



FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PAMPA

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA**

*“RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE NUEVAS SULFOXIMINAS
FOSFORILADAS”*

Paola Andrea Ortiz

SANTA ROSA

LA PAMPA

2008

Esta tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al Grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio dependiente del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, durante el período comprendido entre el 23 de noviembre de 2007 a la fecha, bajo la dirección de la Dra. Bellozas Reinhard Mónica y codirección del Dr. Mastrantonio Guido.

Agradezco:

A Mis Profesores: Dra. Bellozas M. y Dr. Mastrantonio G., quienes me brindaron su apoyo constante, por la intensa dedicación tanto experimental como de dirección de esta tesina.

A Mi Familia: en especial a mis padres, Seba y Lucas, quienes con su paciencia y aliento sustentaron todos estos años de estudio.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron en la realización de este trabajo.

A todos ellos mil gracias.

Resumen

Se ha tomado como modelo de estudio a una serie de compuestos organofosforados (OPs) derivados de sulfoximinas previamente sintetizados por nuestro grupo de trabajo. Aunque estas sustancias todavía no tienen aplicación tecnológica, resultan modelos muy interesantes para el abordaje de problemas más generales asociados a la interacción de los OPs con la acetilcolinesterasa (AChE), la enzima diana. Esto es porque la presencia de múltiples enlaces interatómicos insaturados en una pequeña región de estas estructuras ($X=P-N=S=O$), implica una estructura particular en las que las restricciones conformacionales son la regla.

En el presente trabajo se pretendió reconocer mecanismos particulares de comportamiento toxicológico de estas sustancias. Se trabajó con ensayos enzimáticos que permitieran, mediante el formalismo de Main, caracterizar las diferentes constantes cinéticas de inhibición (k_p , K_a y K_i).

Se realizó un análisis de correlación de estas constantes con descriptores hidrofóbicos y estéricos, observándose una correlación significativa de la actividad biológica ($R^2 > 0,99$), con el momento dipolar en particular.

Este resultado evidencia la importancia de ese factor en la afinidad de estas moléculas con el sitio de reacción. Es posible indicar que, en un entorno no polar como el sitio activo de la AChE, la magnitud del momento dipolar de la molécula entrante será determinante para definir la capacidad de una sulfoximina fosforilada de ser un buen o mal inhibidor.

Estos estudios aportan al conocimiento de los eventos moleculares que determinan la toxicidad de los compuestos OPs en general.

Abstract

A series of sulphoximines organophosphorus compounds (OPs) previously synthesized by our group, has been taken as a study model. Although these substances do not have technological application yet, they are interesting models for the OPs-acetylcholinesterase (AChE) interaction studies.

Multiple insaturated bonds in a small region of these molecules ($X=P-N=S=O$) imply a particular structure in which the conformational restrictions are the rule.

In the present work we tried to recognize intimate mechanisms of toxicological behavior of these substances. Enzymatic tests were performed to characterize the different inhibition kinetic constants (k_p , K_a and K_i), through the Main's formalism.

A correlation analysis between kinetic constants and hydrophobics and esteric descriptors was performed. A significant correlation of biological activity whit the dipole moment is observed.

These results show the importance of this descriptor in the affinity of these molecules whit the reaction site. It is possible to indicate that, in a non-polar environment like the active site of the AChE, the magnitude of the dipole moment of the incoming molecule will be a determining factor to define the capacity of a sulphoximin OPs to be a good or a bad inhibitor.

These studies contribute to the knowledge of the molecular events that determine the toxicity of the OPs.

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. Insecticidas fosforados y colinesterasa	1
1.1. Historia	1
1.2. Colinesterasa, nomenclatura y propiedades	3
1.3. Organofosforados	5
2. Inhibición de colinesterasas por OPs	6
3. Fosforoamidatos	8
4. Sulfoximinas, propiedades y aplicaciones	8
4.1. Síntesis	10
4.2. Síntesis de sulfoximinas N-fosforilada	11
5. Síntesis de compuestos organofosforados	11
6. Relación estructura-actividad de insecticida	12
6.1. Estructura conformacional de las sulfoximinas fosforiladas	12
7. Toxicología de los compuestos organofosforados	13
7.1. Mecanismos de acción tóxica	13
8. Acetilcolinesterasa: caracterización del sitio activo	15
8.1. Dinámica del sitio activo de la AChE	16
8.2. Estructura del sitio activo de la AChE	18
9. Acetilcolinesterasa: Cinética de la inhibición	19
9.1. Formalismo cinético	22
10. Objetivos	27

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Productos químicos utilizados	28
1.1. Determinaciones de cinéticas de inhibición enzimáticas. Método de Ellman	28
1.2. Equipo	29
2. Metodología de trabajo	29
2.1. Consideraciones generales del método utilizado para las mediciones	29
2.2. Curva de tiempo	30

2.3. Curva de inhibición	30
2.4. Correlación estructura química-actividad biológica	31
2.5. Procesamiento de los datos	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. Actividad anticolinesterásica	33
2. Correlación estructura-actividad con enzima de cerebro bovino	33
3. Discusión	37
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39

INTRODUCCIÓN

1. Insecticidas fosforados y colinesterasa

1.1. Historia

Los compuestos organofosforados (OPs) fueron descubiertos por Lassaigne a principios del S XIX, cuando éste verifica la reacción de distintos alcoholes con ácido fosfórico. A mediados de ese siglo, Moschin y De Clermont presentan la primera descripción detallada de la síntesis de ésteres orgánicos del ácido fosfórico. A fines del mismo siglo, Michaelis desarrolla extensivamente la química de estos compuestos, principalmente los que contienen enlaces P-N. Arbuzov A. E, en Rusia, estudiaba la química de los compuestos de fósforo trivalente, incluyendo la reacción Michaelis-Arbuzov para uniones P-C (1).

Por su parte, Gerhardt Srchader de Bayer, en Alemania, continúa trabajando y desarrolla el paratión (1946) encontrando un interés biológico a los OPs al demostrar sus propiedades insecticidas.

A partir de ese momento comienzan los estudios y evaluaciones de miles de compuestos OPs en la búsqueda de sus propiedades insecticidas. El número de compuestos tóxicos es aparentemente ilimitado y su utilidad como insecticida queda definida por sus propiedades químicas de estabilidad, presión de vapor y solubilidad relativa hacia insectos y mamíferos que indica con que margen de seguridad puede ser empleado (2).

Estos compuestos OPs recibieron la denominación de “anticolinesterásicos” teniendo en cuenta su modo de acción.

La existencia de las colinesterasas fue predicha por Dale en 1914, a partir del hecho que, él y Dudley demostraron que la acetilcolina (ACh) era un constituyente natural de los tejidos animales. Tiempo después Stedman y Stedman prepararon el primer extracto crudo de colinesterasa a partir de suero de caballo. Tres años más tarde, encontraron colinesterasa en el cerebro de gato y reportaron que la concentración en el ganglio basal era dos veces la de la corteza cerebral.

Durante el mismo período los fisiólogos, principalmente Dale y sus colegas, trataron de establecer si la ACh actuaba como un neurotransmisor. En 1937 Marnay y Nachmanshon trabajando en músculo de rana demostraron que casi toda la colinesterasa presente en esos tejidos estaba localizada en las terminales nerviosas.

Un año después publicaron evidencia sobre la adecuada concentración de enzima para hidrolizar la ACh con la rapidez demandada por la teoría.

Durante la Segunda Guerra Mundial, las colinesterasas adquirieron una consideración especial en el contexto de la guerra química. Muchos de los agentes desarrollados como potenciales gases de guerra eran poderosos inhibidores de estas enzimas.

Desde entonces los insecticidas OPs se ubicaron entre las armas más poderosas que posee el hombre para controlar las especies de insectos perjudiciales (3).

La actividad inhibitoria de los OPs sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE) fue encontrada por Adrian y colaboradores en 1941; Balls en 1949, encontró que esta inhibición era atribuida a la fosforilación del sitio activo. La introducción de los compuestos organofosforados anticolinesterásicos (COFA) y otros insecticidas resultaron beneficiosos para la agricultura y la economía en general. Paralelamente surgieron serios y profundos problemas tanto inmediatos como a largo plazo, como la contaminación ambiental por productos estables, la aparición de resistencia en los insectos y el hecho que los seres humanos están permanentemente ingiriendo pequeños residuos con los alimentos. Más allá de las armas bioquímicas, los anticolinesterásicos son también utilizados en anestesia o en el tratamiento de *miastenia gravis*, glaucoma y enfermedad de Alzheimer.

En cuanto a los aspectos relacionados al estudio conformacional de los OPs, se han hallado interesantes correlaciones entre las propiedades conformacionales de estos compuestos y sus mecanismos de acción tóxica. En estudios preliminares acerca de la interacción de OPs con la AChE, estos adoptan conformaciones que no son las preferenciales respecto a las medidas en solución (4). Dichos resultados se basan en el modelado del sitio activo de la AChE previamente resuelta por difracción de RX (5).

Se han encontrado relaciones fundamentales entre las diferencias de libertad conformacional y los mecanismos de acción tóxica asociados a OPs pequeños, de manera que el comportamiento conformacional puede ser suficiente para explicar ciertos aspectos de la interacción de estos OPs con los sitios de reactividad biológica (6). Previamente los mecanismos de toxicidad de estos compuestos se asociaron exclusivamente a factores electrónicos, hidrofóbicos o estéricos. Estos resultados se han obtenido aplicando metodologías QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) y el desarrollo de distintos Descriptores Conformacionales. Las metodologías QSAR permiten un acercamiento racional y sistemático a las problemáticas asociadas a los mecanismos de interacción de los analitos con las dianas moleculares. De esta manera se ha aportado en la reinterpretación de los mecanismos de interacción de los compuestos OPs y su diana de acción tóxica (7).

Estudios de este tipo abren un nuevo e interesante ámbito de estudio para moléculas que, además, presentan vastas aplicaciones directas en los campos de la tecnología y la toxicología de diversas sustancias de importancia económica. Cabe agregar que la mayoría de los aspectos de las problemáticas planteadas tienen una mayor o menor consecuencia inmediata con el medio social y productivo, dado el interés tecnológico vigente de los compuestos OPs.

1.2. Colinesterasa, nomenclatura y propiedades

Las enzimas colinesterasas son hidrolasas que, bajo ciertas condiciones, catalizan la hidrólisis de ésteres de colina y son inhibidas por bajas concentraciones (10^{-5} M o menos) de eserina y de compuestos OPs.

Las colinesterasas no son idénticas en todas las especies. Constituyen una familia de enzimas que pueden clasificarse en dos grupos: aquellas que hidrolizan preferentemente acetil-ésteres como la acetilcolinesterasa (AChE) (**Fig. 1.2.1**), también llamada *Colinesterasa de glóbulo rojo (CGR)*, *colinesterasa eritrocítica*, o *acetilcolina acetilhidrolasa*, y se encuentra principalmente en sangre y sinapsis nerviosas y aquellas que prefieren otro tipo de ésteres como la pseudocolinesterasa, también conocida como *colinesterasa sérica*, *butirilcolinesterasa (BuChE)*, o *acilcolina acilhidrolasa*, que se encuentra principalmente en el hígado. Pero esta división no es absoluta y es más adaptable a los mamíferos que a otras especies.

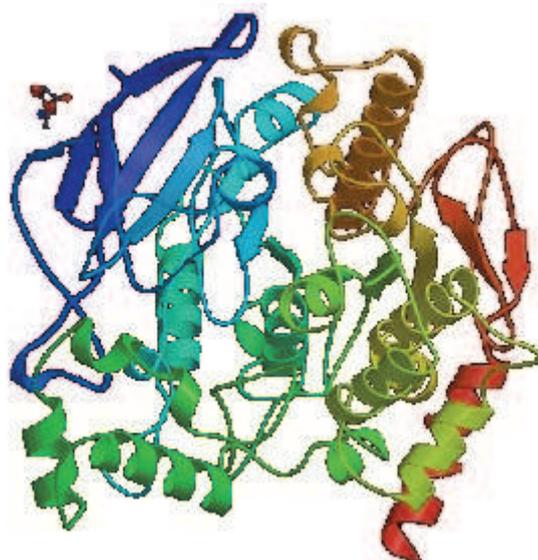


Fig. 1.2.1 Acetilcolinesterasa (8)

Ambos compuestos catalizan la hidrólisis del neurotransmisor ACh sobrante en el espacio sináptico en colina y ácido acético, reacción necesaria para permitir que la neurona colinérgica retorne a su estado de reposo luego de la activación, evitando así una transmisión excesiva de ACh, que produciría una sobreestimulación del músculo y, como consecuencia, debilidad y cansancio. La acumulación de ACh en el espacio intersináptico provoca la aparición de manifestaciones tóxicas que conducen a la incoordinación muscular y a la muerte. (Fig. 1.2.2)

La AChE es susceptible a la inhibición cuando el sustrato está presente en exceso, esto la diferencia de BuChE. La temperatura óptima para la AChE de tejido mamífero es entre 37° y 40°C. La actividad de la enzima en tejidos de mamíferos comienza a decrecer a los 56°C y a los 70°C se inactiva.

La liofilización no reduce la actividad enzimática, lo que resulta muy útil en las prácticas. El pH óptimo varía con la fuente de enzima, pero para la mayoría de los preparados con ACh como sustrato, está en un rango de 8,0-8,5.

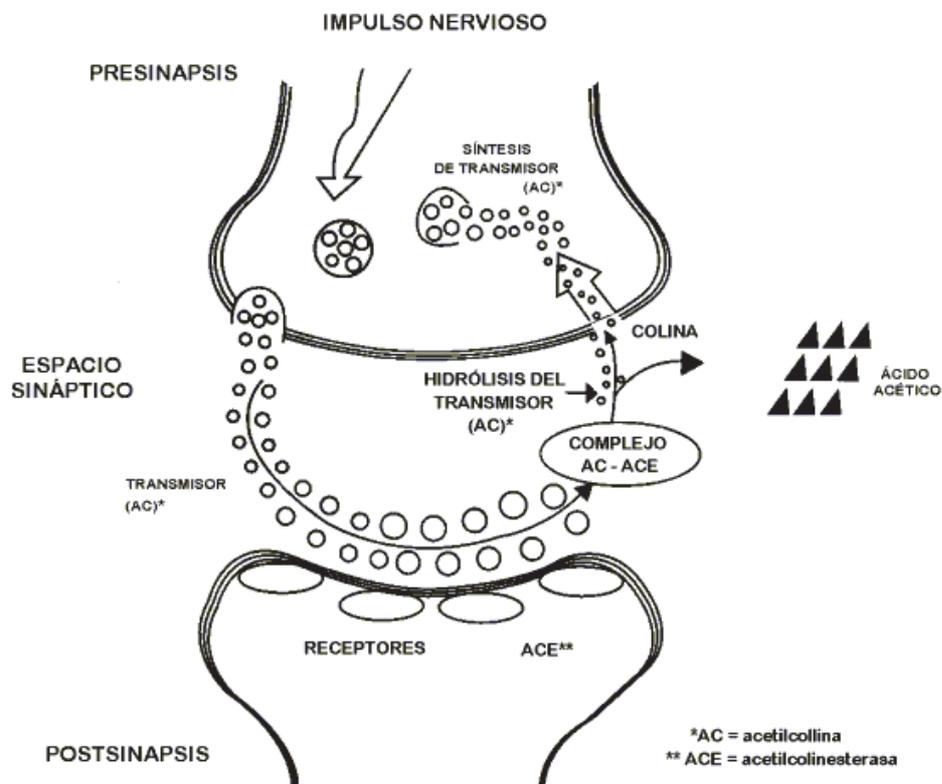


Fig. 1.2.2 Proceso de transmisión del impulso nervioso (9)

1.3. Organofosforados

Con pocas excepciones, los insecticidas fosforados son ésteres neutros o amidas derivadas del ácido fosfórico, su anhídrido o su análogo azufrado. La sustitución de los grupos –OH por –OR (R: metilo, etilo, isopropilo, arilo o amido) origina los fosfatos y sus derivados.

Los compuestos OPs son nombrados como derivados del ácido fosfórico.

Estos insecticidas se pueden clasificar de acuerdo con el grupo funcional que poseen: fosfatos (I), fosforotionatos (II) fosforotiolatos (III), fosforoditioatos (IV), fosfonatos (V), fluorofosfatos (VI), fosforoamidatos (VII); pero puede ocurrir que simultáneamente tengan lugar varias sustituciones del tipo de las indicadas, en cuyo caso la nomenclatura de los compuestos se obtiene por combinación de la correspondiente a cada sustitución.

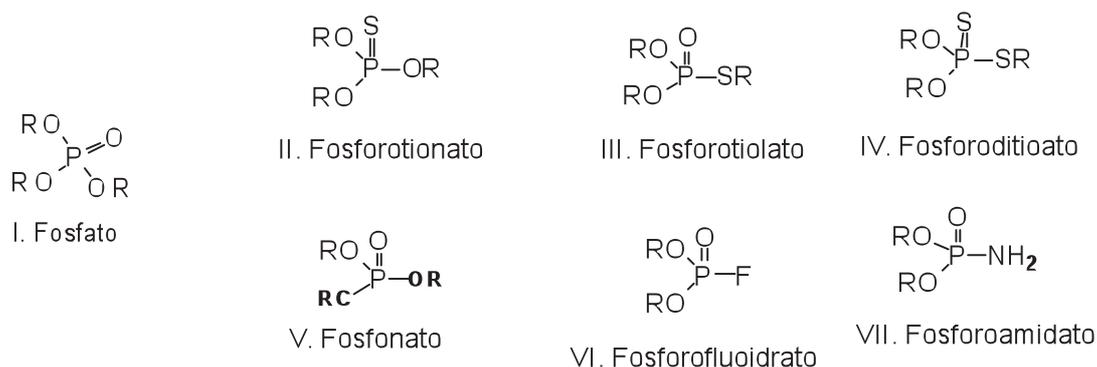


Fig. 1.3.1 Grupos funcionales de los insecticidas fosforados

La presencia de un átomo de oxígeno ó de azufre sobre el fósforo hace que esta unión fosforilo o tiofosforilo esté polarizado creándose una densidad de carga positiva sobre el átomo de fósforo, por lo que éste resulta electrofílico y reactivo frente a nucleófilos. El resto de los sustituyentes presentes modifican, aumentando o disminuyendo, dicha polaridad. La constante de disociación de los compuestos está afectada por los sustituyentes sobre el átomo de fósforo, dependiendo de su efecto inductivo. El grupo más ácido es el más susceptible a la ruptura por reacción nucleofílica y es comúnmente denominado “leaving group” o grupo saliente **(10)**.

La toxicidad de los compuestos que presentan unión P=S (tiono), es menor a la de los que presentan unión P=O (oxo), debido a la menor facilidad de reacción en el sitio activo de la enzima. Esto puede explicarse por el hecho que en un oxofosfato, la mayor

electronegatividad del oxígeno determina una carga positiva neta mayor en el fósforo, respecto de un tiono fosfato. Esto lo dispone de mejor manera, para el ataque nucleofílico durante el evento de inhibición. Este es el llamado “efecto tiono”.

Los fosforotionatos (P-O), se hidrolizan más lentamente que los fosforotiolatos (P-S). Esto puede traducirse en que los derivados fosforotiolatos son más rápidos para actuar sobre la AChE que los oxofosfatos. Sin embargo, por la misma razón son menos persistentes en el medio ambiente. Este es el llamado “efecto tiolo”.

2. Inhibición de colinesterasas por OPs

La inhibición de AChE y BuChE por OPs puede examinarse como una reacción análoga a la hidrólisis de ACh por esta misma enzima (**Fig. 2.1**)

La interacción molecular entre ciertos OPs y AChE se ha investigado utilizando una gran variedad de técnicas, y mucho se sabe con respecto a como los OPs se unen y fosforilan a AChE. Se ha reportado que el grupo acil abierto en el sitio activo de AChE (Phe 295 y Phe 297) (los números se refieren a la posición del aminoácido en AChE y BuChE de humanos) participan en la ubicación de una molécula de OP durante la línea de ataque por la serina catalítica (Ser 203), con Phe 297 más importante para sustitución alcohoxi ramificada, de gran volumen (**Fig. 2.2**). Esta ubicación puede ser interpretada como análoga a la formación del complejo de Michaelis. Se concluyó, de este modo, que la habilidad para la formación de estos complejos de Michaelis es extremadamente importante en determinaciones de reactividad de OP con respecto a AChE.

En el dibujo esquemático del sitio activo de la AChE se puede observar la triada catalítica, que consiste en Ser 203, His 447 y Glu 334. El sitio acil comprometido es probablemente importante en la posición del inhibidor por el ataque nucleofílico de Ser 203 mientras que el hueco del oxianión puede polarizar el enlace P=O, facilitando por medio de esto, el ataque nucleofílico. El ligando comprometido al sitio aniónico periférico puede conducir a la inhibición o a la activación. Adicionalmente, el sitio aniónico periférico juega un papel importante en la estereoselectividad de AChE para con metilfosfonatos (**11**).

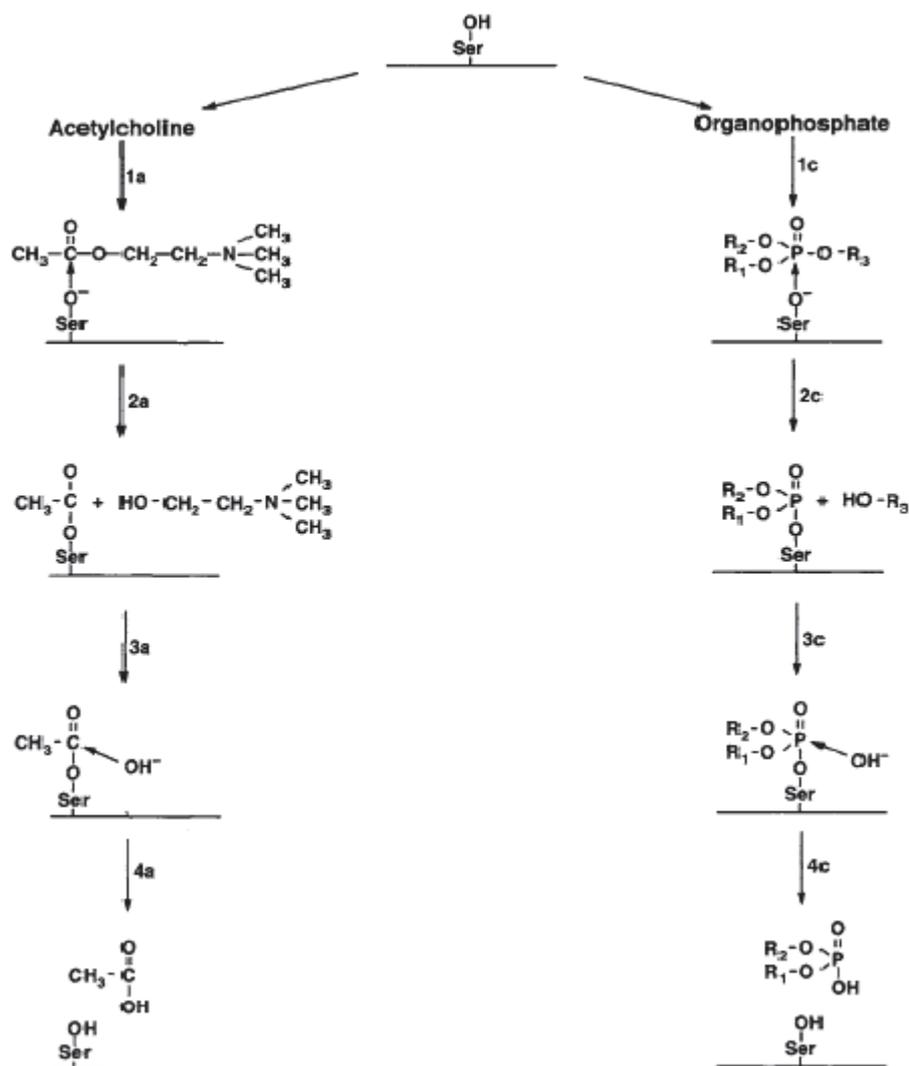


Fig. 2.1 La interacción de ACh y un OP con el sitio activo de serina de AChE y BuChE. La reacción 1 representa la formación de un complejo de Michaelis estable y el comienzo del ataque nucleofílico de la serina. La reacción 2 representa la acilación del sitio activo de serina, seguido de la liberación del primer producto de la reacción o leaving group. La reacción 3 indica el comienzo del ataque nucleofílico de un ion hidroxilo, el cual conduce a la regeneración de la enzima activa (11).

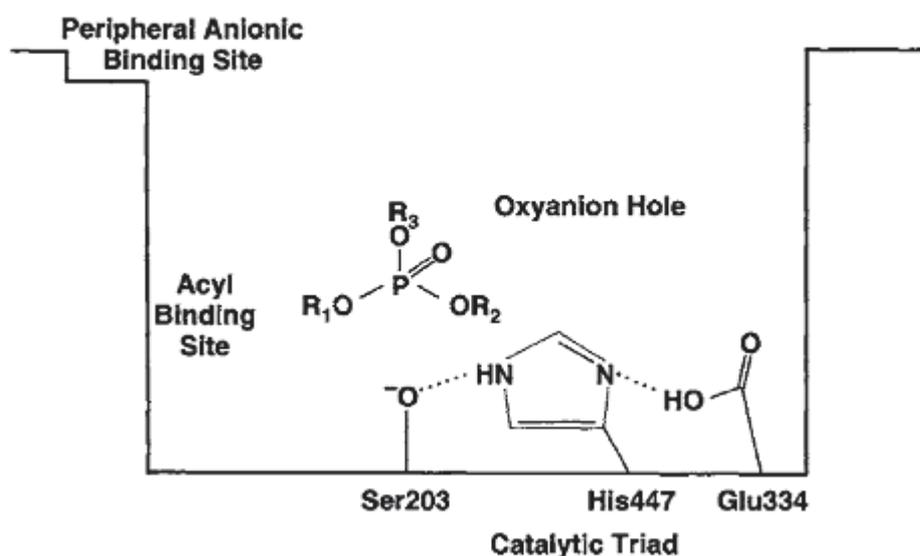


Fig. 2.2 Dibujo esquemático del sitio activo de AChE, con el ingreso de una molécula de un OP. R_1 y R_2 en el OP son usualmente cadenas alquílicas idénticas, mientras que R_3 es un leaving group (grupo saliente) (11).

3. Fosforoamidatos

Son compuestos derivados de ácido fosfórico los cuales tienen uno o más uniones P-N.

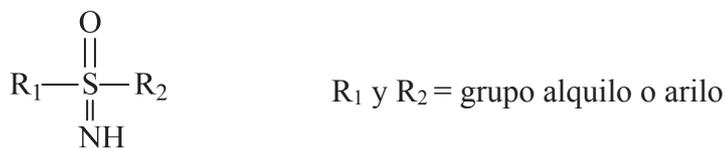
Estos compuestos que poseen un N-amido tienen alta capacidad de donar electrones, por lo que los fosforamidatos en general son menos activos como anticolinesterásicos que los fosfatos. Sin embargo, se ha encontrado que presentan fuerte actividad frente a una gran variedad de plagas, tales como: insectos, ácaros, malezas, nematodos, roedores y microorganismos.

Se han destacado con una actividad prominente como insecticidas (1) pues *in vivo* su potencia inhibitoria se puede intensificar con la presencia de grupos adyacentes de alta polarizabilidad, como el S=O de la sulfoximina, o mediante alguna activación *in vivo*.

4. Sulfoximinas, propiedades y aplicaciones

También conocidas como sulfoximidias; el primer descubrimiento lo realizó Whithead y Benthey en 1950 (12). Desde entonces se conocen como compuestos de gran versatilidad (13).

En varios trabajos aparecen estas sustancias como análogos de las sulfonas, considerándolas como ácidos α -hidrogenados, sin embargo el nitrógeno suministra un sitio adicional para la manipulación de la estructura generando así un centro de basicidad y nucleofilicidad de la misma (14).



SULFOXIMINA

Fig 4.1. Estructura general de la sulfoximina

Las sulfoximinas son solubles en solventes próticos como el agua y el alcohol etílico; comparando con el de las correspondientes sulfonas se ven valores de pK_a grande para las sulfoximinas (1,5 – 2,9) (13).

Los grupos sulfoximina son extremadamente versátiles en síntesis orgánica debido a la existencia del nitrógeno anfotérico, los ácidos α -metilénprotónico y el átomo de azufre quiral. Esto permite dos aplicaciones principales en inducción asimétrica, particularmente durante la transferencia de reacción de alquilideno y en la investigación de la estereoquímica de reacciones en el átomo de azufre.

Bentley y su grupo en su publicación sugirieron que por analogía con sulfonas, el comportamiento del átomo de azufre en una sulfoximina sea tetraédrico y que cuando grupos distintos se unen al azufre, las moléculas sean quirales. La orientación tetraédrica de los átomos alrededor del átomo de azufre se verificó por rayos X, cristalografía y estudios de difracción electrónica (13).

Las sulfoximinas son compuestos bastante estables, resisten a hidrólisis, termólisis, oxidación y reducción. La mayoría de las reacciones de sulfoximinas se atribuyen a la disponibilidad de un solo par de electrones sobre el nitrógeno o a la acidez del α -hidrógeno.

White J. D. y Kim M. en 1977 encontraron que preparados derivados de sulfoximinas de color blanco eran especialmente lábiles al calor.

Las patentes tienden a mostrar una amplia variedad de usos para las sulfoximinas. Ejemplo de ello es metionina sulfoximina y sus sales descubriéndosele el uso como herbicida desfoliante en algodón; algunas alquilsulfoximina (a) de cadenas largas fueron patentadas como detergentes, aditivos para aceites lubricantes, inhibidores de la corrosión para metales

ferrosos en contacto con ácidos, etc. Las sulfoximinas N-alquil sustituidas que se patentaron fueron para usos como antibacteriano y antifúngico derivados del compuesto S-metil-S-decil-N-clorosulfoximina, y sulfoximinas fosforosustituida (b y c) utilizadas como fungicidas.

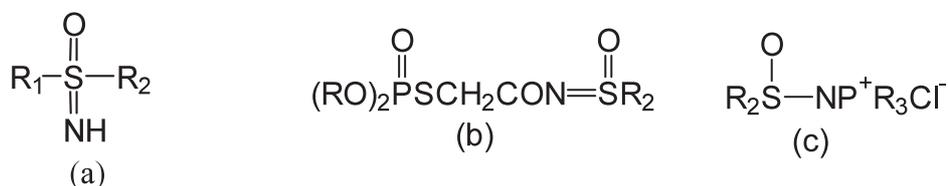


Fig 4.2 Sulfoximinas N-alquil sustituidas

4.1. Síntesis

El Método original fue realizado por Whithead y Benthey y es el más usado para la síntesis de sulfoximina. Se parte del precursor (sulfóxido), H_2SO_4 , azida sódica y cloroformo.

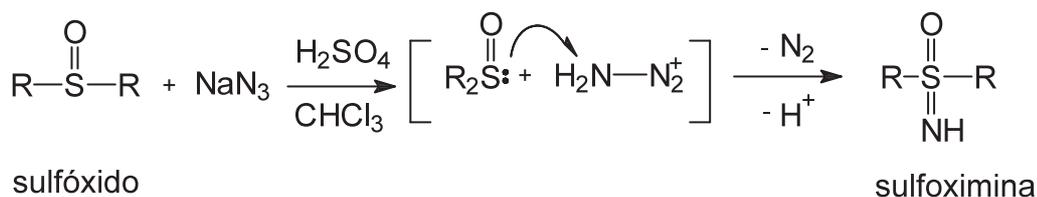


Fig 4.1.1 Reacción de síntesis de la sulfoximina

La reacción fue sugerida como un ataque nucleofílico al sulfóxido por parte de la azida protonándolo, dando ácido hidrazoico intermedio y por último la sulfoximina.

Srass y Satzinger recomendaron modificaciones al método anterior, proponiendo utilizar ácido polifosfórico como catalizador y solvente **(13)**.

El segundo método para la preparación directa de sulfoximina libre fue descubierto por Tamura *et al*, quién encontró que esos sulfóxidos pueden ser aminados en condiciones moderada de metil sulfoniloxiamina **(15)**. El método fue usado para preparar sulfoximina ópticamente activo desde sulfóxidos ópticamente activo, conservando su estructura.

4.2. Síntesis de sulfoximinas N-fosforilada

Las sulfoximinas sustituidas pueden ser fosforiladas por sustitución en el protón ácido del grupo imino, con resultados satisfactorios.

Según el procedimiento de Atherton-Todd (13), dialquilsfosfitos reaccionan suavemente con aminas primarias y secundarias en CCl_4 y una sulfoximina sustituida para dar dialquilsfosforamidatos con buenos rendimientos. Se demostró que esta reacción ocurría vía la formación de un fosforocloridato intermediario.

Wieczorkowski modifica tal técnica partiendo directamente del fosforocloridato o fosforoclorotionato con sulfoximina sustituida y ofrece así una alternativa para la N-fosforilación de las mismas, como puede observarse en la siguiente ecuación:



$\text{R} = (\text{C}_2\text{H}_5)_3$

Ecuación 4.2.1 Reacción de dialquilsfosfitos con aminas primarias y secundarias en CCl_4 y una sulfoximina sustituida.

5. Síntesis de compuestos OPs

Los que trabajan en la síntesis de nuevas moléculas, tienen un gran desafío: descubrir nuevos compuestos con actividad biológica desconocida.

Probablemente la forma más común de realizar investigación actualmente radica en la síntesis de análogos de compuestos conocidos. Dichos compuestos pueden ser una toxina o un insecticida existente. Esto es mucho más frecuente que el descubrimiento de nuevas familias.

Actualmente se buscan nuevos compuestos con buena actividad biológica pero más selectivos insecto-mamíferos y por ende más seguros para el ser humano y el medio ambiente.

Considerando estos conceptos se estudiaron las sulfoximinas N-fosforiladas evaluando su acción insecticida *in vivo* y el poder anticolinesterásico *in vitro* sobre *Musca domestica* (16), con el objeto de contribuir al diseño racional de nuevos insecticidas OPs.

6. Relación estructura-actividad de insecticida

Desde el inicio de la síntesis de compuestos biológicamente activos se postularon relaciones entre la estructura y la actividad biológica, muchos relacionados a estudios de teorías de receptores para drogas.

En la actualidad, el desarrollo de nuevos plaguicidas se realiza a través del área de diseño molecular. La posible actividad biológica de un compuesto depende de procesos complejos que tienen lugar en el organismo y que van desde la penetración y transporte, al metabolismo e interacción con el receptor. Como consecuencia, es de esperar que más de una propiedad de la molécula influya en la bioactividad (17).

Considerando las estructuras de los compuestos inhibidores, se puede intentar demostrar que entre las relaciones que determinan su actividad anticolinesterásica, se distinguen factores estéricos por un lado y energéticos por otro. Se ha encontrado que la propiedad inhibitoria está relacionada directamente con la densidad de carga sobre el átomo de P que se puede evaluar teóricamente considerando la capacidad dadora o aceptora de electrones de los sustituyentes unidos a este, o bien experimentalmente observando las frecuencias de vibración del grupo P-O-R por ejemplo. Aunque la labilidad del enlace éster es el factor más importante que determina la actividad anticolinesterásica, las propiedades estéricas de la molécula en ciertas ocasiones afectan significativamente las constantes de inhibición (18)(19).

Es por ello que desde el comienzo del estudio QSAR se avanzó en la búsqueda de mejores correlaciones, haciéndolas más complejas y utilizando el aporte de la matemática con los algoritmos de correlaciones no lineales y desde la química básica con el desarrollo de metodologías de cálculo de las propiedades estructurales de las moléculas orgánicas necesarias para describir la conformación de las mismas.

6.1. Estructura conformacional de las sulfoximas fosforiladas

Según un estudio realizado por Mastrantonio (20), los ésteres fosfóricos derivados de las sulfoximas, poseen grandes restricciones conformacionales (Fig. 6.1). En estas moléculas existen sistemas orbitales que impiden rotaciones alrededor del átomo de fósforo, debido al sistema de electrones π , ubicados sobre el grupo N=S=O, que pueden tener un cierto grado de deslocalización hacia el sistema π del enlace P=R, siendo R (S u O). Esta estructura impondría una restricción importante a la rotación de ángulos diedros ψ_{PN} y ψ_{NS} .

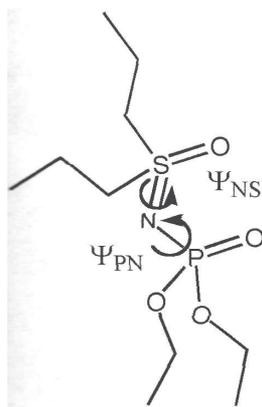


Fig. 6.1 Estructura de la sulfoximina N-fosforilada con diedros sus ángulos característicos.

7. Toxicología de los compuestos organofosforados

La aplicación tecnológica más relevante de los compuestos OPs se relaciona con su gran capacidad de inhibir la actividad de la AChE de invertebrados y, por lo tanto, de inhabilitar sus funciones neurológicas. Así mismo, son importantes tóxicos de vertebrados por inhibir la misma enzima y de aquí su uso como sustancia de agresión bélica. Por esta razón, estas aplicaciones encuentran un campo de investigación común. En este sentido, se dispone de un vasto conocimiento de los mecanismos de acción de estos compuestos en los distintos niveles biológicos (molecular, celular, tisular, orgánico y sobre ecosistemas) y para una gran variedad de organismos, fundamentalmente insectos y mamíferos.

Como ya se mencionó en el Capítulo 1.2, las distintas clases existentes de colinesterasas constituyen una familia de enzimas que, catalizando la misma reacción, presentan diferente localización tisular, afinidad de sustratos y función fisiológica.

7.1. Mecanismos de acción tóxica

Como ya se ha indicado, bajo ciertas condiciones fisiológicas, la AChE hidroliza a la ACh, un mediador químico de la transmisión de impulsos nerviosos, en el resto colina y en ácido acético. Un OP inhibitor se puede describir como un grupo fosforilo (P=O) unido a tres sustituyentes, de los cuales uno es hidrolizable en condiciones biológicas. En presencia de OPs, la AChE es fosforilada y como consecuencia de ello es inhibida (**21**). Esto significará una acumulación de ACh en las terminales sinápticas de los nervios parasimpáticos, en la placa neuromotora y en el sistema nervioso central, este hecho es el responsable de los síntomas típicos del envenenamiento agudo por OPs (**22**).

En el mecanismo de acción tóxica de los OPs es necesario distinguir cada una de las fases del proceso de manera de poder evaluar el contexto en el que se estudiará cada uno de los aspectos relacionados a él. La forma de absorción, la distribución tisular, las modificaciones metabólicas, los procesos de detoxificación y eliminación de la sustancia en cuestión deben ser tenidas en cuenta en la discusión global acerca de la forma en que una sustancia ejerce su acción deletérea sobre un organismo (**Fig. 7.1.1**)

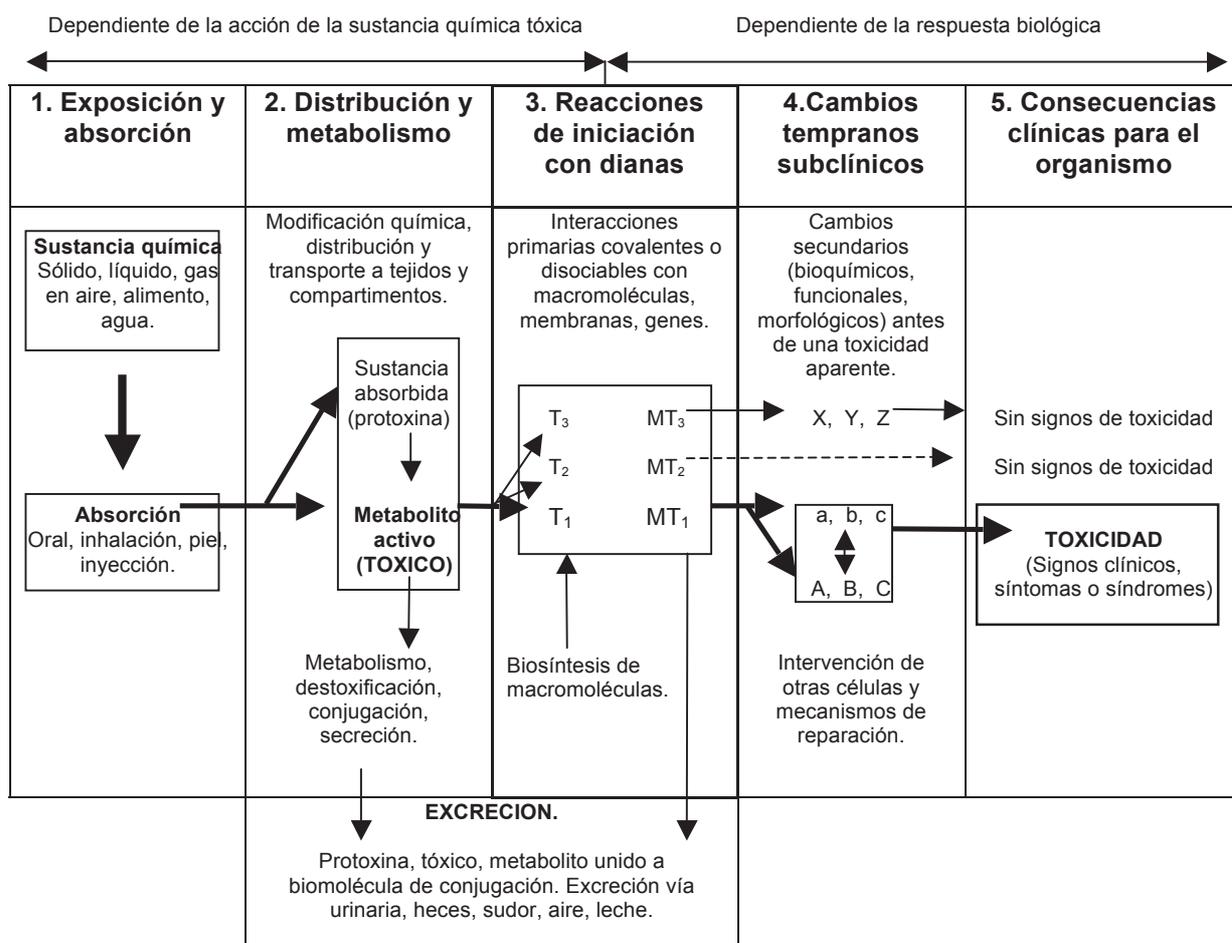


Fig. 7.1.1 Cada una de las fases del proceso de acción tóxica, determina cómo finalmente se expresarán los efectos tóxicos. Se determina entre la interacción con dianas relevantes (T1) e interacciones sin cambios (T2) (23).

Las primeras investigaciones sobre el paratión y su derivado oxigenado, el paraoxón, mostraron que aparentemente además de conferir mayor estabilidad a la hidrólisis no enzimática, la sustitución de P=S por P=O en el compuesto fosforado altera sus propiedades tóxicas (21). El paratión mostró ser menos tóxico que el paraoxón para los animales y algunos

factores que afectan la toxicidad en ratas del paratión no afectan la del paraoxón, aunque ambos compuestos inhiben la AChE y producen signos colinérgicos agudos similares.

Se demuestra entonces que existe una marcada relación entre la toxicidad y la biotransformación de los OPs. Muchos de ellos necesitan de una previa transformación *in vivo* para ejercer su acción.

Por ello existe una clasificación de OPs tóxicos que distingue a los inhibidores indirectos de los inhibidores directos de la AChE, según se necesite o no de una transformación *in vivo* antes de actuar sobre las enzimas.

Cuando se realiza una descripción de la toxicidad de los compuestos OPs, se describe una cantidad de eventos que involucran a distintos compartimentos orgánicos, toxicocinéticas parciales características, biotransformaciones e interacciones con moléculas que comprenden o no a la enzima diana y que, en conjunto, son las que determinan la capacidad toxica de estas sustancias.

Esto implica que las características de la interacción con la molécula diana, en este caso particular la AChE, no es el único factor determinante de cuan tóxico es un OP u otro. En el proceso de intoxicación por OPs, la inhibición de la AChE es un proceso central, pero no se debe perder de vista la diferencia entre la capacidad inhibitoria de un OP y su toxicidad.

8. Acetilcolinesterasa: caracterización del sitio activo

La inhibición de la AChE es un proceso complejo que se puede describir desde dos puntos de vista: el cinético y el mecánico-molecular.

La descripción desde el punto de vista de la mecánica de la inhibición, necesita de una correcta interpretación de las estructuras involucradas en el proceso. Esto implica un conocimiento de la arquitectura del sitio activo de la AChE, es decir, no sólo de las estructuras moleculares, sino también de los procesos dinámicos que se suceden en el transcurso de la interacción con sustratos e inhibidores (24). También es preciso reconocer el papel del comportamiento de las moléculas que interaccionan con este sitio activo.

Es necesario identificar si estas características, descritas para entornos simétricos (en el vacío o en solución), resultan también en variabilidad conformacional en un sitio restringido o asimétrico. Ambas características, la de simetría y la de restricción estérica, están presentes en el sitio activo de la AChE y el objetivo es evaluar la magnitud con la que estos efectos conformacionales influyen en los mecanismos de inhibición.

8.1. Dinámica del sitio activo de la AChE

La hidrólisis del sustrato natural por parte de la AChE, la ACh, ocurre mediante un mecanismo catalítico que involucra tres etapas: **(25)**

- a) interacción inicial del sitio activo con el éster y formación del complejo activado que involucra a un hidrófilo serínico del sitio activo de la proteína,
- b) hidrólisis del enlace éster con formación de un enlace covalente entre el sustrato y el oxígeno serínico y
- c) hidrólisis final con restitución de la actividad enzimática, en la que participarían moléculas de agua fijas en los entornos del hidroxilo serínico. De la misma manera, se han descrito varios otros subsitios en el sitio activo que participan en mayor o menor medida en cada una de estas etapas **(26)** y que tienen individualmente sus características cinéticas definidas **(Fig. 8.1.1)**

En el proceso de inhibición de la enzima con OPs, se describen etapas similares **(27)**, pero la última de ellas tiene una cinética tal que, en condiciones fisiológicas, la unión del fosforado con la enzima implica la formación de un enlace covalente estable que da lugar a una inhibición irreversible. Sin embargo, existe evidencia que el proceso puede ser más complejo, dado que existirían interacciones con los sitios periféricos alternativos al sitio principal **(28)**.

Sólo en los últimos años se han descrito con cierta precisión las características estructurales generales de la AChE **(29)** y se ha dilucidado la estructura tridimensional tanto de la proteína completa, como de su sitio activo **(30)** y de las estructuras de los complejos formados con sustratos e inhibidores **(31)**. Se han reconocido los restos aminoacídicos que participan directa o indirectamente del mecanismo de catálisis del sustrato natural **(32)** y de inhibición por OPs y otras sustancias **(21)**. Esta descripción se ha hecho mediante el auxilio de distintas técnicas fisicoquímicas y metodologías de biología molecular.

Así mismo, se han podido descifrar algunas de las razones que determinan los requerimientos moleculares (estéricos, electrónicos o energéticos) que definen a un buen o mal inhibidor.

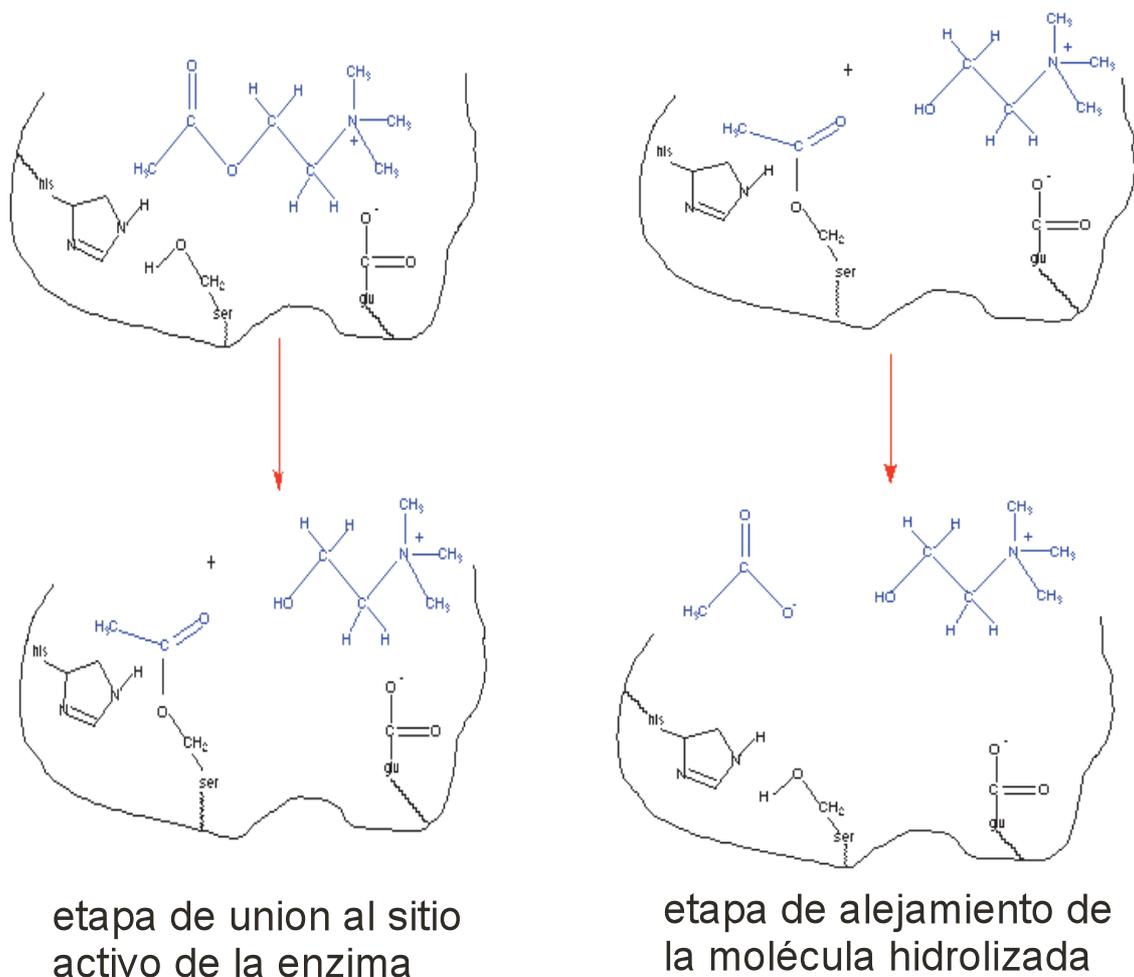


Fig. 8.1.1: Mecanismo esquemático de reacción de acetilcolina con AChE (33)

El sitio activo está descrito por distintos grupos moleculares (34) que dan cuenta de cada uno de los procesos verificados durante la catálisis y está ubicado dentro de una “garganta” o canal hidrofóbico en el que se distinguen varios subsitios (los números en superíndice indican la posición del resto aminoacídico en la estructura primaria de la proteína):

- Subsitio esterásico (Ser²⁰⁰) que participa directamente en el mecanismo de hidrólisis.
- Tríada catalítica completada por los restos de Hys⁴⁴⁰ y Glu³²⁷.
- Subsitio aniónico (Glu^{327, 199}) que guía a substratos e inhibidores catiónicos a lo largo del canal, acelerando la interacción con el sitio activo.
- Subsitios de retención de moléculas de agua (Glu^{202, 450}) en el entorno inmediato del sitio esterásico.
- Cavityd oxianiónica (Gly^{121, 122}, Ala²⁰⁴) que mediante hidrógenos amídicos estabiliza grupos P=O o C=O en posición catalítica.

- Bolsillo acilo (Phe^{295,297}) que limita estéricamente al sitio activo.
- Subsitios aniónicos periféricos (Asp⁷⁴, Trp⁶⁶) que participan de la interacción con inhibidores.

Aunque en general las distintas variantes de la AChE presentan parámetros cinéticos diferentes (35), el mecanismo molecular de la catálisis básicamente es el mismo, lo que es consecuencia de las similitudes en las estructuras de los sitios activos correspondientes.

La AChE es muy eficiente como maquina catalítica, actuando cerca del límite biológico de catálisis (25), de manera que las reacciones con sustratos naturales e inhibidores están limitadas casi fundamentalmente por proceso de difusión.

8.2. Estructura del sitio activo de la AChE

Alrededor del 4% del volumen total de la proteína no esta ocupado por restos aminoacídicos y cerca de la mitad de este vacío se encuentra en el centro de la estructura (36), que es donde se ubica el sitio activo. Varios grupos aromáticos, que participan durante el proceso dinámico de interacción de sustratos e inhibidores con el sitio activo (37), constituyen un profundo canal o garganta de 20Å, en el fondo del cual se encuentra la Ser²⁰⁰ reactiva (Fig. 8.2.1)(38).

El llamado subsitio aniónico, se constituye con los restos Glu³²⁷ y Glu¹⁹⁹, y tiene como función el guiar a las moléculas cargadas positivamente a lo largo del canal hidrofóbico, acelerando la interacción con el sitio activo y la catálisis misma (34).

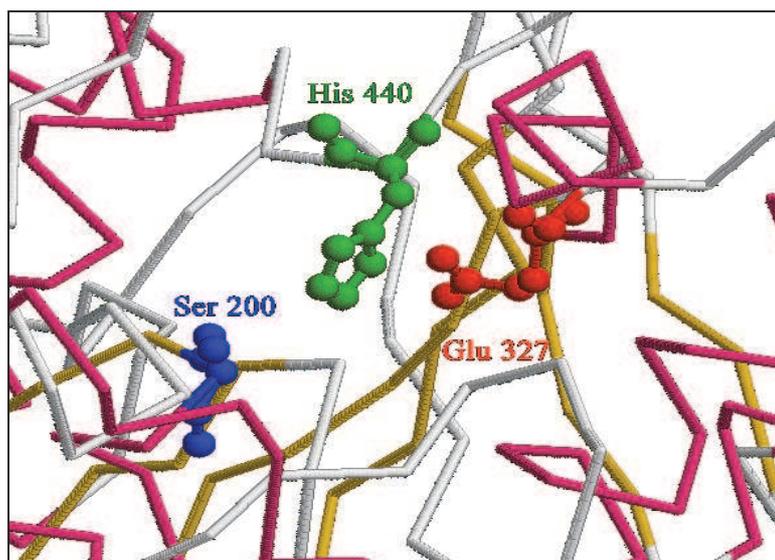


Fig. 8.2.1: Subsitio esterásico, en el que se encuentra la triada catalítica: Ser 200, His 440 y Glu 327 (39).

La llamada tríada catalítica involucra al resto Hys⁴⁴⁰ y Glu³²⁷, quienes durante la formación del estado activado durante la catálisis, formarían fuertes puentes de hidrógeno **(40)** que facilitarían la migración del hidrógeno de la Ser²⁰⁰, hacia el resto ácido de Glu³²⁷. Por otro lado, el ingreso de la molécula huésped queda claramente limitada **(41)** por la cantidad de grupos aromáticos (hidrofóbicos) que rodean al grupo reactivo **(42)**, sobre todo por el llamado bolsillo acilo. El tamaño del bolsillo acilo y las limitaciones estéricas impuestas por éste, determina la especificidad de la enzima **(43)**.

9. Acetilcolinesterasa: Cinética de la inhibición

Para describir la interacción de los OP con el sitio activo de la enzima, se puede utilizar un modelo en el que se consideran: **B** como un grupo básico representado en un nitrógeno imidazol de la histidina, **OH** correspondería al hidroxilo de la serina, **HA** como un grupo ácido (hidroxilo de tirosina) y **S** como un sitio aniónico, organizados en un “bolsillo” determinado por la estructura terciaria de la enzima **(Fig. 9.1)**.

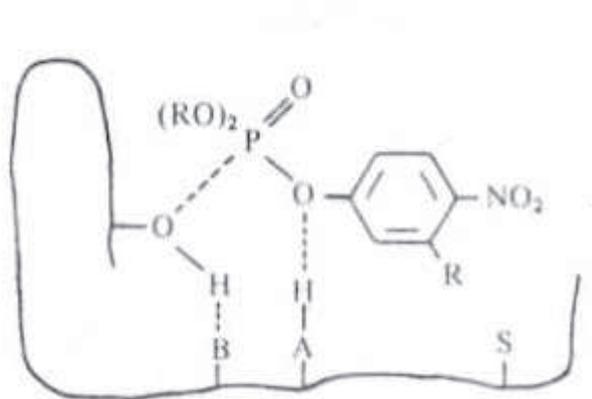


Fig. 9.1: Modelo elemental de la interacción de OPs con el sitio activo de la enzima AChE **(10)**.

Una vez formado, este complejo experimenta una rápida sustitución nucleofílica dentro de la enzima liberando un resto sustituyente de la tercera posición del éster fosfórico **(Fig. 9.2)**

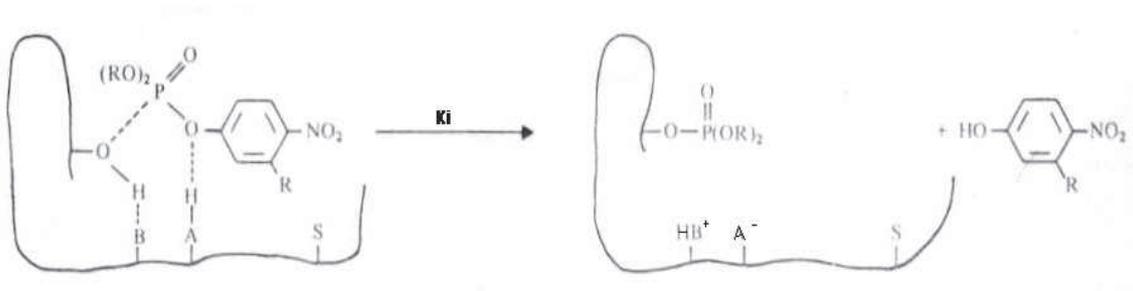
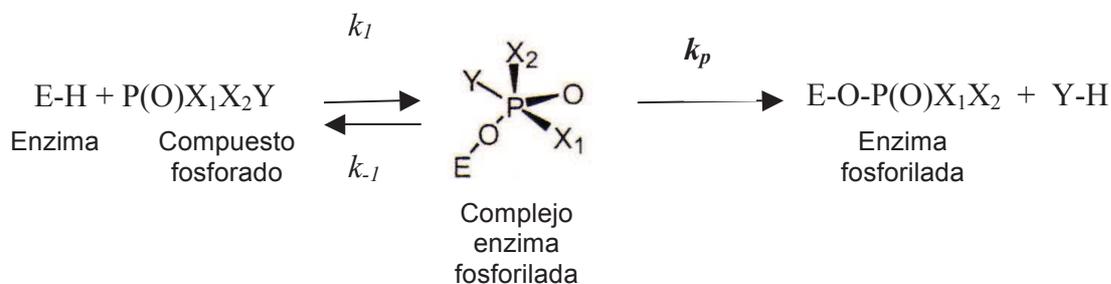


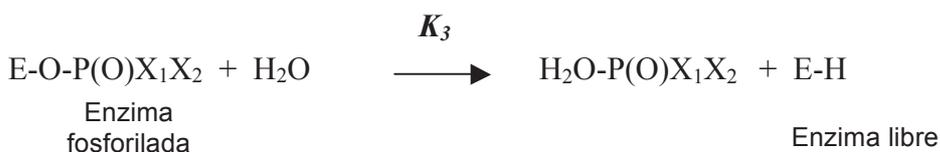
Fig. 9.2: Mecanismo esquemático de reacción de un OP con AChE.

El proceso de inhibición tiene varios pasos que se pueden esquematizar según el esquema de la **Fig. 9.3**. En el primer paso, la relación entre k_{-1} y k_1 es lo que determina la afinidad del OP por la AChE, en un proceso que ocurre a través de un estado de transición con un fósforo pentacoordinado (**44**). Dicha relación k_{-1}/k_1 se denomina constante de afinidad (**Ka**) y determina la inhibición reversible de la enzima (cuanto menor es la constante, mayor es la afinidad) definido por Main (**45**)(**46**). Estudios del efecto de la temperatura sobre estas constantes cinéticas, dan cuenta que Ka es una expresión de la asociación-disociación de la enzima con el inhibidor.

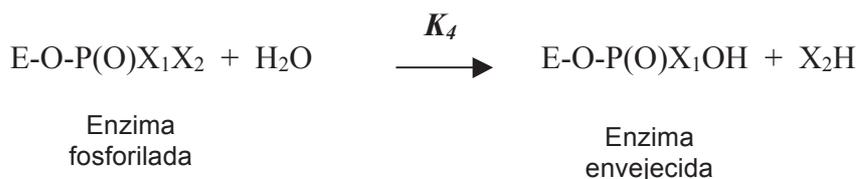
Fig. 9.3: Procesos implicados en la inhibición de la AChE por parte de un inhibidor OP.



a) Esquema de reacción entre la enzima y OP seguida de la reacción de la enzima fosforilada.



b) Esquema de reacción de hidrólisis de la enzima fosforilada.



c) Esquema de reacción de la enzima envejecida.

En un paso siguiente, la constante k_p o constante de fosforilación, es la que determina la velocidad de formación de un enlace covalente estable, con la consecuencia de la inhibición permanente de la enzima y la liberación de un grupo saliente **YH** (47). En general, las constantes de inhibición están influidas por distintos factores como el pH (45), la presencia de detergentes aniónicos (48) o de ciertas sustancias orgánicas como aquellas derivadas de la acridina. (49) Determinados modelos de interacción con el sustrato, implican considerar relaciones cinéticas más complejas que la simple formación de intermedios de activación como el descrito (50).

Aunque se considera que la inhibición de los OP es irreversible, en un esquema general se debe considerar la reacción de hidrólisis del resto fosfato unido al centro activo en un mecanismo análogo a la hidrólisis del sustrato, con la restitución del centro activo y la liberación de un dialquil fosfato como producto final del proceso. Esta es una reacción de hidrólisis, con su constante cinética asociada, k_3 . La desfosforilación de la AChE es un proceso espontáneo, pero tiene una cinética lenta, de manera que la irreversibilidad de la inhibición está determinada por la pequeña magnitud de la constante de hidrólisis del complejo enzima-OP (51).

Una prueba directa del mecanismo de inhibición descrito para los OPs, se obtiene midiendo las constantes de reactivación k_3 de la AChE inhibida con ésteres dialquifosfóricos, que se demuestra dependiente de los grupos $-\text{X}_1$ y $-\text{X}_2$ e independientemente del grupo saliente $-\text{Y}$ (52).

Este proceso de reactivación puede ser favorecido por sustancias capaces de interaccionar con el complejo enzima-fosfato dialquilo, denominadas agentes de reactivación, liberando el sitio activo para dar lugar nuevamente a la enzima funcional. En estos procesos es posible estudiar la cinética de reactivación (53).

El último proceso a considerar, es la hidrólisis de uno de los restos alquilo del grupo fosfato unido al centro activo, dando lugar a un complejo muy estable y caracterizado por la presencia de un grupo ácido en el centro fosfórico. Este proceso se denomina

“envejecimiento” de la fosforilación. La irreversibilidad de la reacción está establecida por la magnitud de la constante cinética k_4 (54), y en condiciones fisiológicas implica la imposibilidad de remoción del grupo fosfato mediante agentes de reactivación.

En la bibliografía clásica, se definen como determinantes de tipo estérico y de tipo energético del poder inhibitor de los OPs: a) el tamaño de los grupos $-X_1$ y $-X_2$ y el grupo saliente $-Y$ (55), que permitan el ingreso al sitio activo sin impedimentos estéricos; b) la lipofilidad de la molécula entrante (56), que permite una mejor interacción en el entorno del sitio activo; c) la naturaleza funcional de los sustituyentes del fosfato (57) que determina la eficiencia de la interacción con los correspondientes subsitios del sitio activo; d) la labilidad del enlace $P-Y$ (58), que tiene implicancia directa en la cinética del proceso y finalmente e) la accesibilidad del átomo de fósforo al ataque nucleofílico por parte del hidroxilo de la enzima, que está determinada por el tamaño de los sustituyentes del fosfato. Según distintas hipótesis (20), un factor que también influiría en el comportamiento cinético, es la **libertad conformacional** de la molécula entrante.

Cuando se diseña un OP, con el propósito de obtener productos de mayor poder plaguicida y, al mismo tiempo, grandes márgenes de seguridad para los mamíferos, se procura que se cumplan relaciones adecuadas entre las distintas constantes cinéticas (Tabla 9.1).

Entre los factores más importantes que determinan las diferencias entre cepas resistentes y cepas sensibles dentro de una misma especie, se encuentra la capacidad de destruir al inhibidor mediante reacciones de oxidación (59) o por la presencia de esterases específicas que dan lugar a la hidrólisis de los xenobióticos. (60) De igual manera, se han descrito cepas de insectos que presentan resistencia por modificaciones estructurales (61) o de las concentraciones *in vivo* (62) de la enzima diana de la inhibición.

Afinidad por la colinesterasa	K_a (peste) < K_a (mamífero)
Conversión de E-inhibida a E-acilada	K_p (peste) > K_p (mamífero)
Estabilidad del enzima acilada	K_3 (peste) < K_3 (mamífero)
Envejecimiento	K_4 (peste) > K_4 (mamífero)

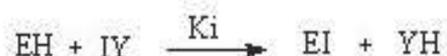
Tabla 9.1: Criterios cinéticos que definen a un inhibidor de la AChE como un buen plaguicida. (21)

9.1. Formalismo cinético

La reacción de fosforilación irreversible de la AChE es dependiente de la temperatura y puede ser descrita según la **Ecuación 9.1.1**, donde **EH** es la enzima, **IY** el OP inhibidor, **EI**

la enzima inhibida mientras que **YH** es el producto de hidrólisis del inhibidor, es decir, corresponde al grupo saliente. El grupo **I** corresponde al resto **-POX₁X₂**. Esta relación define una constante de inhibición bimolecular, **K_i**, que es tanto mayor para los buenos inhibidores y suele expresarse en unidades de M⁻¹ min⁻¹.

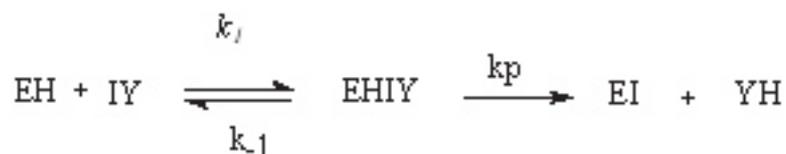
Ecuación 9.1.1



La potencia inhibidora de un OP en particular siempre se expresa como una relación de constantes definidas por las condiciones experimentales. Esto es así pues la adición de sustrato disminuye rápidamente el rango de reacción de los OP con la AChE, y se asume entonces que el OP reacciona con el centro activo del enzima. El modelo se ve corroborado por las similitudes estructurales en los requerimientos tanto para sustratos como para inhibidores. Es natural, por esta razón, considerar un intermediario durante la inhibición, similar al complejo de Michaelis con el sustrato (**Ecuación 9.1.2**), donde **EHIY** representa al complejo intermediario enzima-inhibidor.

La constante de afinidad ($K_a = k_{-1}/k_{+1}$) representa la capacidad del OP de ingresar al sitio activo y formar el complejo intermedio de inhibición. La constante de afinidad es tanto menor para aquellos OP que actúan como buenos inhibidores y suele expresarse en unidades de moles (M).

Ecuación 9.1.2



El segundo paso de fosforilación irreversible, es considerado el determinante principal en la capacidad de inhibición. Esta definido por la constante de equilibrio **k_p** correspondiente, de manera que en los buenos inhibidores este parámetro presentan valores altos, expresándose normalmente en unidades de min⁻¹. Esta etapa de interacción es muy rápida.

Ecuación 9.1.3

$$\frac{[IY]}{K_i} = \frac{[IY]}{k_p} - \frac{K_a}{k_p}$$

A partir de este modelo se plantea la **Ecuación 9.1.3**, en donde K_i es la constante de primer orden en la formación de la enzima fosforilada con una concentración dada del inhibidor y K_a queda planteada como una constante análoga a la constante de Michaelis, correspondiendo a la concentración del inhibidor que inhibe a la mitad de la enzima. En esta expresión está implícita la definición de cada constante respecto de las demás (**Ecuación 9.1.4**).

Ecuación 9.1.4

$$K_i = \frac{k_p}{K_a}$$

Bajo condiciones de pseudo primer orden, cuando $[EH] \ll [IY]$, la constante aparente de inhibición K_i depende de la concentración del inhibidor (**Ecuación 9.1.5**), que puede ser descrita en forma de doble inversa para la obtención de una función lineal (**Ecuación 9.1.6**). Evaluando ambas constantes, k_p y K_a , se obtendrá el valor de K_i .

Ecuación 9.1.5

$$K_i = \frac{k_p [IY]}{K_a + [IY]}$$

Ecuación 9.1.6

$$\frac{1}{K_i} = \frac{1}{[IY]} \frac{K_a}{k_p} + \frac{1}{k_p}$$

Mediante un formalismo diferente, (46) se define el parámetro $1/\rho = \Delta \ln v / \Delta t$, en donde v es la velocidad de catálisis de la enzima no inhibida. En condiciones tales que $[EH] \gg [IY]$, se utiliza la ecuación de inhibición (**Ecuación 9.1.7**) y su transformación lineal (**Ecuación 9.1.8**).

Ecuación 9.1.7

$$\frac{1}{\rho} = \frac{k_p [IY]}{K_a + [IY]}$$

Ecuación 9.1.8

$$\frac{1}{[Y]} = - \frac{1}{K_a} + \frac{k_p}{K_a} \rho$$

Para la obtención experimental del valor de ρ , que es el valor dependiente de ambas constantes cinéticas, se recurre al siguiente planteo matemático: considerando que la velocidad de la reacción catalizada puede ser expresada como un diferencial de la absorbancia en función del tiempo (**Ecuación 9.1.9**), en donde A corresponde a la absorbancia del medio de reacción, el valor ρ puede ser expresado según la **Ecuación 9.1.10**.

Ecuación 9.1.9

$$v = \frac{\delta A}{\delta t}$$

Ecuación 9.1.10

$$\rho = \frac{\delta \ln v}{\delta t} = \frac{1}{\delta A / \delta t} \frac{\delta^2 A}{\delta t^2}$$

Esta expresión constituye una ecuación diferencial de segundo orden, que se resuelve adecuadamente considerando el comportamiento de las curvas experimentales. Dicho comportamiento está definido por una absorbancia creciente y la existencia de una absorbancia máxima a tiempos infinitos. Esto implica imponer a una solución del tipo $A = f(t)$, las condiciones $\delta A / \delta t > 0$ y $\delta^2 A / \delta t^2 < 0$. La función que cumple ambas condiciones está representada en la **Ecuación 9.1.11**.

Ecuación 9.1.11

$$f(t) = A_0 - A_1 e^{-t/\rho}$$

De esta manera, el valor de ρ aparece de los ajustes de los valores experimentales a esta función. En principio, ρ es la única constante significativa en $f(t)$, a los efectos de la determinación de las constantes cinéticas, siendo los valores de A_0 y A_1 dependientes de las condiciones iniciales de cada ensayo y cumplen el papel de permitir un control experimental interno. Desde un punto de vista puramente matemático, para $f(t)$ existen infinitas soluciones,

siendo los valores de A_0 y A_1 dependientes entre sí. Pero experimentalmente se debería verificar que para $t_\infty \rightarrow A = A_0$, y para $t_0 \rightarrow A = A_0 - A_1$.

Por otro lado, ρ corresponde a un valor independiente. Así, tenemos entonces una forma de obtener los valores de k_p y K_a en una misma medida cinética.

Una de las limitaciones importantes en la aplicación de este procedimiento, tiene relación con el encontrar las condiciones experimentales bajo las cuales, en el lapso de los tiempos de medida, exista una concentración apreciable del complejo **EH-IY**, de manera que sea posible manifestar sus concentraciones en las variaciones de la actividad **(63)**, es decir, en el factor ρ asociado a la curvatura de la cinética de reacción. El ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 9.1.11** permite disponer de un margen de trabajo más amplios que los posibles según el procedimiento usual de la aplicación de la expresión $1/\rho = \Delta \ln v / \Delta t$ a las curvas experimentales.

Se han desarrollado otras metodologías para la determinación simultánea de las constantes de afinidad y de fosforilación, con manejos alterativos de las relaciones cinéticas **(64)**, pero el método de Main aparenta ser el más generalizable y es sobre el cual hemos desarrollado las medidas.

10. Objetivos

Mediante el uso de metodologías experimentales de distinto tipo (espectroscopías moleculares, cinética enzimática) y teóricas, se pueden realizar interesantes aportes en diversos aspectos relacionados con la temática de los OPs en particular, uno relacionado con el comportamiento de moléculas aisladas y otro relacionado con los eventos asociados a la interacción de los OPs con la AChE.

En este caso se trabajará con O,O dietil-N-(dipropil sulfoximina) fosforoamidato (DPSNPO), O,O dietil-N-(dibutil sulfoximina) fosforoamidato (DBSNPO) y O,O dietil-N-(metilfenil sulfoximina) fosforoamidato (MePhSNPO) que corresponden, entre otras, a aquellas estructuras de este grupo de sustancias que demostraron ventajas experimentales y suficiente poder anticolinesterásico. Como sustancia de referencia para el trabajo comparativo se cuenta con fosfato de dimetilclorovinilo (DDVP) ampliamente utilizado como insecticida y del cual se cuenta con abundantes datos fisicoquímicos y toxicológicos.

De estas sustancias se obtendrán parámetros toxicológicos (constantes de inhibición) complementarios a los reportados, fisicoquímicos y químicos. El estudio de las características estructurales puede evidenciar los mecanismos particulares de inhibición.

Se abordarán estudios teóricos mediante el software adecuado a los fines, de manera de modelar las propiedades de las sustancias con las que se trabajará y predecir su comportamiento fisicoquímico, químico y biológico, datos que se utilizarán para contrastar con los datos obtenidos mediante metodologías experimentales.

Respecto a las propiedades toxicológicas, se trabajará con ensayos enzimáticos que verifiquen las diferentes constantes cinéticas de inhibición con variantes en las condiciones de medida. Como metodología de referencia se cuenta con el método de Ellman, que bajo ciertas condiciones del ensayo, permite la evaluación de las distintas constantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos utilizados

Actividad anticolinesterásica:

- a) Ácido 5,5´ditiobis-2-nitro benzoico (DTNB) (Sigma)
- b) Ioduro de acetiltiocolina (IATC) (Sigma)
- c) Fosfato diácido de sodio p.a y fosfato monoácido de sodio p.a
- d) Enzima: AChE de cerebro bovino.
- e) Solución inhibidora: se utilizaron los siguientes inhibidores sintetizados: DPSNPO (O,O dietil-N-dipropil sulfoximina fosforoamidato), DBSNPO (O,O dietil-N-dibutil sulfoximina fosforoamidato) y MePhSNPO (O,O dietil-N-metilfenil sulfoximina fosforoamidato).
- f) Etanol absoluto

1.1. Determinaciones de cinéticas de inhibición enzimáticas. Método de Ellman (20)

Soluciones:

- Buffer fosfato de sodio 100 mM ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}$ en las proporciones adecuadas), MgCl_2 1 mM, ajustado en 7,8 unidades de pH.
- Ioduro de acetiltiocolina (IATC) (Sigma) disuelto hasta 12,5 mM en agua bidestilada.
- Ácido 5,5´ditiobis-2-nitro benzoico (DTNB PM: 396,2) en solución 12,5 mM preparada en el buffer (se envasa protegido de la luz)
- Fuente de enzima (las diluciones enzimáticas se preparan en el buffer)
- DPSNPO: solución madre: 28,5 mg en 1 ml de etanol absoluto.
- DBSNPO: solución madre: 31,6 mg en 1 ml de etanol absoluto.
- MePhSNPO: solución madre: 13,42 mg en 1 ml de etanol absoluto.
- A partir de estas soluciones se preparan las siguientes diluciones: 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M en agua.

1.2. Equipo

Espectrofotómetro Metrolab 1700.

Rango espectral: 200 a 1100 nm.

Ancho de Banda: 2 nm.

Luz dispersa: menor que 0,1 % a 220 nm (según norma ASTM).

Exactitud de longitud de onda: mejor que 1 nm.

Precisión de longitud de onda: +/- 0,2 nm.

Linealidad fotométrica: mejor que +/- 0,002 en 0,4 Å.

Detector: silicio con alta sensibilidad UV.

Microprocesador: intel 8032.

Lectura: mediante conversor híbrido tensión-secuencia de 100 KHz

2. Metodología de trabajo

2.1. Consideraciones generales del método utilizado para las mediciones

La determinación de la actividad anticolinesterásica se realizó sobre los respectivos fosfatos, midiendo la K_i que daría cuenta de la reactividad de los fosfatos sobre el sitio activo de la enzima, lo que estaría relacionado con la estructura química de la molécula.

La actividad colinesterasa y su inhibición por compuestos sulfoximinas fosforadas se determinó por la técnica de Ellman. Se basa en la utilización de yoduro de acetiltiocolina (IATC) como sustrato y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitro benzoico (DTNB) como indicador. Cuando el IATC es hidrolizado por las colinesterasas, el anión de tiocolina liberado sufre un intercambio de disulfuro con DTNB. Esto produce el anión del ácido 2-mercapto-5-nitrobenzoico. Este anión tiene una absorción intensa a 412 nm que puede ser determinado espectrofotométricamente.

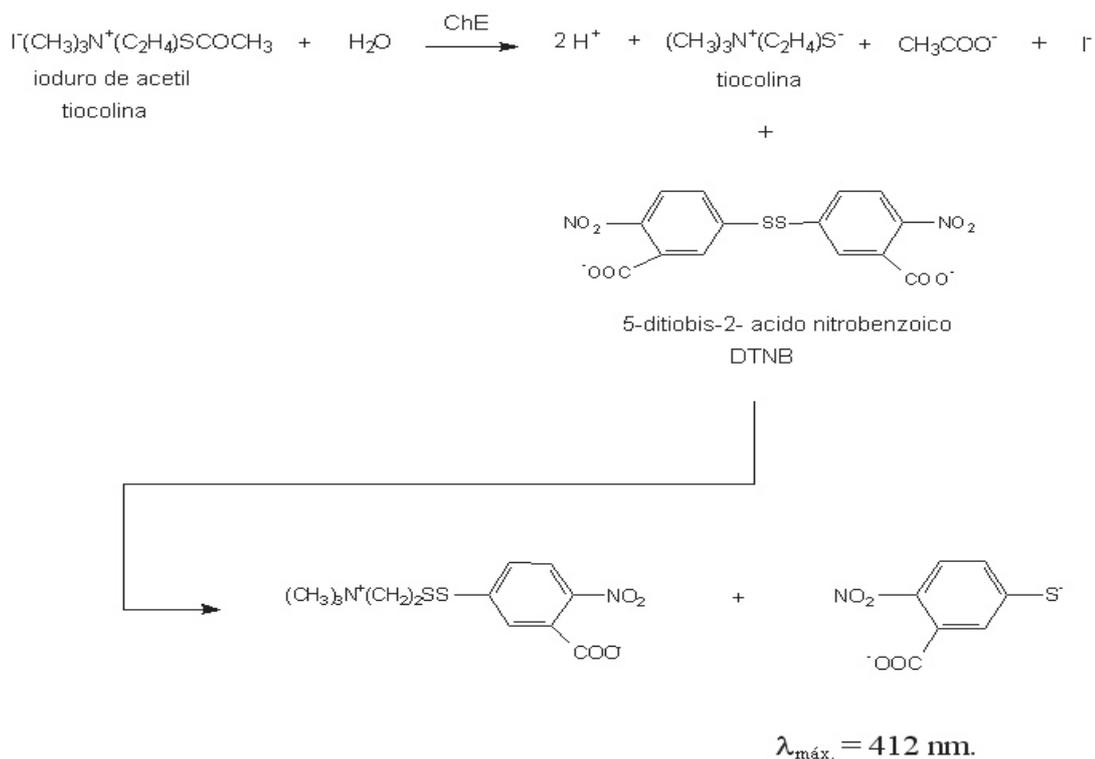


Fig. 2.1.1 Reacción enzima, sustrato, inhibidor y reactivo de Ellman

Las medidas espectrofotométricas de la actividad enzimática se realizaron usando el espectrofómetro Metrolab 1700, celdas de plástico descartables de 1 x 0,5 cm. de paso óptico y las lecturas se realizaron a 412 nm.

2.2. Curva de tiempo:

Se agregan sucesivamente al tubo (celda): 0,05 ml de IATC, 1 ml de buffer con DTNB, 0,05 ml de enzima, manteniendo la mezcla de reacción a 24±1°C. Se lee en espectrofotómetro a 412 nm. La primera lectura se la considera tiempo cero. Se grafica A₄₁₂ en función del tiempo. Se buscan las concentraciones de enzima que varían la A₄₁₂ en 0,8 - 1,1 unidades en el lapso de 20 minutos.

2.3. Curva de inhibición:

Se agregan sucesivamente al tubo: 1,3 ml de buffer con DTNB, 0,05 ml de enzima, 0,05 ml de la solución del inhibidor. Se lee en el espectrofómetro. A esta lectura se la considera tiempo cero. Se agrega luego 0,1 ml de IATC. Se lee en el espectrofómetro durante un tiempo de entre quince minutos (para buenos inhibidores) y hasta veinticuatro horas (para inhibidores pobres), manteniendo permanentemente la mezcla de reacción a 24±1°C. Se

gráfica A_{412} en función del tiempo. Se trabaja con entre tres y cinco concentraciones de inhibidor y cada ensayo se realiza por duplicado.

Para cada concentración se ajusta una curva referida a la ecuación 9.1.11, calculándose el valor de χ^2 , el ajuste de la regresión (r) y el valor de cada parámetro A_0 , A_1 y ρ con los errores analíticos asociados.

2.4. Correlación estructura química-actividad biológica

Parámetros físico-químicos calculados

Debido a la complejidad de los sustituyentes sulfoximina no se disponía en la literatura de información correspondiente a los parámetros electrónicos, hidrofóbicos y estéricos clásicos, por lo que resultó necesario determinar en forma experimental o calcular en forma teórica aquellos parámetros que puedan explicar las diferencias de toxicidad y actividad anticolinesterásica obtenidas para los distintos compuestos sintetizados. El trabajo con programas de diseño molecular permitió realizar cálculos teóricos sofisticados a partir del diseño de la molécula y su conformación de menor energía, obteniéndose así valores que den cuenta de la disposición electrónica de toda la molécula o de alguno de sus átomos y datos espaciales (10). Estos datos podrían servir para dar cuenta de los efectos electrónicos y/o estéricos de la molécula o parte de la misma y ser utilizados en las correlaciones de estructura-actividad. En cuanto a los parámetros hidrofóbicos se utilizó el método de fragmentación de Hansch y Leo (65) para el cálculo de los valores del logaritmo de la constante de partición octanol/agua ($\log P$) del sustituyente (10).

En la siguiente tabla se informan los datos obtenidos mediante el cálculo *ab initio* para el conformero más estable, como así también el valor calculado por fragmentación ($\log P$) de las distintas moléculas O,O dietil-N-sulfoximina fosforoamidato.

Moléculas	Volumen molar (cm ³ /mol)	Log P	Densidad integrada (e/bohr ³)	Momento dipolar (Debyes)
DBSNPO	212.293	5.26	359.6962	4.2566
DPSNPO	197.047	4.18	137.653	4.2055
MePhSNPO	180.380	3.14	211.0948	4.3196

Tabla 2.4.1 Valores calculados para las distintas moléculas sulfoximina fosfatos.

2.5. Procesamiento de los datos

Se aplicaron tratamientos estadísticos para analizar las correlaciones obtenidas con los parámetros experimentales como K_i , K_a y k_p . Utilizando para dicho cálculo de regresión el programa estadístico de datos Origin 6.0.

RESULTADOS

1. Actividad anticolinesterásica

En la siguiente tabla se indican los valores de K_i y sus componentes K_a y k_p para enzima proveniente de cerebro bovino y se compara con la actividad anticolinesterásica de DDVP.

Moléculas	K_i ($M^{-1} \text{ min}^{-1}$)	K_a (M)	k_p (min^{-1})
DDVP	$2,64 \times 10^4$	$4,68 \times 10^{-6}$	$1,24 \times 10^{-1}$
DBSNPO	$1,58 \times 10^8$	$5,14 \times 10^{-10}$	$7,91 \times 10^{-3}$
DPSNPO	$6,747 \times 10^6$	$1,65 \times 10^{-9}$	$1,11 \times 10^{-2}$
MePhSNPO	3×10^8	$3,33 \times 10^{-10}$	1×10^{-1}

Tabla 1.1 Valores de K_i , K_a y k_p para la enzima AChE.

Comparando los distintos compuestos entre sí, se observa que para AChE el metil fenil es el más activo, seguido por el dibutil y dipropil.

2. Correlación estructura-actividad con enzima de cerebro bovino

Parámetros	*	K_i	K_a	k_p
Volumen Molar	m	$-5,660 \times 10^{-8}$	$3,404 \times 10^9$	-85,772
	a	205,27	193,74	202,01
	R²	0,27036	0,02317	0,06239
	P	0,65188	0,90271	0,83928
Densidad Integrada	m	$2,522 \times 10^{-7}$	$-1,053 \times 10^{11}$	1428,734
	a	197,408	323,816	145,566
	R²	0,10690	0,44182	0,34466
	P	0,78795	0,53712	0,60055
logP	m	$-3,431 \times 10^{-9}$	$1,722 \times 10^8$	-4,885
	a	4,72477	4,05001	4,50302
	R²	0,22522	0,01344	0,04587
	P	0,6852	0,92601	0,86258
Momento Dipolar	m	$3,885 \times 10^{-10}$	$-7,238 \times 10^7$	1,152
	a	4,200	4,321	4,188
	R²	0,99386	0,81093	0,87787
	P	0,04988	0,28637	0,22727

* **m**: pendiente de la recta; **a**: ordenada al origen de la recta; **R²**: ajuste de regresión; **P**: probabilidad.

Tabla 2.1 Valores obtenidos de la correlación de los distintos parámetros calculados y los datos experimentales.

a) propiedades electrónicas: pueden analizarse mediante los datos obtenidos para la carga neta sobre el fósforo. Según los datos investigados no hay diferencias significativas entre los distintos sustituyentes por lo que no es posible establecer ningún tipo de correlación.

b) propiedades estéricas: se correlacionaron los descriptores de volumen molar y densidad integrada con las distintas constantes y dio como resultado una falta de correlación entre estos valores. En la Tabla 2.1 se observan los valores obtenidos.

c) propiedades hidrofóbicas: se analizaron los log P con las constantes pero no se encontró una regresión significativa por la falta de correlación de este parámetro con los datos experimentales. En cambio cuando se utilizó el momento dipolar (MD) se estableció una excelente correlación entre su valor y la capacidad anticolinesterásica de los compuestos.

La ecuación que describe la correlación del parámetro MD y Ki es la siguiente:

Ecuación 1: $MD = 4.201 (\pm 0.006) + 3.885E-10 (\pm 3.05E-11) * Ki$

$r = 0.99693$ $SD = 0.00633$ $P = 0.04988$

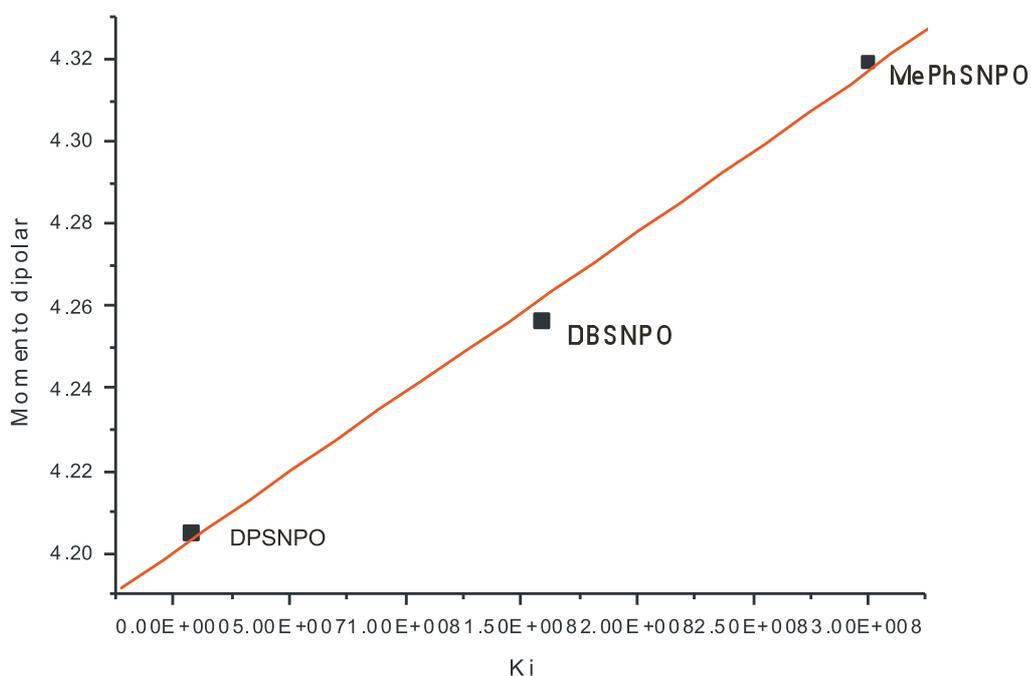


Fig. 1 Momento dipolar vs. Ki

Como puede observarse en la ecuación 1 para el MD la correlación es altamente significativa ($r = 0.99693$).

La ecuación que describe la correlación del parámetro MD y Ka es la siguiente:

Ecuación 2: $MD = 4.3208 (\pm 0.0355) - 7.238E7 (\pm 3.495E7) * Ka$
 $r = -0.90052$ $SD = 0.03529$ $P = 0.28637$

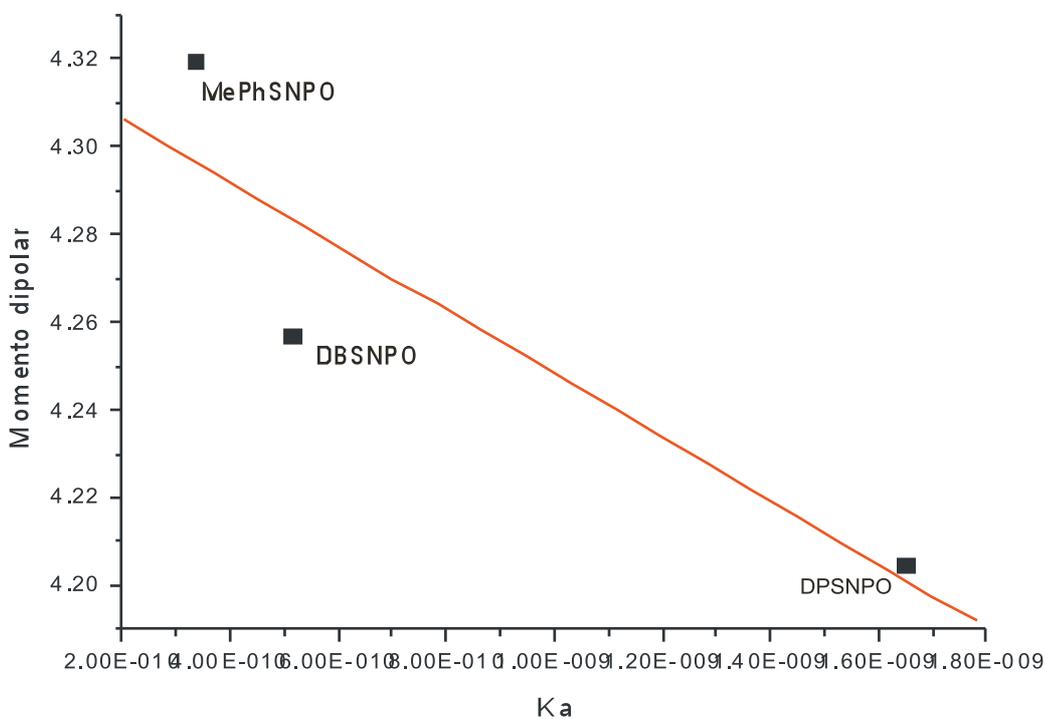


Fig. 2 Momento dipolar vs. Ka

En la ecuación 2 para el MD se observa una buena correlación con este descriptor pero no es estadísticamente significativo con un $p > 0,05$.

La ecuación que describe la correlación del parámetro MD y kp es la siguiente:

Ecuación 3: $MD = 4.187 (\pm 0.03175) + 1.152 (\pm 0.429) * kp$
 $r = 0.93695$ $SD = 0.02825$ $P = 0.22727$

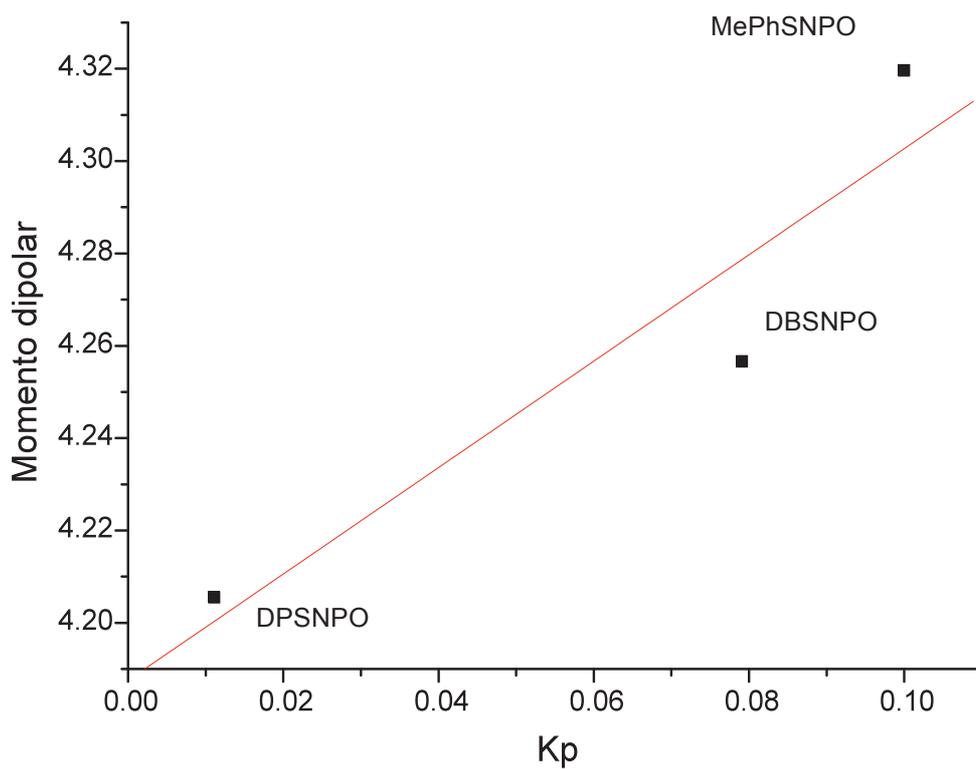


Fig. 3 Momento dipolar vs. kp

Como puede observarse en la ecuación 3 para el MD la correlación con este descriptor es buena, pero no es estadísticamente significativa con un $p > 0,05$.

3. Discusión

En el presente trabajo se realizaron ensayos de inhibición enzimática a tres nuevos insecticidas, sintetizados a partir de la sulfoximina correspondiente (DPSNPO, DBSNPO y MePhSNPO).

Se verificó que las N-dietil fosforil sulfoximina (P=O) son potentes inhibidores de la AChE de cerebro bovino, tal como ya fue reportado. Comparando los distintos compuestos entre sí frente al DDVP, se observó que para AChE el derivado de metil fenil sulfoximina es el más activo, seguido por el dibutil sulfoximina y el dipropil sulfoximina.

Entre los descriptores para los fosfatos, que se determinaron en trabajos anteriores, se encuentra el volumen molar, la densidad integrada, el momento dipolar y el logP.

El estudio de correlación entre el volumen molar con las K_i y sus componentes K_a y k_p para AChE respectivamente dio como resultado una falta de correlación entre estas variables.

No se observó una buena correlación entre la densidad integrada y las constantes cinéticas K_i , K_a y k_p .

El momento dipolar y el logP dan cuenta de las propiedades hidrofóbicas de las moléculas, expresan la afinidad por el sitio de reacción. El momento dipolar es un parámetro vectorial que depende de las distribuciones espaciales de los dipolos locales/enlaces, dependiendo de la conformación adoptada por la molécula y se expresa en Debyes (μ).

En cuanto a la correlación de logP con las distintas constantes no se obtuvo una buena correlación entre estas variables. Pero como puede observarse en los resultados, se obtuvo una excelente correlación de las constantes con el momento dipolar.

CONCLUSIONES

Comparando las ecuaciones de regresión obtenidas para los diferentes parámetros fisicoquímicos, se observó que para AChE de cerebro bovino el momento dipolar es el factor más interesante ya que se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre este descriptor y K_i con $p < 0,05$ y $r = 0,99693$.

Esto puede indicar que, dentro del grupo de moléculas estudiadas, la influencia de los efectos hidrofóbicos es algo más importante que la de los factores estéricos.

Por otro lado, la correlación de este parámetro con K_a y k_p respectivamente, estableció una buena correlación, sin que claramente se pueda indicar la consecuencia de esto.

El momento dipolar aumenta al aumentar la magnitud de las cargas separadas y al disminuir la longitud de enlace. Los valores medidos de momentos dipolares reflejan las polaridades globales de las moléculas. Para las moléculas poliatómicas, el momento dipolar es el resultado vectorial de la totalidad de los dipolos de enlace de las moléculas.

La significativa correlación hallada ($R^2 > 0,99$) expresa la importancia de este factor en la afinidad de este grupo de moléculas por el sitio de reacción. En un entorno no polar como el sitio activo de la AChE, descrito como un bolsillo hidrofóbico, la magnitud del momento dipolar de la molécula entrante será determinante para definir la capacidad de una sulfoximina fosforilada de ser un buen o mal inhibidor durante la interacción enzima-inhibidor.

Es probable que para estos nuevos compuestos, los efectos hidrofóbicos podrían influir en mucho la formación del complejo enzima-sustrato.

Resultados como estos permiten diseñar mejores inhibidores, dada la posibilidad de predecir la actividad biológica, a partir de cálculos sencillos.

Ante la falta de correlación entre los descriptores utilizados y las constantes cinéticas analizadas, podemos inferir que es necesario incorporar algún descriptor electrónico que permita estudiar la reactividad del grupo fosfórico y así incorporar al análisis los eventos de fosforilación de la serina en el sitio activo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Eto, M. (1974): In Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry; CRC Press: Cleveland, Ohio, USA.
2. Metcalf, R.L. (1955): Organic Insecticides. Their Chemistry and Mode of Action, Interscience N.Y. 251.
3. Wood, E.F. (1978): “Propiedades del Sistema Colinesterásico de la cabeza del *Triatoma infestans* y su relación con la acción Insecticida de Compuestos Organofosforados”, Tesis Doctoral, UBA. 2,4.
4. Mastrantonio, G., Della Vedova, C.O., Giannuzzi, L. (1999): “Cálculo de un modelo teórico para estudios cinéticos de la inhibición de la acetilcolinesterasa por OPs”, XI Congreso Argentino de Toxicología, La Plata, Argentina.
5. Axelsen, P.H., Harel, M., Silman, I., Sussman, J.L. (1994): Structure and dynamics of the active center gorge of acetylcholinesterase: Synergistic use of molecular dynamics simulation and X-ray crystallography, Protein. Sci. 3: 188-197.
6. Mastrantonio, G., Mack, H., Della Vedova, C.O. (2008): “Interpretation of the mechanism of acetylcholinesterase inhibition ability by organophosphorus compounds through a new conformational descriptor. An experimental and theoretical study”. J Mol Model. 14: 813-821.
7. Mastrantonio, G., Della Vedova, C. (2004): “Efectos tiono y tiolo: reinterpretación de los mecanismos de acción neurotóxica de compuestos organofosforados”. XXIV Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, Buenos Aires.
8. <http://es.wikipedia.org/wiki/Colinesterasa>
9. <http://www.cepis.org.pe/tutorial2/e/unidad2/index.html>
10. Bellozas Reinhard, M. (2004): Síntesis de nuevas sulfoximinas N-fosforiladas: actividad insecticida sobre *Musca domestica*, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam.
11. Sultatos, L.G. (2006): Interactions of Organophosphorus and Carbamate Compounds with Cholinesterases, Toxicology of Organophosphates and Carbamate Compounds. 209-211.
12. Whitehead, J.K., Bentley, H.R. (1973): Sulphoximides, J. Chem. Res. 6: 341.
13. Kennewell, P.D., Taylor, J.B. (1975): The Sulphoximides, Chemical Society Reviews. (4): 189.
14. Johnson, C.R. (1973): Sulphoximides, Accounts Chem. Res. 6: 341.

15. Tamura, Y., Sumoto, K., Minamikawa, J., Ikeda, M. (1972): Preparation of sulphoximides Tetrahedron Letters. 4137.
16. Bellozas Reinhard, M., Arnstein de Licastro, S. (2005): Synthesis and Bioactivity of New Phosphorylated R,R'-substituted Sulfoximines. *Molecules*. 10: 1369-1376. <http://www.mdpi.org>
17. Ariens, E.J. (1969): A molecular approach to the modulation of pharmacokinetics: modification of metabolic conversion by molecular manipulation. *Pure Appli. Chem.* 19: 187.
18. Fukuto, T.R. (1971): Relationship between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors, *Bull. World. Health. Organ.* 44 (1): 31-42.
19. Fukuto, T.R., Mercalf, R.L. (1956): Structure and insecticidal activity of some diethyl substituted phenyl phosphates, *J. Agric. Food. Chem.* 4 (11): 930-935.
20. Mastrantonio, G. (2003): Estudio Conformacional de Compuestos Organofosforados y sus Mecanismos de Acción Tóxica, Tesis Doctoral, UNLP.
21. Aldridge, W.N. (1971): The nature of the reaction of organophosphorus compounds and carbamates with esterases, *Bull. World. Health. Organ.* 44 (1): 25-30.
22. DuBois, K.P. (1971): The toxicity of organophosphorus compounds to mammals, *Bull. World. Health. Organ.* 44: 233-240.
23. Extraído de Vilanova *et al.* (2003): Curso de Experto Universitario en Toxicología, adaptado del esquema de Aldridge. En: *Toxicología de Posgrado*. M. Repetto. Ed. Area de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla.
24. Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N. *et al.* (1996): The architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors, *J. Biol. Chem.* 271 (20): 11953-11962.
25. Rosenberry, T.L. (1975): Acetylcholinesterase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 43: 103-218.
26. Barnet, P., Rosenberry, T.L. (1979): Functional identity of catalytic subunits of acetylcholinesterase, *Biochim. Biophys. Acta* 567 (1): 154-160.
27. Rosenberry, T.L., Bernhard, S.A. (1972): Studies of catalysis by acetylcholinesterase. Synergistic effects of inhibitors during the hydrolysis of acetic acid esters, *Biochemistry*. 11 (23): 4308-4321.

28. Friboulet, A., Rieger, F., Goudou, D., Amitai, G. (1990): Interaction of an organophosphate with a peripheral site on acetylcholinesterase, *Biochemistry*. 29 (4): 914-920.
29. Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M. *et al.* (1986): Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence, *Nature*. 319: 407.
30. Sussman, J.L. *et al.* (1988): Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* subsequent to solubilisation with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Mol. Biol.* 203: 821-823.
31. Vilanova, E., Johnson, M.K., Vicedo, J.L. (1987): Interaction of some unsubstituted phosphoramidate analogs of methamidophos (O,S-dimethyl phosphorothioamidate) with acetylcholinesterase and neuropathy target esterase of hen brain, *Pestic. Biochem. Physiol.* 28: 224-238.
32. Rosenberry, T.L., Bernhard, S.A. (1971): Studies of catalysis by acetylcholinesterase. I. Fluorescent titration with a carbamoylating agent, *Biochemistry*. 10 (22): 4114-4120.
33. <http://academic.uofs.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymodule.html>
34. Shafferman, A., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M. *et al.* (1992): Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding, *J. Biol. Chem.* 267 (25): 17640-17648.
35. Dave, K.R., Syal, A.R., Katyare, S.S. (2000): Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties, *Z. Naturforsch.* 55 (1-2): 100-108.
36. Kovach, I.M., Qian, N., Bencsura, A. (1994): Efficient product clearance through exit channels in substrate hydrolysis by acetylcholinesterase, *FEBS Lett.* 349 (1): 60-64.
37. Harel, M. *et al.* (1993): Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 9031-9035.
38. Eastman, J., Wilson, E., Cerveñansky, C., Rosenberry, T.L. (1995): Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation, *J. Biol. Chem.* 270 (34): 19694-19701.
39. <http://usuarios.lycos.es/fherranz/actividad2/actividad2.html>
40. Massiah, M.A., Viragh, C., Reddy, P., Kovach, I. *et al.* (2001): Short, strong hydrogen bonds at the active site of human acetylcholinesterase: proton NMR studies, *Biochemistry*. 40 (19): 5682-5690.

41. Zahabi, M., Tahori, A.S., Klimer, F. (1971): Insensibility of acetylcholinesterases to organophosphorus compounds as related to size of esteratic site, *Mol. Pharm.* 7: 611-619.
42. Bracha, P., O'Brien, R.D. (1968): Trialkyl phosphate and phosphorothiolate anticholinesterases. II. Effects of chain length on potency, *Biochem.* 7 (4): 1555-1559.
43. Taylor, P., Radic, Z., Hosea, N.A., Camp, S. *et al.* (1995): Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition, *Tox. Lett.* 82/83: 453-458.
44. Singh, A.K. (1985): Kinetic analysis of inhibition of brain and red blood cell acetylcholinesterase and plasma cholinesterase by acephate or methamidophos, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81 (2): 302-309.
45. Brestkin, A.P. *et al.* (1992): The mechanism of anticholinesterase action of acetylene organophosphorus inhibitors, *Bioorg. Khim.* 18 (8): 1067-1072.
46. Main, A.R., (1964): Affinity and phosphorylation constants for the inhibition of esterase by organophosphates, *Science.* (144): 992-993.
47. Langel, U.L., Jarv, J.L. (1978): Leaving group effects in butyrylcholinesterase reaction with organophosphorus inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* 525 (1): 122-133.
48. Singh, A.K. (1990): Molecular properties and inhibition kinetics of acetylcholinesterase obtained from rat brain and cockroach ganglion, *Toxicol. Ind. Health.* 6 (6): 551-570.
49. Galli, A., Mori, F., Gori, I., Lucherini, M. (1992): In vitro protection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by tetrahydroaminoacridine. Comparison with physostigmine, *Biochem. Pharmacol.* 43 (11): 2427-2433.
50. Dunn, S.M., Raftery, M.A. (1997): Agonist binding to the *Torpedo acetylcholine* receptor. 1. Complexities revealed by dissociation kinetics, *Biochemistry.* 36 (13): 3846-3853.
51. Jong, L.P., Wolring, G.Z., Benschop, H.P. (1982): Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by methamidophos and analogous (di)methylphosphoramidates, *Arch. Toxicol.* 49 (2): 175-183.
52. Aldridge, W.N., Davison, A.N. (1953): The mechanism of inhibition of cholinesterase by organophosphorus compounds, *J. Biochem.* 55: 763-766.
53. Su, C.T., Wang, P.H., Liu, R.F., Shih, J.H. *et al.* (1986): Kinetic studies and structure-activity relationships of bispyridinium oximes as reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds, *Fundam. Appl. Toxicol.* 6 (3): 506-514.

54. Clothier, B., Johnson, M.K., Reiner, E. (1981): Interaction of some trialkyl phosphorothiolates with acetylcholinesterase. Characterization of inhibition, aging and reactivation, *Biochim. Biophys. Acta* 660 (2): 306-316.
55. Berman, H.A., Leonard, K. (1990): Ligand exclusion on acetylcholinesterase, *Biochemistry*. 29 (47): 10640-10649.
56. Antosiewicz, J., Wlodek, S.T., McCammom, J.A. (1996): Acetylcholinesterase: Role of the enzymes charge distribution in steering charged ligands toward the active site, *Biopolymers*. 39 (1): 85-94.
57. Nolte, H.J., Rosenberry, T.L., Neumann, E. (1980): Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands, *Biochemistry*. 19 (16): 3705-3711.
58. Kemp, J.R., Wallace, K.B. (1990): Molecular determinants of the species-selective inhibition of brain acetylcholinesterase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104: 246-258.
59. Yu, S.J., Nguyen, S.N. (1992): Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the *Diamondback moth*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 44 (1): 74-81.
60. Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheahet, E. *et al.* (1997): A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (14): 7464-7468.
61. Gunning, R.V., Moores, G.D., Devonshire, A.L. (1998): Insensitive acetylcholinesterase and resistance to organophosphates in australian *Helicoverpa armigera*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 62 (3): 147-151.
62. Charpentier, A., Fournier, D. (2001): Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance, *Pestic. Biochem. Physiol.* 70 (2): 100-107.
63. Huang, C.T., Dauterman, W.C. (1974): Inhibition of fly head acetylcholinesterase by dimethoxon analogs, *Pest. Biochem. Phys.* 4: 249-253.
64. Hart, G.J., O'brien, R.D. (1973): Recording spectrophotometric method for determination of dissociation and phosphorylation constants for the inhibition of acetylcholinesterase by organophosphates in the presence of substrate, *Biochemistry*. 12 (15): 2940-2945.
65. Hansch, C., Leo, A. (1979): "Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology". J. Wiley & Sons, pp 18.



Este trabajo de tesina se terminó de imprimir
el 19 de diciembre de 2008.

Paola Andrea Ortiz

UNLPam