

# Optimización de ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.)

Alfredo M. Rodríguez<sup>1</sup>, María P. Zunino<sup>1,2</sup> y José S. Dambolena<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (FCEFyN), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)- CONICET, Córdoba, Argentina

Fecha de recepción del manuscrito: 07/04/2017

Fecha de aceptación del manuscrito: 19/12/2017

Fecha de publicación: 15/03/2018

**Resumen**—Los ensayos que miden la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) actualmente son empleados en una amplia variedad de campos que van desde la medicina hasta el manejo integrado de plagas de insectos. De hecho, la mayoría de los insecticidas utilizados en el mundo se basan en inhibidores de esta enzima, como compuestos organofosforados y carbamatos. Los métodos empleados actualmente para testear la capacidad inhibidora de un compuesto se basan en la reacción de Ellman. Sin embargo, estas técnicas no llevan a cabo un seguimiento completo de la reacción en el tiempo, se basan en estimadores poco fiables y suelen requerir experimentos adicionales, como cuantificación de proteínas. Utilizando las ventajas de los nuevos aparatos de espectrofotometría optimizamos una técnica para medir inhibición de la enzima AChE a partir de extractos enzimáticos de *Sitophilus zeamais*, basada en ensayos de microplaca con lecturas en simultáneo a lo largo de toda la reacción. Este avance permitirá realizar este tipo de ensayos de forma más eficiente, rápida y confiable.

**Palabras clave**—Acetilcolinesterasa, insectos, inhibidores, insecticidas, metodología.

**Abstract**—Nowadays Acetylcholinesterase (AChE) essays are a widely used technique in several science fields spanning from medicine, environmental monitoring to plague management. In fact, the vast majority of insecticides used worldwide are based on chemicals, such as organophosphorus compounds and carbamates, with antiAChE activity. All the methods used to test these chemicals as AChE inhibitors derive from the Ellman's reaction. However, these techniques do not assess the effect of inhibitors through time, also measure the enzymatic activity with unreliable estimators and usually require additional experimentation like protein quantification. Using the advantages given by new spectrophotometry technology we optimized a new technique to assess chemicals as AChE inhibitors in enzyme extracts' from *Sitophilus zeamais*, based on microwell essays with simultaneous online lectures over the course of the enzymatic reaction. This will allow to carry out these routine essays in a more efficient, rapid and reliable way.

**Keywords**— Acetylcholinesterase, insects, inhibitors, insecticides, methodology.

## INTRODUCCIÓN

La proteína acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima que juega un papel esencial en el funcionamiento normal del sistema nervioso tanto en el ser humano como en otros vertebrados e invertebrados, incluyendo insectos. Pertenece al grupo de las esterasas, y es capaz de atacar el grupo éster presente en la molécula de acetilcolina (ACh), generando como producto de hidrólisis colina y acetato. Esta molécula actúa como mensajero químico, principalmente en las sinapsis colinérgicas que existen en las uniones entre nervios y músculos, entre nervios y

glándulas, y en las sinapsis entre ciertos nervios en el sistema nervioso central.

La enzima es capaz de inactivar este neurotransmisor lo que restablece la funcionalidad de la terminal postsináptica o del receptor (Pohanka, 2011). Niveles bajos de actividad AChE pueden causar problemas funcionales por sobrestimulación de las uniones colinérgicas, lo que puede conducir a la muerte.

Es de especial interés contar con métodos confiables para medir la actividad AChE en muestras biológicas no solo por su importancia en estudios fisiológicos, sino también en el diseño de drogas y medicamentos para enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Pohanka, 2011); como bioindicador de contaminación con agroquímicos en personas y animales (Bocquené et al., 1990; Tecles y Cerón, 2003); y para el diseño de nuevos productos empleados en el control de plagas (Picollo et al., 2008; Yeom et al., 2012; Herrera et al., 2015b).

Dirección de contacto:

Rodríguez, A. M.; Ayudante de Investigación de la Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales, alumno de las carreras de Ciencias Biológicas e Ingeniería Química de esta unidad académica; Avenida Vélez Sarsfield 1611 Ciudad Universitaria, X5016 CGA.; alfre93.ar@gmail.com

En particular, el estudio de inhibidores de esta enzima es un campo de estudio sumamente importante para el testeo de nuevos compuestos con actividad plaguicida. La mayoría de los principios activos presentes en los pesticidas actuales se basan en la inhibición de esta enzima. Los ejemplos más resonantes corresponden a organofosforados y carbamatos que interfieren o inhiben la actividad de esta enzima principalmente por fosforilación. Como resultado hay una pérdida de actividad AChE de modo que el órgano efector del insecto sufre sobrestimulación. Una vez que una proporción crítica de la masa de la enzima tisular se inactiva se manifiestan síntomas y signos de envenenamiento colinérgico y sobreviene la muerte (Roberts y Reigart, 2013).

A pesar de que estos productos están destinados principalmente al control de plagas de invertebrados, en algunas situaciones, pueden ser nocivos o tóxicos para los seres humanos, de ahí su importancia como bioindicador (Fishel, 2012).

Los procedimientos analíticos desarrollados para la determinación de la actividad AChE *in vitro* más empleados actualmente son del tipo colorimétrico basados en la reacción de Ellman. Este método, que se ha utilizado con éxito para medir actividad AChE en gran cantidad de especies y en diferentes tipos de tejidos, emplea el ácido 5,5'-dithio-*bis*-(2-nitrobenzoico) (DTNB, también llamado Reactivo de Ellman) como sonda para hacer un seguimiento de la reacción catalizada por la enzima AChE, utilizando como sustrato alternativo a la molécula de acetilcolina (ACh) (Ellman et al., 1961).

La hidrólisis de ACh libera tiocolina, una molécula con un grupo -SH libre capaz de reaccionar con el DTNB para dar un producto de sustitución y 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB<sup>2-</sup>) que presenta un pico de absorbancia a 415nm en el rango visible del espectro por lo que es posible hacer un seguimiento de la reacción enzimática midiendo la producción de TNB<sup>2-</sup> mediante espectrofotometría UV/visible (Ellman et al., 1961).

La actividad de la enzima *in vitro* depende de varios factores: el pH y la temperatura a la que ocurre la reacción, el valor de pKa del grupo sulfhidrilo, efectos estéricos y electrostáticos, y particularmente la presencia de inhibidores específicos como insecticidas organofosforados, carbamatos, e incluso ciertos metales pesados y detergentes (Guilhermino et al., 1998). Los inhibidores de AChE pueden presentar las más variadas estructuras y propiedades físico químicas clasificándose en función del sitio de la enzima que afectan (Pohanka, 2011).

En la última década se han desarrollado métodos que emplean esta reacción *in vitro* en combinación con técnicas de cromatografía en capa delgada (TLC) reveladas por autografía y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS) para acetilcolina tetradeuterada (Peng et al., 2017; Su et al., 2017).

Sin embargo, estos nuevos métodos aún presentan inconvenientes, como la presencia de falsos positivos (Su et al., 2017).

Además, los métodos de rutina actualmente empleados para medir la actividad AChE de productos naturales en insectos no se llevan a cabo realizando un seguimiento completo de la reacción enzimática en el tiempo, sino que

más bien determinan la concentración del producto TNB<sup>2-</sup> a un tiempo fijo como estimador de la velocidad de la reacción (e.g. Jukic et al., 2007; Anderson y Coats, 2012; Herrera et al., 2015a,b).

Esta forma de estimar la actividad AChE implica que las variaciones en la calidad de las muestras de enzima pueden hacer variar los resultados obtenidos, por lo que, para poder realizar comparaciones entre mediciones realizadas con distintos extractos enzimáticos esta metodología requiere corregir la actividad en función de la concentración de enzima o, en su defecto, de la concentración de proteínas de la muestra (e.g. Bocquené et al., 1990), por lo que paralelamente se deben realizar ensayos de cuantificación lo que le resta practicidad a los protocolos empleados e introduce mayor error experimental.

En este trabajo se llevaron a cabo una serie de experimentos con el objetivo de poner a punto un nuevo protocolo para la medición de la actividad AChE por el método de Ellman adaptado para ensayos en microplaca de 96 pocillos, según el método propuesto por Herrera et al. (2015a), actualizado y optimizado para mediciones seriadas realizadas en los nuevos espectrofotómetros multimodales que permiten un seguimiento completo de la reacción en el tiempo, junto con la validación de un método estadístico innovador para el análisis de este nuevo tipo de datos (Ellman, et al., 1961; Herrera et al., 2015a,b).

El trabajo está orientado a dar soluciones técnicas a las investigaciones realizadas por el Área de Aromas y Pigmentos del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA) y la Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; realizadas en pos del estudio y el descubrimiento de nuevos compuestos inhibidores de la actividad AChE en el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleóptera: Curculionidae), una plaga primaria que se alimenta de granos sanos de maíz generando pérdidas durante la fase de almacenaje y ensilado (Herrera et al., 2015a,b).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Insectos*

Se utilizaron individuos adultos de *Sitophilus zeamais*, de 2 semanas de edad aproximadamente, de ambos sexos, criados a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa de  $70 \pm 5\%$ , en cámaras de cría, con una dieta a base de granos de maíz enteros libres de insecticida.

### *Compuestos químicos*

El yoduro de acetilcolina (AChI), el ácido 5,5'-dithio-*bis*-(2-nitrobenzoico) (DTNB), el carvacrol y guaiaacol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (Steinheim, Alemania).

### *Extracto enzimático*

Se realizó el extracto enzimático de AChE según Herrera et al. (2015a,b). Brevemente, insectos adultos de *S. zeamais*, previamente lavados y secados, fueron

homogeneizados en Buffer Fosfato 0,1M (pH 7,4) en una concentración de 0,1g/ml de buffer. El material homogeneizado fue centrifugado a 5000 rpm durante 20 min a 0±4°C y se recolectó el sobrenadante. Este extracto enzimático se mantuvo en condiciones de congelamiento a -20°C, y en una bolsa sellada hasta su utilización.

### **Ensayo de actividad AChE**

La solución de cromóforo fue preparada a partir del compuesto DTNB puro y Buffer Fosfato 0.1M (pH 7,4), a una concentración de 4mM. Debido a su fotolabilidad se mantuvo en condiciones de iluminación artificial difusa, y almacenado en un frasco de vidrio opaco recubierto de papel aluminio según lo recomendado por Walmsley et al. (1987).

### **Optimización de la concentración de AThCh**

El compuesto AThChI (en su formato comercial como sales de yodo) funciona como un sustituto del sustrato nativo de la enzima AChE (Ellman et al., 1961).

Al igual que para la molécula de ACh, se ha observado que altas concentraciones de AThCh genera inhibición por sustrato a partir de concentraciones de sustrato de 5mM (Ellman et al., 1961; Tecles et al., 2001).

Además, bajo las condiciones de pH en que se llevan a cabo los ensayos de actividad AChE la molécula de AThCh se hidroliza por un mecanismo no enzimático a una tasa que puede llegar a ser de cuantía (Ellman et al., 1961). La hidrólisis espontánea del sustrato se incrementa de forma considerable cuando su concentración en el medio de reacción supera 1mM (Ellman et al., 1961; Tecles et al. 2001). Es debido a esto que las concentraciones de sustrato más usuales en ensayos de actividad AChE en invertebrados van desde los 3 mM hasta 0,1 mM (e.g. Bocquené et al., 1990; Picollo et al., 2008; Herrera et al., 2015a,b).

Para la determinación de concentración óptima de sustrato se probó el efecto de cuatro (4) diluciones de AThChI en Buffer Fosfato 0.1M (pH 7,4), a concentraciones 5mM, 2,5mM, 1mM y 0,25mM. Las soluciones fueron mantenidas en frascos transparentes bajo condiciones de congelamiento a -20°C hasta su utilización.

En cada pocillo se sembró 140µl de Buffer Fosfato 0.1M (pH 7,4), 20µl de extracto enzimático, 20µl de solución de DTNB y finalmente 20µl de solución de AThChI a las distintas concentraciones a ensayar, para un volumen final de 200µl. Cada ensayo se realizó por triplicado. Además para cada concentración de AThChI ensayada se prepararon dos (2) blancos reemplazando el volumen de enzima por buffer de reacción para cuantificar la hidrólisis no enzimática del sustrato. Adicionalmente se realizaron dos (2) blancos para las reacciones no específicas del cromóforo con otros grupos -SH presentes en el extracto reemplazando el volumen de AThChI por buffer de reacción. La actividad final fue corregida por la sustracción de ambos blancos (Ellman et al., 1961).

### **Determinación del efecto del etanol sobre la actividad AChE**

En la mayoría de los casos los compuestos que se desean ensayar como inhibidores son poco o nada solubles en el medio de reacción debido a su hidrofobicidad. En estos casos se suele inocular el inhibidor en forma de soluciones con solventes anfóteros, usualmente etanol (EtOH) (e.g. Picollo et al., 2008; Lopez y Pascual-Villalobos, 2010; Öztürk 2012; Öztürk et al., 2011; Herrera et al., 2015a).

Sin embargo, el EtOH presenta algunos inconvenientes como solvente principalmente por su volatilidad pero también porque puede actuar como un inhibidor reversible de la actividad AChE a partir de una concentración 12,5% v/v, volviéndose irreversible en concentraciones altas (Cabezas-Herrera et al., 1992).

Esto podría restarle sensibilidad al ensayo por lo que para observar el efecto de la concentración de EtOH en la actividad AChE se realizaron ensayos utilizando la concentración óptima de AThChI definida en el paso anterior adicionando 20 µl de EtOH al medio de reacción a concentración final de 10% (EtOH absoluto), 9,6% (EtOH comercial) y 7% v/v (EtOH al 70%).

Cada tratamiento se realizó por triplicado. La actividad final fue corregida para la hidrólisis no enzimática del sustrato y la actividad no específica del cromóforo de la misma manera que en el apartado anterior. El efecto porcentual del etanol como activador (Act) se calculó comparando la actividad de cada tratamiento ( $r_T$ ) con un control positivo sin el agregado de etanol ( $r_C$ ) según la ec. (1).

$$Act = \left( \frac{r_T}{r_C} - 1 \right) \times 100\% \quad (1)$$

### **Evaluación de las condiciones de almacenamiento del extracto enzimático**

Por cuestiones técnicas es de interés determinar por cuánto tiempo es posible almacenar el extracto enzimático sin que pierda actividad o sufra degradación bajo condiciones de congelamiento.

Utilizando las condiciones óptimas definidas anteriormente se realizaron ensayos para medir la actividad colinesterasa del extracto enzimático preparado en el día (fresco) comparada con el mismo extracto congelado a -20°C durante 25 días.

Cada tratamiento se realizó por triplicado. La actividad final fue corregida para la hidrólisis no enzimática del sustrato y la actividad no específica del cromóforo de la misma manera que en el apartado anterior.

### **Ensayo de inhibición de actividad AChE**

Para constatar que las condiciones experimentales empleadas y el análisis de datos funcionan correctamente se llevaron a cabo sendos ensayos de actividad AChE para evaluar la capacidad inhibidora de los compuestos carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) y guaiacol (*o*-methoxyphenol).

El carvacrol es un monoterpénoide reportado como inhibidor de la actividad AChE (Jukic et al., 2007; Mata et al., 2007; Anderson y Coats, 2012). Las concentraciones de

carvacrol ensayadas fueron 10mM, 5mM, 1mM y 0,5mM, cada una por triplicado.

El guaiacol es un compuesto fenólico aromático natural. Se ensayaron concentraciones de 160mM, 80mM, 40mM, 20mM, 10mM, 5mM, 1mM y 0,5mM. Cada concentración se midió por triplicado. Para testear la robustez del método frente a las variaciones en la cantidad de enzima presente en el extracto enzimático los ensayos con concentraciones 40mM, 20mM, 10mM y 5mM, se repitieron nuevamente por triplicado utilizando tres extractos enzimáticos diferentes preparados independientemente.

Para la realización de ensayos en presencia de inhibidores la mayoría de los protocolos recogidos en la bibliografía llevan a cabo una incubación de la enzima junto a la sustancia potencialmente inhibidora (Picollo *et al.*, 2008; Loizzo *et al.*, 2009; Öztürk *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2015b). En este experimento la enzima fue incubada por al menos 30 minutos en presencia del inhibidor a °T ambiente antes de iniciar la reacción mediante el agregado del sustrato AThChI.

Las actividades medidas se corrigieron para la actividad no específica del cromóforo, la absorbancia del inhibidor y las reacciones de hidrólisis no enzimáticas del sustrato AThChI, mediante blancos construidos a tal fin.

Para cada concentración se calculó el índice de inhibición porcentual (Inh) comparando la actividad del tratamiento ( $r_T$ ) con un control sin solución inhibidora ( $r_C$ ), como muestra la ec. (2).

$$Inh = \left(1 - \frac{r_T}{r_C}\right) \times 100\% \quad (2)$$

El valor de  $IC_{50}$  (concentración a la cual se reduce un 50% la actividad de la enzima) se calculó para las concentraciones utilizando un análisis de regresión Probit.

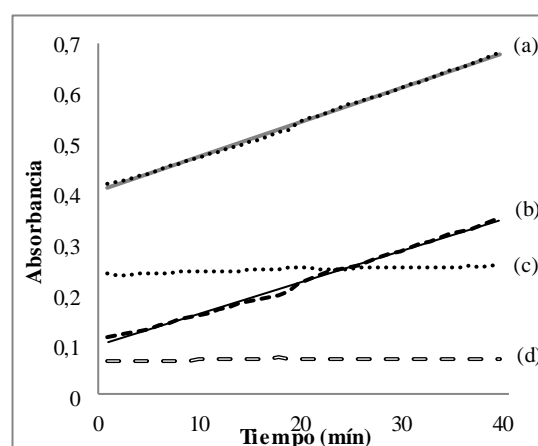
### Lectura y seguimiento de la reacción

La actividad del ensayo colorimétrico se midió utilizando un lector de microplaca Multi-Modal Sinergy 2 de Biotek Instruments, que registra en simultaneo la absorbancia a 415nm de cada pocillo durante 45 minutos a una velocidad de una lectura por minuto, a una temperatura fija de 28°C. De cada ensayo se obtuvieron aproximadamente 50 mediciones de absorbancia a distintos tiempos ( $t_i$ ). En todos los casos la medición se inició inmediatamente después de iniciada la reacción mediante el agregado del sustrato AThChI.

### Análisis de datos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el software Infostat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016).

En cada ensayo se obtiene una serie de mediciones de absorbancia en función del tiempo (Fig. 1). Debido a que las mediciones se realizan en simultáneo para cada



**Fig. 1.** Mediciones obtenidas en un ensayo control de actividad AChE medido por triplicado en simultáneo durante 40 minutos: (a) Absorbancia Media; (b) Absorbancia Corregida; (c) Blanco para la unión no específica del cromóforo; (d) Blanco de la hidrólisis no enzimática del sustrato.

tratamiento se obtiene la absorbancia *media* de los tres ensayos como el promedio de las tres mediciones realizadas a un mismo tiempo  $t_i$ , y así sucesivamente hasta obtener una serie de puntos de absorbancia media.

De la misma manera, la absorbancia media registrada en los blancos a un determinado  $t_i$  se descuentan punto a punto de los blancos, para obtener un único conjunto de valores de absorbancia *corregida* para todos los  $t_i$  del experimento.

La reacción sigue una dinámica lineal prácticamente desde el comienzo tal y como describe Ellman *et al.* (1961). La actividad AChE de cada tratamiento y control se calcula como la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal de las absorbancias corregidas, por el método de mínimos cuadrados, con un valor de significancia  $p < 0,05$ . Este valor es proporcional a la rapidez con que ocurre la reacción, y por ende un mejor estimador de la actividad de la enzima AChE en la muestra.

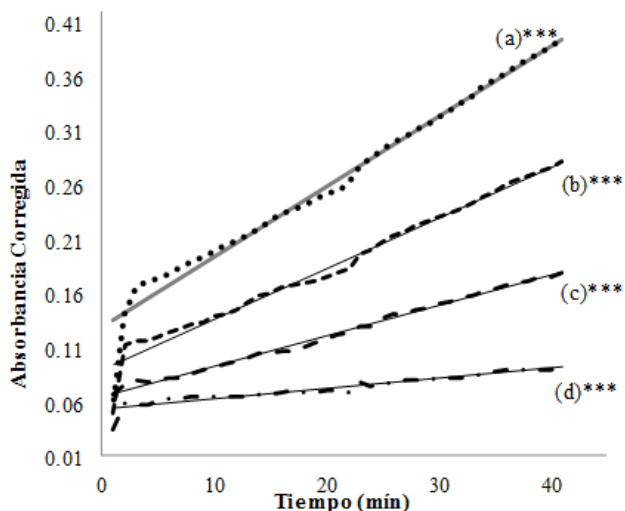
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la concentración de AThCh

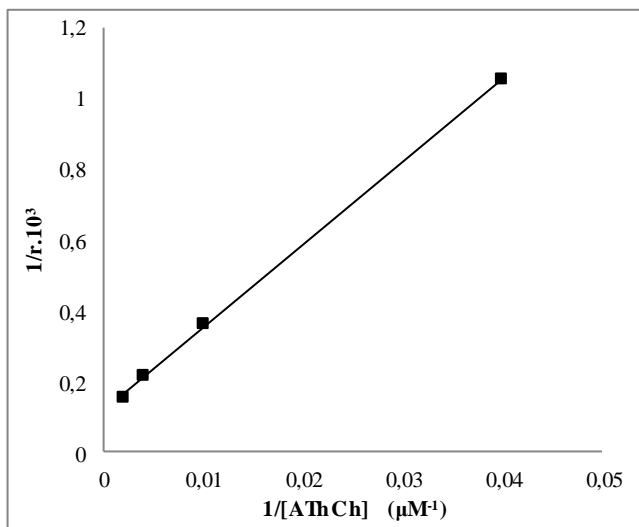
Se observó que la actividad AChE aumenta sistemáticamente a medida que aumentamos la concentración del sustrato de la enzima como se puede ver en la Fig. 2. El aumento de la actividad de la enzima con el aumento de la concentración de sustrato AThCH siguió una dinámica michaeliana (Fig. 3).

Sin embargo, con el aumento de la concentración también se registró un aumento de la hidrólisis no enzimática de la molécula de AThCh en solución. El aumento de la hidrólisis del sustrato fue de  $3,5 \cdot 10^{-5}$  unidades de densidad óptica por  $\mu\text{M}$  de AThCh (Fig. 4 y 5).

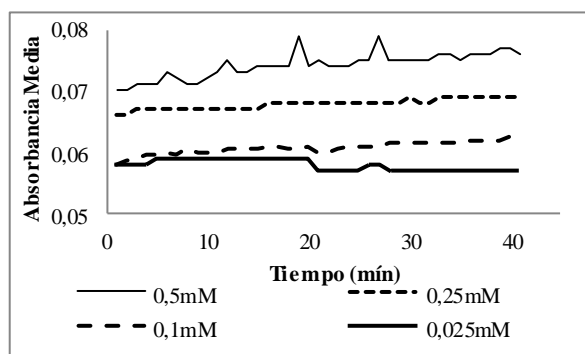
El aumento de la actividad y de la reacción de autohidrólisis del sustrato con la concentración se encuentra en consonancia con lo descrito por Ellman *et al.* (1961).



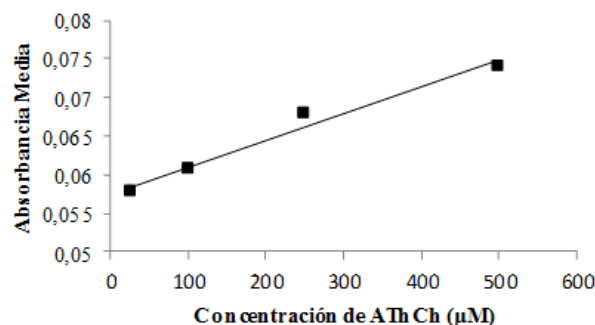
**Fig. 2.** Absorbancia corregida de los distintos ensayos de actividad AChE a distintas concentraciones de AThChI. Sobre cada ensayo se solapa la línea de tendencia obtenida por análisis de regresión lineal, con  $p < 0.0001$  (\*\*\*): (a) 0,5mM,  $r = (6,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ ,  $R^2_{Aj} = 0,9753$ ; (b) 0,25mM,  $r = (4,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ ,  $R^2_{Aj} = 0,9806$ ; (c) 0,1mM,  $r = (2,78 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$ ,  $R^2_{Aj} = 0,9936$ ; (d) 0,025mM,  $r = (0,95 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$ ,  $R^2_{Aj} = 0,8796$ .



**Fig. 3.** Gráfico de doble recíproca. Efecto de la variación de concentración del sustrato, AThCh, sobre la actividad AChE ( $r$ ) para las concentraciones de sustrato 500 $\mu$ M, 250 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 25 $\mu$ M. Modelo lineal ( $p < 0,0001$ ;  $R^2_{aj}=0,9996$ ). Parámetros de Michaelis-Menten:  $r_{m\acute{a}x}=8,63 \cdot 10^{-3}$  (en unidades de densidad óptica por minuto),  $K_M=202,51 \mu$ M.



**Fig. 4.** Efecto de la concentración de AThCh sobre la reacción de autohidrólisis del sustrato.



**Fig. 5.** Aumento de la hidrólisis no enzimática del sustrato en función de la concentración de AThCh medido a los 40 min. El aumento es lineal con  $r=3.5 \cdot 10^{-5} \pm 0.4 \cdot 10^{-5}$ ;  $R^2_{Aj}=0.968$ ;  $p=0.011$ .

La concentración de 0,25mM se consideró como la óptima ya que se consigue un buen nivel de actividad con una baja autohidrólisis del sustrato y un menor consumo de sustrato AThChI.

### Efecto EtOH sobre la actividad AChE

La actividad de los ensayos aumenta con la concentración de EtOH, al principio rápidamente para luego decrecer levemente a la concentración 10% v/v (Fig. 6). En la Tabla 1 se recogen los valores del índice de activación porcentual calculados para las distintas concentraciones.

Este comportamiento parece sugerir que a mayores concentraciones que 10% v/v disminuye el efecto activador del EtOH. Esto concuerda con lo establecido por Cabezas-Herrera et al. (1992), de que el EtOH actuaría como un inhibidor reversible de la actividad enzimática a partir de 12,5% v/v, volviéndose irreversible en concentraciones altas (Cabezas-Herrera et al., 1992).

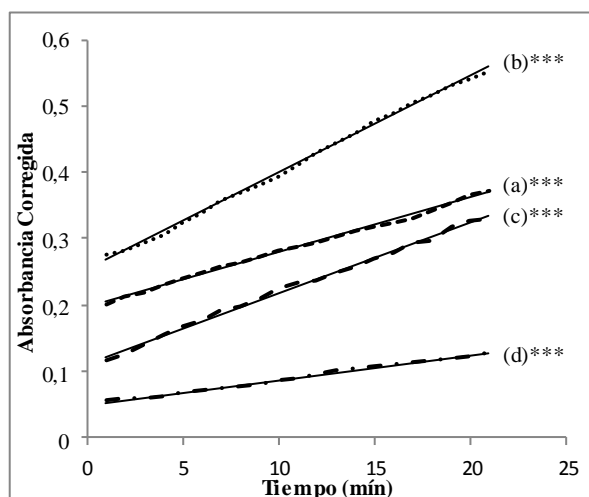
Se recomienda el empleo de concentraciones de 7% y 9,6% v/v para ensayos de inhibición ya que se obtienen buenos niveles de actividad y en la práctica es más sencillo el empleo de alcohol 96% y 70% V/V que EtOH absoluto debido a su volatilidad y disponibilidad.

### Evaluación de las condiciones de almacenamiento del extracto enzimático

Para determinar si existe diferencia significativa entre las distribuciones se realizó un test T con el cual se contrastó la hipótesis de que tanto el extracto fresco como el almacenado durante 25 días a  $-20^\circ\text{C}$  presenten la misma actividad ( $r$ ). Los ensayos se realizaron con una concentración de sustrato AThCh 0,25mM y EtOH 9,6% V/V.

El análisis arrojó un valor no significativo ( $p=0,3206$ ) por lo que no podemos afirmar que la actividad de la muestra fresca sea significativamente diferente de la actividad de los extractos enzimáticos almacenados de *S. zeamais* para ensayos de actividad AChE (Fig. 7).





**Fig. 6.** Efecto de la concentración de EtOH sobre la actividad AChE: (a) EtOH 10%,  $r = (8,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ ,  $R^2_{Aj} = 0,997$ ; (b) EtOH 9,6%,  $r = (14,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ ,  $R^2_{Aj} = 0,998$ ; (c) EtOH 7%,  $r = (10,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ ,  $R^2_{Aj} = 0,996$ ; (d) EtOH 0%,  $r = (3,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ ,  $R^2_{Aj} = 0,994$ . Concentración de sustrato de 0,25mM.

**TABLA 1.** PORCENTAJE DE ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA AChE PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES DE EtOH.

Concentración de EtOH (%V/V)	Actividad	Porcentaje de Activación
10 %	0,0082	74±2 %
9,6 %	0,0146	211±3 %
7 %	0,0107	128±3 %

Este es un resultado que está en consonancia con lo que obtuvieron otros autores para otro tipo de muestras biológicas (Teclès et al., 2002; Eyer y Worek, 2009), según los cuales sería posible prolongar el almacenamiento incluso hasta un mes en condiciones de congelamiento continuo (-20°C).

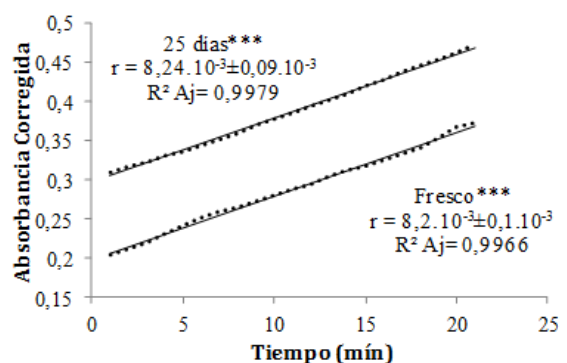
### Ensayo de inhibición de actividad AChE

#### Carvacrol

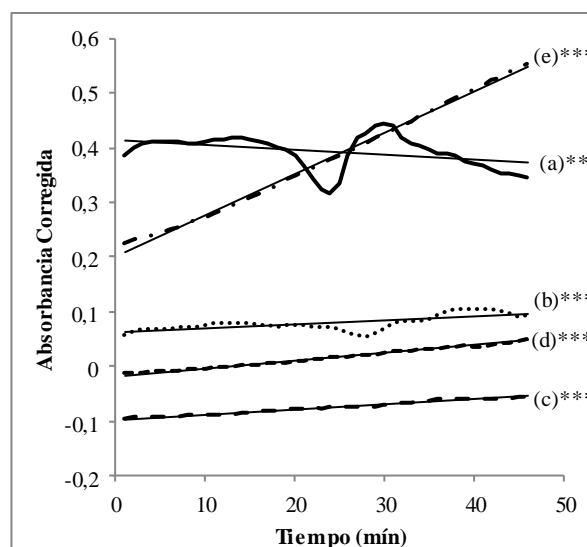
La actividad AChE se vio fuertemente inhibida a todas las concentraciones utilizadas (Fig. 8). Se observó la presencia de turbidez a partir de la concentración 5 mM de Carvacrol lo que aumentó ciertamente los fenómenos de dispersión de la luz y se tradujo en ciertas anomalías observadas en las mediciones de absorbancia.

Los datos obtenidos por el modelo lineal para la concentración 10mM, si bien estadísticamente son significativos ( $p=0,0051$ ), presentan un valor de ajuste muy bajo ( $R^2_{Aj}=0,146$ ). Además la actividad estimada por este modelo resultó en un valor negativo, lo que no tiene sentido en términos de actividad enzimática.

A los fines del modelo se estableció un valor de cero para la actividad enzimática en el ensayo a 10mM para los cálculos del valor de  $IC_{50}$ . Los porcentajes de inhibición calculados para cada concentración se observan en la Tabla 2. El valor de  $IC_{50}$  obtenido por análisis de regresión Probit fue de  $19,4 \pm 0,4 \mu M$  ( $p < 0,0001$ ).



**Fig. 7.** Actividad AChE de dos muestras del mismo extracto enzimático utilizado el día de su extracción (Fresco) y luego de 25 días en condiciones de almacenamiento a -20°C. Concentración de sustrato de 0,25mM.



**Fig. 8.** Efecto de la concentración de Carvacrol sobre la actividad AChE. Se muestran las líneas de tendencias obtenidas por regresión lineal con  $p < 0,0001$  (\*\*\*) excepto la concentración 10mM con  $p = 0,0051$  (\*\*): (a) 10mM,  $r = (-9 \pm 3) \cdot 10^{-4}$ ;  $R^2_{Aj} = 0,146$ ; (b) 5mM,  $r = (7 \pm 1) \cdot 10^{-4}$ ;  $R^2_{Aj} = 0,465$ ; (c) 1mM,  $r = (9,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$ ;  $R^2_{Aj} = 0,977$ ; (d) 0,5mM,  $r = (13,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$ ;  $R^2_{Aj} = 0,995$ ; (e) Control,  $r = (75 \pm 1) \cdot 10^{-4}$ ;  $R^2_{Aj} = 0,997$ . Concentración de sustrato de 0,25mM.

#### Guaiacol

Los experimentos se realizaron en tres etapas correspondientes a los diferentes extractos utilizados. Todos los ensayos tuvieron una dinámica lineal con  $p > 0,0001$  y coeficiente de determinación de entre 94 y 99%. Los valores de inhibición estimados para cada ensayo se muestran en la Tabla 3.

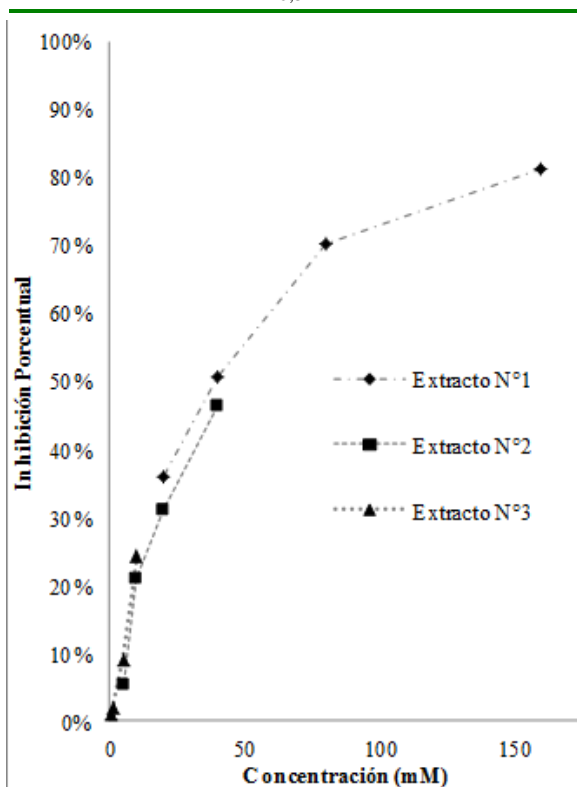
La inhibición de la actividad enzimática en función de la concentración de guaiacol muestra una dosis dependencia evidente (Fig. 9). Más aún, los valores de inhibición calculados a partir de ensayos realizados con diferentes extractos se solapan formando una única curva de respuesta. El valor de  $IC_{50}$  obtenido por análisis de regresión Probit utilizando todos los puntos medidos fue de  $39,30 \pm 0,05 \mu M$  ( $p < 0,0001$ ).

**TABLA 2. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD AChE PARA LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES ENSAYADAS DE CARVACROL.**

Concentración de Carvacrol (mM)	Porcentaje de Inhibición (%)
10	100 %
5	91 %
1	81 %
0,5	88 %

**TABLA 3. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD AChE PARA LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES ENSAYADAS DE GUAIACOL.**

Extracto	Concentración de Guaiacol (mM)	Porcentaje de Inhibición (%)
Extracto N°1	160	81%
	80	70%
	40	51%
	20	36%
Extracto N°2	40	46%
	20	31%
	10	21%
	5	5%
Extracto N°3	10	24%
	5	9%
	1	2%
	0,5	1%



**Fig. 9.** Inhibición porcentual de la actividad AChE en función de la concentración de Guaiacol para los tres extractos ensayados.

## CONCLUSIONES

El método presentado en este trabajo es lo suficientemente flexible como para adaptarse y aplicarse a otros casos, bien para el estudio de insectos o incluso en otro tipo de muestras biológicas bajo otras condiciones experimentales y para un amplio rango de compuestos inhibidores tanto polares como apolares.

Las mediciones realizadas para la capacidad inhibidora del carvacrol se encuentran dentro de los valores esperados lo que nos demuestra que los resultados obtenidos mediante esta técnica son fiables.

El valor de  $IC_{50}$  calculado para el compuesto Carvacrol ( $19,4 \pm 0,4 \mu M$ ) es un orden de magnitud menor que los reportados por otros autores en otros organismos modelos, a saber:  $410 \mu M$  (Jukic et al., 2007);  $770 \mu M$  (Mata et al., 2007);  $224 \mu M$  y  $51 \mu M$  (Anderson y Coats, 2012). Este resultado indicaría que la enzima AChE del insecto *S. zeamais* es especialmente sensible al efecto inhibitor del carvacrol.

Esto resalta la importancia de llevar a cabo estos ensayos utilizando muestras de enzima nativa, a diferencia de otros métodos que emplean muestras de enzima estandarizadas en formato comercial (e.g. AChE de anguila eléctrica, *Electrophorus electricus* L.; AChE eritrocítica bovina) para realizar testeos de compuestos inhibidores (e.g. Jukic et al., 2007; Loizzo et al., 2009; Lopez y Pascual-Villalobos, 2010; Öztürk, 2012).

Los experimentos en Guaiacol sugieren que no es necesario llevar a cabo corrección por cantidad de enzima o proteínas, ya que para diferentes extractos los valores medidos se solapan en una misma curva. Este comportamiento sería el esperado para aquellos inhibidores de tipo competitivo. Se requerirían pruebas adicionales, como determinar la inhibición de la actividad enzimática en extractos con diferentes contenidos de proteínas y la evaluación de la inhibición de la actividad a distintas concentraciones de enzima, para determinar si este es el caso.

Esto puede atribuirse a que la estimación de la actividad se hace a partir de la pendiente de la recta de actividad en función de un control preparado a partir del mismo extracto. En el caso que existiesen variaciones en la cantidad de enzima entre un extracto y otro se verían compensados con un aumento de la actividad en todos los ensayos realizados en un mismo experimento en forma proporcional y no se reflejaría en el valor del Inh%.

El método de seguimiento y estimación de la actividad mediante regresión lineal de la absorbancia corregida es mucho más fiable, práctico, eficiente y reproducible que los protocolos utilizados anteriormente que estimaban la actividad en función de una única medición de absorbancia realizada a un tiempo fijo (e.g. Jukic et al., 2007; Anderson y Coats, 2012; Herrera et al., 2015a,b). Además el hecho de no requerir cuantificación de la enzima ahorra tiempo y recursos por lo que aumenta la practicidad y aplicabilidad, especialmente si se requiere utilizar esta técnica en ensayos de rutina.

Las ventajas de utilizar este nuevo protocolo experimental pueden resumirse en tres puntos fuertes: (1) eficiencia; (2) versatilidad y practicidad; y (3) robustez.

La información obtenida en este trabajo puede utilizarse a su vez para adaptar nuevos protocolos que permitan medir actividad AChE en distintos tipos de muestras biológicas con distintos objetivos.

Se espera que este trabajo sirva para la realización de ensayos y *screenings* de nuevos compuestos inhibidores de la enzima AChE en el gorgojo del maíz y así aporte nueva información para el desarrollo de nuevas tecnologías y técnicas para el control de esta plaga.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Resolución: 203/2014. Código: 05/I787) por el apoyo económico recibido, como así también a las siguientes instituciones FONCyT (PICT 2012-2146) y CONICET (PIP 11220120100661CO).

Al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBiV - CONICET) y al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA – UNC), así como también a la Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales por poner a nuestra disposición las instalaciones para la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS

- Anderson J.A. y Coats J.R. (2012), "Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102: 124–128.
- Bocquené G., Galgani F. y Truquet P. (1990), "Characterization and Assay Conditions for Use of AChE Activity from Several Marine Species in Pollution Monitoring", *Marine Environmental Research*, 30: 75-89.
- Cabezas-Herrera J., Campoy F.J. y Vidal C. (1992), "Differential effects of ethanol on membrana-bound and soluble acetylcholinesterase from sarcoplasm reticulum membranes", *Neurochemistry Research*. 17: 717–722.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. (2016), "InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat", FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Ellman G.L., Courtney K.D., Valentino A. y Featherstone R.M. (1961), "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Eyer P. y Worek F. (2009), "The determination of human erythrocyte acetylcholinesterase (Ery-AChE) in a modified Ellman assay", *Clinical Toxicological Analysis*, pp. 755-774.
- Fishel F. M. (2012), "Pesticidas y Colinesterasa". *Agronomy, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida*. (UF/IFAS), PI242.
- Guilhermino L., Barros P., Silva M.C. y Soares A.M.V.M. (1998), "Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?", *Biomarkers*, 3: 157- 163.
- Herrera J.M., Zunino M.P., Dambolena J.S., Pizzolitto R.P., Gañan N.A., Lucini E.I. y Zygadlo J.A. (2015a), "Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*", *Industrial Crops and Products*, 70: 435–442.
- Herrera J.M., Pizzolitto R.P., Zunino M.P., Dambolena J.S. y Zygadlo J.A. (2015b), "Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize", *Journal of Stored Products Research*, 62 : 74-80.
- Jukic M., Politeo O., Maksimovic M., Milos M. y Milos M. (2007), "In Vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone", *Phytotherapy Research*, 21: 259–261.
- Loizzo M.R., Menichini F., Conforti F., Tundis R., Bonesi M., Saab A.M., Statti G.A., De Cindio B., Houghton P.J., Menichini F. y Frega N.G. (2009), "Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils", *Food Chemistry*, 117:174–180.
- López M.D. y Pascual-Villalobos M.J. (2010), "Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control", *Industrial Crops and Products*, 31 : 284–288.
- Mata A.T., Proença C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F. y Araújo M.E.M. (2007), "Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices", *Food Chemistry*, 103: 778–786.
- Öztürk M. (2012), "Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymra* L.) with identified major terpenes of the essential oil", *Food Chemistry*, 134 : 48–54.
- Öztürk M., Kolak U., Topcu G., Oksuz S. y Choudhary I. (2011), "Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation", *Food Chemistry*, 126: 31–38.
- Peng L., Rong Z., Wang H., Shao B., Kang L., Qi H. y Chen H. (2017), "A novel assay to determine acetylcholinesterase activity: The application potential for screening of drugs against Alzheimer's disease". *Biomed Chromatogr.* 31(10). doi: 10.1002/bmc.3971.
- Piccollo M.I., Toloza A.C., Mougabure Cueto G., Zygadlo, J. y Zerba, E. (2008), "Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids", *Fitoterapia*, 79: 271–278.
- Pohanka M. (2011), "Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology", *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 155 (3): 219-230.
- Roberts J.R. y Reigart J.R. (2013), "Recognition and management of pesticide poisonings". *Environmental Protection Agency (EPA). United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs. Sixth Edition.*
- Su J., Liu H., Guo K., Chen L., Yang M. y Chen Q. (2017), "Research Advances and Detection Methodologies for Microbe-Derived Acetylcholinesterase Inhibitors: A Systemic Review". *Molecules*. 22(1), 176. doi: 10.3390/molecules22010176.
- Tecles F. y Cerón J.J. (2003), "Determinación espectrofotométrica de colinesterasa en sangre entera de animales domésticos: factores pre y analíticos". *Anales de Veterinaria, Murcia* 19: 61-76.
- Tecles F., Gutierrez-Panizo C., Martínez-Subiela S. y Cerón J.J. (2002). "Effects of different variables on whole blood cholinesterase analysis in dogs". *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*. 14:132–139.
- Tecles F., Martínez-Subiela S. y Cerón J.J. (2001), "Influencia de diversas condiciones analíticas en la determinación de colinesterasa en sangre entera mediante el método de Ellman", *Anales de Veterinaria de Murcia*, 17: 67-80.
- Walmsley T.A., Abernethy M.H. y Fitzgerald H.P. (1987), "The effect of daylight on the reaction of thiols with Ellman's DTNB reagent [5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]", *Clinical Chemistry*, 33: 1928-9.
- Yeom H., Kang J.S., Kim G. y Park I. (2012), "Insecticidal and Acetylcholine Esterase Inhibition Activity of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against Adults of German Cockroach (*Blattella germanica*)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7194–7203.