



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis Doctor en Bioquímica

Efecto de malatión sobre el sistema colinérgico  
de Bufo arenarum. Modelos teóricos de  
inactivación de la enzima acetilcolinesterasa y su  
regulación

ENRIQUE ARTURO ROSENBAUM

Bahía Blanca

Argentina

2003

## PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Plaguicidas dependiente del Departamento de Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Comahue, durante el período comprendido entre Mayo de 1992 y Diciembre de 2003 bajo la dirección de la Dra. Ana María Pechen de D'Angelo, Profesora Titular de Química Biológica del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Comahue.

26 de Diciembre de 2003

Departamento de Biología

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

"...a good imagination is better than any knowledge..."

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

A mi directora, Dra. Ana María Pechen de D'Angelo, por aceptarme en su grupo, respaldarme en lo académico y en lo institucional, guiar mi trabajo y orientarme en la realización del trabajo experimental que se vuelca en esta tesis y en la redacción de la misma.

A todo el personal docente y no docente del Dpto. de Química por la colaboración directa e indirecta brindada durante la realización de estos trabajos, que alcanzó hasta el esfuerzo personal. Y un agradecimiento muy especial a todas, y cada una de las personas, que colaboraron en la preparación del material, en ocasión de requerirse mucha mano de obra en poco tiempo, para poder llegar a disponer de masa suficiente para medir el contenido de receptor muscarínico en la cabeza de los renacuajos, y que van desde mi directora hasta personal docente de otras cátedras. A todos muchísimas gracias.

A Adriana Caballero, compañera de trabajo y de varias luchas, por compartir gran parte del trabajo, por compartir ideales y sueños y por su aliento permanente, y a su marido, Edgardo por haberme brindado su amistad sincera.

A Andrés Venturino por haber compartido parte de este trabajo, por haber enriquecido y complementado el esfuerzo creativo y por el extenso debate que decididamente contribuyó a la generación de muchas de las ideas que impulsaron segmentos importantes de esta tesis.

A Lidia Gauna por preparar los embriones y por enseñarme a prepararlos y a manejarlos, y por interesarse personal, laboral y humanamente.

A Carlos Soria, por el estimulante intercambio de ideas y por su invaluable apoyo brindando opiniones y asistencia especialmente en el área analítica e informática.

A mis compañeros de laboratorio Liliana Anguiano, Gladis Potas, Teresa Fonovich, Mónica Montagna, Ana Ferrari, Graciela Otaviano, Sol Souza y Jimena Soleño por tantos favores intercambiados y conformar un ambiente de trabajo ameno.

A Miria Baschini por facilitarme el recurso informático, generarme el espacio temporal relevándome de muchas obligaciones y por la confianza que mostró en mi persona.

A Alejandra Giaveno, Laura Lavalle, Cristian Lopes, María Eugenia Rodríguez, Irene Zajonskovsky, Marcela Sangorrín y Laura Fernández por los buenos momentos compartidos.

Al Ing. Ricardo Echeverría por su buena predisposición, asesoramiento y asistencia en el revelado de autoradiografías, y al Sr. Lizardo Herrera por poner buena voluntad para solucionar todos los problemas que le presentamos.

A la Srta. Cristina Juhász por su colaboración en cada ocasión requerida, y al Sr. Jenó Juhász por sus lecciones en el manejo de la PC en general y de las bases de datos en particular.

A los Dres. Nestor José Carrillo y Eduardo Chiccarelli que guiaron mis pasos en el comienzo del camino y con los que, aún hoy puedo contar incondicionalmente.

Al Prof Oscar Nemeč que me enseñó que una persona es la responsable de lo que aprende y a mantener una actitud crítica ante el conocimiento adquirido, y a la memoria del Sr. Vicente Carballo, personaje de antología, que me demostró que es posible vivir respetando una férrea escala de valores.

A la memoria de mis tíos Margo, Tera, Alex y muy especialmente a la de Moritz, que dedicó su vida entera a asegurar la prosperidad y bienestar de quienes lo rodeaban, y a la de mi madrina, Ernestina, "Chata", de la que recibí tanto durante mi infancia.

A mi hermana Alejandra y a mis sobrinos Alejandro, Julia y Josefina, por aceptarme incondicionalmente

A mi mamá con quien siempre conté a pesar de la distancia y el paso del tiempo.

A mi papá por que le debo todo lo que soy, bueno y malo, por tantos momentos vividos, por mostrarme caminos, por darme el ejemplo, en tu despedida....

A mi esposa Silvana por la compañía, el respaldo y la ayuda que me brindó durante todos estos años y por la lectura crítica de esta tesis.

A mi querido hijo Agustín, primera razón de vivir, por tu paciente comprensión ante la dedicación que demandó este trabajo.

## RESUMEN

Los plaguicidas se han transformado en herramientas casi imprescindibles en el mundo moderno. Sin embargo, su uso acarrea gran variedad de problemas toxicológicos, ambientales y ecológicos de gravedad variable.

Los sapos ocupan una posición central en la cadena trófica en todas las etapas de su vida. Particularmente su etapa embrionaria tiene lugar en medio acuoso donde quedan potencialmente expuestos a numerosos polutores ambientales. Estudiamos el efecto de la exposición a malatión en actividades enzimáticas claves en el proceso de intoxicación, que constituyen los blancos primario y secundarios y algunas enzimas detoxificantes.

Todas las actividades enzimáticas estudiadas se encuentran fuertemente afectadas en embriones desarrollados en medios con malatión 44 mg/l (concentración igual a la  $CL_{50}$  en 96 hs.). Al trasladar los embriones a un medio no contaminado se recuperan rápidamente, siendo su evolución similar a la que experimentan los embriones controles pero con un retraso muy marcado, comparable con el retraso en el desarrollo que se observa en la morfología.

Por otra parte, las  $CL_{50}$  de los embriones y larvas de *Bufo* son significativamente más altas que la de muchas especies acuáticas estudiadas. La razón de esta menor susceptibilidad reside en varias características como escasa metabolización activante, metabolismo detoxificante muy activo, secuestro del plaguicida en lípidos, existencia de blancos alternativos y menor sensibilidad del blanco primario a la inactivación. Merece destacarse que los embriones disponen de una importante reserva lipídica con una gran capacidad de concentrar el plaguicida depurándolo del medio.

Encontramos que la incorporación de paratión en embriones de *Bufo* es muy rápida, alcanzándose un estado cercano a la penetración máxima en menos de 30 min. Valo-

res similares fueron encontrados para malatión, lo que descarta como causa de la tolerancia a una baja permeabilidad al tóxico.

La actividad AChE del sobrenadante post mitocondrial de embriones tiene una afinidad mucho más baja por paraoxón que la AChE de anguila, y menor velocidad de formación del enlace covalente resultando una constante bimolecular de inactivación aproximadamente 80 veces menor. Además, las características cinéticas de la inactivación de la enzima de *Bufo*, pone de manifiesto que habría una actividad paraoxonasa en el extracto. Sin embargo, este sobrenadante fue incapaz de proteger a la misma actividad proveniente de anguila. Adicionalmente, describimos una modulación no covalente de DFP sobre la enzima de anguila difícilmente detectable por los protocolos de medida habituales.

Por otra parte, los embriones de *Bufo arenarum* tienen una importante actividad glutatión-S-transferasa que detoxifica por demetilación y se ve fuertemente aumentada en los embriones expuestos a malatión.

La toxicidad del malatión se ve sorprendentemente aumentada por la presencia de poliaminas en el medio. Modelamos la cinética de AChE de anguila modulada por poliaminas debido a la importancia que las características de la enzima parece tener en la resistencia a organofosforados y al efecto dramático que mostraron las poliaminas en la intoxicación por malatión, con el fin de contar con un instrumento para la estudiar dicho proceso en la enzima de *Bufo*. Encontramos que modulan la actividad enzimática y que dicho efecto depende de la estructura de la poliamina de forma que permite el análisis termodinámico de la afinidad de la enzima por la misma y de las etapas de modificación covalente. Nuestros resultados nos permiten proponer detalles del mecanismo de catálisis probablemente relevantes para interpretar el mecanismo de acción de los compuestos organofosforados.

## ABSTRACT

Pesticides have become indispensable tools in the modern world. However, their use have resulted in a lot of toxicological, environmental and ecological problems with different grade of concern.

Toads are in a central position in the trophic chain along all steps of their life. Specially, during their embryonic and larval stages, which take place in water, they are potentially exposed to environmental pollutants. We studied the effect the malathion exposition over key enzyme activities in the intoxication process, such as primary and secondary targets, and some detoxificant activities.

All the enzyme activities studied are strongly affected in embryos developed in medium with 44 mg/l malathion which is the  $LC_{50}$  in 96 hs. for this species. However, they quickly recover when the animals are transferred to non contaminated medium. Enzyme profiles resembles those in controls but with a delay compatible with a decrease in the rate of development observed from their morphological characteristics.

On the other hand, *Bufo* embryos and larvae  $LC_{50}$  are significantly higher than those of other aquatic species. The mechanism of this low susceptibility may be due to some characteristics such as slow metabolic activation, fast metabolic detoxification, sequester in lipids, availability of secondary targets and reduced primary target sensibility. These embryos have an important lipid storage with high concentration capacity that may clear the pesticide from the medium.

We found that parathion uptake in *Bufo* embryos are very fast reaching a maximum before 30 minutes. Malathion uptake shows similar results.

Post mitochondrial AChE activity in embryos presents lower affinity to paraoxón than eel AChE and slower covalent reaction of the complex. So, the resulting

bimolecular inactivation constant is nearby 80 times lower. Moreover, the kinetic characteristics of the enzyme inactivation in *Bufo* suggests the presence of a paraoxonase activity in the extract. However, this supernatant was unable to protect eel AChE activity. Additionally, we describe a none covalent DFP modulation of AChE difficult to detect by the usually used protocols.

On the other hand, , they have a very high glutathion-S-transferase activity which detoxify mainly by demethylation and increases during the malathion exposition.

Malathion toxicity is enhanced by polyamines in the environment. In order to have an instrument to search that inactivation in *Bufo* enzyme, we modelled the kinetics of AChE modulated by polyamines because of the importance of the enzyme kinetics in the resistance to organophosphate intoxication, and the dramatic effect that polyamines have in malathion intoxication. We find that polyamines modulate AChE in a polyamine structure-depends way that (leave) allow us to perform thermodynamic analysis of the enzyme – polyamine affinity and the covalent reaction steps. Our results allow us to propose some details on the catalytic mechanism's details, probably relevant in the organophosphate poisoning mechanism interpretation.

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.0 PLAGUICIDAS USOS Y NECESIDADES</b>	1
<b>1.1 HISTORIA</b>	4
<b>1.2 PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS</b>	5
<b>1.3 DINÁMICA EN EL MEDIO AMBIENTE</b>	9
<b>1.4 EFECTO SOBRE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS Y TERRESTRES</b>	12
<b>1.5 PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS. MECANISMOS DE ACCIÓN</b>	14
<b>1.5.1 Características generales del sistema nervioso de los vertebrados</b>	15
<b>1.5.2 Efectos tóxicos de organofosforados</b>	21
<i>Intoxicación aguda</i>	21
<i>Teratogenesis</i>	24
<i>Neuropatía inducida por organofosforados</i>	26
<i>Síndrome post traumático</i>	27
<i>Cancer</i>	28
<i>Letalidad retardada</i>	28
<b>1.5.3 Detoxificación</b>	29
<i>Esterasas</i>	30
<i>Carboxiesterasas como blancos secundarios</i>	31

<i>Glutación S transferasas</i>	31
<b>1.6 MODELOS QUE EXPLICAN LA CINÉTICA DE ACHE</b>	32
<i>DESARROLLO DEL MODELO DE INACTIVACIÓN DE KITZ Y WILSON</i>	34
<i>Inactivadores como sustrato</i>	37
<b>1.7 OBJETIVOS</b>	43
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	44
<b>2.1 MATERIALES</b>	44
<b>2.2 MÉTODOS</b>	46
<b>2.2.1 Homogenización</b>	46
<b>2.2.2 Actividades enzimáticas</b>	46
<i>Determinación de colinesterasas</i>	46
<i>Determinación de aliesterasa</i>	47
<b>2.2.3 Receptor muscarínico de acetilcolina</b>	50
<b>2.2.4 Captación de paratión [<sup>14</sup>C]</b>	51
<b>2.2.5 Métodos para proteínas</b>	51
<i>Determinación de proteínas</i>	51
<i>Electroforesis</i>	51
<i>SDS-PAGE</i>	52
<i>Incorporación de Leucina [<sup>14</sup>C]</i>	52
<i>Fraccionamiento en ensayos de incorporación de trazadores radioactivos</i>	53
<b>2.2.6 Ensayos Cinéticos</b>	56

<i>Determinación de la inactivación <b>in vitro</b> de AChE</i>	56
<i>Purificación de fosfatidil colina</i>	57
<i>Preparación de liposomas de fosfatidil colina</i>	57
<b>2.2.7 Modelado de la cinética de AChE</b>	58
<b>3 EFECTO DEL MALATIÓN EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE ANFIBIOS</b>	61
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b>	61
<b>3.2 RESULTADOS</b>	63
<b>3.2.1 Captación de paratión [<sup>14</sup>C] por embriones de sapo <i>Bufo arenarum</i></b>	63
<b>3.2.2 Actividad de acetil, butiril y alilesterasa y el contenido de proteínas en embriones de <i>Bufo arenarum</i> expuestos a malatión 44 mg/l</b>	65
<b>3.2.3 Recuperación de embriones de medios contaminados</b>	67
<b>3.2.4 Receptor Muscarínico de Acetilcolina</b>	72
<b>3.2.5 Efecto de la exposición de malatión en sapo adulto</b>	75
<b>3.3 DISCUSIÓN</b>	79
<b>4 ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE ACETILCOLINESTERASA</b>	88
<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b>	88
<b>4.2 RESULTADOS</b>	92

4.2.1	Inactivación de AChE de anguila por DFP	92
4.2.2	Inactivación de la AChE de anguila por paraoxón	97
4.2.3	Efecto del paraoxón sobre AChE de larvas de <i>Bufo</i>	101
4.2.4	Protección de la actividad AChE por lípidos	104
4.3	DISCUSIÓN	108
5	<b>MODELO TEÓRICO DE LA CINÉTICA DE ACETILCOLINESTERA Y SU REGULACIÓN POR POLIAMINAS</b>	113
5.1	INTRODUCCIÓN	113
5.1.1	<b>MODELOS</b>	128
	<i>Modelo 2D</i>	129
	<i>Modelo 3D</i>	131
	<i>Modelo 4D</i>	134
	<i>Modelo Ping-Pong</i>	136
	<i>Modelo Mixto</i>	136
5.2	RESULTADOS	139
5.2.1	<b>MODELO 3D</b>	141
5.2.2	<b>MODELO 4D</b>	143
5.2.3	<b>MODELO MIXTO</b>	144
	<i>EL PROBLEMA DE LA ESTIMACIÓN DE <math>V_{max}</math> y <math>K_m</math></i>	154
	<i>EL PROBLEMA DE LAS COMPENSACIONES, IMPORTANCIA DE CADA COEFICIENTE</i>	159

<i>Importancia de los coeficientes</i>	159
<i>ASPECTOS TERMODINÁMICOS RELACIONADOS AL MODELO MIXTO</i>	163
<b>5.3 DISCUSIÓN</b>	167
<b>6 CONCLUSIONES</b>	173
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	180
<b>Publicaciones derivadas de este trabajo experimental</b>	203
<b>Presentaciones en congresos nacionales</b>	204
<b>Presentaciones en congresos internacionales</b>	207

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Tema</b>	<b>Página</b>
1	Presencia de plaguicidas .. en el Alto Valle	2
2	Organofosforados Estructura genérica	5
3	Ejemplos de organofosforados	7
4	Sinápsis	18
5	Detalle de la figura 4	19
6	AChE variantes	20
7	Efecto en embriones	25
8	Estructura del sitio activo y de la grieta de AChE	33
9	Diagrama de reacción AChE-OF	39
10	Espectros de p-nitrofenol	48
11	Espectros de 1/2 para ali-esterasas.	49
12	Diagrama de flujo del lavados de las muestras.	54
13	Diagrama de flujo del fraccionamiento de las muestras.	55
14	Asimilación de Paratión [ <sup>14</sup> C]	64
15	Asimilación de malatión	65
16	Actividades enzimáticas en embriones expuestos a malatión	66
17	Mortalidad y contenido de proteínas en embriones expuestos a malatión	66
18	AChE en embriones expuestos a malatión y en recuperación	67
19	Electroforesis SDS-PAGE de embriones expuestos a malatión	68
20	Incorporación de leucina [ <sup>14</sup> C] en larvas	69
21	Efecto de malatión sobre incorporación de leucina [ <sup>14</sup> C]. (Barras)	70
22	Efecto de malatión sobre incorporación de leucina [ <sup>14</sup> C]. (Autorradiografía)	71
23	Efecto de malatión sobre incorporación de leucina [ <sup>14</sup> C].(Titulación)	71
24	Unión directa de QNB.	73
25	Unión directa de QNB rango menor.	74
26	Unión directa de QNB rango menor. Scatchard	74
27	Zimograma + Davies del Adulto	77

28	SDS del Adulto. Sobrenadante de 10000 x g de homogenato de hígado y cerebro	77
29	SDS del Adulto. Sedimento de 10000 x g de cerebro	78
30	Inactivación de AChE de anguila por DFP	94
31	Inhibición de AChE en la cubeta de medida por DFP.	96
32	Representación semilogarítmica de la inhibición por DFP en la cubeta de medida	96
33	AChE de anguila inactivada por paraoxón	99
34	Representación de los valores de $k_I$ y de sus dos componentes, uno hiperbólico y de el otro lineal de AChE de anguila inactivada por paraoxón	100
35	$k_{obs}$ para la inactivación de AChE durante la determinación de actividad en muestras provenientes del medio de reacción de paraoxón y extracto de larvas	102
36	Evolución de los valores ajustados de las constantes de decaimiento de la actividad durante la medida de la misma	103
37	DFP sobre AChE de anguila en presencia de liposomas de PC	104
38	Efecto de liposomas de PC sobre la velocidad de inactivación de acetilcolinesterasa de anguila por DFP	105
39	Estructura de las poliaminas	114
40	Modelo presentado por Main y Rush	117
41	Modelos cinéticos utilizados por Radic y col.	120
42	Esquema del mecanismo 2 de Hofer y Fingelli	121
43	Esquema del mecanismo 3 del Hofer y Fingelli	123
44	Modelo presentado por Taylor y Radic (1994).	125
45	Modelo 2D	130
46	Modelo 3D	131
47	Modelo 4D	135
48	Modelo Mixto	137
49	Resultados de seis determinaciones independientes de la cinética completa de acetilcolinesterasa y curvas ajustadas a partir de modelos paramétricos.	140
50	Solución encontrada con el modelo 3D.	142
51	Solución encontrada con el modelo 4D	143
52	Efecto de asumir que no hay inhibición por sustrato en la forma de la curva $v = f([S])$	158
53	Efecto de reasignar arbitrariamente a un coeficiente un valor diferente al obtenido originalmente	160

54	Efecto de intentar compensar los cambios introducidos en la forma de la curva por variación del valor de un coeficiente, con cambios en otro.	<b>161</b>
55	Rangos de significación de los coeficientes	<b>161</b>
56	$\Delta G^{\circ}$ de unión de las poliaminas	<b>164</b>
57	Valores de $\Delta\Delta g^{\ddagger}$	<b>165</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Tema</b>	<b>Página</b>
I	Consumo de plaguicidas en la República Argentina en los años 1997 y 1998.	3
II	Nombre genérico de las distintas clases de compuestos organofosforados.	6
III	Nombre de las distintas clases de compuestos organofosforados clasificados según el primer átomo de cada sustituyente unido al fósforo.	6
IV	Propiedades e índice GUS de algunos plaguicidas.	11
V	Síntomas y signos de la intoxicación aguda con organofosforados.	23
VI	Valores de $K_i$ y $k_i$ publicados por Wang y Murphy para AChE.	38
VII	Actividades enzimáticas estudiadas en la fracción post-mitocondrial de hígado y cerebro de sapo adulto intoxicados con malatión.	75
VIII	Actividad antes y después de exponer a paraoxón, 200 mg/l, por 2 min. AChE de anguila y de embriones de <i>Bufo</i> por separado y mezcladas.	106
IX	Equivalencia entre los coeficientes de la ecuación 38 y las constantes del modelo 2D.	131
X	Equivalencia entre los coeficientes de la ecuación 39 y las constantes del modelo 3D.	132
XI	Equivalencia entre los coeficientes de la ecuación 40 y las constantes del modelo 4D.	134
XII	Ajustes hechos a los modelos paramétricos probados.	139
XIII	Resultado del ajuste de los coeficientes del modelo 3D a los resultados experimentales.	141
XIV	Constantes aparentes de velocidad de reacción para cada una de las vías de reacción involucradas en el modelo mixto.	145
XV	Definición de los parámetros de ajuste en función de las constantes del modelo cinético.	146
XVI	Coefficientes de la ecuación paramétrica 41 en función de los parámetros de ajuste.	147
XVII	Cálculo de las constantes cinéticas del modelo mixto a partir de los valores de los parámetros de ajuste.	149

XVIII	Valor obtenido por ajuste no lineal de los parámetros de ajuste independientes del modelo mixto de reacción de hidrólisis de acetil-tiocolina catalizada por acetilcolinesterasa de anguila.	150
XIX	Constantes cinéticas del modelo mixto deducidas a partir de los valores obtenidos de los parámetros de ajuste del modelo mixto, definidos en la tabla XVI.	151
XX	Cambios en las energías libres $\Delta G^0$ y de $\Delta g^\ddagger$ para las interacciones de AChE y su sustrato.	166

## Abreviaturas utilizadas en esta tesis

AChE	Acetilcolinesterasa
AChR	Receptor de acetilcolina
AChRm	AChR muscarínico
AChRn	AChR nicotínico
AIC	Criterio de ajuste de Akaike
ATC	Acetil tio colina
ChAT	Colin acil transferasa
CE	Carboxiesterasa
B	Poliamina libre.
BE	Acetilcolinesterasa con poliamina unida.
BE'	Acetilcolinesterasa acetilada con poliamina unida.
BES	Acetilcolinesterasa con poliamina unida y sustrato unido al sitio activo.
BSE	Acetilcolinesterasa con el sitio inhibitorio y el de poliamina ocupado por sus ligandos.
BSE'	Acetilcolinesterasa acetilada con poliamina unida y sustrato unido al sitio inhibitorio.
BSES	Acetilcolinesterasa con ambos sitios para sustrato y el de poliamina ocupados por sus ligandos.
B'E	Acetilcolinesterasa con el segundo sitio para poliaminas ocupado.
B'E'	Acetilcolinesterasa acetilada con el segundo sitio para poliaminas ocupado.
B'ES	Acetilcolinesterasa con el segundo sitio para poliaminas ocupado y sustrato unido al sitio activo.
B'SE	Acetilcolinesterasa con el sitio inhibitorio y el segundo sitio de poliamina ocupado por sus ligandos.

B'SE'	Acetilcolinesterasa acetilada con el segundo sitio para poliaminas ocupado y sustrato unido al sitio inhibitorio.
B'SES	Acetilcolinesterasa con ambos sitios para sustrato y el segundo sitio para poliaminas ocupados.
B'BE	Acetilcolinesterasa con ambos sitios para poliaminas ocupados.
B'BE'	Acetilcolinesterasa acetilada con ambos sitios para poliaminas ocupados.
B'BES	Acetilcolinesterasa con ambos sitios para poliaminas ocupados y sustrato unido al sitio activo.
B'BSE	Acetilcolinesterasa con el sitio inhibitorio y con ambos sitios para poliaminas ocupados por sus ligandos.
B'BSE'	Acetilcolinesterasa acetilada con ambos sitios para poliaminas ocupados y sustrato unido al sitio inhibitorio.
B'BSES	Acetilcolinesterasa con ambos sitios para sustrato y ambos sitios para poliaminas ocupados.
DFP	Di isopropilfluorofosfato
DTNB	Di-tio bis nitrobenzoato
E	Acetilcolinesterasa. Forma libre de ligandos
E'	Acetilcolinesterasa acetilada, libre de otros ligandos.
EDTA	Ácido etilen diamin tetracético
GSH	Glutación reducido
ES	Acetilcolinesterasa con sustrato unido al sitio activo.
GSH-S-T	Glutación S Transferasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Iso OMPA	Octaisopropil pirofosforamida
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MFO	Oxidasas de función mixta
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamina adenina di-nucleótido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamina adenina di-nucleótido fosfato

NADPH	Nicotinamina adenina di-nucleótido fosfato reducido
NEM	N-etil maleimida
NTE	Esterasas neurotóxica
OMPA	Octametil pirofosforamida
OP	Organofosforado
PA	Poliamina
PC	Fosfatidil colina
PMSF	para-Fluoruro de para metil sulfonilo
Put	Putrecina
PON1	Paraoxonasa 1
PVasa	Fenil valerato sintetasa
QNB	Quinuclidil Bencilato
RSD	Desviación estandar residual
RSS	Suma de cuadrados residuales
S	Sustrato libre.
SE	Acetilcolinesterasa con sustrato unido al sitio inhibitorio.
SE'	Acetilcolinesterasa acetilada con sustrato unido al sitio inhibitorio.
SES	Acetilcolinesterasa con sustrato unido a ambos sitios.
SET	Solución: Sacarosa 250 mM, EDTA 1mM, Tris-ClH 100 mM. pH: 7,4.
Spd	Espermidina
Spm	Espermidina
TCA	Ácido tricloro acético

# 1 INTRODUCCION

## 1.0 PLAGUICIDAS USOS Y NECESIDADES

El ser humano convive con innumerable cantidad de especies cuya existencia afecta en mayor o menor medida, generalmente perjudicándolas. Hoy se estima que la tasa de extinciones de especies es entre 1000 y 10000 veces la normal. La actividad antropogénica también genera las condiciones propicias para la proliferación descontrolada de algunas de las mismas que finalmente impactan sobre ecosistemas locales y terminan por afectar su salud o su economía. En estos casos, son consideradas plagas y han sido combatidas de diversos modos desde tiempos inmemoriales. En las últimas décadas se han desarrollado y aplicado diversos productos químicos muy útiles para combatirlos, a los que se llama genéricamente plaguicidas.

Esta práctica para el control de plagas ha hecho posible, hoy en día, hacer más comfortable la vida, mejorar el rendimiento agrícola y controlar vectores de enfermedades infectocontagiosas con excelentes resultados desde el punto de vista epidemiológico. Fiebre amarilla, amebiasis, leishmaniasis, cólera, malaria y tifus son algunos de los ejemplos de enfermedades controladas combatiendo sus vectores mediante el uso de plaguicidas. Hacia el año 1945 llegaron a ser más de veinte las enfermedades transmisibles por vectores controlados de esta forma (Hayes, 1975). La importancia de los beneficios obtenidos frente a sus perjuicios son tales, que hoy en día es difícil dejar de usarlos hasta tanto se desarrolle un procedimiento alternativo que cumpla el mismo fin, con una eficiencia similar. No obstante

es importante señalar que el uso permanente de estos compuestos ha llevado a que los mismos estén presentes en forma persistente en suelos, aguas profundas y superficiales y en los alimentos provocando un importante impacto en el medio ambiente (Baez y col., 1996; Knedel y col., 1999; Kolpin y col., 1998; Krueger y Törnqvist, 1998; Natale y col., 1995; Planas y col., 1997; Loewy y col., 1999; Spliid y Kooppen, 1998). A modo de ejemplo, en la figura 1 se ilustra la presencia de plaguicidas en aguas superficiales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén.

La tecnología agropecuaria actual tiende a racionalizar su uso criteriosamente, apoyándose en la flora benéfica y la competencia entre especies, en el uso de variedades vegetales de genética seleccionada o modificada, resistentes a las plagas y a un completo conocimiento de las características, interacciones y necesidades de los insectos en cada ecosistema. (Loewy, 2002).

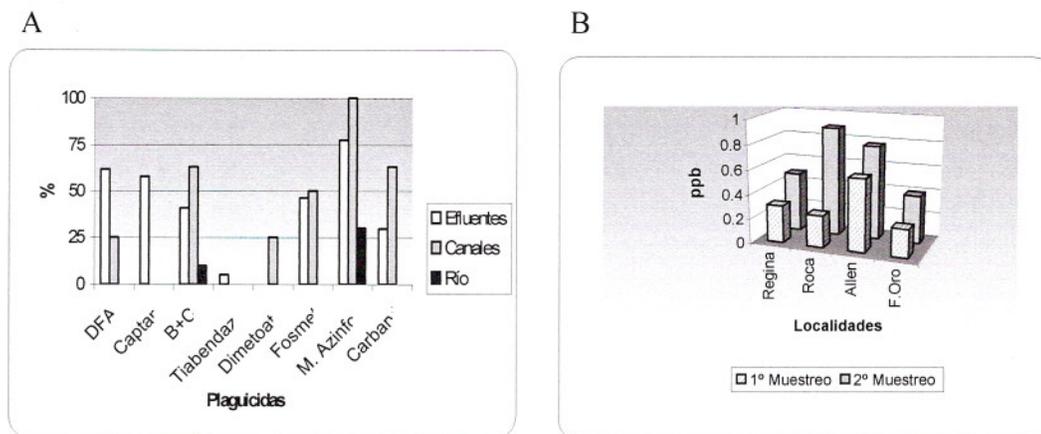


Figura 1: Presencia de plaguicidas organofosforados y carbamatos en agua de efluentes, canales y de río en varias localidades del Alto Valle del Río Negro. (Loewy y col. 2001).

En materia de insecticidas, específicamente, en nuestro país, se registra un descenso paulatino en el consumo total desde el año 1997 en adelante (Tabla I), si bien la intensidad de la aplicación varía de una zona a otra y de un año a otro.

Tabla I: Consumo de plaguicidas en la República Argentina en los años 1997 y 1998. (CASAFE, 1998)

	Herbicidas		Insecticidas		Fungicidas	
	1997	1998	1997	1998	1997	1998
Algodón	20,09	16,8	35,03	26,0	0	0
Soja	329,39	240,8	53,82	38,2	0,15	0,6
Frutales	1,76	2,7	15,40	12,3	3,93	3,9
Totales	634,70	535,5	166,50	133,5	53,00	49,6

Valores en millones de dólares.

Metilazinfos, por ejemplo, es el insecticida más usado en zona de cultivo de frutales llegando a aplicarse hasta 970 toneladas, las que representan el 90% de los aplicados en todo el país. Por otro lado, llegaron a aplicarse 3000 toneladas de clorpirifos, en 1997, de las cuales el 47% se usó en cultivos de soja y nada más que el 4% en frutales el mismo año; pero en 1999, en soja el consumo bajó a 1066 toneladas mientras que para frutales se usaron cerca de 133 toneladas. Hay que tener en cuenta, que el área destinada soja es mucho mayor que la de frutales, y por lo tanto la presión ejercida en estas áreas es mucho más importante (INTA, comunicación personal).

Por lo tanto, todo indica que en nuestro país, aun se aplican importantes cantidades de plaguicidas que constituyen, cuando no se respetan estrictas normas de seguridad, una amenaza a la salud pública y para la integridad ecológica del ambiente.

Los intentos por reducir o abandonar totalmente su uso han ido creciendo en los últimos años, pero el esfuerzo es aún escaso. Así por ejemplo, si bien los llamados “cultivos orgánicos” los evitan por completo, para satisfacer las demandas de un mercado que se muestra dispuesto a cubrir los mayores costos para garantizar un producto completamente libre de residuos, aun a pesar de una calidad inferior, no puede decirse que sea esta una modalidad masiva que vaya a desplazar a la convencional pese ser un mercado en crecimiento.

Por otro lado, los esfuerzos de distintas instituciones por impulsar modalidades de control integrado de plagas lograron sumar adeptos especialmente en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (INTA, comunicación personal).

## **1.1 HISTORIA**

Una de las más antiguas referencias escrita conocida sobre el uso de sustancias destinadas al control de plagas, figura en la Odisea de Homero del siglo IX AC. En oriente se utilizaba arsénico para controlar insectos en jardines. Hay papiros con recetas de preparados destinados a repeler plagas que datan del año 1550 AC. Existen registros de usos de arsénico y tabaco hacia mediados del siglo XXVII. Pero hasta fines del siglo XIX era relativamente poco el uso de productos de este tipo (Hayes, 1975).

Antiguamente se utilizaron sales de metales pesados como sulfato de cobre, arsenito de cobre o arseniato de plomo o productos derivados de extractos vegetales tales como nicotina o rotenona. En el siglo XIX ya se extraían las piretrinas de fuentes naturales. Es bien conocido el uso de habas de tierra (*Phycostigma venenosum*) ricos en el carbamato fisostigmina o eserina (Ecobichon, 1982a).

Recién en la primer mitad del siglo XX, hacia el año 1945, se comenzaron a usar compuestos sintéticos, altamente tóxicos, en forma sistemática y masiva con la introducción del DDT, (Ecobichon, 1982c) con el objetivo de combatir el mosquito y controlar la incidencia de malaria. Pronto surgieron otros organoclorados altamente efectivos, pero su gran persistencia y falta de selectividad hizo que su impacto negativo sobre los ecosistemas fuera generalizado y determinó que fueran reemplazados por una nueva familia de insecticidas, los compuestos organofosforados. Estos compuestos son los más usados hoy en día, y si bien se pretende reemplazarlos por nuevas generaciones de plaguicidas su uso sigue siendo predominante (Primo Yufera, 1991).

## 1.2 PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Se denomina genéricamente organofosforado a una familia de compuestos orgánicos derivados del ácido fosfórico cuya estructura puede representarse como se ilustra en la figura 2.

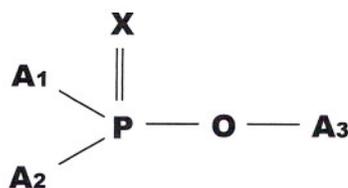


Figura 2: Estructura genérica de un compuesto organofosforado.

Donde X es oxígeno o azufre, y A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub> distintos sustituyentes orgánicos. Los casos particulares en que A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> sean grupos -OH y A<sub>3</sub> sea hidrógeno u otro fosfato, se trata del ácido ortofosfórico y del pirofosfórico respectivamente. Los nombres genéricos de las distintas clases se muestran en la tabla II y los de las clases resultantes en la tabla III.

Tabla II: Nombre genérico de las distintas clases de compuestos organofosforados.

Grupo	1 <sup>er</sup> átomo	Nombre genérico
X	O	Fosfatos
X	S	Tionatos
A <sub>1</sub>	S	Tiolatos
A <sub>1</sub>	N	Amidato
A <sub>1</sub>	C	Fosfonato

Tabla III: Nombre de las distintas clases de compuestos organofosforados clasificados según el primer átomo de cada sustituyente unido al fósforo.

A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	X	Clase
-O-	-O-	O	Ortofosfato
-S-	-O-	O	Fosforo tiolato
-O-	-O-	S	Fosforo tionato
-S-	-O-	S	Fosforo tionotiolato
-S-	-S-	O	Fosforo ditiolato
=N-	-O-	O	Fosforo amidato
=N-	=N-	O	Fosforo diamidato
=N-	-O-	S	Fosforo amido tionato
=N-	-S-	O	Fosforo amido tiolato
≡C-	-O-	O	Fosfonato
≡C-	-O-	S	Fosfono tionato
≡C-	-S-	S	Fosfono tionotiolato
≡C-	≡C-	O	Fosfinato
≡C-	≡C-	S	Fosfinotionato

Tomado de Corbett (1974) y Ecobichon (1982b).

Algunos organofosforados no pueden ser clasificados de esta manera como el TEPP y el OMPA (figura 3) (Ecobichon, 1982b).

En la figura 3 se presentan ejemplos de algunas estructuras químicas de organofosforados de uso frecuente.

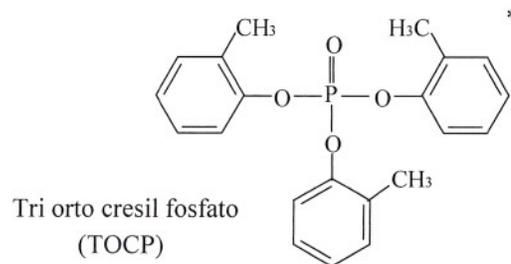
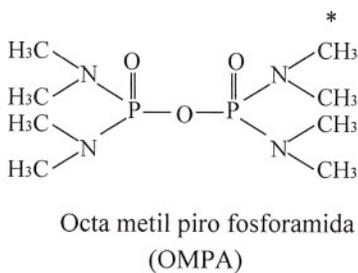
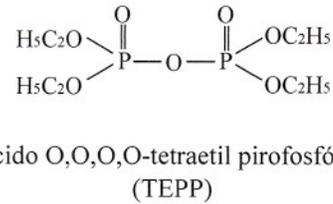
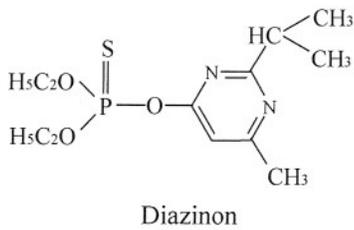
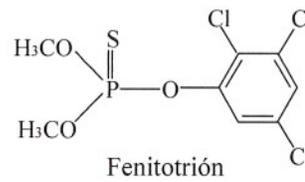
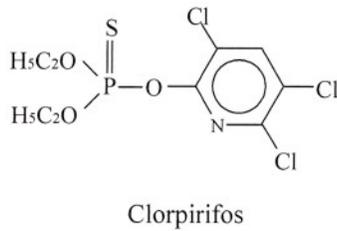
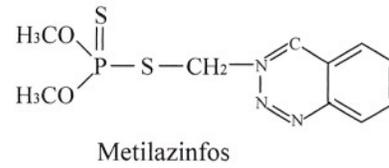
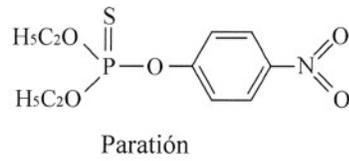
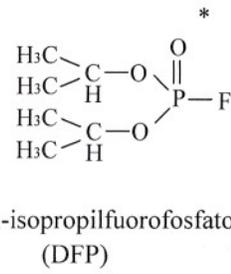
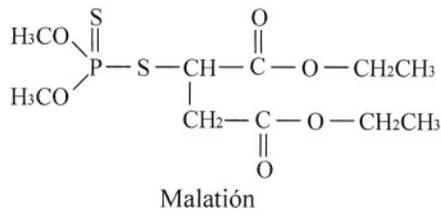


Figura 3: Ejemplos de estructuras de algunos organofosforados. En todos los casos el grupo saliente está a la derecha del átomo de fósforo. Los compuestos marcados con (\*) no se usan como plaguicidas.

Es evidente que las propiedades fisicoquímicas de un compuesto organofosforado dependen de la naturaleza de los grupos representados en la figura 2 como  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$ , de las cuales se destacan por su importancia los efectos electrónicos, estéricos y la hidrofobicidad (Ecobichon, 1982b). Cada una de las etapas que atraviesa el compuesto durante el proceso de intoxicación depende de, al menos uno de estos tres aspectos.

Para que un compuesto organofosforado sea reactivo, el átomo de fósforo debe estar fuertemente activado frente a nucleófilos, lo cual ocurre por efecto de la capacidad atractora de electrones de los grupos unidos a él. La misma es usualmente descrita en química orgánica a través del índice de Hammett ( $\sigma$ ). Además es necesario que la forma y tamaño de dichos grupos no impida la formación del complejo con la enzima, propiedad que es reflejada por la constante estérica de Taft ( $E_s$ ) (Ecobichon, 1982b).

La solubilidad en lípidos es uno de los factores más relevantes para la toxicidad de estos compuestos, ya que al ser liposolubles, se particionan en los compartimientos lipídicos y se bioconcentran. Para cuantificar esta propiedad se define un parámetro llamado coeficiente octanol agua ( $K_{o/a}$ ) como el cociente de las solubilidades en agua y en un solvente orgánico como octanol, n-hexano, cloroformo o benceno.

Para modelar el efecto biológico de compuestos similares, se ha propuesto una ecuación paramétrica para predecir el valor de una respuesta biológica (BR) de un compuesto organofosforado, que contempla estas tres propiedades.

$$\text{Log(RB)} = k_1 \pi^2 + k_2 \pi + k_3 \sigma + k_4 E_s + k_5$$

Esta ecuación es de grado dos en una variable  $\pi = \log(P_X/P_H)$ , donde  $P_H$  es el coeficiente  $K_o/a$  de un compuesto base y  $P_X$  el de un compuesto relacionado, con la que se ha logrado una importante avance en el intento de correlacionar la actividad biológica con las características fisicoquímicas (Ecobichon, 1982b; ; Venturino y col., 2001).

### **1.3 DINÁMICA EN EL MEDIO AMBIENTE**

El carácter contaminante de un plaguicida está definido por sus propiedades tóxicas, su estabilidad química, su concentración y por la sensibilidad de los organismos expuestos al mismo, así como a sus productos de degradación. Estos compuestos están sujetos a procesos de conversión y transporte en el medio ambiente como consecuencia de sus características fisicoquímicas.

Los plaguicidas, una vez aplicados, son movilizados por las corrientes de aire en la atmósfera (Ballschmiter y col., 1996). También percolan a través del suelo y escurren hacia aguas superficiales y subterráneas (Fournier y col., 1997) donde son bioconcentrados en la fauna y flora afectando así no solo al hombre sino a todo el ecosistema desde animales hasta micro organismos.

En el suelo, el desplazamiento de plaguicidas se ve demorado por unión a las partículas coloidales presentes, lo que lo hace extremadamente lento. El estudio de este proceso reviste gran importancia por que permite hacer una primer estimación del tiempo y concentración con que alcanzará el agua subterránea. (Loewy, 2000; Loewy y col., 2002; Kirs, 2000).

En cualquier caso, la movilidad es afectada por los procesos bióticos y abióticos de degradación. Así por ejemplo, cuando se estudió la dinámica del malatión marcado en el

suelo utilizando [<sup>14</sup>C] malatión, se libera [<sup>14</sup>C] CO<sub>2</sub>, probablemente por biotransformaciones producida por la microflora natural. La velocidad y magnitud de la liberación de CO<sub>2</sub> depende de las condiciones del medio, y estas, en parte, dependen de los agregados que se le hagan al suelo. Por ejemplo, el nitrato de amonio disminuye la velocidad de degradación del malatión pero el agregado de superfosfato triple la acelera (Ghezal y col., 1997). Además, se observa que la velocidad de degradación es mayor cuanto mayor es el contenido de materia orgánica (Kirs, 2000). Residuos orgánicos en descomposición facilitan la lixiviación de residuos de pesticidas en suelos especialmente usando surfactantes aniónicos (Iglesias Jimenez, 1997), reacción típica de la acción microbiológica. Por otro lado, debido a su sectorización es muy difícil que entren en contacto un gran número de individuos con un suelo contaminado.

Por otro lado, la contaminación del aire, si bien es más abarcativa, es transitoria porque puede ser fácilmente dispersada por el viento y otros eventos climáticos (Ballschmiter y col., 1996).

La contaminación de aguas superficiales también puede ser fácilmente removida por su movimiento rápido, por dilución por lluvias, por bioconcentración o por descomposición por acción de la luz solar o por metabolización por microorganismos.

En cambio, las aguas subterráneas, contaminadas usualmente por percolación desde la superficie, no sufren dilución, no están expuestas a la luz solar ni son afectadas por un gran desarrollo microbiológico por lo que se espera que la contaminación de las mismas tienda a ser persistente. Además, son frecuentemente consideradas buenas fuentes de agua potable por lo que fácilmente se convierten en fuentes de intoxicación para la población (Baez y col., 1996; Kneldel y col., 1999; Kolpin y col., 1998; Krueger y Törnqvist, 1998; Natale y col., 1995; Planas y col., 1997; Loewy y col., 1999; Spliid y Kooppen, 1998).

El índice GUS (Groundwater Ubiquity Score) (Guftafson, 1989) es un indicador de contaminación potencial de las aguas subterráneas que se define como

$$GUS = (4 - \log(Koc)) \times \log(t_{0,5})$$

donde  $t_{0,5}$  es la vida media en suelos, expresada en días. Esta ecuación permite clasificar a los plaguicidas en lixiviables ( $GUS > 2,8$ ), no lixiviables ( $GUS < 1,8$ ) y de transición para valores de índice de GUS comprendidos entre los valores mencionados. En la tabla IV se muestran algunas propiedades fisicoquímicas y del índice GUS de algunos plaguicidas.

Tabla IV: Propiedades e índice GUS de algunos plaguicidas.

Compuesto	Vida media (días)	Koc	Solubilidad en Agua (mg/l)	GUS
Atrazina	60	100	33000	3,68
Semiazina	60	130	6200	3,34
Lindano	400	1100	6107	2,47
Metidación	7	400	220000	1,18
Clorpirifos	30	6070	400	0,37
Etión	150	10943	1100	-0,09
Endolfán	50	12400	320	-0,15
Aldrín	100	229087	20	-2,80

Adaptado de Costa y col. (1998).

#### 1.4 EFECTO SOBRE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS Y TERRESTRES

La toxicidad de los plaguicidas organofosforados y carbamatos es muy variable para vertebrados terrestres (Hudson y col., 1984) y acuáticos (Johnson y Finley, 1980) y debido a que los mismos actúan interfiriendo la transmisión colinérgica sus efectos son agudos y rápidos necesitándose solo cortos tiempos de exposición para matar o afectar a una gran variedad de especies "no - blanco". La vulnerabilidad de cada especie depende de muchos factores que incluyen desde la sensibilidad específica al producto químico, las características del hábitat, la edad, el sexo del individuo, etc. Algunas especies son más tolerantes que otras a insecticidas organofosforados y carbamatos. Así, por ejemplo, algunas aves son 200 veces más sensibles a carbamatos y 500 veces más sensibles a organofosforados que la *Rana catesbiana* adulta (Johnson y Finley, 1980). En especial, la tolerancia a los plaguicidas anticolinesterásicos varía mucho a lo largo de la vida de la especie dependiendo de la maduración de las vías metabólicas, el crecimiento, etc. Generalmente los adultos son más tolerantes que los jóvenes, pero no siempre es así, por ejemplo, para embriones de *Bufo arenarum*, Hensel, la LC50 es cuatro veces mayor que para larvas de la misma especie, lo que indica que la sensibilidad es menor en estadios tempranos (Anguiano y col., 1994 y 1998, Caballero de Castro, 1999).

En roedores, las formas descritas de desarrollo de tolerancia son: disminución del número de receptores de acetilcolina muscarínicos y nicotínicos, cambios en la liberación de acetilcolina, síntesis compensadora de AChE y cambios en las propiedades cinéticas de la enzima (Milatovic y Dettbarn, 1996). Especialmente en ratas, el cambio estructural

ocurrido durante el desarrollo de tolerancia al paraoxón lleva a una mayor afinidad por acetilcolina y por paraoxón. La mayor tolerancia se debe a la mayor eficiencia de la actividad AChE remanente para hidrolizar acetilcolina (Milatovic y Dettbarn, 1996).

La presencia de blancos secundarios también ha sido sugerida como forma de modificar la tolerancia a organofosforados y carbamatos, a tal punto que se ha sugerido que la aplicación de AChE exógena, por vía endovenosa, podría mejorar la respuesta de personas ocupacionalmente expuestas a organofosforados. En ratas, por ejemplo, la aplicación de inhibidores de carboxiesterasas, disminuyen significativamente la tolerancia a N-metilcarbamato y a paraoxón (Gupta y Dettbarn, 1993; Yang y Dettbarn, 1998).

Uno de los problemas del uso no controlado de plaguicidas es el desarrollo de resistencia en las especies que se pretende combatir. Este último fenómeno se produce por selección natural, por la fuerte presión de selección que impone el plaguicida que permite que solo los más tolerantes sobrevivan y se reproduzcan, sin la competencia de sus pares menos adaptados (Matsumura, 1985a). De esta forma, son las especies de vida corta las que más rápidamente desarrollan resistencia a plaguicidas. La consecuencia directa de este fenómeno es que el uso continuo y abundante de plaguicidas induce pérdida de eficiencia del mismo y la necesidad de aplicarlo cada vez en dosis mayores.

Básicamente, los mecanismos de desarrollo de resistencia son cambios en el comportamiento o mecanismos fisiológicos. Los primeros se relacionan con cambios en la conducta que minimizan o evitan el contacto con las áreas contaminadas. Los últimos son cambios bioquímicos como pérdida de sensibilidad del blanco de acción principal al envenenamiento, cambios compensatorios como una mayor velocidad de síntesis de AChE, una mayor disponibilidad de blancos no críticos que consuman el xenobiótico, cambios en la permeabilidad y mayor eficiencia en la detoxificación (Ffrench-Constant y col., 1999).

En dos cepas de mosca del tabaco resistente a monocrotofos y clorpirifos la resistencia parece estar asociada a diferencias en la sensibilidad de AChE a la inactivación. Aunque en el primer caso no parece haber correlación entre los valores de DL50 y de la constante bimolecular de inactivación de AChE por el oxón correspondiente, esto bien puede deberse a una diferencia en la farmacocinética o en la activación en cada especie (Byrne y Devonshire, 1997).

### **1.5 PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS. MECANISMOS DE ACCIÓN**

Los insecticidas son, en su gran mayoría, venenos del sistema nervioso central. Los plaguicidas organofosforados y carbamatos actúan inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (E.C.3.1.1.7), en forma irreversible o lentamente reversible provocando así una fuerte intoxicación por exceso de acetilcolina. También los plaguicidas piretroides, ciclodienos, y aún algunos clorados como el DDT, alteran el normal funcionamiento del sistema nervioso, pero en estos casos las bases moleculares o enzimáticas de su acción permanecen poco conocidas (O'Brien, 1967; Matsumara, 1985b).

### **1.5.1 Características generales del sistema nervioso de los vertebrados**

Si bien el sistema nervioso de una especie tiene características típicas de la misma que lo distinguen del de otra especie, existen en todas ellas algunos aspectos comunes. En cualquier caso este es el principal blanco de acción de los plaguicidas de segunda generación como organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides.

De las células que lo componen, las neuronas son la más importantes funcionalmente. Esta tiene un cuerpo y uno o varios filamentos, muy ramificados que se extienden, a veces a grandes distancias del cuerpo de la célula, a través de los que se reciben o envían señales. Si bien pueden no existir, generalmente la mayor parte de estas fibras son dendritas, que se especializan en reconocer e integrar señales provenientes de otras neuronas y conducir las hacia el cuerpo de la célula. Uno de ellos, siempre presente, es el axón, que conduce las señales desde el cuerpo hacia su extremo, el cual se especializa en producir y excretar el neurotransmisor que lleva la señal a otra neurona o a otro tipo de célula como una muscular o endócrina.

En la membrana citoplasmática se encuentran poros de naturaleza proteica específicos para sodio y para potasio y una sodio – potasio ATPasa que bombea sodio hacia afuera y potasio hacia adentro del citoplasma consumiendo ATP. Estequiométricamente, se bombean tres átomos de sodio cada dos de potasio, lo que genera un campo eléctrico a través de la membrana con su extremo positivo hacia fuera, por lo que se dice que la misma se encuentra polarizada.

La comunicación entre neuronas tiene lugar por una estructura llamada sinápsis que consiste un ensanchamiento de la fibra nerviosa llamado botón sináptico, en la neurona que de la que proviene el impulso nervioso, y otro en la que lo recibe. Estos son conocidos

como botones pre y post sinápticos respectivamente, y el espacio entre ambos como espacio sináptico. En el botón presináptico se encuentran mitocondrias, vesículas conteniendo el neurotransmisor y todo el sistema enzimático necesario para la síntesis del mismo.

La información se transmite por la membrana de la neurona a lo largo de la fibra nerviosa, axones o dendritas, por una serie de sucesos concertados consecutivos: inversión del campo eléctrico transmembrana, apertura de los canales de sodio, apertura de los canales de potasio, reinversión del campo eléctrico transmembrana, cierre de los canales de sodio y, con posterioridad, cierre de los canales de potasio. Este cambio transitorio de la orientación del campo de membrana, se conoce como potencial de acción y avanza por la membrana a una velocidad de entre 3 y 120 m/s. Cuando el potencial de acción llega a la sinapsis, se libera el neurotransmisor al espacio sináptico. En la membrana post sináptica hay receptores a los que se une el neurotransmisor y que, mediante algún mecanismo reinician el potencial de acción en la segunda neurona. La naturaleza del neurotransmisor determina la naturaleza de la sinapsis en particular, como la vía de síntesis del mismo, el tipo de receptor, el mecanismo por el que se reinicia el potencial de acción, y la forma en que se elimina el neurotransmisor del espacio sináptico. La sinapsis colinérgica y la placa neuromuscular, concretamente, usan acetilcolina como neurotransmisor que se sintetiza a partir de acetato y colina y la actividad CHAT y se libera por fusión dependiente de calcio, de las vesículas que la contiene con la membrana citoplasmática. El receptor de membrana es el AChR nicotínico o muscarínico. El primero de estos, muy concentrado en la placa neuromuscular, tiene un canal de sodio, que se abre al unirse la acetilcolina, dejando entrar sodio a la célula y reiniciando así un potencial de acción. Luego se desensitiza y se cierra aun con acetilcolina unida. La acetilcolina es eliminada principalmente por la actividad AChE que se encuentra muy concentrada en el espacio sináptico. Aunque también se ha

descripto captura de acetilcolina por parte de las membranas pre- y post sinápticas, la actividad AChE es el principal recurso para eliminar rápidamente la acetilcolina liberada de forma que su presencia en el espacio sináptico sea fugaz (Figuras 4 y 5). Precisamente la inactivación de dicha enzima conduce a un cuadro grave con todos los síntomas clásicos de la intoxicación colinérgica.

La enzima está codificada por un gen con dos o tres exones estructurales, según la especie, precedidos de dos exones no codificantes y un exón estructural en el extremo 3' que puede presentar una de tres alternativas llamadas R, H y T (Massoulié y col., 1995). La primera obtenida por lectura directa parece no tener relevancia fisiológica. El exón H codifica para la secuencia señal de reconocimiento para la unión de glicofosfatidilinositol, que constituirá su anclaje a la membrana. El exón T codifica para la región C terminal que une la enzima al colágeno o a sub-unidades hidrofóbicas.

Las distintas formas de AChE aisladas son las globulares como monómero, homo dímero u homo tetrámero llamadas G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y G<sub>4</sub> respectivamente, y las asimétricas, unidas a colas de colágeno con 1, 2 o 3 unidades unidas de la forma G<sub>4</sub>, llamadas A<sub>4</sub>, A<sub>8</sub> y A<sub>12</sub>, respectivamente (ver figura 6) (Massoulié y Bon, 1982; Taylor y Brown, 1999).

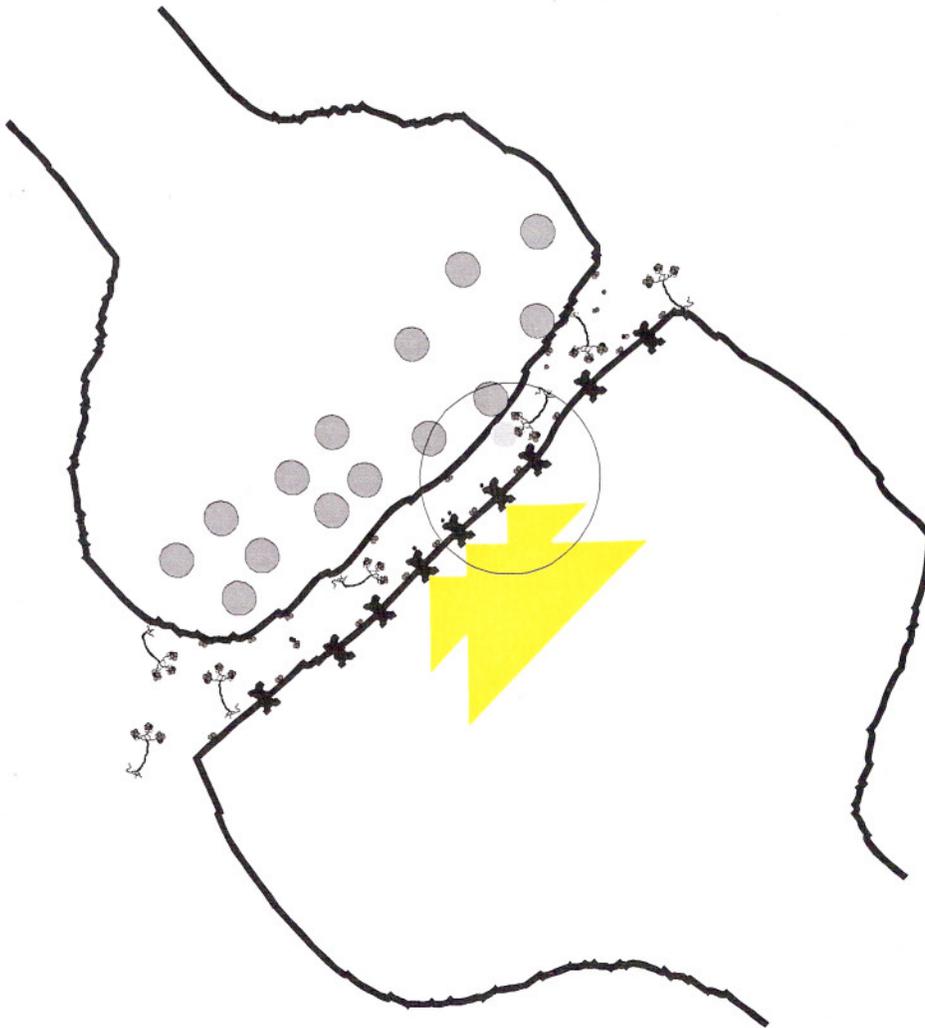
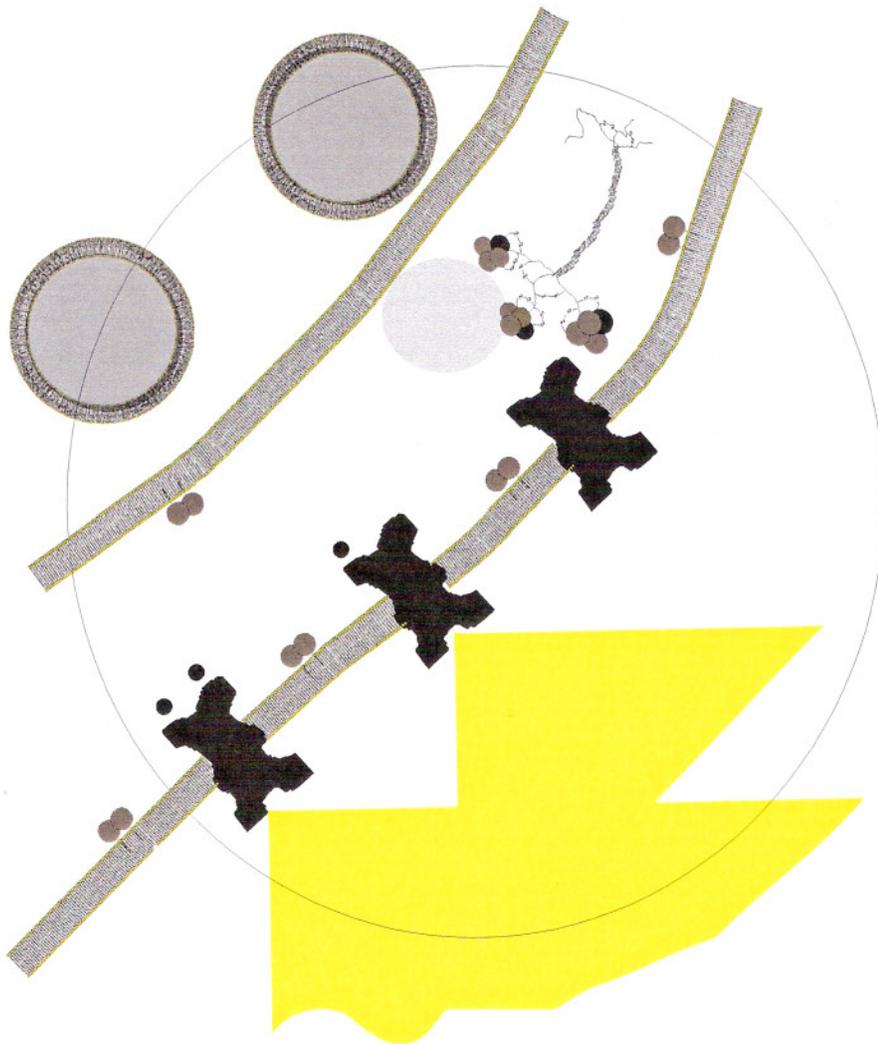


Figura 4: Esquema de una sinápsis colinérgica con distintas forma de la enzima AChE, vesículas de acetilcolina en la célula presináptica, AChRn en la membrana post-sináptica. Los círculos difusos representan masas de ATC difundiendo tras haber sido descargadas en el espacio sináptico. Los puntos sobre los receptores representan ATC unida. El flujo de sodio ingresando a través de los receptores abiertos por acetilcolina se representa en amarillo.



---

Figura 5: Detalles de la figura 4.

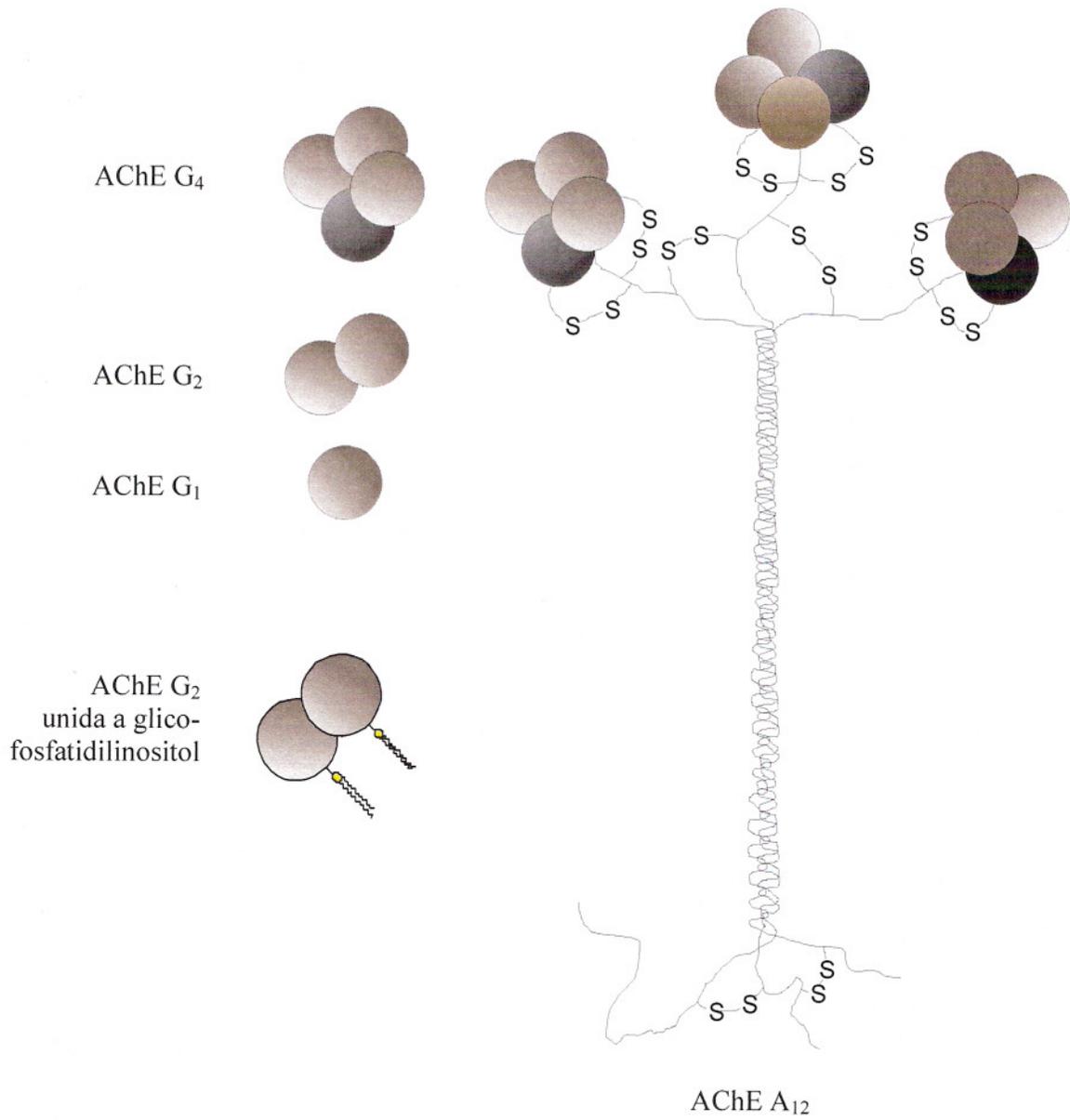


Figura 6: Esquema de la enzima AChE A<sub>12</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> unida a fosfolípidos

### **1.5.2 Efectos tóxicos de organofosforados**

*Intoxicación aguda:* Si bien se describen efectos de algunos organofosforados sobre blancos secundarios como el receptor de GABA (Gant, 1987), los efectos de la intoxicación aguda se deben principalmente a la inactivación de AChE y el consecuente aumento de la concentración de acetilcolina. Sin embargo, la complejidad del sistema nervioso hace que la sintomatología final sea complicada.

La sobre estimulación colinérgica del sistema nervioso produce temblores, convulsiones y parálisis tetánica. Algunos de los síntomas y signos de la intoxicación aguda con organofosforados se describen en la tabla V.

El sistema nervioso autónomo se divide en simpático y para simpático, ambos colinérgicos, que en algunos casos actúan en forma opuesta. Por ejemplo, el simpático aumenta el gasto cardíaco por aumento de la frecuencia y potencia del corazón y el para-simpático lo disminuye. Por esto, la intoxicación aguda puede producir taquicardia o bradicardia según cual de los dos sistemas está más afectado.

A su vez, el exceso de acetilcolina produce reacciones que intentan revertir el efecto de la intoxicación, como mecanismos adaptativos de los receptores, estimulación de la síntesis de AChE y disminución de la síntesis de las enzimas que sintetizan y transportan acetilcolina (Pope, 1999).

También se observa una pérdida de afinidad de los receptores conocida como desensibilización, que es particularmente importante en el receptor colinérgico que provoca un bloqueo de la señal. Además, se ha visto por RT-PCR que, exposiciones a bajas dosis de organofosforados se reprimen actividades relacionadas con la síntesis de acetilcolina como la enzima CHAT, y se sobre expresan las relacionadas con su degradación como AChE

### **1.5.2 Efectos tóxicos de organofosforados**

*Intoxicación aguda:* Si bien se describen efectos de algunos organofosforados sobre blancos secundarios como el receptor de GABA (Gant, 1987), los efectos de la intoxicación aguda se deben principalmente a la inactivación de AChE y el consecuente aumento de la concentración de acetilcolina. Sin embargo, la complejidad del sistema nervioso hace que la sintomatología final sea complicada.

La sobre estimulación colinérgica del sistema nervioso produce temblores, convulsiones y parálisis tetánica. Algunos de los síntomas y signos de la intoxicación aguda con organofosforados se describen en la tabla V.

El sistema nervioso autónomo se divide en simpático y para simpático, ambos colinérgicos, que en algunos casos actúan en forma opuesta. Por ejemplo, el simpático aumenta el gasto cardíaco por aumento de la frecuencia y potencia del corazón y el para-simpático lo disminuye. Por esto, la intoxicación aguda puede producir taquicardia o bradicardia según cual de los dos sistemas está más afectado.

A su vez, el exceso de acetilcolina produce reacciones que intentan revertir el efecto de la intoxicación, como mecanismos adaptativos de los receptores, estimulación de la síntesis de AChE y disminución de la síntesis de las enzimas que sintetizan y transportan acetilcolina (Pope, 1999).

También se observa una pérdida de afinidad de los receptores conocida como desensitización, que es particularmente importante en el receptor colinérgico que provoca un bloqueo de la señal. Además, se ha visto por RT-PCR que, exposiciones a bajas dosis de organofosforados se reprimen actividades relacionadas con la síntesis de acetilcolina como la enzima CHAT, y se sobre expresan las relacionadas con su degradación como AChE

(Kaufer y col., 1998). El orden y los retardos con que se presentan estos fenómenos, condicionan la respuesta de cada organismo a la intoxicación. Como todos estos fenómenos dependen de la especie, del estadio y, a veces, de la historia previa de cada individuo, la respuesta a la intoxicación resulta ser muy compleja y esta asociada a la vía de penetración, la farmacocinética del plaguicida, la reactividad del mismo y a la capacidad del organismo para detoxificar y de compensar los efectos directos e indirectos de la intoxicación.

Tabla V .Síntomas y signos de la intoxicación aguda con organofosforados.

Sistema y receptores involucrados	Sitio	Manifestaciones
AChRm en el sistema parasimpático autónomo  AChRm en fibras nerviosas post ganglionares.	Glándulas exócrinas	Aumento de salivación, lacrimación y perspiración
	Ojos	Miosis, visión borrosa. Derrames.
	Tracto gastrointestinal	Nausea, vómito, rigidez abdominal, inflamación y calambres, diarrea, tenesmo, incontinencia fecal.
AChRn en el sistema autonómico simpático y parasimpático  AChRn en fibras nervias motoras	Tracto respiratorio.	Secreciones bronquiales excesivas, rinorrea, jadeo, edema, broncospasmo, broncoconstricción, tos, bradipnea, dispepsia.
	Sistema cardiovascular	Bradycardia, baja presión.  Frecuencia urinaria e incontinencia.
	Sistema cardiovascular	Taquicardia, anemia, alta presión
AChRn en el cerebro	Músculo esquelético	Facilaciones, calambres, debilidad muscular generalizada en músculos periféricos y respiratorios parálisis, flaccidez o rigides.
		Actividad muscular generalizada, reacción a estímulos acústicos, labilidad emocional, ataxia.
AChRn en el cerebro	Sistema nervioso central	Letargia, fatiga, confusión mental, incapacidad para concentrarse, dolor de cabeza, presión en la cabeza, debilidad generalizada.
		Coma, temblores, convulsiones, depresión de centros respiratorios, cianosis.

Tomado de Ecobichón (1982b)

*Teratogenesis*: Los teratógenos afectan de forma adversa el proceso de diferenciación causando anormalidades estructurales y/o funcionales. El efecto se inicia antes o durante la embriogénesis y generalmente no involucra eventos mutagénicos o carcinogénicos. La anormalidad que se produce es el resultado de una falla ontogénica en el organismo, tal como aberraciones en la mortalidad celular, frecuencia de las mitosis, cambios en el patrón de diferenciación, etc. (Kitos y Suntormat, 1992).

Durante la embriogénesis, antes de la aparición de la placa neural, no hay evidencias de un sistema nervioso. Sin embargo, se ha descrito que durante la etapa de diferenciación celular en embriones de pollo (Layer y col.1987), se expresan algunas de las actividades componentes del sistema colinérgico de transmisión de señales, presumiblemente como parte un mecanismo de comunicación celular, que funcionarían contribuyendo a coordinar los eventos durante esa etapa tan crítica del desarrollo embrionario. Precisamente la exposición a organofosforados durante este período conduce a retraso en el desarrollo y a teratogénesis (Fluck y col., 1980; Fluck, 1982; Venturino y col., 1992; Caballero de Castro, 1999).

Los cambios patológicos producidos por malatión incluyen un retardo en el desarrollo, reducción del tamaño corporal y un aumento generalizado del número de anormalidades (Figura 7). La aparición de estas alteraciones morfológicas y funcionales está correlacionada con una reducción de los niveles de poliaminas (Venturino, 1994). Otros autores han relacionado alteraciones en el metabolismo con algunos compuestos neurotóxicos (Paschen, 1992). Estos conceptos son esenciales para interpretar las alteraciones provocadas durante el desarrollo embrionario por plaguicidas teratógenos (Tabor, 1984; Srivastra, 1992).

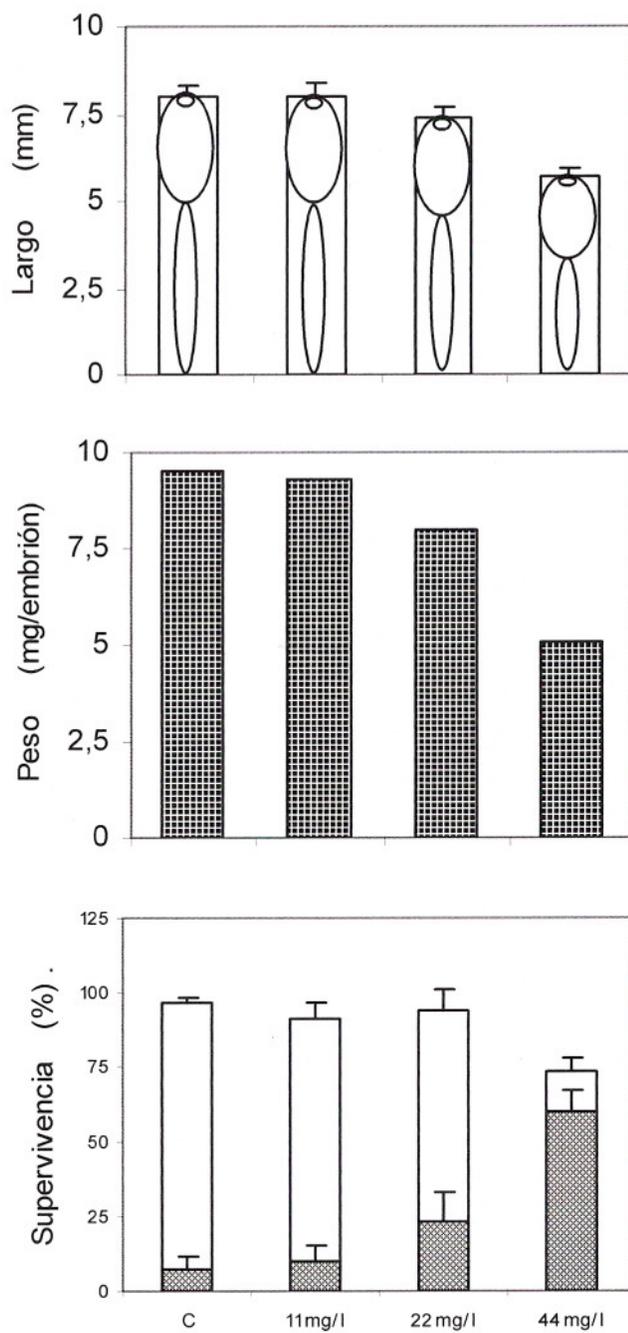


Figura 7: Efecto del malatión en la longitud media, peso húmedo, supervivencia en 48 hs. y proporción de malformados en embriones de *Bufo arenarum* (Tomado de Anguiano y col., 1998).

El agregado exógeno de poliaminas, Spm, Spd y Put, potencian la toxicidad de malatión en larvas de *Bufo arenarum*, Hensel, elevando su mortalidad en 13 veces. En el caso de la Spm se aumenta sinérgicamente también la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Venturino y col., 1992).

En pollos se encontró correlación entre el grado de teratogénesis y el descenso de la concentración de  $\text{NAD}^+$ . Más aún, el efecto teratogénico se evita aportando  $\text{NAD}^+$  exógeno o sus precursores (Kitos y col., 1981; Henderson y Kitos, 1982). Sin embargo, no se observa dicha correlación en larvas de anfibios ya que la inyección de triptofano, precursor del  $\text{NAD}^+$  no revierte el efecto como lo hace en aves (Freeman y Lloyd, 1983; Wenger, 1974).

Los efectos teratogénicos mutagénicos (Ritter, 1997) de organofosforados son muy importantes en la evaluación de sus posibles riesgos dado que estos compuestos se usan en forma masiva para el control de plagas y frecuentemente entran en contacto con personas y animales.

*Neuropatía inducida por organofosforados:* Algunos compuestos organofosforados fosforotiolatos (Thomson, 1992), producen un desorden neurovegetativo conocido como "neurotoxicidad retardada". Se presenta entre 10 días y algunas semanas después de la exposición y se caracteriza por pérdida de sensibilidad y ataxia en extremidades inferiores, por degeneración axónica en nervios sensitivos y motores por demielinización, particularmente en medula espinal y nervio ciático. Se desconoce el mecanismo por el que tiene lugar este proceso, pero se acepta que el mismo se dispara por inactivación de una NTE (Escudero y col., 1997) cuya actividad sería esencial para mantener el control homeostático de la vaina de mielina. Esta enzima es estudiada por su actividad PVasa resistente a

paraoxón y sensible a mipafox. La actividad se encuentra distribuida por el sistema nervioso y presenta una forma ligada a membrana y otra soluble, de la que, se detectaron dos isoenzimas titulando la actividad PVasa con mipafox en presencia de paraoxón 40 mM en tris-ClH (Vilanova, 1990; Escudero y col., 1997).

Además, se han descrito efectos estimulantes de la neuropatía y de otros desórdenes neurodegenerativos producidos por algunos organofosforados que se denomina promoción. El blanco primario no está identificado pero no sería NTE. Sin embargo, sus propiedades serían similares ya que todos los promotores descritos son inactivadores de la misma (Richardson, 1992).

*Síndrome post-traumático:* La intoxicación aguda con organofosforados o carbamatos, a veces es seguida, días después, por un cuadro caracterizado por depresión, irritabilidad y un notable deterioro de las capacidades cognitivas, tiene reminiscencias con el estrés post-traumático que sigue al estrés traumático agudo.

No se ha propuesto ningún mecanismo por el cual la inactivación de AChE y la respuesta al estrés tengan características tan parecidas. Sin embargo, el estrés agudo está acompañado por un aumento transitorio de acetilcolina y de la consecuente hiperexcitabilidad neuronal, al igual que la inactivación de AChE. En ambos casos se han reportado cambios en la expresión de genes relacionados al sistema colinérgico como aumento en el contenido de mensajero de AChE y disminución en el de ChAT, y en el contenido de la vesícula transportadora de acetilcolina (VAcHT) (Kaufer y col., 1998).

*Cancer:* La importancia de la exposición a plaguicidas en la incidencia de cáncer es un tema controvertido. Los estudios hechos en poblaciones supuestamente expuestas, suelen arrojar resultados discutibles. El cáncer de próstata, por ejemplo, tendría una incidencia mayor en fumigadores, que se encuentran muy expuestos, pero no entre los granjeros de la misma región cuya incidencia sería menor (Westhead, 1998). Sin embargo, los hábitos de vida de estos últimos no incluyen algunos reconocidos factores de riesgo habituales, por lo que se esperaría que la incidencia fuese menor que la media poblacional y en la práctica no lo es. Además, debe considerarse que la próstata es sensible a estrógenos y, al menos, los organoclorados aumentan la actividad estrogénica (Leblanc, 1997; Berger, 1998), mientras que los organofosforados presentan resultados controvertidos (Bomser y Casida, 2000).

Se ha establecido claramente el rol del citocromo P-450 en la activación de procarcinógenos. En seres humanos no se ha podido establecer una relación formal entre la expresión del citocromo P-450 y el cancer, si bien se han publicado una serie de evidencias interesantes en su favor (Gonzalez, 1995).

*Letalidad retardada:* Algunos compuestos organofosforados como algunos dialquil fosforo tiolatos o ditiolatos, presentes como contaminantes en la formulación de insecticidas comerciales producen un cuadro patológico que ha sido denominado letalidad retardada (Thomson, 1992). Estos compuestos afectan poco a AChE ya que carecen de grupo saliente. Sin embargo, la salud de animales inyectados con ellos declinó durante pocos días después del tratamiento hasta que finalmente murieron aparentemente por hipoxia debido a complicaciones pulmonares. El mecanismo bioquímico de efecto retardado no ha sido descrito aún.

### 1.5.3 Detoxificación

La mayoría de los plaguicidas son oxidados por actividades enzimática localizadas en el retículo endoplásmico, tanto liso como rugoso, llamadas oxidasas de función mixta o monooxigenasas que incorporan oxígeno a distintos compuestos transfiriéndole electrones desde el NADPH a través del sistema citocromo P-450 - citocromo P-450 reductasa. Estas son capaces de promover una gran variedad de procesos como remoción de grupos alquilo o arilo, o reemplazo de azufre por oxígeno (Ecobichon, 1992b).

Las dealquilaciones que tienen lugar por esta vía son, principalmente, la remoción de grupos metilo, produciendo un aldehído y el mono alquil derivado del compuesto original, que, por lo general, es un compuesto menos anticolinesterásico (Ecobichon, 1992b).

Dearilaciones se han observado en compuestos como paratión, metil paratión, fenitotrión, diazinon y otros.

Algunas reacciones promovidas por este sistema resultan ser activantes. Por ejemplo, los organofosforados tioatos, de tipo P=S, no tienen actividad anticolinesterasa, pero son transformados, por oxidación por las MFO, en fosfatos, de tipo P=O que son inactivadores potentes de esterasas dependientes de serina. Precisamente, en esta propiedad se basa la selectividad de plaguicidas como malatión y paratión, ya que las MFO son más activas en insectos que en animales homeotermos (Ecobichon, 1992b) y poiquilotermos (Venturino y col., 2001b).

Otra reacción activante es la oxidación de tioesteres, primero a sulfóxido, y luego a sulfona, catalizado por el mismo sistema. La reactividad de estos compuestos aumenta con el grado de oxidación, pero la última oxidación es muy lenta por lo que el metabolito

predominante y probablemente el causante de la mayor parte de la inactivación de esterasas es el sulfóxido (Ecobichon, 1992b).

También se han descrito de-arilaciones, de-alquilaciones, deaminaciones y hasta hidroxilaciones del anillo aromático, de grupos alquilo y del nitrógeno en compuestos nitrogenados (Ecobichon, 1992b).

*Esterasas:* La hidrólisis catalizada lleva a la formación de productos más hidrosolubles y por lo tanto más fáciles de eliminar por orina. Las actividades esterasas se caracterizan por ser relativamente menos específicas que otras enzimas y por presentarse en gran número y con un importante solapamiento en cuanto a su especificidad de sustrato y sensibilidad a inhibidores. En algunos casos sus genes se encuentran en locus muy cercanos, constituyendo un “claster”, y son inducidas en distinta magnitud por los mismos inductores, sin que estén claras las razones para la existencia de tanta redundancia de actividades similares, aunque diferentes en sus características cinéticas y en la regulación de su expresión.

Estas enzimas han sido clasificadas de varias maneras. Una de ellas, la propuesta por Holmes y col. (1967), tiene en cuenta su comportamiento frente a compuestos anticolinestérsicos, y las clasifica en las que son inactivadas, las que los hidrolizan y las que no reaccionan en absoluto con los mismos como A, B y C respectivamente, de acuerdo a su especificidad de sustrato y a su sensibilidad a inhibidores.

En seres humanos hay una importante actividad PON1 asociada a las HDL. Se la ha descrito como la responsable de procesar los peróxidos lipídicos de las LDL (Mackness, 1998). Se ha propuesto que el rol fisiológico normal de PON1 es el de impedir la peroxidación en las LDL y, tal vez, en membranas nerviosas, las que están relacionadas con

aterosclerosis y neuropatías, ya que está disminuida en enfermedad coronaria (Mackness y col., 1998) y en diabetes tipo I y II especialmente cuando se presenta neuropatía periférica (Mackness y col., 1998).

La enzima presenta un polimorfismo en la posición 192 (forma B Arg, forma A Glu), y otro en posición 55 (forma L Leu, forma M Met), dentro de alelos en un único locus autosómico. Este polimorfismo, también puede explicar, en parte, porque solo algunos veteranos de la guerra del golfo desarrollaron el “síndrome de la guerra del golfo”, en el que hay organofosforados involucrados, a pesar de haber sufrido todos la misma exposición (Mac Kness y col., 1998).

*Carboxiesterasas como blancos secundarios:* El consumo de organofosforados y carbamatos por la inactivación de carboxiesterasas, cuya actividad no es crítica para la vida en un corto lapso de tiempo, es una buena forma de brindar protección contra estas intoxicaciones y es un mecanismo de tolerancia importante en mamíferos y peces. El Tri-o-cresilfosfato, inactivador de carboxiesterasas, aumenta la potencia de la intoxicación por organofosforados como sarin y tabún 19 veces en ratas y 15 veces en ratones y en menor medida para VX (Gupta y Dettbarn, 1993).

En ratas, las carboxiesterasas actúan como blancos secundarios tanto para DFP como para soman en intoxicaciones agudas y en crónicas (Gupta y Dettbarn, 1993). Entre los carbamatos, algunos no afectan la carboxiesterasas de plasma y otros las carbamilan (Gupta y Dettbarn, 1993).

*Glutación S transferasas:* En muchas especies la vía principal de detoxificación de los triesteres organofosforados es la dealquilación o dearilación por transferencia de un grupo al-

quilo, o arilo, respectivamente, hacia el grupo sulfhidrilo del glutatión reducido. Estas actividades, llamadas GSH-S-T, son solubles y se presentan en varios tejidos en forma de isoenzimas, entre ellos en el sobrenadante de embriones de *Bufo arenarum* (Venturino, 1994).

Un grupo emparentado son las ariltransferasas. Se ha informado la presencia de S-p-nitrofenil glutatión a partir de paratión, sobrenadante postmitocondrial y glutatión. Estas enzimas son distintas a las GSH-S-T pero, también son específicas de glutatión.

## **1.6 MODELOS QUE EXPLICAN LA CINÉTICA DE AChE**

Se han propuesto varios modelos para explicar la cinética de AChE, el más aceptado es el de Wilson y Cabib (1965). De acuerdo al mismo el sitio activo tiene dos subsitios, uno aniónico que alojaría al extremo positivo de la molécula del sustrato, y otro catalítico donde se ubica la función ester y donde es hidrolizada.

La catálisis, en el marco de este modelo, ocurre en dos etapas. La primera consiste en un desplazamiento nucleofílico del alcohol sobre el carbono carboxílico por una serina cuya nucleofilicidad se encuentra exacerbada por la basicidad de un anillo imidazólico de una histidina, aumentada por la carga negativa de un resto de ácido glutámico próximo a la misma (Dodson y Wlodawer, 1998). La segunda etapa es la hidrólisis del acetil-enzima formado en la primera. Este tipo de arreglo en tríada de una serina o treonina, una base generalmente histidina y un ácido normalmente aspártico, glutámico para todas las AChE,

se encuentra en todas las hidrolasas serina dependientes tales como proteasas, lipasas y carboxiesterasas (Dodson y Wlodawer, 1998).

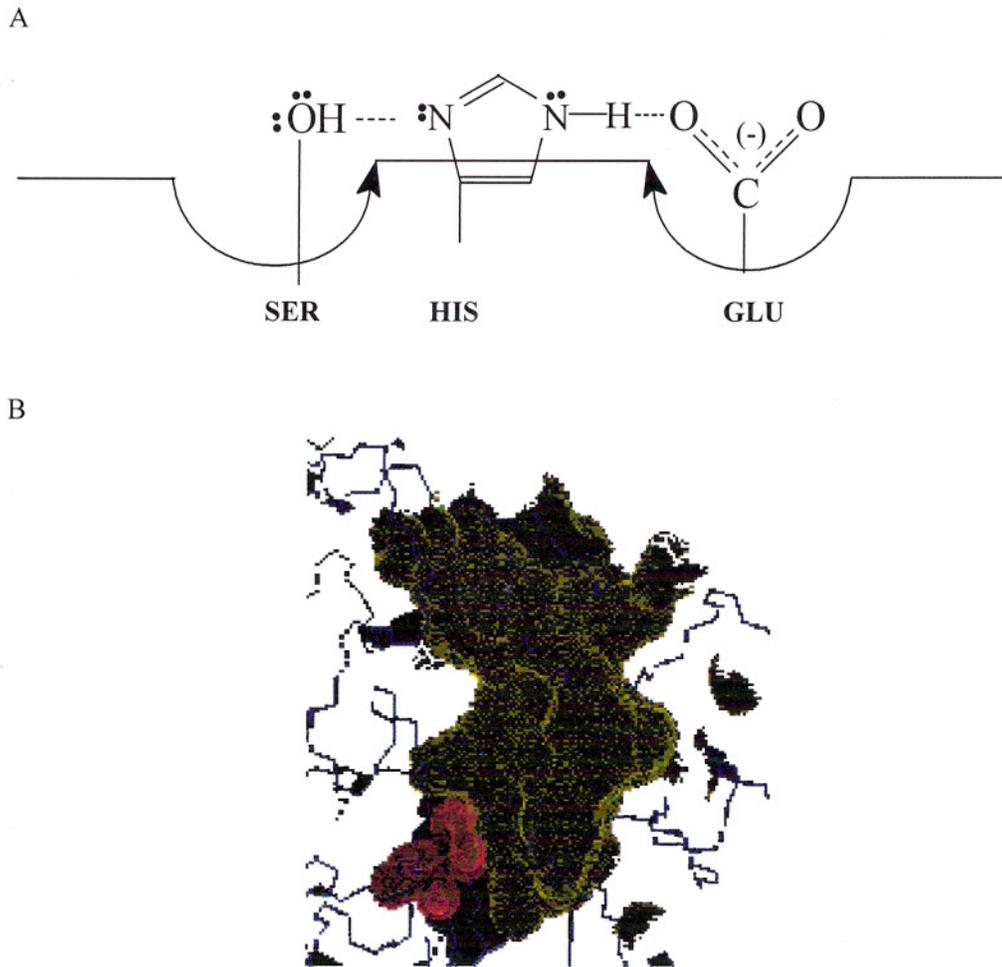


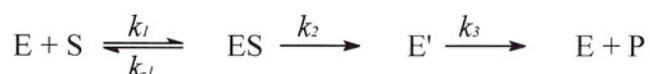
Figura 8: A) Esquema de la estructura de la tríada catalítica en el sitio activo de acetilcolinesterasa. B) Esquema de la grieta característica de la AChE. En color oscuro se representa el espacio libre del interior de la grieta, y el puntillado verde a las paredes de la misma. En rojo, cerca del fondo, se destacan los restos de aminoácidos de la tríada catalítica (Wlodek y McCammon, 2002).

El apoyo empírico más directo en favor de este modelo es la prueba directa de acetilación de la enzima por reacción con sustrato marcado en el acetilo con [<sup>14</sup>C] (Froede y Wilson, 1970).

Sobre la base de este modelo, se ha propuesto que la inhibición por sustrato es la consecuencia de un arreglo complicado de dos moléculas del mismo unidas, cada una de ellas, a uno de los subsitios, de forma tal que impediría la hidrólisis del acetil-enzima intermedio por efecto estérico debido a que la segunda molécula de sustrato, unida al sub-sitio aniónico interferiría el ingreso de la molécula de agua (Wilson y Cabibb, 1965). De esta forma, la inhibición por sustrato tendría lugar en la segunda etapa de la reacción. Esta hipótesis, sin embargo, ha sido rebatida por marcación por afinidad, estudios cinéticos y al establecerse la estructura tridimensional de la enzima por cristalografía de rayos X, que claramente muestra que el sitio inhibitorio para el sustrato se encuentra alejado del sitio activo (Niday y col., 1980; Sussman y col., 1991). En la figura 8 se presenta un esquema de la estructura del sitio catalítico de la AChE donde se destaca, la tríada catalítica y la posición que la misma ocupa, cercana al fondo de la grieta de 2 nm de profundidad, característica de estas enzimas.

#### DESARROLLO DEL MODELO DE INACTIVACIÓN DE KITZ Y WILSON

El modelo propuesto inicialmente es el siguiente



En principio, cuando se alcance el estado estacionario, la velocidad de reacción será la misma para cada una de las etapas.

$$\frac{\partial[P]}{\partial t} = k_3[E'] \quad (1)$$

De acuerdo a las premisas del estado estacionario

$$\frac{\partial[E']}{\partial t} \approx 0$$

Entonces

$$k_2[ES] = k_3[E'] \Rightarrow \frac{k_2[ES]}{k_3} = [E'] \quad (2)$$

Como el primer paso del proceso es la unión del sustrato y se lo supone en estado estacionario

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \Rightarrow [ES] = \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)} [E][S] = \frac{[E][S]}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}} \quad (3)$$

Sustituyendo las ecuaciones 2 y 3 en la 1

$$\frac{\partial[P]}{\partial t} = \frac{k_2}{k_1} \frac{[E][S]}{(k_{-1} + k_2)} \quad (4)$$

A partir del balance de masa de la enzima se puede despejar la concentración de enzima libre

$$[E_T] = [E] + [ES] + [E'] \Rightarrow \frac{[E_T]}{1 + \frac{[S]}{k_1} + \frac{k_2[S]}{k_3(k_{-1} + k_2)}} = [E] \quad (5)$$

Finalmente, sustituyendo la ecuación 5 en la 4 se obtiene la expresión final de velocidad en función de [S].

$$\frac{\partial [P]}{\partial t} = \frac{k_3 k_2 [E_T] [S]}{k_3 \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} + (k_3 + k_2) [S]} \Rightarrow \frac{\partial [P]}{\partial t} = \frac{\frac{k_3 k_2}{(k_3 + k_2)} [E_T] [S]}{\frac{k_3 (k_{-1} + k_2)}{k_1 (k_3 + k_2)} + [S]} \quad (6)$$

Wilson define  $k_{cat}$  como la constante de catálisis aparente en el marco del modelo.

$$k_{cat} = \frac{k_3 k_2}{k_2 + k_3}$$

La velocidad de reacción catalizada por AChE es entonces una hipérbola equilátera donde la velocidad máxima es  $k_{cat} \times [E_T]$  y  $K_m$  es  $k_3(k_{-1} + k_2)/(k_1(k_2 + k_3))$ .

Este modelo cinético asume que no existe inhibición por sustrato y propone trabajar solo a baja concentración de sustrato para evitar desviaciones por este motivo. Wilson

introduce arbitrariamente lo que llama “pequeñas correcciones” de hasta 2,5% al trabajar a una [S] de 1 mM (Wilson y col., 1982).

Sobre la base de este modelo se estimaron valores de  $k_2$  y  $k_3$  de  $4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  aproximadamente. De esta forma, ambas etapas catalíticas serían igualmente limitantes, y el valor efectivo de  $k_{cat}$  es de  $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ . Por otra parte, se estima que el arribo del sustrato al sitio catalítico de una enzima esta entre  $10^8$  y  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Teniendo en cuenta que  $K_S$  se estima en  $7 \times 10^{-5} \text{ M}$ , la constante de segundo orden es  $2.9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . La enzima, entonces, trabajaría limitada por la difusión de acetilcolina, siendo considerada como una de las enzimas perfectas.

*Inactivadores como sustratos alternativos:* La reacción con carbamatos u organofosforados sigue el mismo mecanismo que el sustrato natural, pero la hidrólisis del complejo intermediario carbamil-enzima, o del fosforil-enzima, procede a velocidades muy bajas en el primer caso e insignificantes en el segundo. En ambos casos, la enzima queda arrestada en la etapa intermedia. Kitz y Wilson fueron los primeros en proponer que estos reactivos de serinas debían unirse en dos etapas, una reversible y otra, más lenta, irreversible con formación del enlace covalente fosforil-enzima o carbamiloil-enzima según el compuesto atacante (Kitz y Wilson, 1962). En la tabla VI, se indican algunas constantes de velocidad de reacción medidas para ambas etapas del proceso.

En el caso de los fosforados la reactivación espontánea es más rápida cuanto más chicos sean los grupos representados como  $A_2$  y  $A_3$  en la figura 2 (Wilson y col., 1992). Se informan tiempos de vida media para la reactivación entre 1 y 2 horas según la fuente de la

enzima utilizada y el organofosforado, como malatión, por ejemplo, que varía entre 0,85 y 2,3 hs., con ejemplos extremos de 100, 200 y hasta 700 horas como se describe para el paraoxón y no se detecta para DFP (Wilson, 1992).

Además, la enzima fosforilada puede sufrir un proceso de “envejecimiento” que lleve a un complejo estable no hidrolizable. Este es un proceso de tipo SN1 y como tal es tanto más rápido cuanto más ramificado son los mismos grupos (Jokanovic, 1998). Por ejemplo, AChE inactivada por maloxón se recupera con un tiempo de vida media de alrededor de una hora, mientras que la inactivada por DFP no presenta recuperación detectable, pero envejece con un tiempo de vida media de 4 horas aproximadamente, más rápidamente que la inactivada por malaoxón cuyo tiempo de vida media esta entre 4 y 9 horas dependiendo de la fuente de la enzima (Wilson y col., 1992).

Tabla VI: Valores de  $K_i$  y  $k_i$  publicados por Wang y Murphy para AChE de suspensiones de membranas preparadas por sedimentación a 100000 x g durante 60 min. a partir de cerebro de las especies indicadas.

	DFP		Paraoxón		MParaoxón		Gutoxón		Mgutoxón	
	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_i$ ( $\text{min}^{-1}$ )								
Mono	272	8,99	11	13,42	27	11,79	86	16,92	11	14,02
Rata	568	8,69	22	32,17	39	38,29	31	56,79	20,5	72,90
Guinea Pig	1354	4,04	199	21,32	460	23,83	41	11,76	27	13,71
Pollo	1006	24,08	6,36	25,26	25	37,86	89	8,32	58	24,13
Catfih	976	5,74	203	22,18	242	14,47	53	59,66	61	40,06
Rana	1374	0,86	91	3,62	177	2,45	121	2,69	109	4,48

Adaptado de Wang y Murphy (1982b).

El modelo cinético correspondiente es el mismo que para el sustrato donde este último es sustituido por el inactivador, si bien un modelo más completo debe incluir la reactivación por un nucleófilo distinto al agua y la reacción de envejecimiento. La figura 9 muestra un modelo como el descrito, donde  $K_i$  es la constante de inestabilidad del complejo no

covalente,  $k_i$  es la constante específica de velocidad de reacción irreversible de la segunda etapa de inactivación,  $k_r$  es la constante de reactivación espontánea por hidrólisis,  $k_e$  es la constante de envejecimiento y  $k_r'$  es la constante de la reacción de reactivación por un nucleófilo representado por "N:", como por ejemplo una oxima.

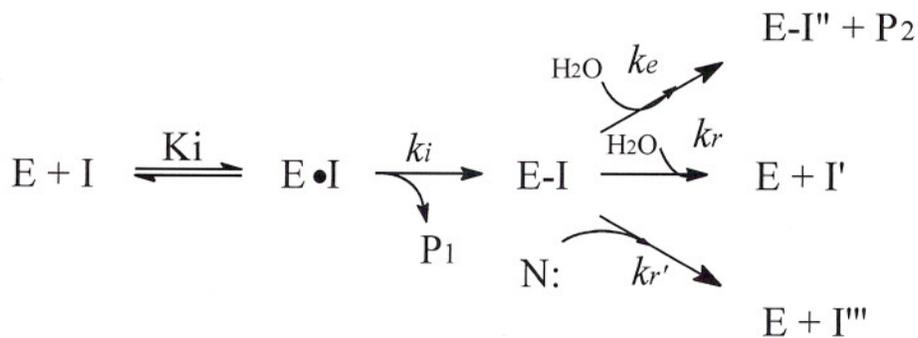


Figura 9: Ecuación química de las reacciones más relevantes entre una esterasa y un compuesto inactivador como un organofosforado o un carbamato.

La medida de actividad enzimática remanente se efectúa diluyendo la muestra en la cubeta de medida entre 20 y 300 veces según el protocolo utilizado, en presencia de un sustrato a concentración saturante, que es un inhibidor competitivo de la unión del inactivador, por lo que el complejo no covalente  $\text{E} \bullet \text{I}$  se disocia de manera que la enzima que forma parte de este complejo se suma, en la cubeta de medida a la forma libre y por lo tanto la medida de actividad incluye a E y a  $\text{E} \bullet \text{I}$ .

Como se desprende de lo anterior, los organofosforados inactivan AChE por ataque nucleofílico de un grupo hidroxilo de un resto de serina de la proteína sobre el átomo de fósforo de muy baja densidad electrónica, formándose un complejo OP-AChE y liberándose el denominado “grupo saliente” unido inicialmente al fósforo (Eto, 1974). Muchos factores tales como la carga, la quiralidad, el efecto estérico, y otros, determinan el potencial inhibitorio de la molécula y su estabilidad química. Cualquiera sea la especie o tejido que se use como fuente de colinesterasa, la inhibición de la enzima es cualitativamente, aunque no cuantitativamente, la misma (Wallace y Herberg, 1988; Environmental Health Criteria, 1986).

En vista de la estructura del sustrato y de muchos de sus inhibidores competitivos se ha propuesto que el sitio activo tendría dos subsitios, uno esteárico, catalítico, y otro aniónico, que contribuiría a estabilizar el complejo enzima sustrato o enzima inhibidor.

La velocidad de reactivación es muy lenta comparada con la de inactivación, de hecho para organofosforados es despreciable, así que puede seguirse la reacción de la enzima con un inactivador por desaparición de la actividad a lo largo del tiempo, a partir del momento en que ambos entran en contacto.

$$\frac{\partial [Et]}{\partial t} = -k_i [E \cdot I] + k_r [E - I] + k_r [N][E - I]$$

Como ya se dijo, el valor de la velocidad de reactivación es despreciable ( $k_r \approx 0$ ) y no hay nucleófilo alternativo, es decir  $[N] = 0$ , entonces la ecuación anterior se reduce a

$$\frac{\partial [Et]}{\partial t} = -k_i [E \cdot I] \quad (7)$$

Como no es posible conocer la concentración de complejo reversible  $E \cdot I$ , es necesario expresar la ecuación 7 en función de la concentración de enzima susceptible de ser estimada, o sea  $E + E \cdot I$ , y de la concentración de inactivador, a la que se la considera mucho mayor que la concentración de enzima de forma que prácticamente no se consume durante la reacción de unión y por lo tanto su valor no se altere por este motivo a lo largo del proceso. Además, se asume que la primer etapa de unión reversible tiene lugar rápidamente y por lo tanto en equilibrio termodinámico.

$$K_i = \frac{[E][I]}{[E \cdot I]} \quad \Rightarrow \quad [E \cdot I] = \frac{[E][I]}{K_i} \quad (8)$$

Llamando  $Et$  a la enzima susceptible de ser medida,  $E + E \cdot I$

$$[Et] = [E] + [E \cdot I] \quad \Rightarrow \quad [E] = \frac{[Et]}{1 + \frac{[I]}{K}} \quad (9)$$

Sustituyendo la ecuaciones 8 y 9 en al 7 y re-ordenando se obtiene

$$\frac{\partial[Et]}{\partial t} = -\frac{k_i[Et][I]}{K_i + [I]} \quad (10)$$

Resolviendo la ecuación diferencial 10

$$\ln\left(\frac{E}{E_0}\right) = -\frac{k_i[I]}{K_i + [I]}t \quad (11)$$

Como  $[Et] \ll [I]$ , la concentración de inactivador es casi invariable durante la reacción. Entonces:

$$\ln\left(\frac{E}{E_0}\right) = -k_{obs}t \quad \text{donde} \quad k_{obs} = \frac{k_i[I]}{K_i + [I]} \quad (12)$$

La representación de  $\ln(E/E_0)$  en función del tiempo debe ser una recta descendente que pasa por cero cuya pendiente es la constante específica de velocidad de inactivación observada, la que es una función hiperbólica de la concentración de inactivador. De esta forma  $k_{obs}$  puede parecer proporcional a  $[I]$  a baja concentración del mismo, pero tiene un máximo teórico al que tiende asintóticamente igual a  $k_i$ .

## 1.7 OBJETIVO

Los embriones de anfibios se encuentran expuestos a toda clase de contaminantes desde las primeras etapas de sus vidas y muchas de sus especies se encuentran en declinación en muchas partes del mundo (Barinaga, 1990; Wake, 1991; Houlahan y col., 2000; Sparling, 2001). Debido a su particular respuesta a muchos tóxicos han sido frecuentemente usados como especies centinela o bioindicadores (Greenhouse, 1976; Cooke, 1977; Dumpert y Zeitz, 1984). Por esto resulta especialmente interesante estudiar los efectos de plaguicidas sobre el desarrollo embrionario de estos anfibios ya que su época de reproducción coincide con la de mayor aplicación de insecticidas en primavera y verano. Se ha demostrado también que las larvas de varias especies de anfibios pueden concentrar plaguicidas presentes en su medio ambiente (Hall y Kolbe, 1980; Gauna y col., 1991; Rovedatti y col., 1998).

El objetivo de esta tesis es:

- 1 Establecer los mecanismos básicos por los cuales el malatión afecta el patrón de desarrollo de *Bufo arenarum*, Hensel.
- 2 Caracterizar los factores que influyen en la inactivación de la AChE, blanco primario de la acción del malatión.
- 3 Desarrollar modelos teóricos que permitan explicar la cinética de inactivación de AChE por malatión y su modulación por poliaminas.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIALES

El yoduro de acetil-tiocolina, el yoduro de butiril-tiocolina, DTNB, el DFP y la acetilcolinesterasa (E.C. 3.1.1.7) tanto de eritrocito bovino como de órgano eléctrico de anguila fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Malatión de grado técnico, 94 %, fue aportado por Cyanamid Argentina y se purificó por cromatografía en capa fina en sílica HF<sub>254</sub> tipo 60 de MERCK de 1 mm de espesor, activada a 120 °C durante una hora, usando benceno-acetato de etilo (95:5) como fase móvil, a partir de un estándar al 94% de pureza. La mancha principal, revelada por una breve exposición a vapores de yodo, fue eluída con cloroformo bajo corriente de nitrógeno. La solución resultante fue evaporada exhaustivamente y el malatión obtenido se guardó bajo atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su utilización. La pureza del malatión así obtenido fue verificada por cromatografía gaseosa no observándose más picos que el del tiempo de retención correspondiente al estándar de malatión.

Todos los solventes utilizados son de calidad pro-análisis.

Los sapos *Bufo arenarum*, Hensel fueron capturados en la provincia de Buenos Aires y mantenidos durante el invierno a la intemperie en un medio adecuado.

La ovulación fue inducida inyectando a la hembra aclimatada entre 20 y 24 horas, con un homogenato de hipófisis homologa suspendida en solución Ringer diluida 1:10 sin bicarbonato (ClNa 111 mM, ClK 1,3 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 2,7 mM) (Pisanó y Renguel 1982). La ovulación se produce entre 15 y 24 horas después de inyectadas y los ovocitos fueron removidos mediante pinzas del oviducto y depositados en una caja de Petri.

La fertilización se efectuó *in vitro* mediante el agregado de una suspensión de testículo macerado en solución Ringer (Pisanó y Renguel, 1982). Después de 60 min. se enjuagó con solución Ringer y se separaron en tiras de ganga conteniendo entre 50 y 100 embriones cada una, que se transfirieron a bandejas con solución Ringer de no más de 4 cm de profundidad hasta su utilización, o al medio correspondiente al tratamiento adecuado a cada experimento.

Los restos de ganga fueron retirados cuando los embriones podían ser desprendidos de la misma, y a partir de entonces el medio se renovó cada dos días y fueron retirados los individuos muertos o deformados. Cuando estuvieron en condiciones de ingerir alimentos, se les aportó lechuga hervida diariamente.

Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente.

El malatión fue agregado en solución acetónica en una concentración final inferior al 2,5 % v/v en acetona. Los controles tuvieron en todos los casos el mismo tratamiento.

## **2.2 MÉTODOS**

Todas las determinaciones espectrofotométricas se efectuaron en un espectrofotómetro de doble haz Shimatzu UV-240 con un ancho de ventana de 2 nm.

### **2.2.1 Homogenización**

Los homogenatos se efectuaron en un homogenizador Potter, en una proporción de 7 a 15 larvas o embriones por cada mililitro de solución SET (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, Tris-ClH 50 mM, pH 7,4) o en solución de fosfato de sodio 100 mM pH 7,4, y, de ser necesario, fueron congelados a -20°C hasta su fraccionamiento, el que se efectuó a 10 000 x g, 20 min.

### **2.2.2 Actividades enzimáticas**

*Determinación de colinesterasas:* La acetilcolinesterasa se midió por el método de Ellman y col. (1961). Excepto en los casos que se indican especialmente la reacción se llevó a cabo en solución reguladora de pH fosfato 100 mM a pH 8, con acetiltiocolina 1,5 mM y ditiobis nitrobenzoato 10 mM como reactivo de color y leyendo la variación de absorbancia a 412 nm. Se registró la variación de absorbancia en ausencia de la enzima para medir la deriva provocada por la hidrólisis química del sustrato en las condiciones de

trabajo y se agregó la solución que contiene la actividad enzimática, en un volumen mínimo para evitar que se produzca una dilución significativa del sistema. El número total de sitios activos fue calculado a partir de la velocidad máxima aparente y el valor reportado de *k<sub>cat</sub>* (Yamamura, 1974).

Al estimar parámetros cinéticos se requiere la máxima precisión posible. Para mejorar la calidad de las determinaciones, se coronó la cubeta de medida con un sello plástico para evitar derrames con todo el contenido necesario para establecer la línea de base, y después de medida ésta, se inyectó a través del sello unos 10 µl de la solución de la enzima con toda la actividad necesaria para efectuar la medida con una jeringa jamilton mezclándose inmediatamente por inversión antes de medir la variación de absorbancia resultante.

*Determinación de aliesterasa:* La actividad aliesterasa se determinó midiendo la velocidad de hidrólisis del p-nitrofenilbutirato. El medio de medida fue fosfato monoácido de sodio 20 mM, pH 7,4, acetona 5%. El sustrato fue preparado en solución acetónica 0,1 mM y agregado al medio en el momento de medir en una proporción de 1:100.

Se compararon el espectro diferencial del medio de reacción con el espectro del p-nitrofenol en el mismo medio, que resultaron ser iguales (figuras 10 y 11).

La hidrólisis espontánea se midió antes de agregar el homogenado para corregir la lectura de la actividad. Las lecturas se efectuaron a 400 nm y se determinó un coeficiente de extinción molar de 18,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. La longitud de onda óptima y el coeficiente de extinción fueron estimados a partir de los espectros mostrados en las figuras 10 y 11.

En las condiciones establecidas la actividad del extracto de embriones demostró ser de 4 UI/mg de proteína con un Km de 250  $\mu$ M. La concentración de sustrato elegida corresponde a un 80% de saturación y no puede ser aumentada dada la baja solubilidad del mismo. De hecho la presencia de acetona en el medio es necesaria para permitir que el sustrato llegue a la mencionada concentración.

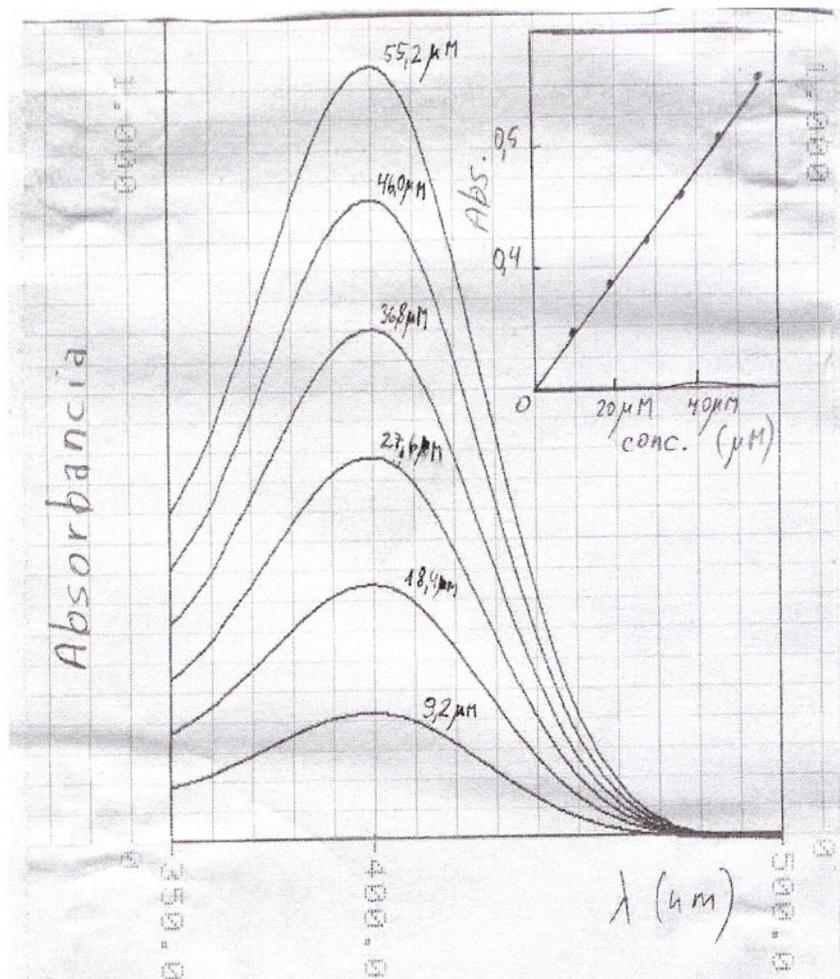


Figura 10: Espectro de absorbancia de p-nitrofenol en el medio de medida de actividad ali-esterasa. En el inserto, se graficó la absorbancia en función de la concentración a 400 nm con datos tomados del gráfico principal.

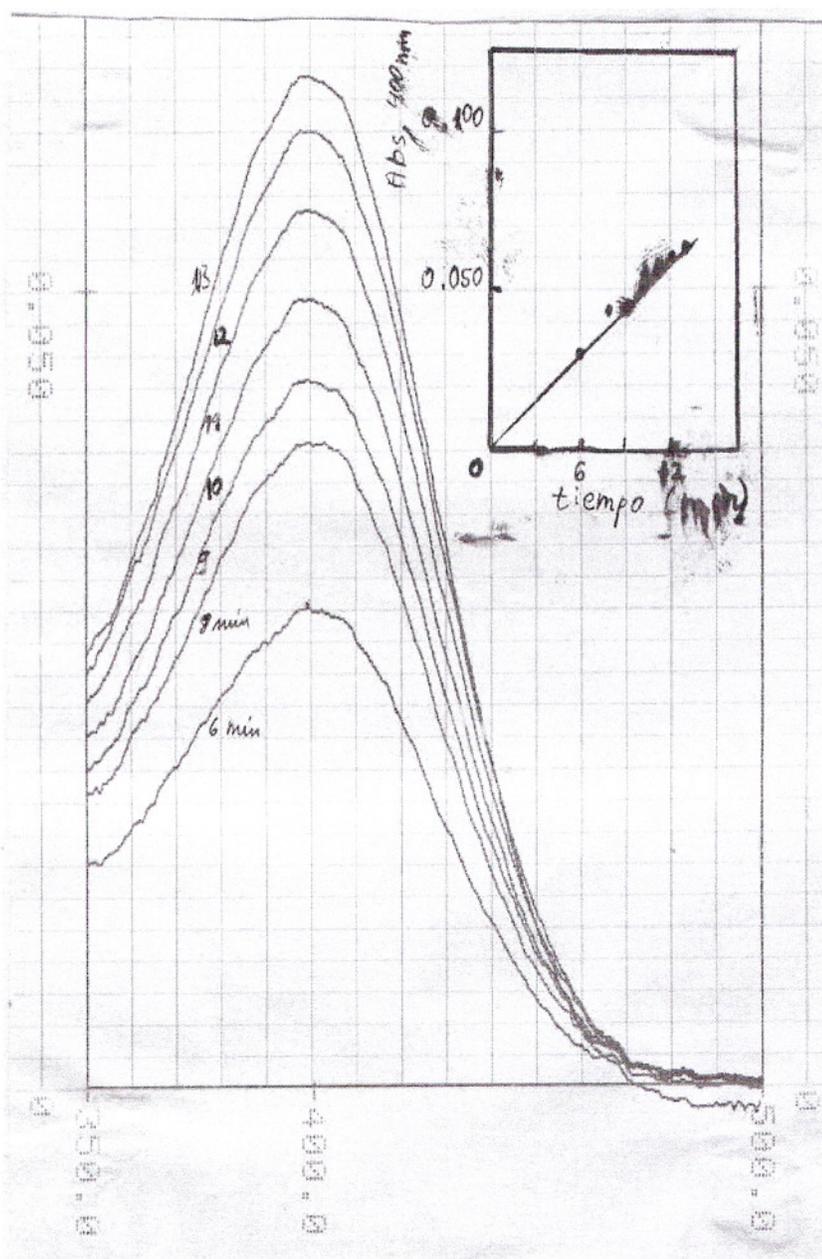


Figura 11: Espectro de absorbancia diferencial del medio de medida de actividad ali-esterasa. Se tomó como base el espectro del medio al agregar el homogenato, y se barrió a los tiempos indicados. En el inserto, se graficó la absorbancia en función del tiempo a 400 nm con datos tomados del gráfico principal.

### **2.2.3 Receptor muscarínico de acetilcolina**

Larvas de 20 días de desarrollo, crecidas en solución Ringer con malatión 4,4 ppm y acetona 0,4%, y sus correspondientes controles fueron lavadas con solución de trabajo (Tris-ClH 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,9%), a la que se agregaron EDTA 1 mM, PMSF 5 mM y NEM 5 mM para reducir la actividad proteolítica. Luego fueron decapitadas y, las cabezas, sumergidas en nitrógeno líquido. Luego de descongeladas fueron homogenizadas en el mismo medio y fraccionadas a 1000 x g durante 10 min. para separar los pigmentos, y al sobrenadante a 20000 x g 20 min.. El sedimento así obtenido se resuspendió en la solución de medida (Tris-ClH 20 mM, pH 7,4, NaCl 83 mM), conteniendo cuando se indica los inhibidores de proteasas citados para la solución de homogenización.

La unión de [<sup>3</sup>H]QNB se determinó por el método descrito por Yamamura y Snyder (1974a) incubando una cantidad de homogenado o de fracción de membranas conteniendo entre 200 y 300 µg de proteínas con el radionucleído (34,7 µCi/nmol) a 37 °C durante 30 min. en solución de medida. La reacción de unión fue detenida centrifugando a 20000 x g 20 min.. El sedimento fue lavado dos veces con solución de medida y luego resuspendido en líquido de centelleo compuesto por omni fluor 4%, tritón X-100 30% en tolueno, mediante sonido de alta frecuencia. La unión inespecífica se midió en presencia de atropina 1µM. Las medidas se efectuaron en un contador de centelleo Beckman.

#### **2.2.4 Captación de paratión [<sup>14</sup>C]**

Diez embriones en respuesta muscular, fueron incubados en 13 ml de medio Ringer sin bicarbonato, con acetona 2,8% v/v y [<sup>14</sup>C] paratión 2 mg/l. A los tiempos indicados se separaron los animales del medio y se los lavó 5 veces con 0,5 ml de solución Ringer, juntándose las aguas de lavado con el medio de incubación. Luego se homogenizaron los embriones en 1 ml de hexano, y se lavó el sedimento con 1 ml de hexano 3 veces. Se juntaron las alícuotas de lavado con el extracto inicial y se llevaron a sequedad y se la acondicionó para su cuantificación como se indica en materiales y métodos.

El medio de incubación y lavado de embriones se lo analizó por el procedimiento de Thomson para cuantificar plaguicidas en medio acuoso (Thomson y col., 1977).

#### **2.2.5 Métodos para proteínas**

*Determinación de proteínas:* La concentración de proteínas se midió por el método de Lowry (1951). En todos los casos se realizó una curva de calibración usando albúmina sérica bovina como estándar.

*Electroforesis:* La electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo por el método de Davis (1964), usando azul de Coomassie para teñir proteínas y  $\alpha$  o  $\beta$  naftilacetato con Fast

Blue B para revelar actividad carboxiestearasa, preincubando en este caso los geles en solución Tris-ClH 100 mM pH 7 durante 30 min. y dejando reaccionar el sustrato 1 hora a 30°C, en el mismo medio.

*Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE):* La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo por el método de Laemmli (1970), usando azul de Coomasie para teñir proteínas.

*Incorporación de Leucina [<sup>14</sup>C]:* Los animales se expusieron a un medio experimental en solución Ringer, en presencia de [<sup>14</sup>C] leucina 325 mCi/mmol. En paralelo, se dispuso de igual cantidad de embriones procesados de la misma manera sin leucina para contar con un control de lavado.

*Fraccionamiento en ensayos de incorporación de marca radioactiva:* En todos los ensayos se efectuaron controles de lavado procesando embriones no expuestos al compuesto marcado, en paralelo con los experimentales, a los que se les aplicó fugazmente el medio sobrenadante de los últimos para que quedaran bañados en el medio radioactivo para disponer de un control de lavado efectivo, como se indica en el esquema de la figura 12.

Los embriones expuestos al compuesto marcado, fueron inmovilizados a 4°C, el medio fue retirado y conservado para exponer fugazmente a los embriones controles de lavado. Luego fueron lavados con solución fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4, 3 veces y homogenizados en homogenizador Potter en el volumen necesario para que el homogenato resultara de 10 embriones/ml.

Se guardó parte del homogenato para análisis y 1 ml se fraccionó por centrifugación a 20.000 x g 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en el mismo medio, en un volumen final igual al de partida. Luego se tomó 0,5 ml del homogenato, del sobrenadante y del sedimento resuspendido y se los precipitó con 0,5 ml de TCA 15% a una concentración final de 7,5%. Se separó por centrifugación a 20.000 x g, 15 min., se recuperó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en el mismo medio.

Los controles de lavado se procesaron de la misma forma pero antes de homogenizarlos se los resuspendió fugazmente en el medio con marca radioactiva que fue retirado de los embriones expuestos, del que fueron separados inmediatamente con el fin de disponer de una medida de la cantidad de marca que llega a cada una de las fracciones a pesar del lavado. En la práctica, la exposición de los embriones controles de lavado fue de entre 30 y 40 segundos.

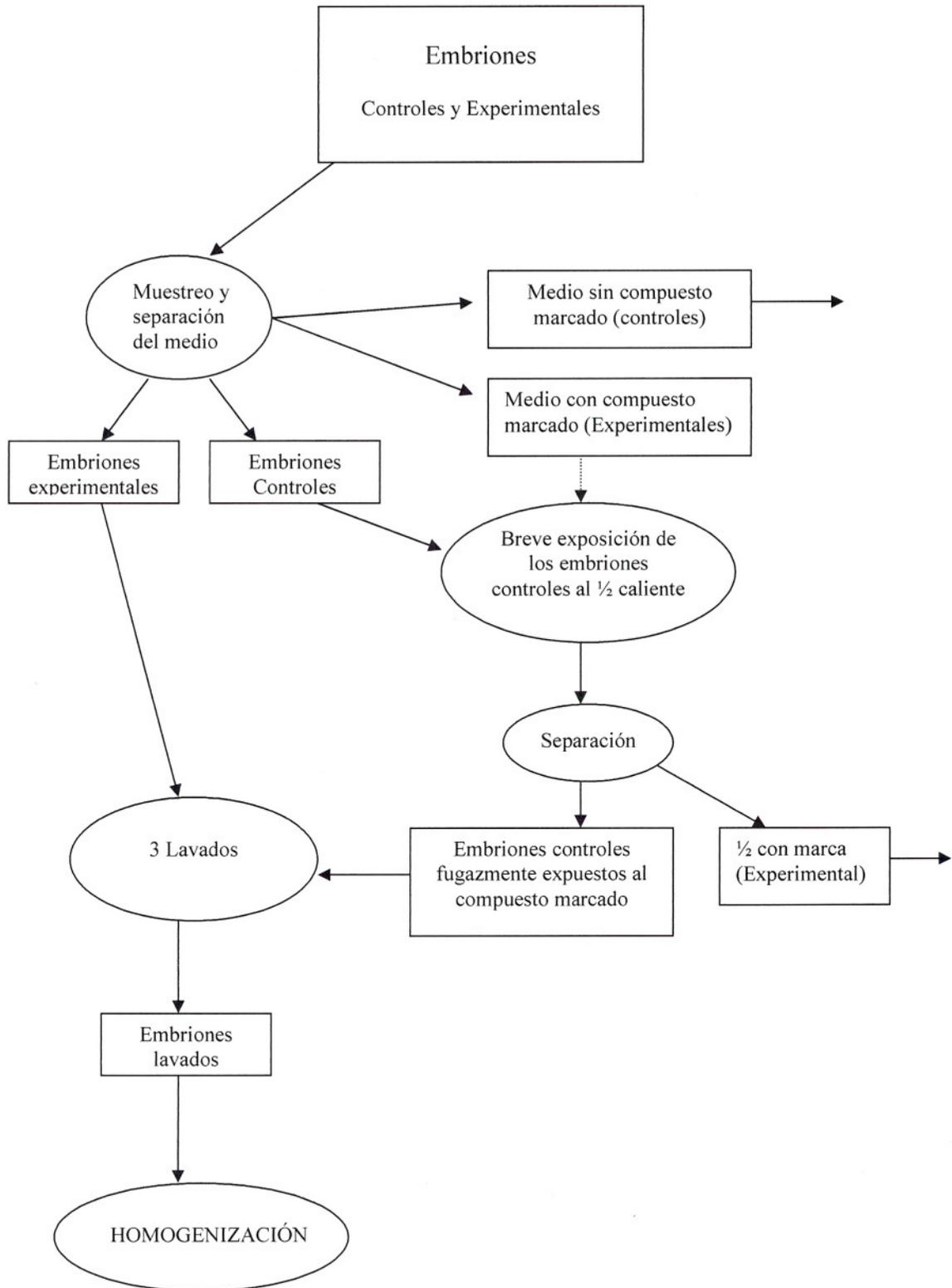


Figura 12: Diagrama de flujo del procesamiento de las muestras. Lavados.

## HOMOGENIZACIÓN

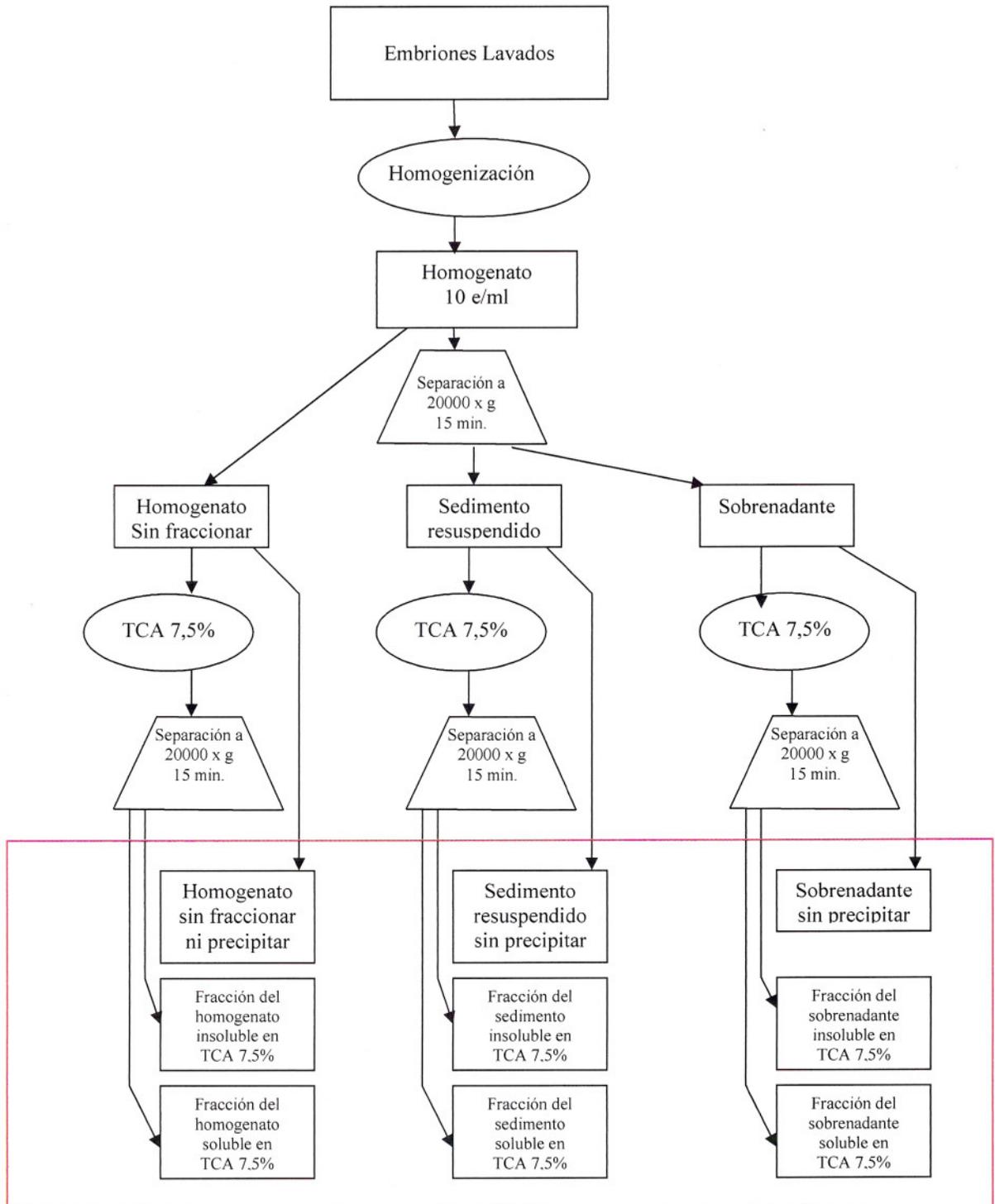


Figura 13 B: Diagrama de flujo del procesamiento de las muestras. Homogenización y fraccionamiento.

### **2.2.6 Ensayos Cinéticos**

*Estudio de la inactivación **in vitro** de AChE:* La inactivación se realizó en solución SET conteniendo los componentes requeridos en cada ensayo, como la suspensión de liposomas de PC por ejemplo, además de 20  $\mu$ l conteniendo 0,25 unidades internacionales de AChE de anguila. La reacción comenzó con el agregado de un volumen mínimo de solución acetónica de DFP o de paraoxón de la concentración adecuada para dar la concentración final indicada en cada caso, y se detuvo por el agregado de 250  $\mu$ l de acetiltiocolina 375 mM, que diluye el DFP y satura de sustrato el sitio activo para reducir la velocidad de inactivación a valores despreciables. Luego se transfirieron 200  $\mu$ l de la solución resultante a 0,8 ml de solución de DTNB 0,4 mM. La concentración de ATC utilizada es suficiente para que los 200  $\mu$ l tomados de la solución resultante contengan la cantidad de sustrato que requiere 1 ml de solución de medida. Los dos últimos agregados fueron realizados en intervalos medidos, desde jeringas Hamilton, a muy corta distancia para asegurar que la agitación provocada mezcle completamente la solución. Los valores de tiempo cero se obtuvieron agregando la solución de ATC antes que el DFP. El valor de las constantes se determinó gráficamente a partir de las pendientes observadas en las representaciones del logaritmo neperiano de la relación  $v/v_0$  vs tiempo. En todos los casos, como control, se midió la actividad siguiendo el mismo protocolo usando acetona en lugar de la solución del inactivador. Tanto el sustrato como el DTNB se prepararon en solución reguladora de fosfato 100 mM, pH 8.

*Purificación de fosfatidil colina:* La PC se purificó a partir de lecitina de huevo por el método de Rouser y col. (1970) usando una placa de silica gel Merck 50 g, de 1000  $\mu\text{m}$  de espesor. La primera dimensión se corrió usando cloroformo-metanol-amoniaco 65:25:5 como fase móvil, y cloroformo-acetona-metanol-ácido acético-agua 45:60:15:15:7,5 en la segunda dimensión. La placa fue revelada con vapores de yodo y la mancha de PC fue raspada y eluida con cloroformo-metanol-ácido fórmico 60:30:0,5. Finalmente se guardó bajo nitrógeno a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Preparación de liposomas de fosfatidil colina:* Los liposomas se prepararon siguiendo la técnica de Zilversmith llevando a sequedad la cantidad apropiada de fosfatidilcolina y redisolviéndola en éter etílico. Luego se evaporó este solvente lentamente hasta sequedad y se repitió la operación. A continuación se agregó la cantidad de solución SET necesaria para dar la concentración requerida y se desplazó el oxígeno por burbujeo de nitrógeno. Tras agitar en vortex durante 10 min. se aplicó sonido de alta frecuencia durante 30 min.. La temperatura se mantuvo en  $4^{\circ}\text{C}$ , y todo el procedimiento se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno.

### 2.2.7 Modelado de la cinética de AChE

Los modelos cinéticos fueron desarrollados considerando dos sitios de unión de acetilcolina, uno catalítico, el sitio activo ( $S_c$ ) y otro inhibitorio ( $S_i$ ), y uno o dos sitios de unión de poliamina (B) en la molécula enzimática (E). En el caso del modelo mixto en particular se consideró un mecanismo en dos etapas con un estado intermediario de enzima acetilada ( $E'$ ). Di Cera y col (1996) aplicaron un esquema similar en el tratamiento cinético de proteasas de serina bajo el supuesto de estado estacionario, pero no consideran la posibilidad de la inhibición por sustrato y, además, el modelo resultante es de una complejidad tal que no es posible rescatar información útil en un intento por interpretar el mecanismo de catálisis. Por este motivo, en nuestro caso, fue necesario introducir simplificaciones con el fin de establecer el valor de algunas de las constantes cinéticas. Analizamos el desarrollo de este modelo en la sección 5.1.

Se llamaron  $K_s$ ,  $K_i$  y  $K_b$  a las constantes de disociación de los complejos formados por la unión de cada uno de dichos ligandos a la enzima libre en  $S_c$ ,  $S_i$  y B, respectivamente. Se definieron factores de interacción para la formación de complejos ternarios denominándolos con letras griegas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  para las interacciones  $S_c$ - $S_i$ ,  $S_c$ -B y  $S_i$ -B, respectivamente y  $\delta$  para el complejo cuaternario. En el caso de la enzima acetilada,  $\alpha'$  y  $\beta'$  para los factores que afectan las constantes de inestabilidad en  $S_i$  y B respectivamente, y  $\gamma'$  para la interacción  $S_i$  - B en  $E'$ .

$k_v$  y  $k_w$  son las constantes de reacción de pseudo primer orden correspondientes a los complejos ES y  $E'S$ . a, b y c son los factores que afectan la modulación de dichas constantes para los complejos con el sitio  $S_i$  o B o ambos ocupados respectivamente en la primer etapa.  $a'$ ,  $b'$  y  $c'$  son los correspondientes factores para la segunda etapa.

En cada caso se tomó como velocidad de reacción a la suma de velocidades de reacción de la transformación covalente a partir de cada uno de los complejos que tienen el sitio Sc ocupado, y se consideró a las reacciones de unión de sustrato o de poliamina a sus sitios como reversibles, por lo que la concentración de cada complejo se despejó de la ley de acción de masas.

El modelo mixto introduce una complicación adicional. La enzima se encuentra acetilada o no acetilada, y en ambos casos formando varios complejos. El problema es dar cuenta en la expresión cinética de la forma en que la etapa de enzima acetilada influye en la concentración de cada uno de los complejos y en la velocidad de reacción.

Asumiendo nuevamente que cada complejo se encuentra en equilibrio termodinámico con los ligandos libres, el balance masas puede expresarse de la siguiente manera:

$$[E]_T = [E] + [ES_c] + [ES_i] + [ES_2] + [EB] + [EBS_c] + [EBS_i] + [EBS_2] + [E'] + [E'S_i] + [E'B] + [EBS_c]$$

$$[E]_T = [E] \left( 1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]}{K_i} + \frac{[S]^2}{\alpha K_s K_i} + \frac{[B]}{K_b} + \frac{[S][B]}{\beta K_s K_b} + \frac{[S][B]}{\gamma K_i K_b} + \frac{[S]^2[B]}{\alpha \beta \gamma \delta K_s K_i K_b} \right) + [E'] \left( 1 + \frac{[S]}{\alpha' K_i} + \frac{[B]}{\beta' K_b} + \frac{[S][B]}{\alpha' \beta' \gamma' K_i K_b} \right)$$

Suponiendo que el sistema procede en estado estacionario, la suma de reacciones de transformaciones covalentes de ambas etapas debes ser iguales.

$$k_v \times [ES_c] + a k_v \times [ES_2] + b k_v \times [EBS_c] + c k_v \times [EBS_2] = +k_w \times [E'] + a' k_w \times [E'S_1] + b' k_w \times [E'B] + c' k_w \times [EBS_c]$$

$$[S][E] \frac{k_v}{K_s} \left( 1 + [S] \frac{a}{\alpha K_i} + [B] \frac{b}{\beta K_b} + [S][B] \frac{c}{\alpha \beta \gamma \delta K_i K_b} \right) =$$

$$= [E'] k_w \left( 1 + [S] \frac{a'}{\alpha' K_i} + [B] \frac{b'}{\beta' K_b} + [S][B] \frac{c'}{\alpha' \beta' \gamma' K_i K_b} \right)$$

A partir de esta expresión puede explicitarse fácilmente el valor de concentración de enzima acetilada libre de ligandos ([E']) en función de la concentración de la enzima libre ([E]). La expresión resultante permite completar el balance de masa y despejar el valor de concentración de la enzima libre ([E]) en función de la concentración de enzima total ([E<sub>T</sub>]) y usarla en la ecuación cinética dejando así la velocidad de reacción en función de [E<sub>T</sub>], [S] y [PA].

Las expresiones logradas son cocientes de polinomios arreglados para que el término independiente en el denominador sea la unidad. Las mismas se indican en los resultados junto a la explicación de cada modelo.

## **3 EFECTO DEL MALATIÓN EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE ANFIBIOS.**

### **3.1 INTRODUCCIÓN**

El blanco primario de acción de OPs es la enzima AChE (Main, 1984). Su función es la de catalizar la hidrólisis de la acetilcolina liberada en el espacio sináptico de sinápsis colinérgicas y de uniones neuromusculares. Si bien no se ha descrito en embriones tempranos ningún sistema colinérgico completo, se ha encontrado expresión de actividad AChE en embriones de equinodermos (Fluck y col., 1980) y de peces (Fluck y col., 1978). Más aún, antagonistas colinérgicos bloquean el desarrollo embrionario (Fluck y col., 1980). De hecho, ambas colinesterasas se encuentran en tejidos embrionarios cuyas células se están reordenando. Flaugi y Raneri (1985) propusieron un modelo de control de diferenciación en extremidades primordiales de pollo basados en la comunicación de células ectodérmicas y mesenquimatosas mediada por acetilcolina. Esta expresión temprana de acetilcolina no fue sensible a emetina, un inhibidor de la síntesis proteica, en peces (Ozaki, 1976), por lo que se supone que la misma es de síntesis temprana y se activa por cambios post-traduccionales.

En los primeros días de desarrollo, los embriones de *Bufo*, se mantienen a expensas de sus reservas, especialmente lipídicas (Rosenbaum y col., 1988). No es sorprendente que las proteínas totales de los mismos disminuyan en el dicho lapso (Llamas y col., 1985). Sin embargo, en las condiciones de trabajo, el contenido proteico de la fracción no sedimentable, aumenta paulatinamente (Rosenbaum y col., 1988). Esto su-

giere que los embriones tempranos sufren importantes relocalizaciones de proteínas. También se han reportado redistribuciones de lípidos (Pechen de D'Angelo y Bazan, 1977) y de actividades enzimáticas (Deuchard, 1966).

La exposición prolongada a malatión no afecta el descenso de las proteínas totales, pero disminuye el incremento del contenido proteico de la fracción no sedimentable. Probablemente esto se deba a una interferencia en la redistribución proteica por inactivación de algunas proteasas (Rosenbaum y col., 1988).

Las diferentes carboxiesterasas se expresan siguiendo un patrón complejo que depende de la etapa de desarrollo y de las condiciones ambientales. Dicha expresión es fuertemente afectada por la presencia de xenobióticos ya que forman parte del proceso de inducción, y para complicar el panorama, muchas de ellas tienen una serina esencial en el sitio activo y siguen un mecanismo de reacción similar al de la AChE, por lo que son sensibles a la inactivación por organofosforados. Estas razones permiten predecir un comportamiento complejo del patrón de expresión de las distintas carboxilesterasas ante la intoxicación.

Por otra parte, la intoxicación por malatión afecta a todas las vías metabólicas directa o indirectamente, entre ellas el recambio de proteínas que está alterado por, al menos una de las siguientes razones: disminución de la síntesis por interferencia directa o por caída de la disponibilidad de energía, disminución de la degradación de muchas proteínas por inactivación de proteasas dependientes de serina o aumento, al menos relativo, de la síntesis de algunas proteínas por retroalimentación negativa, tratando de reponer alguna actividad, o por expresión inducida por la intoxicación.

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 Captación de paratión [<sup>14</sup>C] por embriones de sapo *Bufo arenarum*

El estudio de la cinética de captación, metabolización y eliminación de un tóxico, brinda información adicional para interpretar el riesgo de intoxicación de una especie ante la exposición a un tóxico.

Debido a que interacción entre los distintos factores que deciden la sensibilidad de un organismo a un plaguicida es muy compleja, no es posible ni conveniente el modelado preciso y completo del proceso que contemple todas las etapas. Sin embargo, modelos simples cuyo comportamiento emule la conducta del sistema real resultan de gran utilidad. Por ejemplo, cuando la velocidad de eliminación de un compuesto es muy baja, el animal entero puede ser considerado como un solo compartimiento (Gillette, 1980).

Embriones en brote caudal desarrollados en medio Ringer, expuestos a [<sup>3</sup>H]paratión 2 mg/l, captaron el 80% de la marca en una hora. La figura 14 muestra que el organofosforado se concentra en el embrión mientras es retirado del medio. La pérdida de marca a las 24 hs. no significa que haya disminuido la fosforilación en la fracción proteica porque se utilizó paratión marcado en el anillo aromático que se separa durante la fosforilación. Incluso, en caso de liberarse p-nitrofenol por acción de alguna actividad enzimática, no puede ser distinguido del liberado por fosforilación de una proteína ni del paratión original.

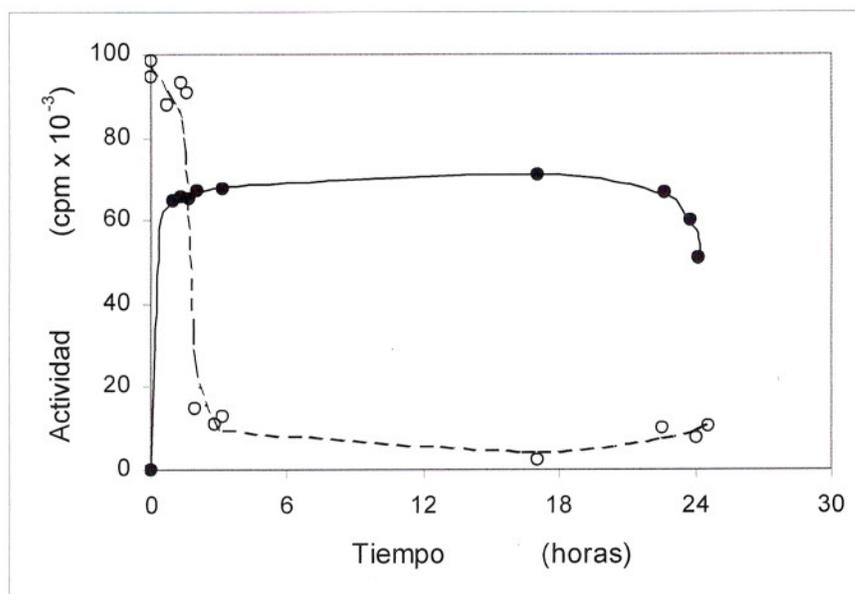


Figura 14: Medida de la captación de paratión en embriones de *Bufo arenarum*, Hensel. (●) actividad extraída de los embriones. (○) actividad recuperada en el medio sobrenadante.

En las condiciones de ensayo, la captación máxima no se alcanza hasta las 4 hs. de exposición, a pesar que en 60 min., los embriones concentran más del 80% del paratión presente en el medio. Asumiendo que un embrión tiene entre 1 y 2  $\mu\text{l}$ , este resultado implica que la concentración interna de paratión es superior a 1 g/l, más de 500 veces la concentración inicial de plaguicida en el medio. Resultados similares se obtuvieron en peces, con compuestos clorados, piretroides, fosforados y carbamatos (Guarino y col., 1979). Este experimento pone de manifiesto la alta capacidad de los embriones de *Bufo* de acumular este tipo de compuestos.

Caballero de Castro (1999) modeló la captación y bioacumulación de malatión en varios estadios de desarrollo de embriones de *Bufo* (Figura 15). El proceso es bifásico, probablemente por haber un compartimiento lipídico, de acceso lento que disminuye su capacidad con el desarrollo, y otro, acuoso, de acceso rápido, más estable. De acuerdo a

los valores obtenidos para opérculo completo la captación llega a un 67% del valor máximo en una hora, resultado similar al que obtuvimos con paratión.

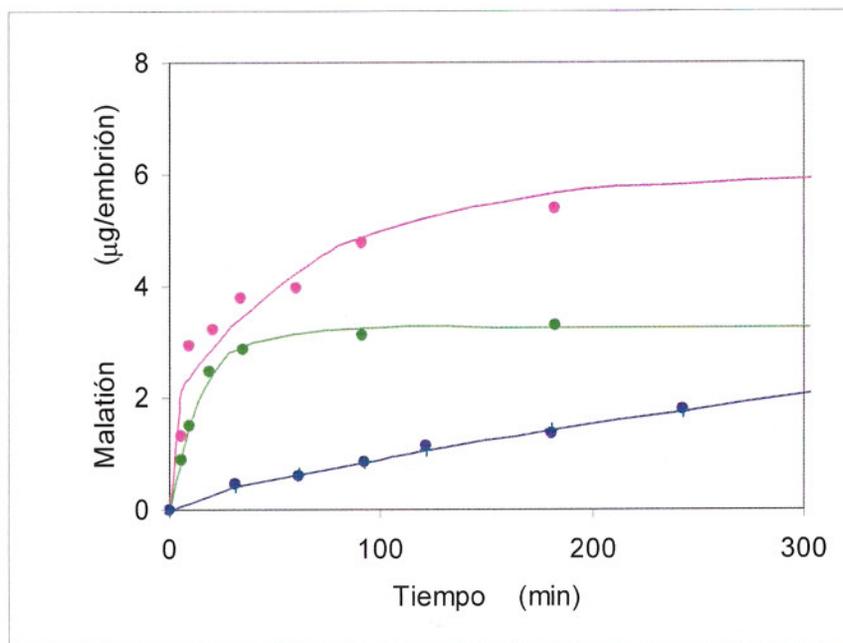


Figura 15: Curvas de captación de malatión para los estadios de placa neural (●), circulación branquial (●) y opérculo completo (●), medido por cromatografía a partir de un extracto cetónico (Caballero de Castro, 1999).

### 3.2.2 Actividad de acetil, butiril y alilesterasa y el contenido de proteínas en embriones de *Bufo arenarum* expuestos a malatión 44 mg/l

Las actividades enzimáticas ensayadas en los embriones expuestos a malatión decaen a menos del 25% de los valores de los correspondientes controles, en cinco días, siendo las aliestearasas las más profundamente afectadas (figura 16c). Las actividades acetil, butiril y alietearasas aumentaron 36, 31 y 35 veces en los controles respecto de sus valores en el oocito recién fertilizado. Las mismas actividades en los embriones ex-

puestos a malatión se mantuvieron en un valor similar al inicial a lo largo de los cinco días (figuras 16 y 18).

La mortalidad a las 96 hs. de exposición a malatión aumenta abruptamente a una concentración de 44 mg/l (Figura 17A).

El contenido de proteínas totales en la fracción considerada sufre un descenso sostenido respecto del de los controles a lo largo de los 4 primeros días de vida (figura 17B). Es de destacar que los embriones controles experimentan un aumento en el contenido proteico de dicha fracción desde 92,15  $\mu\text{g}/\text{embrión}$ , en el momento de la fecundación, hasta 275,5  $\mu\text{g}/\text{embrión}$  en el quinto día de desarrollo. Este incremento es sensiblemente menor en los embriones desarrollados en medios contaminados.

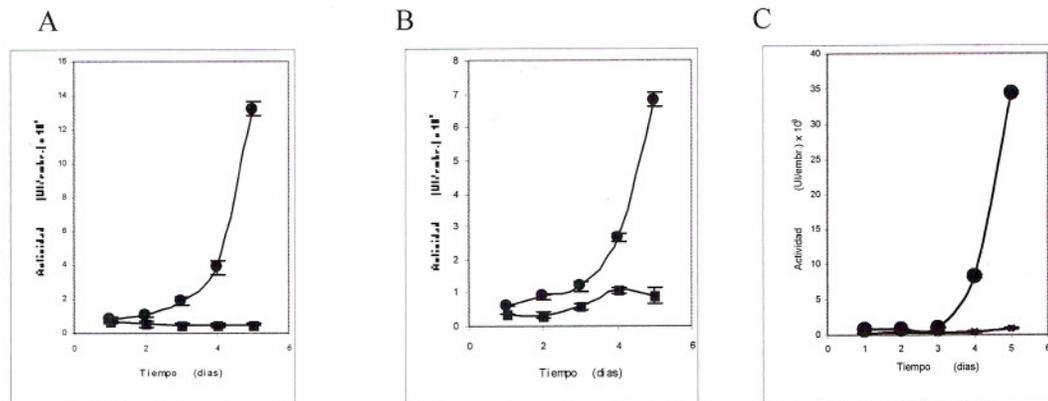


Figura 16: Actividades enzimáticas y contenido de proteínas totales respecto del control. A: AChE; B: BChE; B: CE..

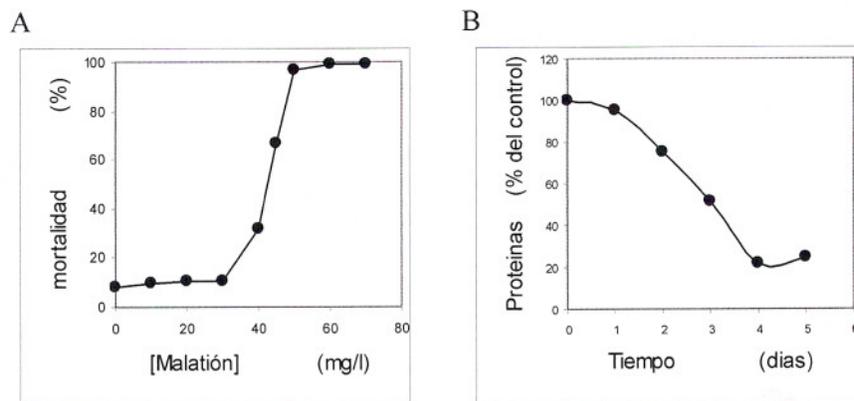


Figura 17: Efecto del malatión 44 mg/l en los embriones de *Bufo arenarum* expuestos desde la fertilización. A: Mortalidad a las 96 hs. B: Contenido de proteínas.

### 3.2.3 Recuperación de embriones de medios contaminados

Se estudió la evolución de las distintas actividades enzimáticas en embriones desarrollados en un medio contaminado y transferidos, después de una hora, a medio Ringer, con el fin de evaluar la capacidad de recuperación de los mismos tras una exposición a malatión (figura 18).

Las actividades acetil y carboxilestearasas presentan una rápida inhibición producida dentro de la primera hora después de la transferencia. La evolución posterior sigue el mismo perfil que los controles con un retraso igual a la duración del lapso de exposición al plaguicida. Esto parecería indicar que la intoxicación se traduce, al menos en parte, en un retraso en el desarrollo embrionario, que es coincidente con la evolución de los cambios morfológicos.

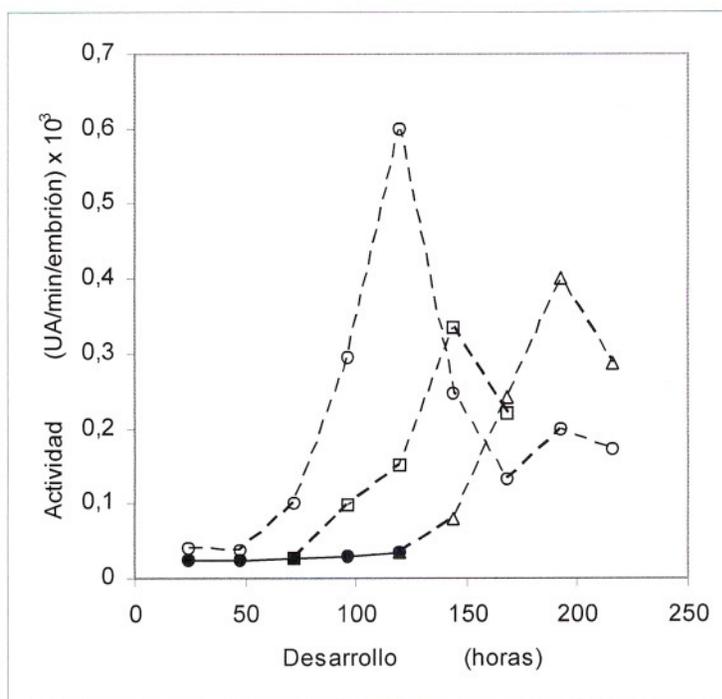


Figura 18: Evolución de las actividades AChE en embriones expuestos permanentemente a malatión desde la fertilización (●), y transferidos a medio libre del mismo a las 48hs. (○), 72 hs. (□) y 120 hs. (Δ) de exposición.

El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de dodecilsulfato de sodio revelado con azul de Coomasie, presenta una banda correspondiente a un péptido de 27000 daltons en muestras provenientes de embriones expuestos al plaguicida desde la fertilización, que no se encuentra en muestras de los embriones controles sin que se manifiesten otras diferencias significativas entre los distintos proteinogramas. La intensidad de la citada banda aumenta progresivamente con los días de exposición (figura 19).

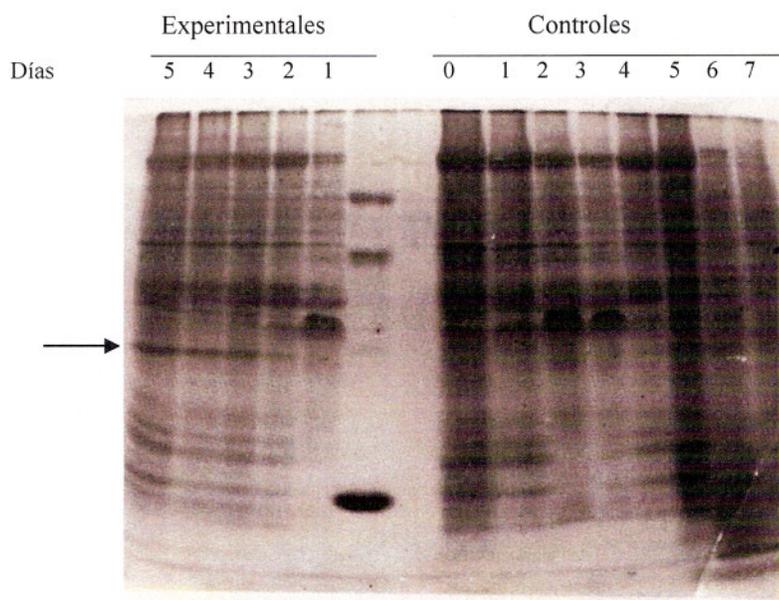


Figura 19: Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras expuestas a malatión 44 mg/l y sus controles. Los marcadores de peso molecular fueron BSA de 65000, albúmina de huevo de 45000 y citocromo C de 12500 daltons. La flecha señala la banda de 27000 daltons que no aparece en los embriones controles.

Consistentemente con estos cambios en la actividad enzimática se altera drásticamente el patrón de incorporación de aminoácidos. Ya se ha visto que el contenido de proteínas totales es menor en embriones intoxicados que en los correspondientes controles (figura 17b) (Rosenbaum y col., 1988).

Estudiamos entonces la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ] leucina en larvas de *Bufo arenarum*, Hensel de 15 días de desarrollo ya que en experimentos previos observamos que en embriones tempranos no se logra una buena incorporación de marca.

La incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ] leucina es significativa recién a partir de las 2 horas de exposición tanto en el homogenato entero como en la fracción insoluble en TCA y la marca incorporada no aumenta significativamente al menos en una semana de exposición al aminoácido marcado (figura 20).

Malatión 40 mg/l interfiere significativamente en la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ] leucina en larvas de sapo a las 48 hs. Los controles de lavado muestran que no hay arrastre de marca inespecífica en el precipitado de TCA (Figuras 21 y 22).

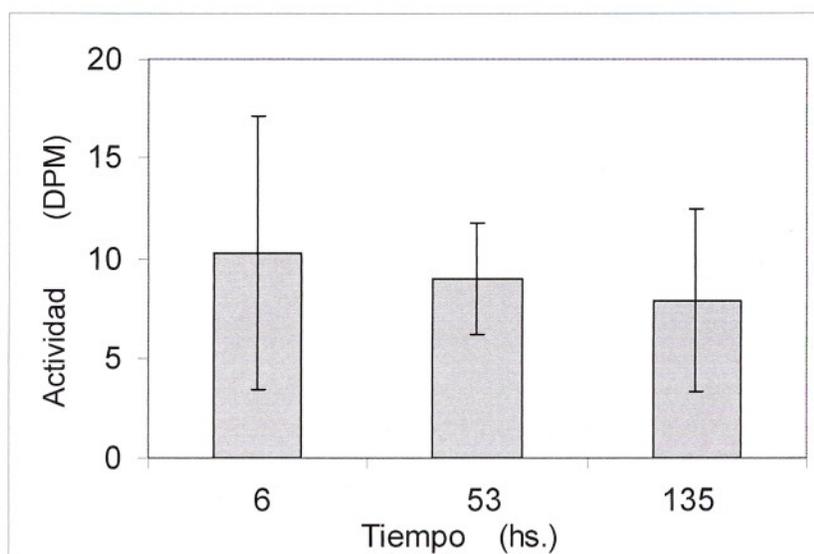


Figura 20: La actividad en la fracción del homogenato insoluble en TCA para larvas mantenidas con leucina [ $^{14}\text{C}$ ] es máxima antes de las 6 hs. de exposición y se mantiene en el tiempo. Las medidas se realizaron por triplicado

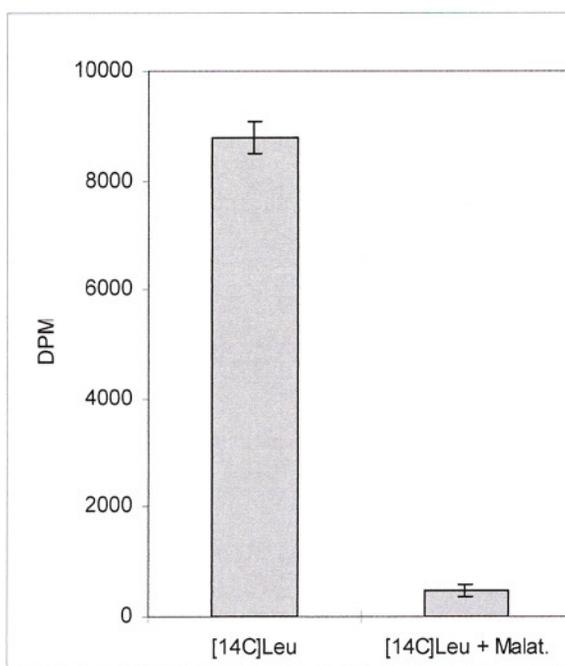


Figura 21: Cinco larvas ayunadas 24 hs en 5 ml de solución Ringer fueron expuestas 48 hs. a Leucina [ $^{14}\text{C}$ ] 620 nM, 1  $\mu\text{Ci}$ , en presencia de malatión 25 mg/l, agregado en 25  $\mu\text{l}$  de solución acetónica. En el control se cambió la solución acetónica por acetona. Los controles de lavado procesados en paralelo no contenían leucina [ $^{14}\text{C}$ ] y fueron expuestas a la misma fugazmente como en la experiencia anterior. Sus actividades resultaron comparables al fondo y fueron descontados para esta representación.

El efecto de malatión sobre la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ] leucina a las 48 hs. de exposición tiene un una concentración de 50% de efecto de aproximadamente 5 mg/l (figura 23), pero no parece haber una supresión total de la incorporación por lo menos para los valores de concentración de malatión probadas, ya que en experimentos donde utilizamos 40 mg/l obtuvimos un 5% de incorporación de marca respecto del control.

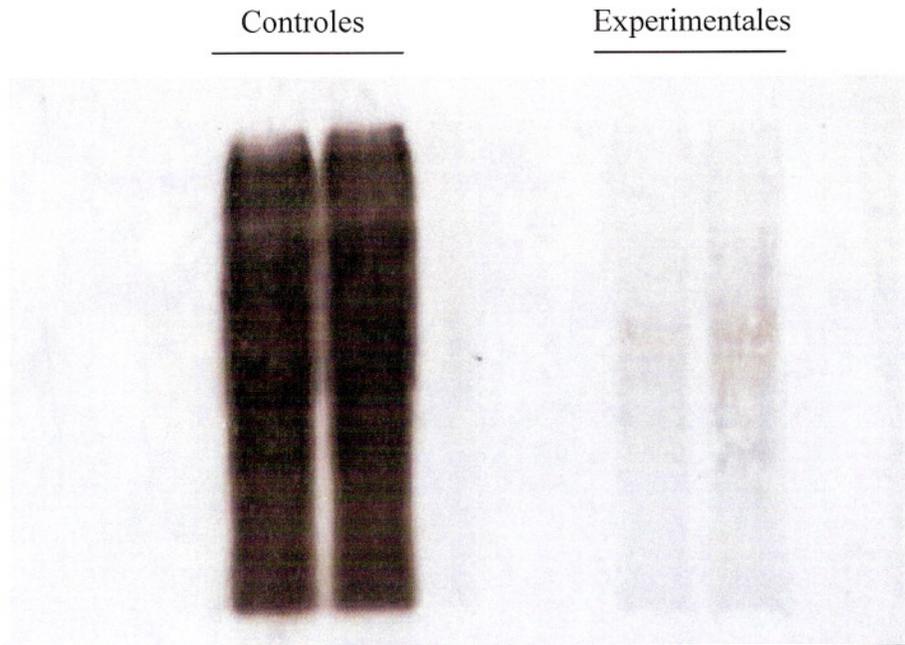


Figura 22: Autorradiografía de la membrana de nitrocelulosa procedente de un SDS-PAGE realizado a partir de las mismas de las muestras de la figura 21.

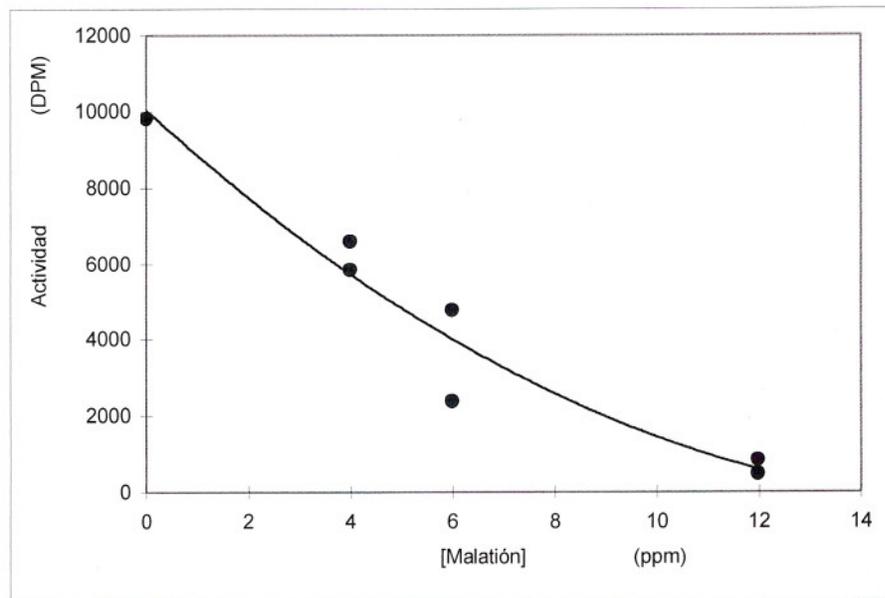


Figura 23: Incorporación de leucina [ $^{14}\text{C}$ ] en larvas de *Bufo* intoxicadas con malatión por 48 hs.

### 3.2.4 Receptor Muscarínico de Acetilcolina

La exposición aún a bajos niveles de organofosforados lleva a una alta concentración de acetilcolina debido a la baja actividad colinesterasa remanente (figuras 9 y 10) (Schiller, 1979). Una de las formas de adaptación a esta situación es la de reducir la sensibilidad de la membrana post sináptica a la acetilcolina reduciendo el número de receptores o sus afinidades por su ligando.

Intentamos medir el cambio del contenido de AChRm en embriones de *Bufo arenarum*, Hensel provocado por una exposición prolongada a dosis subagudas de malatión.

La medida directa de unión de [<sup>3</sup>H]QNB en el homogenato de embriones no puede realizarse ya que el alto contenido de pigmentos enmascara la fluorescencia del líquido de centelleo. Las primeras determinaciones se realizaron en una fracción sobrenadante de 1000 x g 10 min. con una concentración saturante de radionucleído obteniéndose una unión inespecífica de 12 femtomoles/mg de proteína. La unión inespecífica fue de un 80 % de la total (dato no mostrado).

El homogenato mostró ser sensible al ataque proteolítico. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se modificó la técnica operatoria en tres aspectos. En primer lugar, se agregó EDTA, aprotinina y NEM como inhibidores de proteasas a todas las soluciones; en segundo lugar, se procedió a cortar la cabeza de las larvas para eliminar la porción intestinal de las mismas, rica en enzimas catabólicas; y por último, se puso énfasis en trabajar a bajas temperaturas de forma que las cabezas recién cortadas fueron inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido y fueron mantenidas en él hasta su procesamiento. La medida efectuada con el material obtenido, en la forma descripta, se muestra en la figura 24. En estas condiciones se observa unos 250 femtomoles/mg de proteínas como máxima capacidad de unión aparente de QNB. No es posible estimar, en

estas condiciones, el valor de  $K_d$  por que el QNB ha demostrado ser saturante para el rango de concentraciones utilizado, a pesar de lo cual, puede observarse que dicho valor es menor que 0,5 nM. La elevada unión inespecífica podría deberse a la alta concentración de [ $^3$ H]QNB utilizada.

Dada las dificultades que presenta la obtención del material las primeras medidas en el rango de concentraciones apropiado se llevaron a cabo con pocos puntos experimentales. Este hecho, junto con la elevada dispersión característica del método condujo a datos poco concluyentes, que, sin embargo, parecen confirmar el valor observado anteriormente de la capacidad máxima de unir QNB y aventurar el valor de  $K_d$  en alrededor de 100 pM (figura 25).

Utilizando 3000 cabezas de embriones controles y otras tantas experimentales se logró una medida más precisa (figura 26). De estos resultados inferimos que la exposición de embriones a 4,4 mg/l de malatión desde su fertilización lleva a un menor contenido de receptor muscarínico de acetilcolina sin afectar la afinidad por el QNB con un  $K_d$  aprox. 0,21 mM.

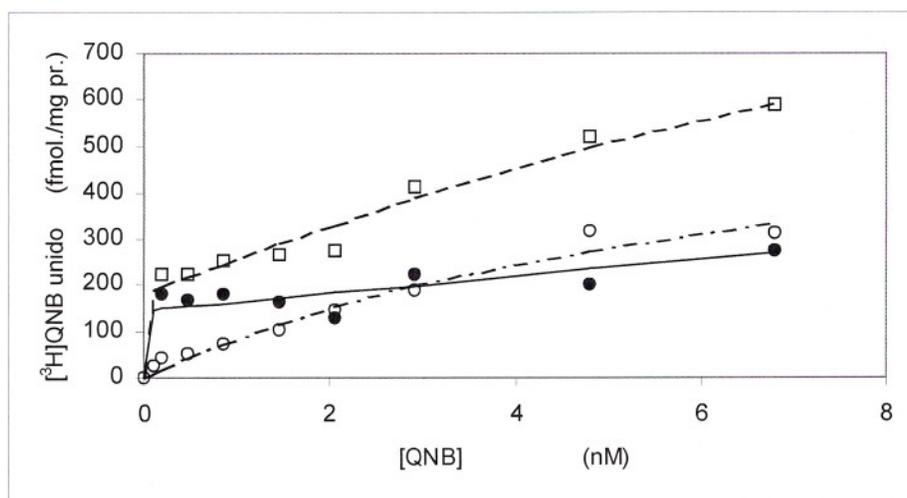


Figura 24: Unión de QNB tritiado a membranas de cabeza de larvas de *Bufo arenarum*. Las determinaciones se llevaron a cabo como se indica en materiales y métodos. A Unión total. B Unión en presencia de atropina. C Unión específica. Las líneas fueron ajustadas por mínimos cuadrados.

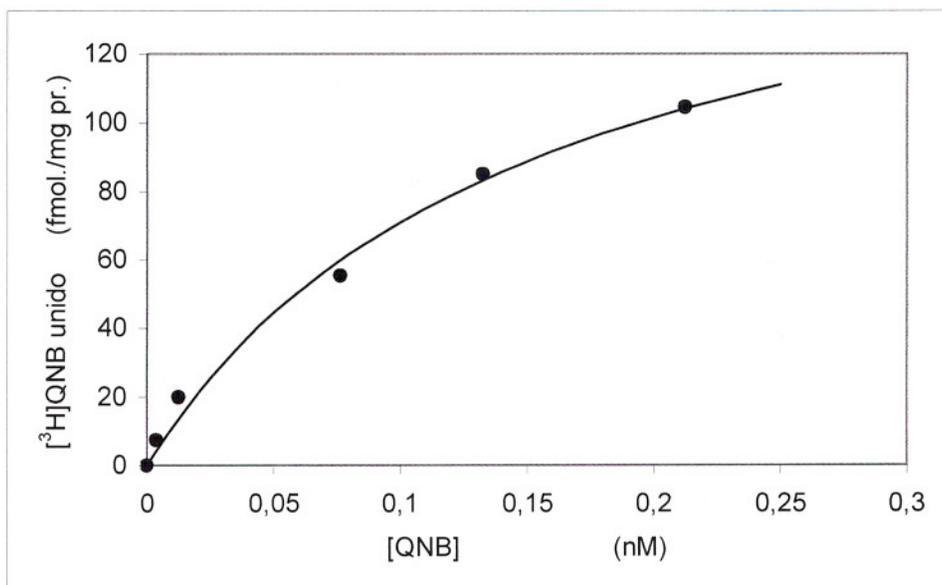


Figura 25: Unión de QNB tritado a membranas de cabeza de larvas de *Bufo arenarum*. Cada punto en la diferencia entre la marca total y la inespecífica.

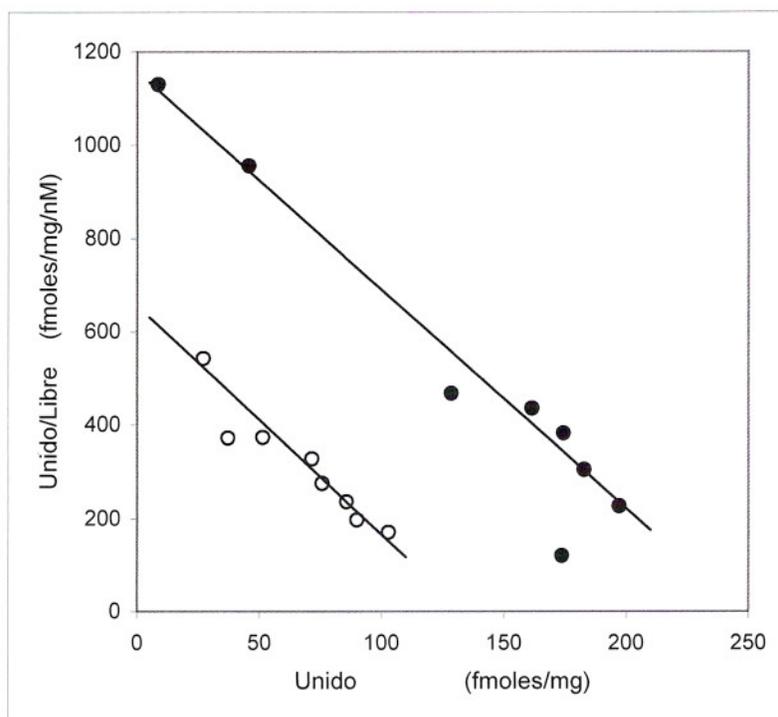


Figura 26: Representación de Scatchard de la unión de [<sup>3</sup>H]QNB a membranas preparadas a partir de cabezas de larvas expuestas desde la fecundación a malatión. (●) Controles, (○) experimentales

### 3.2.5 Efecto de la exposición de malatión en sapo adulto

Con el fin de comparar las alteraciones bioquímicas provocadas por el malatión en embriones y larvas de *Bufo* con sus efectos en tejidos adultos, se estudiaron las fracciones post-mitocondriales de hígados y cerebro de sapos adultos sometidos a tratamiento agudo y crónico con dicho plaguicida. El protocolo experimental y los resultados obtenidos se resumen en la tabla VII. Se observan fuertes inhibiciones en las tres actividades estudiadas, siendo más pronunciada la que presentan los animales sometidos a tratamiento agudo.

Tabla VII: Actividades enzimáticas estudiadas en la fracción post-mitocondrial de hígado y cerebro de sapo adulto intoxicados con malatión. Se trató de simular una intoxicación crónica mediante una inyección diaria de 0,5 ml de malatión de 10 mg/l y una intoxicación aguda mediante una única inyección de malatión de 50 mg/ml a razón de 0,5 ml por cada 100 g de peso corporal. Los controles fueron tratados de igual manera con alcohol sin malatión. Los animales fueron sacrificados 40 min. después de la última aplicación. Tanto hígado como cerebro fueron inmediatamente extraídos, homogenizados en solución SET y fraccionados a  $20000 \times g$  durante 20 min. Guardándose el sobrenadante en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

Órgano	Tratamiento	Animal	AChE (%)	BChE (%)	CE (%)
Hígado	Crónico	1	6,8	10,0	23,5
Hígado	Crónico	2	0,0	0,0	45,5
Hígado	Agudo	3	0,0	0,0	11,8
Hígado	Agudo	4	0,0	0,0	37,1
Cerebro	Crónico	1	19,0	--	92,0
Cerebro	Crónico	2	17,0	--	nd
Cerebro	Agudo	3	7,2	--	17,2
Cerebro	Agudo	4	6,03	--	nd

Los resultados son respecto de las actividades medidas en los correspondientes controles.

nd: no determinado

Zimogramas revelados con  $\alpha$  y  $\beta$  naftilacetato de las fracciones de hígado estudiadas presentan una banda de actividad de movilidad relativa 0,85. En algunos casos se presenta una segunda banda de movilidad relativa 0,8 sin que esto parezca ser efecto del malatión. Estas actividades son sensibles a eserina 10  $\mu$ M y a DFP 100  $\mu$ M, lo que hace pensar que se trataría de una acetilcolinesterasa de acuerdo a la clasificación de Holmes y Masters (1967). En todos los casos se observan bandas minoritarias de intensidades y movilidades diversas probablemente debido a variaciones normales en la especie (figura 27).

Muestras provenientes de cerebro presentan dos bandas de actividad carboxil-estearasa de baja intensidad y de movilidades relativas 0,75 y 0,8 que están disminuidas o ausentes en los animales tratados con el insecticida.

El análisis por electroforesis de la fracción estudiada, en presencia de dodecilsulfato de sodio revela, además de diferencias mínimas, dos bandas correspondientes a polipéptidos de 12500 y 15000 daltons, en muestras provenientes de hígado, cuyas intensidades son significativamente superiores en los animales tratados con malatión (figura 28). La fracción sedimentada a 10000 x g 20 min. presenta las mismas bandas pero sin diferencias entre los distintos animales (figura 29).

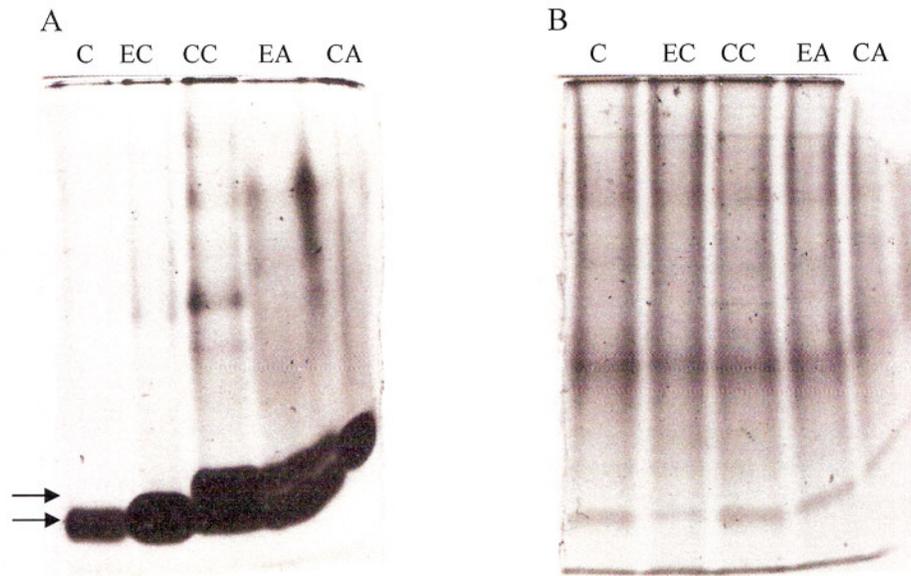


Figura 27: A: Zimogramas de homogenato de hígado de sapo revelado con  $\alpha$  naftilacetato. B) El mismo proteinograma revelado con azul de Coomassie. Las flechas señalan las bandas mencionadas en el texto.

C: Control sin tratamiento

EC: Experimental crónico, EA: Experimental agudo

CC: Control crónico. CA: Control agudo.

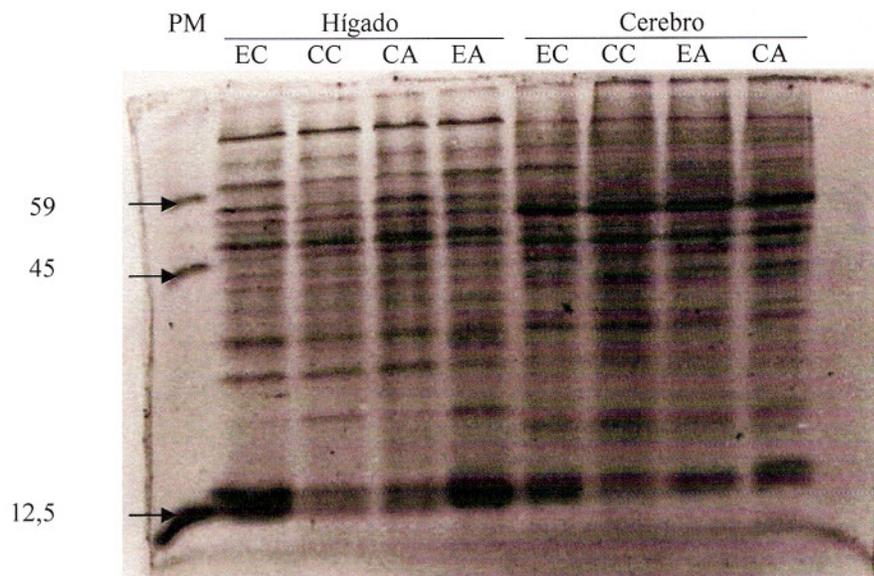


Figura 28: Proteinograma en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de muestras de homogenato de hígado y cerebro de sapo adulto tratado con malatión y de sus controles. Los pesos moleculares se expresan en kilodaltons. El significado de las iniciales es el mismo de la figura 27.

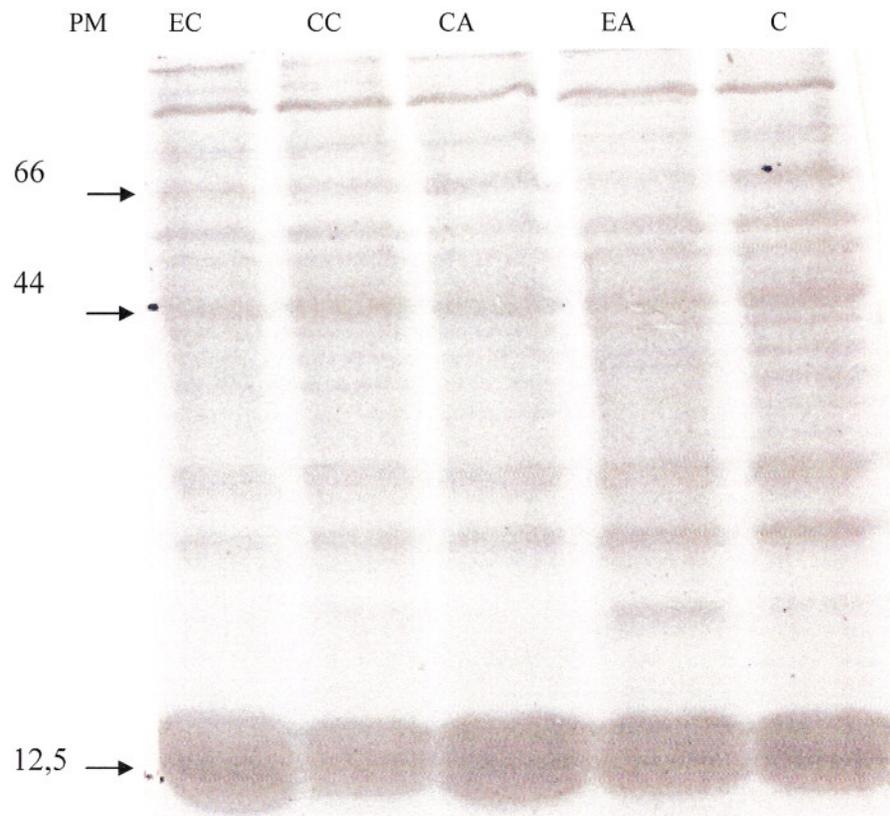


Figura 29: Proteinograma en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de muestras de sedimento de 10000 x g preparado a partir de homogenato de hígado y cerebro de sapo adulto tratado con malatión y de sus controles. Los pesos moleculares se expresan en kilodaltons. Las iniciales tienen el mismo significado que en la figura 27.

### 3.3 DISCUSIÓN

Los embriones de anfibios son susceptibles a la presencia de plaguicidas en su medio de desarrollo debido a que por sus características lipofílicas son rápidamente bioacumuladas como lo demuestran las captaciones de malatión y paratión ilustradas en las figuras 14 y 15. Una vez incorporados pueden ser retenidos en la fracción de las plaquetas vitelinas ricas en lípidos y fosfoproteínas (Caballero de Castro, 1999).

La acción del malatión en los embriones de sapo se manifiesta en la reducción significativa de varias actividades enzimáticas por acción directa de uno de sus metabolitos sobre estas macromoléculas, dando como resultado un fuerte desequilibrio metabólico. Las actividades afectadas en primer lugar fueron las esterasas dependientes de serina (Rosenbaum y col., 1988) por fosforilación directa de las mismas por el plaguicida (Eto, 1977). Esto es coincidente con el hecho de que aplicaciones de AChE en animales de experimentación elevan la tolerancia a la intoxicación por este tipo de compuestos debido presumiblemente a que consumiría el malatión en sangre antes que pueda actuar a nivel del SNC (Yang y Dettbarn, 1998; Gupta y Dettbarn, 1993). Observamos en los embriones controles de nuestros experimentos aumentos importantes de las actividades acetil, butiril y carboxilestearasas que no se presentan en los ejemplares expuestos al plaguicida, seguida de un descenso en el valor de las mismas. Observamos que cuando se alcanza 84% de inhibición de AChE y un 60% de BChE respecto de las correspondientes actividades en los controles, se produce un incremento importante en la mortalidad. Sin embargo, observaciones previas de nuestro laboratorio dan cuenta de que inhibiciones prolongadas del 60% de actividad AChE no impiden el desarrollo ulterior de la larva que puede sobrevivir largo tiempo (Llamas y col., 1985). Un fuerte

descenso en las actividades mencionadas también tiene lugar en embriones desarrollados en medio Ringer, por lo que variaciones en la actividad enzimática constituyen un evento normal en el desarrollo de estos animales (figura 18).

El estudio de la evolución de las actividades consideradas en los embriones en recuperación en medio no contaminado parece indicar que se produjo un retraso en el desarrollo de estos embriones durante el tiempo de exposición al plaguicida (figura 18).

Por otra parte, se observa en estos mismos embriones expuestos al plaguicida, una rápida inactivación adicional de las tres actividades al ser transferidos al medio no contaminado que llega a ser hasta del 40%. Si bien esta alteración está cerca del error de medida debido al bajo valor de las tres actividades, ha probado ser reproducible y podría tener algún significado en el mecanismo de acción del tóxico y/o del proceso de detoxificación.

La recuperación de los embriones en medio libre de plaguicida puede ocurrir por defosforilación o nueva síntesis de la enzima. Análisis en geles de poliacrilamida teñidos por histoquímica con  $\alpha$ -naftilacetato demuestra que la exposición a malatión 44 mg/l elimina toda actividad en los geles (Caballero de Castro y col., 1991), no pudiendo observarse reactivación *in vitro* durante 24 hs. por lo que la recuperación de la actividad de colinesterasas depende en este sistema fundamentalmente de la síntesis de proteínas.

La inhibición de otras esterasas como aliesterasa resulta particularmente interesante de considerar por cuanto podría estar involucrada en la hidrólisis del malatión y del malaoxón, y su pérdida dejaría al embrión sin una importante vía de detoxificación. Aunque la actividad aliesterasa medida con p-nitrofenilbutirato, como se realiza en el presente trabajo, no siempre refleje la actividad de las carboxiesterasas específicas de estos xenobióticos, la mayoría de los trabajos existentes en la bibliografía se han

realizado con extractos crudos usando sustratos inespecíficos (Walker y Thompson, 1991). Se ha propuesto que las carboxiestearasas serían blancos secundarios ya que son inhibidas por estos compuestos, y se considera que tanto la carboxilesterasa como la acetilcolinesterasa han evolucionado de una carboxilesterasa primitiva presente filogenéticamente en reptiles (Walker y Thompson, 1991). Estas enzimas han sido consideradas como responsables de la resistencia a plaguicidas organofosforados, carbamatos y piretroides en un importante número de insectos (Oppernooth, 1985).

También se observan alteraciones relacionadas con el contenido proteico. El descenso relativo del contenido proteico de la fracción estudiada parece ser consecuencia de una interferencia en el mecanismo de redistribución del material almacenado en las plaquetas vitelinas, ya que no hemos detectado diferencias significativas en el contenido proteico del homogenato entero tanto de embriones controles como de los tratados, pero si en la fracción sobrenadante a 10000 x g (figura 17b).

Otro efecto importante detectado es la aparición en esa fracción de un péptido de 27000 daltons (figura 19). No hemos caracterizado aún este péptido pero presumimos que podría tratarse de una proteína inducida por el malatión, involucrada en la metabolización del mismo, pudiendo ser un componente normal de la fracción que sedimenta a 10000 x g, que se relocalizaría por efecto del plaguicida. Otra explicación posible es que se trata de un péptido degradado rápidamente en las muestras de los embriones controles durante la homogeización y el fraccionamiento. Esta última posibilidad supone una menor actividad, en los embriones expuestos, de una proteasa específica para dicho péptido. Se ha informado una disminución de la actividad de proteasas que estarían relacionadas con un mayor potencial teratogénico de los compuestos organofosforados (Wenger, 1974), y que la inanición provocada por la caída de la actividad proteolítica en ratas sería la causa de deformaciones congénitas (Freeman y Lloyd, 1983). En cualquier

caso, es destacable que embriones y larvas desarrollados en solución Ringer no presentan el péptido en cuestión. Es importante señalar que la unión de malatión a otras enzimas que no condicionan la supervivencia de la larva como lipasas y proteasas puede ser considerado un mecanismo de detoxificación ya que reduce la disponibilidad de malatión para interactuar con el blanco primario (Rosenbaum y col., 1988).

Finalmente, también se observó una reducción del número de receptores muscarínicos en larvas de *Bufo* tratadas con malatión.

El receptor muscarínico de acetilcolina se encuentra distribuido en todo el reino animal (Murray y col., 1985; Mpitsos y col., 1988), y es el principal receptor colinérgico del sistema nervioso central en mamíferos, aunque también se lo encuentra a nivel periférico (Fields y col., 1978; Honkanen y Abdel-Latif, 1988; Bylund y col., 1982). Este receptor pertenece a una super - familia de receptores que poseen 7 pasos transmembrana y están asociados a proteínas G. Se incluye en esta familia a los receptores adrenérgicos, serotorinérgicos receptores K, rodopsina y opsina. Mediante técnicas de biología molecular se han podido identificar 5 sub-tipos llamados  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $m_4$  y  $m_5$  (Eldefrawi y col., 1971). Ha sido caracterizado en distintos tejidos de muchas especies de insectos y animales (Holmes y Masters, 1967; Kehoe, 1972; Jones y Sumikawa, 1981; Salvaterra y Foders, 1979), principalmente por el método descrito por Yamamura y Snyder (1974a), de unión de quinuclidilbenzilato tritiado, que es el que hemos usado en esta tesis. Se informan valores de  $K_d$  que oscilan entre  $5 \times 10^{-8}$  M y  $1,5 \times 10^{-6}$  M según el origen del tejido en estudio, en nuestro caso el valor de  $K_d$  observado fue de  $2 \times 10^{-10}$  M.

Se ha descrito, en retina de aves, cambios en las características del receptor durante la sinaptogénesis (Large y col, 1985) y que la capacidad de unir QNB aparece durante el desarrollo embrionario, antes que el estímulo colinérgico mediado por dicho receptor, sin embargo, no se puede considerar que se halla estudiado a fondo este sistema durante el desarrollo embrionario a pesar de estos informes.

El tratamiento de la placa neuromuscular y la sinapsis colinérgicas con organofosforados como el paraoxón y el DFP aumenta la liberación de acetilcolina lo que produce la despolarización de la membrana post – sináptica. Sin embargo, a altas concentraciones de OP Bartels y Nachmanshon (1969) han descrito que la membrana se hiperpolariza sugiriendo una acción directa sobre la molécula del AChRn, (Bartels y Nachmanshon, 1969). Posteriormente se demostró que ligandos colinérgicos no se pueden unir al receptor tras una intoxicación por OP.

La exposición a bajos niveles de organofosforados lleva a una alta concentración de acetilcolina debido a la baja actividad colinesterasa (Schiller, 1979). Animales mantenidos en estas condiciones desarrollan tolerancia a la intoxicación aguda por estos plaguicidas (Rieder y col, 1952) y a agonistas colinérgicos (Mc'Phillips, 1969). Se ha sugerido que la misma se debería, al menos en parte, a una desensibilización de la membrana post-sináptica por descenso del número efectivo de receptores como respuesta al excesivo estímulo colinérgico (Ehlert y col, 1980), o por acción directa del xenobiótico sobre el receptor (Costa y Murphy, 1985). En ratas, por ejemplo, algunas zonas del cerebro pierden capacidad de unir [<sup>3</sup>H]QNB al ser tratadas con diisopropilfluorofosfato, aunque no todas se ven afectadas (Churchill y col., 1984; Gazit y col. 1979).

Los mecanismos conocidos para el desarrollo de tolerancia a organofosforados son varios. Entre otros, cambios en la velocidad de detoxificación, cambios en las características estructurales de las enzimas blanco o adaptaciones a los trastornos metabólicos producidos. La primera evidencia de una acción directa sobre el receptor fue descrita por Volpe y col. (1985) en cerebro bovino. Se ha observado en mamíferos cambios en el contenido de AChR muscarínico como respuesta a la intoxicación subaguda con organofosforados (Churchill y col., 1984). Estos cambios explican el desarrollo paralelo de tolerancia a agonistas muscarínicos, como una desensibilización de la membrana pos-sináptica ante el exagerado estímulo colinérgico.

Por otro lado, es muy poco lo que se ha informado sobre este receptor en estadios embrionarios de desarrollo, si bien experiencias de transformación en ovocitos de *Xenopus* que no poseen receptor endógeno, han permitido obtener líneas celulares que expresan solo un subtipo de receptor (Bonner, 1989).

Otra forma de reducir la sensibilidad de la membrana a la acetilcolina, es que el receptor sufra un cambio conformacional pasando a un estado de baja afinidad por el neurotransmisor. Esta situación podría darse por desensitización, habitual ante un estímulo colinérgico sostenido, o por acción directa del xenobiótico sobre el receptor.

Los resultados obtenidos hasta este momento nos permiten adelantar que larvas expuestas a bajos niveles de malatión desde su fertilización poseen una cantidad de receptores muscarínicos sumamente reducida, lo que sin duda representa un factor importante en su adaptación al medio contaminado. Este fenómeno no está necesariamente relacionado con un efecto directo del OP sobre el receptor muscarínico ya que los OPs aumentan la concentración de acetilcolina en la hendidura sináptica y una continua activación del receptor muscarínico estimula el "down regulation" del mismo. Por otra

parte, no parece haber cambios en la estructura del receptor ya que no observamos diferencias en la afinidad de la acetilcolina por el mismo entre las membranas de ambos orígenes (figura 26).

Resultados similares se han obtenido en ratones con tratamientos cortos, de 18 horas aproximadamente, con DFP que produce la reducción de la capacidad de unión máxima de [<sup>3</sup>H]-N-metilescopolamina sin afectar la afinidad por la droga (Cioggi El-Fakahany, 1988) y con otros organofosforados tales como paraoxón (Smith y col., 1980) y desulfotón (Costa y Murphy, 1982).

Si bien este mecanismo parece ser muy importante en el desarrollo de la tolerancia a OP no podemos descartar la existencia de otros sistemas de neurotransmisores involucrados en el mismo proceso como ocurre en otras especies (Sivam y col., 1983). En nuestro laboratorio, Anguiano y col. (2001) han demostrado que la importante actividad detoxificante de las GSH-S-T constituyen también un mecanismo de tolerancia para los embriones de anfibios.

El efecto de los insecticidas organofosforados sobre distintas actividades enzimáticas, particularmente esterasas, ha sido bien documentado (Moss y Deutsch, 1965). Nuestros resultados durante el período embrionario y larval del sapo se ajustan a estos informes y decidimos extender el análisis al sapo adulto para identificar la validez de estos mismos blancos en tejidos adultos. Se observan una mayor inhibición de las actividades consideradas en los animales sometidos a tratamiento agudo (Tabla VII). Durante el tratamiento crónico, seguido en este experimento, los animales son capaces de contrarrestar el efecto de la intoxicación, ya sea por detoxificación o por reposición de las actividades afectadas. Además teniendo en cuenta que el malatión no actúa

directamente sino después de haber sido transformado en malaoxón, el tiempo transcurrido desde la aplicación del plaguicida en el ejemplar experimental agudo, demostró ser suficiente como para metabolizar una cantidad de malatión que alcanza a provocar el cuadro agudo.

Las mayores inhibiciones que determinamos se presentaron en los hígados si bien el blanco principal de estos compuestos es la acetilcolinesterasa cerebral, pero la accesibilidad del malaoxón formado a la enzima cerebral es sin duda más dificultosa que a la enzima del parénquima hepático.

Los hígados de los animales tratados con malatión presentan, en la fracción estudiada, un mayor contenido de polipéptidos de 12000 y 15000 daltons que los correspondientes controles. Descartamos la posibilidad que se trate de proteínas inducidas por el plaguicida porque aparecen en un período de tiempo muy corto en el animal sometido a tratamiento agudo (figura 28). El análisis por electroforesis en condiciones desnaturilizantes de la fracción sedimentada durante el fraccionamiento, revela que no se trata de un proceso de relocalización (figura 29). Nuevamente aquí se plantea la posible existencia de una actividad proteasa específica reducida en los animales tratados, al igual que en las larvas, lo que impediría la degradación rápida de los péptidos que dan origen a dichas bandas en los animales controles, fortaleciendo la hipótesis de su participación en las propiedades teratogénicas del malatión. Esta posibilidad puede explicar las propiedades teratogénicas del insecticida de acuerdo a Wenger (1974) y a Freeman y Lloyd (1983).

De todas formas, más allá de los efectos específicos sobre los distintos sistemas enzimáticos descriptos, falta establecerse cuál es el efecto que determina la sensibilidad

al malatión en los embriones de *Bufo arenarum*, Hensel. Hemos podido demostrar que, sin duda, existe una relación directa entre la inhibición de AChE y muerte. Cuando se alcanza el 84% de inhibición de AChE se produce un significativo aumento de mortalidad, lo que nos conduce a analizar los parámetros cinéticos de esta enzima y sus posibles moduladores para explicar la alta tolerancia a plaguicidas organofosforados de la especie.

## 4 ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE ACETILCOLINESTERASA

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Los organofosforados inactivan la enzima uniéndose covalentemente a un resto esencial de serina, a través de un proceso que se ajusta al modelo de inactivación en dos etapas propuesto por Kitz y Wilson (1962). Básicamente, se trata del mecanismo similar a la hidrólisis del sustrato natural, aplicado sobre la molécula del organofosforado, donde la segunda etapa procede a una velocidad insignificante dejando la enzima arrestada en forma de fosforil-enzima. De acuerdo a esto se formaría un complejo no covalente entre el xenobiótico y la enzima rápida y reversiblemente, que lentamente se transformaría en complejo estable e inactivo.

El modelo propuesto por Kitz y Wilson (1962) para la inactivación de enzimas por reactivos modificadores de aminoácidos parte del supuesto que la reacción cursa con la formación de un intermediario no covalente de acuerdo con el siguiente esquema:



Donde E es la enzima, I el inactivador, E.I el complejo no covalente y EI el complejo covalente.

Si se considera la primera etapa reversible y rápida y la segunda lenta e irreversible, las ecuaciones que describen el modelo, que desarrollamos en la introducción (ver ecuaciones 11 y 12, pag 42), son las siguientes:

$$\ln\left(\frac{[E_T]}{[E_T] - [E \cdot I]}\right) = k_{obs} \times t \quad (13)$$

Donde:

$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i + [I]} \quad (14)$$

De manera que la reacción es de pseudo primer orden respecto de la actividad enzimática. En el caso límite de una ecuación cinética bimolecular simple,  $K_i \rightarrow \infty$ , quedando:

$$\lim_{[I] \rightarrow 0} k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i} \quad (15)$$

Reordenando la ecuación 14 y considerando el tiempo de vida media para la actividad enzimática:

$$\frac{1}{[I]} = \frac{k_i t_{0,5}}{K_i \ln 2} - \frac{1}{K_i} \quad (16)$$

Al representar gráficamente la ecuación 16 se tendrá una recta cuya ordenada al origen es  $-1/K_i$ , y su pendiente  $k_v/K_i$ . Dicha recta pasará por el origen de coordenadas solo cuando  $K_i$  sea infinita en el caso de una reacción bimolecular simple (Kitz y Wilson, 1962).

La determinación de estos parámetros cinéticos no solo permitió explicar las diferencias de  $CI_{50}$  observadas en diversas especies (Wang y Murphy, 1982b), sino también algunos mecanismos de tolerancia basados en la biosíntesis de acetilcolinesterasa modificada con menor afinidad por el insecticida o menor velocidad de transformación en complejo covalente (Oppenoorth, 1984).

Como ya dijimos, de acuerdo a este modelo, la inactivación *in vitro* de la actividad acetilcolinesterasa por compuestos organofosforados, presenta una cinética de pseudo primer orden respecto de la actividad enzimática, y la velocidad de inactivación es función de la afinidad del tóxico por la enzima y de la velocidad de formación del enlace covalente responde a la siguiente ecuación :

$$v = k_v [Et][I]/(K_i + [I])$$

Donde  $v$  es la velocidad de inactivación,  $k_v$  la constante de velocidad de formación del enlace covalente,  $[Et]$  concentración de enzima no modificada covalentemente,  $[I]$  concentración de inhibidor y  $K_i$  constante de inestabilidad del complejo no covalente.

La principal consecuencia del modelo descrito estriba en el hecho que la velocidad de inactivación es saturable ya que la constante de pseudo primer orden es una función hiperbólica de la concentración del organofosforado, en donde el parámetro  $K_i$  es la constante de inestabilidad de la unión reversible del plaguicida al sitio activo. Precisamente,

como ya dijimos, diferencias entre los valores de  $K_i$  en distintas especies se han correlacionado con la diferente susceptibilidad a organofosforados (Wang y Murphy, 1982b) (Ver Tabla VI, pag. 38).

Valores de concentración inhibitoria del 50% de la actividad ( $IC_{50}$ ) calculados a través de este modelo se correlacionan perfectamente con los observados experimentalmente en sinaptosomas de mono, rata, pollo, peces y rana, lo que permitió explicar las diferentes susceptibilidades a plaguicidas en distintas especies de vertebrados como consecuencia de diversas características estructurales de las enzimas blanco (Wang y Murphy, 1982b). Esta variedad en los valores de  $IC_{50}$  había tratado de justificarse sin éxito, en estos casos, como diferencias en la capacidad de metabolizar el tóxico y por la posible presencia de proteínas no críticas que sirvan de blanco alternativo (Wang y Murphy, 1982a). Cabe señalar que los organofosforados son algunos de las pocas clases de productos químicos con los que no se puede establecer una regresión lineal interespecies para la toxicidad aguda (Wallace, 1992).

Por otra parte, se ha observado en nuestro laboratorio que los embriones de *Bufo arenarum*, Hensel son muy tolerantes a la intoxicación aguda con plaguicidas organofosforados y organoclorados y que dicha resistencia se pierde en paralelo con las reservas lipídicas durante el desarrollo (Anguiano y col., 1998; Venturino, 1998). Se ha postulado que estos xenobióticos se disolverían en los lípidos de reserva separándose de esta forma de la fase acuosa, quedando así protegidos los blancos específicos de estos tóxicos (Llamas y col., 1985; Venturino y col., 1988; Caballero de Castro A., 1999). Con el fin de analizar la posible acción protectora de los lípidos, estudiamos, en forma comparativa, la inactivación de una enzima purificada y la del homogenato de embriones en presencia del fosfolípido

fosfatidil colina en el medio de reacción durante la inactivación *in vitro* de la actividad de AChE.

## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Inactivación de AChE de anguila por DFP

Para realizar estos estudios es necesario disponer de una cantidad importante de enzima purificada, por lo que se utilizó una enzima comercial, AChE de anguila, provista por SIGMA Chemical Co. y un organofosforado modelo como el DFP que si bien no tiene aplicación como plaguicida, es frecuentemente utilizado en ensayos de inactivación de esterasas y trabajos toxicológicos.

Frecuentemente cuando se caracteriza este sistema, se presenta una desviación respecto del modelo de Kitz y Wilson (1962) que consiste en una ordenada al origen distinta de cero en las representaciones semi-logarítmicos de la actividad relativa a la del control en función del tiempo. Esta anomalía ha sido habitualmente atribuida a la presencia de una forma de la enzima minoritaria, pero muy reactiva, que provocaría un decaimiento bifásico de la actividad, con una primer etapa muy rápida (Main, 1984; Wang y Murphy, 1982b). Esta explicación predice que la inactivación observada a tiempo cero es independiente de la concentración del reactivo inactivante, tanto en el medio de reacción, como en la cubeta de medida, ya que la proporción de la forma minoritaria más reactiva de la enzima no depende, en forma alguna, ni de la naturaleza ni de la concentración del inactivador, ni del protocolo utilizado. Sin embargo, en nuestros primeros trabajos encontramos que esta "inactivación rápida" depende más de la magnitud de la dilución del sistema de reacción en

el momento de detener la inactivación y comenzar la medida de actividad remanente, que de la partida de colinesterasa utilizada (datos no mostrados). Por esta razón, introdujimos un control de tiempo cero, en el que se agregó el sustrato antes que el inactivador. La actividad relativa a este nuevo control se ajusta bien al modelo de inactivación de Kitz y Wilson (1962) (Figura 30). El protocolo utilizado permite obtener muestras en un rango de tiempo de un segundo en adelante. Sin embargo, no es posible abarcar todo el rango de concentraciones de DFP que sería deseable por la gran velocidad de la inactivación a  $[DFP] = 1,4 \text{ mM}$  o mayores. El valor establecido de  $K_i$ , en estas condiciones, es de  $1620 \pm 150 \mu\text{M}$  y de  $k_i$  es de  $0,15 \pm 0,02 \text{ seg}^{-1}$ .

Por otra parte, el control de tiempo cero mostró una actividad que es menor conforme aumenta la concentración final de DFP. De hecho, esta inhibición a tiempo cero resultó ser una función de la concentración de DFP que recuerda a la hiperbólica (figura 31).

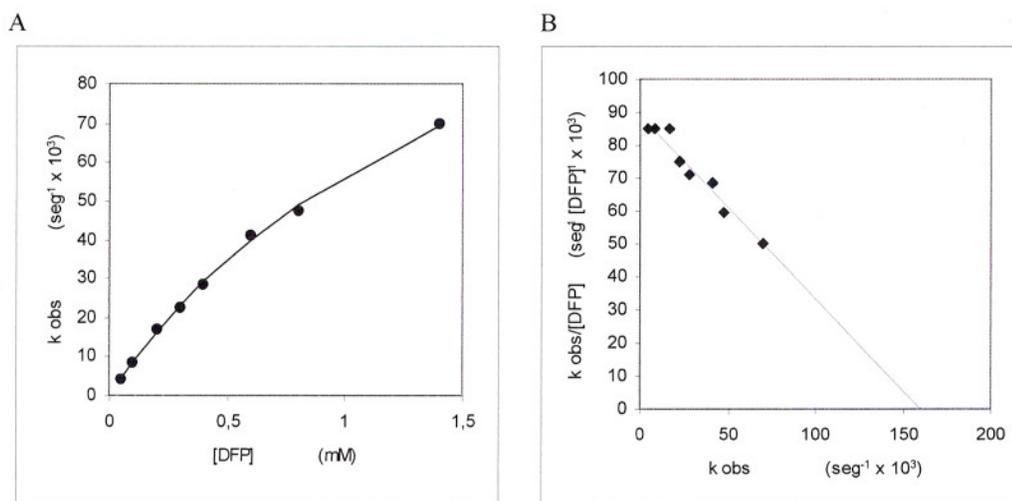


Figura 30: Inactivación de AChE de anguila por DFP. El protocolo de medida utilizado se describe en materiales y métodos.

- A)  $k_{obs}$  vs concentración de DFP durante la reacción de inactivación.
- B) Representación de tipo Scatchard.

Ese hecho no puede deberse a una inactivación rápida porque la pérdida de actividad a tiempo cero es solo una fracción discreta de la del control, a pesar de que el DFP, en todos los casos, alcanza para inactivar la enzima por completo.

En todos los casos, el registro de absorbancia fue lineal con el tiempo, por lo que la inactivación no progresa durante la medición, que usualmente es de 3 min. aproximadamente. Por lo tanto, la dilución del DFP y la presencia de acetilcolina son medidas suficientes para proteger la AChE de la inactivación. Esto significa que la pérdida de actividad inicial es un proceso concluido al empezar a registrarse la absorbancia.

Finalmente, como ya dijimos, una explicación basada en dos formas de la enzima, una muy reactiva, en menor proporción, y otra, mayoritaria, menos sensible sería suficiente si la fracción inactivada a tiempo cero fuera siempre la misma, pero este no es el caso.

El fenómeno puede ser la consecuencia de una inhibición no inactivante de la enzima, en la cubeta de medida. En esta, como ya dijimos, la inactivación no avanza porque el registro de absorbancia es lineal dentro del lapso utilizado para medir la actividad. No obstante, la actividad observada a tiempo cero de inactivación, es menor cuanto mayor es la concentración remanente de DFP.

Estudiamos la posibilidad de que el fenómeno se debiera a una inhibición reversible y rápida, dependiente de la concentración final del inhibidor en el medio de medida. La inhibición de la actividad AChE ante el agregado de DFP en la cubeta de medida es la misma que la ejercida sobre el control de tiempo cero, en el ensayo de inactivación. Las diferencias observadas son compatibles con el error de medida, teniendo en cuenta que el procedimiento en ambos casos fue significativamente diferente (figura 31). Incluso en el hecho de que, tras la inhibición inicial, no hay una inactivación progresiva evidente en el lapso en que se efectuaron las medidas hay una prueba clara que se trata de una inhibición rápida y reversible. Es interesante destacar que el 50% de la inhibición reversible se logra a  $[DFP] = 6 \mu M$ .

Estos resultados sugieren la existencia de, al menos, un sitio de unión de DFP, distintos al sitio activo, con una afinidad de aproximadamente  $6 \mu M$ . Esta afinidad es significativamente diferente al valor de  $K_i = 1620 \mu M$  correspondiente a la formación del complejo no covalente en el sitio activo (ver figuras 30 y 31).

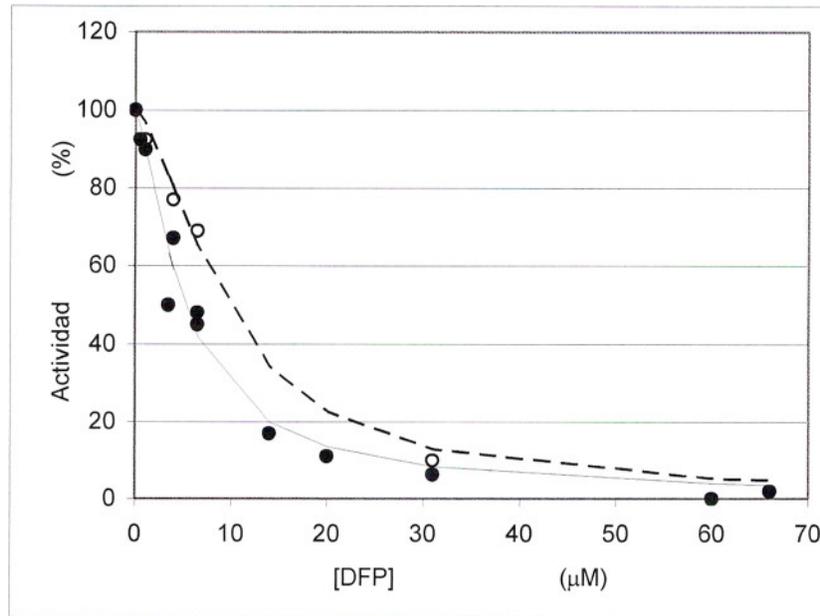


Figura 31: Inhibición de AChE en la cubeta de medida por DFP. Por un lado, se graficó la relación entre el control de tiempo cero y el de actividad descriptos en la figura 30. Por otra parte se agregó a la cubeta de medida de actividad 7  $\mu\text{l}$  de las soluciones de DFP usado en el experimento de la figura 30, que es la cantidad equivalente de solución acetónica trasladada a la cubeta de medida.  
(●) agregado directo. (○) DFP remanente en el control durante el ensayo de inactivación.

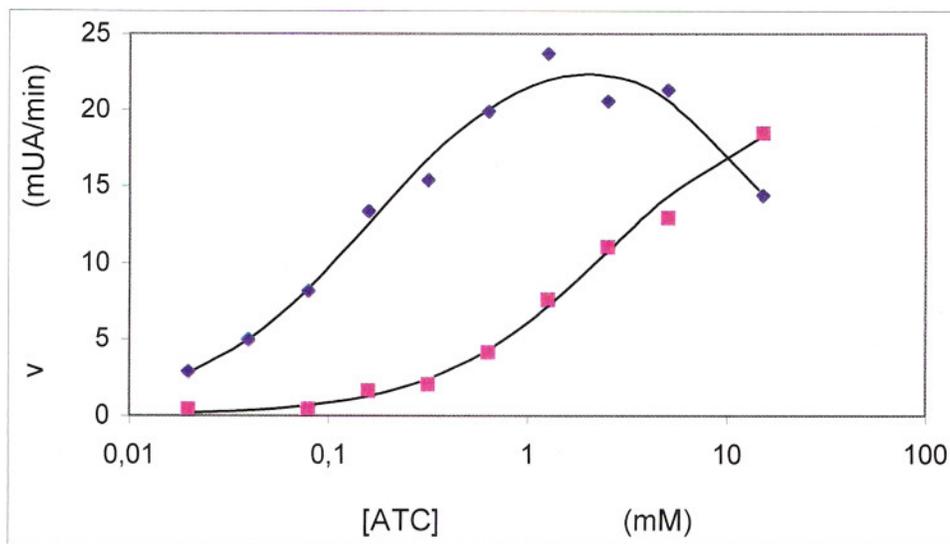


Figura 32: Representación semilogarítmica de la inhibición por DFP en la cubeta de medida en presencia de sustrato. (◆) Control (■) [DFP] = 10  $\mu\text{M}$

#### 4.2.2 Inactivación de la AChE de anguila por paraoxón

El DFP no es un organofosforado de uso comercial pero ha sido usado frecuentemente como modelo de este tipo de compuestos. En principio, en relación con el mecanismo descrito en el párrafo anterior, se espera que otros organofosforados sean capaces de unirse reversiblemente a AChE, y su presencia en muestras de tejidos de animales podrían producir una inhibición reversible y rápida de AChE por unión no covalente, que no sería percibida en el análisis debido a la dilución practicada en la cubeta de medida. Por otro lado, hemos demostrado previamente que el paratión es incorporado por embriones de *Bufo* (figura 14, pag 64).

La forma activa derivada del paratión, el paraoxón, inactiva AChE de anguila siguiendo el modelo de inactivación de dos etapas descrito por Kitz y Wilson (1962). La dilución en el medio de medida en presencia de sustrato es suficiente para detener la inactivación de manera que no se perciben cambios en la actividad durante la medida.

Las figuras 33 (pag. 99) muestra la forma en que pierde actividad AChE de anguila expuesta a paraoxón. El proceso parece ser bifásico, y fue bien ajustado por la función siguiente

$$A = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad (17)$$

Donde  $A_1$  y  $A_2$  son actividades de dos formas de la enzima a tiempo cero de inactivación y  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes aparentes de inactivación de pseudo primer orden.

De la sola expresión de la función ajustada surge que, a diferencia del caso de DFP, aquí se pone de manifiesto que se trata de dos formas de la enzima que reaccionan a distinta velocidad, o bien de, al menos dos formas de diferentes actividades específicas ubicadas secuencialmente en el proceso de inactivación, especialmente porque los valores de  $A_1$  y  $A_2$  no dependen de la concentración del inactivador.

Por otra parte, la forma en que  $k_1$  y  $k_2$  dependen de la concentración de paraoxón indica que la forma menos sensible de la enzima tiene un  $K_i$  mayor a 2500 mg/l (9 mM), uno de los más altos valores observados para paraoxón y para cualquier organofosforado (ver tabla VI, pag. 38), y además, que la forma más sensible, 32% de actividad original, presenta una constante de pseudo primer orden que depende de la concentración de paraoxón de una forma que se corresponde a la ecuación 14 (pag. 89) sumada a un término proporcional a la concentración misma (ecuación 18 y figura 34, pag. 100).

$$k_1 = \frac{k_{i1}[I]}{K_{i1} + [I]} + k_i'[I] \quad (18)$$

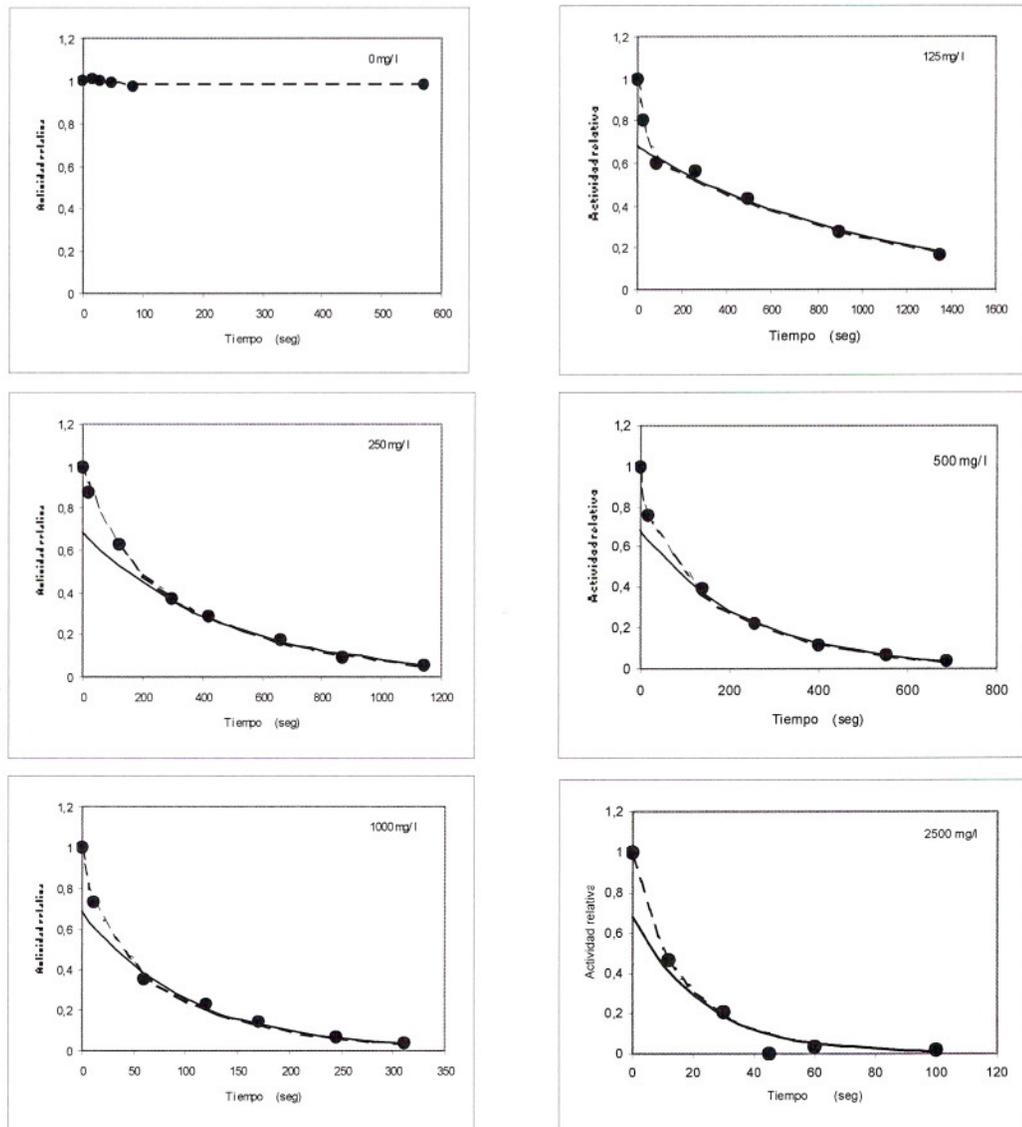


Figura 33: Evolución de la actividad AChE de anguila inactivada por paraoxón 250 mg/l. Los puntos corresponden a datos experimentales, la línea a trazos a la ecuación 17 (pag. 97) ajustada y la línea continua al segundo término de la misma ecuación.

El valor de  $K_{i1}$  parece estar entre 50 y 100 mg/l (de 180 a 360  $\mu\text{M}$ ),  $k_{i1}$   $7 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$  o  $4,7 \text{ min}^{-1}$  y  $k'$   $35 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}(\text{mg/l})^{-1}$ . La explicación más simple para este comportamiento es la de reacciones paralelas, donde  $k_i'$  es una constante de pseudo primer orden, posiblemente el resultado de otro cociente  $k_i'/K_{i1}$  donde  $K_{i1}$  fuera muy alto. Sin embargo, no es la única forma de interpretarlo y retomaremos la discusión más adelante (ver discusión final de esta tesis).

Por otra parte, la constante  $k_2$  de la ecuación 17 (pag 97) es proporcional a  $[I]$ . La constante de proporcionalidad parece tener un valor similar al de la constante  $k'$  en la ecuación 18 (pag 98).

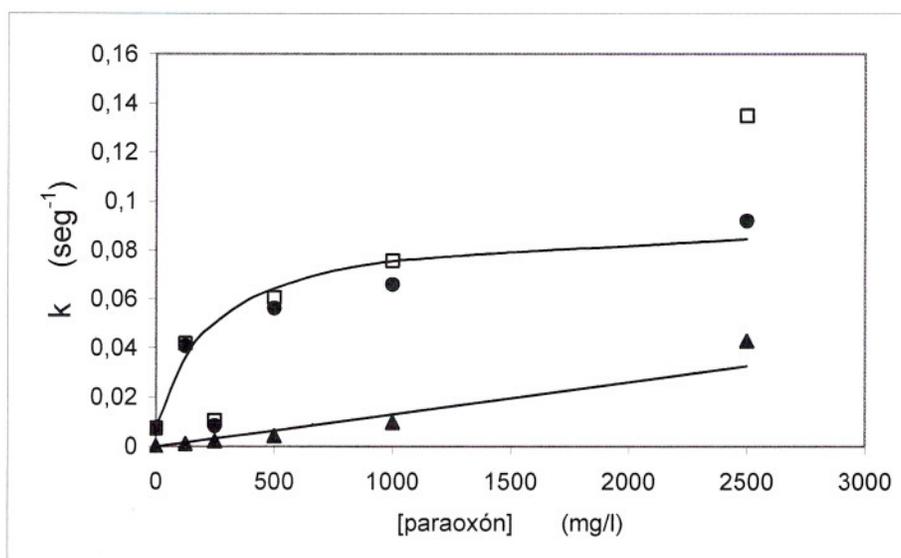


Figura 34: Representación de los valores de  $k_1$  ( $\square$ ) y de sus dos componentes, uno hiperbólico ( $\bullet$ ) y de el otro lineal ( $\blacktriangle$ ) de la ecuaciones 17 y 18 (pag. 97 y 98) y de las curvas que los ajustan. Los valores de  $k_1$  se obtienen por diferencia entre la pendiente al origen y los valores de  $k_2$ .

### 4.2.3 Efecto del paraoxón sobre AChE de larvas de *Bufo*

El efecto de paraoxón sobre la actividad de un extracto de larvas presenta algunas particularidades. En primer lugar, la actividad es mucho menos sensible a la inactivación por paraoxón que la proveniente de anguila, lo que seguramente contribuye a la baja sensibilidad de la especie al plaguicida.

En segundo lugar, la dilución en el medio de medida conteniendo sustrato no es suficiente para detener la inactivación, que continúa en la cubeta durante el acto de la medida, mostrando una pérdida de actividad que sigue una cinética de pseudo-orden uno respecto de la enzima. El sustrato no alcanza a competir eficazmente con el paraoxón diluido, aún presente en la cubeta de medida, para evitar la unión de éste al sitio activo. En estas condiciones se espera que la cinética de inactivación en la cubeta de medida sea de orden uno, con una constante de velocidad de inactivación que sea función, únicamente de las concentraciones de sustrato y de paraoxón remanente. En la figura 35 se muestra como cambia dicha constante con la concentración de paraoxón presente en la cubeta de medida. Este gráfico se obtuvo por exposición de la enzima al p-oxón en medio de medida sin que haya habido interacción previa. Es idéntico a controles de tiempo cero en un experimento de inactivación a todos los valores de concentración de p-oxón probados. En las condiciones de ensayo, el valor de la constante de reacción, obtenida a concentración infinita de POX, fue de  $5,76 \text{ min}^{-1}$ , y el de la  $K_i$  aparente de  $390 \text{ mg/l}$ , aproximadamente ( $1,4 \text{ mM}$ ). La relación  $k_i/K_i$  resulta ser de  $0,015 \text{ min}^{-1} \text{ mg/l}^{-1}$ .

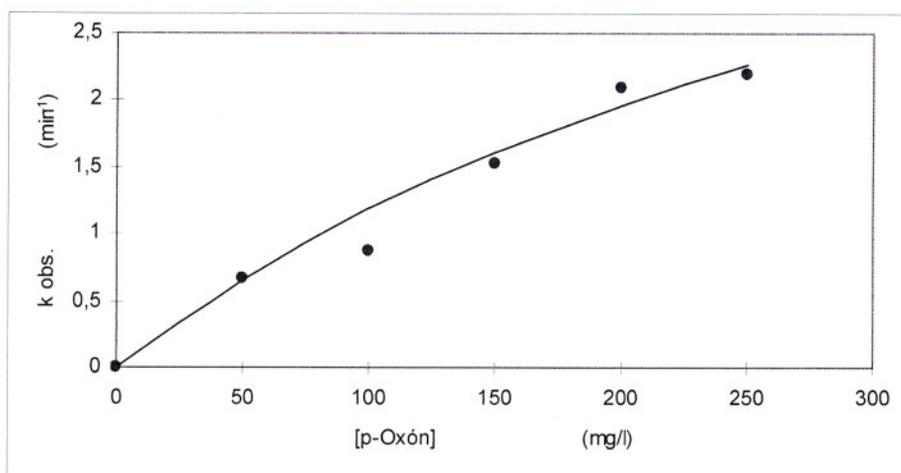


Figura 35: Valores de  $k_{obs}$  para la inactivación de AChE durante la determinación de actividad en muestras provenientes del medio de reacción de paraoxón y extracto de larvas, en las condiciones de medida. Estos datos se obtuvieron a partir del registro de absorbancia en función del tiempo durante la medida de actividad AChE en presencia de paraoxón. No se expuso la enzima al inactivador en ausencia del sustrato. En cada caso se ajustó por mínimos cuadrados, a partir del registro para obtener cada valor de  $k_{obs}$ .

Sorprendentemente, el valor de dicha constante de inactivación, cambia con el tiempo de inactivación previo en el medio de reacción. La función es complicada, y parece tener una ordenada al origen distinta de cero, una fase ascendente y una fase descendente. (ver figura 36).

La ordenada al origen distinta de cero se debe a que hay inactivación en la cubeta de medida aunque no haya habido exposición previa de la enzima al p-oxón, y se justifica porque la presencia de sustrato y la dilución en el medio de medida no evitan la inactivación durante la determinación de actividad. De hecho, los datos que se muestran en la figura 35 se obtuvieron sin que hubiera inactivación previa, por lo tanto son, en si mismos, los valores de ordenada al origen en el tipo de representación usado en la figura 36.

Debido a que la fase ascendente es muy corta, solo se dispone de muy pocos datos. Por lo tanto, no podemos caracterizarla, ni analizar el aumento del valor de la constante observado para tiempos muy cortos de reacción.

La fase descendente si puede caracterizarse y es bien ajustada por una exponencial. En el marco del modelo de inactivación descrito por la ecuación 14 (pag. 89), puede explicarse como el resultado de la disminución de la concentración de paraoxón en el medio de reacción durante la inactivación, ya que es la única variable que puede modificarse durante esa etapa. Además, el tiempo de vida media para esta fase de aproximadamente 60 segundos para las dos concentraciones de p-oxón probadas sugiriendo que se producen como una propiedad inherente al medio de reacción

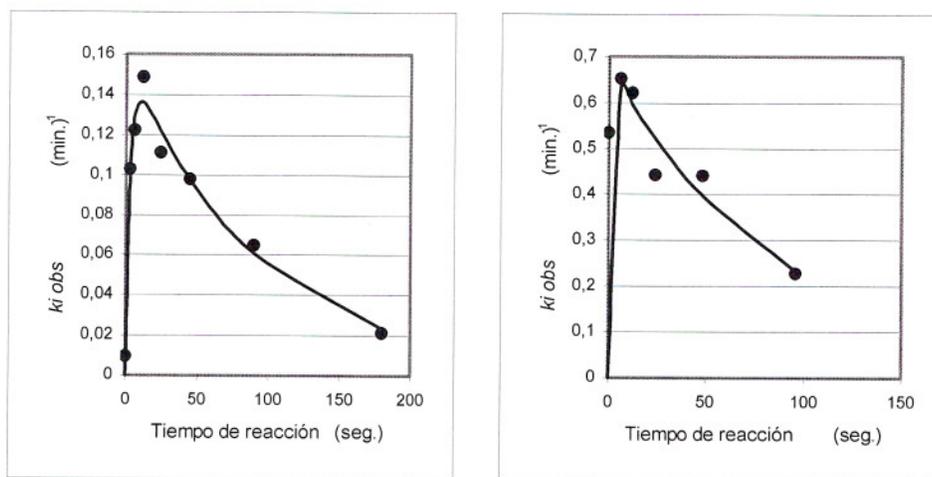


Figura 36: Evolución de los valores ajustados de las constantes de decaimiento de la actividad durante la medida de la misma, en función del tiempo de inactivación previo a la medida. A: Paraoxón 0,5% en el medio de reacción y 3 mg/l en el medio de medida. B: Paraoxón 1% en el medio de reacción y 6 mg/l en el medio de medida.

#### 4.2.4 Protección de la actividad AChE por lípidos

Usando AChE de anguila y de embriones, y con liposomas de fosfatidil colina puros a prueba, *in vitro*, la posibilidad de que la menor sensibilidad a la inactivación por organofosforados, de la actividad AChE de embriones, se deba a la presencia de lípidos en los cuales se particione el paraoxón, de manera que no quede disponible para interactuar con la enzima. Experiencias preliminares muestran que liposomas de fosfatidilcolina 1,2 mM son capaces de disminuir la inactivación de acetilcolinesterasa de órgano eléctrico de anguila (figura 37).

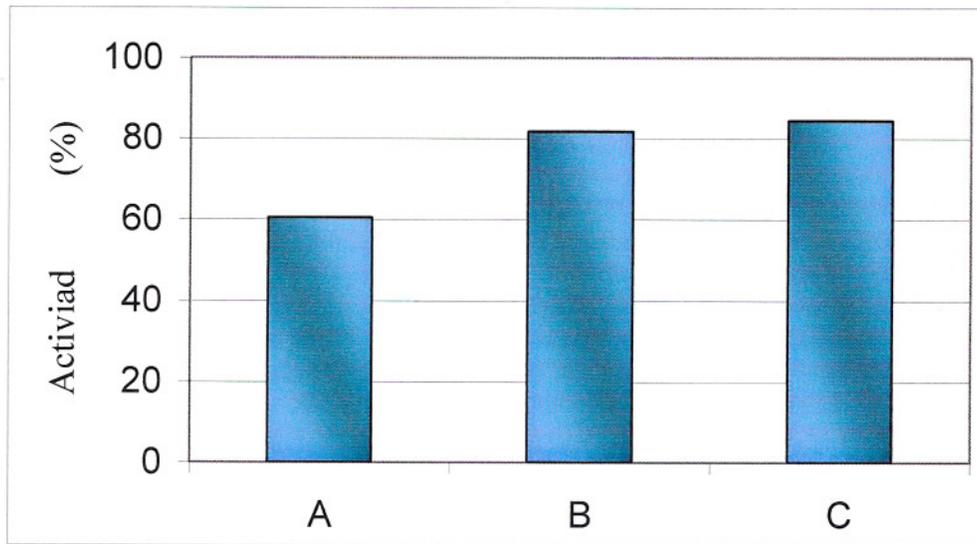


Figura 37: Efecto de DFP 50  $\mu$ M en solución SET sobre AChE de anguila en presencia de liposomas de PC 1,2 mM.

A: Se incubaron la enzima y el DFP durante 2 min. A los 90 seg. se agregó la suspensión de liposomas.

B: Se preincubaron los liposomas con el inactivador durante 15 min. Luego se agregó la enzima y se dejó reaccionar durante 2 min antes de medir.

C: Se pre-incubó la enzima en la suspensión de liposomas por 15 min. Luego se agregó DFP y se dejó actuar durante 2 min.

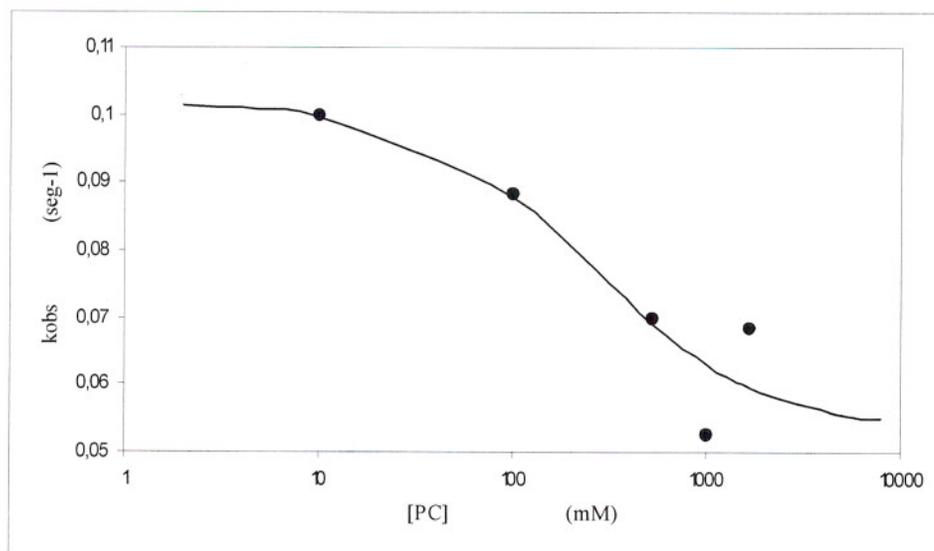


Figura 38: Efecto de liposomas de PC sobre la velocidad de inactivación de acetilcolinesterasa de anguila por DFP 50  $\mu$ M.

Liposomas de una concentración final de fosfatidilcolina de 0,7 mM redujeron la velocidad aparente de inactivación en un 17% aproximadamente. (figura 38).

Por otro lado, una concentración efectiva del organofosforado marcadamente diferente a la supuesta, afectaría a la estimación del valor aparente de  $K_i$  y no de  $k_i$ , ya que esta última es una constante de velocidad de 1er orden independiente de la concentración de inactivador y en cambio  $K_i$  es una constante de equilibrio (ver tratamiento matemático en la discusión de este capítulo, ecuaciones 19 y 20, pag 111). En el caso de AChE de homogenato de embriones, la enzima puede estar protegida del ataque de inactivadores por mecanismos que no involucren a la enzima directamente. La disolución en lípidos, actividades hidrolíticas o metabólicas, secuestro u oferta de blancos secundarios son algunos ejemplos

de alternativas posibles. En cualquier caso, cualquiera de estas formas de protección debería ser también efectiva para proteger una enzima exógena más sensible.

Como ya dijimos, AChE de sobrenadante de 10000 x g de embriones de *Bufo* es mucho menos sensible que la enzima de anguila en las mismas condiciones al igual que la enzima de larvas (sección 4.2.3). La exposición del extracto de embriones a paraoxón 500 mg/l dejó un 80 % de actividad remanente, mientras que solo quedó un 15 % de la actividad inicial en el caso de la enzima de anguila por exposición a 50 mg/l. (dato no mostrado).

Estudiamos la velocidad de inactivación de AChE de anguila y de embriones por separado y mezcladas (ver Tabla VIII).

Tabla VIII: Actividad antes y después de exponer a paraoxón, 200 mg/l, por 2 min AChE de anguila y de embriones de *Bufo* por separado y mezcladas. Los resultados se expresan en UI/ml  $\pm$  DS.

Fuente de la actividad	T <sup>(1)</sup> (min.)	
	0	2
AChE de Anguila	362,5 $\pm$ 11	0
Extracto de embriones	7,72 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 0,3
Mezcla	351,5 $\pm$ 11	6,4 $\pm$ 0,3

<sup>(1)</sup> Tiempo de reacción

El análisis de la inactivación de AChE de anguila y de embriones por separado y en una mezcla muestra que el homogenato de embriones no es capaz de proteger la actividad proveniente de anguila en las condiciones del ensayo (tabla VIII). Si la protección por lípidos se debe a que el tóxico se disuelve en los mismos, y reduce así significativamente su concentración en la fase acuosa, entonces, los lípidos involucrados en dicha protección no

se encuentran en esta fracción ya que, de acuerdo a la ecuación 19 (pag. 111), deberían haber protegido también a la colinesterasa de anguila. Sin embargo, la protección por lípidos también puede deberse a una acción directa de los mismos sobre la enzima anclada en la membrana, lo que es compatible con el hecho de que esté protegida solo la colinesterasa de embriones y no la de anguila. Entonces, si bien estos resultados no son concluyentes, indican que en los embriones la actividad AChE no es protegida por los lípidos, o el mecanismo de protección no es únicamente el primero de los descritos, o los lípidos involucrados en la protección están en la fracción sedimentada a 10000 x g, que incluye la fracción rica en plaquetas vitelinas, la que posee un 60% de los lípidos del embrión (Pechen de D'Angelo y col., 1974).

En cualquier caso, la enzima de embriones es, en si misma, menos sensible a organofosforados que la de otras especies, lo que contribuye a justificar, al menos parcialmente, una parte de la mayor tolerancia a estos compuestos que la especie tiene en comparación con otras. El ensayo de protección *in vitro* con la fracción de plaquetas vitelinas de embriones ricas en lípidos fue imposible de realizar por las características de esta fracción que posee un alto contenido en pigmentos que enmascaran la reacción con el DTNB del grupo tilo liberado en la reacción enzimática interfiriendo con la determinación de actividad ChE.

### 4.3. DISCUSIÓN

El DFP está descrito como un inactivador potente e irreversible de AChE. La constante de reactivación para AChE humana y del cerdo de Guinea inactivada con DFP es no detectable (Wilson y col., 1992). Sin embargo, no se describe a DFP como inhibidor reversible, no covalente.

Nuestros resultados muestran que hay, en colinesterasa de anguila, al menos un sitio de unión reversible para DFP diferente al sitio activo cuya presencia ha pasado inadvertida dado, que la gran dilución de la muestra en el medio de medida para los protocolos usuales de determinación de actividad AChE, es suficiente para revertirla por completo.

Desde el punto de vista básico, este hecho pone de manifiesto aspectos estructurales y de la mecánica de interacción entre DFP y la enzima no descriptos todavía.

En cuanto al aspecto analítico, es posible que, en aquellos casos en que se presenta, esta propiedad lleve a subestimar el grado de inhibición de AChE en una muestra biológica, y alcanza por si sola a justificar la inhibición a tiempo cero, que observan algunos autores, en experimentos de inactivación (Main, 1984; Wang y Murphy, 1982b).

Finalmente, de acuerdo a los valores observados, a 150  $\mu$ M DFP, AChE estaría un 90 % inhibida, pero la velocidad de inactivación sería solo el 5% de la máxima, como no es seguro que en condiciones fisiológicas ocurra lo mismo, ni que se presente el mismo efecto en colinesterasas de otros orígenes, la incertidumbre en el grado de inhibición, puede ser uno de los factores que contribuyan a la falta de correlación, que a veces se ve, entre el

grado de inhibición de la actividad AChE y los efectos observados, ya que no tiene porque presentarse para otros organofosforados, ni para AChE de otros orígenes.

Paraoxón no presenta el mismo fenómeno de inhibición reversible. De acuerdo a estos resultados, la preparación de AChE de anguila muestra sub-poblaciones de distinta sensibilidad frente a la inactivación por paraoxón. Más aún, la expresión 12, que describe la forma en que la constante específica de velocidad de inactivación de la forma más sensible cambia con la concentración de paraoxón, tiene dos términos, que ponen de manifiesto que esta sub-población está compuesta por dos formas de la enzima. Esto no implica necesariamente que se trata de colinesterasas diferentes. Puede deberse a asociaciones distintas o a entornos diferentes.

Con respecto al efecto de paraoxón sobre la AChE de larvas, si bien es conocido que las enzimas poseen propiedades específicas de acuerdo a su origen, es sorprendente la falta de protección por sustrato en el caso de la inactivación de AChE de larvas de *Bufo* en comparación con la enzima de anguila. Esto puede deberse a una mayor afinidad por el inactivador en el primer caso que en el segundo. Más sorprendente aún, es el hecho de que la velocidad de decaimiento de la actividad en la cubeta de medida, tenga una constante específica que, a su vez, decaiga con el tiempo de exposición de la enzima a paraoxón en el medio de reacción. Pero lo más llamativo, es que esto ocurra con un tiempo de vida media independiente de la concentración de paraoxón en dicho medio.

La forma más simple de explicar esto es que el paraoxón es consumido durante la etapa de inactivación de AChE. Para que esta sea una explicación consistente, como el descenso de *kobs* se ajusta bien a una exponencial descendente, es necesario que dicho des-

censo de concentración sea de orden uno, y que la  $k_{obs}$  sea proporcional a la concentración final de paraoxón. Para que se cumpla la primera condición, debe haber una actividad paraoxonasa, en el medio de reacción, para la que la concentración de paraoxón este muy por debajo del valor de  $K_m$  aparente en las condiciones de dicho medio, para que el descenso de su concentración sea de orden uno, o bien que el paraoxón esté pasando a otro compartimiento con una velocidad de retorno despreciable, como podría ser el caso de un secuestro por lípidos. La segunda de estas dos condiciones está asegurada por el hecho de que la concentración final de paraoxón en el medio de medida es de 3 y 6 mg/l, 0,75 y 1,5 % del valor de  $K_i$  (figura 35, pag. 102). La posibilidad de que se trate de una descomposición química no catalizada en las condiciones del ensayo, queda descartada porque la misma reacción no tiene lugar cuando se realiza el mismo experimento con AChE de anguila. Además, es muy significativo que en las dos concentraciones ensayadas, el valor de la constante de decaimiento haya resultado ser la misma, a pesar de que la concentración final de paraoxón sea en un caso el doble de la otra.

La acetilcolinesterasa es una proteína de membrana cuya actividad se ve notablemente afectada por el entorno anfifílico en que se encuentra. Lípidos polares, cationes, detergentes, o proteínas hidrofóbicas pueden alterar su actividad, su estabilidad, y su sensibilidad a la inactivación por plaguicidas. Resultados preliminares nos revelan que liposomas de fosfatidilcolina brindan cierta protección a la actividad acetilcolinesterasa ante la inactivación por DFP, usando enzima de órgano eléctrico de anguila (figura 38, pag. 105).

Nuestros resultados indican que la inactivación transcurre en dos etapas, con un intermedio no covalente de muy corta vida media, de aproximadamente medio segundo (figura 30, pag. 94).

Si la concentración del plaguicida en medio acuoso es una fracción “f” de la aparente debido a la presencia de micelas lipídicas ( $[I] = f \times [I]_{ap}$ ), la constante aparente de pseudo primer orden, como se la muestra en la ecuación 14 (pag. 89), se modifica quedando:

$$k_{obs} = \frac{k_v \times f \times [I]_{ap}}{K_i + f \times [I]_{ap}}$$
$$k_{obs} = \frac{k_v \times [I]_{ap}}{\frac{K_i}{f} + [I]_{ap}} \quad (19)$$

Lamentablemente, no podemos determinar el valor exacto de  $K_i$  para analizar si se modifica en presencia de lípidos, sin embargo trabajando a concentraciones de inhibidor mucho menores que  $K_i$  como es nuestro caso,  $k_{obs}$  resulta ser proporcional a “f”:

$$\frac{\lim(k_{obs})}{[I]_{ap} \rightarrow 0} = \frac{k_v \cdot f \cdot [I]_{ap}}{K_i} \quad (20)$$

Hemos observado que liposomas de fosfatidil colina brindan una protección limitada a la actividad AChE de *Torpedo* (figura 37, pag. 104) ante la inactivación por DFP.

Finalmente, debemos concluir que el sobrenadante post mitocondrial de 10000 x g obtenido de embriones *Bufo arenarum* Hensel, cuyo contenido lipídico es de aproximadamente 6 mM/mg de proteína (Pechen de D'Angelo y col., 1974), es incapaz de proveer protección a la enzima de órgano eléctrico de *Torpedo*.

La razón de la elevada tolerancia de esta especie ante la intoxicación por organofosforados puede residir en el alto valor de  $K_i$  de su AChE ante los mismos. Sin embargo, no podemos descartar *a priori* que *in vivo* los lípidos de los embriones absorban al plaguicida disminuyendo su concentración efectiva en el medio interno, y que los lípidos en el sobrenadante de 10000 x g tengan un efecto similar brindando una protección extra a AChE. Sin embargo, esto no puede ser demostrado para los lípidos del sobrenadante de 10000 x g de acuerdo a los resultados mostrados en la tabla VIII (pag. 106) de la experiencia *in vitro*. Sin embargo, debe señalarse también, el alto contenido lipídico de las plaquetas vitelinas que no están presentes en el sobrenadante de 10000 x g, pero que es *in vivo* un importante bioacumulador de organofosforados. En trabajos previos, Caballero de Castro (1999) demostró que malatión [ $^{14}\text{C}$ ] es incorporado en un 45 a 55% en esta fracción dependiendo del tiempo de incubación del plaguicida. En esta fracción subcelular se recuperó el 60% de los fosfolípidos totales del embrión y el 80% de las proteínas (Pechen de D'Angelo y col., 1974 ), por lo que la participación de esta organela en la detoxificación por secuestro del compuesto debe ser considerada.

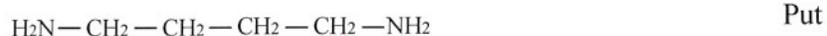
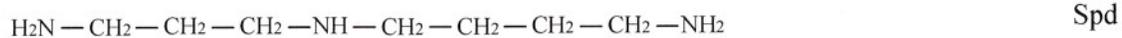
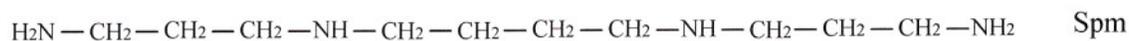
El conocimiento de los factores que afectan la sensibilidad *in vitro* de AChE a organofosforados en diferentes especies es importante para decidir cuan adecuado puede ser una especie como bio monitor. En este caso en particular, la alta tolerancia de los embriones y larvas de *Bufo arenarum* Hensel no permiten considerarlo como biomonitor sensible.

## **5 MODELO TEÓRICO DE LA CINÉTICA DE ACETILCOLINESTERA Y SU REGULACIÓN POR POLIAMINAS**

### **5.1 INTRODUCCIÓN**

Dado que se ha reportado que AChE es modulada también por poliaminas (Kossorotow, 1974), y que en nuestro laboratorio, se ha demostrado que Spm, Spd y en menor medida Put, potencian la toxicidad de malatión en embriones de anfibios llegando Spd 0,2 mM y Put 1 mM a reducir la dosis letal 50 del malatión a la mitad (Venturino y col., 1992), estudiamos y modelamos la modulación de AChE de anguila por poliaminas para disponer de un instrumento para interpretar las alteraciones del comportamiento cinético de la enzima frente a las alteraciones impuestas por plaguicidas.

Las poliaminas son policationes derivadas del metabolismo de aminoácidos y se encuentran en el citoplasma tanto de procariotes como de eucariotes. Intervienen en la regulación de la replicación, de la expresión y de la síntesis proteica. Interaccionan fácilmente con macromoléculas de carga negativa como ácidos nucleicos, polipéptidos y hasta con membranas fosfolipídicas. Spm, Spd y Put son tres ejemplos de esta familia de compuestos que se ilustran en la figura 39.



---

Figura 39: Estructura de las tres poliaminas mencionadas en el texto

La modulación por poliaminas resulta en un desplazamiento de la curva hacia la derecha y ligeramente hacia arriba, en la representación semi-logarítmica de la velocidad de reacción catalizada en función de la concentración de sustrato, resultando en un efecto inhibitorio a baja concentración y activador a concentraciones relativamente altas de sustrato y nuevamente inhibitorio a concentraciones extremas del mismo. Así, a primera vista, las poliaminas parecen afectar la cinética de AChE disminuyendo la afinidad del sustrato para ambos sitios de unión, aumentando ligeramente el valor de  $V_{\max}$  y transformando en total a la inhibición por sustrato. El efecto es más importante cuanto más grande es la poliamina, siendo muy pequeño para Put y más importante para Spm.

La característica cinética más destacable de AChE es la inhibición parcial por sustrato. Las expresiones matemáticas derivadas de los diversos modelos propuestos a lo largo de varios años son del tipo

$$v = \frac{\sum_{i=1}^n P_i [S]^i}{\sum_{j=0}^m Q_j [S]^j} \quad \text{para } m \geq n. \quad (21)$$

donde  $Q_0=1$ .

Resulta interesante establecer algunas características de esta función, como sus valores límites y la pendiente al origen.

$$\lim_{[S] \rightarrow 0} v = \frac{P_1}{Q_0} [S] \quad (22)$$

$$\lim_{[S] \rightarrow 0} \frac{\partial v}{\partial [S]} = \frac{P_1}{Q_0} \quad (23)$$

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} v = P_n / Q_m \quad \text{si } n = m \quad (24)$$

Si  $n < m$   $\lim_{v \rightarrow \infty} v = 0$ .

Nunca se presentó un modelo en que  $n > m$ .

La expresión matemática del modelo cinético de Wilson y Cabib (1956) para AChE descrito en la introducción tiene gran aceptación. De él se desprende una constante

cinética aparente asimilable al número de recambio en una enzima de cinética Micaléana a la que llamó *k<sub>cat</sub>* (ver ecuación 6, pag. 36).

$$\frac{\partial[P]}{\partial t} = \frac{\frac{k_3 k_2}{(k_3 + k_2)} [E_T] [S]}{\frac{k_3 (k_{-1} + k_2)}{k_1 (k_3 + k_2)} + [S]} \quad k_{cat} = \frac{k_3 k_2}{(k_3 + k_2)} \quad (25)$$

No sorprende que la expresión corresponda a una hipérbola equilátera pues el modelo no contempla en su expresión formal la inhibición por sustrato. El propio Wilson aplica una corrección arbitraria para compensar los efectos de la inhibición por sustrato (Wilson y Cabib, 1956). La expresión, en términos de la ecuación 21 (pag. 115) es  $n = 1$  y  $m = 1$  y no logra ajustarse a los resultados experimentales.

Los modelos más elaborados encontrados en la bibliografía llegan a expresiones matemáticas en las que  $n$  y  $m$  tienen un valor de 2.

Main y Rush en 1980, estudiaron la hidrólisis de ésteres de colina por carboxiesterasas de hígado de conejo oligoméricas y monoméricas. Contemplaron un modelo en dos etapas con interacción entre sitios, pero lo simplifican en un modelo de una sola etapa catalítica, o segunda etapa rápida, para el análisis cinético de esterasas en la hidrólisis de ésteres de colina (figura 40) (Main y Rush, 1980).

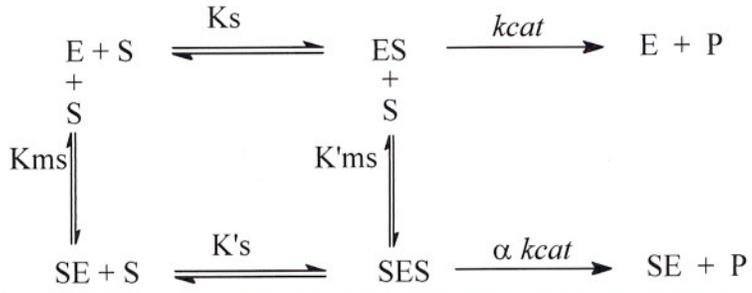


Figura 40: Modelo presentado por Main y Rush.

El modelo matemático asociado a este esquema es el siguiente

$$v = \frac{V_{max} \left( \alpha [S] / K'_{ms} + 1 \right)}{1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{[S]}{K'_{ms}} + \frac{K_s}{K_{ms}}} \quad (26)$$

Reordenando

$$v = \frac{\frac{V_{max}}{K_s} [S] + \frac{\alpha V_{max}}{K_s K'_{ms}} [S]^2}{1 + \left( \frac{1}{K_s} + \frac{1}{K_{ms}} \right) [S] + \frac{[S]^2}{K_s K'_{ms}}} \quad (27)$$

El supuesto más importante es que la etapa limitante de la reacción sea la primera. Por eso no aparecen constantes relacionadas con la segunda etapa que no existe en el marco de este modelo.

Radic y col. (1993) han considerado una inhibición parcial por sustrato en un modelo cinético de una sola etapa sin interacción entre sitios, para el análisis estructural de AChE, utilizando colinesterasas con mutaciones puntuales. Este modelo no contempla la existencia de una forma acetilada de la enzima ni una segunda etapa.

En el mismo trabajo los autores presentan otro modelo para interpretar el efecto de inhibidores de colinesterasa, con un sitio para el modulador sin restricciones en la interacción del mismo con el sitio activo, y sin sitio inhibitorio para sustrato, que tampoco tiene en cuenta la segunda etapa del proceso (Figura 41B, pag 120).

En el primer caso, el modelo matemático derivado, según los autores, en términos del tratamiento de estado estacionario de Brigs Haldane (Radic y col., 1993), donde  $K_m$  y la constante de inhibición  $K_{ss}$  están en términos de Michaelis Menten, no brinda un resultado adecuado por que existe una evidente actividad remante en la enzima saturada de sustrato unido a ambos sitios. El análisis del esquema mostrado en la figura 41 A es el siguiente

$$v = \left( \frac{1 + b[S]/K_{ss}}{1 + [S]/K_{ss}} \right) \left( \frac{V_{max}}{1 + K_m/[S]} \right) \quad (28)$$

Reordenando:

$$v = \frac{\frac{V_{max}}{K_m} [S] + \frac{b V_{max}}{K_m K_i} [S]^2}{1 + \left( \frac{1}{K_m} + \frac{1}{K_i} \right) [S] + \frac{[S]^2}{K_m K_i}} \quad (29)$$

Las exigencias más importantes de este modelo son, que no haya interacción entre sitios, es decir que la afinidad de cada sitio no dependa en absoluto de la presencia del sustrato en el otro, y que la primer etapa sea la limitante del proceso. La expresión 29 es muy similar a la ecuación 27 (pag. 117) obtenida a partir de Main y Rush (1980) por que dicho modelo cinético solo se distingue de este, además de una diferencia en la nomenclatura, en que este exige que no haya ninguna interacción entre sitios. Por lo que, en este caso, no aparecen diferencias entre las afinidades por el sitio inhibitorio en los términos de primer y segundo grado en el denominador.

El modelo usado por Radic y col. (1993) para interpretar la acción de moduladores, si bien no es explícitamente desarrollada por los autores, tiene la siguiente expresión matemática.

$$v = \frac{\frac{V_{\max}}{K_m} [S]}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S][I]}{\alpha K_m K_i}} \quad (30)$$

Esta ecuación es una hipérbola equilátera donde la  $V_{\max}$  y  $K_m$  aparentes son:

$$V_{\max \text{ ap}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad K_m \text{ ap} = K_m \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (31)$$

El modelo, tal como está presentado, tiene un valor de velocidad independiente de [I] para  $[S] = -\alpha Km$ , o sea que una vez ajustado a los datos experimentales, necesariamente las curvas obtenidas van a coincidir en dicho punto, que se pone de manifiesto en la representación doble recíproca.

Las imposiciones más importantes en este caso son que no haya inhibición por sustrato y que la inhibición sea estrictamente no competitiva, es decir que la afinidad del inhibidor sea la misma para la enzima libre que para el complejo ESc y que el complejo enzima – inhibidor no tenga nada de actividad y, nuevamente, que la primer etapa sea la que limita la velocidad de reacción.

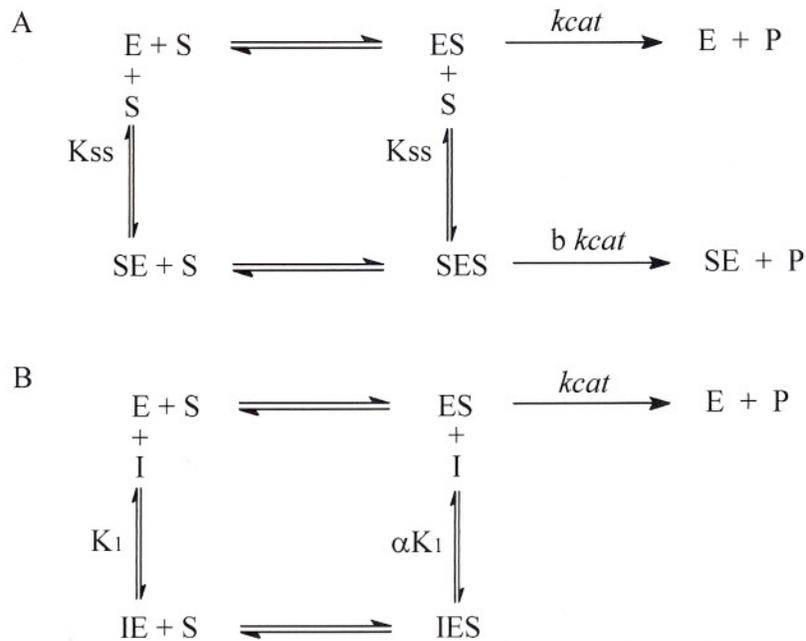


Figura 41: Modelos cinéticos utilizados por Radic y col. (1993) en el análisis de las propiedades cinéticas de AChE con una o más mutaciones puntuales. A: Esquema utilizado para el análisis de la inhibición por sustrato. B: Esquema utilizado para el análisis del efecto de inhibidores.

Las constantes faltantes están ausentes en el trabajo original.



La ecuación resultante es la siguiente:

$$v = \frac{V + V_i \frac{[S]}{K_i}}{1 + Q + \frac{Km}{[S]} + \frac{[S]}{Ki}} \quad (32)$$

Donde

$$V = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \cdot [E_T] = k_{cat} \cdot [E_T]$$

$$V_i = \frac{k_2 k_5}{k_2 + k_5} \cdot [E_T] = k_{cati} \cdot [E_T]$$

$$Km = \frac{k_3 (k_{-1} + k_2)}{k_1 (k_2 + k_3)}$$

$$Ki = \frac{(k_2 + k_3) \cdot (k_{-4} + k_5)}{(k_2 + k_3) \cdot k_4}$$

$$Q = \frac{k_{-1} \cdot k_4 \cdot k_5}{k_1 \cdot (k_2 + k_3) \cdot (k_{-4} + k_5)}$$

Reordenando la ecuación 32

$$v = \frac{\frac{V}{(1+Q)Km} [S] + \frac{V_i}{(1+Q)KmKi} [S]^2}{1 + \frac{[S]}{(1+Q)Km} + \frac{[S]^2}{(1+Q)KmKi}} \quad (33)$$

Estos autores también analizaron la posibilidad de la unión del sustrato a un sitio inhibitorio específico, para todos los estados posibles del sitio activo, tanto libre, como unido a sustrato o acetilado, sobre la base de propuestas anteriores, que sugieren una interacción sinérgica entre ambos sitios para sustrato. En principio, el esquema presentado en la figura 43 le asigna las mismas constantes, directa e inversa, a la unión del sustrato al sitio inhibitorio para los tres complejos en juego. No obstante esta restricción, al momento de modelar el sistema, consideran que el sitio inhibitorio solo puede ocuparse a partir de la enzima libre. Las ecuaciones resultantes son las siguientes.

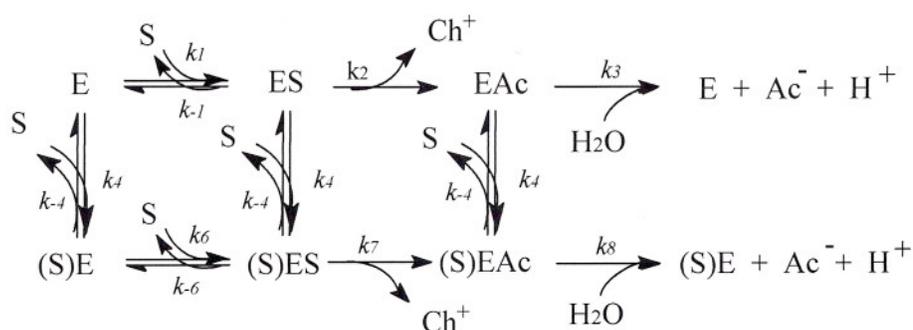


Figura 43: Esquema de mecanismo 3 del Hofer y Fingeli (1981). La unión del sustrato se produce a la enzima libre, al complejo enzima-sustrato y a la enzima acetilada. Pero, a los efectos de facilitar el análisis, se supone que dicho intercambio se produce solo para la enzima con el sitio catalítico libre.

$$v = \frac{V_1 + V_2 \frac{K_{m1}}{K_{m2}}}{1 + K_{m1} K_E + \frac{K_{m1}}{[S]} + \frac{K_{m1}}{K_{m2}} K_E [S]}$$

Donde

$$K_{m1} = \frac{k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_3)} \quad K_{m2} = \frac{k_8(k_{-6} + k_6)}{k_6(k_7 + k_8)}$$

$$V_1 = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [E_T] \quad V_2 = \frac{k_7 k_8}{k_7 + k_8} [E_T] \quad K_E = \frac{k_4}{k_{-4}}$$

La ecuación paramétrica correspondiente es la siguiente

$$v = \frac{C_1 + C_2[S]}{1 + \frac{C_3}{[S]} + C_4[S]} \quad (34)$$

y reordenando

$$v = \frac{\frac{C_1}{C_3}[S] + \frac{C_2}{C_3}[S]^2}{1 + \frac{[S]}{C_3} + \frac{C_4}{C_3}[S]^2} \quad (35)$$

Aunque los autores ajustaron por mínimos cuadrados los coeficientes de la ecuación resultante (35), expresamente indican que no intentaron obtener información sobre las constantes cinéticas, por la gran complejidad del modelo en comparación con el del mecanismo 2. Si bien este análisis es más riguroso que en los casos anteriores, por no suponer un estado de equilibrio y no ignorar la inhibición por sustrato, se pre-asignan valores de cero para las constantes de unión de sustrato al sitio Si en los complejos ES y E', y para las de sus co-

respondientes reacciones inversas para simplificar el análisis y aun así la complejidad final impide su uso en trabajos cinéticos (ver figura 43, pag. 123).

Taylor y Radic (1994) señalan que la inhibición por sustrato es una cuestión no resuelta porque los estudios cinéticos no distinguen entre las etapas de acilación y deacilación, presentan un esquema muy genérico, al que llaman esquema 3, y mostramos en la figura 44, pero lo usan con fines ilustrativos y solo resuelven para casos particulares donde se asume que la primer etapa catalítica es la limitante de la velocidad de reacción, y no desarrollan el análisis matemático del esquema completo.

En todos los casos en que se usa el modelo de tipo micaleano, los autores aclaran que para establecer el valor de los parámetros del modelo se debe trabajar a baja concentración de sustrato en la esperanza de que, en esas condiciones, la inhibición por sustrato sea despreciable, y así poder utilizar los métodos convencionales de linealización para estimar los valores de dichos parámetros como son el  $K_m$  aparente y la constante de catálisis  $k_{cat}$ . (Nachmansohn y Wilson, 1951; Rosenberry, 1975; Radic y col., 1993).

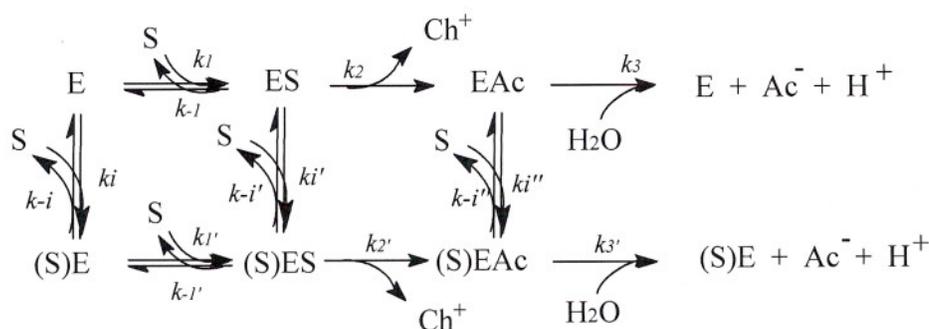


Figura 44: Modelo presentado por Taylor y Radic (1994). Difiere del "esquema 3" de Hofer y Fingeli (1981) en que no impone ningún tipo de restricción en el acceso del sustrato a los sitios de unión libres. Este modelo es mostrado con fines ilustrativos y se indica que el mismo no ha podido ser resuelto.

Di Cera y col. (1996) desarrollaron el mismo modelo para esterasas en general, moduladas por un ligando "L" pero sin inhibición por sustrato. Sin embargo, la ecuación paramétrica resultante es compleja y no es posible establecer el valor de las constantes a partir del valor ajustado de los parámetros. Los propios autores reconocen que carece de cualquier utilidad práctica.

Concretamente aplican el algoritmo de King-Altman que se basa en obtener las expresiones que corresponden a la concentración de cada uno de los complejos enzimáticos involucrados, como una relación entre una suma de términos relacionados con flujos parciales, que incluyan al complejo en cuestión, dentro del esquema de reacción y la suma de todos los términos correspondientes a todos los caminos de reacción abiertos posibles dentro del mismo esquema. Para este caso se trata de más de cien términos diferentes que son el producto de cinco constantes cada uno y las concentraciones de el sustrato y el ligando. La ecuación resultante es la siguiente.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = E_T k_{cat} \frac{(\alpha + [S])[S]}{(\beta + \gamma[S] + [S]^2)} \quad (36)$$

Donde

$$k_{cat} = \frac{A_0 + A_1[L] + A_2[L]^2}{B_0 + B_1[L] + B_2[L]^2}$$

$$\alpha = \frac{C_0 + C_1[L] + C_2[L]^2 + C_3[L]^3}{A_0 + A_1[L] + A_2[L]^2}$$

$$\beta = \frac{D_0 + D_1[L] + D_2[L]^2 + D_3[L]^3}{B_0 + B_1[L] + B_2[L]^2}$$

$$\gamma = \frac{E_0 + E_1[L] + E_2[L]^2 + E_3[L]^3}{B_0 + B_1[L] + B_2[L]^2}$$

Todos los coeficientes son  $A_i$ ,  $B_i$ ,  $C_i$ ,  $D_i$  y  $E_i$  son el resultado de la suma de varios términos, que a su vez son el producto de varias de las constantes cinéticas del modelo.

Reordenando la expresión 36:

$$v = \frac{\frac{\alpha}{\beta} [S] + \frac{1}{\beta} [S]^2}{1 + \frac{\gamma}{\beta} [S] + \frac{1}{\beta} [S]^2} \quad (37)$$

La expresión 37 es más restringida que la 21 para  $n = m = 2$ , porque impone la igualdad de ambos coeficientes de grado 2. En realidad, este sistema es más simple que el de colinesterasa porque no incluye inhibición por sustrato. Para convertirlo, bastaría con sustituir  $[L]$  por  $[S]$ . Pero esto saca del escenario una de las variables independientes, dejando dos polinomios de grado cinco, uno en el numerador y el otro en el denominador. Esto dificulta aún más la posibilidad de rescatar información sobre el valor de las constantes cinéticas a partir de un ajuste a datos experimentales.

Claramente, la complejidad del sistema hace que carezca de utilidad en cualquier esfuerzo para interpretar el funcionamiento enzimático.

### 5.1.1 MODELOS

Intentamos analizar nuestros resultados mediante un modelo que fuera capaz de absorber todas las alternativas previstas para acetilcolinesterasa. Analizamos varias alternativas para interpretar el comportamiento cinético de esta enzima, y su modulación por poliaminas, partiendo de la base de que hay una unión rápida de sustrato y ligandos en estado de equilibrio, seguida de la primera etapa de catálisis, en principio, limitante de la velocidad de reacción. Suponemos un sitio catalítico y un sitio inhibitorio para el sustrato y al menos un sitio unión para el ligando. Además, suponemos una libre interacción entre sitios, cuya magnitud queda definida por el ajuste del modelo a los datos experimentales. Cada uno de ellos arroja una ecuación paramétrica diferente que describe la cinética de la enzima con diferente eficiencia (Figuras 45 – 47, pag 130, 131 y 135).

Llamamos “2D” a un modelo que no incluye moduladores distintos al propio sustrato. Sirve de base para todos los modelos propuestos. Sus características principales se indican en la figura 45 (pag. 130).

El modelo “3D” supone la unión de dos moléculas de sustrato y una de ligando a la enzima (figura 45 y 46), y “4D” a otro parecido que supone la unión de una segunda molécula del ligando modulador (figura 47). La razón para estos nombres es que si se asigna una dimensión para cada reacción de unión, el primer modelo puede ser íntegramente representado en dos dimensiones, el segundo necesita tres y el tercero requiere un espacio de cuatro dimensiones para ser representado por completo (ver figuras 45 – 47).

Teniendo en cuenta que la enzima atraviesa por dos estados, y que cada uno de ellos es la base para cada una de las etapas de catálisis, también analizamos la posibilidad de aplicar un modelo ping-pong, asumiendo una interacción libre y rápida del sustrato por am-

dos sitios, salvo el catalítico en el caso de la forma acetilada, y del modulador por un solo sitio. Lamentablemente no es posible obtener información de un planteo como este.

Por último, el modelo mixto, que desarrollamos exhaustivamente más adelante, supone los dos sitios de unión para sustrato y uno para el modulador, todos ellos de acceso libre, para los que, las reacciones de unión, tienen lugar en equilibrio termodinámico. El proceso tiene lugar en dos etapas de catálisis consecutivas para las que es válido asumir que se encuentra en estado estacionario pocos instantes después de iniciada la reacción. Para la forma acetilada, también supusimos que el sitio inhibitorio de sustrato y el del modulador interactúan libremente y en equilibrio termodinámico con sus respectivos ligandos (figura 48, pag. 137).

En ninguno de estos casos fueron pre-impuestos valores definidos a la interacción entre sitios, ni valores determinados a las constantes de velocidad de catálisis.

*Modelo 2D:* El caso más simple que analizamos es el representado en la figura 45. En base al mismo, a las concentraciones de los distintos complejos a partir de la ley de acción de masas, al balance de masa de la enzima y tomando como la velocidad de reacción  $v = k_v [ES] + a k_v [SES]$ , se llega a la siguiente expresión 38 y tabla IX (pag. 131).

$$v = \frac{P_1[S] + P_2[S]^2}{1 + Q_1[S] + Q_2[S]^2} \quad (38)$$

Asumimos una libre interacción del sustrato con un sitio catalítico (Sc) y otro inhibitorio (Si).

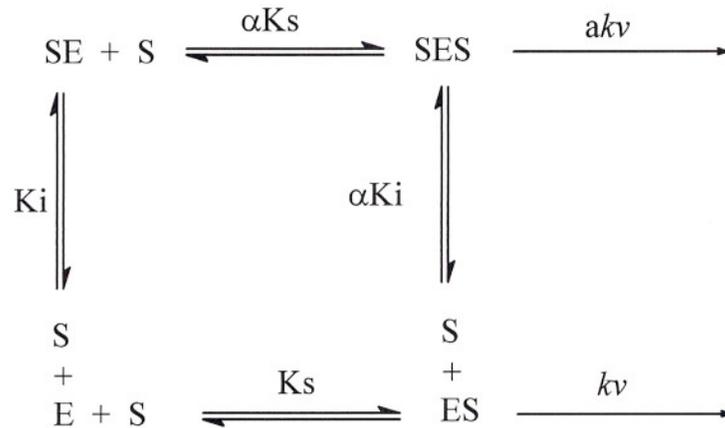


Figura 45: Modelo 2D. Modelo cinético de la interacción de AChE con su sustrato. La enzima tiene dos sitios de unión de sustrato de intercambio rápido. Uno de ellos es el sitio activo. Cualquier complejo que tenga el sitio activo ocupado puede producir la reacción y rendir los productos finales.

E representa la enzima libre, ES al complejo enzima-sustrato formado con el sitio Sc ocupado, "SE" corresponde a complejo con el sitio inhibitorio ocupado y "SES" con ambos sitios ocupados.

Ks y Ki son las constantes de inestabilidad de los complejos ES y SE respectivamente.  $\alpha K_s$  y  $\alpha K_i$  son los valores de las constantes de inestabilidad de la reacción de unión de S a los sitios Sc y Si, cuando el otro sitio se encuentra ocupado. " $\alpha$ " es la constante de interacción entre sitios. " $kv$ " es la constante de velocidad de reacción de transformación covalente del complejo ES y  $akv$  es la del complejo SES. " $a$ " es la relación entre las constantes correspondientes a ambas vías.

Tabla IX: Equivalencia entre los coeficientes de la ecuación 38 (pag. 129) y las constantes del modelo 2D.

	$Q_0 = 1$
$P_1 = V_{max}/K_s$	$Q_1 = 1/K_s + 1/K_i$
$P_2 = P_1 a/(\alpha K_i)$	$Q_2 = 1/(\alpha K_s K_i)$

**Modelo 3D:** Para modelar el efecto de poliaminas suponemos una libre interacción de las mismas con cada uno de los complejos del modelo 2D y la posibilidad que cada uno de los complejos que tienen el sitio  $S_c$  ocupado puedan reaccionar rindiendo productos finales. Los detalles del modelo se indican en la figura 46.

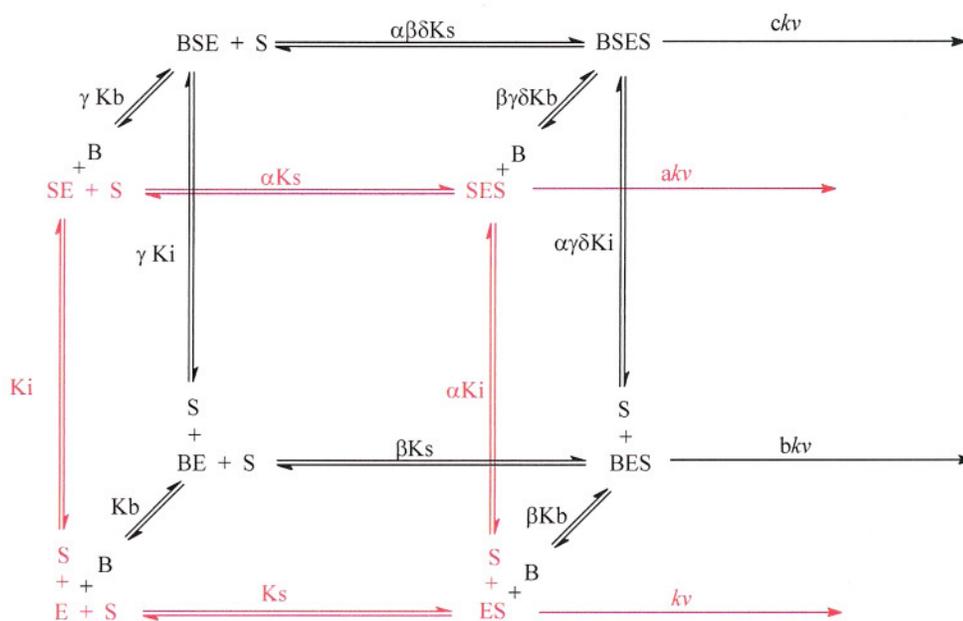


Figura 46: Modelo 3D. Básicamente es el modelo 2D igual al de la figura anterior, con un sitio de unión para poliaminas. En color se indican las reacciones en común con el modelo 2D. La letra "B" representa a la poliamina ya sea libre o formando parte un complejo. "Kb" es la constante de inestabilidad del complejo poliamina-AChE. "β", "γ" y "δ" tienen significado análogo al de "α" en la figura 45. "b" y "c" tienen significado análogo a "a" en la misma figura.

En base al esquema de la figura 46 y procediendo de la misma forma que para el modelo 2D usando como ecuación de velocidad a

$$v = kv ES + a kv SES + b kv BES + c kv BSES$$

se llega a la siguiente expresión:

$$v = \frac{P_{1,0}S + P_{1,1}SB + P_{2,0}S^2 + P_{2,1}S^2B}{Q_{0,0} + Q_{0,1}B + Q_{1,0}S + Q_{1,1}SB + Q_{2,0}S^2 + Q_{2,1}S^2B} \quad (39)$$

Los significados de los parámetro se indican en la tabla X.

Tabla X: Equivalencia entre los coeficientes de la ecuación 39 y las constantes del modelo 3D.

	$Q_{0,0} = 1$
	$Q_{0,1} = 1/Kb$
$P_{1,0} = Vmax/Ks$	$Q_{1,0} = 1/Ks + 1/Ki$
$P_{1,1} = P_1 b/\beta Ki Kb$	$Q_{1,1} = 1/\beta Ks Kb + 1/\gamma Ki Kb$
$P_{2,0} = P_1 a/\alpha Ki$	$Q_{2,0} = 1/\alpha Ks Ki$
$P_{2,1} = P_1 c/\alpha \beta \gamma \delta Ki Kb$	$Q_{2,1} = 1/\alpha \beta \gamma \delta Ks Ki Kb$

Al igual que el modelo de Wilson y Cabib (1965), el coeficiente  $P_1$  es  $Vmax/Ks$ , sin embargo en aquel no existen los términos que incluyan  $Kb$  y  $Q_1$  en aquel, es  $1/Ks(1+k_1/k_2)$ , pero en los modelos 2D y 3D la segunda etapa es mucho más rápida que la primera, entonces,  $k_2 \gg k_1$  y asumiendo esto último,  $Q_1$  queda igual a  $1/Ks$ . Es decir que los

modelos 2D y 3D no contemplan en Q1 a la segunda etapa, y el modelo de Wilson no tiene en cuenta la inhibición por sustrato.

Respecto del modelo de Main y Rush (1980), la ecuación de velocidad es la misma, teniendo en cuenta que estos autores no incluyen moduladores, llaman "Kms" a "Ki" y " $\alpha$ " a la constante "a", y no contemplan interacción entre sitios, es decir que para ellos  $\alpha = 1$ . Este último punto en particular, hace al modelo presentado por estos autores como un caso particular del 2D.

Por otra parte, el primero de los modelos usados por Radic y col. (1993), es parecido al presentado precedentemente, pero a la constante que nosotros llamamos "a" ellos la llaman "b", "Kss" a "Ki" y "Km" a "Ks" y, como no consideran interacción entre sitios, " $\alpha$ " igual a 1.

Finalmente, en el segundo modelo usado por estos autores, llaman "Ki" a lo que llamamos "Kb". Salvando estas diferencias de nomenclatura, este modelo es un caso particular del modelo 3D en el que  $a = 0$  y  $K_i, K_{ss}$  para Radic y col. (1993), es infinito. Así queda el numerador de orden 1.

Queda demostrado que los modelos analizados de la bibliografía son casos particulares del modelo 3D, en los que se han pre-impuesto distintas condiciones.

*Modelo 4D:* Como se indica más adelante, el modelo 3D no explica satisfactoriamente todas las observaciones realizadas. Desarrollamos una alternativa con dos sitios de unión para poliaminas al que llamamos modelo 4D ya que para representarlo completamente usando una dimensión espacial para cada ligando dicha representación tiene 4 dimensiones. La ecuación paramétrica (ecuación 40 y tabla XI, pag 132) se obtiene de la misma forma que la anterior agregando las concentraciones de los complejos con dos moléculas de poliamina unidas y sitio catalítico ocupado, multiplicados por  $k_v$  y su correspondiente constante de proporcionalidad.

$$v = \frac{P_{1,0}S + P_{2,0}S^2 + P_{1,1}SB + P_{2,1}S^2B + P_{1,2}SB^2 + P_{2,2}S^2B^2}{Q_{0,0} + Q_{0,1}B + Q_{0,2}B^2 + Q_{1,0}S + Q_{1,1}SB + Q_{1,2}SB^2 + Q_{2,0}S^2 + Q_{2,1}S^2B + Q_{2,2}S^2B^2} \quad (40)$$

Tabla XI: Equivalencia entre los coeficientes de la ecuación 40 y las constantes del modelo 4D.

	$Q_{0,0} = 1$
	$Q_{0,1} = 1/K_b + 1/K_g$
	$Q_{0,2} = 1/\rho K_b K_g$
$P_{1,0} = V_{max}/K_s$	$Q_{1,0} = 1/K_s + 1/K_i$
$P_{1,1} = P_1 (b/\beta K_b + d/\epsilon K_g)$	$Q_{1,1} = 1/\beta K_s K_b + 1/\gamma K_i K_b + 1/\tau K_i K_g + 1/\epsilon K_s K_g$
$P_{1,2} = P_1 f/\beta \epsilon \rho \phi K_b K_g$	$Q_{1,2} = 1/\beta \epsilon \rho \phi K_s K_b K_g + 1/\gamma \tau \rho \pi K_i K_b K_g$
$P_{2,0} = P_1 a/\alpha K_s K_i$	$Q_{2,0} = 1/\alpha K_s K_i$
$P_{2,1} = P_1 (c/\alpha \beta \gamma \delta K_i K_b + e/\alpha \epsilon \tau \mu K_i K_g)$	$Q_{2,1} = 1/\alpha \beta \gamma \delta K_s K_i K_b + 1/\alpha \epsilon \tau \mu K_s K_i K_g$
$P_{2,2} = P_1 g/\alpha \beta \gamma \delta \epsilon \rho \phi \tau \pi \mu K_i K_b K_g$	$Q_{2,2} = 1/\alpha \beta \gamma \delta \epsilon \rho \phi \tau \pi \mu K_s K_i K_b K_g$

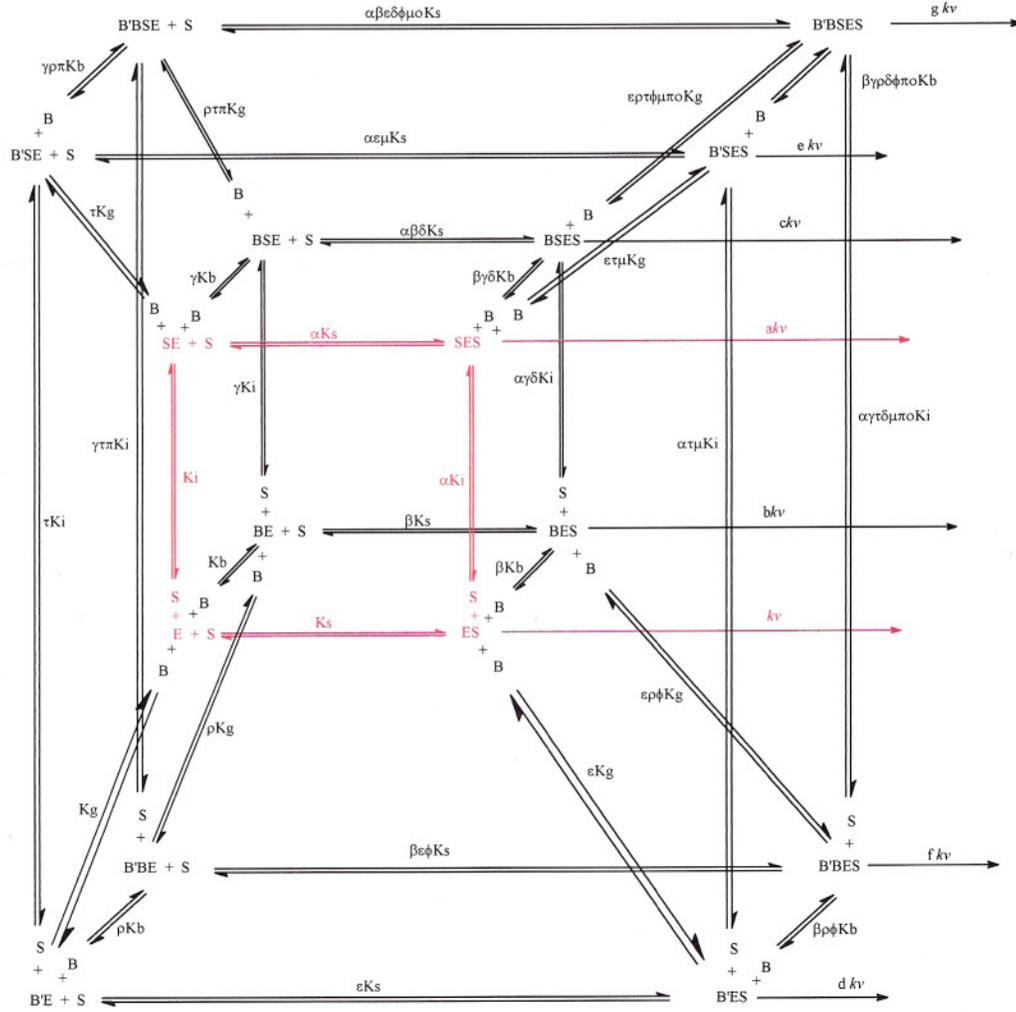


Figura 47: Modelo 4D. La enzima tiene dos sitios de unión de sustrato de intercambio rápido. Uno de ellos es el sitio activo. Además, cuenta con dos sitios de unión para poliaminas. Cualquier complejo que tenga el sitio activo ocupado puede producir la reacción y rendir los productos finales. En color se indican las reacciones en común con el modelo 2D. El significado de las constantes de equilibrio, constantes de interacción representadas con letras griegas y las constantes de proporcionalidad entre velocidades específicas de velocidad de reacción representadas con letras latinas minúsculas, es análogo al asignado en las figuras 45 y 46.

El modelo 3D es un caso particular de este, donde  $K_g$  es infinito y  $a'$ ,  $b'$ ,  $c'$ ,  $a$ ,  $b$  y  $g$  no existen y los términos que los tienen son nulos, por lo que valen las mismas consideraciones hacia los modelos presentados en la introducción.

*MODELO PING-PONG:* Los dos últimos modelos probados se ajustan más a la idea de mecanismo de reacción en dos etapas. Especialmente el modelo de tipo ping-pong debido a que la enzima cambia de la forma acetilada a la no acetilada, después de reaccionar con la acetilcolina y con el agua respectivamente. Sin embargo, como uno de los sustratos es el agua, y no es posible alterar su concentración sin cambiar drásticamente las condiciones del medio, resulta imposible ajustar todos los parámetros, por lo que lo deseamos.

*MODELO MIXTO:* Por este motivo, parece más adecuado centrarse en el modelo "mixto" para profundizar el estudio, ya que el mismo contiene todos los elementos generalmente aceptados para el mecanismo de acción de AChE, como son la reacción en dos etapas, intermediario acetilado, inhibición por sustrato y modulación alostérica por otros ligandos y se distingue del ping-pong en que la molécula de agua actúa sobre la enzima acetilada en una etapa, sin unirse primero en forma no covalente. Como ya dijimos, Taylor y Radic (1994) describen un modelo similar, más completo, en el que todas las interacciones se consideran en estado estacionario, incluso la formación de los complejos enzima-sustrato  $ES_c$  y  $ES_i$  y el complejo ternario  $ES_2$ , pero solo para un análisis cualitativo.

Resolver este modelo requiere aplicar el concepto de estado estacionario para establecer la cantidad de enzima que se encuentra acetilada, o más precisamente, para poner dicha cantidad en función de la cantidad de enzima total y de la concentración del sustrato y del

modulador. Hecho esto, y considerando todas las especies químicas en juego, se llega a la siguiente ecuación paramétrica, por un procedimiento similar a los casos anteriores.

$$v = \frac{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=0}^2 P_{i,j} [S]^i [B]^j}{\sum_{i=0}^3 \sum_{j=0}^2 Q_{i,j} [S]^i [B]^j} \quad (41)$$

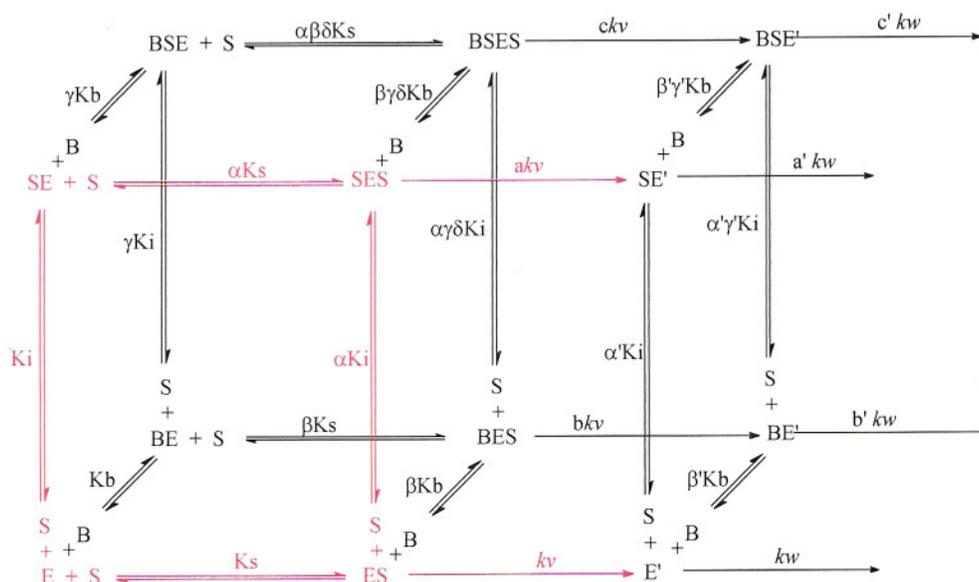


Figura 48: Modelo Mixto. La enzima tiene dos sitios de unión de sustrato de intercambio rápido. Uno de ellos es el sitio activo. Además, cuenta con un sitio de unión para poliaminas. Cualquier complejo que tenga el sitio activo ocupado puede producir la reacción y liberar tiocolina, o colina, quedando la enzima acetilada. El significado de las distintas constantes es similar al asignado en la figura 45, salvo que las constantes de proporcionalidad entre velocidades específicas de velocidad de reacción de la segunda etapa,  $a'$ ,  $b'$  y  $c'$  refieren a la descomposición de la enzima acetilada con los sitios  $S_i$  y  $B$  libres,  $kw$ . En color se indican las reacciones en común con el modelo 2D.

Esta expresión difiere de las de los modelos anteriores en el hecho de ser de grado 3 para el sustrato y grado 2 para la poliamina, tanto en el numerador como en el denominador. El significado de cada coeficiente, para este modelo puede obtenerse a partir de las tablas XIV, XV y XVI (pag. 145-147), y los discutiremos en la parte de resultados. En este caso, pueden hacerse reducciones al modelo 3D si se le impone que  $k_w \gg \gg k_v$ , pero no puede hacerse lo mismo con el modelo 4D porque este supone un segundo sitio de unión para poliaminas.

Tanto las expresiones de estos parámetros, como las de los coeficientes se muestran en las tablas XV y XVI respectivamente (pag. 146 y 147).

Algunas propiedades interesantes de esta función son las siguientes

$$\lim_{\substack{[S] \rightarrow 0 \\ [B] \rightarrow 0}} v = P_{1,0}[S] \quad \text{La pendiente al origen en ausencia de poliaminas es } P_{1,0}. \quad (42)$$

$$\lim_{\substack{[S] \rightarrow \infty \\ [B] \rightarrow 0}} v = \frac{P_{3,0}}{Q_{3,0}} \quad \text{Tras el ajuste tanto } P_{3,0} \text{ como } Q_{3,0} \text{ resultaron distintos a cero.} \quad (43)$$

$$\lim_{\substack{[S] \rightarrow \infty \\ [B] \rightarrow \infty}} v = \frac{P_{3,2}}{Q_{3,2}} \quad \text{Tras el ajuste } P_{3,1}, P_{3,2} \text{ y } Q_{3,2} \text{ resultaron ser cero.} \quad (44)$$

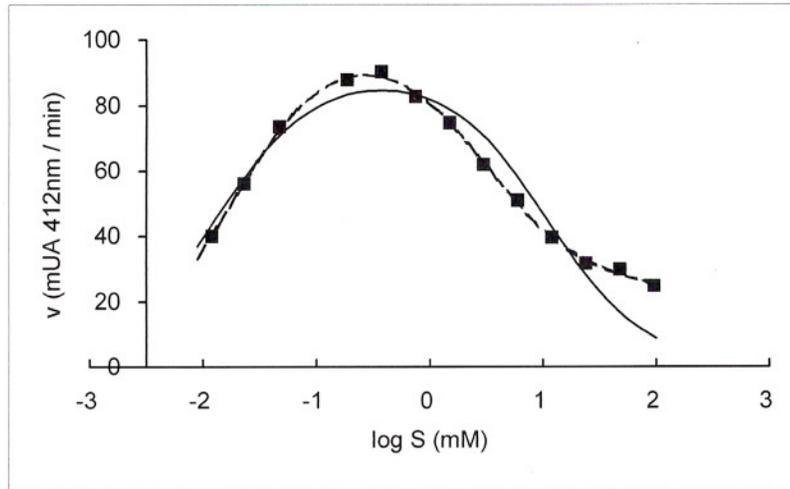
## 5.2 RESULTADOS

En primer lugar estudiamos la bondad de ajuste de distintos modelos derivados de la expresión 21 (pag. 115). Encontramos que la expresión más simple que ajusta con eficiencia es la que corresponde a  $n = 2$  y  $m = 2$ . Formas más simples como  $n = 1$  y  $m = 2$  no logran buenos ajustes bajo ninguno de los criterios de calidad de ajuste utilizados (Figura 49 y Tabla XII). Por otro lado, valores para  $n$  y  $m$  superiores a 3, no mejoran la calidad del ajuste bajo ninguno de los criterios ensayados.

Tabla XII: Ajustes hechos a los modelos paramétricos probados. Las ecuaciones paramétricas fueron ajustadas para seis experimentos independientes por métodos no lineales (Venturino, 1990). Se compararon los ajustes mediante tres criterios, suma de cuadrados residuales (RSS), desviación estándar residual (RSD) y el criterio de ajuste de Akaike (1973) (AIC). Se subrayaron los valores correspondientes a los mejores ajustes en cada experimento, de acuerdo a los criterios RSD y AIC.

Modelo		Criterio (a)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
N	m							
3	3	RSS	1930	9983	326,1	11,64	508,3	223,7
		RSD	<u>31,0</u>	50,0	6,83	1,21	7,55	5,29
		AIC	<u>72,52</u>	104,09	87,33	46,37	97,71	87,73
2	3	RSS	8470	12329	359,7	11,47	467,5	226,1
		RSD	53,1	49,7	<u>6,71</u>	<u>1,13</u>	<u>7,21</u>	<u>5,01</u>
		AIC	82,35	104,20	<u>86,51</u>	<u>44,16</u>	96,06	<u>85,89</u>
2	2	RSS	8970	12498	703,0	13,25	537,5	326,1
		RSD	47,4	<u>45,6</u>	8,84	1,15	7,33	5,71
		AIC	80,81	<u>102,33</u>	93,22	46,18	<u>96,02</u>	89,02
1	2	RSS	15500	26150	12851	684,6	4670	4489
		RSD	55,7	61,1	35,85	7,89	20,60	20,20
		AIC	83,19	107,72	129,00	97,40	124,28	123,7

A



B

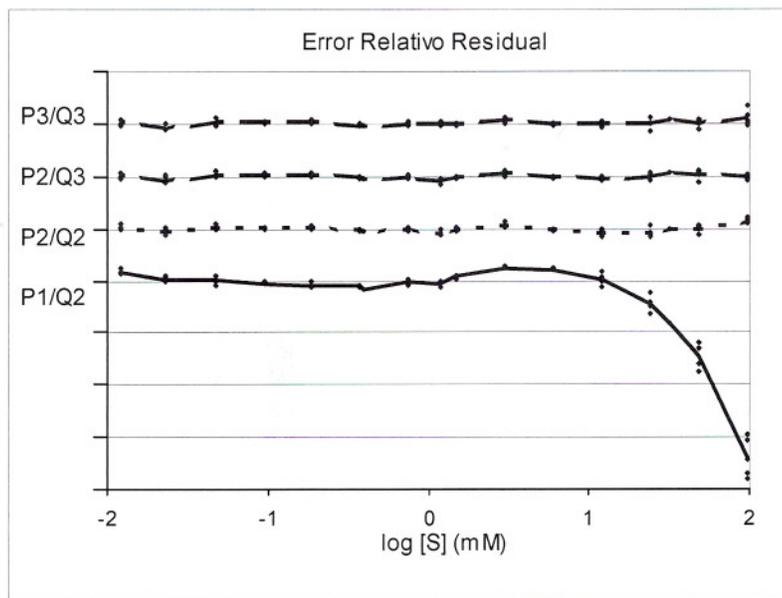


Figura 49: Resultados de seis determinaciones independientes de la cinética completa de acetilcolinesterasa. Datos experimentales, y curvas ajustadas a partir de modelos paramétricos derivados de la ecuación 21 (pag. 115). A: para  $n=3$  y  $m=3$  (---),  $n=2$  y  $m=3$  (.....),  $n=2$  y  $m=2$  (---) y finalmente  $n=1$  y  $m=2$  (—). B: Errores residuales relativos para cada modelo paramétrico.

### 5.2.1 MODELO 3D

Este modelo contempla la inhibición por sustrato y un sitio de unión para PA. Un problema que presenta es el de que tomando los coeficientes como parámetros de ajuste, se cuenta con 9 parámetros ajustados y hay 11 constantes que despejar. Sin embargo, ya ha sido estimada la  $V_{max}$  a partir de la extrapolación, en un gráfico de Eadie Hofstee, de la tangente a la curva cuando la concentración de sustrato tiende a cero. Este procedimiento asume que en estas condiciones la inhibición por sustrato no debe influir en el valor observado de  $V_{max}$ , supuesto que requiere un análisis más profundo que haremos más adelante. En base a esta consideración, llegamos a obtener valores para casi todas las constantes que se muestran en la tabla XIII.

Tras el ajuste por mínimos cuadrados se despejaron las constantes cinéticas y se llegó a los siguientes valores.

Tabla XIII: Resultado del ajuste de los coeficientes del modelo 3D a los resultados experimentales

Parámetro	medida $\pm$ DS	Spm	Spd	Put
		medida $\pm$ DS	medida $\pm$ DS	medida $\pm$ DS
$K_s$ ( $\mu$ M)	39 $\pm$ 18			
$K_i$ ( $\mu$ M)	453 $\pm$ 120			
$\alpha$	9,43 $\pm$ 1,76			
$k_v$				
$a$	0,17 $\pm$ 0,03			
$K_b$ ( $\mu$ M)		44,5 $\pm$ 6,40	132 $\pm$ 40	408 $\pm$ 170
$\beta$		7,96 $\pm$ 1,69	6,87 $\pm$ 0,71	3,14 $\pm$ 0,48
$b$		1,20 $\pm$ 0,01	1,37 $\pm$ 0,13	1,14 $\pm$ 0,09
$\gamma\delta$		3,39 $\pm$ 0,92	4,89 $\pm$ 3,51	2,76 $\pm$ 0,04
$c$		0	0	0

Los valores de las constantes que dependen de poliaminas se obtuvieron a partir de dos experimentos independientes. Los valores de las constantes que no dependen de poliaminas se obtuvieron a partir de seis experimentos independientes, que fueron los controles del anteriores.

DS: desvío estándar.

Otro problema asociado a este modelo es que arroja una ecuación paramétrica que predice que existen hasta cuatro valores de concentración de sustrato a las que la velocidad de reacción catalizada no depende de la concentración del modulador. Una de ellas es para  $[S] = 0$ , otra es evidente en el gráficos de la figura 50 y la tercera se encuentra por encima de 100 mM de ATC. Esto no es lo que se observa al graficar los resultados donde se percibe, no solo que las curvas tienen puntos de paso obligados, sino que alrededor de ellos presentan mucho sesgo (ver figura 50). Esto justificó que se lo descarte y se realice mediante un modelo más complejo.

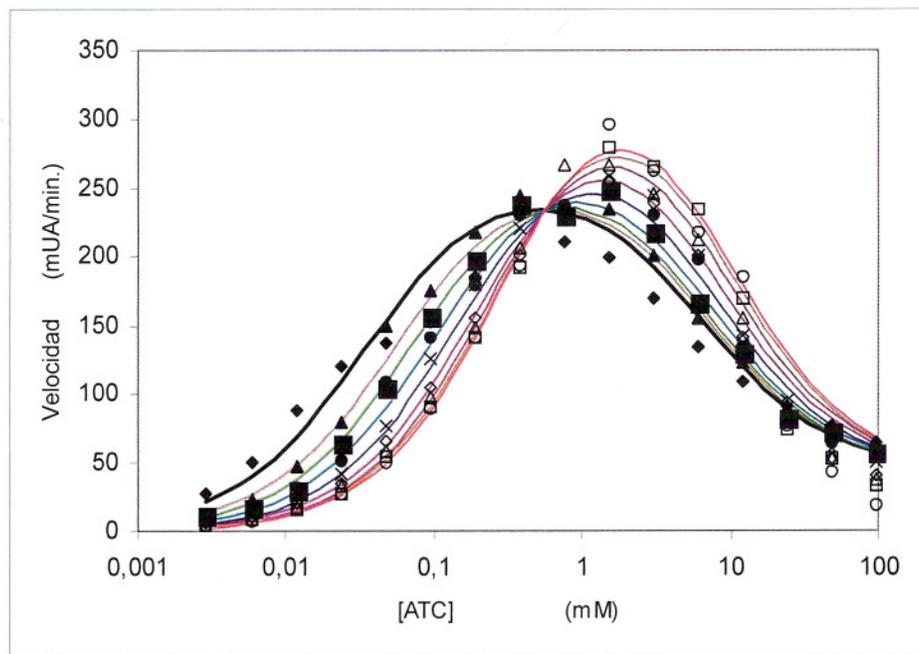


Figura 50: Solución encontrada con el modelo 3D para la modulación de AChE por Espermina utilizando la ecuación 39 (pag. 132). Los valores de concentración de Spm en unidades mM son 0: —◆—, 0.039: —▲—, 0.078: —■—, 0.156 —●—, 0.313: —×—, 0.625: —◇—, 1.25: —△—, 2.5: —□—, 5.0: —○—.

### 5.2.2 MODELO 4D

El ajuste logrado en este caso, es mejor que el logrado con el modelo 3D, no presenta los puntos de paso obligados, aunque nuevamente se llega a tener más constantes que parámetros de ajuste, 19 y 14 respectivamente, por lo que quedan más constantes sin resolver que en el anterior.

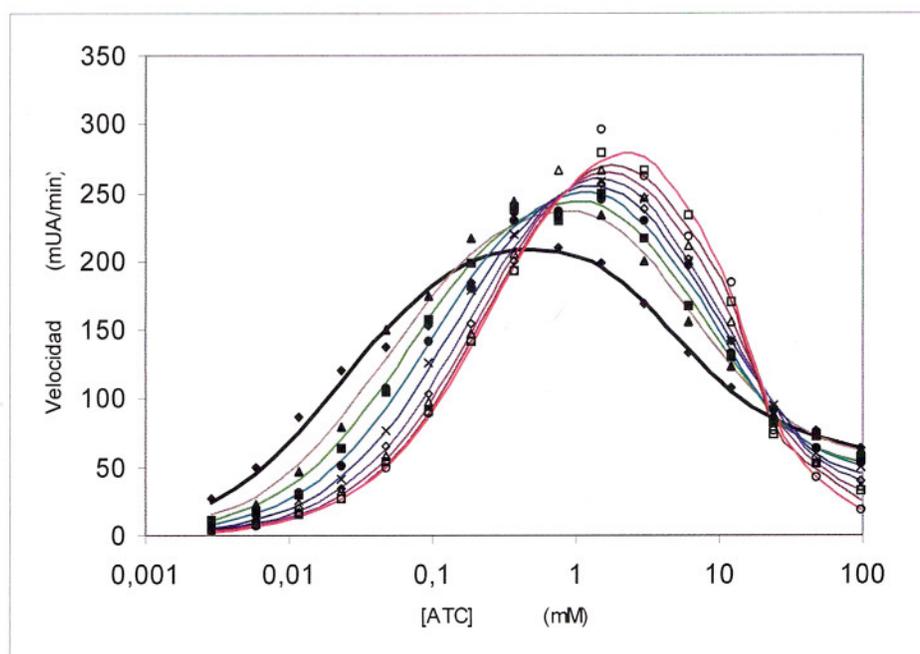


Figura 51: Solución encontrada con el modelo 4D para la modulación de AChE por Espermina. Los valores de concentración de Spm. Los valores de concentración de Spm y significado de símbolos y colores son los mismos de la figura 50.

### 5.2.3 MODELO MIXTO

Ninguno de los modelos anteriores consideran la presencia de la enzima acetilada y por lo tanto no la contemplan, ni como estado alternativo de la enzima, ni como posible etapa limitante de la reacción, o sea que tácitamente le impone la condición de limitante a la primer etapa.

Este modelo fue desarrollado para tener en cuenta la forma acetilada de la enzima, su contribución a velocidad de reacción y su posible interacción con el sustrato y posibles moduladores. El resultado fue un modelo que responde a todos los detalles conocidos de la enzima, incluyendo reacción en dos etapas, libre acceso de los moduladores a sus sitios de unión e interacción entre sitios de unión libre de restricciones.

Sin embargo, aun persiste la falta de independencia de los coeficientes  $P_{ij}$  y  $Q_{ij}$ . Los métodos de ajuste por mínimos cuadrados están validados para parámetros independientes, y claramente ninguno de los modelos presentados, ni propios, ni de otros autores, cumplen esta condición. Sin embargo, es posible agrupar las constantes en los coeficientes de la expresión 41 (pag. 137), de manera de lograr expresiones independientes, que pueden ser usadas como parámetros de ajuste (Ver tablas XV y XVI, pag. 146 y 147).

Esta definición de los parámetros de ajuste, puede ser observada por carecer de significado físico, ya que los mismos, ni son coeficientes en la expresión de velocidad, ni constantes definidas en el modelo cinético. Sin embargo, pese a su definición abstracta, estos parámetros tienen significado termodinámico.

Se considera al cociente  $k_v/K_m$  como una medida de eficiencia catalítica de la enzima y permite estimar el cambio de energía libre entre el estado basal y el complejo activado ( $\Delta g^\ddagger = -RT \ln(k_v E_T/K_m/A)$ ). Para el caso del modelo mixto, dicha  $\Delta g^\ddagger$  puede calcularse

para cada una de las vías de reacción que dependen de los complejos que tienen el sitio catalítico ocupado, ES, SES, BES, BSES, E', SE', BE' y BSE', como el cociente entre la constante de velocidad de transformación covalente, y la de inestabilidad correspondientes al complejo respectivo (ver tabla XIV). En el caso de la etapa de hidrólisis, se asume que el agua reacciona directamente sin unirse a la enzima un tiempo suficiente como para considerárselo relevante para el análisis cinético, por lo que no se define una constante de inestabilidad de un complejo no covalente E'-H<sub>2</sub>O, y  $k_w$  es de orden 2 a diferencia de  $k_v$  que es de orden 1.

Tabla XIV: Constantes aparentes de velocidad de reacción para cada una de las vías de reacción involucradas en el modelo mixto.

$k'_{ES} = k_v/K_s$	$k'_{E'} = k_w$
$k'_{SES} = a k_v/(\alpha K_s K_i)$	$k'_{SE'} = a' k_w/(\alpha' K_i)$
$k'_{BES} = b k_v/(\beta K_s K_b)$	$k'_{BE'} = b' k_w/(\beta' K_b)$
$k'_{BSES} = c k_v/(\alpha\beta\gamma\delta K_s K_i K_b)$	$k'_{BSE'} = c' k_w/(\alpha'\beta'\gamma' K_i K_b)$

Ahora bien, como se indica en la tabla XV, los parámetros desde  $I_2$  hasta  $I_7$  son cocientes entre las constantes pseudo segundo orden representadas en la tabla XIV. A partir de ellos es posible calcular directamente los valores de la diferencia en los  $\Delta g^\ddagger$  de reacción entre la vía considerada y la no modulada, a lo que llamamos  $\Delta\Delta g^\ddagger$ . Los parámetros del  $I_9$  en adelante son constantes de afinidad global, excepto el  $I_{10}$  e  $I_{16}$  que son sumas de dos

constantes de afinidad.  $I_1$  es la constante de pseudo primer orden para la reacción simple para la primer etapa



Finalmente  $I_8$  es la relación entre la última y su homóloga correspondiente a la segunda etapa.

Tabla XV: Definición de los parámetros de ajuste en función de las constantes del modelo cinético.

Parámetro de ajuste	Definición	Significado físico
$I_1$	$E_T kv/Ks$	Cte. de 1er orden por vía de el complejo $ES = k'_{ES} E_T$
$I_2$	$a/(\alpha Ki)$	Relación $k'_{SES}/k'_{ES}$
$I_3$	$a'/(\alpha' Ki)$	Relación $k'_{SE'}/k'_{E'}$
$I_4$	$b/(\beta Kb)$	Relación $k'_{BES}/k'_{ES}$
$I_5$	$b'/(\beta' Kb)$	Relación $k'_{BE'}/k'_{E'}$
$I_6$	$c/(\alpha\beta\gamma\delta KiKb)$	Relación $k'_{BSES}/k'_{ES}$
$I_7$	$c'/(\alpha'\beta'\gamma' KiKb)$	Relación $k'_{BSE'}/k'_{E'}$
$I_8$	$kv/(kwKs)$	Relación $k'_{ES}/k'_{E'}$
$I_9$	$1/(\alpha KsKi)$	Constante de estabilidad del complejo SES
$I_{10}$	$1/Ks + 1/Ki$	Suma de las $Kaf$ de los complejos ES y SE
$I_{11}$	$1/(\alpha' Ki)$	Constante de estabilidad del complejo SE'
$I_{12}$	$1/Kb$	Constante de estabilidad del complejo BE
$I_{13}$	$1/(\beta' Kb)$	Constante de estabilidad del complejo BE'
$I_{14}$	$1/(\alpha\beta\gamma\delta KsKiKb)$	Constante de estabilidad del complejo BSES
$I_{15}$	$1/(\alpha'\beta'\gamma' KiKb)$	Constante de estabilidad del complejo BSE'
$I_{16}$	$1/(\beta KsKb) + 1/(\gamma KiKb)$	Suma de las $Kaf$ de los complejos BES y BSE

Los coeficientes de la ecuación 41 (pag. 137) quedan definidos como se indica en la tabla XVI.

Tabla XVI: Coeficientes de la ecuación paramétrica 41 (pag. 137) en función de los parámetros de ajuste.

	$Q_{0,0} = 1$
	$Q_{0,1} = I_5 + I_{12}$
	$Q_{0,2} = I_5 I_{12}$
$P_{1,0} = I_1$	$Q_{1,0} = I_3 + I_8 + I_{10}$
$P_{1,1} = I_1(I_4 + I_5)$	$Q_{1,1} = I_3 I_{12} + I_5 I_{10} + I_7 + I_8(I_4 + I_{13}) + I_{16}$
$P_{1,2} = I_1 I_4 I_5$	$Q_{1,2} = I_4 I_8 I_{13} + I_5 I_{16} + I_7 I_{12}$
$P_{2,0} = I_1(I_2 + I_3)$	$Q_{2,0} = I_3 I_{10} + I_8(I_2 + I_{11}) + I_9$
$P_{2,1} = I_1(I_2 I_5 + I_3 I_4 + I_6 + I_7)$	$Q_{2,1} = I_3 I_{16} + I_5 I_9 + I_7 I_{10} + I_8(I_2 I_{13} + I_4 I_{11} + I_6 + I_{15}) + I_{14}$
$P_{2,2} = I_1(I_4 I_7 + I_5 I_6)$	$Q_{2,2} = I_5 I_{14} + I_7 I_{16} + I_8(I_4 I_{15} + I_6 I_{13})$
$P_{3,0} = I_1 I_2 I_3$	$Q_{3,0} = I_2 I_8 I_{11} + I_3 I_9$
$P_{3,1} = I_1(I_2 I_7 + I_3 I_6)$	$Q_{3,1} = I_3 I_{14} + I_7 I_9 + I_8(I_2 I_{15} + I_6 I_{11})$
$P_{3,2} = I_1 I_6 I_7$	$Q_{3,2} = I_6 I_8 I_{15} + I_7 I_{14}$

Tras el ajuste por mínimos cuadrados de los dieciséis parámetros de ajuste, tres de ellos presentaron valores compatibles con cero:  $I_6$ ,  $I_7$  e  $I_{14}$ . Los dos primeros son la relación entre las constantes  $k'_{BSES}$  y  $k'_{ES}$ , y  $k'_{BSE}$  y  $k'_{E'}$ , correspondientes a las vías de reacción a través de los complejos EBS*ScSi* y E'*BSi*. El último, es la constante de afinidad global para el complejo cuaternario EBS*ScSi*. Se ajustaron entonces, modelos en los que se restringió a cero sucesivamente los valores de dichos parámetros. Primero  $I_6 = 0$  o sea de 15 parámetros. Luego,  $I_{14} = 0$ , que implica  $I_6 = 0$  de 14 parámetros. Y finalmente  $I_6 = I_7 = I_{14} = 0$  de 13 parámetros. En todos los casos se verificó la calidad del ajuste y se adoptó el último para estimar los 13 restantes parámetros de ajuste (Tabla XVIII, pag. 150).

Es interesante destacar que el modelo 3D es un caso particular de este donde  $a'/\alpha' = 0$  de manera que  $I_3 = 0$ ,  $k_w \gg k_v$  de forma que  $k_v/k_w \approx 0$  y entonces  $I_8 = 0$ ,  $b'/\beta' = 0$  o sea  $I_5 = 0$  y  $c' = 0$  para que  $I_7 = 0$ . Tras los ajustes realizados, la última es la única de estas condiciones que se cumple y por lo tanto este modelo abarca y supera a todos los mencionados

en la introducción de este capítulo a los que puede ser reducido el modelo 3D (Ver tablas X y XVI, pag, 132 y 147).

Algunos de los parámetros son independientes de PA por lo que proporcionan información acerca de la cinética de la enzima y de la interacción del sustrato en ambos sitios de unión. Por ejemplo, las constantes de afinidad global para los complejos EScSi y E'Si son  $5,6 \text{ mM}^{-2}$  y  $1,8 \text{ mM}^{-1}$  respectivamente. De la misma forma, los valores de algunas de las constantes cinéticas pueden derivarse directamente a partir de los valores ajustados de los parámetros.

$$K_b = 1/I_{12} = 0,05, 0,25 \text{ y } 0,95 \text{ mM para Spm, Spd y Put.}$$

$$a' = I_3/I_{11} = 0,38$$

$$b' = I_5/I_{13} = 1,44, 0,89 \text{ y } 0,80 \text{ mM para Spm, Spd y Put..}$$

$$c' = I_7/I_{15} = 0$$

Establecer el valor del resto de las constantes, al igual que los casos precedentes, requiere más información que la que surge del ajuste, ya que se dispone del valor de 16 parámetros para estimar 18 constantes. Aceptando que se trata de una primera aproximación, tomamos el valor de  $K_s$  a partir de la pendiente de la representación de Eadie Hofstee, cuando  $[S]$  tiende a cero, y corrigiendo por la influencia de la inhibición por sustrato como se describe más adelante (ver pag. 154 – 159 y fig 52).

La concentración total de sitios activos fue estimada a partir de la actividad específica informada por el proveedor y a la velocidad obtenida en el máximo relativo a una concentración de sustrato de  $1 \text{ mM}$ . La constante de pseudo segundo orden  $kv/K_s$ , calculada a partir de  $I_1$  y la concentración estimada de sitios catalíticos ( $E_t$ ), es de  $3,2 \times 10^7 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ .

Por este procedimiento establecimos valores de  $k_v$  y  $k_w$  en  $2,23 \times 10^6$  y  $2,45 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente (tabla XIX, pag. 151).

Establecido estos valores, pueden derivarse los valores de casi todas las demás constantes de la forma mostrada en la tabla XVII, y cuyos valores se muestran en la tabla XIX.

Tabla XVII: Cálculo de las constantes cinéticas del modelo mixto a partir de los valores de los parámetros de ajuste. Las formulas fueron deducidas a partir de las expresiones de la tabla XV (pag. 146).

a) Constantes independientes de otros datos.

---

$K_b = 1/I_{12}$	$a' = I_3/I_{11}$
$\beta' = I_{12}/I_{13}$	$b' = I_5/I_{13}$
$\gamma' = I_{11} I_{13}/I_{15}$	$c' = I_7/I_{15}$

---

b) Constantes dependientes de  $K_s$  o  $V_{max}$ , y de  $E_t$ .

---

$K_s$ : Pendiente corregida de Eadie - Hofstee	$\alpha = (I_{10} - 1/K_s)/(I_9 K_s)$
$V_{max} = I_1 K_s$	$\alpha' = (I_{10} K_s - 1)/(I_{11} K_s)$ $= (I_{10} - 1/K_s)/I_{11}$
$K_i = 1/(I_{10} - 1/K_s)$	
$K_v = I_1 K_s/[E_T]$	$a = I_2/(I_9 K_s)$
$K_w = I_1/(I_8 [E_T])$	$c = I_6/(I_{14} K_s)$

---

c) Constantes no despejables, aunque dependientes entre si.

---

$\beta = \gamma I_{12} / (\gamma I_{16} K_s - I_{12} (I_{10} K_s - 1))$	$\beta \gamma \delta = I_9 I_{12}/I_{14}$
$\gamma = \beta I_{12} (K_s I_{10} - 1)/(\beta K_s I_{16} - I_{12})$	$b/\beta = I_4/I_{12}$

---

Tabla XVIII: Valor obtenido por ajuste no lineal de los parámetros de ajuste independientes del modelo mixto de reacción de hidrólisis de acetil-tiocolina catalizada por acetilcolinesterasa de anguila.

Los parámetros definidos en la tabla XV (pag. 146) fueron ajustados a resultados obtenidos de 12 experimentos independientes sin moduladores y 4 con cada una de las poliaminas. El error estándar de las medias fue calculado entre experimentos. Los resultados que presentan un valor de  $p < 0,05$  son significativamente diferentes a cero estimada mediante la prueba t de Students.

El parámetro  $I_1$  está referido al número total de sitios calculado por el método usado por Salih y col. (1993).  $I_6$ ,  $I_7$  e  $I_{14}$  fueron considerados iguales a cero y fueron ajustados los trece parámetros restantes.

Parámetro (units)	independiente de PA media ± DE	dependiente de PA		
		<i>Spm</i> media ± DE	<i>Spd</i> media ± DE	<i>Put</i> media ± DE
$I_1/E_T$ (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	(3.21±0.49) x10 <sup>7</sup> <i>p</i> <0.0005			
$I_2$ (mM <sup>-1</sup> )	0.043 ± 0.011 <i>p</i> <0.0025			
$I_3$ (mM <sup>-1</sup> )	0.446 ± 0.147 <i>p</i> <0.01			
$I_4$ (mM <sup>-1</sup> )		2.64 ± 0.92 <i>p</i> <0.05	0.980 ± 0.256 <i>p</i> <0.025	0.333 ± 0.113 <i>p</i> <0.05
$I_5$ (mM <sup>-1</sup> )		225 ± 80 <i>p</i> <0.05	12.7 ± 5.6 <i>p</i> <0.05	1.08 ± 0.46 <i>p</i> <0.05
$I_6$ (mM <sup>-2</sup> )		-0.024±0.020 NS	-0.001 ± 0.001 NS	-0.220 ± 0.175 NS
$I_7$ (mM <sup>-2</sup> )		-0.228 ± 0.116 NS	-0.013 ± 0.732 NS	-0.051 ± 0.042 NS
$I_8$ (mM <sup>-1</sup> )	13.1 ± 4.5 <i>p</i> <0.01			
$I_9$ (mM <sup>-2</sup> )	5.60 ± 1.30 <i>p</i> <0.001			
$I_{10}$ (mM <sup>-1</sup> )	19.0 ± 3.1 <i>p</i> <0.001			
$I_{11}$ (mM <sup>-1</sup> )	1.17 ± 0.28 <i>p</i> <0.0025			
$I_{12}$ (mM <sup>-1</sup> )		19.9 ± 6.0 <i>p</i> <0.02	4.05 ± 1.20 <i>p</i> <0.025	1.05 ± 0.40 <i>p</i> <0.05
$I_{13}$ (mM <sup>-1</sup> )		161 ± 61 <i>p</i> <0.05	14.3 ± 5.9 <i>p</i> <0.05	1.35 ± 0.01 <i>p</i> <0.0025
$I_{14}$ (mM <sup>-3</sup> )		-1.46 ± 1.99 NS	-0.701 ± 0.552 NS	-0.197 ± 0.62 NS
$I_{15}$ (mM <sup>-2</sup> )		26.4 ± 10.8 <i>p</i> <0.05	1.02 ± 0.29 <i>p</i> <0.05	0.137 ± 0.52 <i>p</i> <0.05
$I_{16}$ (mM <sup>-2</sup> )		18.2 ± 0.78 <i>p</i> <0.001	15.5 ± 7.4 <i>p</i> <0.05	4.70 ± 0.66 <i>p</i> <0.01

Tabla XIX: Constantes cinéticas del modelo mixto deducidas a partir de los valores obtenidos de los parámetros de ajuste del modelo mixto, definidos en la tabla XV (pag. 146), cuyos valores se muestran en la tabla XVIII . El valor de  $k_{cat}$  ( $1,17 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$ ) fue calculado partir del valor de velocidad máxima estimada por extrapolación de la tangente a la curva en el límite cuando  $[S]$  tiende a cero de la representación de Eadie Hofstee.

constantes cinéticas	PA			
	<i>S</i>	<i>Spm</i>	<i>Spd</i>	<i>Put</i>
$k_v$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$2.23 \times 10^6$			
$k_w$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$2.45 \times 10^6$			
$K_s$ (mM)	0.070			
$K_i$ (mM)	0.212			
$\alpha$	12.0			
<b>a</b>	0.11			
$\alpha'$	4.03			
<b>a'</b>	0.38			
$K_b$ (mM)		0.050	0.25	0.95
$\beta'$		0.13	0.28	0.78
<b>b'</b>		1.44	0.89	0.80
$\gamma'$		7.00	16.4	11.5
<b>b</b> / $\beta$		0.133	0.242	0.315
$\beta$ (límite inferior) <sup>a</sup>		15.7	3.69	3.20
<b>b</b> (límite inferior) <sup>a</sup>		2.09	0.89	1.01
$\gamma$ (límite inferior) <sup>b</sup>		5.18	1.22	1.06
$\delta$		$\infty^c$	$\infty^c$	$\infty^c$
<b>c</b>		indefindo	indefindo	indefindo
<b>c'</b>		0	0	0

a: Límite cuando  $\gamma$  tiende a infinito. b: Límite cuando  $\beta$  tiende a infinito. c: a menos que  $\beta$  o  $\gamma$  tiendan a infinito en cuyo caso d es indefinido.

En principio,  $K_i$  es solo 4 veces mayor que  $K_s$ . Sin embargo, teniendo en cuenta que se trataría de un proceso secuencial, hay que considerar que la afinidad por el segundo sitio en ser ocupado es 12 veces inferior a la del mismo sitio e la enzima libre, porque este es el valor de  $\alpha$ . De esta forma, si el sitio catalítico es ocupado primero, la afinidad por el sitio inhibitorio es 48 veces inferior a la del catalítico. Es decir  $K_s = 0,070 \text{ mM}$  y  $\alpha K_i = 2,54 \text{ mM}$ .

En la enzima acetilada, la afinidad por el sitio inhibitorio es la cuarta parte que en la AChE libre, pero el triple que cuando Sc está ocupado.

Los complejos SES y SE' presentan 0,11 y 0,38 veces la velocidad de catálisis que las correspondientes formas con el sitio inhibitorio libre. La inhibición por sustrato tiene lugar, entonces, principalmente en la primer etapa.

Resulta sorprendente que todos los parámetros dependientes de PA muestran el mismo patrón de incremento de sus valores con el número de nitrógenos (ver tabla XVIII, pag 150). Por ejemplo, Spm tiene mayor afinidad de las tres poliaminas probadas por E, E', E'Si y para la suma de las afinidades por ESc y ESi. También presenta los mayores valores de  $I_4$  y de  $I_5$  indicando un efecto más pronunciado, que las otras, sobre la etapa catalítica.

A partir del valor de estos parámetros pueden obtenerse los valores de todas las constantes relacionadas con la interacción PA-AChE. Las constantes de inestabilidad de los complejos formados por las tres poliaminas pueden verse en la tabla XIX.

$\gamma' > 1$  indica cooperatividad negativa entre la unión del sustrato al sitio Si y las poliaminas en la enzima acetilada. Este efecto es tanto más importante cuanto mayor es el número de nitrógenos de la poliamina.

Por otra parte, Spm aumenta la constante de velocidad de des-acetilación en un 44% y Spd y Put casi no alteran esta reacción, a juzgar por los valores obtenidos de  $b'$  en cada uno de estos casos.

Algunas de las constantes específicas de velocidad de reacción de la primer etapa no pueden ser resueltas. Sin embargo, pueden establecerse límites a sus valores posibles en el marco del modelo (ver tabla XVIIc, pag. 149). Si los sitios para Si y PA no pudieran

ocuparse simultáneamente,  $\gamma$  sería infinito. Entonces  $\beta$  tendría su mínimo valor posible, ya que valores finitos de  $\gamma$  llevarían a valores mayores de  $\beta$ . Esto corresponde a una fuerte cooperatividad negativa entre la unión a los sitios PA y Si, o inhibición competitiva entre la unión de Si y PA.

De la misma, forma se calcula que el límite inferior del valor de "b" es menor que 1 para Spd, pero no para Spm y Put. Esto muestra que en cualquier caso, la primera puede tener efecto inhibitorio sobre la enzima, pero Spm acelera la primer etapa y Put no la afectara el número de recambio.

En el otro extremo del espectro de posibilidades, si " $\beta$ "  $\rightarrow$  infinito, " $\gamma$ " tiende a un valor mínimo mayor que 1 por lo que presenta, en cualquier caso, cooperatividad negativa a la ocupación simultanea de los sitios PA y Sc.

" $\delta$ " es indefinido en ambas situaciones extremas, si  $\beta$  o  $\gamma$  tinden a infinito, ya que en ambos casos, al no poder formarse el complejo cuaternario (EScSiB), pierde sentido y queda fuera de la ecuación por que todos los términos en que participa son nulos.

"c" carece de sentido porque la constante global de afinidad del complejo cuaternario ES<sub>2</sub>B es cero. De todas maneras, el parámetro de ajuste I<sub>6</sub>, que lo incluye, ajusta a cero por lo que cualquier traza de complejo ES<sub>2</sub>B sería completamente inactivo (ver tablas XV y XVIII, pag 147 y 150).

"c'" es compatible con cero en cualquier caso. O sea que si se forma el complejo 3ario E'SB, este es completamente inactivo.

Un aspecto interesante es la actividad remanente a concentración infinita de sustrato. Ya dijimos que dicho valor es P<sub>3</sub>/Q<sub>3</sub> para el modelo mixto. Conociendo el significado de

cada coeficiente puede ampliarse el concepto hasta la expresión 45 a la que llamamos  $k_{cati}$  porque la estructura de la misma es muy similar a la de  $k_{cat}$  definida por Wilson y Cabibb (1956) como  $(k_v k_w / (k_v + k_w))$ .

$$\lim_{\substack{[S] \rightarrow \infty \\ [B] \rightarrow 0}} v = \frac{P_3}{Q_3} = \frac{I_1 I_2 I_3}{I_2 I_8 I_{11} + I_3 I_9} = \frac{\frac{E_T k_v}{K_s} \frac{a}{\alpha K_i} \frac{a'}{\alpha' K_i}}{\frac{a}{\alpha K_i} \frac{k_v}{k_w K_s} \frac{1}{\alpha' K_i} + \frac{a'}{\alpha' K_i} \frac{1}{\alpha K_s K_i}} = \frac{E_T a a' k_v k_w}{a k_v + a' k_w} = k_{cati} \quad (45)$$

#### EL PROBLEMA DE LA ESTIMACIÓN DE $V_{max}$ y $K_m$ .

Siempre se asumió que el sitio inhibitorio de AChE carece de importancia a baja concentración de sustrato. Por ese motivo, normalmente se estima el valor de  $K_s$  a partir de un gráfico doble recíproco, como la abscisa al origen de la recta tangente a la curva en la zona de  $[S] \approx 0$ , o en un gráfico de Eadie Hofstee como la pendiente de la curva, donde se cumple la misma condición.

En el marco de este modelo mixto, probamos el peso que el valor de la constante  $K_i$  tiene en la forma de la curva, particularmente cuando la concentración de sustrato tiende a cero. Básicamente se trata de verificar si en el límite, cuando  $[S]$  tiende a cero, la ecuación es la misma, ya sea que  $K_i$  tiende a infinito o no.

Partiendo de la ecuación 41 (pag. 137) en ausencia de poliaminas:

$$\lim_{[S] \rightarrow 0} v = \frac{P_{1,0}[S]}{1 + Q_{1,0}[S]} \quad (46)$$

Luego, como  $Q_{1,0} = I_3 + I_8 + I_{10}$ :

$$Km_{ap} = \frac{1}{Q_{1,0}} = \frac{1}{I_3 + I_8 + I_{10}} = \frac{1}{\frac{a'}{\alpha' Ki} + \frac{kv}{(kw Ks)} + \frac{1}{Ks} + \frac{1}{Ki}}$$

$$Km_{ap} = \frac{1}{\left(\frac{kv}{kw} + 1\right) \frac{1}{Ks} + \left(\frac{a'}{\alpha'} + 1\right) \frac{1}{Ki}} \quad (47)$$

$$Km_{ap} = \frac{Ks}{\left(\frac{kv}{kw} + 1\right) + \left(\frac{a'}{\alpha'} + 1\right) \frac{Ks}{Ki}} \quad (48)$$

El valor de Km aparente está aun afectado por la relación Ks/Ki aun cuando  $S \rightarrow 0$ .

Por otro lado, la pendiente al origen de la ecuación 46 es  $P_1$ , como lo indica la ecuación 23 (pag. 115) al ser  $Q_0 = 1$  (Tabla XVI, pag. 147).

$$P_1 = I_1 = \frac{kv E_T}{Ks} \Rightarrow \frac{kv}{Ks} = \frac{I_1}{[E_T]} \quad (49)$$

También, a partir de la ecuación 46 puede derivarse la velocidad máxima aparente de acuerdo a esta aproximación.

$$V_{\max ap} = \frac{P_1}{Q_1} = \frac{I_1}{I_3 + I_8 + I_{10}} = \frac{kv E_T}{\left(1 + \frac{kv}{kw}\right) + \left(1 + \frac{a'}{\alpha}\right) \frac{Ks}{Ki}} \quad (50)$$

Como ya dijimos, otra forma que se ha usado para estimar  $Ks$  es la estimación gráfica a partir de una representación de Linkweaver y Burck o de Eadie y Hofstee, tomando la recta tangente a la curva en el punto límite cuando la concentración de sustrato tiende a cero. En el primer caso se obtiene el mismo resultado de la ecuación 48, pero a partir de la representación de Eadie y Hofstee se puede demostrarse que

$$\lim_{S \rightarrow 0} \frac{\partial v}{\partial \frac{v}{s}} = \frac{1}{I_2 - I_8 - I_{10}} \quad \Rightarrow \quad Ks_{ap} = \frac{1}{I_8 + I_{10} - I_2} \quad (51)$$

Puede verse una diferencia en esta última expresión con respecto a obtenida en la deducción de la ecuación 47. Pero, los supuestos de partida son distintos y tanto  $I_3$  como  $I_2$  son muy pequeños respecto a  $I_8$  y a  $I_{10}$ .

Luego

$$Km_{ap} = \frac{1}{\frac{1}{Ks} + \frac{1}{Ki} + \frac{kv}{kw Ks} - \frac{a}{\alpha Ki}} = \frac{1}{\left(1 + \frac{kv}{kw}\right) \frac{1}{Ks} + \left(1 - \frac{a}{\alpha}\right) \frac{1}{Ki}} \quad (52)$$

$$K_m \text{ ap} = \frac{K_s}{\left(1 + \frac{k_v}{k_w}\right) + \left(1 - \frac{a}{\alpha}\right) \frac{K_s}{K_i}} \quad (53)$$

A partir de la ecuación 49 (pag. 155) se llega a un error que depende de la relación  $K_s/K_i$  de forma parecida a la descrita por la ecuación 48 (pag. 155), excepto en el caso, muy particular, en que  $a = \alpha$  y la reducción de la afinidad del sustrato por el sitio catalítico por ocuparse el inhibitorio se vea compensado exactamente por una mayor velocidad de reacción del complejo SES.

Cabe agregar que  $(1 + k_v/k_w) \approx 2$  y que  $(1 + a'/\alpha') \approx 1.1$  y  $(1 - a/\alpha) \approx 0.99$ . O sea que el denominador de la ecuación 48 (pag. 155) es aproximadamente 2,24 y el de la ecuación 53 es 2,27. La diferencia en escala logarítmica es de 0,007 aproximadamente.

Más significativo es el hecho que el valor de  $K_m$  aparente sea alrededor de la mitad del valor de  $K_s$ . Esto se debe a que siendo las dos etapas catalíticas de velocidades similares, en estado estacionario, la enzima se encuentra repartida entre la forma acetilada y no acetilada en cantidades comparables, reduciendo más o menos a la mitad a la enzima libre para unirse al sustrato. De hecho en las ecuaciones 48 y 53  $K_m$  aparente sería aproximadamente igual al  $K_s$ , si  $k_w \gg \gg k_s$  como asumen mucho de los modelos usualmente utilizados. Esto lleva a que en dichos casos se subestime el valor de  $K_s$ .

Lamentablemente ninguna de estas ecuaciones permite calcular el verdadero valor de  $K_s$  porque el resultado depende de  $K_i$ , que a su vez depende del valor real de  $K_s$ . Ni siquiera es posible aplicar un método iterativo que permita aproximar el verdadero valor minimizando el error.

En cualquier caso, ignorar la inhibición por sustrato equivale a decir que  $K_i$  tiende a infinito. Esto es asumir que  $K_s$  es, o esta cerca de la concentración de sustrato que corres-

ponde al punto de media onda en un gráfico directo, o en la hipérbola más parecida a la curva en la zona en que  $[S] \rightarrow 0$ . Si esto fuera cierto, el valor de  $K_i$  no debería afectar la estimación del valor de  $K_m$ . Sin embargo, probamos que asumir que  $K_i$  vale infinito puede cambiar fuertemente la posición del punto de media onda, y por lo tanto, de la estimación del valor  $K_m$  (Figura 52).

A pesar de lo dicho, la estimación de  $K_s$  y  $V_{max}$  a partir de datos obtenidos a baja concentración de sustrato ha sido práctica corriente. Ante la realidad de que no hay otra fuente de información, y de que el error relativo sería solo de alrededor del 15% (ver figura 52), aceptamos el valor estimado a partir de la ecuación 51 (pag. 156), corregida por la ecuación 53 y por el error producido por ser  $K_i \neq 0$ . Queda claro que el error asociado a esta aproximación alcanza a las constantes dependientes de  $K_s$ .

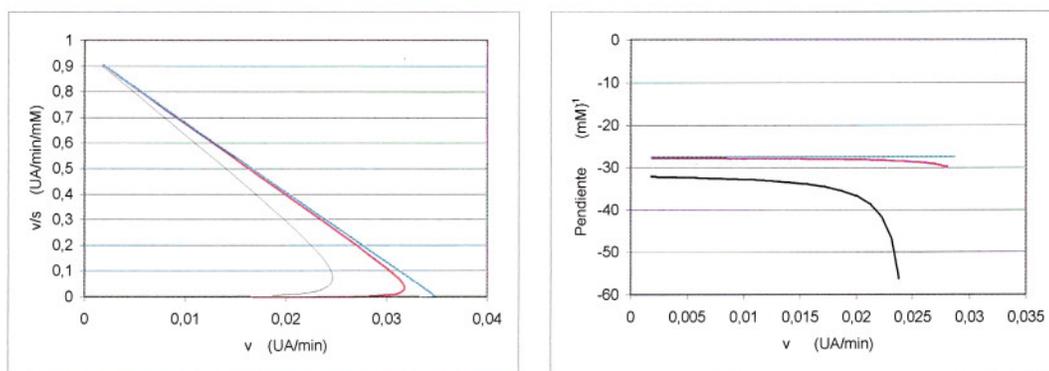


Figura 52: Efecto de asumir que no hay inhibición por sustrato en la forma de la curva  $v = f([S])$ , calculadas a partir del modelo mixto. A: Representación de Eadie Hofstee. B) Pendientes del gráfico A en función de la velocidad.  
(-)  $K_i = 0,2$  mM, (-)  $K_i = 2$  mM (-)  $K_i = 200$  mM.

Contrariamente a lo que ocurre con  $K_s$  y  $V_{max}$ , la relación  $V_{max}/K_s$  no es afectada por el valor de  $K_i$ , por lo que la pendiente al origen, en el gráfico directo es una buena estimación de dicho valor (figura 52).

### *EL PROBLEMA DE LAS COMPENSACIONES, IMPORTANCIA DE CADA COEFICIENTE*

La importancia relativa de cada parámetro en la ecuación 21 (pag. 115) para  $n = m = 3$ , es variable y depende del rango de concentración de sustrato que se considere. En la figura 53 se muestra la consecuencia de introducir cambios en los valores de los seis coeficientes por separado. Las variaciones provocadas por un modulador deben modificar los seis coeficientes de manera de componer la nueva forma de la curva. Sin embargo, puede verse que para cada rango de concentración de sustrato, existen dos coeficientes capaces de modificar la curva de una manera similar, y si este es el caso no es posible ajustarlos porque cualquier cambio en uno de ellos sería fácilmente compensado por un cambio apropiado en el otro.

Para analizar la confiabilidad del ajuste, introdujimos arbitrariamente, en cada uno de los coeficientes por separado, cambios del  $-10$ ,  $+10$  y  $+20$  % y representamos las curvas para comparar los cambios en la forma de las mismas (ver figura 53).

Al reajustar, se lograron valores muy bajos de la suma de cuadrados de los errores, pero ninguno alcanzó el valor del ajuste original (figura 54).

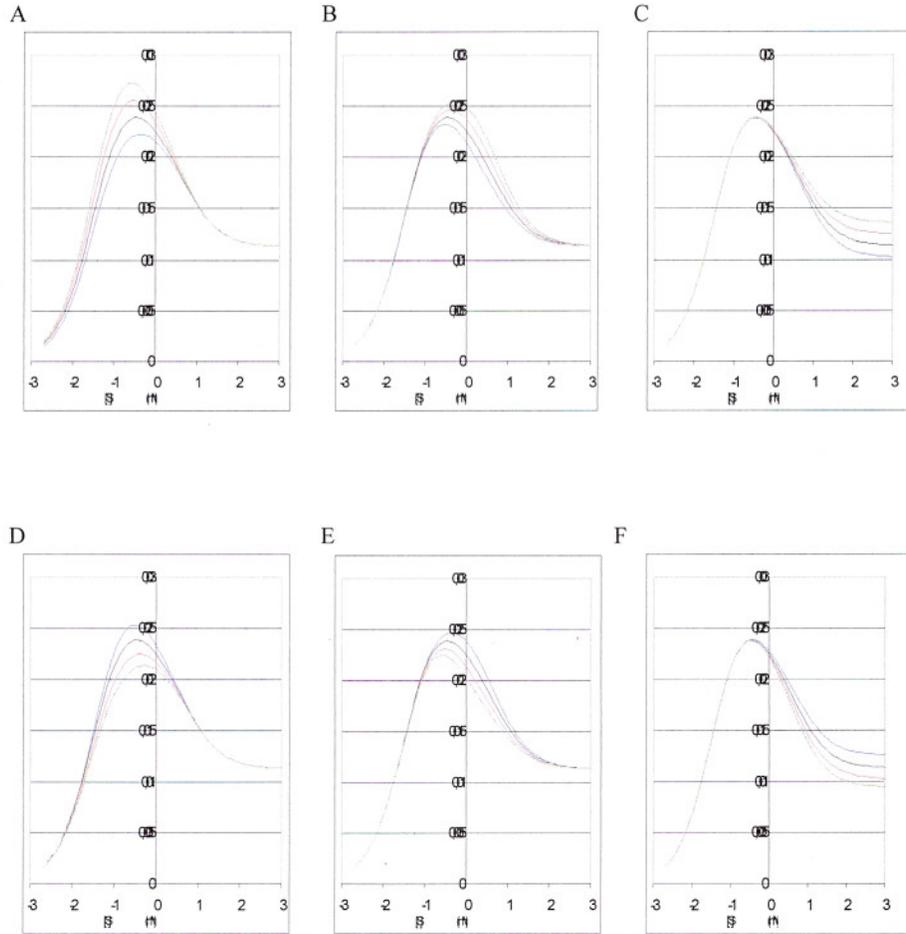


Figura 53: A – F Efecto de reasignar arbitrariamente a un coeficiente un valor diferente al obtenido originalmente. (—) valores ajustados, (---) 90% del valor ajustado, (—) 110% del valor ajustado, (—) 120% del valor ajustado.

A B y C corresponden a  $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$ . D, E y F corresponden a  $Q_1$ ,  $Q_2$  y  $Q_3$ .

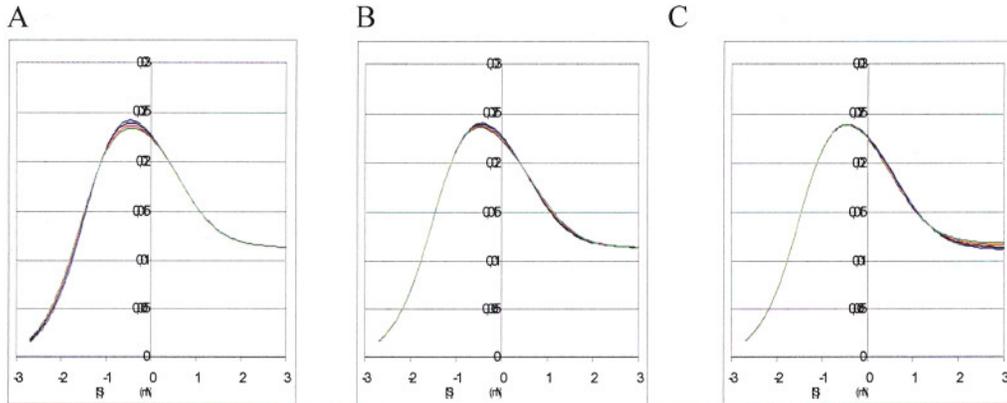


Figura 54: Efecto de intentar compensar los cambios introducidos en la forma de la curva por variación del valor de un coeficiente, con cambios en otro.

A Valores  $Q_1$  igual al 90%, 100%, 110% y 120% del valor ajustado compensados por valores de  $P_1$  iguales a 93%, 100%, 107% y 114% del valor ajustado respectivamente.  
 B Valores  $Q_2$  igual al 90%, 100%, 110% y 120% del valor ajustado compensados por valores de  $P_1$  iguales a 91%, 100%, 109% y 118% del valor ajustado respectivamente.  
 C Valores  $Q_3$  igual al 90%, 100%, 110% y 120% del valor ajustado compensados por valores de  $P_1$  iguales a 88%, 100%, 112% y 124% del valor ajustado respectivamente.

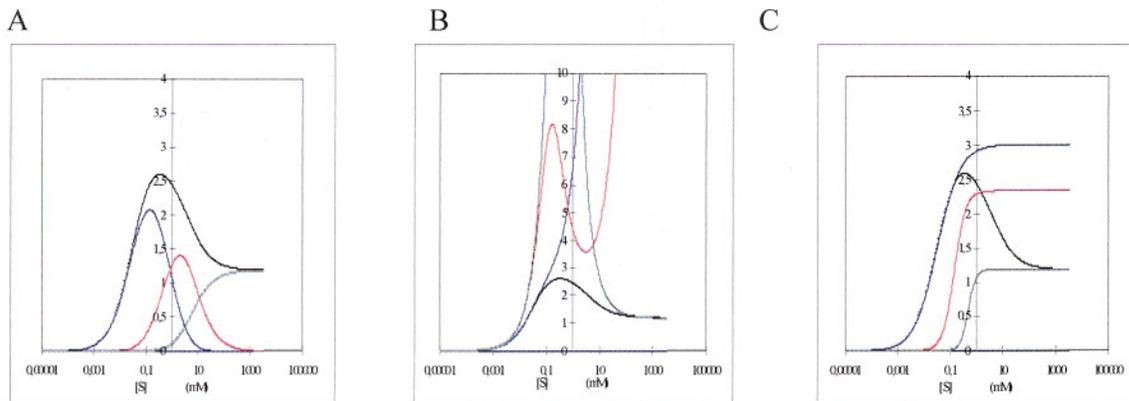


Figura 55: A) Curvas correspondientes al modelo mixto completo con  $I1=100$  (—), al mismo modelo con  $P_2 = P_3 = 0$  (—),  $P_1 = P_3 = 0$  (—) y  $P_1 = P_2 = 0$  (—).  
 B) Curvas correspondientes al modelo mixto completo con  $I1=100$  (—), al mismo modelo con  $Q_2 = Q_3 = 0$  (—),  $Q_1 = Q_3 = 0$  (—) y  $Q_1 = Q_2 = 0$  (—).  
 C) Curvas correspondientes al modelo mixto completo con  $I1=100$  (—), al modelo simplificado  $v = P_1[S]/(1+Q_1[S])$  (—),  $v = P_2[S]/(1+Q_2[S])$  (—) y  $v = P_3[S]/(1+Q_3[S])$  (—).

Estos resultados ponen en evidencia que cada término del numerador, junto con el término de igual orden del denominador, controlan la velocidad de reacción en un determinado rango de concentraciones de sustrato. Es decir, que dado un valor de [S], solo son relevantes, en la ecuación 46 (pag. 155), un término del numerador y uno del denominador, cometiéndose un error despreciable por no considerar el resto de la ecuación. Sin embargo, la contribución de cada término mostró que los términos de grado 1 son relevantes para [S] < 7,5 y 15 µM respectivamente y los de grado 3 lo son a partir de [S] > 1,4 y 0,720 M respectivamente (figura 55). Más aun, la expresión 46 (pag. 155) es suficiente para valores de [S] < 132 µM y la ec. 47 (pag. 155) para concentraciones mayores de 582 mM. En cambio, los términos de grado 2, no tienen un rango donde definan por si mismos a la velocidad de reacción.

$$\text{a baja [S]} \quad v = \frac{P_1[S]}{1 + Q_1[S]} \quad (54)$$

$$\text{a alta [S]} \quad v = \frac{P_3[S]^3}{1 + Q_3[S]^3} \quad (55)$$

Este hecho define el rango de validez del supuesto, que asimila a la primer parte de la curva a una hipérbola equilátera, y la expresión que corresponde al mismo. Es interesante hacer notar que el valor equivalente al Km, es  $1/Q_1$ , o sea  $1/(1/K_s + 1/K_i)$  para el modelo 3D, y para el modelo mixto es  $1/(I_3 + I_8 + I_{10})$ , es decir  $1/(1/K_s + 1/K_i + k_v/(k_w K_s) - a' / (\alpha' K_i))$ . Esta

expresión demuestra que al estimar  $K_s$ , la inhibición por sustrato introduce un error aun a baja concentración del mismo y que no considerar la segunda etapa y la inhibición por sustrato lleva a sobrestimar el valor de  $K_s$  y  $K_i$ .

#### *ASPECTOS TERMODINÁMICOS RELACIONADOS AL MODELO MIXTO*

Seis de los parámetros de ajuste están relacionados con las velocidades de reacción y permiten el cálculo de la diferencia del cambio de energía libre de activación entre un camino que incluya un complejo ternario o cuaternario y el complejo ES o el E' según corresponda. A esta diferencia la llamamos  $\Delta\Delta g_i^\ddagger$  y se obtiene a partir de la expresión  $\Delta\Delta g_i^\ddagger = -RT\ln(I_i)$ , donde  $i$  es un entero de 2 a 7 (ver tabla XV, pag. 146). En ausencia de poliaminas, las reacciones por los complejos con el sitio  $S_i$  ocupado, SES y SE', presentan una energía de activación menor que las correspondientes a los complejos con el sitio  $S_i$  libre, ES y E'S a pesar que el sitio  $S_i$  es inhibitorio. Esta situación paradójica, se explica por el hecho que a alta concentración de sustrato, la etapa de unión de sustrato no es la limitante, ya que ambos sitios se encuentran saturados. La limitante en estas condiciones es la reacción misma, y para esta la diferencia en energías libres de activación es  $-RT\ln(a)$  o  $-RT\ln(a')$ , y estas son 1,311 y 0,575 Kcal/mol respectivamente. A muy baja concentración de sustrato, en cambio, los complejos son minoritarios y la reacción debe remontarse, energéticamente hablando, desde la enzima libre, y desde allí, corresponden los valores calculados para  $\Delta\Delta g_i^\ddagger$  a partir de  $I_2$  y de  $I_3$ . En todos estos casos hay que tener en cuenta además que para entender los cambios de energía libre en un proceso no basta con los valores estándar.

Por otra parte, puede notarse, tanto en este análisis, como observando el valor de las constantes de inestabilidad, que la unión de S a cualquier sitio de la enzima libre no presentan gran diferencia de afinidades, pero sí una fuerte cooperatividad negativa.  $K_i$  es apenas 4 veces  $K_s$ , pero el factor de interacción  $\alpha$  es 12.

En el caso de las poliaminas, encontramos una relación lineal entre la energía libre de unión para las distintas formas en que se encuentra la enzima y el número de nitrógenos de la poliamina (figura 56). Cada aminopropilo parece aportar la misma cantidad definida al  $\Delta G^\circ$  de unión de la poliamina. Además, dicho aporte es distinto según esté o no, la enzima acetilada. Es evidente una diferencia en las pendientes que indica mayor influencia de cada aminopropilo para la forma acetilada.

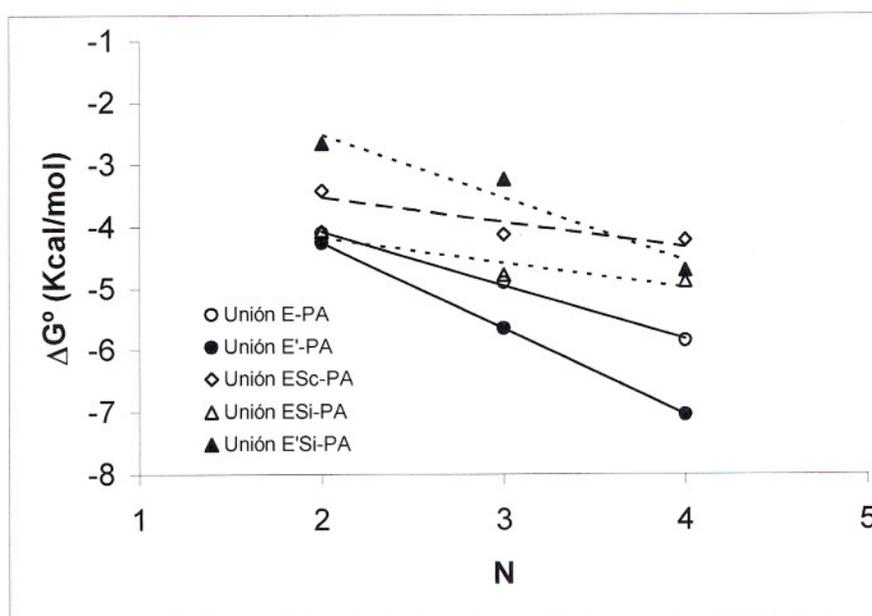


Figura 56: Valores calculados de  $\Delta G^\circ$  para la unión de las poliaminas a los distintos complejos.

Por otro lado, el valor absoluto de  $\Delta\Delta g^\ddagger$  disminuye linealmente con el número de aminopropilos, ya sea por unión al complejo ES o al  $E'$ , pero el efecto es más marcado en la segunda etapa catalítica como lo indican los cálculos a partir de  $I_4$  y de  $I_5$ , que dan un valor de -1,58 y -0,61 Kcal/mol respectivamente por cada amino propilo agregado, pero esto ocurre principalmente a costa del efecto sobre las constantes de afinidad en la segunda etapa como puede verse en la figura 57. Consistentemente, el valor obtenido de "b" es aproximadamente de 1 (ver tabla XIX, pag. 151).

En la primer etapa la situación es más incierta. Solo si los valores de "b" son los mínimos, el caso es parecido al anterior.

Finalmente, no hay reacción a través de los complejos cuaternarios ya que los mismos no se forman y no estarían presentes en el medio.

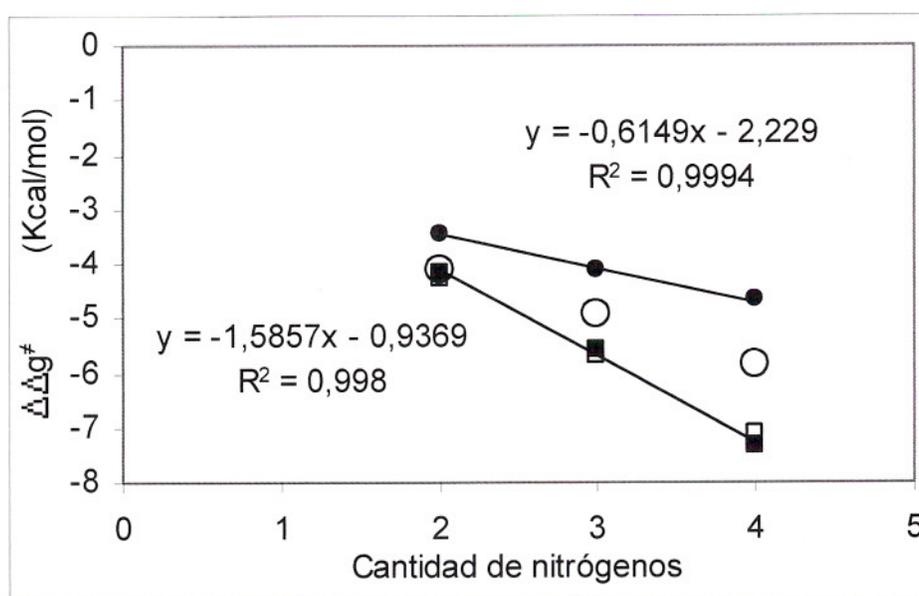


Figura 57: Valores de  $\Delta\Delta g^\ddagger$  correspondientes a los complejos BES (●) y  $BE'$  (■) calculados a partir de  $I_4$  e  $I_5$  (ver tabla XVIII, pag. 150). Insertas las ecuaciones de cada una de las rectas ajustadas y los correspondientes valores de  $R^2$ . Se superpusieron los valores de  $\Delta G^0$  derivados de las constantes de afinidad global de los complejos BES (○) y  $BE'$  (□) representados en la figura 56.

Tabla XX: Cambios en las energías libres estándar de formación y variaciones en los cambios de energía libre estándar de activación para las interacciones de AChE y su sustrato en ambos sitios de unión, calculadas a partir de los valores obtenidos de los parámetros ajustados que figuran en la tabla XVIII (pag 150).

	$\Delta\Delta g^\ddagger$ o $\Delta G^\circ$ (Kcal/mol)	Parámetro o constante involucrada	
$\Delta\Delta g^\ddagger$			
$\Delta\Delta g^\ddagger_{E-Sc-Si} = \Delta g^\ddagger_{E-Sc-Si} - \Delta g^\ddagger_{E-Sc}$	-2.22		I <sub>2</sub>
$\Delta\Delta g^\ddagger_{E'-Si} = \Delta g^\ddagger_{E'-Si} - \Delta g^\ddagger_{E'}$	-3.60		I <sub>3</sub>
$\Delta G^\circ$ de unión			
$\Delta G^\circ_{E-Sc}$	-5.64	Ks	
$\Delta G^\circ_{E-Si}$	-4.99	Ki	
$\Delta G^\circ_{E-Sc-Si}$	-9.17	$\alpha \times Ks \times Ki$	I <sub>9</sub>
$\Delta G^\circ_{\alpha}$ (interacción E-Sc-Si)	+1.47	$\alpha$	
$\Delta G^\circ_{E'-Si}$	-4.17	$\alpha' \times Ki$	I <sub>11</sub>
$\Delta G^\circ_{\alpha'}$ (interacción E'-Si)	+0.82	$\alpha'$	

### 5.3 DISCUSIÓN

Acetilcolinestrasa es una enzima con propiedades muy interesantes. Entre ellas, la cinética presenta características particulares. En los últimos años se han usado varios modelos cinéticos para interpretar distintos aspectos de la misma, tales como efecto del pH (Rosenberry, 1975), función de distintos aminoácidos (Vellom y col., 1993), o simplemente para interpretar el proceso de catálisis (Hasan y col., 1980). En todos los casos en los que el objeto del trabajo es para interpretar un efecto sobre la enzima, el modelo es deducido a partir del supuesto de equilibrio. La ecuación paramétrica es un cociente de dos polinomios de la concentración de sustrato, sin término independiente en el numerador. Nosotros mismos desarrollamos modelos cuyas ecuaciones paramétricas son de grado 2 o 3 en ambos casos.

Demostramos que las ecuaciones paramétricas más simples que ajustan satisfactoriamente a los datos experimentales son cocientes de polinomios de grado dos en concentración de sustrato, sin término independiente en el numerador (Tabla XII, Figura 40, pag. 139 y 140). A pesar de esto, el efecto de moduladores demuestra la necesidad de considerar el modelo mixto, aunque a primera vista es el más complejo de los tratados hasta aquí, ya que es de grado 3 para [S] en el numerador y denominador.

Los ajustes realizados a partir de expresiones de grado 1 en el numerador y 2 en el denominador conducen en todos los casos a altos valores de RSD y de AIC, mostrando un sesgo muy importante respecto de los datos experimentales (tabla XII, figura 40). Esta falta de ajuste ha sido reportada por varios autores, que incluso han propuesto un modelo de grado dos en numerador y denominador. Por esta razón, cualquier modelo del primer tipo de-

bería ser considerado insuficiente para describir la cinética de acetilcolinesterasa, a menos que el análisis se restrinja a concentraciones de sustrato muy bajas. Este hecho claramente puntualiza que el modelo paramétrico más simple que ajusta a los datos experimentales es del segundo tipo, lo que significa que, en el marco del modelo presentado, al menos una de las dos etapas es inhibida por un sustrato mientras que la otra permanece parcialmente activa, ya que el análisis hecho a partir de datos obtenidos en ausencia de moduladores muestra que  $P_3$ , que es  $I_1I_2I_3$  es compatible con cero, pero  $P_2$ , que es  $I_1(I_2+I_3)$ , no lo es, lo que indica que entre  $I_2$  e  $I_3$ , uno y solo uno, es nulo o muy pequeño. Es decir que el análisis hecho a partir del modelo mixto en ausencia de moduladores no permite resolver el sistema. Sin embargo, el mismo modelo aplicado a datos obtenidos en presencia de poliaminas elimina esta indeterminación.

La constante específica de velocidad de reacción  $kv/Ks$  fue calculada a partir del valor ajustado de  $I_1$  y del valor estimado de  $[Et]$  de acuerdo a Salih y col. (1993). El altísimo valor de  $3,21 \times 10^7 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  es consistente con la gran capacidad catalítica de la enzima reportada por varios autores (Hasan y col., 1980; Noltre, 1980).

El valor calculado de  $kcati$  de  $1,64 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$  es aproximadamente el 15% del valor obtenido para  $kcat$  (Salih y col., 1993). En otras palabras, la inhibición por sustrato es solo parcial como ha sido descripta por Radic y col. (1993).

Muchos de los modelos utilizados para interpretar la cinética de AChE se basan en el supuesto de equilibrio (Froede y Wilson, 1984; Vellom y col., 1993; Hasan y col., 1980, Noltre y col., 1980). El mismo ha sido criticado para esta enzima por ser esta una enzima de las consideradas perfectas. El valor estimado por nosotros de  $kv$  es de  $2,23 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$  (tabla XIX, pag. 151). Otros valores publicados son,  $1,23 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$  (Froede y Wilson, 1984),  $6,6 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$  (Hasan y col., 1980),  $1,2 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$  (Noltre y col., 1980). Esto hace pensar

que el sistema opera en estado estacionario, completamente fuera del equilibrio termodinámico, es que dicha velocidad es similar a la prevista por la cinética estadística para la velocidad de llegada de una molécula pequeña a un sitio de unión ubicado en una superficie inmóvil o de muy baja movilidad, como es el caso de una macromolécula. Si la velocidad de unión es similar a la de transformación covalente, es de esperarse que la reacción inversa de la de unión tenga una velocidad despreciable. (Si  $k_f [E][S] \approx k_v [ES] \Rightarrow k_{-1} [ES] \approx 0$ ).

Sin embargo, no se ha hecho medida directa de  $k_f$  o de  $k_{-1}$ , y los intentos por plantear una solución por estado estacionario han conducido a resultados sumamente engorrosos, de los que no puede rescatarse información útil, y esto solo después de haber aplicado restricciones importantes como, por ejemplo, la de suponer que parte de las reacciones no pueden tener lugar, lo que equivale a pre-asignar valor de cero a varias constantes de velocidad de reacción (Hofer y Fingeli, 1981).

Por otra parte, en el planteo por estado de equilibrio, la fase de unión resume todos los eventos que ocurren con el sustrato sobre la enzima hasta el momento anterior a la transformación covalente. No necesariamente se trata de la reacción de unión simplemente.

Finalmente, como dice Segel (1975), si un modelo obtenido por el supuesto de equilibrio ajusta bien a los datos experimentales, se dispone del modelo más simple que describe el sistema. El modelo mixto es el que menos restricciones pre-impone, dentro de los modelos de equilibrio presentados, tanto por nosotros, como de los tomados de la bibliografía.

Demostramos que la relación  $K_s/K_i$  afecta el valor de  $k_{cat}$  obtenido por extrapolación de gráficos linealizados como el de Eadie - Hofstee. Niday y col. (1980) sugirieron a partir de la representación de Hill que no hay interacción entre sitios a baja concentración de sustrato esperando, por esto, que el sitio inhibitorio se encontrara desocupado en esas condiciones. Básicamente, asume que  $K_i \gg K_s$ , y así es posible calcular un valor de  $k_{cat}$  de  $9,3 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ . Este valor es similar incluso al estimado por otros autores que asumen *a priori* que  $K_i \gg K_s$  (Hasan y col., 1980; Noltre y col., 1980; Rosenberry, 1975).

El modelo presentado describe la acción de poliaminas sobre AChE y tiene en cuenta el mecanismo en dos etapas que cuenta con un importante apoyo empírico (Froede y Wilson, 1984).

El alto valor de las constantes  $k_v$  y  $k_w$  son similares a la velocidad de difusión de un sustrato pequeño hacia un sitio de unión específico expuesto en una macromolécula. El criterio por el que puede considerarse que la etapa de unión de un sustrato a una enzima se mantiene en equilibrio termodinámico es que la velocidad de transformación covalente sea más lenta que la velocidad inversa a la de unión, y en este caso puede especularse que no es posible alcanzar el equilibrio.

Sin embargo, la elevadísima actividad que presenta esta enzima puede explicarse, en parte, por la interacción que habría entre el sustrato y los residuos aromáticos de la pared de la grieta en la que se encuentra el sitio activo (Figura 8, pag. 33). La excelente correlación lineal encontrada entre el número de nitrógenos de la poliamina y el logaritmo del valor de la constante de afinidad de la misma por la enzima es consistente con esta hipótesis. Esto agrega una característica interesante al proceso de unión de sustrato, ya que no se trataría de

la unión a un sitio específico y, al menos en principio, puede ser más rápida que la prevista. Para completar este tema falta establecer la contribución entálpica y entrópica aportada por cada amino propilo a la unión de las poliaminas a colinesterasa.

Tras la acetilación, la unión a poliamina aumenta la eficiencia de la hidrólisis para Spm y Spd y disminuye para Put. Es posible que un amonio, unido a un sitio de unión de amonio, provoque una caída en la velocidad de hidrólisis, pero que la unión de cada amino propilo ocasiona un descenso en la energía libre de activación, llevando a que putrecina no sea capaz de revertir la inhibición parcial, pero que espermina y espermidina sí la compensen, e incluso que aparezcan como activadoras de la segunda etapa.

Inicialmente la inhibición por sustrato ha sido interpretada como la unión de más de una molécula de sustrato al sitio activo por exceso de concentración de este (Nachmansohn y Wilson, 1951), pero la estructura tridimensional de la molécula deducida a partir de la imagen de difracción de rayos X, muestra un sitio de unión para sustrato fuera de la garganta que hoy se interpreta como el sitio a través del cual el sustrato inhibiría la enzima (Sussman y col., 1992).

Sin embargo, la elevada eficiencia de la enzima, no parece ser consistente con la estructura de la molécula que tiene su sitio activo en el fondo de una grieta de 2 nm de profundidad y aproximadamente 0,6 nm de ancho (Figura 8, pag. 33) (Sussman y col., 1992). Con dicha estructura se espera que haya un muy fuerte impedimento estérico que limite la llegada del sustrato. Más aun, el poco espacio disponible, debiera provocar un gran conflicto de tráfico en el interior de la grieta, entre el sustrato acercándose, y los productos alejándose del sitio activo. En estas condiciones, sorprende que la enzima sea tan efectiva.

En resumen, hay una inconsistencia entre la enorme velocidad de reacción catalizada por esta enzima, la estructura del entorno del sitio activo y la interferencia estérica como fenómeno relevante en cinética química.

P. Taylor y colaboradores (comunicación personal), están trabajando en un modelo mecanístico que supone que la enzima cambia entre, al menos dos estados conformacionales, uno con la grieta abierta y otro con la grieta cerrada. Con la grieta abierta, se intercambiarían sustrato y productos libremente, y al cerrarse, el campo eléctrico generado por cargas convenientemente localizadas, conduciría al sustrato hacia el sitio activo.

En las paredes de la grieta los 14 restos aromáticos que cubren el 40% de la superficie interna de la misma con capacidad de unir cationes inespecíficamente, como el sustrato por ejemplo, formando complejos de transferencia de carga. Además, hay pruebas de que al menos cuatro aminoácidos con carga negativa contribuyen a orientar y movilizar ligandos hacia el sitio activo (Radic y col., 1997). Todas estas características deben tener alguna relevancia en el mecanismo de catálisis de la enzima.

## 6. CONCLUSIONES

El malatión (dietil(dimetoxifosfinotioil)tio butanodioato) es uno de los plaguicidas organofosforados más frecuentemente usados, sus residuos han sido detectados en cursos de aguas superficiales (Kimbrough y Little , 1996) y poco es lo que se conoce acerca de sus efectos sobre el desarrollo embrionario de los anfibios y acerca del mecanismo de acción a dosis subclínicas y a tiempos largos de exposición, si bien existe el antecedente de que otros insecticidas anticolinesterásicos han resultado teratogénicos para anfibios (Elleot – Feely y Armstrong, 1982; Schuytema y col., 1994; Snawder y Chamber, 1989; Fordham y col., 2001).

El malatión produjo alteraciones en el desarrollo de embriones de *Bufo arenarum*, Hensel que indujeron alteraciones morfológicas y fisiológicas que se tradujeron en disminución del peso y largo corporal, disminución de la pigmentación, defecto en conformación de las notocordas, branquias y en los intestinos, curvatura del eje anteroposterior entre otras (Rosenbaum y col., 1988; Venturino y col., 1994; Caballero de Castro, 1999). Tales anomalías encuadran en los teratismos de tipo 2 que parecen estar relacionados con las alteraciones fisiopatológicas asociadas a la disminución de la neurotransmisión debido a la inactivación de la AChE y de otras esterasas relacionadas. Como consecuencia de esa inhibición encontramos efectos adaptativos en el receptor colinérgico muscarínico que se tradujeron en una reducción en el número de receptores si bien su afinidad no fue modificada.

Los embriones de *Bufo arenarum* son mucho más tolerantes a la intoxicación por organofosforados que otras especies de vertebrados. Gran parte de esta tolerancia se debe a aspectos analizados críticamente en esta tesis, como las características propias del blanco primario de acción AChE, al contenido en lípidos de reserva característicos de estos embriones y a los cambios en el contenido de receptor muscarínico, que sin duda disminuye la sensibilidad de la membrana post sináptica a la intoxicación colinérgica. Estos estudios complementan el análisis de otros factores estudiados previamente en nuestro laboratorio y que también contribuyen en el proceso como las importantes actividades detoxificantes asociadas a GSH-S transferasas (Anguiano y col., 2001; Anguiano y col., 2002) y la evolución de la actividad de distintas enzimas detoxificantes durante el desarrollo (Caballero de Castro, 1999; Venturino, 2001a).

Demostramos en esta tesis que una de las características más sobresalientes relacionadas a la tolerancia natural del *Bufo* a plaguicidas organofosforados reside en la baja sensibilidad del blanco primario y pusimos en evidencia que es posible que algunos organofosforados presentes efectos inhibitorios distintos a la inactivación por modificación covalente difícil de detectar a través de los protocolos usuales para la cuantificación de la actividad colinesterasa.

Dada la evidencia del rol preponderante que las características cinéticas de AChE tienen en estos mecanismos, al hecho de que al menos algunos organofosforados pueden interaccionar con la enzima de una forma diferente a la descrita tradicionalmente en la biología y a los antecedentes de que las poliaminas sinergizan el efecto tóxico del

malatión (Venturino y col., 1992), decidimos modelar la cinética de acetilcolinesterasa y su modulación por poliaminas con el fin de disponer de una herramienta para interpretar el mecanismo de acción de diversos moduladores sobre esta actividad.

AChE además de ser el blanco primario de la acción de organofosforados y carbamatos ha sido tomada como modelo para el estudio de la modificación química de proteínas por reactivos de serina (Kitz y Wilson, 1962) y como esterasa para el estudio del mecanismo de catálisis. Es considerada como una de las enzimas perfectas por que la relación  $k_{cat}/K_m$ , constante de pseudo orden 2, usualmente considerada como una medida de la eficiencia de una enzima, tiene un valor similar al de la aproximación del sustrato a un sitio activo, por difusión simple.

El hecho de que la enzima tenga una fuerte inhibición por sustrato, sugiere que la etapa limitante es alguna de las etapas catalíticas y no la de difusión. Sin embargo, la elevadísima velocidad de reacción sugiere que el complejo enzima-sustrato nunca estaría en equilibrio con sus componentes separados.

El sitio activo se encuentra en el fondo de una garganta y hacia él, el sustrato debe llegar y desde el mismo los productos deben retirarse con un grave conflicto de tráfico (Figura 8).

Pensamos que la unión del sustrato a la pared de la grieta, es inespecífica, y libre de restricciones de orientación, ya que se trata de la unión de un catión orgánico a restos aromáticos, complejos que han sido descritos como complejos de transferencia de carga (March, 1977). Esta unión, debería ser mucho más rápida que la de un ligando a

un sitio de unión específico en una orientación determinada, por que la superficie de unión es mucho más grande y no hay limitaciones de orientación. Si es así, el límite de la velocidad impuesto por la difusión sería, como mínimo, dos o tres órdenes de magnitud mayor al supuesto.

Además, para considerar que un proceso químico, como por ejemplo una reacción enzimática simple, opera bajo control difusional, la velocidad directa de la etapa de reacción debe ser no despreciable frente a la velocidad de reacción inversa de la etapa de unión, o sea  $k_v \geq k_{-1}$ . En el caso de AChE, se asume que la velocidad inversa de la etapa de unión, es despreciable porque la velocidad de catálisis es comparable con la con el valor de la velocidad de difusión del sustrato. Pero, si el modelo fuera más complejo, y la velocidad de difusión puede suponerse que es mucho mayor que la de catálisis, puede interpretarse que la primer etapa esté en equilibrio químico, y que esta sea el resultado de una cadena de eventos, todos en equilibrio.

El sitio inhibitorio para acetilcolina presenta otra particularidad. Su constante de inestabilidad es más de 100 veces el valor máxima de concentración alcanzado por ATC en el espacio sináptico (Rosenberry, 1979). Más aún, dicha concentración sería solo un quinto de la concentración de sitios activos de AChE y de sitios de unión de AChR. Es probable entonces, que el sitio inhibitorio no tenga, ningún rol fisiológico, ni efecto alguno, ya que su grado de saturación sería, como máximo, de 1/1000 o 1/10000 aproximadamente. Sin embargo, llama la atención que este sitio se encuentra altamente conservado. Además, este sitio se encuentra expuesto en la superficie de la molécula por fuera de la grieta, a diferencia del sitio catalítico que se encuentra escondido,

prácticamente en el centro de la molécula. Este hecho hace pensar que el mismo tiene importancia, posiblemente en el mecanismo de acción de la propia enzima.

En el marco del modelo presentado, la influencia del sitio inhibitorio requiere algunas explicaciones. En primer lugar, su afinidad solamente es  $1/4$  de la del sitio activo, cuando la simple observación de la representación de velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato parece indicar que la misma es menor. Pero, teniendo en cuenta que el complejo EScSi se formaría principalmente a partir del ESc, la afinidad global para el sitio inhibitorio debe considerarse como  $(1/\alpha K_i)$  que es 20 veces menor que  $1/K_s$ .

En segundo lugar, teniendo en cuenta que este sitio está principalmente libre la mayor parte del tiempo, su intervención debería ser irrelevante. Pero, como ya hemos señalado, se encuentra altamente conservado.

Creemos que es posible proponer un mecanismo de catálisis que explique los resultados presentados en esta tesis y las aparentes contradicciones discutidas. Nuestra interpretación de los resultados es que al ocuparse el sitio inhibitorio se produzca el cambio conformacional de garganta cerrada a abierta acompañada de la hidrólisis y liberación de los productos, seguida de un libre y muy rápido intercambio de actilcolina entre el medio y los restos aromáticos de la pared de la garganta. Al desocuparse Si se cierra la garganta y un campo eléctrico provocado por cargas convenientemente localizadas impulsarían al sustrato hacia el sitio activo donde ya podría proceder con la primer etapa de catálisis. El ciclo vuelve a repetirse comenzando por la unión de otra molécula de

sustrato al sitio Si. No hay información acerca de la velocidad con que esto ocurre, pero tratándose de la aproximación de un sustrato de bajo peso molecular uniéndose a un sitio específico que se encuentra casi completamente libre, la velocidad debería ser la impuesta por la difusión.

Consistentemente con los valores observados de  $k_{cat}/K_s$ , la velocidad queda definida por la difusión del sustrato, pero no hacia el sitio catalítico, sino hacia el inhibitorio. Por tratarse este último de un sitio específico, expuesto en la superficie de la macromolécula, cumple con las condiciones para considerar que dicha velocidad sea del orden de  $10^8$  a  $10^9$   $M^{-1}s^{-1}$  tal como se observa experimentalmente.

Esta propuesta justifica que la velocidad de catálisis sea similar a la de difusión, que el sitio activo esté tan escondido, que la pared de la garganta tenga tantos restos aromáticos y que el sitio inhibitorio este expuesto, se encuentre siempre presente y se haya conservado en la evolución. Hasta abre la puerta para justificar el análisis cinético del sistema a partir del supuesto de equilibrio.

En nuestro laboratorio se ha probado el efecto sinérgico que la presencia de poliaminas en el medio externo tiene sobre la sensibilidad a malatión (Venturino y col., 1992). También se ha evaluado el efecto de poliaminas sobre el estrés oxidativo que acompaña a la intoxicación por malatión (Venturino y col., 2001a). Sin embargo, no hay otros estudios tendientes a interpretar el mecanismo por el que las poliaminas influyen en la sensibilidad de los embriones a organofosforados. Estudiar la forma en que

influyen en la cinética de la enzima, es una manera de empezar a entender el mecanismo en cuestión.

La cinética de AChE es afectada por distintos amonios orgánicos. Un solo informe anterior trata el efecto de poliaminas sobre esta actividad (Kossorotow y col., 1964). A partir de nuestros resultados se torna relevante analizar el posible rol que estas aminas tienen en la función sináptica, así como también el efecto, y el mecanismo, por el que las mismas influyen en el proceso de intoxicación por organofosforados.

Nuestros resultados indican que además de la relación directa entre inhibición de AChE y mortalidad, existen una serie de efectos subletales sobre el metabolismo proteico, lipídico y la actividad detoxificante que condicionan el desarrollo embrionario y reducen el éxito reproductivo y por ende la supervivencia de la especie. Sin embargo, cuando debe establecerse un mecanismo confiable de diagnóstico en la toxicología regulatoria solo es aprovechable el análisis de la inhibición de AChE.

## 7. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Akaike H., A (1973) “*New look at the statistical model identification.*” IEEE Trans. Aut. Contr. **19**, 716 - 723.

Aldridge W.N., Reiner E. (1972) “*Enzyme Inhibitors as Substrates. Interactions of esterases with esters of organophosphorous and carbamic acids*”. En: North Holland Research Monographs. Frontiers of Biology. Vol 26, Cap 2, pp 8 – 36. Neuberger A., Tatum E.L. Eds. North Holland Publishing Co. Amsterdam, London.

Anguiano O.L., Montagna C.M., Chifflet de Llamas M. Gauna L., Pechen de D'Angelo A.M. (1994). “*Comparative toxicity of parathion in early embryos and larvae of the toad **Bufo arenarum**, Hensel*”. Bull. Environm. Contam. **49**, 649 – 655.

Anguiano, O.L.; Caballero de Castro A.C., Rosenbaum, E.; Venturino, A.; Pechen de D'Angelo, A.M. (1998) “*Afectan los plaguicidas la supervivencia de las poblaciones de anfibios*”. Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia **141**, 1 - 10.

Anguiano O.L., Caballero de Castro A.C., Pechén de D'Angelo A.M. (2001) “*The role of gsh conjugation in the regulation of early toad embryo tolerant of pesticides*”. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 128, 35-43.

Anguiano O.L. (2002) "*Inducción por plaguicidas de enzimas detoxificantes de la fase II durante el desarrollo embrionario de anfibios*". Tesis de Magíster. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Comahue.

Ballschmiter K. (1996) "*Persistent, ecotoxic and bioaccumulative compound and their possible environmental effects*". Pure Appl. Chem. **68**, 171 – 1780.

Barinaga M. (1990) "*Where have all the froggies gone?*" Science **247**, 1033-1034.

Bartels, Nachmanshon D. (1969) "*Organophosphate inhibitors of acetylcholine receptors and esterase tested on electropac*". Arch. Biochem. Biophys. **133**, 1 – 10.

Bazelyansky M., Robey E., Kirsch J.F (1986) "*Fractional diffusion-limited component of reactions catalyzed by acetylcholinesterase*". Biochem. **25**, 125 – 130.

Baez M., Rodriguez M., Lastra O., Peña A., De La Colina C., Sánchez Rasero F (1996) "*Residuos de plaguicidas en aguas superficiales de la V región de Chile. Estudio prospectivo*". Boletín de la Sociedad Chilena de Química 41, 271 – 276.

Bonner T.I., (1989). "*New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors*". Trends Pharmacol. Sci. **10 Supl.** 11 – 15.

Bomser J., Casida J. (2000) "*Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 44/42) by chlorpyrifos oxon in chinese hamster ovary cells.*" J. Biochem. Molec. Toxicol. **14**, 346 – 353.

Bylund D.B., Martinez J.L., Pierce D.L. (1982) "*Regulation of autonomic receptors in rat submandibular gland*". Mol. Pharmac. 21, 27 - 35.

Byrne F.J., Devonshire A.L. (1997) "*Kinetics of insensitive acetylcholinesterases in organophosphate-resistant tobacco whitefly, Bemisia tabaci (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae*". Pestic. Biochem. Physiol. **58**, 2, 119 - 124.

Caballero de Castro A.C., Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M. (1991) "*Effect of malati3n on Bufo arenarum Hensel development. I Esterase inhibition and recovery*." Biochem. Pharmacol. **41**, 491 – 495.

Caballero de Castro A.C. (1999) "*Efectos letales y subletales del malati3n sobre el desarrollo embionario del sapo Bufo arenarum Hensel. Aspectos toxicol3gicos y Bioqu3micos*". Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur.

CASAFE (1998) Informe anual de la C3mara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

Churchill L., Pazdernik T.L., Samson F., Nelson S.R. (1984) "*Topographical distribution of down-regulated muscarinic receptors in rat brains after repeated exposure to diisopropyl phosphorofluoridate*". Neurosci. **11**, 2, 463 - 472.

Cioggi C.L., El-Fakahany E.E. (1988) "*Lacks of alteration in muscarinic receptors subtypes and phosphoinositides hydrolisis upon acute DFP treatment*". Eur. J. Pharmacol. **156**, 35 – 45.

Cooke A.S. (1977) "*Effects of field applications of the herbicides diquat and dichlobenil on amphibians*". Environ. Pollut. **12**, 43 - 50.

Corbertt, J.R. (1974) "*Insecticides inhibiting acetylcholinesterase*". En: The Biochemical Mode of action of Pesticides. Cap. 3, pp 107 – 164. Academic Press. London New York.

Costa L.G., Murphy S.D. (1982). "*Passive aviodance retention in mice tolerant to the organophosphates insecticide disulfoton*". Toxicol. Appl. Pharmacol. **65**, 451 – 458.

Costa L.G., Murphy S.D. (1985) "*Characterization of muscarinic cholinergic receptors in the submandibular gland of the rat*". J. of Automatic Nervous System **13**, 287 - 301.

Costa C., Garrido T., Olivilla L., Ginebreda A., Niñerola J.M., Orejudo E., Fraile J. (1998) "*Presencia de plaguicidas en diversos acuíferos de Cataluña. Análisis de los resultados obtenidos*". En: "Plaguicidas, aspectos ambientales, analíticos y Toxicológicos". Morell L., Candella L. Eds. (1998) Universitat Jaume I., España.

Davis B.J. (1964) "*Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins*". Ann. N.Y. Acad. Sci. **121**, 404 - 427.

Deuchard E.M., (1966) "*Biochemical aspects of amphibian Development*". Menthon & Co. Ltd. London.

Di Cera E., Hopfner K.P., Dang Q.D. (1996) "*Theory of allosteric effects in serine proteases*". Biophys. J. **70**, 174 – 181.

Dodson, G.; Wlodawer, A. (1998) "*Catalytic triads and their relatives*". Trends Biochem. Sci. **23**, 92, 347 - 352.

Dumpert, R. and Zeitz, E. (1984) "*Platanna (Xenopus laevis)* as a test organism for determining the embryotoxic effects of environmental chemicals". *Ecotoxicology and Environmental Safety* **8**, 55 - 74.

Ecobichon D.J., (1982a) "*Introduction*". En: "Pesticide and Neurological Disease" En: Ecobichon D.J., Joy R.M. Introduction, pp 1 – 14. CRC press.

Ecobichon D.J., (1982b) "*Organophosphorus ester insecticides*". En: "Pesticide and Neurological Disease" Ecobichon D.J., Joy R.M, Cap 5, pp 151 – 204. CRC press.

Ecobichon D.J., (1982c) "*Chlorinated hydrocarbon insecticides*". En: "Pesticide and Neurological Disease" Ecobichon D.J., Joy R.M, Cap 4, pp 91 – 150. CRC press.

Eduards C.A., Fisher S.W., (1991) "*The use of cholinesterase measurement in assessing the impact of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates in cholinesterase inhibiting insecticides: their impact on wild life and the environment*". Ed. P. Mineau Elsevier, Amsterdam, P-255.

Ehlert F.J., Kokka N., Fairhurst A.S. (1980) "*Muscarinic Receptor Subsensitivity in the Longitudinal muscle of the rat ileum Following Chronic Anticholinesterase treatment with diisopropylfluorophosphate*". *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1391 - 1397.

Eldefrawi H.E., Britten A.G., O'Brien R.D. (1971) "*Action of organophosphates on binding of cholinergic ligands*". *Pestic. Biochem. Physiol.* **1**, 101 – 108. Eldefrawi , ME (1971)

Elleott – Feeley E., Armstrong J.B. (1982). "*Effect of fenitrothion and carbaryl on Xenopus laevis development*". *Toxicology* **22**, 319 – 335.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. (1961) "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity" *Biochem. Pharmac.* **7**, 88 - 85

O.M.S. Environmental Health Criteria 63 (1986). Organophosphorus insecticides: A general introduction.

Escudero, M.A.; Cespedes, M.V.; Vilanova, E. (1997) "Chromatographic discrimination of soluble neuropathy target esterase isoenzymes and related phenyl valerate esterases from chicken brain, spinal cord, and sciatic nerve". *J. Neurochem.* **68**, 5, 2170-2176.

Eto M., (1977). Organophosphorus pesticides: Organic and physiological Chemistry. 3 Ed., CRC Press, Florida, USA.

Flaugi C., Ranieri M., (1985) "Acetylcholinesterase (AChE) and pseudocholinesterase (BChE) activity distribution pattern in early developing chick limbs" *J. Embriol. Exp. Morphol.* **86**, 89 - 108.

Fields J.Z., Roeske W.R., Morkin E., Yamamura H.I. (1978) "Cardiac muscarinic Acatylcholine receptor. Biochemical. identificationn and characterization". *J. Biol. Chem.* **253**, 3251 - 3258.

Fluck R.A., (1978) "Acetilcholine and acetylcholinesterase in early embryos of the medaka *Oryzias latipes*, a teleost". *Dev. Growth. Differ.* **20**, 17 - 25.

Fluck R.A., Wynshaw-Boris A.J., Schneider L.M. (1980) "Cholinergic molecules modify the *in vitro* behavior of cells from early embryos of the medaka *Oryzias latipes*, a teleost fish". *Comp. Biochem. Physiol.* **67c**, 29 - 34.

Fluck R.A. (1982) "*Localization of acetylcholinesterase activity in young embryos of the medaka **Oryzias latipes**, a teleost*". Comp. Biochem. Physiol. **72C**, 1, 59 – 64.

Fordham C., Tessari J.D., Ramsdell H.S., Keefe T.J. (2001) "*Effects of malathion on survival, growth, development and equilibrium posture of full frog tadpoles (**Rana catesbiana**)*". Environ Tox Chem **20**, 179 – 184.

Fournier J.C., Soulas G., Parek Nisha R. (1997) "*Main microbial mechanisms of pesticide degradation*". Soil Ecotoxicology, pp 85 – 116. CRC Press Inc.

Freeman S.J., Lloyd J.B., (1983). "*Inhibition of proteolysis in rat yolk sacs as **in vivo***". J. Embryol. Exp. Morphol. **78**, 196 – 197.

French-Constant R.H.; Park, R.; Feyereisen, R. 1999 "*Molecular biology of insecticide resistance*". En: Molecular Biology of the Toxic Response. Purga, A. y K. Wallace (Eds.). Taylor y Francis, Philadelphia, pp 533 - 552.

Froede H.C., Wilson I.B. (1984) "*Direct determination of acetyl-enzyme intermediate in the acetylcholinesterase-catalyzed of acetylcholine and acetylthiocholine*". J. Biol. Chem. **259**, 11010 – 11013.

Gant D.B. Eldefrawi M.E., Eldefrawi A.T. (1987) "*Action of organophosphates on GABA<sub>A</sub> receptor and voltage-dependent chloride channels*". Fund. Appl. Toxicol. **9**, 698 – 704.

Gauna L., Caballero de Castro A.C., Chifflet de Llamas M., Pechen de D'Angelo, A.M. (1991) "*Effects of dieldrin treatment on physiological and biochemical aspects of the toad embryonic development*". Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **46**, 4, 633 - 640.

Gazit H., Silman I., Dundai Y., (1979) "*Administration of an organophosphate causes a decrease in muscarinic receptor levels in rat brain*". Brain Res. **174**, 351 – 354,.

Ghezal F., Miloudi M.E.A., Bennaceur M., Zayed S.M.A.D. (1997) "*Behaviour of C-14-malathion in north African soils*". Analyst **122**, 8, 859 - 862.

Gillette J.R., (1980) "*Enzimatic basis of detoxification*". Jakoby W.B. (ed.) Vol. **2**, 9 – 24. Acad. Press.

Gonzalez F.J. (1995) "*Human cytochrome P-450 and their roles in environmientally-based disease in application of molecular biology*". En: Environmental Chemistry, Hinear R., Ford A., Needham L., Karch N., Eds. CRC Press inc. pp 111 – 131.

Greenhouse G. (1976) "*The evaluation of toxic effects of chemicals in fresh water by using frog embryos and larvae*". Environm. Pollut. **11**, 303 - 315.

Guarino A. M., Arnold S.T. (1979) "*Xenobiotic transport mechanisms and pharmacokinetics in the dogfish shark*". En: Pesticides and Xenobiotic Metabolism in Acuatic Organisms. Kahn M.A.Q. ed. Cap 15, pp 233 – 258.

Guftafson D.J. (1989) "*Ground Ubiquity Score. A simple method for assessing pesticide leachability*". Environm. Toxicol. Chem. **8**, 339 – 357.

Gupta R.C., Dettbarn W.D. (1993) "*Role of carboxiesterases in the prevention and potentiation of N-methylcarbamate toxicity*". Chem. Biol. Int. **87**, 295 – 303.

Hall R.H., Kolbe E. (1980). "*Bioconcentration of organophosphorus pesticides to hazard levels by amphibians*". J. Toxicol. Environm. Health **6**, 853 – 860.

Hasan F.B., Cohen S.G., Cohen J.B. (1980) "*Hydrolysis by acetylcholinesterase. Apparent molal volumes and trimethyl and subsites*". J. Biol. Chem. **255**, 9, 3898 – 3904.

Hayes Jr, W. J. (1975) En: Toxicology of Pesticides. . Introduction, pp 1 – 36. Willams & Wilkins Company Ed. Baltimore, USA.

Henderson M., Kitos P.A. (1982) "*Do organophosphate insecticides inhibit the conversion of tryptophan in NAD<sup>+</sup>?*". Teratology **26**, 173 – 181.

Hofer P., Fringeli U.P. (1981) "*Acetylcholinesterase kinetics*". Biophys. Struct. Mech. **8**, 45 - 59.

Holmes R.S., Masters C.J. (1967) "*The developmental multiplcity and isoenzyme status of cavian esterases*". Biochem. Biophys. Acta **132**, 372 - 399.

Honkanen R.E., Abdel-Latif A.A. (1988) "*Characterization of cholinergic muscarinic receptors in the rabbit iris*". Biochemical Pharmacology **37**, 13, 2575 – 2583.

Hudson R.H., Toker R.K., Haegle M.A. (1984) En: Handbook of toxicity of pesticides to wild life, Resource Pub. 153 U.S. Fish and wild life service, Washington D.C.

Houlahan J.E., Findlay C.S., Schmidt B.R., Meyer A.H., Kuzmin, S.L. (2000) "*Quantitative evidence for global amphibian population declines*". *Nature* **404**, 752-755.

Iglesias-Jimenez, E.; Poveda, E.; Sanchez Martin, M.J.; Sanchez Camazano, M. (1997) "*Effect of the nature of exogenous organic matter on pesticide sorption by the soil*". *Arch Environm. Contam. Toxicol.* **33**, 2, 117 - 124.

Jokanovic M., Stepanovic R.M., Maksimovic M., Kosanovic M., Stojiljkovic M.P. (1998) "*Modification of the rate of aging of diisopropylfluorophosphate-inhibited neuropathy target esterase of hen brain*". *Toxicology Letters* **95**, 2, 93 - 101.

Johnson W.W., Finley M.T., (1980) *Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates*. Resource Pub. 137 U.S. Fish and wild life service, Washington D.C.

Jones S.W., Sumikawa K. (1981) "*Quinuclidinyl Benzilate binding in house fly heads and rat brain*". *J. Neurochem.* **36**, 454 - 459.

Kaufer D., Friedman A., Seidman F., Soreq H. (1998) "*Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression*". *Nature* **393**, 373 – 377.

Kehoe J. (1972) "*Three acetylcholine receptors in *Aplysia* neurons*". *J. Physiol. (Lond.)* **225**, 115 - 146.

Kimbrough R.A., Little D.W. (1996) "*Pesticides in streams chaining agricultural and urban areas in Colorado*". *Envir. Sci. Technol.* **30**, 908 – 916.

Kirs, V.E. (2000) "*Dinámica y degradación de plaguicidas organo-fosforados en suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén*". Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Comahue.

Kitos P.A., Anderson D.S., Uyeki E.M., Misawa M., Wyttenbach C.R. (1981) "*Teratogenic effects of cholinergic insecticidas in chick embryos. II. Effects on the NAD<sup>+</sup> content of early embryos*". *Biochemical Pharmacology* **30**, 2225 – 2235.

Kitos P.A. Suntorwal O. (1992) "*Teratogenesis effect of orgaophosphorus compounds*". En: *Organophosphates: chemistry, Fate and Effects*. Ed. J.Chambers and P. Levi. Cap 20, pp 387 – 416. Academic Press.

Kitz R., Wilson I.B. (1962) "*Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase*". *J. Biol. Chem.* **273**, 2345 - 3249.

Knedel W., Chiquín J.C., Perez J., Rosales S. (1999) "*Determination of pesticides on surface and ground water used in human consumption in Guatemala*". IAEA-TECDOC-1116.

Kolpin D.W., Barbash J.E., Gilliom R.J. (1998) "*Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: Initial results of the National Water Quality Assessment Program*". *Envirionm. Sci. Technol.* **32**, 558 – 566.

Kossorotow A., Wolf H.U., Seiler N. (1974) "*Regulatory effects of polyamines on membrane-bound acetylcholinesterase*". *Biochem J.* **144**, 21 – 27.

Krueger J., Törnqvist L. (1998) "*Multiple regression analysis occurrence in streamflow related to pesticide properties and quantities applied*". *Chemosphere* **37**, 189 – 207.

Laemmli U.K. (1970) "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*". Nature **227**, 680 - 685.

Large T.H., Cho N.J., De Mello F.G. Klein W.L. (1985) "*Molecular alteration of a muscarinic acetylcholine receptor system during synaptogenesis*". J. Biol. Chem. **260**, 15, 8873 - 8871.

Layer P.G., Alber R., Sporns O. (1987) "*Quantitative development and molecular forms of acetyl and butyrylcholinesterases during morphogenesis and synatogenesis of chick and retina*". J. Neurochem. **49**, 1, 175 – 182.

Leblanc G.A., Bain L.J., Wilson V.S. (1997) "*Pesticides: Multiple mechanisms of demasculinization*". Mol Cell Endocrinol. **126**, 1, 1 – 5.

Llamas M.C., Castro A.C., Pechén de Dángelo A.M. (1985) "*Cholinesterase activities in developing amphibians embryos following exposure to the insecticides dieldrin and malathion*". Arch. Environ. Cont. **14**, 161 - 166.

Loewy R.M., Kirs V., Carvajal G., Venturino A., D'Angelo A.M.P. (1999) "*Groundwater contamination by azinphos methyl in the northern patagonic region (Argentina)*". The Science of the Total Environment **225**, 211 – 218.

Loewy R.M. (2000) "*Plaguicidas en aguas subterranas del Alto Valle del Río Negro y Neuquén*". Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Comahue.

Loewy R.M., Carvajal G., Pechen de D'Angelo A.M. (2001) "*Residuos de plaguicidas en efluentes de industrias agroalimentarias y aguas superficiales*". 4ta Reunión Anual de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC).

Loewy R.M., Carvajal L.G., Pechen de D'Angelo A.M. (2003) "*Effect of pesticide use in fruit production orchards on shallow ground water*". J. Environmental Science. Parte B - Pesticide, Food contaminants, and Agricultural waste. B38, 3, 317 – 325.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) "*Protein measurement with Folin phenol reagent*". J. Biol. Chem. **193**, 269 - 275.

Mackness B., Mackness M.I., Arrol S. Turkie W., Durrington P.N. (1998) "*Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification*". FEBS Lett. **423**, 1, 57 – 60.

Main A.R. (1984) "*Mode of action of anticholinesterrases*". En: Differential toxicities of insecticides and halogenated aromatics. Matsumura Ed. Cap. 6, pp 351 – 400, Pergamon Press.

Main, A.R., Rush R.S. (1980) "*Hydrolysis of choline esters by rabbit liver oligomeric and monomeric carboxylesterases (EC 3.1.1.1)*". J. Biol. Chem. **255**, 7168 - 7173.

Massoulié J., Bon S. (1982) "*The molecular form of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates*". Ann. Rev. Neurosci. **5**, 57 – 106.

Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Coussen F., Kreijci E., Legay C. (1995) "*The C-terminal alternative regions of acetylcholinesterase*". En: Enzyme of the Cholinesterase Family. Quinn D.M. Ed. Plenum Press, New York.

March J. (1977) "*Advanced Organic Chemistry Reactions. Mechanism and Structure*", última edición. McGraw Hill Book Company. ISBN 0-07-040247-7.

Mc'Phillips J.J. (1969) "*Subsensitivity of the rat ileum to the cholinergic drugs*". J. Pharmac. Exp. Théor. **166**, 249 - 259.

Matsumura F. (1985a) "*Toxicological Studies in Insects*". En: Toxicology of Insecticides. Matsumura F. Cap. 6, pp 299 – 345.

Matsumura F. (1985b) "*Modes of action of insecticides*". En: Toxicology of Insecticides. Matsumura F. Cap. 4, pp 111 – 202.

Milatovic D., Dettbarn W.D. (1996) "*Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat*". Toxicol. Appl. Pharmacol. **136**, 20 – 28.

Moss D.E., Deutsch J.A. (1965) Cholinergic Mechanism pp 438 - 492. Raven Press N.Y.

Murray T.G., Mpitsos G.J., Siebenaller J.F., Barker D.L. (1985) "*Stereoselective L 3H-QNB binding sites in nervous tissue of *Aplysia californica*: Evidence for muscarinic receptors*". J. of Neuroscience **5**, 12, 3184 - 3188.

Mpitsos, G.J., Murray, T.F., Creech, H.C. and Barker, D.L., (1988) "*Muscarinic antagonist enhances one-trial food-aversion learning in the mollusc **Pleurobranchea***".

Brain Res. Bull., **21**, 169 - 179

Nachmansohn D., Wilson I.B. (1951) "*The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine*". Adv. Enzymol. **12**, 259 - 339.

Natale O., Gomez C., Vermeulen J., Casamiquela C., D'Angelo A.M.P., Loewy M., Alcalde R., Vernier B., Schultz F., Cardot L. (1995) Manual de evaluación y manejo de sustancias Tóxicas en aguas Superficiales. Anexo 2. Estudio de caso: Río Negro, Argentina. Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud. Programa de Salud Ambiental. Coordinador Editor: Henry J. Salas.

Niday, E., Wang C.S., Alaupovic P. (1980) "*Kinetic evidence for the allosteric substrate inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase*". Biochim. Biophys. Acta **612**, 67 - 72.

Noltre, H.J., Rosenberry T.L., Neumann E. (1980) "*Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the anionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands*". Biochem. **19**, 3705 - 3711.

O'Brien R.D. (1967) Insecticide action and metabolism. Academic Press N.Y.

Oppennoorth F.J. (1984) "*Biochemistry of insecticide resistance*". Pest. Bioch. Physiol. **22**, 187 - 193.

Oppernooth F.J. (1985) En: "Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology" Kerbut G.S. and Silbert L.J. Eds. Vol 12, pp731 - 773. Pergamon Press, Oxford

Ozaki H., (1976) "*Molecular properties and differentiation of acetylcholinesterase in seq Urchin embryos*". Development Growth and Differentiation. **18**, 3, 245 – 257.

Paschen, W. (1992) "*Polyamine metabolism in different pathological states of the brain*". Molecular Chemistry and Neuropathology **16**, 241-271.

Pechen de D'Angelo A.M., Bazan N.G. (1977) "*Lipid metabolism in early development using labeled precursors incorporates during oogenesis and in cell-free embryos homogenates*". Lipids **12**, 2, 131 – 134.

Pechen de D'Angelo A.M., Bonini de Romanelli I.C., Bazan N.G. (1974) "*Distributional changes of <sup>32</sup>P-labeled acid soluble phosphates and phospholipids among subcellular fractions early vertebrate embryonic development*". Biochem. Biophys. Acta **372**, 388 – 398.

Pisanó A., Rengel D. (1982) "*Biología del desarrollo de anfibios*". Manual del curso de postgrado, Laboratorio de Investigaciones Embriológicas (CONICET) y Universidad Nacional del Comahue. Neuquén. Argentina.

Planas C., Caixach J. Santos F.J. Rivera J. (1997) "*Ocurrance of pesticides on Spanish surface. Analysis of high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry*". Chemosphere **34**, 2393 – 2406.

Pope C.N. (1999) "*Organophosphorus pesticides: Do they all have same mechanism of toxicity?*" J. Toxicol. Environ. Health, **B 2**, 161 – 181.

Primo Yufera, E. (1991) "*Ecología Química. Nuevos métodos de lucha contra insectos*". Ediciones Multiprensa, Madrid, España.

Radic Z., Pickering N.A., Vellom D.C., Camp S., Taylor P.. (1993) "*Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitors*". *Biochem.* **32**, 12074 - 12084.

Radic Z., Kirchhoff P.D., Quinn D.M., McCammon J.A., Taylor P. (1997) "*Electrostatic influence on the kinetics of ligand binding to acetylcholinesterase-Distinctions between active center ligands and fasciculin*". *J. Biol. Chem.* **272**, 23265 - 23277.

Richardson R.J. (1992) "*Interaction of organophosphorus compounds with neurotoxic esterase*". En: *Organophosphates: chemistry, Fate and Effects*. Ed. J.Chambers and P. Levi. Cap 16, pp 299 – 323. Academic Press.

Rider J.A., Ellinwood L.E., Coon J.M. (1952) "*Production of tolerance in the rat to the octamethyl pirophosphoramide*". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **181**, 455 - 459.

Ritter L., (1997) "*Report of a panel on the relationship between public exposure to pesticides and cancer*". *Cancer* **80**, 10, 2019 - 2033. ...

Rovedatti G., Gauna L., Loewy M., Venturino A., Pechen de D'Angelo A.M. (1998) "*Distribución y acumulación de 14C-paratión en un sistema acuático multiespecífico nativo*". X Congreso Latinoamericano de Toxicología. La Habana, Cuba. Libro Resumen, pp 223.

Rosenbaum E.A., Caballero de Castro A.C., Gauna L., Pechen de D'Angelo A.M. (1988) "*Early biochemical changes produced by malatión in toad embryos*". *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* **17**, 831 – 835.

Rosenberry T.L. (1975) "*Acetylcholinesterase*". Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. **43**, 103 - 218.

Rosenberry T.L. (1979) "*Quantitative simulation of endplate current at neuromuscular junctions based on the reaction of acetylcholine with acetylcholine receptor and acetylcholinesterase*". Biophys. J. **26**, 263 - 289.

Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A. (1970) "*Two dimensional thin-layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots*". Lipids **5**, 494 - 496.

Salih E., Howard S., Chishit S.B., Cohen S.G., Liu W.S., Cohen J.B. (1993) "*Labelling of cysteine 231 in acetylcholinesterase from *Torpedo nobiliana* by the active-site directed reagent, 1-bromo-2 [<sup>14</sup>C] pinacolone*". J. Biol. Chem. **268**, 245 - 251.

Salvaterra P.M., Foders R.M. (1979) "*[<sup>125</sup>I]  $\alpha$  bungarotoxin and [<sup>3</sup>H]quinuclidilbencilate binding in central nervous system of different species*". J. Neurochem. **32**, 1509 - 1517.

Schiller G.D. (1979) "*Reduced Binding of (<sup>3</sup>H)-Quinuclidinyl Benzilate associated with chronically low acetylcholinesterase activity*". Life Sci. **24**, 1159 - 1164.

Schuytema G.S., Nebeker A.V., Griffitt W.L. (1994) "*Toxicity of guthion and guthion-2S to *Xenopus laevis* embryos*". Arch. Environm Contam. Toxicol. **27**, 250 - 255.

Segel I.H. (1975) En: Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. J. Wiley and Sons, New York.

Sivam S.P., Naveshima T., Lim D.K., Hoskin B., Ho I.K. (1983a) "*Diisopropyl fluorophosphate and GABA synaptic function: Effect on levels, enzymes, release and uptake. The rat striatum*". Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. **42**, 51 – 60.

Sivam S.P., Norris J.C., Lim D.K., Hoskin B., Ho I.K. (1983b) "*Effect of acute and chronic cholinesterase inhibitors with DFP on muscarinic, dopamine and GABA receptors of the rat stratum*". J. Neurochem. **40**, 1414 – 1422.

Smit M.F., Ehler F.J., Yamamura S., Roeske W.R., Yamamura I.H. (1980) "*Differential regulation of muscarinic agonist binding sites following chronic cholinesterase inhibition*". Eur. J. Pharmacol. **66**, 379 – 380.

Snawder J.E., Chamber J.E. (1989) "*Toxic and developmental effects of organophosphorus insecticides in the South African clawed frog*". J. Environm. Sci. Health, **B24**, 205 – 218.

Sparring D.W., Feellers, G.M., McConnell (2001) "*Pesticides and amphibian population declines in California, USA*". Environem. Toxicol. Chem. **20**, 7, 1591 – 1595.

Spliid N.H., Kooppen B. (1998) "*Ocurrance of pesticides in Danish shallow groud water*". Chempsphere **37**, 1307 – 1316.

Wlodek S.T., McCammon J.A. (2002) "*Reaction Gorge Fluctuation in AchE*".

[http://chemcca10.ucsd.edu/java\\_movie2/GeorgeF.html](http://chemcca10.ucsd.edu/java_movie2/GeorgeF.html)

Sussman J.L., Harel M., F. Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman Y. (1991) "*Atomic structure of acetylcholinesterase from **Torpedo californica**: a prototypic acetylcholine-binding protein*". *Science* **253**, 872 - 879.

Tabor C.W., Tabor H. (1984) "*Polyamines*". *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 747 – 790.

Taylor P., Radic Z. (1994) "*The cholinesterases: from genes to proteins*". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 281 - 320.

Taylor P., Brown J.H. (1999) "*Acetylcholine*". En: *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. Cap. 11, pp 213 – 242. Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K., Uhler M.D. Eds. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA.

Thomson C.M. (1992) "*Preparation, Analysis and Toxicity of Phosphorothiolates*". En: *Organophosphates: chemistry, Fate and Effects*. Ed. J.Chambers and P. Levi. Cap 2, pp 19 – 46. Academic Press.

Thomson J.F., Reid S.J., Kantor E.J. (1977) *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* En: "*Manual of Analytical Methods for Analysis of pesticides in Human and Environmental Samples*"

Vellom D.C., Radic Z., Li Y., Pickering N.A., Camp S., Taylor P. (1993) "*Amino acid residues controlling acetilcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity*". *Biochemistry* **32**, 12 – 17.

Venturino A., Rivera E.S., Bergoc R.M., Caro R.A. (1990) "*A simplified competition data analysis for radioligand specific activity determination*". *Nucl. Med. Biol. Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B* **2**, 233 - 237.

Venturino A., Gauna L., Bergoc R.M., Pechen de D'Angelo A.M.. (1992) "*Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad **Bufo arenarum** Hensel*". Arch. Environm. Contam. Toxicol. **22**, 135 – 139.

Venturino A. (1994) "*Interacción de Plaguicidas organofosforados y poliaminas sobre el desarrollo embrionario*" Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires.

Venturino A., Bergoc R.M., Pechen de D'Angelo A.M. (1998) "*Kinetic mpdes of lipophilic compound uptake and bioelimination in amphibians during the aquatic stages*". J. Biological Systems **6**, 1 85 – 94.

Venturino A., Anguiano O.L., Gauna L., Cocca C., Bergoc R.M., Pechen de D'Angelo A.M. (2001a) "*Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad **Bufo arenarum** Hensel*". Comp. Biochem. Physiol. **130**, 191 – 198.

Venturino A., Gauna L., Bergoc R.M., Pechen de D'Angelo A.M. (2001b) "*Toxicokinetics of malati6n in larval stages of the toad **Bufo arenarum** (Hensel). Effect of exogenous spermidine*". Pest. Biochem. Phisiol. **70**, 142 – 150.

Venturino A., Rovedatti M.G. Gauna L., Pechen de D'Angelo A.M. (2001c) "*Model study of factors influencing steady state clearance for lipophilic toxicants in aquatic microcosms*". J. Biol. Sys. **9**, 2, 123 – 143.

Vilanova, E.; Barril, J.; Carrera, V.; Pellin, M.C. (1990) "*Soluble and particulate forms of the organophosphorus neuropathy target esterase in hen sciatic nerve*". J Neurochem. **55**, 1258-1265.

Volpe L.S., Biagione T.M., Marquis J.K. (1985) "*In vitro modulation of bovine caudate muscarinic receptor number by organophosphorates and carbamates*". Tox. Appl. Pharmacol. **78**, 266 – 234.

Wake D.B. (1991) "*Declining amphibian populations*". Science **253**, 860.

Walker C.H., Thompson H.M. (1991) "*Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases*". En: Cholinesterase inhibiting insecticides their impact on wildlife and the environmental. Ed. P. Mineau. Elsevier Sci. Pub.

Wallace K.B. Herzberg U. (1988) "*Reactivation and aging of phosphorylated cholinesterase – brain acetylcholinesterase from fish and rodents*". Toxicol. Appl. Pharmacol. **92**, 307 – 314.

Wang C., Murphy S.D. (1982a) "*The role of noncritical binding proteins in the sensitivity of acetylcholinesterase from different species to DFP in vitro*". Life Sci. **31**, 139 - 149.

Wang C., Murphy S.D. (1982b) "*Kinetic analysis of species difference in acetylcholinesterase sensivity to organophosphate insecticides*". Toxicology and Applied Pharm. **66**, 409 - 419.

Wenger B.S. (1974) "*Protease inhibition as a teratogenic mechanism*". Am. Tool. **14**, 1305.

Westhead D.R., Hatton D.C., Thornton J.M. (1998) "*An atlas of protein topology cartoons available on the World-Wide Web*". Trends Biochem. Sci. **23**, 1, 35 – 36.

Wilson I.B., Cabib E. (1956) "*Acetylcholinesterase: enthalpies and entropies of activation*". J. Am. Chem. Soc. **78**, 202 - 207.

Wilson I.B., Alexander (1982) "*Acetylcholinesterase: Reversible inhibitors, substrate inhibition*". J. Biol. Chem. **237**, 4, 1323 - 1326.

Wilson W.W., Hooper M.J., Hansen M.E., Nieber P.S. (1992) En: Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects. Ed. J.Chambers and P. Levi. Cap 5, pp 107 – 137. Academic Press.

Wolthius O.L., Kepner I.A., (1978) "*Successful oxime therapy one hour after soman intoxication in the rat*". Eur. J. Pharmacol. **49**, 415 – 425.

Yamamura H.I., Snyder S.H. (1974) "*Muscarinic Acetylcholin Receptor binding in the long muscle of guinea pig ileum with [<sup>3</sup>H] Quinuclidyl Benzilate*". Molec. Pharmacol. **10**, 861 - 867.

Yang Z.P., Dettbarn W.D. (1998) "*Prevention of tolerance to the organophosphorus anticholinesterase paraoxon with carboxylesterase inhibitors*". Biochem. Pharmacol. **55**, 9, 1419 – 1426.

## Publicaciones derivadas de este trabajo experimental

Rosenbaum E.A., Caballero de Castro A.C., Gauna L., Pechen de D'Angelo A.M. (1988) "*Early biochemical changes produced by malati3n in toad embryos*". Arch. Environm. Contam. Toxicol. **17**, 831 – 835.

Caballero de Castro A.C., Rosenbaum E., Pechen de D'Angelo A.M. (1991) "*Effect of malati3n on Bufo arenarum Hensel development. I Esterase inhibition and recovery*." Biochem. Pharmacol. **41**, 491 – 495.

Anguiano O.L., Caballero de Castro A.C., Rosenbaum E.A., Venturino A., Pechen de D'Angelo A.M. (1998) "*¿Afectan los plaguicidas la supervivencia de las poblaciones de anfibios?*". En: Serie de Publicaciones del Museo Bernardino Rivadavia e Instituto Nacional de Investigaci3n de las Ciencias Naturales. La Plata. **149**, 1-10.

Rosenbaum E.A., D'Angelo A.M., Bergoc R.M., Venturino A. (1999) "*Modelling acetylcholinesterase kinetics: the identifiability problem in parameter estimation*". J. Biol. Sys. **7**, 95 - 111.

Venturino A., Bergoc R.M., Pechen de D'Angelo A.M., Rosenbaum E.A. (2002) "*Kinetic models on acetylcholinesterase modulation by self-substrate and polyamines. Estimation of interaction parameters and rate constants for free and acetylated states of the enzyme*". J. Biol. Sys. **10**, 127-147.

Venturino A., Rosenbaum E.A., Caballero de Castro A., Anguiano O.L., Gauna L., Fonovich de Schroeder T., Pechen de D'Angelo A.M. (2003) "*Biomarkers of effect in toads and frogs. Review*". Biomarkers. **8**, 167 - 186.

## Congresos Nacionales

*"Alteraciones en el desarrollo embrionario provocado por malatión".*

Rosenbaum E.A., Caballero de Castro A.C., Pechen de D'Angelo A.M.

1<sup>eras</sup> Jornadas de Investigación de la U. N. del Comahue. (1988).

*"Efecto de malatión en el contenido de receptor muscarínico de acetilcolina en larvas de **Bufo arenarum**, Hensel".*

Rosenbaum E.A., De Los Santos B., Barrantes F., Pechen de D'Angelo A.M.

XXV reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (1989).

*"Respuesta de un sistema embrionario simple a la intoxicación con organofosforados. Adaptación por medio de cambios en el contenido de AChRm".*

Caballero de Castro A.C., Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M.

XXV reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (1989).

*"Unión Reversible de di-isopropilfluorofosfato a acetilcolinesterasa".*

Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M.

XXV reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (1989).

*"Modulación por poliaminas de la actividad **in vitro** de acetilcolinesterasa de anguila. Aplicación de modelos cinéticos sobre el mecanismo de acción".*

Venturino A, Rosenbaum E, Bergoc R.M., Pechen de D'Angelo A.M.

XXVII Reunión Anual de la SAIB. Huerta Grande, Córdoba, 21 al 24 de Octubre de 1991.

*"Efectos del malatión sobre el desarrollo embrionario: Bases bioquímicas de los cambios de susceptibilidad en diferentes estadios".*

Caballero de Castro A.C., Rosenbaum E.A., Carbajal G., Loewy M., Anguiano L.,  
Pechen de D'Angelo A. M..

XXVII Reunión Anual de la SAIB. Huerta Grande, Córdoba, 21 al 24 de Octubre de  
1991.

*"Toxicocinética del malatión en el desarrollo embrionario de anfibios, estudios comparativos en distintos estadios".*

Caballero de Castro A.C., Rosenbaum E.A., Carbajal G., Loewy M., Anguiano L.,  
Pechen de D'Angelo A.M..

Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Toxicología. 1992.

*"Toxicidad del malatión en embriones de **Bufo arenarum**, Hensel. Activación, detoxificación y tolerancia".*

Caballero de Castro A.C., Anguiano O.L., Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M.

XXIX Reunión Anual de la SAIB. Villa Carlos Paz, 17 al 20 de Noviembre de 1993.

*"Modelos teóricos de interacción de sustrato y poliaminas con acetilcolinesterasa".*

Venturino A., Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M., Bergoc R.M.

XXIX Reunión Anual de la SAIB. Villa Carlos Paz, 17 al 20 de Noviembre de 1993.

*"Marcación de proteínas de embriones de **Bufo arenarum**, Hensel por exposición a malatión [<sup>14</sup>C]. Recambio de acetilcolinesterasa".*

Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M.

XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (1994).

*"Modelo de interacción entre acetilcolinesterasa y su sustrato".*

Venturino A., Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M., Bergoc R.

XXXI Reunión Anual de la SAIB. Villa Giardino, 15 al 18 de Noviembre de 1995.

*"Acetilcolinesterasa: desde un modelo general a modelos particulares como método de estimación de constantes cinéticas y de interacción del sustrato".*

Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M., Bergoc R.M., Venturino A.

XXXIII Reunión Anual de la SAIB. Villa Giardino, 12 al 15 de Noviembre de 1997.

*"Interacción de poliaminas y acetilcolinesterasa. Diferencias entre la afinidad de la forma libre y acetilada de la enzima".*

Venturino A., Bergoc R.M., Pechen de D'Angelo A.M. y Rosenbaum E.A.

XXXIII Reunión Anual de la SAIB. Villa Giardino, 12 al 15 de Noviembre de 1997.

*"Plaguicidas: Toxicología ambiental".*

Rosenbaum E.A., Magnarelli G., Caballero A., Gauna L., Anguiano L., Loewy M., Carbajal G., Kirs V., Rovedatti G., Ferrari A., Alvarez R., Venturino A., Montagna M., Pechen de D'Angelo A.M

Jornadas de Divulgación Científica y Técnica de la Universidad Nacional del Comahue. Neuquén, 25 y 26 de abril de 2000.

## Congresos Internacionales

*"Diferente susceptibilidad de estadios embrionarios y larvas de sapo **Bufo arenarum**, Hensel a insecticidas".*

Pechen de D'Angelo A.M., Gauna L., Rosenbaum E.A..

III Congreso latino Americano de toxicología analítica y experimental, V congreso y VI jornadas argentinas interdisciplinarias de toxicología (1986).

*"The effect of agricultural pesticides on the toad embryonic development".*

Pechen de D'Angelo A.M., Rosenbaum E.A., Caballero de Castro A.C., Gauna L.

V reunión de la "Pan-American Association of Biological Societies" (1987).

*"Respuesta de un sistema embrionario simple a la intoxicación con organofosforados".*

Caballero de Castro A.C., Rosenbaum E.A., Pechen de D'Angelo A.M..

XXIV reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, y V reunión de la "Pan-American Association of Biological Societies cono sur" (1988).

*"Interacción de poliaminas con acetilcolinesterasa y su efecto sobre la actividad catalítica".*

Venturino A., Rosenbaum E.A., D'Angelo A.M., Bergoc R.M.

II Congreso Iberoamericano de Biofísica. Puebla, México, 3 al 7 de Octubre de 1993.

*"Polyamine modulation on acetylcholinesterase kinetics: Two-step catalysis model"*.

Rosenbaum E.A., D'Angelo A.M.P., Bergoc R.M., Venturino A.

III Iberoamerican Congress of Biophysics. Buenos Aires, Argentina, 20 al 23 de Septiembre de 1997

*"The effect of pesticides on amphibians"*.

Venturino A., de Schroeder T.M.F., Rosenbaum E.A., Caballero de Castro A.C., Anguiano O.L., Gauna L., Pechen de D'Angelo A.M.

VIII Congreso Internacional de Toxicología. París, Francia, 5 al 9 de Julio de 1998.

*"Comparative toxicity and metabolism of malathion in **Bufo arenarum** embryos"*.

Caballero de Castro A.C., Rosenbaum E.A., Anguiano O., Venturino A., Pechen de D'Angelo A.M.

218<sup>th</sup> American Chemical Society National Meeting. New Orleans, EEUU, 22 al 26 de Agosto de 1999.

*"Energética de la modulación de acetilcolinesterasa por sustrato y poliaminas"*.

Venturino A., Pechen de D'Angelo A.M., Rosenbaum E.A.

Reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular. Viña del Mar, Chile, 30 de octubre al 3 de noviembre de 2000.

*“Identification of biomarkers of pesticide effect in the toad “**Bufo arenarum**”, a bioindicator of environmental contamination”.*

Venturino A., Rosenbaum E.A., Caballero de Castro A.C., Anguiano O.L., Gauna L.,  
Fonovich de Schroeder T., Pechen de D’Angelo A.M.

Congress of Biomarkers of Environmental Contamination. Póvoa de Varzim, Portugal,  
24 al 26 de setiembre de 2001