



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Grado en Biotecnología

Curso 2017/2018

Instituto de Bioingeniería, Área de Toxicología

Trabajo de Fin de Grado

Actividad fenilvalerato esterasa en la acetilcolinesterasa humana recombinante

Marina Terol González

Estudiante de Biotecnología

Tutor: Jorge Estévez Domènech

Elche, junio de 2018

ÍNDICE

0. Resumen	0
1. Introducción	1-6
1.1 Los compuestos organofosforados inhibidores de esterasas	1-3
1.2 Carboxilesterasas	3-5
1.3 Discriminación de componentes enzimáticos con actividad PVasa.....	5-6
2. Antecedentes	6-8
2.1 Optimización de las condiciones del ensayo para las diferentes actividades	6
2.2 Actividad PVasa en otras colinesterasas.....	6
2.3 Mecanismos de reacción	7-8
3. Objetivos	8-9
3.1 Objetivos específicos	8-9
4. Materiales y Métodos	9-13
4.1 Tampones y reactivos utilizados	9-10
4.2 Material biológico	10
4.3 Equipos utilizados	10-11
4.4 Microensayo de actividad colinesterasa.....	11
4.5. Microensayo de actividad PVasa	11
4.6 Microensayo de competición entre sustratos	11-12
4.7 Curva de calibrado del método colorimétrico de fenol.....	12
4.8 Curva de calibrado del método colorimétrico de tiocolina	13
4.9 Modelos matemáticos y análisis de los datos	13
5. Resultados	14-25
5.1 Actividad PVasa.....	14-21
5.2 Actividad colinesterasa de AChE humana recombinante	22-25
6. Discusión	26-29
6.1 Optimización de las condiciones del ensayo para las diferentes actividades.....	26
6.2 Actividad PVasa en otras colinesterasas	26-27
6.3 Mecanismos de reacción	27-28
6.4 Actividad PVasa y colinesterasa en presencia de PV y AtCh en función del tiempo	29
7. Conclusiones y proyecciones futuras	30-31
7.1 Conclusiones	30
7.2 Proyecciones futuras	31
8. Bibliografía	32-35
Anexos	i-xviii

RESUMEN

Se ha descrito recientemente que la acetilcolinesterasa (AChE) presenta actividad fenilvalerato esterasa (PVasa). No se han caracterizado sus propiedades y parámetros cinéticos para la actividad PVasa ni se ha estudiado la interacción entre sustratos para las actividades PVasa y colinesterasa.

En este trabajo se caracteriza cinéticamente la actividad PVasa de la enzima AChE humana recombinante, y estudia el tipo de interacción entre dos de los sustratos hidrolizados por esta enzima: el fenilvalerato y la acetiltiocolina. La acetiltiocolina a bajas concentraciones reactiva la actividad PVasa y a altas concentraciones de acetiltiocolina la inhibe. Por otro lado, los productos de reacción de la actividad AChE (acetato y tiocolina) están involucrados en la reactivación de la actividad PVasa.

Palabras clave: acetilcolinesterasa (AChE), fenilvalerato (PV), acetiltiocolina (AtCh), butirilcolinesterasa (BuChE)

ABSTRACT

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

The objective of this study is to characterize kinetically the phenylvalerate esterase activity of the recombinant human acetylcholinesterase and to study the interaction between two of the substrates hydrolyzed by this enzyme: the phenylvalerate and the acetylthiocholine. Phenylvalerate esterase activity is reactivated at low concentrations of acetylthiocholine and phenylvalerate esterase activity is inhibited at high concentrations of acetylthiocholine. Furthermore, the products of the acetylthiocholine hydrolysis (acetate and thiocholine) are involved on the reactivation of the phenylvalerate esterase activity.

Key words: acetylcholinesterase (AChE), phenyl valerate (PV), acetylthiocholine (AtCh), butyrylcholinesterase (BuChE)

ABREVIATURAS

AAP	Aminoantipirina	PVasa	Fenilvalerato esterasa
AChE	Acetilcolinesterasa	SDS	Dodecilsulfato sódico
AtCh	Acetiltiocolina	μM	micromolar
BuChE	Butirilcolinesterasa	mM	milimolar
BSA	Albúmina de suero bovino	nM	nanomolar
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico	nm	nanómetros
OPs	Organofosforados	mL	mililitros
PV	Fenilvalerato o valerato de fenilo	μL	microlitros

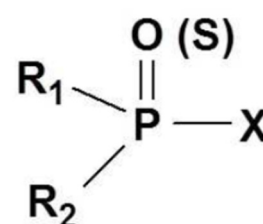
1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los compuestos organofosforados inhibidores de esterasas

1.1.1 Características químicas

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

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



A lo largo de la historia, los OPs se han empleado para muchos propósitos, destacando su uso como plaguicidas y armas químicas. Son una de las clases de insecticidas más utilizadas actualmente y su importancia probablemente continúe, pues son efectivos y de bajo costo (Casida y Durkin., 2013). Sin embargo, se ha visto que los OPs pueden afectar a humanos, causando múltiples desordenes neurotóxicos. En la **Tabla 1.1** se describe la toxicidad de los organofosforados y se relaciona con la inhibición de las esterasas. La acción tóxica de los OPs se puede resumir en:

- Inhibición de AChE del sistema nervioso produciendo efectos tóxicos inmediatos.
- Inhibición de la esterasa diana de neuropatía (NTE) causando efectos neurotóxicos retardados. Su inhibición y posterior envejecimiento produce la neuropatía retardada inducida por OPs (OPIDN) (Johnson, 1969b, 1982).
- 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.

Efectos	Síntomas	Aparición sintomatología	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

1.1.2 Reacciones de interacción con esterasas

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

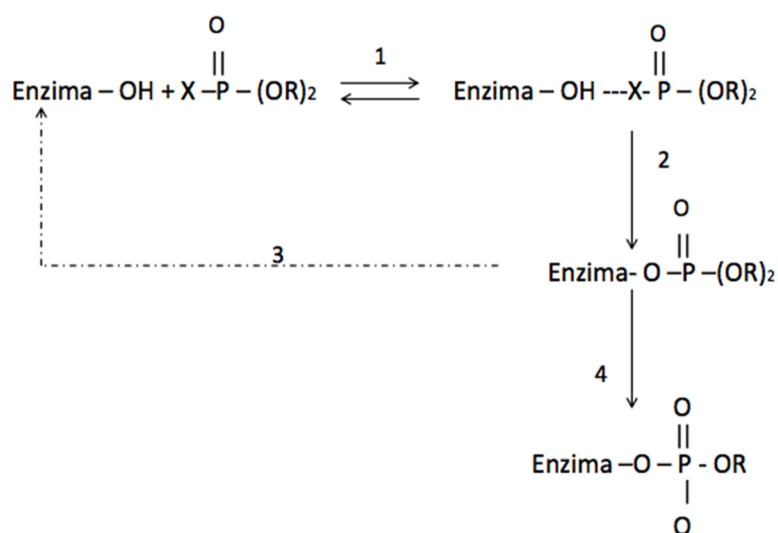


Figura 1.2. Mecanismo general de esterasas por organofosforados (OPs). Cuando se ha formado el complejo de tipo michaeliano entre la enzima y el OP (1), se fosforila un residuo de serina de la enzima perdiéndose el grupo saliente X (2). A partir de aquí pueden darse dos vías: la de reactivación (3), en la que la enzima se recupera, o una reacción de envejecimiento (4), en la que se rompe el enlace R-O-P perdiéndose el grupo R y formándose un residuo fosfórico con una carga negativa, (Johnson, 1975). La reacción 3 puede ser una reactivación espontánea o inducida por reactivos nucleofílicos.

1.1.3 Dianas moleculares no identificadas

Algunos de los efectos tóxicos ocurren debido a la interacción de los OPs con dianas moleculares definidas (crisis colinérgica, neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN) y síndrome intermedio), pero se ha visto que existen otros efectos debidos a la interacción con dianas moleculares no identificadas hasta la fecha, cuyos mecanismos no se conocen con claridad (efectos neuropsicológicos

crónicos, potenciación de OPIDN, toxicidad cognitiva a largo plazo, etc.) (COT 1999; Jamal et al. 2002; Lockridge and Schopfer 2006; Terry 2012; McDaniel and Moser 2004).

1.2 Carboxilesterasas

1.2.1 Tipos de carboxilasas

Las enzimas carboxilesterasas (CbEs) pertenecen al grupo de las esterasas encargadas de catalizar reacciones de hidrólisis de ésteres carboxílicos. Hay varios tipos de enzimas CbEs, y Aldridge (1953) las clasificó en función de su interacción con los compuestos OPs:

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

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

1.2.2 Colinesterasas

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

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

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

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

El sustrato natural de la AChE es la acetilcolina, aunque también es capaz de hidrolizar butirilcolina, β -metiltiocolina, propionilcolina y a los análogos tiocolina de los tres compuestos, mientras que la BuChE no actúa sobre la β -metiltiocolina (Repetto, 1995; Alles y Hawes, 1940). En mamíferos la BuChE hidroliza la butirilcolina 4 veces más rápido que a la acetilcolina (Massoulié et al, 1993 y 2005).

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

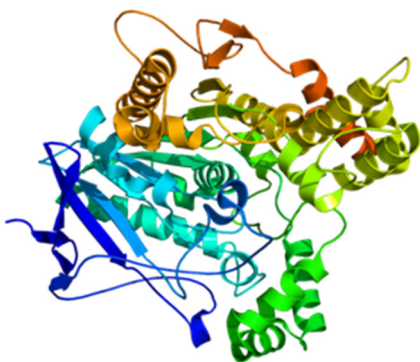


Figura 1.4 Estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa humana. Imagen obtenida de Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>)

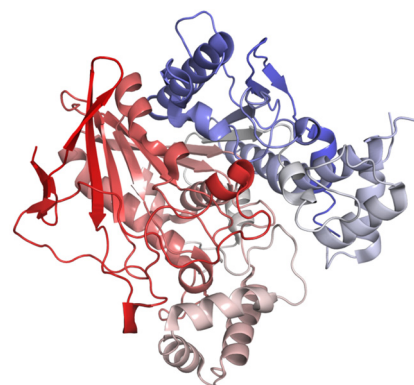


Figura 1.5. Estructura tridimensional de la butirilcolinesterasa humana. Imagen obtenida de Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>)

1.2.3 Fenilvalerato esterasas y NTE

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

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

1.3 Discriminación de componentes enzimáticos con actividad PVasa

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

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

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

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

discriminaron experimentalmente tres componentes enzimáticos con actividad PVasa en fracción soluble de cerebro de pollo: E α , E β , y E γ .

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

1.3.1 PVasa y colinesterasas

Benabent et al. (2014) mostraron que el fenilvalerato inhibía parcialmente la actividad colinesterasa en fracción soluble de cerebro de pollo. Por otro lado, la acetiltiocolina (AtCh) muestra cierta inhibición en los componentes de actividad PVasa.

Este escenario sugiere que los componentes PVasa pueden contener enzimas que hidrolizan AtCh. Mediante análisis proteómico, se demostró que la fracción enriquecida con el componente E α de actividad PVasa contiene BuChE (Mangas et al. 2016).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la enzima BuChE humana tiene actividad PVasa (Mangas et al. 2017).

2. ANTECEDENTES

2.1 Optimización de las condiciones del ensayo para las diferentes actividades

En los últimos años en el laboratorio de toxicología se han llevado a cabo una serie de trabajos con el fin de caracterizar proteínas con actividad PVasa. Las investigaciones se realizaron con la enzima BuChE humana, aislada del plasma humano. En el trabajo presentado por Romo (2017) se establecieron las variables experimentales óptimas para los experimentos de competición entre sustratos en actividad PVasa y colinesterasa de la BuChE humana a un tiempo de reacción enzima-sustrato de 5 minutos, siendo la concentración óptima de la enzima 0,5 nM y su temperatura óptima 37°C, para los cuales la velocidad de formación de productos es constante; es decir, están en condiciones de estado estacionario.

2.2 Actividad PVasa en otras colinesterasas

Romo (2017) estudió la actividad PVasa para colinesterasas de otras especies, siendo en orden decreciente de actividad: BuChE humana, AChE humana, BuChE de suero de caballo y AChE de anguila eléctrica, demostrando que el nivel de actividad PVasa de las colinesterasas es dependiente de la especie de procedencia de la enzima y del tipo de enzima.

2.3 Mecanismos de reacción

2.3.1 Actividad PVasa

Cinética de reacción

En este mismo trabajo se utilizaron diversos modelos matemáticos para analizar los resultados y observaron que la actividad hidrolizante del fenilvalerato por la BuChE humana siguió un mecanismo de Michaelis-Menten, con una K_M comprendida entre 0,096 y 0,23 mM y una V_{max} en el rango de 7,2 y 16,0 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Romo, 2017), valores similares a los obtenidos en el trabajo de Mangas et al. (2017).

Estudio de competición entre sustratos

Romo (2017) estudió la interacción entre los sustratos fenilvalerato (PV) y acetiltiocolina (AtCh) en la BuChE humana y se observó que el mecanismo no se ajustaba a una competición entre sustratos basada en un modelo de Michaelis-Menten.

Los datos obtenidos con actividad PVasa en presencia de AtCh sugirieron que el comportamiento de la AtCh era similar a un inhibidor reversible según la reacción mixta parcial (**Figura 2.1**), cuya ecuación se muestra en la **Figura 2.2**. Este modelo mostraba que la reacción no se inhibe del todo, sino que se ralentiza al ser parcial. La reacción mixta parcial indicó que el sitio activo de hidrólisis de PV podría ser diferente al de la AtCh.

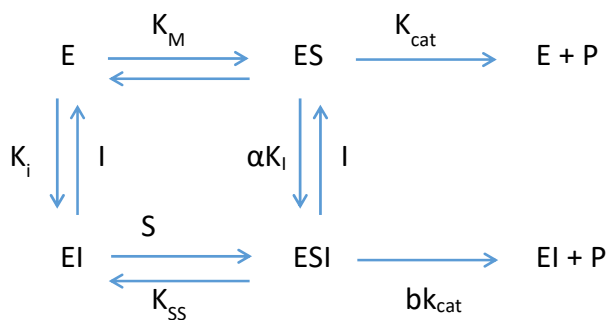


Figura 2.1. Inhibición mixta parcial, donde I es la concentración de inhibidor, S la de sustrato, E la de la enzima y P la del producto. En mayúsculas se presentan las constantes de equilibrio de la reacción y en minúsculas las constantes catalíticas. Su ecuación se muestra en la **Figura 2.2**.

$$v = \frac{V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M} + BV_{max} \cdot \frac{[S] \cdot [I]}{\alpha K_M \cdot K_I}}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[S] \cdot [I]}{\alpha K_M \cdot K_I}}$$

Figura 2.2. Ecuación de inhibición mixta parcial, donde I es la concentración de inhibidor, S la de sustrato, E la de la enzima y P la del producto.

2.3.2 Actividad Colinesterasa

Cinética de reacción

En este mismo trabajo, se aplicaron diversos modelos matemáticos para analizar los datos de actividad colinesterasa en BuChE humana y se observó que seguía un mecanismo bifásico de activación por sustrato (modificación de la reacción de Webb) mostrado en la **Figura 2.3**, con una K_M comprendida entre 0,04 y 0,09 mM, una K_{SS} entre 1,3 y 2,3 mM, una V_{max1} entre 13 y 17 $\mu\text{M}/\text{min}$, y una V_{max2} entre 31 y 32 $\mu\text{M}/\text{min}$. El trabajo presentado por Masson et al. (1993) mostró que para la hidrólisis de AtCh por BuChE humana era un mecanismo de activación por exceso de sustrato mediado por el mismo sitio de unión periférico regulador, obteniendo una K_M y K_{SS} comparables a las del trabajo de Romo (2017).

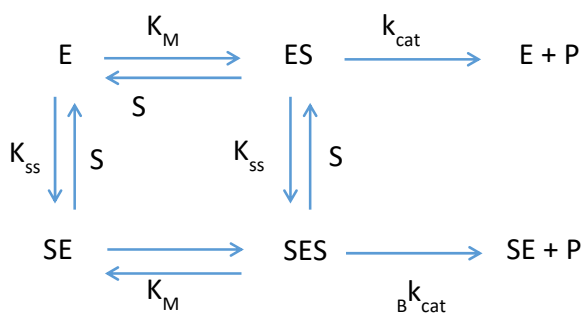


Figura 2.3. Reacción bifásica, donde E es la concentración de enzima, S la de sustrato y P la del producto. Las constantes de equilibrio de la reacción se muestran en mayúsculas y las catalíticas en minúsculas.

Estudio de competición entre sustratos

La actividad colinesterasa en presencia de PV estudiada por Romo et al. (2017) para BuChE humana mostraba que la interacción del PV era comparable a la de un inhibidor reversible.

También se observó que los experimentos de competición entre sustratos eran compatibles con que el PV y la AtCh tengan un centro activo diferente, o con un modelo más complejo que el modelo de reacción de Michaelis-Menten.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es caracterizar cinéticamente la actividad hidrolizante de PV y la interacción entre PV y AtCh en las actividades PVasa y acetilcolinesterasa en AChE humana recombinante.

3.1 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones óptimas para diseñar los ensayos de interacción entre sustratos en actividades PVasa y colinesterasa con AChE humana recombinante.

2. Comparar la actividad PVasa de la AChE humana recombinante con otras colinesterasas de otras especies.
3. Caracterizar la interacción cinética entre sustratos en actividades fenilvalerato esterasa y acetilcolinesterasa en AChE humana recombinante.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tampones y reactivos utilizados

- ✓ **Albúmina de suero bovino (BSA).** (Pureza 96%) se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Se preparó en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4. Se utilizó para preparar las disoluciones de enzima y los blancos de las mismas.
- ✓ **Agua ultrapura (MQ).** Se obtuvo a partir de agua purificada por ósmosis inversa (Elix 3 de Millipore) que se ultrapurificó con el equipo (miliQ Element de Millipore).
- ✓ **Tampón fosfato.** Dihidrofosfato de sodio monohidratado 0,1 M pH 7,4. Se preparó disolviendo dihidrofosfato de sodio monohidratado en agua MQ. El pH se ajustó a 7,4 con NaOH concentrado y se conservó a temperatura ambiente.
- ✓ **Acetato sódico anhidro (CH₃COONa).** Se adquirió de Sigma-Aldrich S.A. Para su utilización, se preparó a la concentración requerida en función del ensayo realizado, en agua ultrapura.
- ✓ **Dodecilsulfato sódico (SDS) y 4 aminoantipirina (AAP).** Se adquirieron de grado analítico (PanReac). Se preparó una disolución de SDS 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, ya que es fotosensible.
- ✓ **Dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).** Se adquirieron de grado analítico de Panreac Química S.A. (Barcelona, España) y Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España) respectivamente. Se preparó una disolución de SDS 2% / DTNB 6 mM en tampón fosfato 0.1 M / EDTA 1 mM, pH 7.4 y se conservó a temperatura ambiente en una botella de topacio para evitar la degradación del DTNB.
- ✓ **Fenilvalerato (PV).** Se adquirió de Lark Enterprises (Webster, USA). Para los ensayos de actividad fenilvalerato esterasa se preparó una disolución concentrada de 300 mg/ml (1715'5 mM) en N,N-dimetilformamida (DMF) y se conservó en nevera a 4°C, siendo estable durante meses. Para su utilización como sustrato se prepararon disoluciones, inmediatamente antes de uso, a las concentraciones requeridas del ensayo, de forma que el porcentaje de DMF no fuera superior al 3% para que no se viera alterada la actividad enzimática.

- ✓ **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 acetiltiocolina (AtCh).** (Pureza superior al 98%). Se adquirió de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Para su uso como sustrato, se preparó, inmediatamente antes de su uso, a la concentración necesaria en función del ensayo realizado (en agua ultrapura) para minimizar su degradación por hidrólisis espontánea.
- ✓ **Yoduro de tiocolina.** (Pureza superior al 95%). Se adquirió de BOC Sciences (USA). Para su utilización, se preparó a la concentración requerida en función del ensayo realizado, en agua ultrapura.

4.2 Material biológico

Las soluciones enzimáticas se prepararon a diferentes concentraciones, según lo requiriese el ensayo a realizar, con BSA 1% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y comprobando su actividad antes de realizar cada ensayo. Las concentraciones enzimáticas se refieren a la concentración de sitios catalíticos i.e., monómeros.

- ✓ **Acetilcolinesterasa humana recombinante (hAtChER).** Se adquirió de R&D SYSTEMS a biotechnne brand distribuida por VITRO.S.A.
- ✓ **Butirilcolinesterasa humana (hButChE).** Aislada de plasma humano y proporcionada por Douglas Cerasoli [USAM-RICD (US Army Medical Research Institute of Chemical Defense), Aberdeen Proving Ground, MD, USA].
- ✓ **Butirilcolinesterasa (C 3.1.1.8) de suero de caballo (BuChE sc)** liofilizada, ≥ 10 unidades/mg de proteína, C7512, adquiridos de Sigma-Aldrich. Se preparó un stock a 3 mg/ml en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4.
- ✓ **Acetilcolinesterasa (C 3.1.1.7) de anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*) (AChE ee)** Tipo V-S, liofilizada, más de 1,000 unidades/mg de proteína, C2888, adquiridos de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Se preparó un stock a 1 mg/ml en tampón fosfato 0'1 M, pH 7'4.

4.3 Equipos utilizados

- ✓ **Estación automatizada Biomek 2000 (Beckman-Coulter).** Esta estación de trabajo robotizada se utilizó para realizar todas las medidas de actividades enzimáticas mediante microensayo, a fin de minimizar el consumo de muestra, permitiendo además la automatización de los ensayos, la realización simultánea de un número elevado de muestras y garantizando la reproducibilidad de los volúmenes y tiempos. Está equipada con pipetas multicanal (8x) con capacidad entre 20-200

μL , dos termobloques de aluminio termostatzado para 8x12 minitubos de 1 mL con un controlador de temperatura electr3nico y una microplaca de 96 pocillos para su posterior lectura fotom3trica.

- ✓ **Lector de placas.** Para la lectura fotom3trica se utiliz3 el lector de placas AD 340 C (Beckman Coulter).

4.4 Microensayo de actividad colinesterasa

Se mezclaron 120 μL de una soluci3n con enzima a la concentraci3n deseada en BSA 1% con 120 μL de sustrato. Pasado el tiempo de reacci3n, especificado en cada ensayo, se detiene el proceso aadiendo 120 μL de SDS 2% / DTNB 6 mM y, posteriormente, se aadiaron 120 μL de BSA 1% a las muestras o enzima en el caso de los controles. Se midi3 la absorbancia a 405 nm.

El m3todo est3 basado en el ensayo descrito por Benabent et al. (2014) para la determinaci3n de actividad colinesterasa en cerebro.

4.5 Microensayo de actividad PVasa

Se mezclaron 120 μL de una soluci3n con enzima a la concentraci3n deseada en BSA 1% con 120 μL de otra soluci3n de sustrato a 37°C. Pasado el tiempo de reacci3n, especificado en cada ensayo, se detuvo el proceso aadiendo 120 μL de SDS 2% / AAP 10 mM y, posteriormente, se aadiaron 60 μL de ferricianuro pot3sico, tanto a las muestras como a los blancos. Se midi3 la absorbancia a 510 nm.

El m3todo colorim3trico utilizado est3 basado en el m3todo de medida de fenol adaptado por Jonhson (1977) para el ensayo de NTE y optimizado en el laboratorio de toxicolog3a (Escudero et al. 1997, Mangas et al. 2012 a).

4.6 Microensayo de competici3n entre sustratos

El ensayo para la actividad PVasa se realiz3 en termobloques de aluminio a 37°C (temperatura 3ptima de la enzima). En minitubos de 1 mL se dispuso 120 μL de enzima (**B** en **Figura 4.1** y **Figura 4.2**). Posteriormente se aadiaron 120 μL (**1** en **Figura 4.1** y **Figura 4.2**) de preparaci3n de sustrato (PV y AtCh en agua ultrapura a diferentes concentraciones) (**A** en **Figura 4.1** y **Figura 4.2**). El tiempo de reacci3n fue de 5 minutos y 25 segundos. La reacci3n se par3 aadiendo 120 μL de una soluci3n que conten3a SDS 2% / AAP 10 mM (**2** en **Figura 4.1**). A continuaci3n, se aadi3 60 μL de ferricianuro pot3sico a todos los minitubos (**3** en **Figura 4.1**). Por el contrario, la reacci3n para la actividad colinesterasa se par3 aadiendo 120 μL de una soluci3n que conten3a SDS 2% / DTNB 6 mM (**2** en **Figura 4.2**) y a continuaci3n, se aadi3

120 μL de BSA 1% (3 en **Figura 4.2**) a las muestras y 120 μL de enzima a los controles. Un volumen de 300 μL fue transferido automáticamente a una microplaca de 96 pocillos (4 en la **Figura 4.1** y **Figura 4.2**). Se midió la absorbancia a 510 nm para la actividad PVasa y a 405 nm para la actividad colinesterasa. Los controles de hidrólisis espontánea (BSA 1%) fueron incluidos en el mismo proceso automatizado.

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

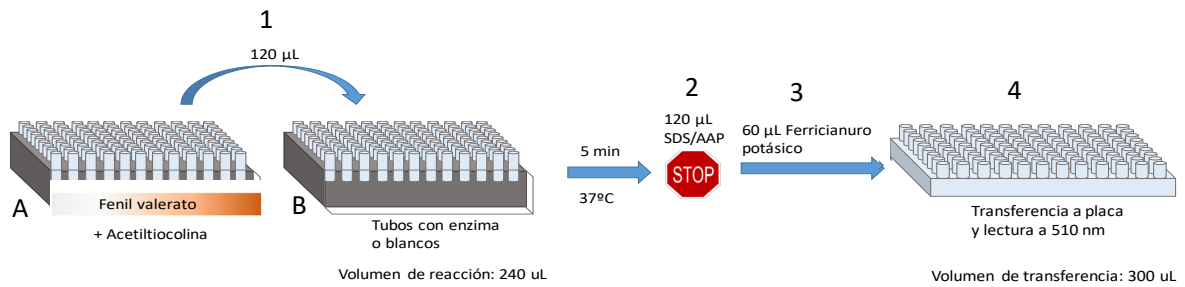


Figura 4.1. Esquema del ensayo de competición entre sustratos de actividad PVasa. En A se dispone el sustrato y en B la enzima en la mitad de los tubos y BSA 1% en la otra mitad. (Imagen tomada de Romo, 2017).

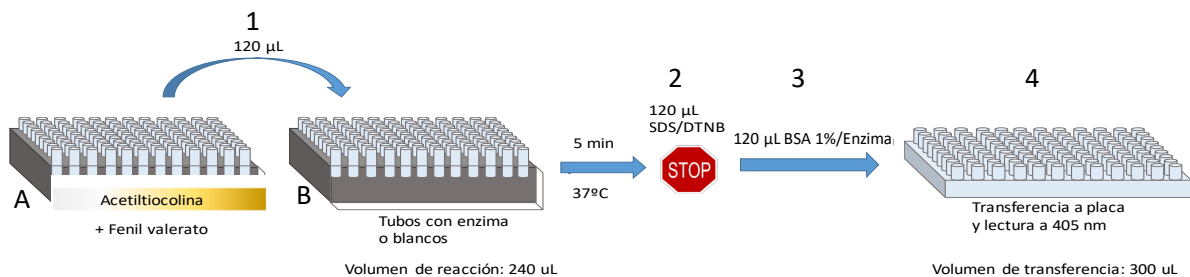


Figura 4.2. Esquema del ensayo de competición entre sustratos de actividad colinesterasa. En A se dispone el sustrato y en B la enzima en la mitad de los tubos y BSA 1% en la otra. (Imagen tomada de Romo, 2017).

4.7 Curva de calibrado del método colorimétrico de fenol.

Se realizó una curva de calibrado del método colorimétrico basado en el método de medida de fenol adaptado por Johnson (1977) para el ensayo de NTE. Se realizaron utilizando 10 concentraciones crecientes de fenol en el rango de 0 y 0,5 mM en un volumen de reacción de 200 μL preparadas en agua ultrapura a partir de una concentración de 1 mM. A 100 μL de cada una de las disoluciones estándar de fenol se le añadieron 100 μL de BSA 1%, 100 μL de SDS 2% / AAP 10 mM y 50 μL de ferricianuro potásico. Se transfirieron 300 μL de cada muestra a una placa de 96 pocillos, se midió la absorbancia a 510 nm.

4.8 Curva de calibrado del método colorimétrico de tiocolina.

Se realizó una curva de calibrado del método colorimétrico de tiocolina. Se utilizaron 12 concentraciones de tiocolina preparadas en agua ultrapura, en un rango de 0 y 0,667 mM en un volumen de reacción de 200 μ L. A 100 μ L de las distintas disoluciones de tiocolina se les añadió 100 μ L de BSA 1%, 100 μ L de SDS/DTNB y 100 μ L de BSA 1%. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm.

4.9 Modelos matemáticos y análisis de los datos

4.9.1 Análisis de los datos

Los resultados de los ensayos cinéticos de actividad de sustratos se analizaron con el módulo Exploratory E-K del programa SigmaPlot versión 13.0 (Systat Software Inc, Chicago, USA) para Windows con el objetivo de obtener información tanto cualitativa como cuantitativa sobre el mecanismo de interacción con el sustrato. Este módulo crea gráficos directos lineales, gráficos secundarios e informes numéricos.

A partir de regresiones no lineales el software compara diferentes mecanismos enzimáticos (Hill, Michaelis-Menten, activación por el sustrato ordenado y aleatorio, inhibición por sustrato incompetitiva, isoenzima y modelo bifásico) y proporciona los parámetros cinéticos (V_{max} , índice de Hill, K_M ...).

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

4.9.2 Análisis matemático de los datos de los experimentos de competición entre sustratos

Los datos obtenidos en los experimentos de competición entre sustratos en actividad colinesterasa, se sometieron a análisis mediante el programa Sigma Plot 13.0. Se utilizó el criterio ALCC para comparar los ajustes. Se consideró que la actividad colinesterasa de AChE humana recombinante seguía un mecanismo de reacción bifásica de inhibición por sustrato (**Figura 2.3**). Se usaron diferentes modelos para ajustar los datos obtenidos en los experimentos de competición de PV en actividad colinesterasa. Dichos modelos consideran al PV como un inhibidor reversible. Los mecanismos utilizados y sus ecuaciones son mostradas en el **Anexo**.

5. RESULTADOS

5.1 Actividad PVasa

5.1.1 Actividad PVasa en diferentes colinesterasas en función de la concentración de enzima

Se estudió la actividad PVasa con diferentes concentraciones de colinesterasas procedentes de distintas especies. La BuChE humana es la enzima que mostró más actividad PVasa, seguida de la AChE humana recombinante, BuChE de caballo y finalizando con la AChE de anguila eléctrica, que no mostró actividad PVasa (**Figura 5.1**). También se observa que la actividad PVasa de AChE humana recombinante es lineal en el rango de concentraciones de enzima utilizado.

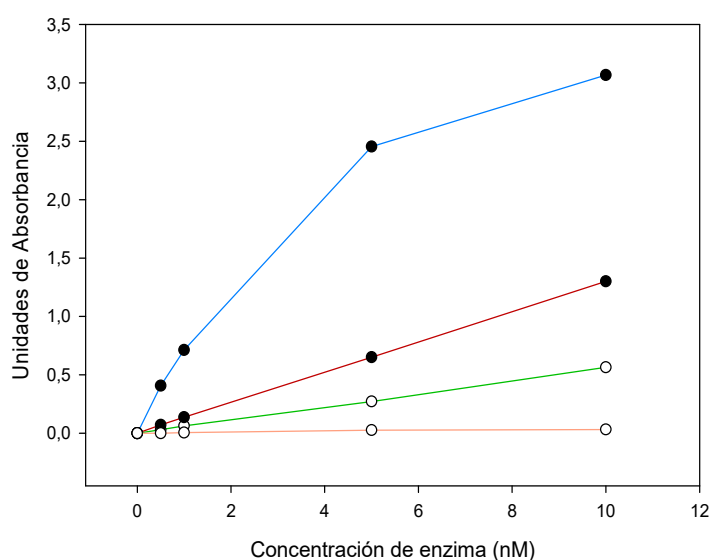


Figura 5.1. Comparación de actividades. Se ensayaron varias concentraciones de enzima, 0,5, 1, 5, 10 nM en el volumen de reacción, con 7,5 mM de PV durante 10 minutos a 37°C. Enzimas: BuChE humana (azul), AChE humana recombinante (rojo), BuChE de caballo (verde) y AChE anguila eléctrica (naranja).

5.1.2 Actividad PVasa en AChE humana recombinante en función del tiempo de reacción

Para la determinación del tiempo óptimo de reacción y la concentración óptima de PV se ensayaron diferentes tiempos de reacción en diferentes condiciones: 5 nM de AChE humana recombinante y concentraciones de PV de 0,25 mM y 2,86 mM en el volumen de reacción. Los resultados se muestran en la **Figura 5.2**.

La actividad PVasa mostró un comportamiento lineal durante todo el intervalo de tiempo, de 0 a 20 minutos, para la concentración de 2,88 mM de PV. Para una concentración de PV de 0,25 mM, la actividad se muestra lineal en un intervalo de tiempo de 0 a 10 minutos, es decir, a velocidad de reacción

constante, lo que implica que podemos trabajar en ese rango de concentraciones y tiempo en los experimentos de competición.

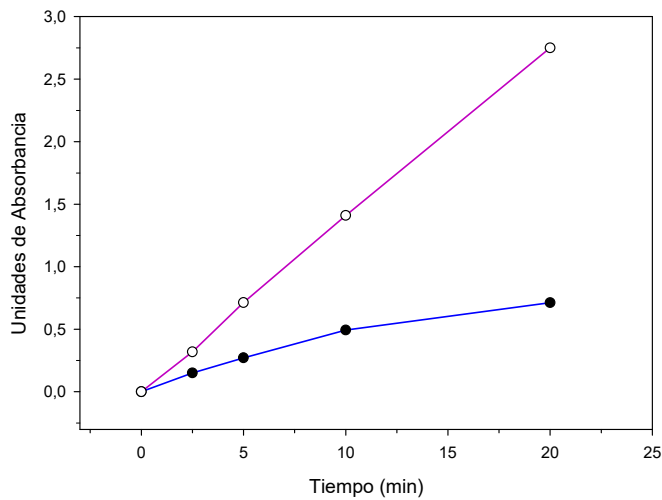


Figura 5.2. Actividad PVasa. Se ensayaron concentraciones de fenilvalerato de 0,25 mM (círculos negros) y 2,87 mM (círculos blancos) en el volumen de reacción, y se midió la actividad a los 0, 2,5, 5, 10, 20 minutos, a una concentración final de enzima de 5 nM.

5.1.3 Curva de calibrado de fenol

Se realizó la curva de calibrado de fenol para el posterior cálculo de los resultados del experimento de competición. Se ensayaron 10 concentraciones de fenol, comprendidas entre 0 y 0,5 mM en el volumen de reacción durante 5 minutos a 37 °C, de acuerdo con el ensayo de actividad PVasa, añadiendo BSA 1% en lugar de enzima. Los resultados se muestran en la **Figura 5.3**.

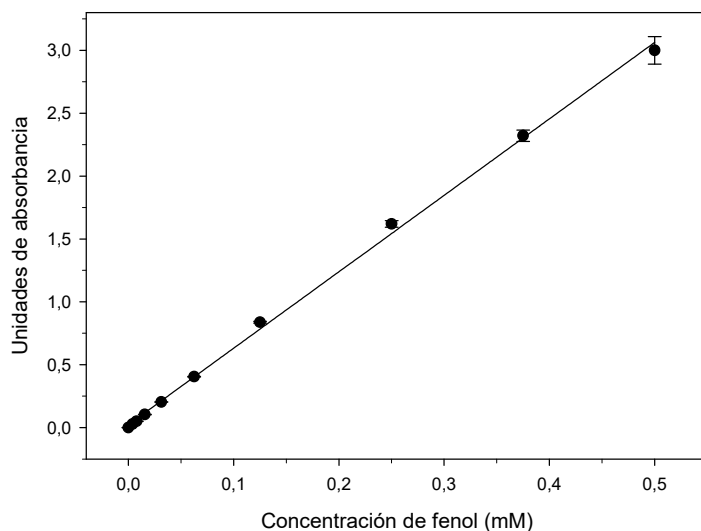


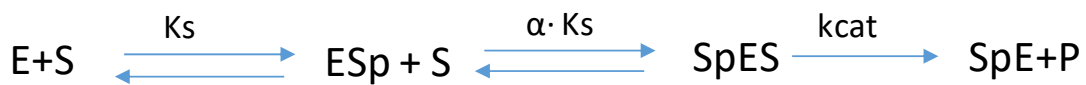
Figura 5.3. Curva de calibrado de fenol. ($R^2 = 0,999$). Las barras muestran la desviación estándar.

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

$$\text{Absorbancia} = 0,0231 + 6,0818 \cdot \text{concentración}$$

5.1.4 Actividad PVasa en AChE humana recombinante en función de la concentración de sustrato

En la **Figura 5.6** se muestran los datos obtenidos con diferentes concentraciones de PV y 5 nM de AChE humana recombinante en volumen de reacción, y 5 minutos 25 segundos de tiempo de reacción. Los datos se analizaron de acuerdo con diferentes modelos cinéticos y el mejor, según el criterio de ALCC, fue el correspondiente al mecanismo de reacción de activación por sustrato ordenado (**Figura 5.4**). La ecuación de este modelo se muestra en la **Figura 5.5** y los parámetros aparecen en la **Tabla 5.1**.



5.4. Reacción de activación ordenada, donde *E* es la concentración de enzima, *S* la de sustrato y *P* la del producto. Las constantes de equilibrio se muestran en mayúsculas y las catalíticas en minúsculas. Su ecuación se muestra en la **Figura 5.5**.

$$v = V_{max} \cdot \frac{\frac{S}{K_S}}{1 + \frac{S}{K_S} + \frac{S^2}{\alpha K_S^2}}$$

Figura 5.5. Ecuación típica de un modelo de activación por sustrato ordenado, donde K_S es la constante de equilibrio cuando se une la primera molécula de sustrato, V_{max} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción y α es un número que multiplicado por K_S se obtiene la constante de equilibrio cuando se une la segunda molécula. La reacción es mostrada en la **Figura 5.4**.

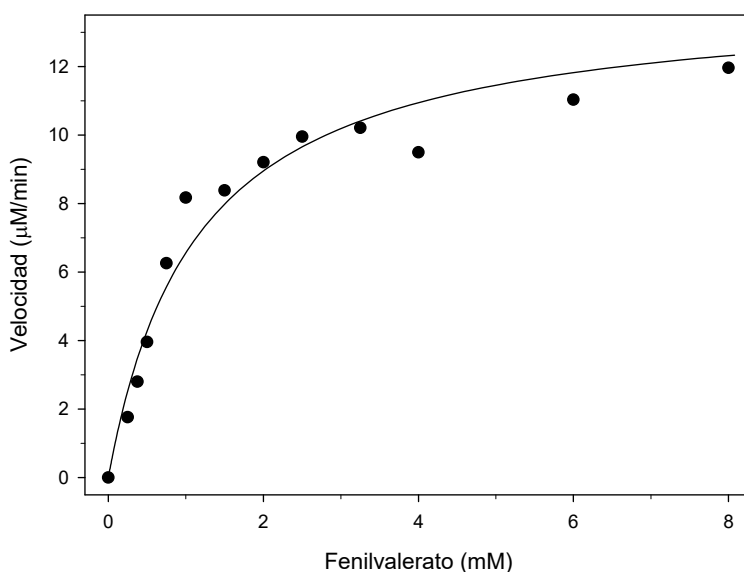


Figura 5.6. Ajustes al mecanismo de reacción. Se muestran los resultados del análisis de los datos de acuerdo al mecanismo de activación por sustrato ordenado, mejor mecanismo según el criterio de ALCC con el software SigmaPlot. ($R^2 = 0,996$).

Tabla 5.1. Parámetros obtenidos del ajuste de activación por sustrato ordenado. K_S es la constante de equilibrio cuando se une la primera molécula de sustrato, la V_{max} es la velocidad máxima alcanzada en la

reacción, k_{cat} es la constante catalítica y α es un número que multiplicando a la K_S da la K_{SS} , la constante de equilibrio cuando se une la segunda molécula de sustrato. Se muestran los parámetros estimados de 2 experimentos independientes.

K_S (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	k_{cat} (constante catalítica) (min^{-1})	α
0,38 / 0,36	12,66 / 8,10	2531 / 1620	1,57 / 2,35

5.1.5 Ensayo de competición con acetiltiocolina. Actividad PVasa en AChE humana recombinante

Se realizó el microensayo de competición entre sustratos para actividad PVasa descrito en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la **Figura 5.7**.

A la concentración más baja de AtCh (0,5 mM) se observó un aumento de la actividad PVasa, mientras que a altas concentraciones de AtCh, se inhibió esta actividad PVasa, casi totalmente a 8 mM de AtCh (**Figura 5.7**).

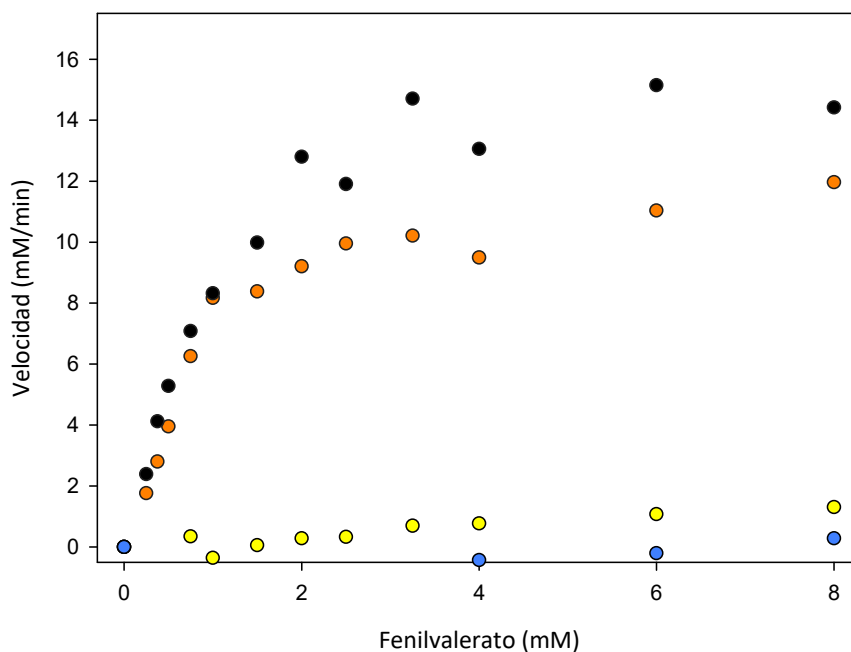


Figura 5.7. Cinética de la actividad PVasa de la AChE humana recombinante. Concentraciones de fenilvalerato: entre 0,25 y 8 mM a 37°C para 5 minutos de reacción. Concentraciones de acetiltiocolina: 0 (naranja), 0,5 (negro), 3 (amarillo) y 20 (azul) mM en un volumen de reacción de 240 μL .

5.1.6 Actividad PVasa de AChE humana recombinante en presencia de diferentes concentraciones de acetiltiocolina

Se estudió la actividad PVasa de la AChE humana recombinante, a una concentración de 5 nM en el volumen de reacción con una mezcla de 3 mM de PV y AtCh a 0,125 mM, 0,250 mM, 0,5 mM, 0,75 mM ó 1 mM, a 5 minutos de reacción. Como control se siguió el mismo procedimiento pero con 3 mM de PV en ausencia de AtCh.

Según los resultados obtenidos mostrados en la **Figura 5.8**, al aumentar la concentración de AtCh en el rango de 0 a 1 mM, aumentó la actividad PVasa hasta alcanzar una actividad máxima entre 0,5 y 0,75 mM de AtCh, que a partir de 1 mM empieza a descender.

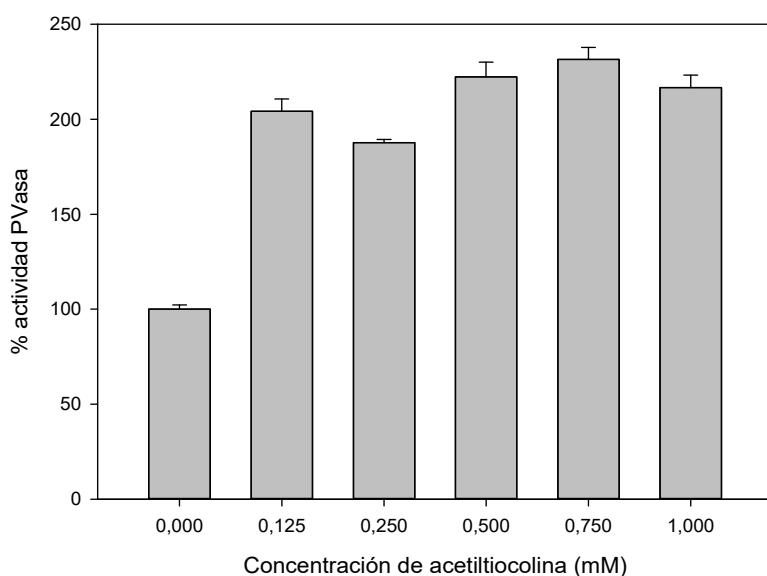


Figura 5.8. Actividad PVasa expresada en porcentaje en función de la concentración de acetiltiocolina (mM). Las barras representan la desviación estándar.

5.1.7 Actividad PVasa de AChE humana recombinante en presencia de acetiltiocolina y sus productos de reacción

Se estudió la actividad PVasa de AChE humana recombinante usando 5,46 nM de AChE y 3 mM de PV en el volumen de reacción, en presencia AtCh y sus productos de reacción (acetato y tiocolina) a 37°C en 5 minutos de reacción.

En la **Figura 5.9** se muestran dos experimentos independientes. Se observó que en todas las condiciones aumenta la actividad PVasa respecto al control (PV 3 mM). Sin embargo, la máxima activación para la actividad PVasa se da en presencia de la mezcla correspondiente a 3 mM de PV y 0,5 mM de AtCh.

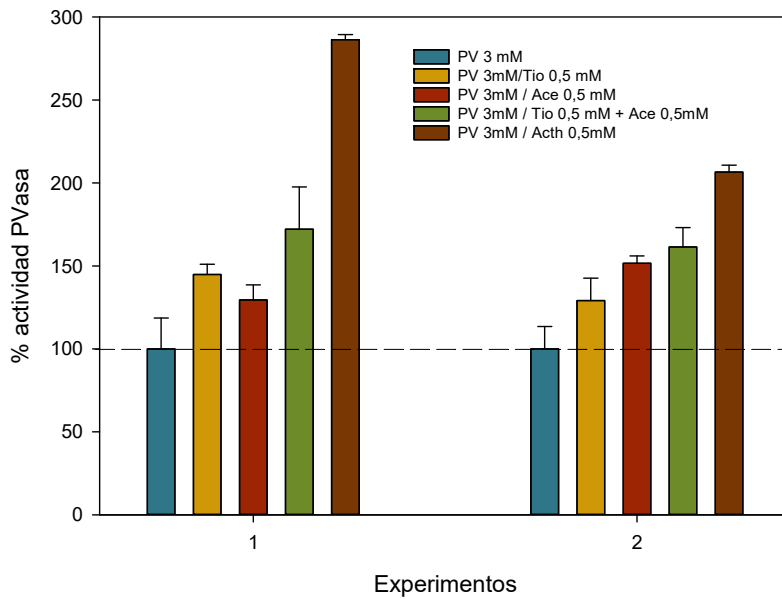


Figura 5.9. Actividad PVasa. Se utilizó una mezcla de fenilvalerato (PV) a 3 mM, presente en todas las condiciones, con: tiocolina (Tio) a 0,5 mM, acetato (Ace) a 0,5 mM, tiocolina y acetato a 0,5 mM, y acetiltiocolina (AtCh) a 0,5 mM. Como control se usó PV a 3 mM en ausencia de acetiltiocolina y sus productos de reacción. Las barras representan la desviación estándar.

5.1.8 Actividad PVasa de AChE humana recombinante en función del tiempo en presencia de acetiltiocolina

Se estudió la actividad PVasa de la AChE humana recombinante a una concentración de 5 nM en volumen de reacción con una mezcla de 3 mM de PV y 0,75 mM de AtCh en volumen de reacción para los siguientes tiempos de reacción: 25, 35, 60, 105, 120, 180 y 300 segundos. Como control se siguió el mismo procedimiento con 3 mM de PV en ausencia de AtCh.

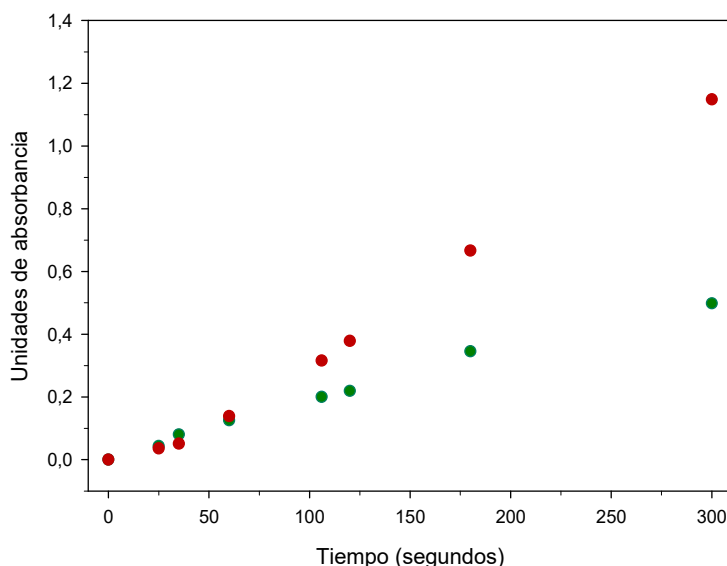


Figura 5.10. Actividad PVasa de AChE en función del tiempo con 3 mM de fenilvalerato (puntos verdes) y en presencia de 0,75 mM de acetiltiocolina y 3 mM de fenilvalerato (puntos rojos).

La **Figura 5.10** muestra que la actividad PVasa en presencia de AtCh para tiempos cortos de reacción coincide con la recta control (3 mM de PV en ausencia de AtCh). Sin embargo, a partir de un

tiempo teórico de inflexión entre 33 y 44 segundos (mostrado en la **Tabla 5.3**) la actividad en presencia de AtCh aumentó.

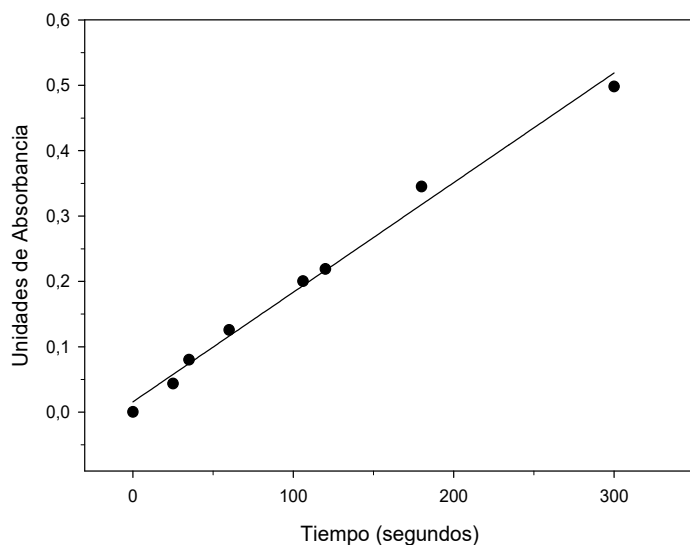


Figura 5.11. Curva control para actividad PVasa. Concentración de fenilvalerato a 3 mM. ($R^2 = 0,991$).

Como se aprecia en la **Figura 5.11**, la actividad PVasa de AChE en ausencia de AtCh mostró un comportamiento lineal, a velocidad de reacción constante, hasta 5 minutos con 3 mM de PV en volumen de reacción. Los parámetros de esta recta se muestran en la **Tabla 5.2**.

Y_0 (u.A)	m (u.A/seg)
0,0157 / 0,0106	0,0017 / 0,0017

Tabla 5.2. Parámetros. Y_0 es la ordenada en el origen y m es la pendiente de la gráfica. *u.A* son unidades de absorbancia. Se muestran los parámetros deducidos de dos experimentos.

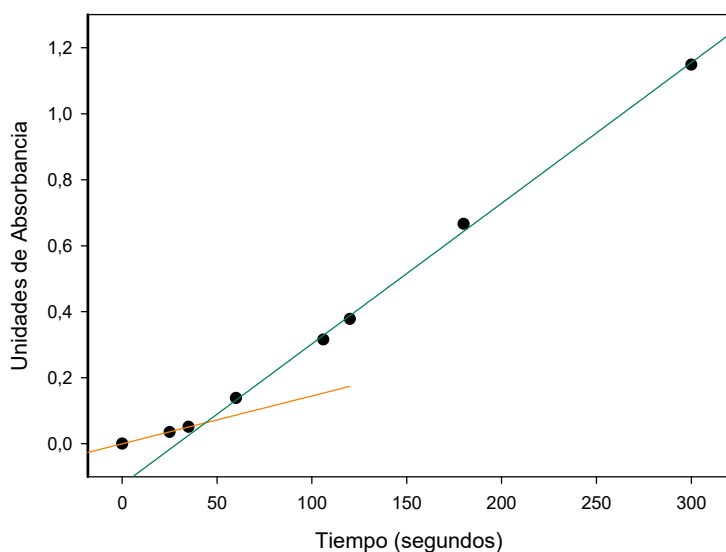


Figura 5.12. Actividad PVasa en presencia de 3 mM de fenilvalerato y 0,75 mM de acetilcolina. Las líneas rectas muestran el ajuste lineal de los datos en dos rangos donde la actividad es lineal. Los parámetros obtenidos de cada recta se muestran en la **Tabla 5.3**.

Como se muestra en la **Figura 5.12**, la actividad Pvasa de AChE sufre una activación alrededor de un tiempo teórico de inflexión de 33 – 44 segundos (**Tabla 5.3**). El tiempo teórico de inflexión es deducido como el punto donde intersectan las dos rectas que ajustan los puntos de los dos rangos de tiempo donde la actividad es lineal.

	Y_0 (u.A)	m (u.A/seg)	R^2	Tiempo teórico de inflexión (segundos)
Recta Naranja	-0,0002 / -0,0011	0,0015 / 0,001	0,9996 / 0,9607	43,9 / 32,77
Recta Verde	-0,1235 / -0,0708	0,0043 / 0,0031	0,999 / 0,9968	

Tabla 5.3. Parámetros obtenidos. Y_0 es el punto donde la recta corta con el eje Y. m es la pendiente de la recta. R^2 es el coeficiente de correlación. El *tiempo teórico de inflexión* es el tiempo en el que la velocidad cambiaría si su comportamiento fuera el de dos rectas. $u.A$ son las unidades de absorbancia. Se muestran los parámetros deducidos de dos experimentos independientes.

5.2 Actividad colinesterasa de AChE humana recombinante

5.2.1 Actividad colinesterasa en AChE humana recombinante en función del tiempo

Se estudió la actividad colinesterasa con las concentraciones de 1 nM y 0,25 nM de AChE humana recombinante, con AtCh 1,1 mM en el volumen de reacción durante un tiempo de reacción de 5 minutos. Se observó que para una concentración de enzima 1 nM se saturaba el lector de placas y con 0,25 nM obteníamos una actividad de 1,93 unidades de absorbancia.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se utilizó 0,05 nM de enzima y 0,250 mM de AtCh, en el volumen de reacción. Los tiempos de reacción a los que se midió la actividad fueron de 0,5, 1, 3, 6 y 10 minutos. Los resultados se muestran en la **Figura 5.13**.

Como vemos en la **Figura 5.13** la actividad se mantiene lineal, a velocidad de reacción constante, en el intervalo de tiempo ensayado.

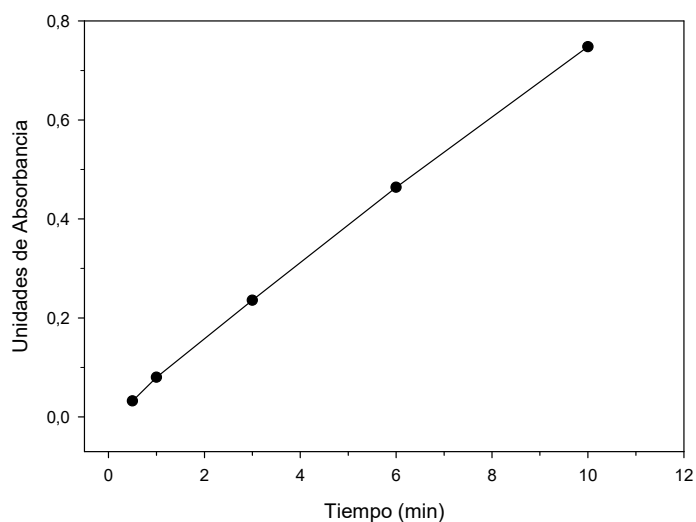


Figura 5.13. Actividad colinesterasa de la AChE humana recombinante. Se utilizó una concentración 0,250 mM de AtCh y AChE a 0,05 nM, ambas en el volumen de reacción. El ensayo se realizó parando la reacción a diferentes tiempos, ya señalados, a 37 °C.

5.2.2 Curva de calibrado de tiocolina

Se realizó la curva de calibrado de tiocolina para el posterior cálculo de los resultados del experimento de competición. Se ensayaron diferentes concentraciones de tiocolina, comprendidas entre 0 y 0,667 mM en volumen de reacción, durante 5 minutos a 37°C en las mismas condiciones que el ensayo de actividad colinesterasa, pero añadiendo BSA 1% en lugar de enzima (**Figura 5.14**).

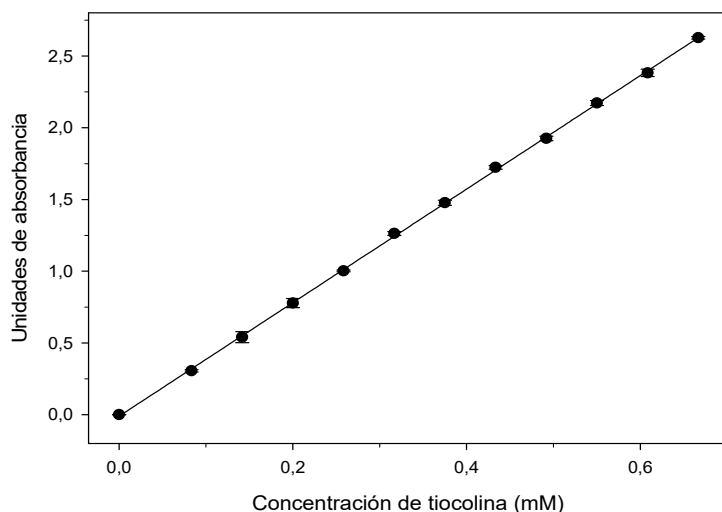


Figura 5.14. Curva de calibrado de tiocolina. ($R^2 = 0,9998$). Las barras representan la desviación estándar.

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

$$\text{Absorbancia} = -0,0105 + 3,9577 \cdot \text{concentración}$$

5.2.3 Estudio de actividad colinesterasa de AChE humana recombinante

La **Figura 5.16** muestra los resultados obtenidos del experimento de actividad colinesterasa de la AChE humana frente a la concentración de la AtCh. Los datos se analizaron según los modelos matemáticos correspondientes a diferentes modelos enzimáticos: Michaelis-Menten, Hill, activación por sustrato ordenado y aleatoria, isoenzima, inhibición acompetitiva y modelo bifásico mediante el software SigmaPlot. El mejor ajuste, de acuerdo con el criterio de ALCC y con una R^2 de 0,996 fue el mecanismo bifásico de inhibición por sustrato (Reacción de Webb modificada) (**Figura 2.3**), cuya ecuación se muestra en la **Figura 5.15**. Los parámetros se muestran en la **Tabla 5.4**.

$$v = \frac{V_{max1} \cdot S + V_{max2} \cdot \frac{S^2}{K_{SS}}}{K_M + S + \frac{S^2}{K_{SS}}}$$

Figura 5.15. Ecuación típica de un modelo bifásico, donde V_{max1} es la velocidad máxima alcanzada en la reacción en una primera fase, K_M es la constante de equilibrio a concentraciones de S bajas, V_{max2} es la velocidad máxima alcanzada en la segunda fase, y K_{SS} es la constante de equilibrio a concentraciones de S altas. La reacción se muestra en la **Figura 2.3**.

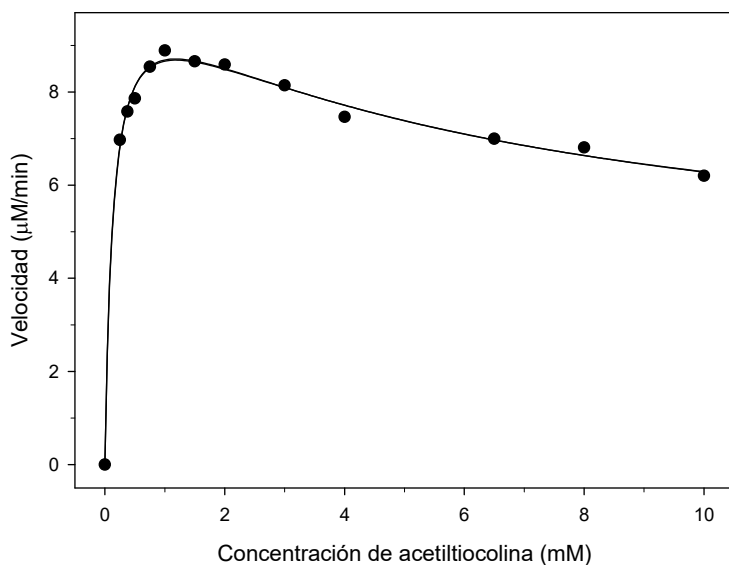


Figura 5.16. Ajustes al mecanismo de reacción de la actividad colinesterasa. Se muestran los resultados del análisis de los datos de acuerdo al mecanismo bifásico por activación de sustrato, mejor mecanismo según el criterio de ALCc con el software SigmaPlot ($R^2 = 0,996$).

K_M (mM)	V_{max1} (µM/min)	K_{cat1} (min ⁻¹)
0,14 / 0,11 / 0,10	11,08 / 30,13 / 25,97	236.000 / 602.600 / 519.400
K_{SS} (mM)	V_{max2} (µM/min)	K_{cat2} (min ⁻¹)
5,36 / 12,31 / 8,92	3,86 / 3,53 / 6,71	77.200 / 70.600 / 134.200

Tabla 5.4. Parámetros para el mecanismo bifásico de inhibición por sustrato de la actividad acetilcolinesterasa. La K_M corresponde a la constante de equilibrio a concentraciones de S bajas, V_{max1} a la velocidad máxima alcanzada en la reacción en una primera fase, K_{SS} a la constante de equilibrio a concentraciones de S altas, V_{max2} sería la velocidad máxima alcanzada en la segunda fase, k_{cat1} es la constante catalítica a concentraciones de S bajas y k_{cat2} es la constante catalítica a altas concentraciones de S. Se muestran los parámetros deducidos de 3 experimentos independientes.

5.2.4 Competición con fenilvalerato de la actividad colinesterasa de AChE humana recombinante

Se realizó el microensayo de competición con PV en actividad colinesterasa. Se observó que a altas concentraciones de AtCh la actividad colinesterasa tiende a alcanzar la velocidad máxima en todas las concentraciones de PV, una característica propia de una interacción competitiva (**Figura 5.17**). Los datos fueron analizados considerando que el PV actúa como un inhibidor reversible en una reacción bifásica de inhibición por sustrato (AtCh) según los modelos moleculares que incluían al menos una inhibición competitiva a altas, bajas o ambas concentraciones de sustrato. Los modelos moleculares usados fueron los correspondientes a una reacción bifásica de inhibición con el sustrato (AtCh) que se inhibía con el PV de acuerdo a la inhibición mostrada en la **Tabla 5.5**. Las reacciones y la deducción de las ecuaciones son mostradas en el **Anexo**.

Baja concentración de sustrato	Alta concentración de sustrato
Competitivo	-
Competitivo	Competitivo
Competitivo	No competitivo
Competitivo	Acompetitivo
Competitivo	Mixto
-	Competitivo
No competitivo	Competitivo
Acompetitivo	Competitivo
Mixto	Competitivo

Tabla 5.5. Modelos analizados en el microensayo de competición de PV en actividad colinesterasa. Todos incluyen al menos una inhibición competitiva en una de las fases.

Se realizó el ajuste en tres dimensiones de acuerdo a Estévez et al (2004) (**Figura 5.17**). El mejor ajuste, de acuerdo al criterio de ALCC, es el correspondiente a la inhibición competitiva a bajas y altas concentraciones de sustrato. Los parámetros obtenidos se muestran en la **Tabla 5.6**.

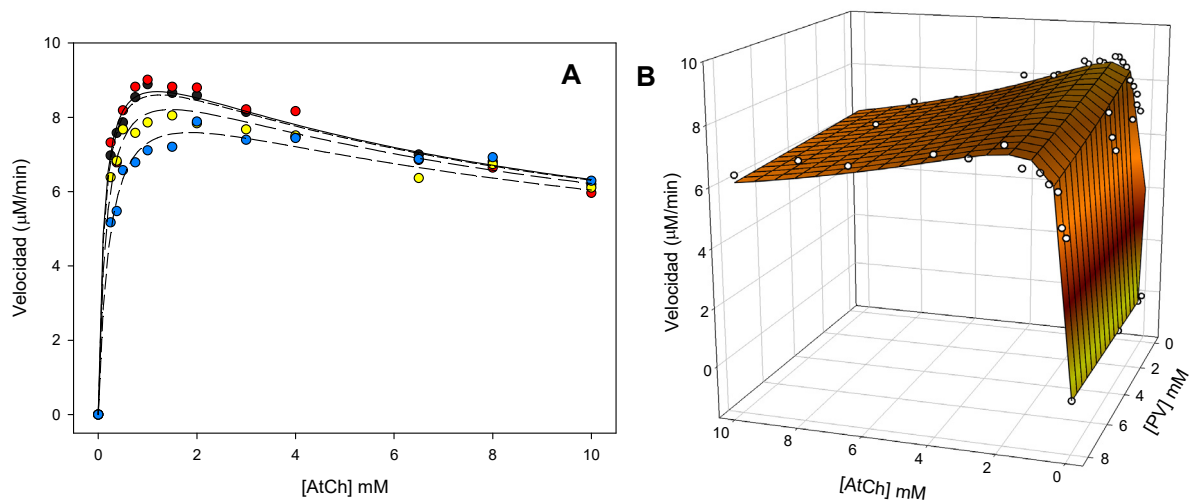


Figura 5.17. Cinética del efecto del fenilvalerato sobre la actividad colinesterasa de AChE humana recombinante. Concentraciones de acetiltiocolina en mM ([AtCh]): entre 0,125 y 8 mM, durante 5 minutos a 37°C. Concentraciones de fenilvalerato en mM ([PV]): 0(círculo negro), 0,5(círculo rojo), 3(círculo amarillo) y 8(círculo azul) mM en el volumen de reacción de 240 µL. **Imagen A.** Representación de curvas de nivel obtenidas del ajuste 3D. **La Imagen B** es la superficie del ajuste 3D según la ecuación del modelo bifásico de inhibición ($R^2 = 0,9797$).

Tabla 5.6. Tabla parámetros obtenidos por el mecanismo de competición descrito. La K_M es la constante de equilibrio a concentraciones bajas, la V_{max1} es la velocidad máxima alcanzada en la primera fase, la K_{SS} es la constante de equilibrio a concentraciones altas, la V_{max2} es la velocidad máxima alcanzada en la segunda fase, la K_{I1} es la constante de inhibición en la primera fase y K_{I2} es la constante de inhibición en la segunda fase.

K_M (mM)	V_{max1} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_{SS} (mM)	V_{max2} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_{I1} (mM)	K_{I2} (mM)
0,11 / 0,11	10,49 / 26,50	7,91 / 7,52	3,17 / 8,57	6,51 / 5,74	1,25 / 1,12

5.2.5 Actividad Colinesterasa de AChE humana recombinante en función del tiempo en presencia de fenilvalerato

Se estudió la actividad colinesterasa para la AChE humana recombinante con una concentración de AChE de 5 nM en el volumen de reacción con una mezcla de 3 mM de PV y 0,75 mM de AtCh para los siguientes tiempos de reacción: 25, 35, 60, 105, 120, 180 y 300 segundos. Como control se siguió el mismo procedimiento con 0,75 mM de AtCh en ausencia de PV.

Se observó que el PV inhibe muy poco y solo a tiempos tempranos (**Figura 5.18**). A partir de los 30 segundos aproximadamente la concentración de tiocolina alcanzada es de 0,79 mM, que correspondería a la totalidad de concentración de AtCh utilizada; de modo que asumimos que toda la AtCh está hidrolizada a partir de este tiempo.

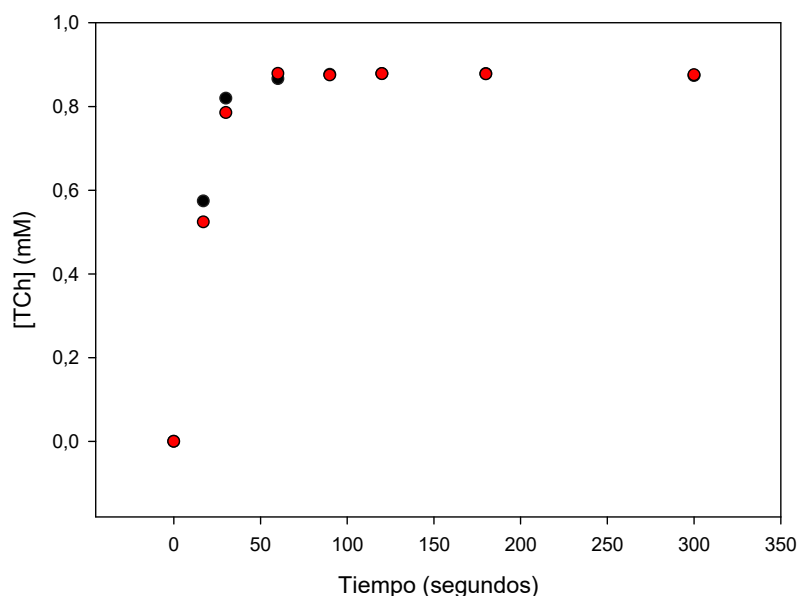


Figura 5.18. Actividad colinesterasa para AChE en función del tiempo y de concentración de tiocolina en mM ([TCh]). Se ensayó en presencia de 0,75 mM de acetiltiocolina (puntos negros) que usaremos como control y en presencia de 0,75 mM de acetiltiocolina y 3 mM de PV (puntos rojos).

6. DISCUSIÓN

6.1 Optimización de las condiciones del ensayo para las diferentes actividades

Actividad fenilvalerato esterasa (PVasa)

Se han estudiado las condiciones óptimas para el estudio de la actividad PVasa y colinesterasa de la AChE humana recombinante. A 5 nM de AChE con una concentración de 2,87 mM de PV se alcanzó la máxima actividad PVasa a 20 minutos de reacción. Mientras que a 5 nM de AChE con una concentración de 0,25 mM de PV se alcanzó la máxima actividad PVasa a 10 minutos de reacción.

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

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

Actividad colinesterasa

Se concluyó que una concentración de 0,05 nM de AChE a 5 minutos de reacción enzima-sustrato garantizaba una velocidad de formación de productos constante.

6.2 Actividad PVasa en otras colinesterasas

Se observó que la BuChE humana es la que mostraba más actividad PVasa, seguida de la AChE humana recombinante, BuChE de caballo y la AChE de anguila eléctrica, que no mostró actividad PVasa (**Figura 5.1**).

La actividad PVasa de la AChE humana es mayor que la recombinante (Romo, 2017). Esto podría ser debido a su propia naturaleza, la forma de procesamiento de la proteína, a que tenga menos actividad por sí misma u otros factores.

Respecto al resto de las enzimas, observamos que la BuChE humana mostró una mayor actividad PVasa que la observada por Romo, pero comparable a nuestros resultados. La actividad PVasa de la AChE de anguila eléctrica y la BuChE de caballo no mostraron diferencias significativas respecto a los resultados de ese trabajo.

Por tanto, según los resultados experimentales y de acuerdo a la bibliografía (Romo, 2017), se concluyó que el nivel de actividad PVasa de las colinesterasas es dependiente de la especie de procedencia y del tipo de enzima.

6.3 Mecanismos de reacción

6.3.1 Actividad PVasa

Cinética de reacción

Se aplicaron varios modelos matemáticos, correspondientes a diferentes reacciones enzimáticas para analizar los resultados (apartado 4.9). El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de ALCC fue el correspondiente a un mecanismo de activación por sustrato ordenado (**Figura 5.4**), con una K_S en un rango entre 0,36 y 0,38 mM, una k_{cat} entre 1620 y 2531 min^{-1} y α entre 1,57 y 2,35 (**Tabla 5.1**).

Mangas et al. (2017) y Romo (2017) reportaron valores de k_{cat} para la actividad PVasa de ButChE humana superiores a los de la AChE humana recombinante obtenidos en este trabajo. Además, se mostró que la actividad PVasa de ButChE seguía el mecanismo de Michaelis-Menten.

Estudio de competición entre sustratos

Los experimentos realizados para estudiar la interacción entre los sustratos PV y AtCh en la AChE humana recombinante (**Figura 5.7**) demostraron que a altas concentraciones de AtCh (3 y 8 mM) se inhibía la actividad PVasa mientras que a una baja concentración de AtCh (0,5 mM) se producía una activación de la actividad PVasa.

El experimento realizado a una concentración 3 mM de PV y a distintas concentraciones de AtCh (0,125, 0,250, 0,5, 0,75 ó 1 mM) mostró que la máxima activación se alcanza entre 0,5 y 0,75 mM de AtCh (**Figura 5.8**).

De acuerdo con las k_{cat} de la reacción de hidrólisis de AtCh, la AtCh a concentraciones entre 0,5 y 0,75 mM con una concentración de AChE humana recombinante de 5 nM debe hidrolizarse muy rápidamente, por lo que posiblemente los productos de hidrólisis de la AtCh (acetato y tiocolina) podrían ser los causantes de la activación de la actividad PVasa. El experimento realizado de actividad PVasa en presencia de AtCh, tiocolina y acetato (los dos últimos siendo productos de hidrólisis de la AtCh) mostraron que a pesar de que había un 50% más de actividad PVasa, es con la AtCh cuando se alcanza la máxima activación (entre 200-300% de actividad) (**Figura 5.9**). La interacción de la AtCh parece ser la pieza fundamental para la activación de la actividad PVasa.

6.3.2 Actividad colinesterasa

Cinética de reacción

Se aplicaron varios modelos matemáticos, correspondientes a diferentes reacciones enzimáticas, para analizar el comportamiento de la actividad hidrolizante de la AtCh por la AChE. El modelo que mejor se ajustó de acuerdo al criterio de ALCC fue el correspondiente a un mecanismo bifásico por inhibición de sustrato (Reacción de Webb modificada), con una K_M (constante de equilibrio) comprendida entre 0,10 y 0,14 mM, una K_{SS} entre 5,36 y 12,31 mM, una V_{max1} entre 11,08 y 30,13 $\mu\text{M}/\text{min}$, una V_{max2} entre 3,53 y 6,71 $\mu\text{M}/\text{min}$, una k_{cat1} entre 236.000 y 602.600 min^{-1} y una k_{cat2} entre 70.600 y 134.200 min^{-1} . El modelo de este trabajo coincide con el descrito en la bibliografía y los datos obtenidos son comparables (AChE humana, $K_M = 0,14$ mM, $K_{SS} = 6$ mM, $k_{cat1} = 400.000$ min^{-1} y $k_{cat2} = 80.000$ min^{-1} , Kaplan et al., 2001; AChE ratón, $K_M = 0,46$ mM, $K_{SS} = 15$ mM, $k_{cat1} = 140.000$ min^{-1} , $k_{cat2} = 32.200$ min^{-1} , Radić et al., 1993).

Estudio de competición entre sustratos

Los datos de los experimentos de interacción del fenilvalerato con la actividad colinesterasa no se ajustaron bien a un comportamiento Michaeliano (**Figura 5.16**). No fue posible deducir un mecanismo molecular de competición entre sustratos para la actividad colinesterasa porque el mecanismo de interacción de la AtCh con la PVasa no es michaeliano y los resultados de este trabajo muestran un mecanismo complejo desconocido. Se consideró la interacción del PV como la interacción de un inhibidor reversible en una reacción bifásica de inhibición por AtCh. Se analizaron los datos según modelos matemáticos que incluyeran al menos una inhibición competitiva a bajas concentraciones de sustratos, a altas concentraciones de sustrato o en ambas (**anexo**), pues se observó que a altas concentraciones de AtCh, la actividad colinesterasa tendía a alcanzar la velocidad máxima, una característica propia de inhibidores competitivos y se observó que el mejor modelo, según el criterio ALCC, correspondía a una inhibición competitiva a bajas y altas concentraciones de sustrato.

Se observó que la V_{max1} , V_{max2} y las constantes de equilibrio K_M y K_{SS} del experimento de competición eran similares a las obtenidas para el estudio de actividad colinesterasa sin interacción con el PV (**Tabla 5.6**, **Tabla 5.4** respectivamente).

La K_{i1} para actividad colinesterasa de la enzima a bajas concentraciones de AtCh es mayor que K_{i2} , actividad de la enzima a altas concentraciones de AtCh. Esto nos indica que existe más afinidad por el PV a altas concentraciones de AtCh.

6.4 Actividad PVasa y colinesterasa en presencia de PV y AtCh en función del tiempo

El experimento de actividad PVasa en presencia de AtCh frente al tiempo (**Figura 5.12**) mostró que a partir de un tiempo teórico de inflexión (33 – 44 segundos) la actividad PVasa se activaba dramáticamente en presencia de AtCh. En las mismas condiciones, la actividad colinesterasa en presencia de PV mostró que alrededor de 30 segundos de reacción toda la AtCh se había hidrolizado (**Figura 5.18**). Los resultados de estos dos experimentos nos indican que la activación de la actividad PVasa se produce una vez hidrolizado toda la AtCh, es decir que la actividad podría ser activada por los productos de la reacción, acetato y tiocolina. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos la interacción de AtCh con la actividad PVasa presenta la máxima activación (**Figura 5.9**). Esta contradicción aparente podría explicarse si los productos de reacción, acetato y tiocolina, no abandonan el sitio activo una vez que la AtCh se ha hidrolizado, interaccionando dentro del sitio activo y activando la actividad PVasa. En este caso la AtCh estaría actuando como un caballo de Troya, la AtCh pasa fácilmente dentro del sitio activo, libera acetato y tiocolina, que interaccionan dentro del sitio activo (**Figura 6.1**).

El fenómeno de la activación de la actividad PVasa por bajas concentraciones de AtCh es posible que se pueda dar también con otros sustratos en el espacio intersináptico donde la acetilcolinesterasa está concentrada y es posible que la propia actividad acetilcolinesterasa esté activada por colina o acetato.

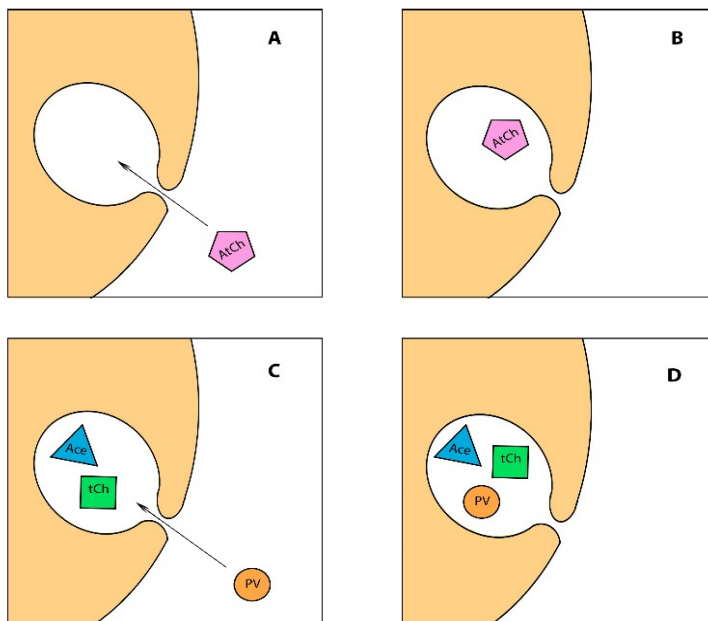


Figura 6.1 Actividad PVasa en presencia de AtCh. Imagen A. Entrada de la acetiltiocolina (AtCh) en el centro activo de la enzima. **Imagen B.** La AtCh se encuentra en el centro activo de la enzima. **Imagen C.** La AtCh se ha hidrolizado en acetato (Ace) y tiocolina (tCh). Entrada del fenilvalerato (PV) en el centro activo. **Imagen D.** El PV se encuentra en el centro activo de la enzima, junto con acetato y tiocolina.

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

7.1 Conclusiones

1. Se han establecido las siguientes variables experimentales óptimas para los experimentos de competición entre sustratos en actividad PVasa y colinesterasa de la AChE humana recombinante; concentración de enzima 5 nM (actividad PVasa), concentración de enzima 0,05 nM (actividad colinesterasa), tiempo de reacción de 5 minutos y 37°C.
2. La actividad PVasa varía entre especies y entre colinesterasas, presentando mayor actividad según el siguiente orden: BuChE humana, AChE humana recombinante, BuChE de caballo y AChE de anguila eléctrica.
3. La actividad hidrolizante del fenilvalerato por la AChE humana recombinante parece seguir un mecanismo de activación por sustrato ordenado, con una K_S comprendida entre 0,36 y 0,38 mM, una k_{cat} entre 1620 y 2531 min^{-1} y α entre 1,57 y 2,35.
4. Los ensayos de interacción con ambos sustratos muestran que a bajas concentraciones de AtCh se activa la actividad PVasa, mientras que a altas concentraciones de AtCh se inhibe la actividad PVasa.
5. Los datos sugieren que los productos de reacción de hidrólisis de la AtCh (acetato y tiocolina) podrían ser los responsables de la activación de la actividad PVasa, pero debe ser mediada por AtCh.
6. El PV competiría con la AtCh en la actividad colinesterasa con un mecanismo más complejo que Michaelis-Menten y estarían involucrados los productos de reacción de la AtCh.
7. Los ensayos de interacción con ambos sustratos para la actividad colinesterasa muestran que el PV actúa siguiendo un mecanismo competitivo tanto a altas como a bajas concentraciones de sustrato con una K_M de 0,11 mM, una K_{SS} entre 7,52 y 7,91 mM, una K_{I1} entre 5,74 y 6,51 mM y una K_{I2} entre 1,12 y 1,25 mM.

7.2 Proyecciones futuras

- Estudio estructural de la AChE humana recombinante con los sustratos PV, AtCh y sus productos de reacción unidos a los centros activos mediante modelos *in silico* y/o mediante cristalografía de rayos X.
- Proponer el mecanismo de la AChE humana recombinante para la actividad PVasa con la interacción de la AtCh y deducir las ecuaciones cinéticas correspondientes.
- Proponer el mecanismo de la AChE humana recombinante para la actividad colinesterasa con la interacción del PV y deducir las ecuaciones cinéticas correspondientes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Aldridge, WN., (1953). Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J.* 53(1):110-7.
- 📖 Aldridge WN. y Reiner E. (1972) Acylated amino acids in inhibited esterases. In: Neuberger A., Tatum E.L., (Eds), *Enzyme inhibitors as substrates*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp 170-175.
- 📖 Alles, GA. y Hawes, R.C. (1940). *J. Biol. Chem.*, 133 pp 375-390
- 📖 Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control.* 19, 716–723.
- 📖 Ballantyne, B., Marrs, T.C., (1992). *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- 📖 Barril, J., Estevez, J., Escudero, M.A., Cespedes, M.V., Niguez, N., Sogorb, M.A., Monroy, A., Vilanova E., (1999). Peripheral nerve soluble esterases are spontaneously reactivated after inhibition by paraoxon: implications for a new definition of neuropathy esterase. *Chemico-biological interactions*, 119-120:541-50.
- 📖 Benabent M, Vilanova E, Mangas I, Sogorb MA, Estevez J. (2014). Interaction between substrates suggests a relationship between organophosphorus-sensitive phenylvalerate-g and acetylcholinesterase activities in chicken brain. *Toxicol Lett.* Oct 15;230(2):132-8
- 📖 Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M.G., Cuendet, M., Pezuto, J.M., Santarsiero, B.D., Mesecar, A.D., 2010. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem. J.* 429, 273–282.
- 📖 Carrington CD, Abou-Donia MB (1984) The correlation between the recovery rate of neurotoxic esterase activity and sensitivity to organophosphorus-induced delayed neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 75(2):350–357
- 📖 Casida, J.E., Durkin, K.A. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol. Interact.* 2013 Mar 25;203(1):221-5.
- 📖 Cauet, G., Friboulet, A. And Daniel Thomas (1987). *Biochem. Cell Biol.* Vol. 65. 1987
- 📖 Cespedes, M.V.; Escudero, M.A.; Barril, J.; Sogorb, M.A.; Vicedo, J.L.; Vilanova, E. Discrimination of carboxylesterases of chicken neural tissue by inhibition with a neuropathic, non-neuropathic organophosphorus compounds and neuropathy promoter. *Chemico- Biological Interactions*. Volume 106, Issue 3, 24 October 1997, Pages 191–200.
- 📖 Chemnitz JM, Haselmeyer K.H., Zech R (1983) Neurotoxic esterase. Identification of two isoenzymes in hen brain. *Arch Toxicol* 53(3):235–244
- 📖 COT Report, 1999. *Organophosphates. A report of the committee on Toxicology of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment*. UK Department of Health, London.
- 📖 Escudero M.A., Vilanova E., (1997). Purification and characterisation of naturally soluble neuropathy target esterase from chicken sciatic nerve by HPLC and Western blot. *J. Neurochem.* 69:1975-82.

- 📖 Estevez J, GarcíagPerez AG, Barril J, Pellin M, Vilanova E. (2004). The inhibition of the high sensitive peripheral nerve soluble esterases by mipafox. A new mathematical processing for the kinetics of inhibition of esterases by organophosphorus compounds. *Toxicol Lett.* Jun 15;151(1):171g81.
- 📖 Estevez J., y Vilanova E., (2009). Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: Esterases and organophosphorus compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 39 (5):427g448.
- 📖 Estevez J., Barril, J., Vilanova E. (2010). Inhibition with spontaneous reactivation and the “ongoing inhibition” effect of esterases by biotinylated organophosphorus compounds: S9B as a model. *Chem.g Biol. Interact.* 187 (1–3), 397–402.
- 📖 Estevez J., GarcíagPerez A., Barril J., Vilanova, E. (2011). Inhibition with spontaneous reactivation of carboxyl esterases by organophosphorus compounds: paraoxon as a model. *Chem. Res. Toxicol.* 2011 (24), 135–143.
- 📖 Estevez J., Barril J., Vilanova E. (2012). Kinetics of inhibition of soluble peripheral nerve esterases by PMSF: a nongstable compound that potentiates the organophosphorusinduced delayed neurotoxicity. *Arch. Toxicol.* 86, 767–777.
- 📖 Fišar,Z., Hroudova, J., Raboch, J., 2010. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 31(5), 645–656.
- 📖 GarcíagPerez, A.G.; Barril, J.; Estevez, J.; Vilanova, E.(2003). Properties of phenyl valerate esterase activities from chicken serum are comparable with soluble esterases of peripheral nerves in relation with organophosphorus compounds inhibition. *Toxicol Lett.* Apr 30;142(1g2):1g10.
- 📖 Glynn P, Read DJ, Guo R, Wylie S, Johnson MK (1994) Synthesis and characterization of a biotinylated organophosphorus ester for detection and affinity purification of a brain serine esterase: neuropathy target esterase. *Biochem J* 301(Pt 2):551–556.
- 📖 Glynn P, Holton JL, Nolan CC, Read DJ, Brown L, Hubbard A, Cavanagh JB (1998) Neuropathy target esterase: immunolocalization to neuronal cell bodies and axons. *Neurosci* 83(1):295–302
- 📖 Jamal, A., N. Ayub, M. Usman and A.G. Khan. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance Zn and Ni uptake from contaminated soil by soybean and lentil. *Int. J. Phytorem.*, 4: 205-221
- 📖 Johnson M.K. (1969b). A phosphorylation site in brain and delayed neurotoxic effects of some organophosphorus compounds. *Biochem.J.* 111, 487g495.
- 📖 Johnson, M.K. The delayed neuropathy caused by some organophosphorous esters: mechanism and challenge. 1975 CRC. *Crit. Rev. Toxicol* 3:289-316.
- 📖 Johnson M.K., Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. 1977 *Arch Toxicol*; 37(2):113-5.
- 📖 Johnson MK. (1982). The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. *Rev Biochem Toxicol*; 4: 141g212.
- 📖 Kaplan D., Ordentlich A., Barak D., Ariel N., Kronman C., Velan B. y Shafferman A. (2001). Does “Butyrylization” of Acetylcholinesterase through Substitution of the Six Divergent Aromatic Amino Acids in the Active Center Gorge Generate an Enzyme Mimic of Butyrylcholinesterase?. *Biochemistry* 2001, 40, 7433-7445.

- Li, X.Q., Andersson, T.B., Ahlstrom, M., Weidolf, L.,. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs Omeprazole, Esomeprazole, Lansoprazole, Pantoprazole and Rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug. Metab. Dispos* 2004. 32, 821-827.
- Lockridge, O., & Schopfer, L. M. (2006). Biomarkers of organophosphate exposure. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds* (pp. 703-711).
- Mangas I., Vilanova E., Estevez J. (2011). Kinetics of the inhibitory interaction of organophosphorus neuropathy inducers and nonginducers in soluble esterases in the avian nervous system. *Toxicol. App. Pharmacol.* 256, 360g368.
- Mangas I., Vilanova E., Estevez J. (2012a). NTE and non NTE esterases in brain membrane: Kinetic characterization with organophosphates. *Toxicology* 297 (2012) 17– 25.
- Mangas I., Vilanova E., Estevez J., (2012b). Phenylmethylsulfonyl Fluoride a Potentiator of Neuropathy, alter the interaction of organophosphorus compounds with soluble brain esterases. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2393g2401.
- Mangas I., Vilanova E., Estevez, J. (2013a). Kinetic interactions of a neuropathy potentiator (phenylmethylsulfonyl fluoride) with the neuropathy target esterase and other membrane bound esterases. *Arch Toxicol* DOI 10.1007/s00204g013g1135g0.
- Mangas I., Vilanova E., Estevez, J. (2017). Phenyl valerate esterase activity of human butyrylcholinesterase. *Arch Toxicol* DOI 10.1007/s00204-017-1946-5.
- Lockridge O. (1987). Aminoacid sequence of human cholinesterase. *Gov Rep Announce, Index* 87,21.
- Kovarik Z., Radić Z., Berman HA., SimeongRudolf V., Reiner E. y Taylor P. (2003). Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *The Biochemical journal*, 373(Pt 1):33g40.
- Lockridge, O.; Duysen, E.G.; Voelker, T.; Thomson, c.m.; Schopfer, L.M. Life without acetylcholinesterase: the implications of cholinesterase inhibitor toxicity in AChE- knowout mice. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 2005 May; 19(3):463-9.
- Mangas I, Radić Z, Taylor P, Ghassemian M, Candela H, Vilanova E, Estevez J. (2016). Butyrylcholinesterase identification in a phenylvalerate esteraseenriched fraction sensitive to low mipafox concentrations in chicken brain. *Arch Toxicol.* 2016 Feb 2. [Epub ahead of print].
- Masson, Adkins, Gouet, and Osaka (1993). Recombinant Human Butyrylcholinesterase G390V, the Fluoride-2 variant, expressed in Chinese hamster ovary cells, is a low affinity variant. *The journal of biological chemistry.*
- Massoulie J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E. y Vallette F.gM. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41, 31g91.
- Massoulie J., Bon S., Perrier N. y Falasca C (2005) The Cgterminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficKing, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact* 157g158:3.14.
- McDaniel, Virginia C Moser, Differential profiles of cholinesterase inhibition and neurobehavioral effects in rats exposed to fenamiphos or profenofos, *Neurotoxicology and Teratology*, Volume 26, Issue 3, May June 2004, Pages 407-415

- 📖 Radic, Z. y Taylor, P. (2006). Structure and Function of Cholinesterases. Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds. Cap. 12 pp 161g186. Ed.R.C. Gupta. Elsevier, Inc.
- 📖 Radic Z., Pickering N.A., Vellom D.C., Camp S. y Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinergic esterase molecule confer selectivity for acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32, 12074– 12084.
- 📖 Repetto, M. (1995) Toxicología Avanzada. Ed. Diaz de Santos.
- 📖 Romo M. (2017) Trabajo de fin de grado: Actividad fenilvalerato esterasa en la butirilcolinesterasa humana. Universidad Miguel Hernández de Elche. 40pp.
- 📖 Schumacher M., Camp S., Maulet Y., Newton M., MacPheeQuigley K., Taylor S., Friedmann T. y Taylor P. (1986). Primary structure of Torpedo californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* 319, 407g409.
- 📖 Sogorb M.A., Vilanova E., Carrera V. (2004). Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicol Lett.* 151 (1), 219g233.
- 📖 Taylor P. y Radic Z. (1994). The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34:281– 320.
- 📖 Terry, A.V., 2012a. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential noncholinergic mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 134, 355– 365.
- 📖 Vellom DC, Radic Z, Ying L, Pickering NA, Camp S y Taylor P. (1993). Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 32:12g17.
- 📖 Vilanova E., Barril J., Carrera V., Pellin MC. (1990). Soluble and particulate forms of the organophosphorus neuropathy target esterase in hen sciatic nerve. *J Neurochem.* Oct;55(4):1258g65.
- 📖 Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. (2004). Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2237g2248.
- 📖 Worek F., Aurbek N., Koller M., Becker, C., Eyer C., Thiermann H. (2007). Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. *Biochem. Pharmacol.*
- 📖 World Health Organisation (WHO). (1986a) Properties and analytical methods pp23g29. En: Organophosphorus Insecticides: A general Introduction. Geneva.

ANEXO

1) Inhibición competitiva de la actividad AChE a bajas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A1.

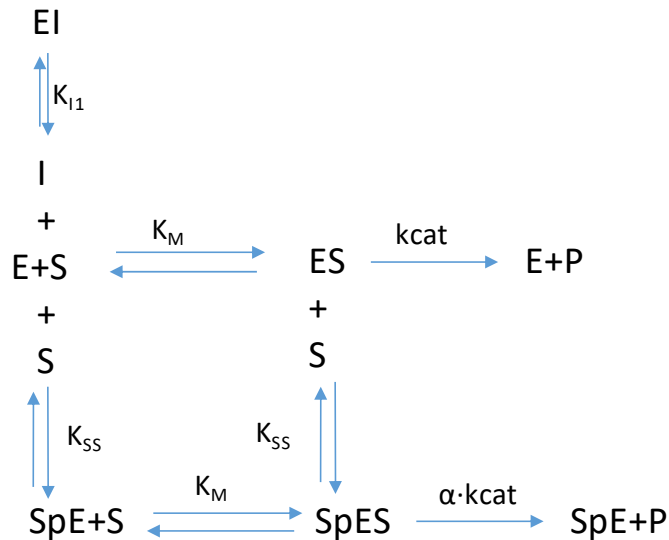


Figura A1. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{I1} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones bajas de sustrato, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a altas concentraciones de sustrato, EI el complejo enzima-inhibidor a bajas concentraciones de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato y SpES el complejo michaeliano con la enzima activada.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad E = \frac{K_M \cdot ES}{S} \quad \text{a)}$$

$$K_{I1} = \frac{E \cdot I}{EI} \quad EI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{b)}$$

$$K_{SS} = \frac{E \cdot S}{SpE} \quad SpE = \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} \quad \text{c)}$$

$$K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} \quad SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad \text{d)}$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A1 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad \text{e)}$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + EI \quad \text{h)}$$

Siendo E_0 la concentración de enzima inicial

Despejando ES en h) obtenemos

$$ES = E_0 - ES_p - E - S_p ES - EI \quad i)$$

Sustituyendo a), b), c) y d) en i) obtenemos

$$ES = E_0 - ES \cdot \left(1 + \frac{K_M}{S} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_{I1}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M}\right)\right) \quad j)$$

Y despejando ES de la anterior ecuación obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{1 + \frac{K_M}{S} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_{I1}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M}\right)} \quad k)$$

Sustituyendo p) y d) en e) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot \frac{E_0}{1 + \frac{K_M}{S} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_{I1}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M}\right)} + \alpha \cdot k_{cat} \cdot \frac{E_0}{1 + \frac{K_M}{S} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_{I1}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M}\right)} \cdot \frac{S}{K_{SS}}$$

Reagrupando la anterior ecuación obtenemos

$$\frac{dP}{dt} = \frac{E_0 \cdot (k_{cat} + \alpha \cdot k_{cat} \cdot \frac{S}{K_{m2}})}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{K_M \cdot I}{S \cdot K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}}} = \frac{V_{max1} + V_{max2} \cdot \frac{S}{K_{m2}}}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{K_M \cdot I}{S \cdot K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}}}$$

2) Inhibición competitiva de la actividad AChE a altas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A2.

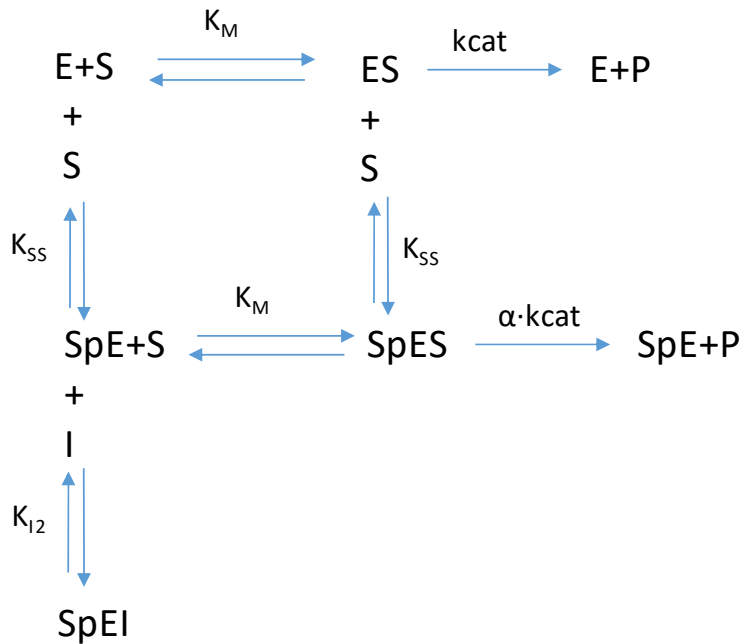


Figura A2. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{I2} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones altas de sustrato, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, SpEI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones altas de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato y SpES el complejo michaeliano con la enzima activada.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$\begin{array}{l}
 K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad E = \frac{K_M \cdot ES}{S} \quad \text{l)} \\
 K_{I2} = \frac{SpE \cdot I}{SpEI} \quad SpEI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{m)} \\
 K_{SS} = \frac{E \cdot S}{SpE} \quad SpE = \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} \quad \text{n)} \\
 K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} \quad SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad \text{o)}
 \end{array}$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A2 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad \text{p)}$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + SpEI \quad \text{q)}$$

Siendo E_0 la concentración de enzima inicial

Despejando ES en q) obtenemos

$$ES = E_0 - ES_p - E - SpES - SpEI \quad r)$$

Sustituyendo l), m), n) y o) en r) obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{K_M \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}}} \quad r)$$

Sustituyendo k) y o) en p) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot E_0 + \alpha \cdot k_{cat} \cdot E_0 \cdot \frac{S}{K_{SS}}}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{K_M \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}}} = \frac{V_{max1} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{SS}}}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{K_M \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}}}$$

3) Inhibición competitiva de la actividad AChE a bajas y a altas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A3.

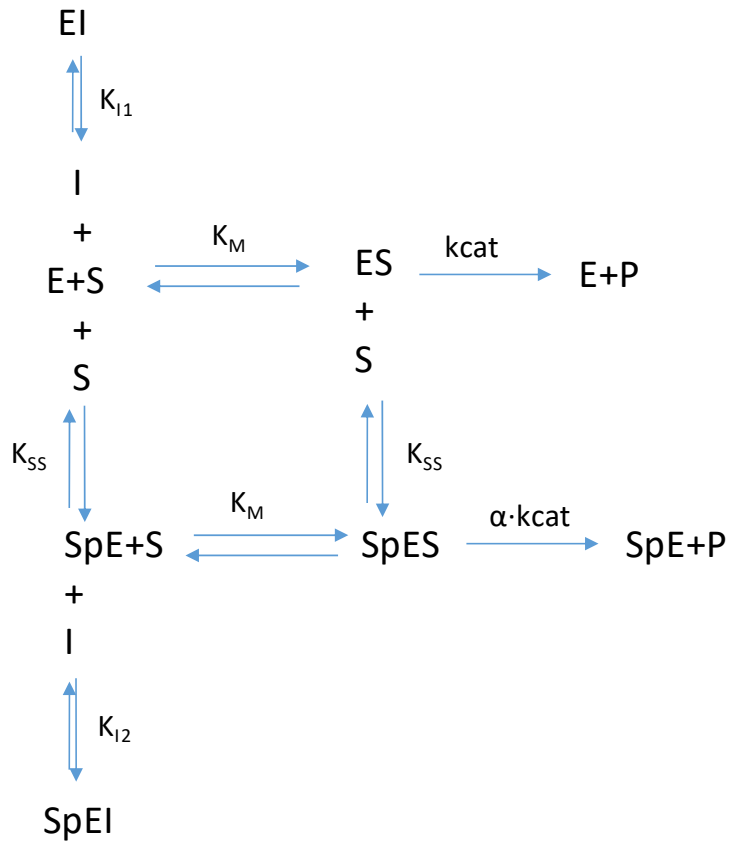


Figura A3. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{I1} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones bajas de sustrato, K_{I2} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones altas de sustrato, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, EI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones bajas de sustrato, SpEI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones altas de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato y SpES el complejo michaeliano con la enzima activada.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$\begin{array}{l}
 K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad E = \frac{K_M \cdot ES}{S} \quad \text{s)} \\
 K_{I2} = \frac{SpE \cdot I}{SpEI} \quad SpEI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{t)} \\
 K_{I1} = \frac{E \cdot I}{EI} \quad EI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{u)} \\
 K_{SS} = \frac{E \cdot S}{SpE} \quad SpE = \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} \quad \text{v)}
 \end{array}$$

$$K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} \quad SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad x)$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A3 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad y)$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + SpEI + EI \quad z)$$

Siendo E_0 la concentración de enzima inicial

Despejando ES en z) obtenemos

$$ES = E_0 - E - SpE - SpES - SpEI - EI \quad aa)$$

Sustituyendo s), t), u), v) y x) en aa) obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{\frac{K_M + \frac{K_M}{S} + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} + 1 + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}}} \quad ab)$$

Sustituyendo ab) y x) en y) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot E_0 + \alpha \cdot k_{cat} \cdot E_0 \cdot \frac{S}{K_{M2}}}{\frac{K_M}{S} + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} + 1 + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}}} = \frac{V_{max1} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{SS}}}{\frac{K_M}{S} + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} + 1 + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}}}$$

4) Inhibición competitiva de la actividad AChE a bajas concentraciones y no competitiva a altas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A4.

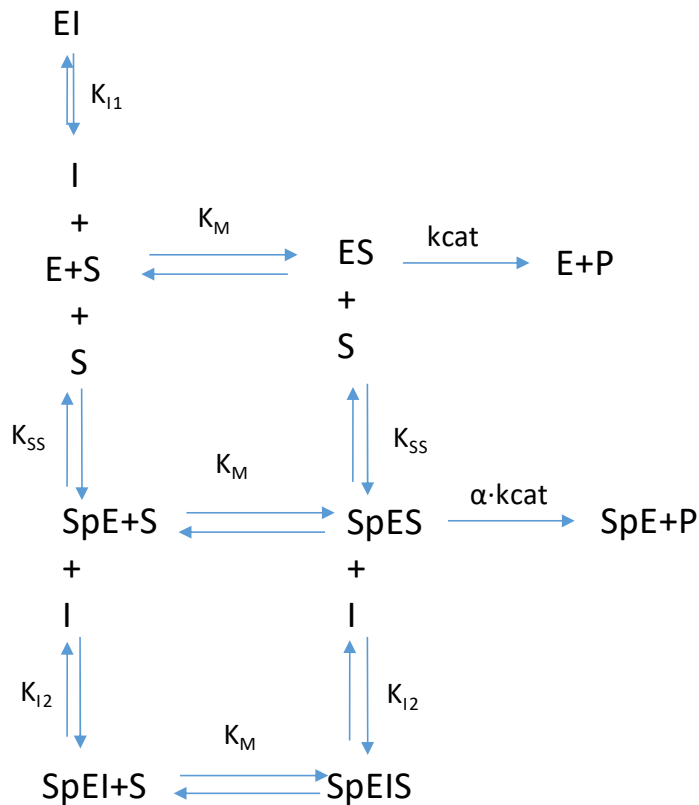


Figura A4. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{I1} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones bajas de sustrato, K_{I2} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones altas de sustrato, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, EI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones bajas de sustrato, SpEI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones altas de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato, SpES el complejo michaeliano con la enzima activada y SpEIS es el complejo michaeliano con la enzima activada inhibido.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$\begin{array}{l}
 K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad E = \frac{K_M \cdot ES}{S} \quad \text{ac)} \\
 K_{I2} = \frac{SpE \cdot I}{SpEI} \quad SpEI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{ad)} \\
 K_{I1} = \frac{E \cdot I}{EI} \quad EI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{ae)} \\
 K_{SS} = \frac{E \cdot S}{SpE} \quad SpE = \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} \quad \text{af)}
 \end{array}$$

$$K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} \quad SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad \text{ag)}$$

$$K_M = \frac{SpEI \cdot S}{SpEIS} \quad SpEIS = \frac{SpEI \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} \quad \text{ah)}$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A4 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad \text{ai)}$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + SpEI + EI + SpEIS \quad \text{aj)}$$

Siendo E_0 la concentración de enzima inicial

Despejando ES en aj) obtenemos

$$ES = E_0 - E - SpE - SpES - SpEI - EI - SpEIS \quad \text{ak)}$$

Sustituyendo ac), ad), ae), af), ag) y ah) en ak) obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{\frac{K_M + K_M \cdot I}{S} + \frac{K_M \cdot I}{S \cdot K_{I1}} + \frac{K_M \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} + 1 + \frac{K_M \cdot S}{K_{SS}} + \frac{S \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}}} \quad \text{al)}$$

Sustituyendo al) y ag) en ai) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max1} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{SS}}}{\frac{K_M}{S} + \frac{K_M \cdot I}{S \cdot K_{I1}} + \frac{K_M \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} + 1 + \frac{K_M \cdot S}{K_{SS}} + \frac{S \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}}}$$

5) Inhibición competitiva de la actividad AChE a bajas concentraciones y no competitiva a altas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A5.

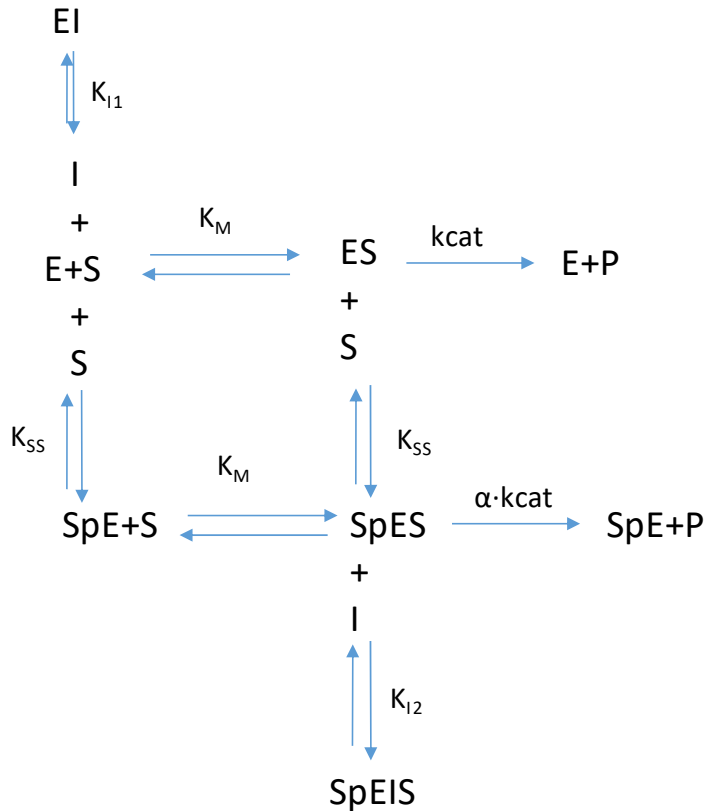


Figura A5. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{I1} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones bajas de sustrato, K_{I2} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones altas de sustrato, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, EI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones bajas de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato, SpES el complejo michaeliano con la enzima activada y SpEIS es el complejo michaeliano con la enzima activada inhibida.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$\begin{array}{ll}
 K_M = \frac{E \cdot S}{ES} & E = \frac{K_M \cdot ES}{S} \quad \text{am)} \\
 K_{I1} = \frac{E \cdot I}{EI} & EI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{an)} \\
 K_{SS} = \frac{E \cdot S}{SpE} & SpE = \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} \quad \text{añ)} \\
 K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} & SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad \text{ao)}
 \end{array}$$

$$K_{I2} = \frac{SpE \cdot I}{SpEIS} \quad SpEIS = \frac{SpE \cdot I}{K_{I2}} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} = \frac{ES \cdot S \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} \quad \text{ap)}$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A5 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad \text{aq)}$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + EI + SpEIS \quad \text{ar)}$$

Siendo E₀ la concentración de enzima inicial

Despejando ES en ar) obtenemos

$$ES = E_0 - E - SpE - SpES - EI - SpEIS \quad \text{as)}$$

Sustituyendo am), an), añ), ao), y ap) en as) obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{\frac{K_M + K_M \cdot I}{S} + 1 + \frac{K_M + S}{K_{SS}} + \frac{S \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}}} \quad \text{at)}$$

Sustituyendo at) y ao) en aq) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max1} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{SS}}}{\frac{K_M}{S} + \frac{K_M \cdot I}{S \cdot K_{I1}} + 1 + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{S \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}}}$$

6) Inhibición competitiva de la actividad AChE a bajas concentraciones y mixta a altas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A6.

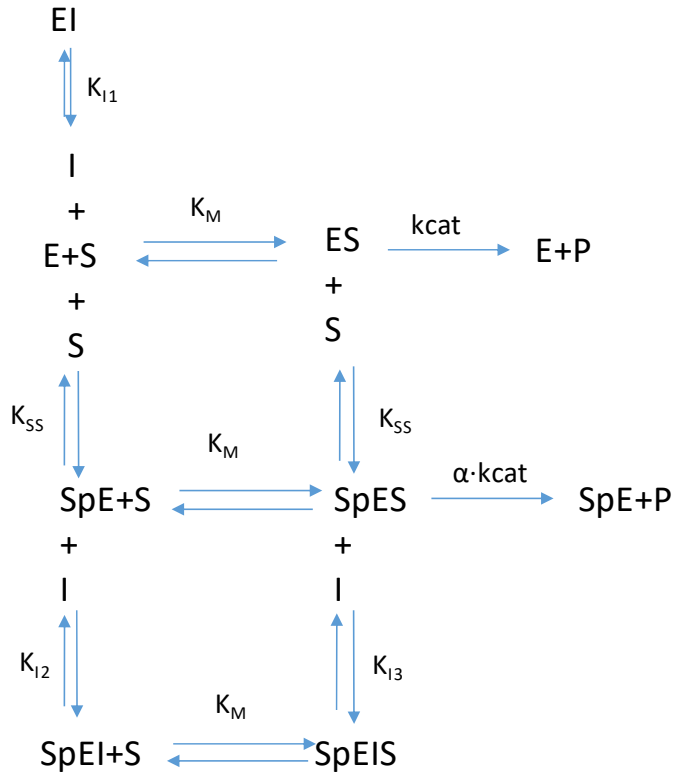


Figura A6. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{I1} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones bajas de sustrato, K_{I2} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones altas de sustrato, K_{I3} es la constante de equilibrio entre SpES y SpEIS, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, EI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones bajas de sustrato, SpEI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones altas de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato, SpES el complejo michaeliano con la enzima activada y SpEIS es el complejo michaeliano con la enzima activada inhibido.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad E = \frac{K_M \cdot ES}{S} \quad \text{au)}$$

$$K_{I2} = \frac{SpE \cdot I}{SpEI} \quad SpEI = \frac{E \cdot I}{K_{I2}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} \quad \text{av)}$$

$$K_{I1} = \frac{E \cdot I}{EI} \quad EI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{aw)}$$

$$K_{SS} = \frac{E \cdot S}{SpE} \quad SpE = \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} \quad \text{ax)}$$

$$K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} \quad SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad \text{ay)}$$

$$K_{I3} = \frac{SpES \cdot I}{SpEIS} \quad SpEIS = \frac{SpES \cdot I}{K_{I3}} = \frac{ES \cdot S \cdot I}{K_{I3} \cdot K_{SS}} \quad \text{az)}$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A6 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad \text{ba)}$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + SpEI + EI + SpEIS \quad \text{bb)}$$

Siendo E_0 la concentración de enzima inicial

Despejando ES en bb) obtenemos

$$ES = E_0 - E - SpE - SpES - SpEI - EI - SpEIS \quad \text{bc)}$$

Sustituyendo au), av), aw), ax), ay) y az) en bc) obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{\frac{K_M + K_M \cdot I}{S} + \frac{K_M \cdot I}{S \cdot K_{I1}} + \frac{K_M \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} + 1 + \frac{K_M \cdot S}{K_{SS}} + \frac{S \cdot I}{K_{I3} \cdot K_{SS}}} \quad \text{bd)}$$

Sustituyendo bd) y ay) en ba) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max1} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{SS}}}{\frac{K_M}{S} + \frac{K_M \cdot I}{S \cdot K_{I1}} + \frac{K_M \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I2}} + 1 + \frac{K_M \cdot S}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{S \cdot I}{K_{SS} \cdot K_{I3}}}$$

7) Inhibición no competitiva de la actividad AChE a bajas concentraciones y competitiva a altas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A7.

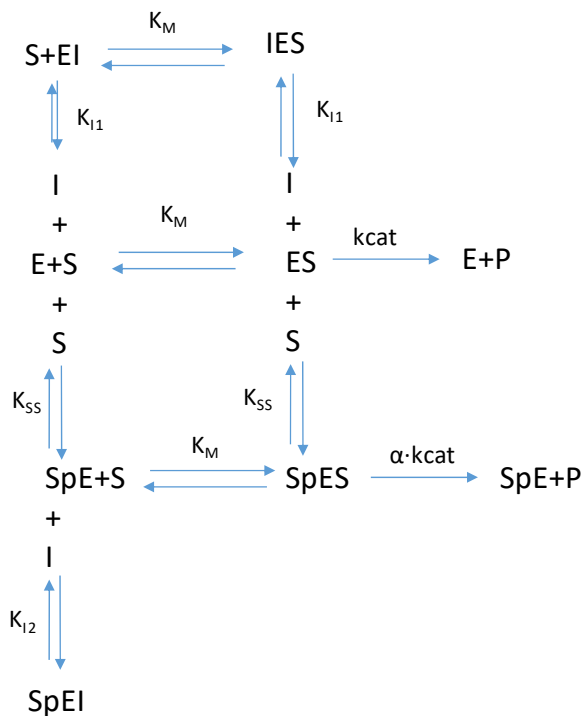


Figura A7. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{11} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones bajas de sustrato, K_{12} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones altas de sustrato, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, EI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones bajas de sustrato, IES es el complejo michaeliano con la enzima inhibido a concentraciones bajas de sustrato, SpEI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones altas de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato y SpES el complejo michaeliano con la enzima activada.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$\begin{aligned}
 K_M &= \frac{E \cdot S}{ES} & E &= \frac{K_M \cdot ES}{S} & \text{be)} \\
 K_{12} &= \frac{SpE \cdot I}{SpEI} & SpEI &= \frac{E \cdot I}{K_{12}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{12}} & \text{bf)} \\
 K_{11} &= \frac{E \cdot I}{EI} & EI &= \frac{E \cdot I}{K_{11}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{I}{K_{11}} & \text{bg)} \\
 K_{SS} &= \frac{E \cdot S}{SpE} & SpE &= \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} & \text{bh)}
 \end{aligned}$$

$$K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} \quad SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad \text{bi)}$$

$$K_{I1} = \frac{ES \cdot I}{EIS} \quad EIS = \frac{ES \cdot I}{K_{I1}} \quad \text{bj)}$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A7 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad \text{bk)}$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + SpEI + EI + EIS \quad \text{bl)}$$

Siendo E_0 la concentración de enzima inicial

Despejando ES en bl) obtenemos

$$ES = E_0 - E - SpE - SpES - SpEI - EI - EIS \quad \text{bm)}$$

Sustituyendo be), bf), bg), bh), bi) y bj) en bm) obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{\frac{K_M + K_M}{S} + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} + 1 + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{I}{K_{I1}}} \quad \text{bn)}$$

Sustituyendo bn) y bi) en bk) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max1} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{SS}}}{\frac{K_M}{S} + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} + 1 + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{I}{K_{I1}}}$$

8) Inhibición mixta de la actividad AChE a bajas concentraciones y competitiva a altas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A8.

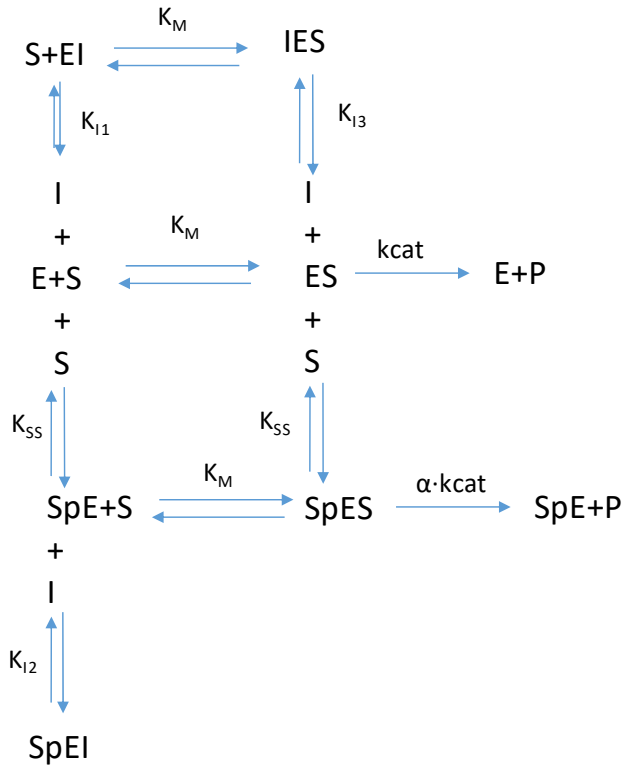


Figura A8. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{I1} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones bajas de sustrato, K_{I2} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones altas de sustrato, K_{I3} es la constante de equilibrio entre ES y EIS, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, EI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones bajas de sustrato, IES es el complejo michaeliano con la enzima inhibido a concentraciones bajas de sustrato, SpEI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones altas de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato y SpES el complejo michaeliano con la enzima activada.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$\begin{array}{l}
 K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad E = \frac{K_M \cdot ES}{S} \quad \text{bo)} \\
 K_{I2} = \frac{SpE \cdot I}{SpEI} \quad SpEI = \frac{E \cdot I}{K_{I2}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} \quad \text{bp)} \\
 K_{I1} = \frac{E \cdot I}{EI} \quad EI = \frac{E \cdot I}{K_{I1}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} \quad \text{bq)} \\
 K_{SS} = \frac{E \cdot S}{SpE} \quad SpE = \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} \quad \text{br)}
 \end{array}$$

$$K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} \quad SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad \text{bs)}$$

$$K_{I3} = \frac{ES \cdot I}{EIS} \quad EIS = \frac{ES \cdot I}{K_{I3}} \quad \text{bt)}$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A8 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad \text{bu)}$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + SpEI + EI + EIS \quad \text{bv)}$$

Siendo E_0 la concentración de enzima inicial

Despejando ES en bv) obtenemos

$$ES = E_0 - E - SpE - SpES - SpEI - EI - EIS \quad \text{bw)}$$

Sustituyendo bo), bp), bq), br), bs) y bt) en bw) obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{\frac{K_M + K_M}{S} + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} + 1 + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{I}{K_{I3}}} \quad \text{bx)}$$

Sustituyendo bx) y bs) en bu) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max1} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{SS}}}{\frac{K_M}{S} + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{I}{K_{I1}} + \frac{K_M}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} + 1 + \frac{K_M}{K_{SS}} + \frac{S}{K_{SS}} + \frac{I}{K_{I3}}}$$

9) Inhibición acompetitiva de la actividad AChE a bajas concentraciones y competitiva a altas concentraciones de AtCh.

La reacción propuesta en este modelo es la mostrada en la figura A9.

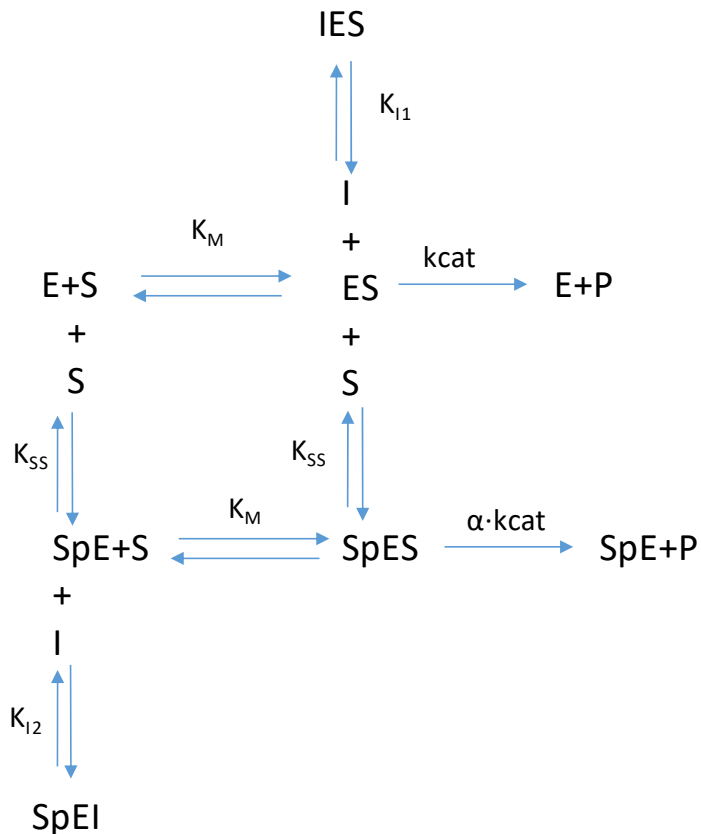


Figura A9. Mecanismo de reacción

Siendo S un sustrato (AtCh), I el inhibidor (PV), K_M la constante de equilibrio para concentraciones bajas de sustrato (S), ES el complejo michaeliano formado, P el producto formado, K_{SS} la constante de equilibrio para el sitio periférico a concentraciones altas de sustrato (S), K_{I2} es la constante de equilibrio del inhibidor para concentraciones altas de sustrato, K_{I1} es la constante de equilibrio entre ES y EIS, $\alpha \cdot k_{cat}$ es la constante catalítica a concentraciones altas de sustrato, IES es el complejo michaeliano con la enzima inhibido a concentraciones bajas de sustrato, SpEI el complejo enzima-inhibidor a concentraciones altas de sustrato, SpE el complejo activado enzima-sustrato y SpES el complejo michaeliano con la enzima activada.

Las constantes de equilibrio se definen tal como sigue:

$$\begin{array}{l}
 K_M = \frac{E \cdot S}{ES} \quad E = \frac{K_M \cdot ES}{S} \quad \text{by)} \\
 K_{I2} = \frac{SpE \cdot I}{SpEI} \quad SpEI = \frac{E \cdot I}{K_{I2}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{I}{K_{I2}} \quad \text{bz)} \\
 K_{SS} = \frac{E \cdot S}{SpE} \quad SpE = \frac{E \cdot S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} = \frac{K_M \cdot ES}{K_{SS}} \quad \text{ca)}
 \end{array}$$

$$K_M = \frac{SpE \cdot S}{SpES} \quad SpES = \frac{SpE \cdot S}{K_M} = \frac{K_M \cdot ES}{S} \cdot \frac{S}{K_{SS}} \cdot \frac{S}{K_M} = \frac{ES \cdot S}{K_{SS}} \quad \text{cb)}$$

$$K_{I1} = \frac{ES \cdot I}{EIS} \quad EIS = \frac{ES \cdot I}{K_{I1}} \quad \text{cc)}$$

La variación del producto formado en función del tiempo en la reacción de la figura A9 es definida tal como sigue:

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot ES + \alpha \cdot k_{cat} \cdot SpES \quad \text{cd)}$$

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

$$E_0 = E + ES + SpE + SpES + SpEI + EIS \quad \text{ce)}$$

Siendo E_0 la concentración de enzima inicial

Despejando ES en ce) obtenemos

$$ES = E_0 - E - SpE - SpES - SpEI - EIS \quad \text{cf)}$$

Sustituyendo by), bz), ca), cb), bs) y bt) en cf) obtenemos

$$ES = \frac{E_0}{\frac{K_M + K_M \cdot I}{S + K_{SS}} + 1 + \frac{K_M + S}{K_{SS}} + \frac{I}{K_{I1}}} \quad \text{cg)}$$

Sustituyendo cg) y cb) en cg) se obtiene

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max1} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{SS}}}{\frac{K_M + K_M \cdot I}{S + K_{SS}} + 1 + \frac{K_M + S}{K_{SS}} + \frac{I}{K_{I1}}}$$