

Tutoriales prácticos de aplicación en Alimentación, Nutrición y Trazabilidad en Acuicultura

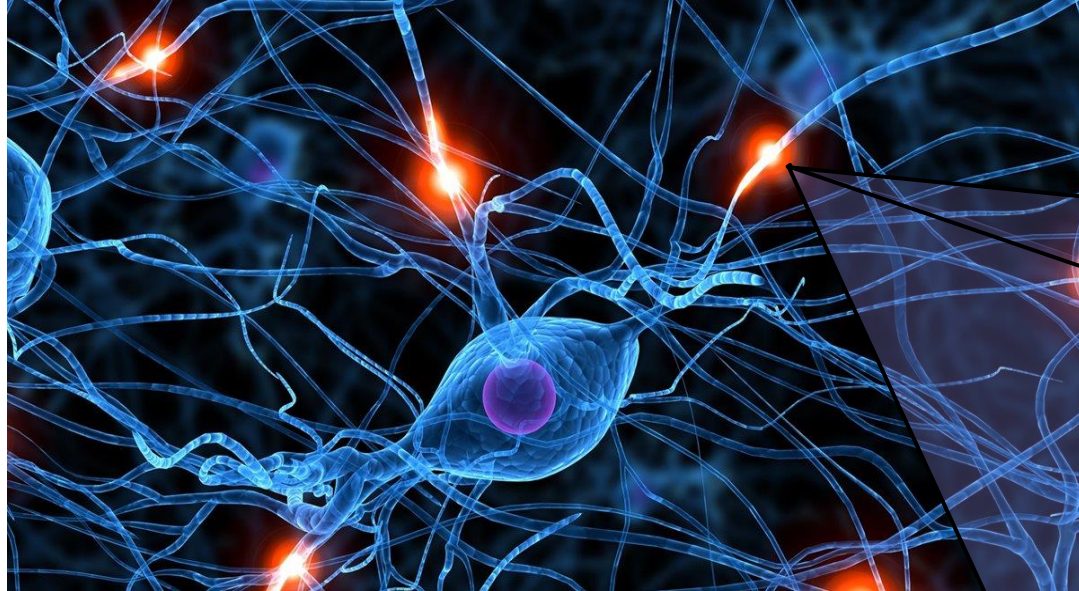
Práctica 2.2. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en el cerebro y músculo esquelético de peces

Efectos de contaminantes ambientales

Objetivo:

La determinación de la actividad de la enzima AChE constituye un biomarcador bioquímico especialmente útil en la evaluación de los efectos tóxicos de plaguicidas, ya sea por su especificidad como por su sensibilidad

Las neuronas se comunican entre sí o con otras células (ej. musculares) a través de sitios especializados, por impulsos electroquímicos.



Sinapsis



**Neurona
Presináptica**

Neurotransmisores

Neurona Postsináptica

Acetilcolina (ACh)

Sinapsis Colinérgicas:

- Uniones **neuromusculares** que involucran fibras musculares esqueléticas.
- Varias conexiones neuronales en el **sistema nervioso central (SNC)**.
- Sinapsis neurona-neurona en el **sistema nervioso periférico (SNP)**.
- Uniones neuromusculares y neuro-glandulares de la división parasimpática del **sistema nervioso autónomo (SNA)**.

Cerebro/Encéfalo



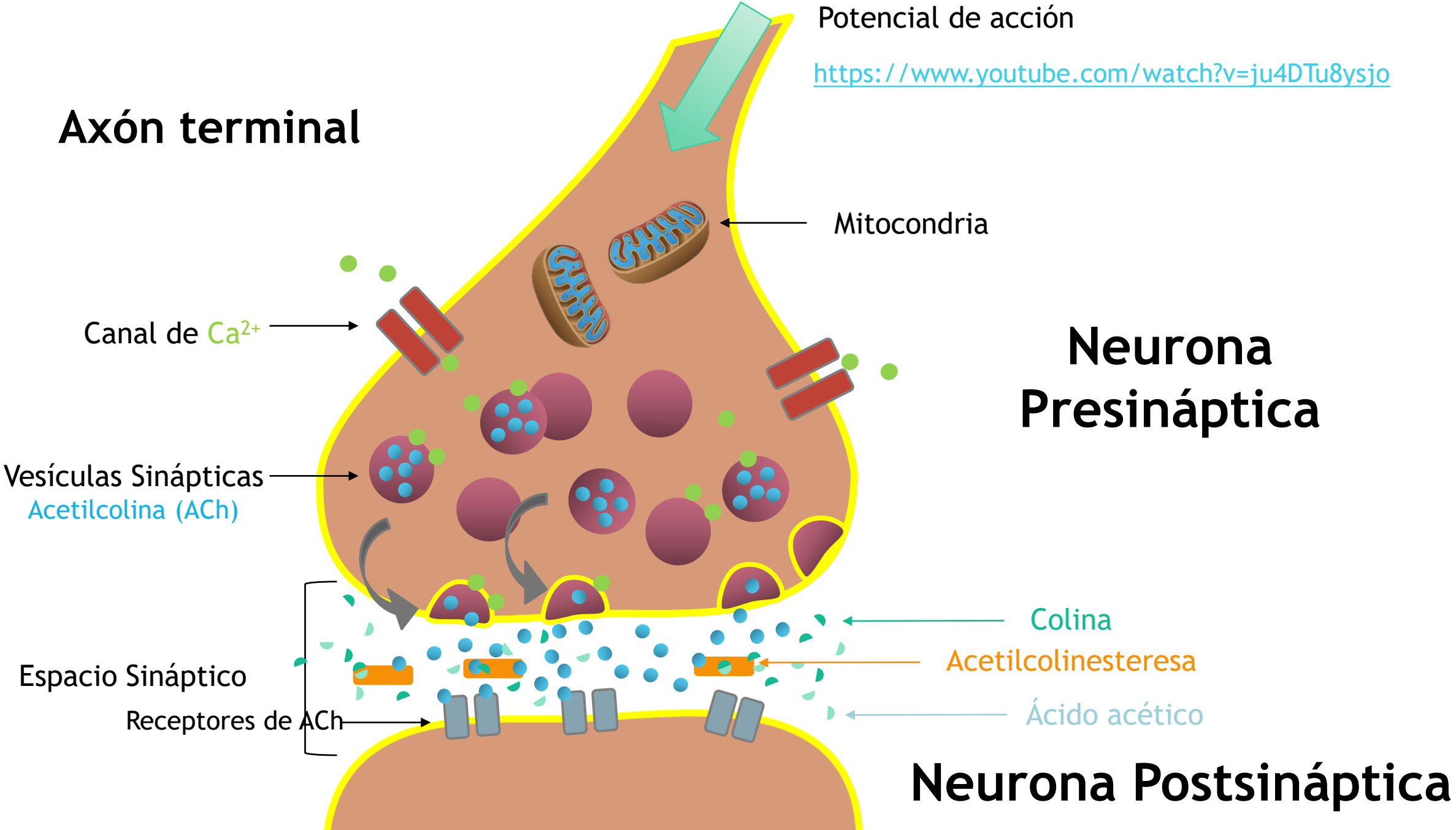
Músculo Esquelético



Potencial de acción

<https://www.youtube.com/watch?v=ju4DTu8ysjo>

Axón terminal



Neurona Presináptica

Neurona Postsináptica

Colina
Acetilcolinesterasa
Ácido acético

Inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE)

Acetilcolina (ACh)



Acetilcolinesterasa

Colina



Ácido acético



Contaminantes

**Insecticidas
organofosforados
Metales pesados**

Acetilcolina (ACh)



Acetilcolinesterasa



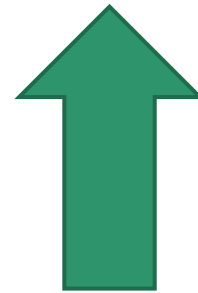
<https://www.youtube.com/watch?v=L4Ry3npshJQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=PNeOEvXt0mU>

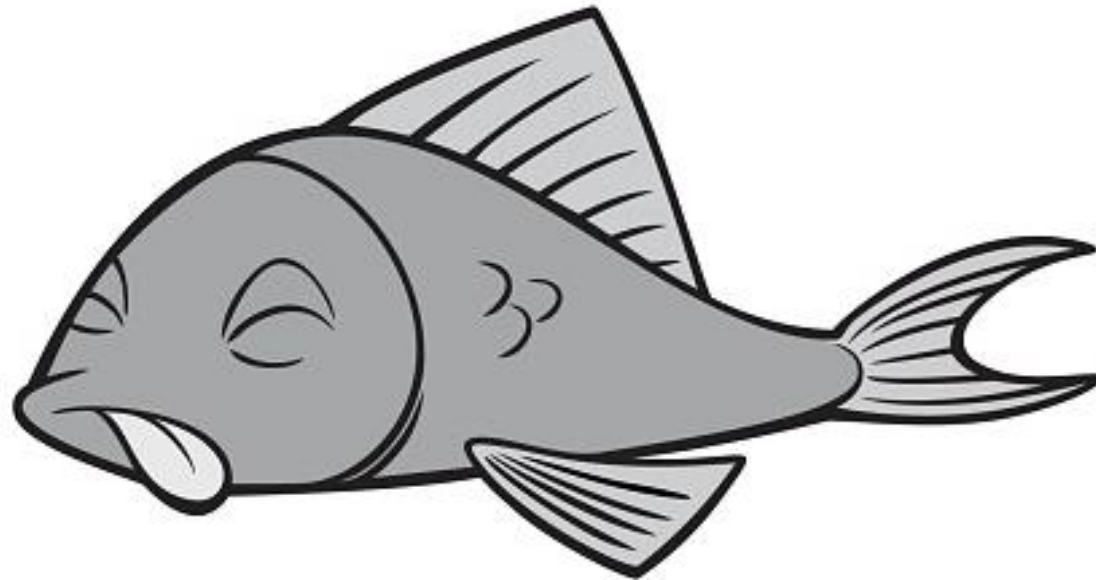
Inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE)



Acumulación de ACh en la
hendidura/espacio
sináptico



Excitación nerviosa
excesiva



Caboso de charco
Mauligobius maderensis (Valenciennes, 1837)



Barriguda
Parablennius parvicornis (Valenciennes, 1836)



Contaminantes

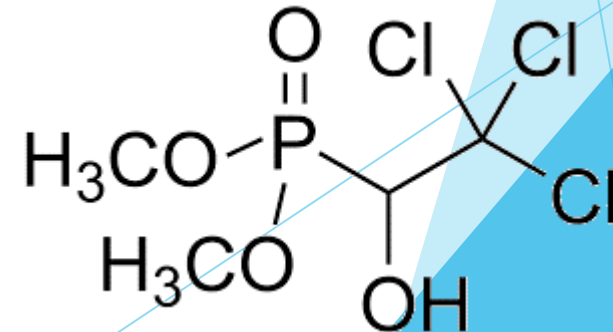
Mercurio (HgCl₂)
(contaminante antropogénico)



Cobre (CuSO₄)
(antifúngico)



Trichlorform (insecticida organofosforado)



La determinación de la **actividad AChE** se medirá siguiendo el método de **Ellman et al. (1961)** (Biochem. Pharmacol. 7: 88-90)

1) Acetil**tiocolina** (**ATC**) → ácido acético + **tiocolina**

2) **tiocolina** + ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (**DTNB**)
→
2-nitrobenzoato-5-mercaptop**tiocolina** + 5-tio-2-nitrobenzoato

Con un máximo de absorbancia a 410 nm



Tampón de homogeneización: TRIS/HCl 0.1 M, Tritón 0.1 %, pH 8. Preparar 50 mL

Tampón de reacción: TRIS 25mM, CaCl₂ 1mM, pH 7.6. Preparar 100 mL

Solución de DTNB 10mM (ácido 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoico)

Solución de ACTI 20 mM (acetiltiocolina ioduro)

Solución de HgCl₂ 5mM y 0.5 mM

Solución de CuSO₄ 5mM y 0.5 mM

Solución de Trichlorfon 50 mM y 5 mM

Pesada y adición del Tampón de Homogeneización



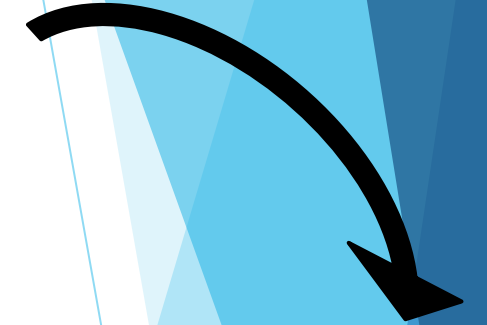
$\frac{0.06 \text{ g cerebro}}{1 \text{ mL Tampón homogeneización}}$ $\frac{0.1 \text{ g músculo}}{1 \text{ mL Tampón homo.}}$

Cerebro Caboso No Stress 291 mg \rightarrow 4.85 mL
:
Músculo Caboso No Stress 450 mg \rightarrow 4.5 mL
:
:

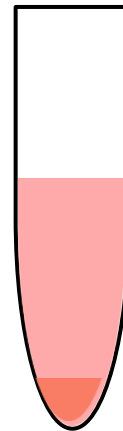


Homogeneización

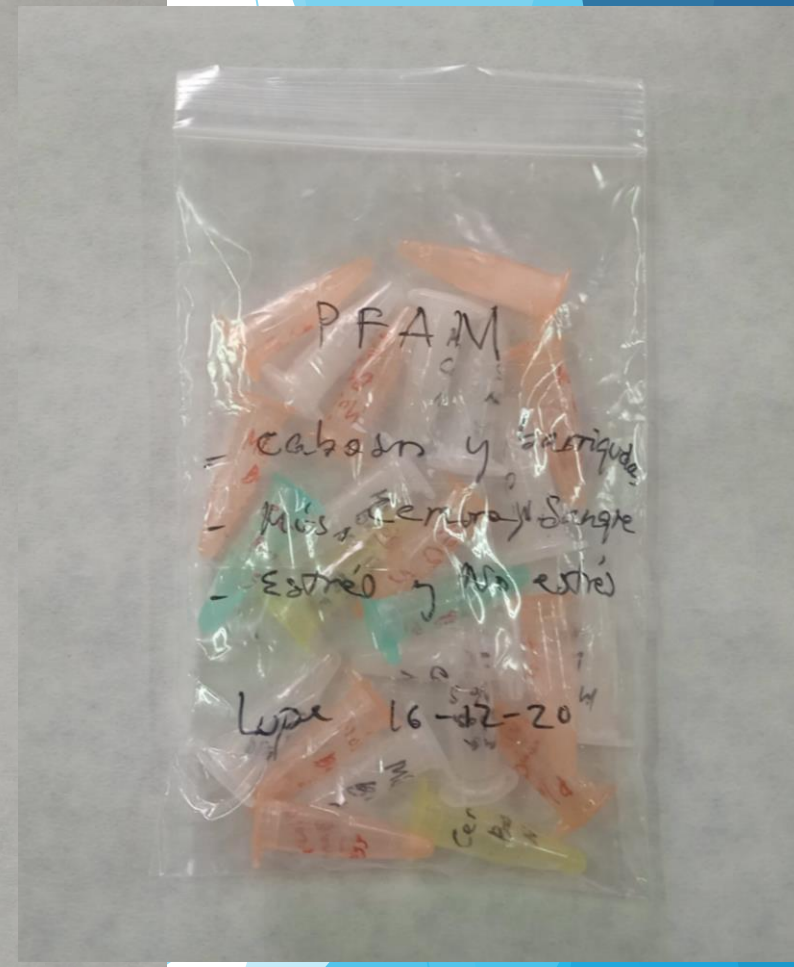
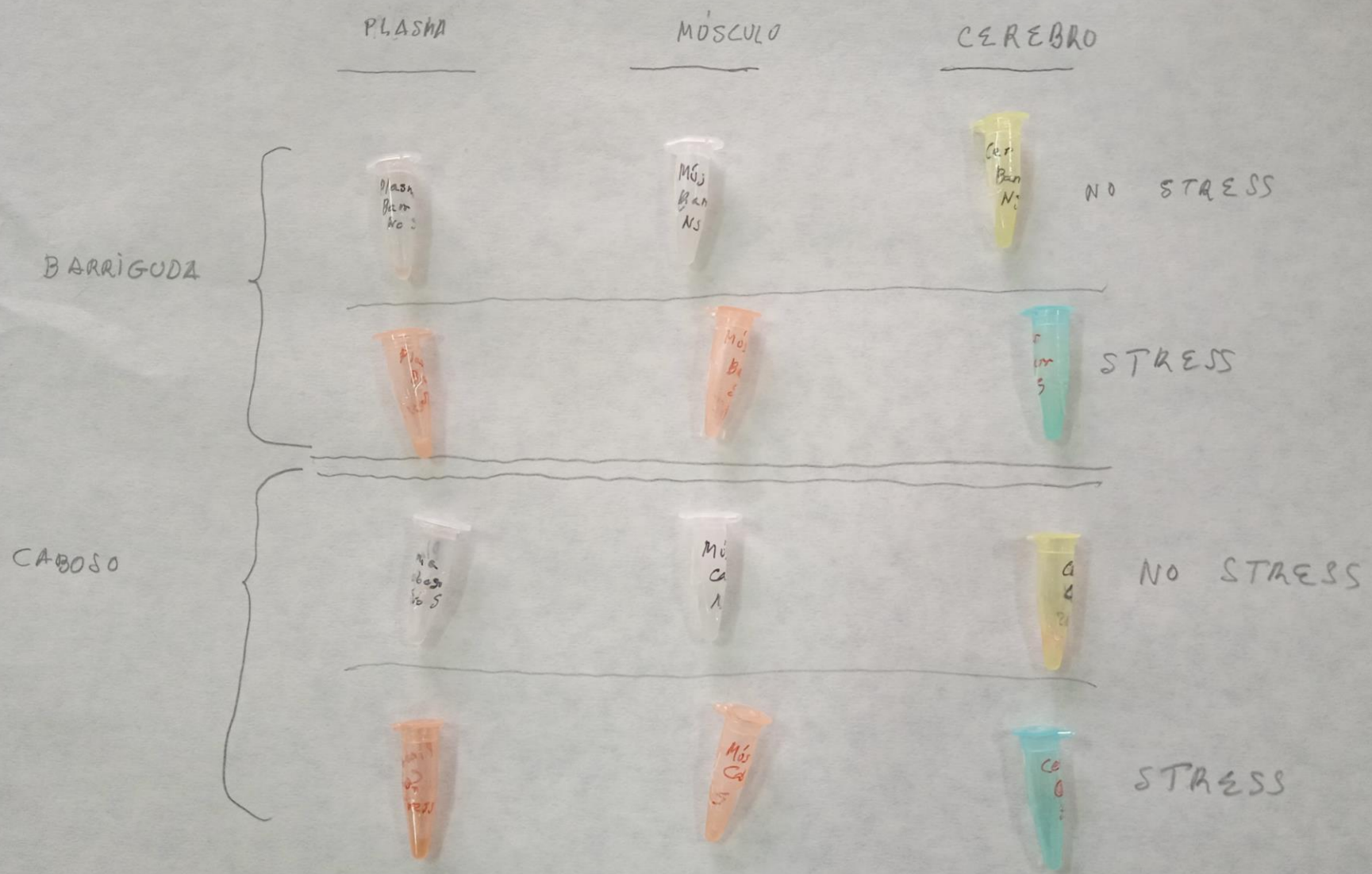
Colocamos los tubos en la centrifuga



Condiciones de la centrifuga



- 80°C



INHIBICIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA

1- INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS.

a) Se diluyen los stocks originales de los contaminantes 10 veces.

Relación de contaminantes:

HgCl₂ 5mM

CuSO₄ 5mM

Trichlorfon 50 mM

HgCl₂ 0.5 mM

CuSO₄ 0.5 mM

Trichlorfon 5 mM

b) Se mezclan 40 µL de tejido (cerebro/músculo) con 10 µL de H₂O ó las 2 disoluciones de contaminante, obteniéndose con cada tipo de muestra un triplete.

¿Cuál es la concentración final del contaminante? Ver ejemplo con Cu



40 μ L tejido + 10 μ L Cu 5 mM

$$5 \text{ mM Cu} \times 10 \mu\text{L} = [\text{Cu}] \times 50 \mu\text{L} ; [\text{Cu}] = 1 \text{ mM Cu}$$



40 μ L tejido + 10 μ L Cu 0.5 mM

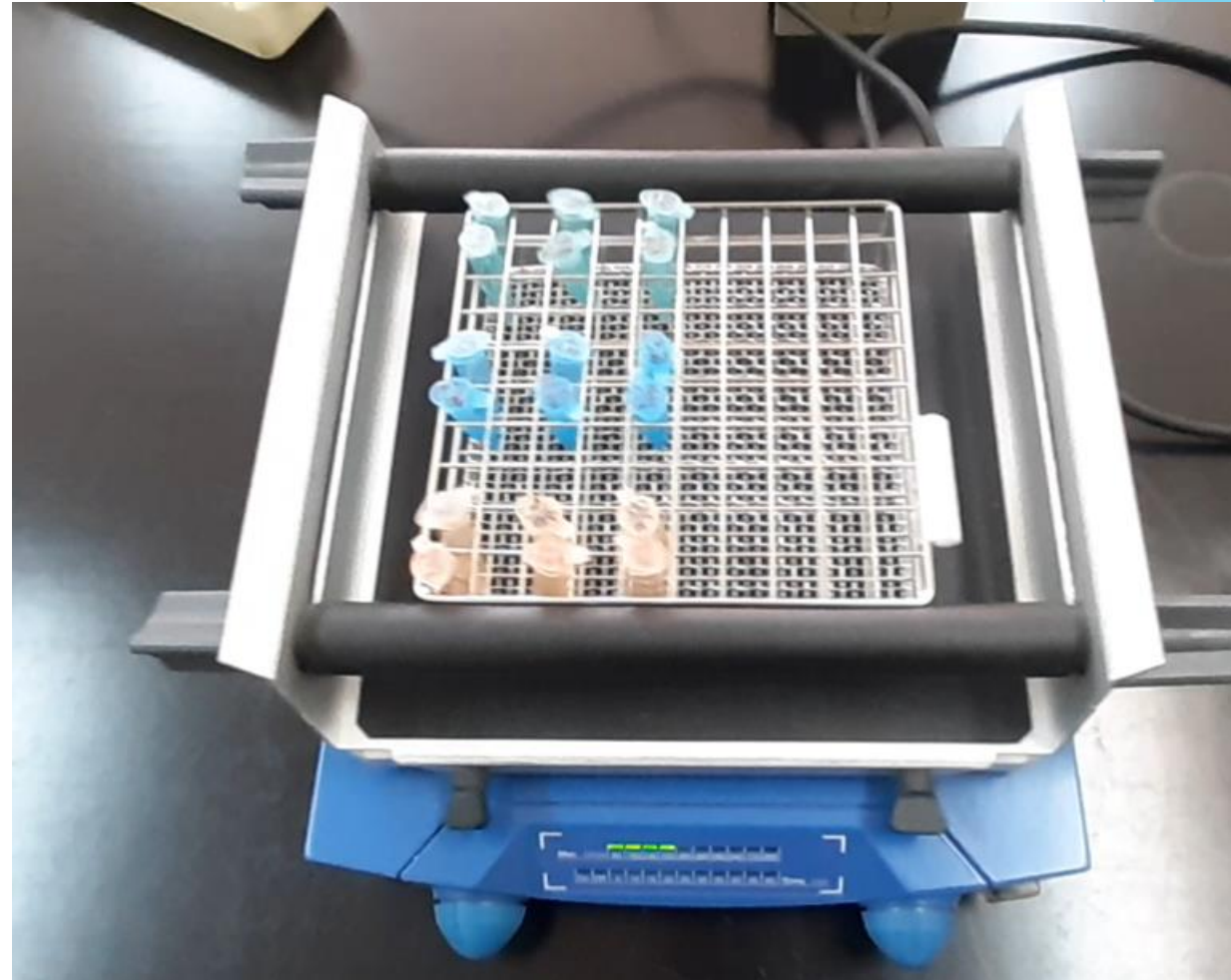
$$0.5 \text{ mM Cu} \times 10 \mu\text{L} = [\text{Cu}] \times 50 \mu\text{L} ; [\text{Cu}] = 0.1 \text{ mM Cu}$$



40 μ L tejido + 10 μ L H₂O

$$0 \text{ mM Cu} \times 10 \mu\text{L} = [\text{Cu}] \times 50 \mu\text{L} ; [\text{Cu}] = 0 \text{ mM Cu}$$

c) Se incuban todas las muestras a temperatura ambiente con agitación durante 10 minutos



2- REACCIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA. La reacción se lleva a cabo en la cubeta espectrofotométrica donde se realizarán las medidas de absorbancia:



1º) Se añade **2,86 mL** de **Tampón de Reacción** (TRIS/CaCl₂)

2º) Se adiciona **100 µL** de **DTNB**

3º) Luego **20 µL** de **ATCI**

4º) Por último se añade **20 µL** de las **incubaciones anteriores.**

5º) Se cubre con parafilm, se agita y se pasa al espectrofotómetro inmediatamente

Se obtiene de cada tipo de muestra un **triple**te de reacciones por **cada contaminante**

1 mM Cu

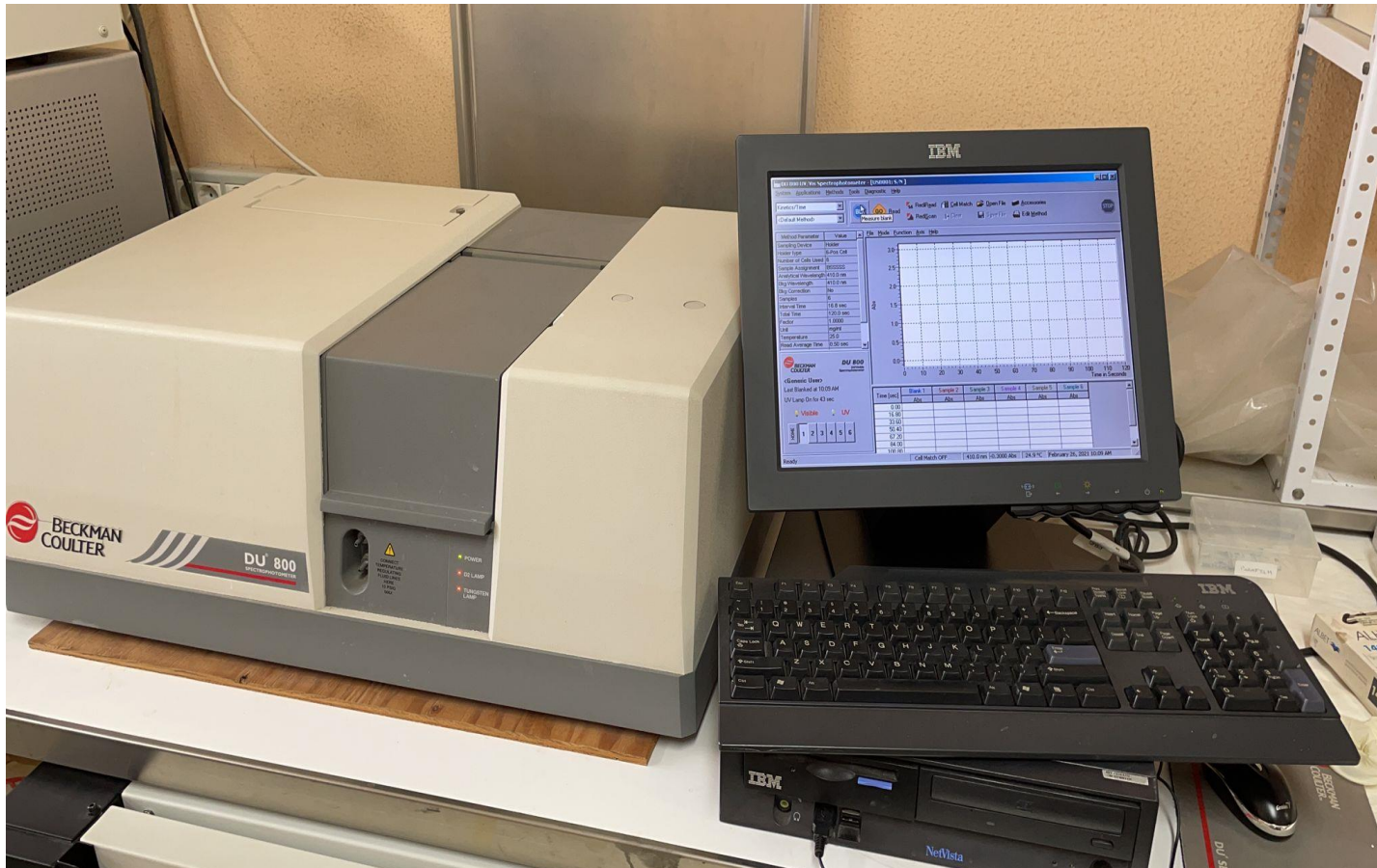
0.1 mM Cu

0 mM Cu

Vemos como ejemplo el de un tejido (cerebro/músculo) con **Cu**

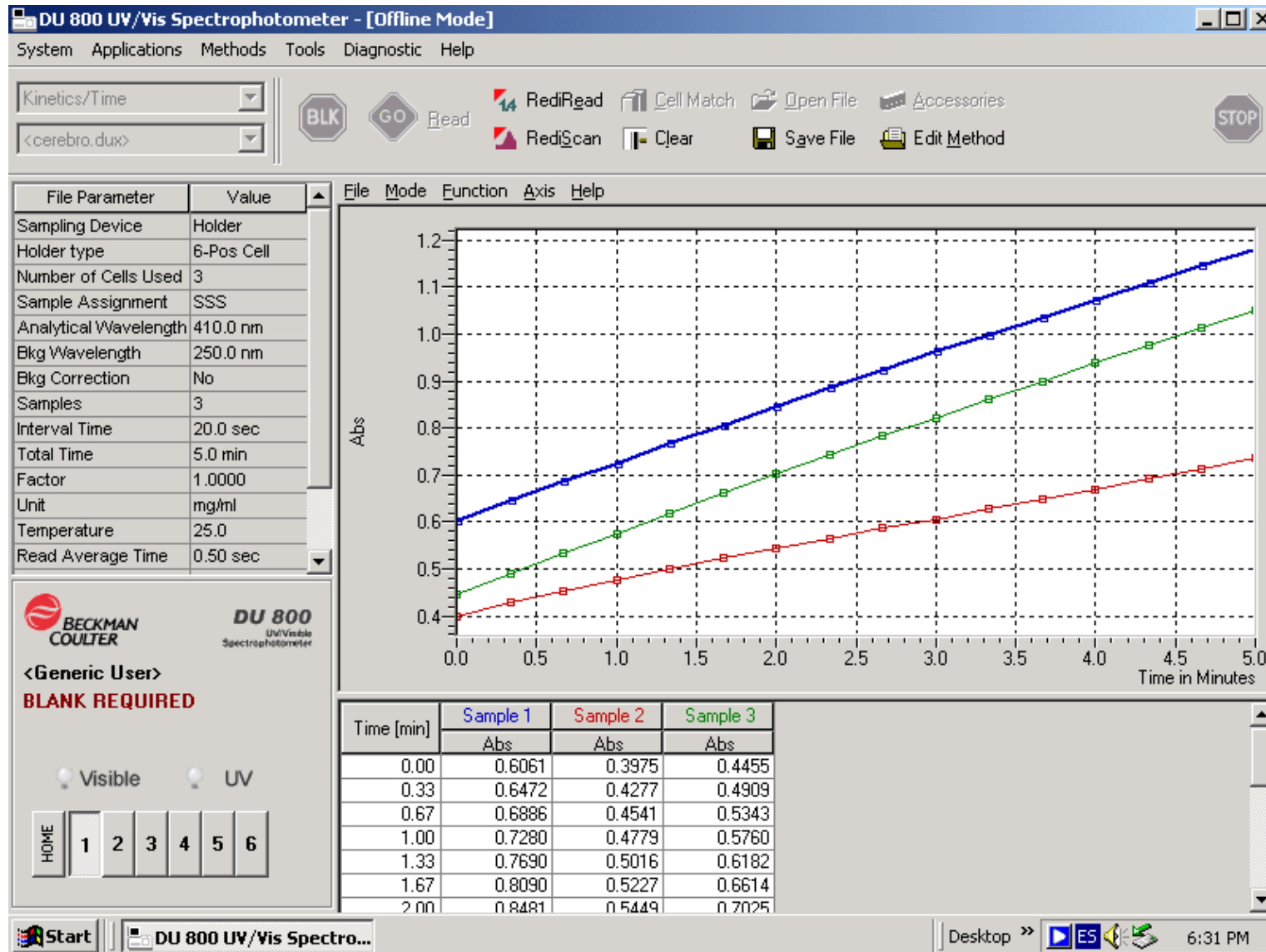


3- LECTURA EN EL ESPECTROFOTÓMETRO - Método cinético a 410 nm y 25°C, haciendo lecturas cada 20 segundos durante 5 minutos. Es muy cómodo ponerlo por tripletes (las 3 diferentes concentraciones de un contaminante sobre el mismo tejido)



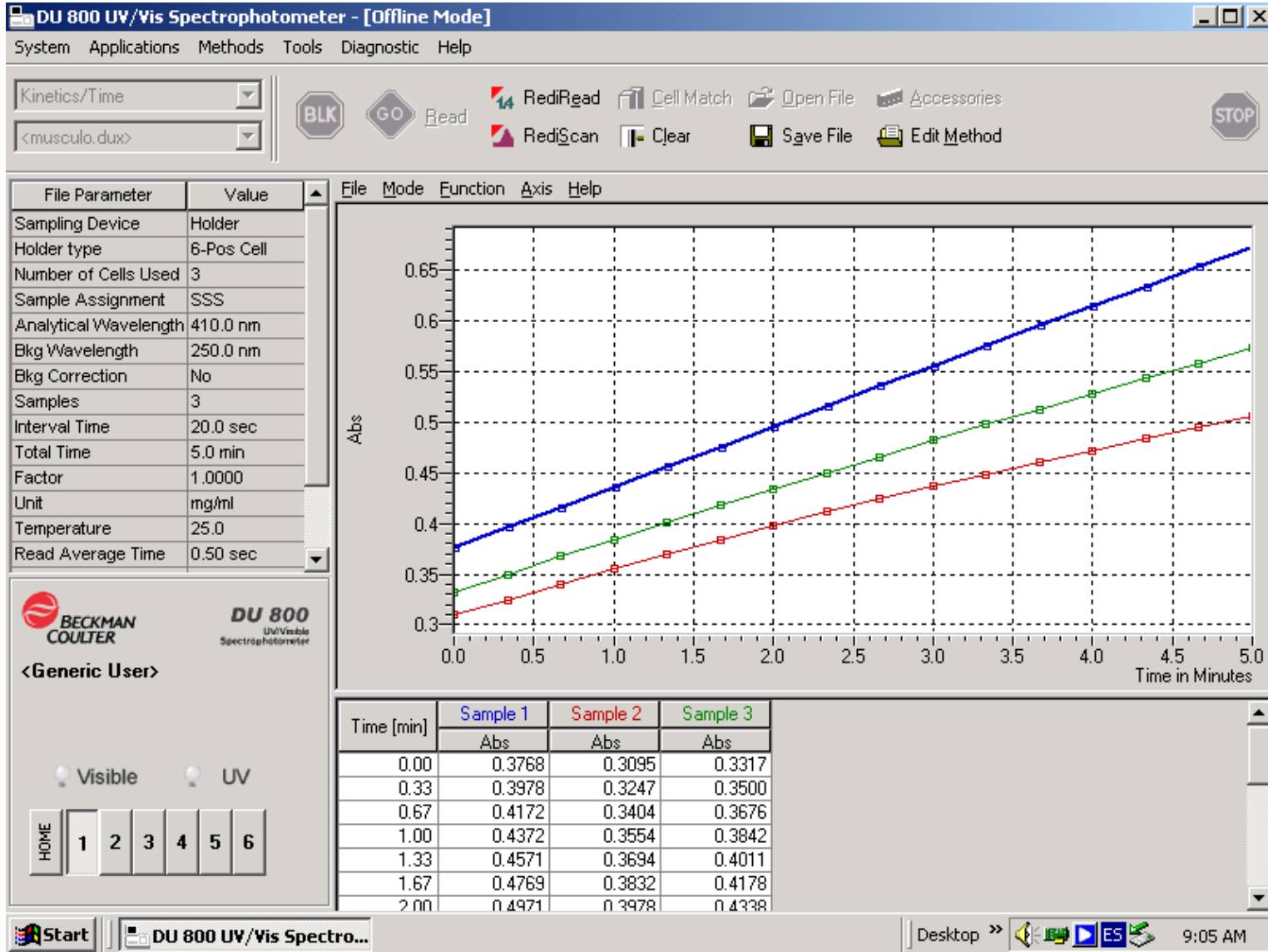
4- DATOS Y RESULTADOS

Cerebro incubado con Cu 0 mM, 0,1 mM y 1 mM



4- DATOS Y RESULTADOS

Músculo incubado con Cu 0 mM, 0,1 mM y 1 mM



4- DATOS Y RESULTADOS

A) La actividad enzimática medida en Absorbancia/min es la pendiente de la recta resultante de representar la Absorbancia frente al tiempo.

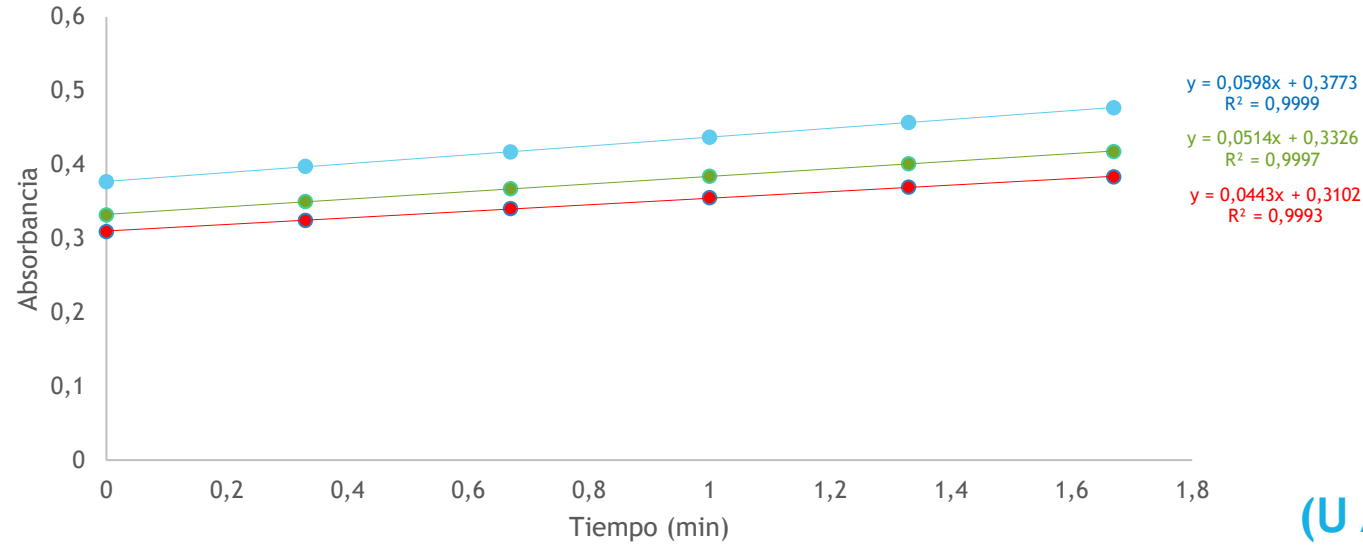
En este ejemplo de homogeneizado de músculo de barriguda, *Parablennius parvicornis*, incubados con Cu a 3 diferentes concentraciones vamos a calcular la actividad enzimática y a deducir qué actividad corresponde con cada grupo de datos o sea, a cada concentración.

Músculo

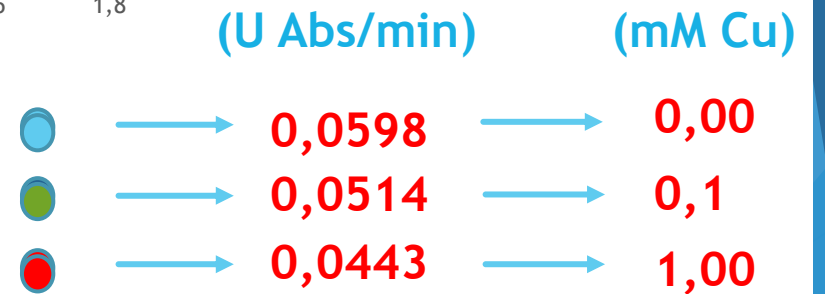
Tiempo	Absorbancia		
0,00	0,3768	0,3095	0,3317
0,33	0,3978	0,3247	0,35
0,67	0,4172	0,3404	0,3676
1,00	0,4372	0,3554	0,3842
1,33	0,4571	0,3694	0,4011
1,67	0,4769	0,3832	0,4178

4- DATOS Y RESULTADOS

músculo incubado con Cu



De estos datos se deduce la actividad enzimática (U Abs/min)



Estas actividades enzimáticas corresponden con las concentraciones lógicas de inhibidor (mM)

Tiempo	Absorbancia		
	0 mM Cu	1 mM Cu	0,1 mM Cu
0,00	0,3768	0,3095	0,3317
0,33	0,3978	0,3247	0,35
0,67	0,4172	0,3404	0,3676
1,00	0,4372	0,3554	0,3842
1,33	0,4571	0,3694	0,4011
1,67	0,4769	0,3832	0,4178

4- DATOS Y RESULTADOS

B) El porcentaje de inhibición que representa una concentración del contaminante en relación a la muestra sin contaminar es:

$$\frac{(a - b)}{a} \times 100$$

siendo **a** - la actividad enzimática sin contaminante

b - la actividad enzimática con contaminante

En nuestro caso de inhibición del músculo de barriguda con diferentes concentraciones de Cu, los porcentajes de inhibición son:

porcentaje de inhibición enzimática (%)

Cu 0 mM	→	0,00
Cu 0,1 mM	→	14,05
Cu 1 mM	→	25,92



Universidad
de La Laguna



Tutorial realizado por:



Dra. Covadonga Rodríguez



Dra. Ana Galindo



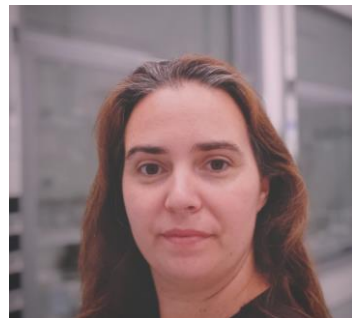
Dr. Manuel Marrero



Dr. José A. Pérez



Dra. Deiene Rodríguez



Dra. Diana B. Reis



Jesús Villora



Nieves G. Acosta

