tiempo fijo de la actividad FAc esterasa

El ensayo tuvo lugar a 37 °C mediante termobloque, de manera similar a lo indicado en el punto 4.4. En minitubos de 1 mL se dispusieron 90 µL de una disolución hrAChE (concentración 0,15 nM en volumen de reacción) o 90 µL de BSA 0,1% (blancos). Se preincubaron durante 30 minutos con 10 µL de una disolución de inhibidor.

El ensayo se realizó con 18 concentraciones de dos inhibidores distintos: mipafox o metamidofos. Para ello, se prepararon las concentraciones que se indican en el punto 4.4.

Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 90 µL de una disolución PV (concentración 1mM en volumen de reacción). Se dejó reaccionar durante 10 minutos y tras ese tiempo se añadieron 90µL de SDS 2%/ AAP 10 mM, para parar la reacción. Después, se añadieron 45µL de ferrocianuro potásico a cada minitubo y se transfirieron 250 µL a microplaca de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 510 nm.

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

4.6. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa y FAc esterasa tras pretratar con AtCh

Pretratamiento con AtCh:

Se utilizaron termobloques de aluminio a 37 °C (temperatura óptima de la enzima). Se dejó reaccionar durante 20 minutos 260 µL de una disolución de hrAChE en BSA 0,1% con una concentración de 76 nM para para el experimento realizado con PV y una concentración de 5 nM para el experimento con FAc; junto con 260 µL de una disolución 2 mM de AtCh en agua destilada, de esta manera la AtCh se hidrolizaba totalmente. Pasado el tiempo, se realizó la ultrafiltración.

Ultrafiltración y posterior dilución:

Los 500 µL de disolución de AChE y AtCh preparada en el punto anterior (Pretratamiento con AtCh) se colocaron en filtros (Ultracel 10K de Milipore) previamente lavados con TP pH 7,4. Los filtros se centrifugaron a 14000 x g durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C para llegar a una concentración de productos menor de 0,1 µM. Pasada cada centrifugación, el material retenido en cada filtro se llevó a un volumen de 500 µL con TP pH 7,4 y se centrifugaba nuevamente. Terminada la cuarta centrifugación, se llevaba a 500µL con TP pH 7,4 para luego diluir en BSA 0,1% hasta el volumen necesario en el ensayo de actividad, en el cual se utilizó una concentración hrAChE de 2,5 nM en volumen de reacción para los

ensayos con PV y una concentración de 0,15 nM en volumen de reacción para los ensayos con FAc.

Medida de la inhibición tras pretratamiento y ultrafiltración:

La disolución obtenida de la ultrafiltración se utilizó para hacer un ensayo como el descrito en el punto 4.4.

Al igual que se ha explicado en los apartados anteriores, se realizó un ensayo a tiempo fijo en termobloque a 37 °C. Dentro de minitubos de 1 mL se dispusieron 90 µL de la hrAChE pretratada y ultracentrifugada o 90 µL de BSA 0,1% (blancos). Se preincubaron durante 30 minutos con 10 µL de una disolución inhibidora de mipafox o metamidofos (concentraciones indicadas en el punto 4.4).

Pasada la incubación, se añadieron 90 µL de una disolución de PV preparada en agua destilada (concentración 3 mM en volumen de reacción) y se dejó reaccionar 10 minutos. Tras ese tiempo, se pararon las reacciones con 90µL de una disolución SDS 2%/AAP 10mM y se añadieron 45 µL de ferrocianuro potásico. Luego, se transfirieron 250 µL del contenido a una microplaca de 96 pocillos para medir absorbancia a 510 nm.

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

4.7. Modelos matemáticos y análisis de datos

Todos los resultados que se han obtenido fueron procesados en el programa SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc, Chicago, USA) para Windows, para poder extraer la información tanto cualitativa como cuantitativa sobre los mecanismos de interacción entre enzimas, sustratos e inhibidores. Además, ha permitida la creación de gráficos directos lineales, gráficos secundarios e informes numéricos.

4.7.1. Ensayos de inhibición

Para el estudio de los ensayos, se utilizaron los modelos descritos por Estévez y Vilanova (2009). En las inhibiciones de múltiples componentes enzimáticos, la actividad se ajustó mediante la expresión general:

$$E = E1_0 \cdot e^{-k_1 \cdot I} + E2_0 \cdot e^{-k_2 \cdot I} + E3_0 \cdot e^{-k_3 \cdot I} + \dots + E_R$$

En esta expresión, E_0 representa el control de actividad inicial (sin inhibidor). La E representa la actividad para una concentración de inhibidor I . Dentro de la expresión, los componentes

E_1 , E_2 y E_3 representan las fracciones relativas de los componentes sensibles; mientras que los componentes k_1 , k_2 y k_3 son las constantes exponenciales asociadas a dichos componentes. Por último, el término E_R refleja la fracción resistente, es decir, la actividad residual que permanece incluso a altas concentraciones de inhibidor.

Para el cálculo de la IC_{50}^{30} , se aplicó la siguiente fórmula: $\frac{\ln 2}{k'_1}$, siendo $k'_1 = k_i \cdot t \cdot I$ y considerando como tiempo (t) de incubación 30 minutos.

En cada ensayo de inhibición, los datos obtenidos de los experimentos se ajustaron a uno de los siguientes modelos matemáticos:

- Un componente sensible (**Figura 4.1**):

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

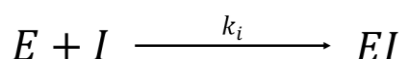


Figura 4.1. Representación de la ecuación de inhibición que tiene lugar con un único componente sensible.

- Un componente sensible y uno resistente:

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

Terminado el ajuste, se realizó el test de la F utilizando el programa SigmaPlot 14.0 para determinar si un modelo más complejo mejoraba significativamente el ajuste respecto a otro con menos parámetros.

5. RESULTADOS

5.1. Inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa

5.1.1. Inhibición por mipafox

5.1.1.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh

Para el estudio de inhibición con mipafox se llevaron a cabo cuatro experimentos. Un ejemplo de curva que mejor se ajustaban según el test de la F se muestran en la **Figura 5.1** y los parámetros definidos de los ajustes de los datos experimentales en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Media, desviación estándar e intervalo de confianza obtenidos para los distintos parámetros y componentes de la actividad PVasa de la hrAChE tras el ajuste de los datos experimentales mostrados en la **Figura 5.1**. E_1 indica el porcentaje del componente sensible, E_R indica el porcentaje de componente resistente, k_i corresponde a la constante de inhibición y IC_{50}^{30} representa la concentración de inhibición que se necesita para reducir la actividad un 50% a los 30 minutos de reacción entre proteína e inhibidor. Indicado entre paréntesis se encuentra el intervalo de confianza (95%) de cada uno de los componentes.

	$E_1 \pm SD$	$E_R \pm SD$
	$92,824 \pm 2,262$ (90,608 – 95,041)	$7,176 \pm 2,262$ (4,959 – 9,392)
k_i ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$) $\pm SD$ (n=4)	$8,993 \cdot 10^{-5} \pm 6,118 \cdot 10^{-6}$ ($8,394 \cdot 10^{-5} - 9,593 \cdot 10^{-5}$)	
IC_{50}^{30} (μM) $\pm SD$ (n=4)	$7,733 \pm 0,508$ (7,236 – 8,231)	

Como se observa, el modelo para ajustar los datos experimentales según el test de la F, fue el modelo de un componente sensible y otro resistente a la inhibición.

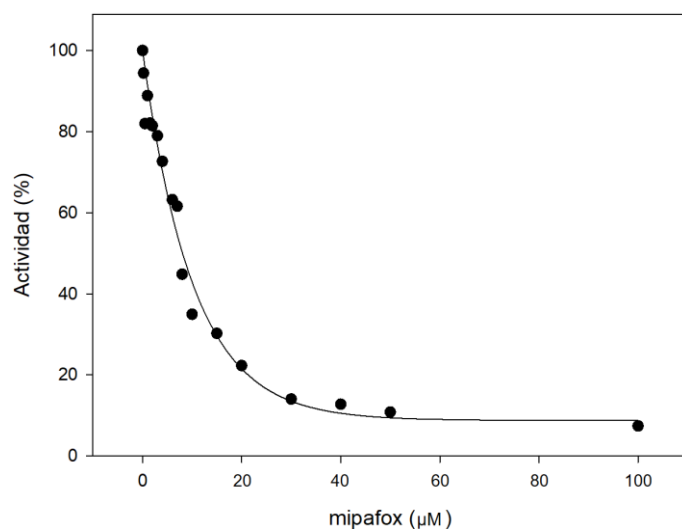


Figura 5.1. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa de la hrAChE a distintas concentraciones de mipafox. El procedimiento del ensayo se realizó como está indicado en el apartado de *Materiales y métodos*. Los valores de actividad se encuentran expresados en porcentaje respecto a la muestra control, que contenía 0 μM de inhibidor.

5.1.1.2. Inhibición con pretratamiento con AtCh

Para el estudio de inhibición con mipafox se llevaron a cabo cuatro experimentos. Un ejemplo de curva que mejor se ajustaban según el test de la F se muestran en la **Figura 5.2** y los parámetros definidos de los ajustes de los datos experimentales en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2. Media, desviación estándar e intervalo de confianza obtenidos para los distintos parámetros y componentes de la actividad PVasa de la hrAChE tras el ajuste de los datos experimentales mostrados en la Figura 5.2. E_1 indica el porcentaje del componente sensible, E_R indica el porcentaje de componente resistente, k_i corresponde a la constante de inhibición y IC_{50}^{30} representa la concentración de inhibición que se necesita para reducir la actividad un 50% a los 30 minutos de reacción entre proteína e inhibidor. Indicado entre paréntesis se encuentra el intervalo de confianza (95%) de cada uno de los componentes.

	$E_1 \pm SD$	$E_R \pm SD$
	$97,452 \pm 2,545$ (94,958 – 99,945)	$2,548 \pm 2,545$ (0,055 – 5,042)
k_i ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$) $\pm SD$ (n=4)	$1,554 \cdot 10^{-4} \pm 3,379 \cdot 10^{-5}$ ($1,223 \cdot 10^{-4} - 1,885 \cdot 10^{-4}$)	
IC_{50}^{30} (μM) $\pm SD$ (n=4)	$4,597 \pm 0,850$ (3,765 – 5,430)	

Como se observa, el modelo para ajustar los datos experimentales según el test de la F, fue el modelo de un componente sensible y otro resistente a la inhibición.

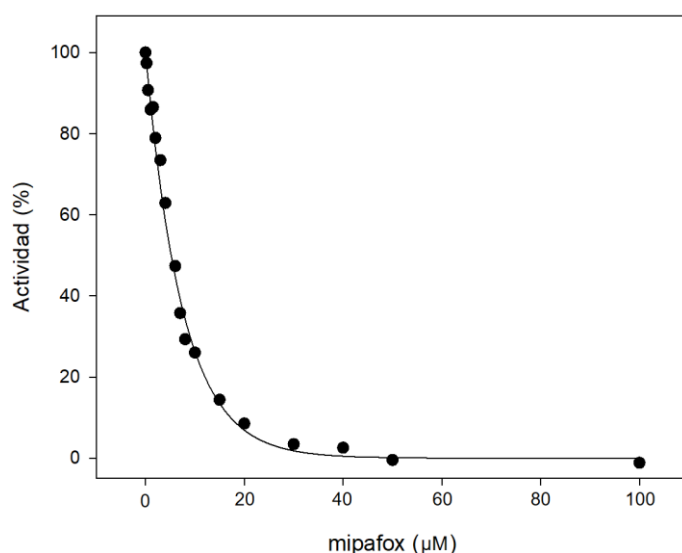


Figura 5.2. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa de la hrAChE tras su pretratamiento con AtCh y sometida a distintas concentraciones de mipafox. El procedimiento del ensayo se realizó como está indicado en el apartado de *Materiales y métodos*. Los valores de actividad se encuentran expresados en porcentaje respecto a la muestra control, que contenía 0 μM de inhibidor.

5.1.2. Inhibición por metamidofos

5.1.2.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh

Para el estudio de inhibición con metamidofos se llevaron a cabo tres experimentos. Un ejemplo de curva que mejor se ajustaban según el F test se muestran en la **Figura 5.3** y los parámetros definidos de los ajustes de los datos experimentales en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3. Media, desviación estándar e intervalo de confianza obtenidos para los distintos parámetros y componentes de la actividad PVasa de la hrAChE tras el ajuste de los datos experimentales mostrados en la **Figura 5.3**. E_1 indica el porcentaje del componente sensible, E_R indica el porcentaje de componente resistente, k_i corresponde a la constante de inhibición y IC_{50}^{30} representa la concentración de inhibición que se necesita para reducir la actividad un 50% a los 30 minutos de reacción entre proteína e inhibidor. Indicado entre paréntesis se encuentra el intervalo de confianza (95%) de cada uno de los componentes.

	$E_1 \pm SD$	$E_R \pm SD$
	93,953 $\pm$ 2,159 (91,511– 96,396)	6,047 $\pm$ 2,159 (3,604 – 8,489)
k_i ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$) $\pm$ SD (n=3)	1,001 $\cdot 10^{-4} \pm 3,754 \cdot 10^{-5}$ (5,766 $\cdot 10^{-5} \pm 1,426 \cdot 10^{-4}$)	
IC_{50}^{30} (μM) $\pm$ SD (n=3)	7,515 $\pm$ 2,388 (4,813 – 10,218)	

Como se observa, el modelo para ajustar los datos experimentales según el test de la F, fue el modelo de un componente sensible y otro resistente a la inhibición.

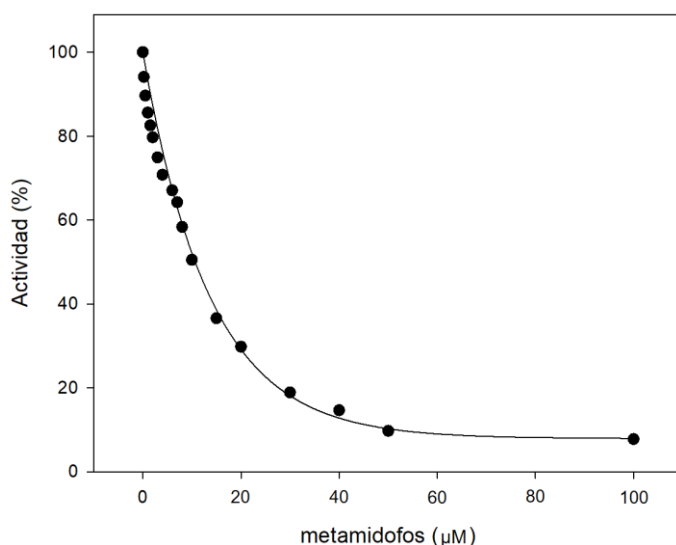


Figura 5.3. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa de la hrAChE a distintas concentraciones de metamidofos. El procedimiento del ensayo se realizó como está indicado en el apartado de *Materiales y métodos*. Los valores de actividad se encuentran expresados en porcentaje respecto a la muestra control, que contenía 0 μM de inhibidor.

5.1.2.2. Inhibición con pretratamiento con AtCh

Para el estudio de inhibición con mipafox se llevaron a cabo cinco experimentos. Un ejemplo de curva que mejor se ajustaban según el F test se muestran en la **Figura 5.4** y los parámetros definidos de los ajustes de los datos experimentales en la **Tabla 5.4**.

Tabla 5.4. Media, desviación estándar e intervalo de confianza obtenidos para los distintos parámetros y componentes de la actividad PVasa de la hrAChE tras el ajuste de los datos experimentales mostrados en la **Figura 5.4**. E_1 indica el porcentaje del componente sensible, E_R indica el porcentaje de componente resistente, k_i corresponde a la constante de inhibición y IC_{50}^{30} representa la concentración de inhibición que se necesita para reducir la actividad un 50% a los 30 minutos de reacción entre proteína e inhibidor. Indicado entre paréntesis se encuentra el intervalo de confianza (95%) de cada uno de los componentes.

	$E_1 \pm SD$	$E_R \pm SD$
	96,865 $\pm$ 1,433 (95,609 – 98,121)	3,135 $\pm$ 1,433 (1,879 – 4,391)
k_i ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$) $\pm$ SD (n=5)	7,014 $\cdot 10^{-5} \pm 1,544 \cdot 10^{-5}$ (5,660 $\cdot 10^{-5} \pm 8,367 \cdot 10^{-5}$)	
IC_{50}^{30} (μM) $\pm$ SD (n=5)	10,195 $\pm$ 1,779 (8,635 – 11,755)	

Como se observa, el modelo para ajustar los datos experimentales según el test de la F, fue el modelo de un componente sensible y otro resistente a la inhibición.

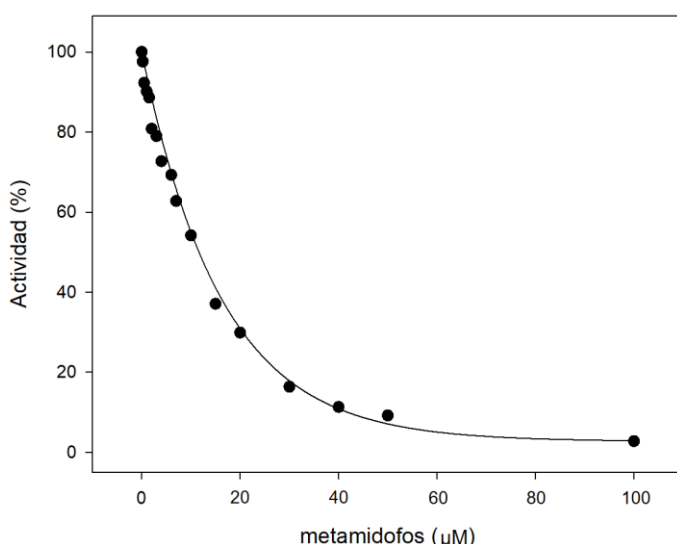


Figura 5.4. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad PVasa de la hrAChE tras su pretratamiento con AtCh y sometida a distintas concentraciones de metamidofos. El procedimiento del ensayo se realizó como está indicado en el apartado de *Materiales y métodos*. Los valores de actividad se encuentran expresados en porcentaje respecto a la muestra control, que contenía 0 μM de inhibidor.

5.2. Inhibición a tiempo fijo de la actividad FAc esterasa

5.2.1. Inhibición por mipafox

5.2.1.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh

Para el estudio de inhibición con metamidofos se llevaron a cabo cuatro experimentos. Un ejemplo de curva que mejor se ajustaban según el F test se muestran en la **Figura 5.5** y los parámetros definidos de los ajustes de los datos experimentales en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.5. Media, desviación estándar e intervalo de confianza obtenidos para los distintos parámetros y componentes de la actividad FAc esterasa de la hrAChE tras el ajuste de los datos experimentales mostrados en la **Figura 5.5**. E_1 indica el porcentaje del componente sensible, E_R indica el porcentaje de componente resistente, k_i corresponde a la constante de inhibición y IC_{50}^{30} representa la concentración de inhibición que se necesita para reducir la actividad un 50% a los 30 minutos de reacción entre proteína e inhibidor. Indicado entre paréntesis se encuentra el intervalo de confianza (95%) de cada uno de los componentes.

	$E_1 \pm SD$	$E_R \pm SD$
	100	
$k_i (\mu M^{-1} \cdot s^{-1}) \pm SD$ (n=4)	$5,668 \cdot 10^{-5} \pm 1,099 \cdot 10^{-5}$ ($4,590 \cdot 10^{-5} \pm 6,745 \cdot 10^{-5}$)	
$IC_{50}^{30} (\mu M) \pm SD$ (n=4)	$12,625 \pm 2,746$ (9,934 – 15,317)	

Como se observa, el modelo para ajustar los datos experimentales según el test de la F, fue el modelo de un componente sensible.

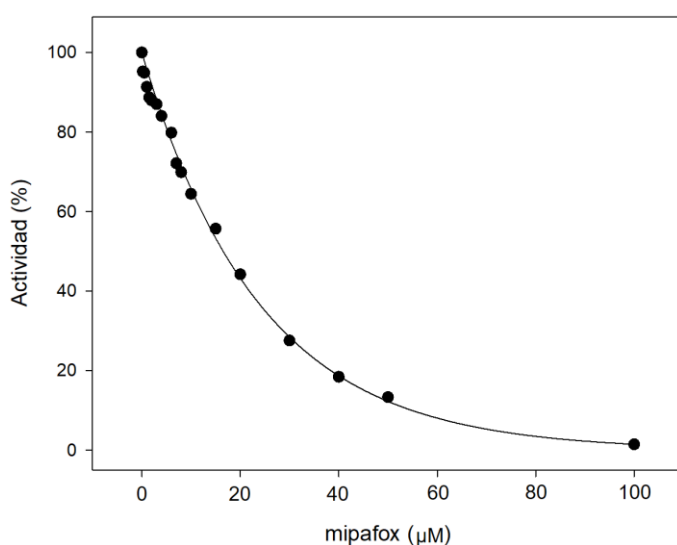


Figura 5.5. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad FAc esterasa de la hrAChE a distintas concentraciones de mipafox. El procedimiento del ensayo se realizó como está indicado en el apartado de *Materiales y métodos*. Los valores de actividad se encuentran expresados en porcentaje respecto a la muestra control, que contenía 0 μM de inhibidor.

5.2.1.2. Inhibición con pretratamiento con AtCh

Para el estudio de inhibición con metamidofos se llevaron a cabo cinco experimentos. Un ejemplo de curva que mejor se ajustaban según el F test se muestran en la **Figura 5.6** y los parámetros definidos de los ajustes de los datos experimentales en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.6. Media, desviación estándar e intervalo de confianza obtenidos para los distintos parámetros y componentes de la actividad FAc esterasa de la hrAChE tras el ajuste de los datos experimentales mostrados en la **Figura 5.6**. E_1 indica el porcentaje del componente sensible, E_R indica el porcentaje de componente resistente, k_i corresponde a la constante de inhibición y IC_{50}^{30} representa la concentración de inhibición que se necesita para reducir la actividad un 50% a los 30 minutos de reacción entre proteína e inhibidor. Indicado entre paréntesis se encuentra el intervalo de confianza (95%) de cada uno de los componentes.

	$E_1 \pm SD$	$E_R \pm SD$
	100	
$k_i (\mu M^{-1} \cdot s^{-1}) \pm SD$ (n=5)	$9,008 \cdot 10^{-5} \pm 1,713 \cdot 10^{-5}$ ($7,506 \cdot 10^{-5} \pm 1,051 \cdot 10^{-4}$)	
$IC_{50}^{30} (\mu M) \pm SD$ (n=5)	$7,909 \pm 1,436$ (6,651 – 9,168)	

Como se observa, el modelo para ajustar los datos experimentales según el test de la F, fue el modelo de un componente sensible.

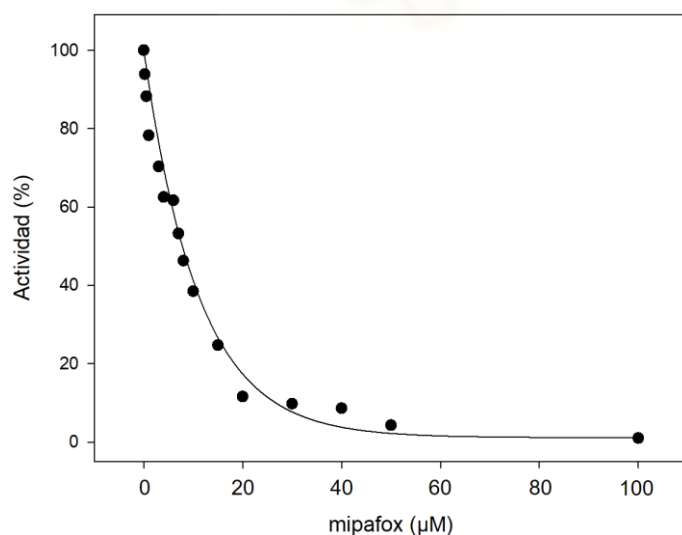


Figura 5.6. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad FAc esterasa de la hrAChE tras su pretratamiento con AtCh y sometida a distintas concentraciones de mipafox. El procedimiento del ensayo se realizó como está indicado en el apartado de *Materiales y métodos*. Los valores de actividad se encuentran expresados en porcentaje respecto a la muestra control, que contenía 0 μM de inhibidor.

5.2.2. Inhibición por metamidofos

5.2.2.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh

Para el estudio de inhibición con metamidofos se llevaron a cabo tres experimentos. Un ejemplo de curva que mejor se ajustaban según el F test se muestran en la **Figura 5.7** y los parámetros definidos de los ajustes de los datos experimentales en la **Tabla 5.7**.

Tabla 5.7. Media, desviación estándar e intervalo de confianza obtenidos para los distintos parámetros y componentes de la actividad FAc esterasa de la hrAChE tras el ajuste de los datos experimentales mostrados en la **Figura 5.6**. E_1 indica el porcentaje del componente sensible, E_R indica el porcentaje de componente resistente, k_i corresponde a la constante de inhibición y IC_{50}^{30} representa la concentración de inhibición que se necesita para reducir la actividad un 50% a los 30 minutos de reacción entre proteína e inhibidor. Indicado entre paréntesis se encuentra el intervalo de confianza (95%) de cada uno de los componentes.

	$E_1 \pm SD$	$E_R \pm SD$
	96,165 $\pm$ 1,228 (94,775 – 97,554)	3,835 $\pm$ 1,228 (2,446– 5,225)
$k_i (\mu M^{-1} \cdot s^{-1}) \pm SD$ (n=3)	7,570 $\cdot 10^{-5} \pm 5,645 \cdot 10^{-6}$ (6,931 $\cdot 10^{-5} \pm 8,209 \cdot 10^{-5}$)	
$IC_{50}^{30} (\mu M) \pm SD$ (n=3)	9,190 $\pm$ 0,666 (8,436 – 9,943)	

Como se observa, el modelo para ajustar los datos experimentales según el test de la F, fue el modelo de un componente sensible y otro resistente a la inhibición.

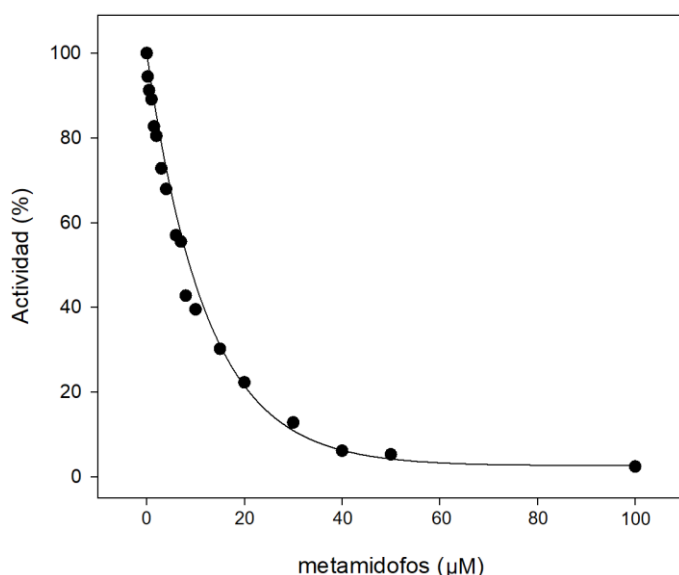


Figura 5.7. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad FAc esterasa de la hrAChE a distintas concentraciones de metamidofos. El procedimiento del ensayo se realizó como está indicado en el apartado de *Materiales y métodos*. Los valores de actividad se encuentran expresados en porcentaje respecto a la muestra control, que contenía 0 μM de inhibidor.

5.2.2.2. Inhibición con pretratamiento con AtCh

Para el estudio de inhibición con metamidofos se llevaron a cabo tres experimentos. Un ejemplo de curva que mejor se ajustaban según el F test se muestran en la **Figura 5.8** y los parámetros definidos de los ajustes de los datos experimentales en la **Tabla 5.8**.

Tabla 5.8. Media, desviación estándar e intervalo de confianza obtenidos para los distintos parámetros y componentes de la actividad FAc esterasa de la hrAChE tras el ajuste de los datos experimentales mostrados en la **Figura 5.8**. E_1 indica el porcentaje del componente, E_R indica el porcentaje de componente resistente, k_i corresponde a la constante de inhibición y IC_{50}^{30} representa la concentración de inhibición que se necesita para reducir la actividad un 50% a los 30 minutos de reacción entre proteína e inhibidor. Indicado entre paréntesis se encuentra el intervalo de confianza (95%) de cada uno de los componentes.

	$E_1 \pm SD$	$E_R \pm SD$
	$96,032 \pm 0,886$ (95,030 – 97,034)	$3,968 \pm 0,886$ (2,966– 4,970)
k_i ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$) $\pm SD$ (n=3)	$8,673 \cdot 10^{-5} \pm 9,128 \cdot 10^{-6}$ ($7,640 \cdot 10^{-5} \pm 9,706 \cdot 10^{-5}$)	
IC_{50}^{30} (μM) $\pm SD$ (n=3)	$8,048 \pm 0,806$ (7,136 – 8,961)	

Como se observa, el modelo para ajustar los datos experimentales según el test de la F, fue el modelo de un componente sensible y otro resistente a la inhibición.

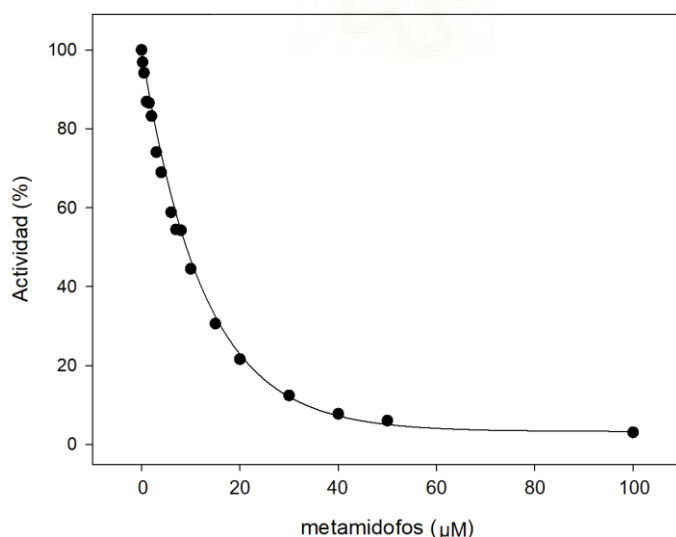


Figura 5.8. Curva de inhibición a tiempo fijo de la actividad FAc esterasa de la hrAChE tras su pretratamiento con AtCh y sometida a distintas concentraciones de metamidofos. El procedimiento del ensayo se realizó como está indicado en el apartado de *Materiales y métodos*. Los valores de actividad se encuentran expresados en porcentaje respecto a la muestra control, que contenía 0 μM de inhibidor.

6. DISCUSIÓN

6.1. Inhibición por mipafox

El mipafox es un compuesto de tipo fosforamidato que se utiliza para bloquear la acción de las esterasas. Se emplea habitualmente de la medición de la actividad NTE y es reconocido por desencadenar OPIDN.

6.1.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh

Los experimentos de inhibición por mipafox a tiempo fijo con AChE sin pretratar con acetiltiocolina (AtCh) mostraron para la actividad PVasa (**Figura 5.1**) la existencia de un componente sensible (92,824%) con una IC_{50}^{30} media de $7,733 \pm 0,508 \mu\text{M}$ y una k_i media de $8,993 \times 10^{-5} \pm 6,118 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**Tabla 6.1**), además de un componente resistente (7,176%).

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

	Enzima sin pretratar	Enzima pretratada
$IC_{50}^{30} (\mu\text{M})$	$7,733 \pm 0,508$	$4,597 \pm 0,850$
$k_i (\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$8,993 \times 10^{-5} \pm 6,118 \times 10^{-6}$	$1,554 \times 10^{-4} \pm 3,379 \times 10^{-5}$

Sin embargo, para la actividad FAc esterasa (**Figura 5.5**) mostraron la existencia de un componente sensible (100%) con una IC_{50}^{30} media de $12,625 \pm 2,746 \mu\text{M}$ y una k_i media de $5,668 \times 10^{-5} \pm 1,009 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**Tabla 6.2**).

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

	Enzima sin pretratar	Enzima pretratada
$IC_{50}^{30} (\mu\text{M})$	$12,625 \pm 2,746$	$7,909 \pm 1,436$
$k_i (\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$5,668 \times 10^{-5} \pm 1,009 \times 10^{-5}$	$9,008 \times 10^{-5} \pm 1,713 \times 10^{-5}$

La existencia de un componente resistente a la inhibición con mipafox en la actividad PVasa indica que la inhibición no es completa, sugiriendo que la enzima no se desactiva al 100% sino que la hidrólisis de PV se ralentiza alrededor de un 93%. Sin embargo, la actividad FAc esterasa si es capaz de inhibirse al 100%, lo que indica que los procesos de hidrólisis de PV y FAc pueden tener mecanismos moleculares ligeramente diferentes.

El mejor modelo con actividad FAc esterasa según el test de la F, fue el de un componente sensible que corresponde a una actividad enzimática que se inhibe totalmente mediante una inhibición irreversible, el cual es el modelo esperado por ser el material biológico una proteína pura.

6.1.2. Inhibición con pretratamiento con AtCh y ultrafiltración

Los experimentos a tiempo fijo con AChE pretratada con AtCh mostraron para la actividad PVasa (**Figura 5.2**) la existencia de un componente sensible (97,452%) con una IC_{50}^{30} media de $4,597 \pm 0,850 \mu M$ y una k_i media de $1,554 \times 10^{-4} \pm 3,379 \times 10^{-5} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ (**Tabla 6.1**); además de un componente resistente (2,548%).

Sin embargo, para la actividad FAc esterasa (**Figura 5.6**) mostraron la existencia de un componente sensible (100%) con una IC_{50}^{30} media de $7,909 \pm 1,436 \mu M$ y una k_i media de $9,008 \times 10^{-5} \pm 1,713 \times 10^{-5} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ (**Tabla 6.2**).

La existencia del componente resistente en la inhibición con mipafox en actividad PVasa apoya la idea sugerida en el apartado 6.1.1 sobre la existencia de diferencias en los mecanismos de hidrólisis del PV y FAc.

6.1.3. Conclusiones acerca de la inhibición con mipafox

Estudios realizados por Kropp y Richardson (2003), estimaron una k_i de $7,15 \times 10^{-5} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ y de la que se puede estimar una IC_{50}^{30} de $5,386 \mu M$ en AChE de microsomas de cerebro de pollo y AtCh como sustrato a una temperatura de 25 °C.

Los resultados de los ensayos realizados para estudiar la actividad PVasa para las muestras pretratadas con AtCh y ultrafiltradas (**Tabla 6.1**), se asemejan a los obtenidos por Kropp y Richardson (2003). Los parámetros (**Tabla 6.1**) de los ensayos realizados con enzimas que habían sido pretratadas con AtCh antes de la inhibición con mipafox presentan una sensibilidad mayor a cuando no están pretratadas.

En el trabajo realizado por Benalal (2025) en AChE recombinante y actividad PVasa se observó también que la sensibilidad en muestras sin pretratamiento fue menor que en muestras pretratadas, aunque las IC_{50}^{30} obtenidas fueran mayores en este TFG, ésto fue debido a que el stock de mipafox utilizado por Benalal estaba degradado y la concentración efectiva de mipafox era menor que la esperada.

Diagrama de un ensayo de inhibición enzimática. Se muestra un eje de tiempo horizontal. En el inicio, se añade un inhibidor (t_i). Después de un tiempo de incubación (t_s), se añade el sustrato. Se comparan dos trayectorias de absorbancia: una para el sustrato solo (t_s) y otra para el sustrato con inhibidor (t_0). La absorbancia con inhibidor es menor que la sin inhibidor.

6.2. Inhibición por metamidofos

El metamidofos es un insecticida organofosforado fosforamidato altamente tóxico que inhibe la acetilcolinesterasa, causando un síndrome colinérgico agudo.

6.2.1. Inhibición sin pretratamiento con AtCh

Los experimentos de inhibición por metamidofos a tiempo fijo con AChE sin pretratar con AtCh mostraron para la actividad PVasa (**Figura 5.3**) la existencia de un componente sensible (93,953%) con una IC_{50}^{30} media de $7,515 \pm 2,388 \mu M$ y k_i media de $1,001 \times 10^{-4} \pm 3,754 \times 10^{-5} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ (**Tabla 6.3**); además de un componente resistente (6,047%).

Tabla 6.3. Interpretación global de los parámetros obtenidos en los experimentos de inhibición de la actividad PVasa con metamidofos. Se muestran las medias de los valores IC_{50}^{30} y la k_i de los experimentos independientes realizados.

	Enzima sin pretratar	Enzima pretratada
$IC_{50}^{30} (\mu M)$	$7,515 \pm 2,388$	$10,195 \pm 1,779$
$k_i (\mu M^{-1} \cdot s^{-1})$	$1,001 \times 10^{-4} \pm 3,754 \times 10^{-5}$	$7,014 \times 10^{-5} \pm 1,544 \times 10^{-5}$

Sin embargo, para la actividad FAc esterasa (**Figura 5.7**) mostraron la existencia de un componente sensible (96,165%) con una IC_{50}^{30} media de $9,190 \pm 0,666 \mu M$ y una k_i media de $7,570 \times 10^{-5} \pm 5,645 \times 10^{-6} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ (**Tabla 6.4**); además de un componente resistente (3,835%).

Tabla 6.4. Interpretación global de los parámetros obtenidos en los experimentos de inhibición de la actividad FAc esterasa con metamidofos. Se muestran las medias de los valores IC_{50}^{30} y la k_i de los experimentos independientes realizados.

	Enzima sin pretratar	Enzima pretratada
$IC_{50}^{30} (\mu M)$	$9,190 \pm 0,666$	$8,048 \pm 0,806$
$k_i (\mu M^{-1} \cdot s^{-1})$	$7,570 \times 10^{-5} \pm 5,645 \times 10^{-6}$	$8,673 \times 10^{-5} \pm 9,128 \times 10^{-6}$

Al trabajar con una proteína pura, se esperaría un componente sensible si la actividad se inhibe completamente, como ocurre con la actividad FAc esterasa descrita en el apartado 6.1.1.

La existencia de un componente resistente a la inhibición con metamidofos en la actividad PVasa y en la actividad FAc esterasa indica que la inhibición no es completa, sugiriendo que la enzima no se desactiva al 100% sino que la hidrólisis de PV y FAc se ralentiza alrededor de un 93% y un 96%, respectivamente.

6.2.2. Inhibición con pretratamiento con AtCh y ultrafiltración

Los experimentos a tiempo fijo con AChE pretratada con AtCh para la actividad PVasa (**Figura 5.4**) mostraron la existencia de un componente sensible (96,865%) con una IC_{50}^{30} media de $10,195 \pm 1,779 \mu M$ y una k_i media de $7,014 \times 10^{-5} \pm 1,544 \times 10^{-5} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ (**Tabla 6.3**); además de un componente resistente (3,135%).

Sin embargo, para la actividad FAc esterasa (**Figura 5.8**) mostraron la existencia de un componente sensible (96,032%) con una IC_{50}^{30} media de $8,048 \pm 0,806 \mu M$ y una k_i media de $8,673 \times 10^{-5} \pm 9,128 \times 10^{-6} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ (**Tabla 6.4**); además de un componente resistente (3,968%).

La existencia del componente resistente en la inhibición con metamidofos en actividad PVasa y actividad FAc esterasa apoya la idea sugerida en el apartado 6.2.1.

6.2.3. Conclusiones acerca de la inhibición con metamidofos

Čadež et al. (2021) trabajaron con AChE humana recombinante y AtCh como sustrato a una temperatura de 25 °C y describieron una k_i de $4,6 \times 10^{-5} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ de la que se puede estimar una IC_{50}^{30} de 8,37 μM . Por lo que sería posible deducir que la IC_{50}^{30} a 37 °C deberían ser más baja, por tanto, las IC_{50}^{30} obtenidas en este trabajo en muestras no pretratadas podrían ser mayores que las de la bibliografía a 37 °C.

Los datos de la enzima pretratada varía de los obtenidos en los experimentos de la bibliografía (Čadež et al., 2021), realizados con enzima recombinante; mientras que los resultados sin pretratamiento muestran una similitud con la literatura. La **Tabla 6.3** muestra que la actividad PVasa de la enzima sin pretratar con AtCh es más sensible que cuando se somete al pretratamiento y ultrafiltración.

Mientras tanto, en los estudios para la actividad FAc esterasa se observa que los datos se asemejan a los obtenidos en los experimentos realizados por Čadež et al. (2021). En la inhibición de la actividad FAc esterasa (**Tabla 6.4**) los datos obtenidos tanto en los ensayos sin pretratamiento como los realizados tras pretratar con AtCh y ultrafiltrar, se asemejan en ambos casos, no encontrando una diferencia significativa en la actividad de la enzima en ambos casos.

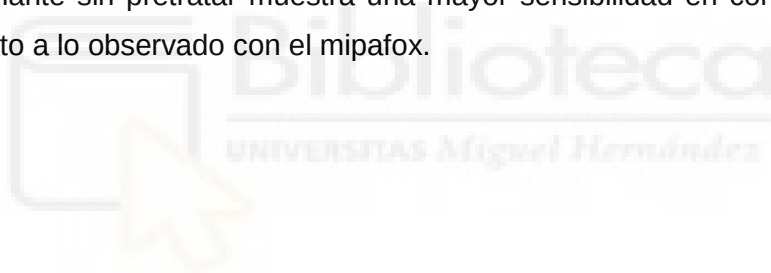
6.3. Consideraciones finales

Este estudio demuestra que la AtCh altera las interacciones de mipafox y metamidofos con AChE recombinante y apoya las observaciones realizadas por Benalal (2025).

Estévez et al. (2009 y 2022) observaron que la tiocolina (tCh) liberada en el centro activo modifica la actividad de la enzima de manera irreversible, lo que podría alterar la inhibición de estos inhibidores; este fenómeno depende estrechamente de la estructura química del inhibidor empleado y del sustrato, siendo más evidente en la inhibición con mipafox.

De hecho, la inhibición por mipafox de la hrAChE modificada por tCh resultó comparable a la observada en AChE de tejidos animales. Esto apoya la idea propuesta en Benalal (2025) de que la tCh liberada podría inducir una posmaduración dirigida por el sustrato AtCh, siendo un proceso que podría extenderse a AChE no recombinante.

Por otro lado, los ensayos con metamidofos revelaron que la modificación por tCh no afecta significativamente a la inhibición de la actividad FAc esterasa tal como ocurre en lo observado con la inhibición por mipafox, pero cuando se utiliza metamidofos con PV como sustrato, la enzima recombinante sin pretratar muestra una mayor sensibilidad en comparación con la pretratada, distinto a lo observado con el mipafox.



7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

7.1. Conclusiones

- Los experimentos de inhibición con mipafox y PV como sustrato en muestras sin pretratamiento con AtCh muestran un componente sensible, con unos valores de k_i de $8,993 \times 10^{-5} \pm 6,118 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y de IC_{50}^{30} de $7,733 \pm 0,508 \mu\text{M}$; además de un componente resistente.
- Los experimentos de inhibición con mipafox y PV como sustrato en muestras pretratadas con AtCh muestran un componente sensible, con unos valores de k_i de $1,554 \times 10^{-4} \pm 3,379 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y de IC_{50}^{30} de $4,597 \pm 0,850 \mu\text{M}$; además de un componente resistente.
- En las muestras pretratadas con AtCh, la hrAChE resulta más sensible a la inhibición con mipafox.
- Los experimentos de inhibición con mipafox y FAc como sustrato en muestras sin pretratamiento con AtCh muestran un solo componente sensible, con unos valores de k_i de $5,668 \times 10^{-5} \pm 1,009 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y de IC_{50}^{30} de $12,625 \pm 2,746 \mu\text{M}$.
- Los experimentos de inhibición con mipafox y FAc como sustrato en muestras pretratadas con AtCh muestran un solo componente sensible, con unos valores de k_i de $9,008 \times 10^{-5} \pm 1,713 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y de IC_{50}^{30} de $7,909 \pm 1,436 \mu\text{M}$.
- En muestras pretratadas con AtCh, la hrAChE resulta más sensible a la inhibición con mipafox.
- Los experimentos de inhibición con metamidofos y PV como sustrato en muestras sin pretratamiento con AtCh muestran un componente sensible, con unos valores de k_i de $1,001 \times 10^{-4} \pm 3,754 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y de IC_{50}^{30} de $7,515 \pm 2,388 \mu\text{M}$; además de un componente resistente.
- Los experimentos de inhibición con metamidofos y PV como sustrato en muestras pretratadas con AtCh muestran un componente sensible, con unos valores de k_i de $7,014 \times 10^{-5} \pm 1,544 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y de IC_{50}^{30} de $10,195 \pm 1,779 \mu\text{M}$; además de un componente resistente.
- En muestras pretratadas con AtCh, la hrAChE resulta menos sensible a la inhibición con metamidofos.
- Los experimentos de inhibición con metamidofos y FAc como sustrato en muestras sin pretratamiento con AtCh muestran un componente sensible, con unos valores de k_i de $7,570 \times 10^{-5} \pm 5,645 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y de IC_{50}^{30} de $9,190 \pm 0,666 \mu\text{M}$; además de un componente resistente.
- Los experimentos de inhibición con metamidofos y FAc como sustrato en muestras pretratadas con AtCh muestran un componente sensible, con unos valores de k_i de

$8,673 \times 10^{-5} \pm 9,128 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y de IC_{50}^{30} de $8,048 \pm 0,806 \mu\text{M}$; además de un componente resistente.

- No se observan diferencias significativas en la inhibición con metamidofos entre muestras pretratadas con AtCh y sin pretratar.
- Se ha detectado un componente resistente a la inhibición con mipafox en la actividad PVasa y a la inhibición con metamidofos en la actividad PVasa y FAc esterasa; indicando que estos casos la actividad no se inhibe completamente, indicando un mecanismo de hidrólisis más complejo.
- Las diferencias de sensibilidad con un mismo inhibidor al utilizar diferentes sustratos indican diferencias significativas en los mecanismos moleculares de hidrólisis de dichas muestras.
- Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la hrAChE debe reaccionar 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 a futuro

- 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 de inhibición con otros compuestos OPs 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
- Benalal Álvarez, C. A. (2025). Interacción de acetiltiocolina en la actividad fenilvalerato esterasa de la acetilcolinesterasa humana recombinante e inhibición con inhibidores irreversibles [Trabajo de Fin de Grado, Universidad Miguel Hernández de Elche]
- Casida JE, Durkin KA. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol Interact.* 2013;203(1):221-225. doi:10.1016/j.cbi.2012.08.002
- De Villiers, P., Parker, N., Van Rensburg, R., Goussard, P., Marks, C., & Lorente, V. P. (2023). Methamidophos poisoning: A paediatric case report. *Toxicology Reports*, 12, 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.12.001>
- Estévez, J., García-Pérez, A. G., Barril, J., Pellín, M., & 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.2004.04.006>
- 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. (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/10.1080/10408440802412309>
- Iannacone, J., Alvariño, L., Murrugarra, Y., Arrascue, A., Alayo, M., & Salazar, N. (2008). Selectividad del insecticida metamidofos en ocho organismos terrestres no destinatarios. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 3(1), 23–34.
- 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

- Jorge, E. D. (2017b, julio 12). *Actividad fenilvalerato esterasa en la butirilcolinesterasa humana*. <https://hdl.handle.net/11000/4144>
- 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. J., & Richardson, R. J. (2006). Aging of Mipaflox-Inhibited Human Acetylcholinesterase Proceeds by Displacement of Both Isopropylamine Groups to Yield a Phosphate Adduct. *Chemical Research In Toxicology*, 19(2), 334-339. <https://doi.org/10.1021/tx050342o>
- 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
- Mangas, I., Vilanova, E., & Estévez, J. (2012). NTE and non-NTE esterases in brain membrane: Kinetic characterization with organophosphates. *Toxicology*, 297(1-3), 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.03.012>
- Mangas, I., Vilanova, E., & Estévez, J. (2017). Phenyl valerate esterase activity of human butyrylcholinesterase. *Archives Of Toxicology*, 91(10), 3295-3305. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1946-5>
- Petroianu, G., Arafat, K., Kosanovic, M., Saleh, A., Camasamudram, V., & Hasan, M. Y. (2003b). In vitro protection of red blood cell acetylcholinesterase by metoclopramide from inhibition by organophosphates (paraoxon and mipafox). *Journal Of Applied Toxicology*, 23(6), 447-451. <https://doi.org/10.1002/jat.936>
- Richardson, R. J., Fink, J. K., Glynn, P., Hufnagel, R. B., Makhaeva, G. F., & Wijeyesakere, S. J. (2020). Neuropathy target esterase (NTE/PNPLA6) and organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity (OPIDN). *Advances In Neurotoxicology*, 4, 1-78. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2020.01.001>
- Terol M. Actividad fenilvalerato esterasa en la acetilcolinesterasa humana recombinante [Trabajo de Fin de Grado]. Elche, España: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2018.
- Wang, L., Wen, Y., Guo, X., Wang, G., Li, S., & Jiang, J. (2009). Degradation of methamidophos by *Hyphomicrobium* species MAP-1 and the biochemical degradation pathway. *Biodegradation*, 21(4), 513-523. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9320-9>