

Tesis de Posgrado

Acción de tóxicos tiolprivos sobre colinesterasa

Castro, José Alberto

1964

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Castro, José Alberto. (1964). Acción de tóxicos tiolprivos sobre colinesterasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1238_Castro.pdf

Cita tipo Chicago:

Castro, José Alberto. "Acción de tóxicos tiolprivos sobre colinesterasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1964.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1238_Castro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

1238

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Acción de tóxicos tiolprivos

sobre colinesterasa

Jose Alberto Castro

1238

Tesis presentada para optar al

Titulo de Doctor en Ciencias Quimicas

Orientación Analítica

Año 1964

UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Padrino de tesis, Dr Fernando Gaudy

INDICE

Introducción	Pág. 1
Parte experimental	4 - 28
Instrumental, drogas empleadas y abreviaturas ..	4 y
Acción de tóxicos sobre ChE de suero humano	6
Reacción de ClAF con aminoácidos	8
Acción de ClAF sobre LDH de músculo de conejo ..	9
Acción de ClAF sobre MDH de corazón de lechón ..	10
Acción de ClAF sobre Enclasa de músculo de conejo	10
Acción de ClAF sobre ICDE de corazón de lechón .	10
Acción de ClAF sobre Fumarasa de corazón de lechón	11
Acción de ClAF sobre GOT de corazón de lechón ..	11
Acción de ClAF sobre Aldolasa de músculo de conejo	11
Acción de ClAF sobre ADE de levadura	12
Acción de ClAF sobre Gliceraldehído de 3-Fosfato DH de músculo de conejo	12
Velocidad de inhibición de ChE de suero humano por ClAF	13
Inhibición de ChE de suero humano por ClAF en medio ácido	14
Velocidad de inhibición de ChE de suero humano por p-cloromercuribenzoico y difenilaminocloro- arsina	14
Variación del % de inhibición con la concentración de ClAF	15
Variación del % de inhibición por ClAF con la con- centración de enzima	15
Variación del % de inhibición por ClAF según el orden de agregado de Ach	16
Variación del % de inhibición por ClAF con la concentración de Ach	16
Efecto de distintos sustratos en la inhibición de ChE por ClAF y Difenilaminocloroarsina	17

.....
.....
.....
.....
.....
.....

2,-

.....
.....
.....
.....
.....
.....

30

INTRODUCCION

En los últimos años se ha incorporado a la toxicología como un elemento indispensable, la enzimología.

Ello se debe a que se ha llegado a la conclusión de que sólo un conocimiento exacto de los mecanismos de acción de los tóxicos sobre los sistemas enzimáticos, permitirá desarrollar medios terapéuticos racionales y adecuados para el tratamiento y prevención de las intoxicaciones.

El fundamento sobre el cual se basa ésta teoría enzimática de la acción tóxica es el siguiente: Todos los procesos vitales están gobernados por reacciones enzimáticas, al decir de Willstätter: "La vida es un armonioso equilibrio de la acción enzimática". Es natural por lo tanto, que cualquier alteración en éste equilibrio sea perjudicial al ser viviente.

La inhibición de una sola enzima, implicada en una cadena metabólica importante, puede volver a toda la cadena inoperante y ello puede provocar profundas y hasta fatales consecuencias para el organismo. Este fenómeno denominado acertadamente por Peters (1) "lesión bioquímica", ha sido y será para la toxicología moderna la piedra fundamental que permitirá conocer el porqué de la acción tóxica de las sustancias.

Ya son varios los tóxicos cuyo mecanismo de acción ha podido ser interpretado como el resultado de una inhibición enzimática. Uno de los mejor conocidos es el ácido cianhídrico, cuya toxicidad se debe a la inhibición de la citocromoxidasa; con lo que se detienen los procesos de oxidación aerobia, sobreviniendo la muerte en pocos minutos.

Otros ejemplos, son la acción tóxica de los insecticidas organofosforados sobre la colinesterasa (2), la de los compuestos arsenicales sobre la piruvatoxidasa y otras enzimas sulfhidrúlicas

(3): la de los fluoracetatos sobre la acetilasa (4;5); las nitrilas de azufre y de nitrógeno sobre la oxalacasa (6); los carbonatos sobre las enzimas respiratorias (7); los anticoagulantes derivados de la cumarina sobre el sistema retróaloinérgico (8) los nitrofenoles sobre la fosforilación oxidativa (9).

No siempre la acción del tóxico es sobre la enzima; puede reducir también acción inhibitoria por supresión de activadores; por destrucción de coenzimas o simplemente por provocar una desorganización celular. A éste último caso pertenece la acción tóxica del tetracloruro de carbono (10) y las radiaciones (11).

Como puede verse ya se conocen varios ejemplos de acción tóxica debida a inhibición enzimática.

En este trabajo se intenta establecer el mecanismo de la acción tóxica local y general de varias sustancias, en especial algunas que poseen acción lacrimatoria. En la actualidad se desconoce el mecanismo de la lacrimación por acción de sustancias tóxicas lacrimógenas y ésta dificultad ya fué mencionada por M. Dixon y E. Webb (12) quienes dicen: "no se sabe por qué sustancias que son venenos de enzimas sulfhidrúlicas dan lugar a una serie de inflamaciones en las fibras nerviosas de la córnea produciendo la lacrimación".

Dado que las glándulas lacrimales responden a la acetilcolina se pensó que una de las posibilidades del mecanismo de acción, era la inhibición de la colinesterasa de la córnea. Pero en éste caso la enzima (por lo menos la de córnea) debería ser fuertemente sulfhidrúlica, puesto que de otro modo los inhibidores de la colinesterasa del tipo órganofosforado tendrían que ser más potentes como agentes lacrimatorios.

Para ver que posibilidad tenia esta hipótesis, se comenzó a estudiar el presunto rol de los grupos sulfhidrúlicos en

af a2 a l. col. in car

7

1

.i

s-

ur

u

PARTS EXPERIMENTAL

INSTRUMENTS

Espectrofotómetro Beckman DU visible-ultravioleta, (e...
mente para celdas termostatizables).-

Analizador automático radiométrico BSA 212

Espectroscopio infrarrojo...

Termostato VEB... modelo N° 10...

Isotermia... (temperatura constante)...

C.-

requisitos.-

REAGENTS

Celulosa de azúcar... (CHE) Sigma
-acetato de etilo (CEA) preparada en... (16)
recristalizada en alcohol-agua, T_F 59°C

Bromacetato de etilo, preparado en el laboratorio, según (16)
 T_F 155°C

Levadura de... (Beringer)

Levadura de levadura (Beringer)

Penicilina, bromuro de xililo, cianuro de amoníaco, difenil-
amino-cloro-urea, etilclorocarsina, de la marca H. St. Ives...
(Alemania), conservadas en ampollas de vidrio neutro, cerradas a
la cámara.

Los anticuerpos empleados fueron de la marca Messer Schueler
(Alemania)

Cloruro de Acetilcolina (AcCh), de E. Siegfried (Suiza)

Cloruro de Benzilcolina (BzCh), de L. Light & Co.

p-toluene-sulfonato de Butirilcolina (BuCh)

Aldolasa de músculo de conejo 5x de Nutritional Biochemicals

Difosfopiridin nucleótido reducido (DPHF)
Trifosfopiridin nucleótido oxidado (TFN)
2-fosfoglicerato sal de bario
Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa de musculo d- conejo
Láctico dehidrogenasa de músculo de conejo (LDH)
Málico dehidrogenasa de corazón de lechón (MDH)
Transaminasa glutámico-oxalacética de corazón de lechón (GOT)
Glicerina 1-fosfato dehidrogenasa de músculo de conejo
Triosa fosfato isomerasa de musculo de conejo
Enolasa de músculo de conejo
Isocítrico dehidrogenasa de corazón de lechón (ICDH)
Fumarasa de corazón de lechón
Alcohol dehidrogenasa de levadura (ADH)
Fructuosa 1-6 difosfato sal sódica, todas fueron de la marca
Boehringer & Sohae (Alemania)
Difosfopiridin nucleótido oxidado (DPN) marca Mann Research Lab.
d-1 isocitrato de sodio, Mann Research Lab.
Etilenglicol-dimetil-éter (EGDE) de la firma Ansul Chemicals Co
(EEUU)
No se mencionan aquí los reactivos más comunes, aunque todos fue-
ron de calidad pro análisis.

ACCION DE TOXICOS SOBRE COLINESTERASA DE SUERO HUMANO

Se estudió el probable efecto inhibitor de diversos tóxicos sobre colinesterasa de suero humano, en especial aquellos tiol-privos.

Los resultados recopilados en la tabla N°1, fueron obtenidos valiéndose del siguiente procedimiento general: se incubó la enzima con el tóxico en una concentración dada, durante el tiempo indicado en cada caso. La fuente enzimática fué suero o plasma heparinizado y también colinesterasa purificada de plasma humano, (Sigma Chemical Co) diluida convenientemente con solución fisiológica.

Posteriormente se determinó la actividad colinesterásica remanente según la técnica colorimétrica (18) en los primeros ensayos y luego titrimétricamente (19) por ser más rápida y exacta. Cada vez se efectuó un ensayo paralelo de actividad sin el tóxico.

Se emplearon soluciones acuosas de los tóxicos solubles en agua, los insolubles o poco solubles se disolvieron en etilenglicol-dimetil-éter. Este solvente fué elegido después de ensayar muchos otros; por ser un poderoso solvente de sustancias orgánicas, miscible con agua, y lo que es muy importante, no destruye la actividad enzimática tan intensamente como otros. En los casos que se usó éste solvente, durante el ensayo de actividad se incluyó la misma cantidad que el que acompañaba al tóxico en el ensayo de inhibición.

Según la tabla N°1 vemos que inhibieron a la colinesterasa de suero humano, en las condiciones empleadas: etildicloroarsina, difenilamino-cloroarsina, etilmercuriotiosalicilato de sodio, p-cloromercuribenzoato, bromuro de xililo, cianuro de bromo bencilo y W-cloroacetofenona.

la inhibieron: ácido monocloroacético, bromoacetofenona, bromoacetato de etilo, azida sódica, ferricianuro de potasio, cianuro de potasio y cloropicrina.

Si observamos la lista de tóxicos que inhibieron a la colinesterasa de suero humano, notaremos que todos ellos poseen común la propiedad de reaccionar con rapidez, con grupos sulfhidrílicos.

Algunos de ellos por formación de mercaptidas (arsenicales y mercuriales) y otros por alquilación.

El comportamiento de la enzima frente a éste grupo de tóxicos, nos hizo suponer que se trataba de una de las denominadas colinesterasas sulfhidrúlicas. Pero sucede que del grupo de tóxicos ensados y que resultaron no inhibidores, varios son también reactivos frente a sulfhidrílicos (ferricianuro, cloropicrina, bromoacetato, bromoacetato de etilo). Esta aparente contradicción se agrega a las ya registradas en bibliografía con respecto al posible comportamiento del grupo sulfhidrilo de la colinesterasa sérica.

ACCION DE LA CLOROACETOFENONA

Para dilucidar el mecanismo de la acción inhibidora de los tóxicos sobre la enzima, se decidió tomar uno de ellos para efectuar un estudio detallado y explicar en lo posible las variaciones halladas y las existentes en bibliografía.

Se seleccionó para ello a la *w*-cloroacetofenona por ser un tóxico de fácil obtención y purificación. Además tiene la ventaja de ser bastante estable a la hidrólisis a pH 7,2 y no interfiere en la técnica titrimétrica. Es además un representante típico de los compuestos con actividad lacrimatoria.

Aunque la *w*-cloroacetofenona ha sido mencionada por algunos autores (12; 20) como un inhibidor específico de enzimas sulfhidrasas no cuenta con un aval bibliográfico abundante como otros tóxicos, por ejemplo el *p*-cloromercuribenzoico, la iodoacetamida y el iodoso benzoico. Por lo tanto se trató de comprobar y reafirmar éste concepto de especificidad completando algunos datos no realizados para este compuesto.

Reacción de la *w*-cloroacetofenona con aminoácidos

Este estudio se efectuó valiéndose de la espectrofotografía en el ultravioleta. Para ello se determinó el espectro de absorción de la *w*-cloroacetofenona y el de los aminoácidos empleados.

La técnica general consistió en mezclar *w*-cloroacetofenona y un aminoácido, ambos en concentraciones de $2,5 \times 10^{-3}$ M, a pH 7.2 y temperatura a 37°C, durante 4 horas. Luego se diluyó convenientemente (según la absorbancia de la mezcla) con buffer fosfato pH 7.2 y se leyó a 250 m μ (máximo de absorción de *w*-cloroacetofenona) y a 220 m μ (longitud de onda a la que la *w*-cloroacetofenona absorbe poco y los aminoácidos absorben más). Idénticamente se siguió con los testigos realizados simultáneamente, uno con la misma cantidad del tóxico y sin aminoácido y el otro con la misma cantidad de aminoácido y sin *w*-cloro-

fenona.

Si el aminoácido presentaba un máximo de absorción característica, también se leyó a esa longitud de onda (ej. tirosina).

Se consideró que no había reacción entre la w-clorcacetofenona y el aminoácido, cuando la lectura de absorbancia a las dos longitudes de onda mencionada, era igual a la de las absorbancias de los dos testigos. Los aminoácidos ensayados fueron: cisteína, histidina, serina, tirosina, lisina, prolina, arginina, ácido glutámico, metionina, glicina, alanina, leucina, isoleucina, fenilalanina, hidroxiprolina, valina, metionina y triptofano. Sólo se pudo observar reacción en el caso de la cisteína, los demás no produjeron variaciones apreciables en estas condiciones.

Mediante la técnica espectrofotométrica mencionada y midiendo la acidez que se libera titrimétricamente se pudo concluir que la reacción w-clorcacetofenona con cisteína es sumamente rápida, casi instantánea.

Estos datos fueron de utilidad cuando se estudió la actividad de la inhibición de la ChE por la w-clorcacetofenona.

Efecto de la clorcacetofenona sobre Lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo de conejo (Boehringer)

Se incubó una dilución de la enzima pura en buffer fosfato pH 7,2 a 37°C con el inhibidor durante 15 minutos, la concentración del mismo fue de $4,4 \times 10^{-3}$ M.- Se efectuó un ensayo simultáneo de actividad con la cantidad equivalente del solvente (EGDE). La técnica de la determinación fue la de Wroblewski Due (21).-

En tres determinaciones realizadas se obtuvieron: 63% y 55% de inhibición.

La incubación de la enzima con p-cloromercuribenzoico a una concentración de $1 \times 10^{-4}M$, produjo 100% de inhibición.-

Ensayo de ClAF sobre Mállico dehidrogenasa (MDH) de corazón de conejo (Boehringer)

El ácido oxalacético necesario para la reacción se generó "in situ" con glutámico oxalacético transaminasa (GOT), ácido aspártico y alfa ceto glutarato, tal cual lo indica (22) se obtuvieron los siguientes % de inhibición: 53%, 53% y 45% respectivamente en 3 determinaciones sucesivas. La concentración de tóxico era de $4,4 \times 10^{-3}M$.

Empleando p-mercuribenzoico $10^{-4}M$ se obtuvo 100% de inhibición (incluyendo GOT en la determinación)

Ensayo de ClAF sobre Enolasa de músculo de conejo (Boehringer)

Se incubó la enzima con el tóxico (conc. $4,4 \times 10^{-3}M$) en buffer glicina pH 7,4 durante 15 minutos a 25°C, luego se controló con la técnica de Bücher (23). No se observó inhibición de la enzima en repetidas determinaciones.

Si se procede del mismo modo pero empleando p-cloromercuribenzoico se obtiene inhibición enzimática. Para concentración de $0,05 \times 10^{-4}M$ se observó 41,7% de inhibición; concentraciones de $1 \times 10^{-4}M$ se observó 63,2% de inhibición, concentraciones de $25 \times 10^{-4}M$ se observó 73,6% de inhibición.

Ensayo de ClAF sobre Isocítrico dehidrogenasa (ICDH) de corazón de conejo (Boehringer)

Incubando diluciones de ICDH en buffer de Tris pH 7,5 con el tóxico, (conc. $4,4 \times 10^{-3}M$) durante 5 minutos a temperatura de 25°C, se obtuvo 69% de inhibición.

Se empleó en la determinación la técnica de Wolfson y Mans-Ashman (24).

Con difenilaminocloroarsina en conc. $1 \times 10^{-3}M$ en lugar de ClAF, se produjo un 15% de inhibición.

Acción de ClAF sobre Fumarasa de corazón de lechón (Boehringer)

La enzima tratada con ClAF en concentración de $4,4 \times 10^{-3}M$ durante 5 minutos a 25°C y pH 7,2, no se inhibió.

Intentos de inhibirla con difenilaminocloroarsina fueron infructuosos. Se ensayaron concentraciones de hasta $1 \times 10^{-3}M$ en 10 minutos de incubación a 30°C.

Las determinaciones se efectuaron según Massey (25)

Acción de ClAF sobre Transaminasa Glutámico Oxalacética de corazón de lechón (Boehringer)

Tratando diluciones de la enzima en buffer fosfato pH 7,4 con ClAF (conc. $2,2 \times 10^{-3}M$) durante 15 minutos a 37°C y realizando simultáneamente un ensayo de actividad sin el tóxico pero con la cantidad correspondiente de EGDE; no se obtuvo inhibición.

Se empleó la técnica de Reitman y Frankel (26), para la determinación de actividad.

Como ClAF producía coloración por formación de la 2-4-dinitrofenilhidrazona correspondiente, el blanco colorimétrico contenía también ClAF en el ensayo de inhibición.

Acción de ClAF sobre Aldolasa de músculo de conejo (NBCo)

Tratando a la aldolasa de músculo de conejo con ClAF $4,4 \times 10^{-3}M$ en un medio de buffer colidina pH 7,4 durante 15 minutos a 37°C; no se obtuvo inhibición.

Las determinaciones de actividad se efectuaron según Bruns (27) de acuerdo con el Boletín Técnico de la casa Boehringer para la técnica en el UV.

Se efectuaron además ensayos en idénticas condiciones empleando: difenilaminocloroarsina en concentración $1 \times 10^{-3}M$,

etilmaleimida $1 \times 10^{-3}M$ y p-cloromercuribenzoico $0,5 \times 10^{-3}M$.

En el primer caso se obtuvo un 19% de inhibición, en el segundo no hubo inhibición y en el tercero el % de inhibición fue el 90%.

Acción de ClAF sobre la Alcohol dehidrogenasa (ADH) de levadura (Boehringer)

Por tratamiento de diluciones de la enzima pura, en buffer pirofosfato pH 8,5 con ClAF en concentración $4,4 \times 10^{-5}M$ durante 5 minutos a $25^{\circ}C$, se obtuvo un 100% de la actividad enzimática inhibida. La técnica empleada para determinar la actividad fue la de Racker (28) en cada caso se hizo el ensayo de actividad con ClAF pero con la cantidad correspondiente de EGDE.

En otro ensayo donde la concentración de ClAF fue de $4 \times 10^{-4}M$ se produjo un 56.2% de inhibición.

Acción de ClAF sobre la Gliceraldehido-3-fosfato Dehidrogenasa de músculo de conejo (Boehringer)

Se incubaron diluciones de la enzima en buffer pirofosfato $0,03M$ pH 8,4 con ClAF en concentración $4,4 \times 10^{-5}M$, durante 5 minutos a $25^{\circ}C$. Se efectuó paralelamente un ensayo sin inhibidor y con la cantidad correspondiente de EGDE. La técnica seguida para determinar la actividad de la enzima fue la de Velick (29).

Se obtuvo para esa concentración de ClAF, 30% de inhibición de la actividad enzimática.

Acción de Cl.F sobre las fibrinas (Lehringer)

Se trató a la enzima con Cl.F a una concentración de $1,5 \times 10^{-3}$ M durante 5 minutos a pH 7.5 y t 30°C.

Después se continuó con la detección de actividad según (75). No se observó inhibición alguna en estas

Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía

(76)

Acción de Cl.F sobre la Histoquinasa de levadura (Lehringer)

Incubando diluciones apropiadas de la enzima con Cl.F a pH 7.5 y t 25°C durante 5 minutos, se obtuvieron los siguientes resultados: para Cl.F $1,5 \times 10^{-3}$ M 0% de inhibición; para Cl.F $3,0 \times 10^{-3}$ M, 27,5% de inhibición; para Cl.F $6,0 \times 10^{-3}$ M, 65% de inhibición.

La actividad se midió en las condiciones recomendadas por Berr y H. y Colwick S (1957) el sustrato que se liberada se midió titrificamente, a pH 7,5, t 25°C.

Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía

(77)

Velocidad de inhibición de la ChE de suero humano por ClAF

El estudio de la velocidad de inhibición de la ChE de suero humano por ClAF, se efectuó de dos modos distintos. El primero se realizó utilizando la técnica colorimétrica anteriormente mencionada (18); pH 7,2 a 37°C, concentración de ClAF durante la inhibición $4,6 \times 10^{-3}M$ y deteniendo la reacción de inhibición a los 5 minutos, 10 minutos y 20 minutos con cisteína (concentración final $2,5 \times 10^{-2}M$).

Esta destruye inmediatamente el exceso de ClAF (ver experiencia anterior) especialmente si se tiene en cuenta que la concentración de ClAF después de agregar la cisteína fué de $2,3 \times 10^{-3}M$, o sea que la relación cisteína-ClAF era 10:1.

Después de agregar la cisteína se dejó unos 5-10 minutos a 37°C y finalmente se siguió con la técnica mencionada. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

duración de inhibición	% inhibición
5 min	31.0
10 min	28.8
20 min	29.8

Como puede verse, a partir de los 5 minutos la inhibición no varía. Con respecto a comprobar que sucede a tiempos menores, se puede afirmar que esta técnica no permite verificarlo por requerir mucho tiempo las manipulaciones previas.

Posteriormente pudo resolverse el problema valiéndose de la técnica titrigráfica, con la cuál pudo probarse que la reacción que conduce a la inhibición es prácticamente instantánea. Además que en presencia de un gran exceso de sustrato (Ach 0,08M) la pendiente de actividad remanente de la determinación de inhibición se mantiene constante durante casi una hora.

Actividad a tiempo 0 min = 0,0099 ml de NaOH 0,01N/min x 0,2 ml de suero; actividad final a tiempo 53 minutos = 0,0096 ml de NaOH 0,01N/min x 0,2 ml de suero)

Inhibición de la ChE de suero humano por ClAF en medio ácido

Pudo comprobarse que la inhibición también se verificaba en medio ácido (pH 5,58) (100% inh. para ClAF $2,2 \times 10^{-3}M$).

La reacción que conduce a la inhibición es sumamente rápida, prácticamente instantánea y se produce igualmente aunque se añada al sistema la Ach antes que el inhibidor, con respecto al suero.

Intentos de trabajar a pH más bajo aún (pH 4,5) no produjeron resultados netos, debido a que se observaba una intensa desnaturalización (aún agregando el sustrato antes), agravada por la presencia de solvente.

Algunas determinaciones efectuadas a pH 5,0 (conc. Ach $10^{-1}M$; concentración ClAF $1,1 \times 10^{-3}M$) produjeron en un caso 86% de inhibición y en otro 42,5%. Esta falta de reproductibilidad se debe a los fenómenos de desnaturalización que ocurren.

Pero de todos modos es importante el hecho de haber podido comprobar, que existe una marcada inhibición a éste pH y que esta es rápida (aproximadamente 1 minuto en completarse)

Estos resultados están de acuerdo con la presunción de que ClAF reacciona sobre un sulfhidrilo.

Velocidad de inhibición de la ChE de suero humano por p-cloromercuribenzoato y difenilaminocloroarsina

Tratando de dar apoyo a la suposición de que la reacción de ClAF en ChE es sobre un grupo sulfhidrilo de la misma, pareció interesante estudiar el comportamiento del p-cloromercuribenzoico y de la difenilaminocloroarsina en iguales circunstancias

El primero se eligió por su conocida y bien documentada aptitud para actuar específicamente sobre grupos sulfhidrilos y el segundo por pertenecer al grupo de los arsenicales orgánicos, los cuales han sido considerados por varios autores como los reactivos para sulfhidrilos más específicos. Además posee un gran factor estérico. (Más adelante veremos que esto es sumamente importante en éste caso)

El comportamiento de estos dos tóxicos fué completamente similar al de ClAF en el sentido de que la inhibición era prácticamente instantánea, independientemente del hecho de que el sustrato se hallara antes que el tóxico en contacto con la enzima.

Estos resultados están de acuerdo con la suposición de que el grupo reaccionante de la enzima es un sulfhidrilo.

Variación de la inhibición con la concentración de ClAF

Se hizo la experiencia poniendo en contacto el tóxico con el suero en las concentraciones que pueden observarse en la figura N° 2 y luego de dejar incubar 5 minutos, se añadió Ach hasta obtener una concentración final 0,1M. Los resultados pueden verse en la misma figura.

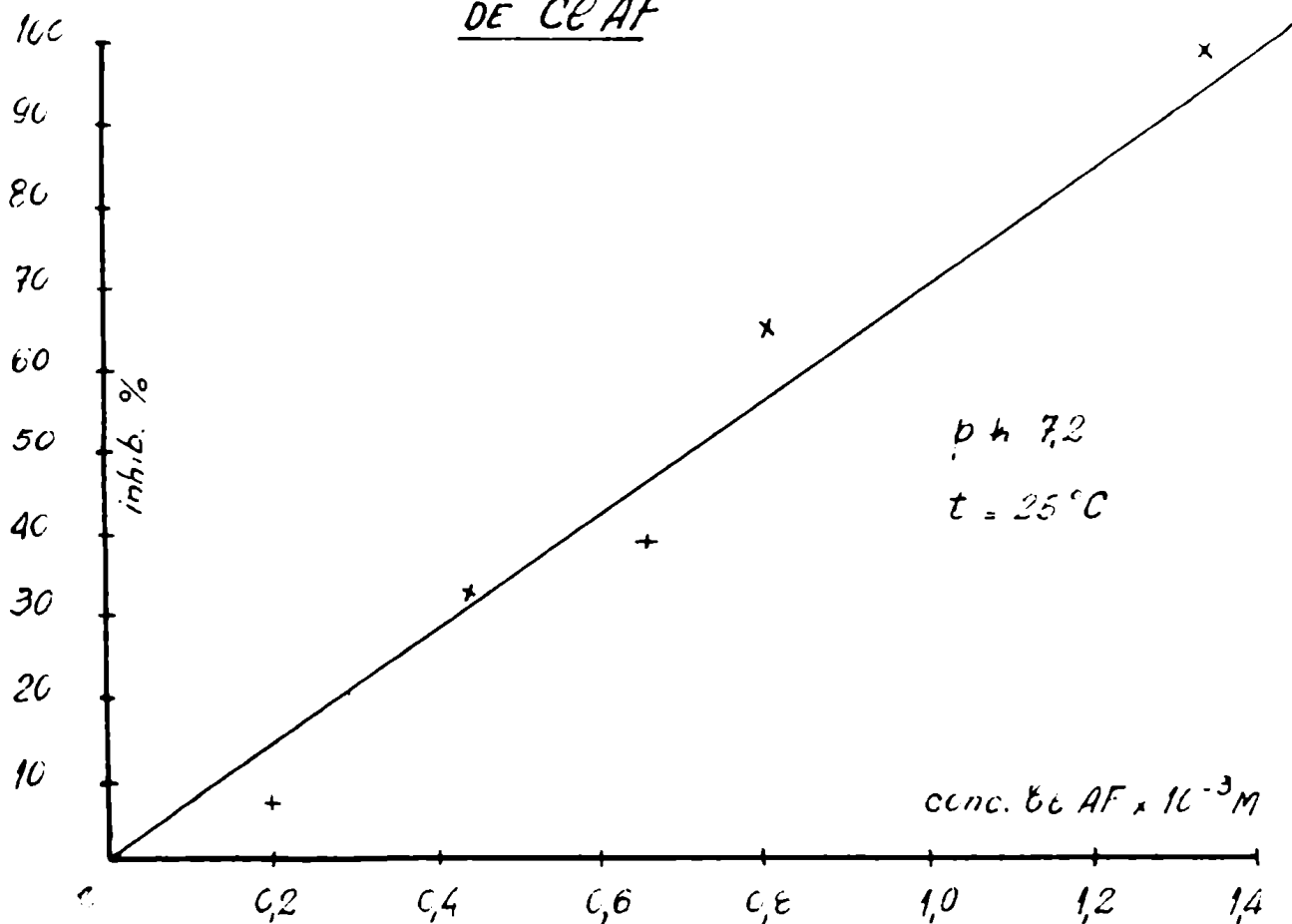
Variación del % de inhibición por ClAF con la concentración de la enzima

Para obtener información acerca de como variaba el % de inhibición de la ChE de plasma, se incubaron cantidades de suero crecientes con ClAF en concentración constante (el volumen final siempre fué el mismo) y finalmente después de 5 minutos de incubación se añadió la Ach (conc. final 10^{-2} M). Se usaron dos concentraciones de ClAF, una $1,2 \times 10^{-3}$ M y otra $0,6 \times 10^{-3}$ M. Los resultados pueden verse en la figura N° 3

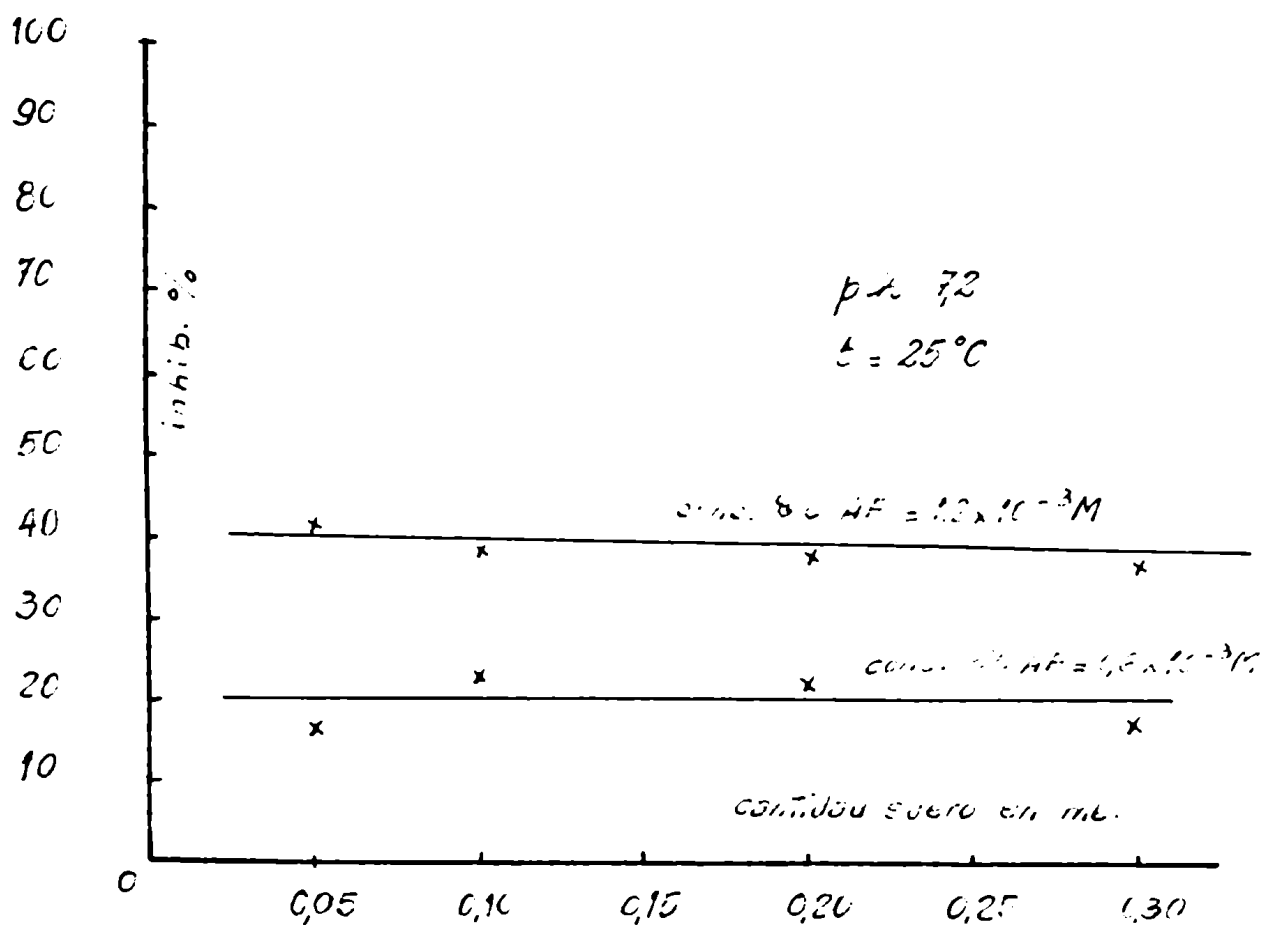
Según la misma, los % de inhibición no varían apreciablemente al aumentar la concentración de la ChE, lo cual significa que el inhibidor se encuentra en exceso con respecto a la

SERIE n° 2 y 3

VARIACION DE LA INHIBICION CON LA CONCENTRACION DE CCAF



VARIACION DE LA INHIBICION CON LA CANTIDAD DE SUERO



concentración del grupo reaccionante de la enzima.

Variación del % de inhibición por ClAF sobre ChE según el orden de agregado de Ach

Se realizaron dos tipos de determinaciones para estudiar esta variación; en una la enzima y el sustrato estuvieron en contacto antes de añadir el inhibidor; en la otra, primero se puso en contacto la enzima con el inhibidor y posteriormente se agregó el sustrato. En ambos casos la concentración de ClAF durante la inhibición fué de $0,48 \times 10^{-3}M$ y la concentración de sustrato final era de $10^{-2}M$ ($t = 25^{\circ}C$ y $pH 7,2$)

En el primer caso se obtuvo 28.3% de inhibición y en el segundo 29,3%, o sea que el % de inhibición no varía apreciablemente con el agregado del sustrato o inhibidor con respecto a la enzima (a concentraciones de ClAF y Ach iguales).

Variación del % de inhibición por ClAF sobre ChE con la concentración del sustrato

La experiencia fué ejecutada incubando previamente la enzima con el sustrato y finalmente se añadió el inhibidor. La concentración final del inhibidor se mantuvo constante y en una de las series de experiencias realizadas fué de $2,2 \times 10^{-3}M$. La concentración final de sustrato fué variable y era de 0.002M; 0.005; 0.0075; 0.015; 0.030; 0.045; 0.060 y 0.1M respectivamente para cada una de las determinaciones de esta serie, los % de inhibición están indicados en la tabla N° 2

En la figura N° 4 puede verse el análisis de estos valores según la técnica de Hunter y Downs (30) de acuerdo con el tratamiento hecho por Friedenwald J.S. y Maengwin-Davies (31).

Para confirmar estos resultados, se empleó posteriormente colinesterasa purificada de suero humano de Sigma Chemical Co. En esta experiencia la Ach fué agregada después de incubar

la ClAF con la enzima (conc. ClAF $0,89 \times 10^{-3}M$) las concentraciones de Ach finales fueron de 0,01M; 0,03M; 0,05M; 0,07M y 0,1M respectivamente. Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla Nº 3

El tratamiento según Hunter y Dawns puede verse en la figura Nº 5

No obstante, resultados aislados obtenidos tomando % de inhibición para dos valores de concentración de sustrato extremos, no produjeron variaciones importantes.

En otro ensayo (ClAF $1,1 \times 10^{-3}M$, t $25^{\circ}C$, pH 7,2) se obtuvo: para Ach 0,002M 50,6% inhibición; para Ach 0,01M 44,6% inhibición; para Ach 0,1M 43,2% inhibición. Otra experiencia produjo para (ClAF $0,88 \times 10^{-3}M$, t $15^{\circ}C$ y pH 7,2) Ach 0,005M 76,8% inhibición y con Ach 0,05M 76,3% de inhibición. En un caso, (ClAF $2,2 \times 10^{-3}M$; t $15^{\circ}C$, pH 7,2) para Ach 0,01M dio 76,7% inhibición, para Ach 0,1M 76,7%

Efecto de diversos sustratos en la inhibición de ChE de suero humano por ClAF

Para verificar el comportamiento de la inhibición de la ChE por ClAF, frente a distintos sustratos se efectuaron dos ensayos. En el primero la enzima se añadió al sistema en último término, es decir que se encontró con el sustrato y el inhibidor. La experiencia se efectuó a pH 7.2 t $25^{\circ}C$; concentración de sustrato final 0,01M; se emplearon dos concentraciones diferentes de ClAF, una $0.97 \times 10^{-3}M$ y otra $1.94 \times 10^{-3}M$. Los resultados pueden verse en la tabla Nº 4

Como se puede observar existe un notable efecto protector de la Benzoilcolina, a pesar de su menor afinidad por la ChE de suero humano con respecto a la Ach o a la BuCh.

Este típico comportamiento pudo reproducirse aún varian-

VARIACION DE LA INHIBICION POR ClAF

CON LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

TABLA Nº 2

t: 30°C; pH 7,2; concentracion ClAF $2,2 \times 10^{-3}M$
Ach y ClAF antes que la enzima (suero humano)

conc. Ach M	0,002	0,005	0,0075	0,01	0,015	0,030	0,045	0,06	0,10
% inhib.	58	55	60,7	51,3	61	71	99,5	100	100

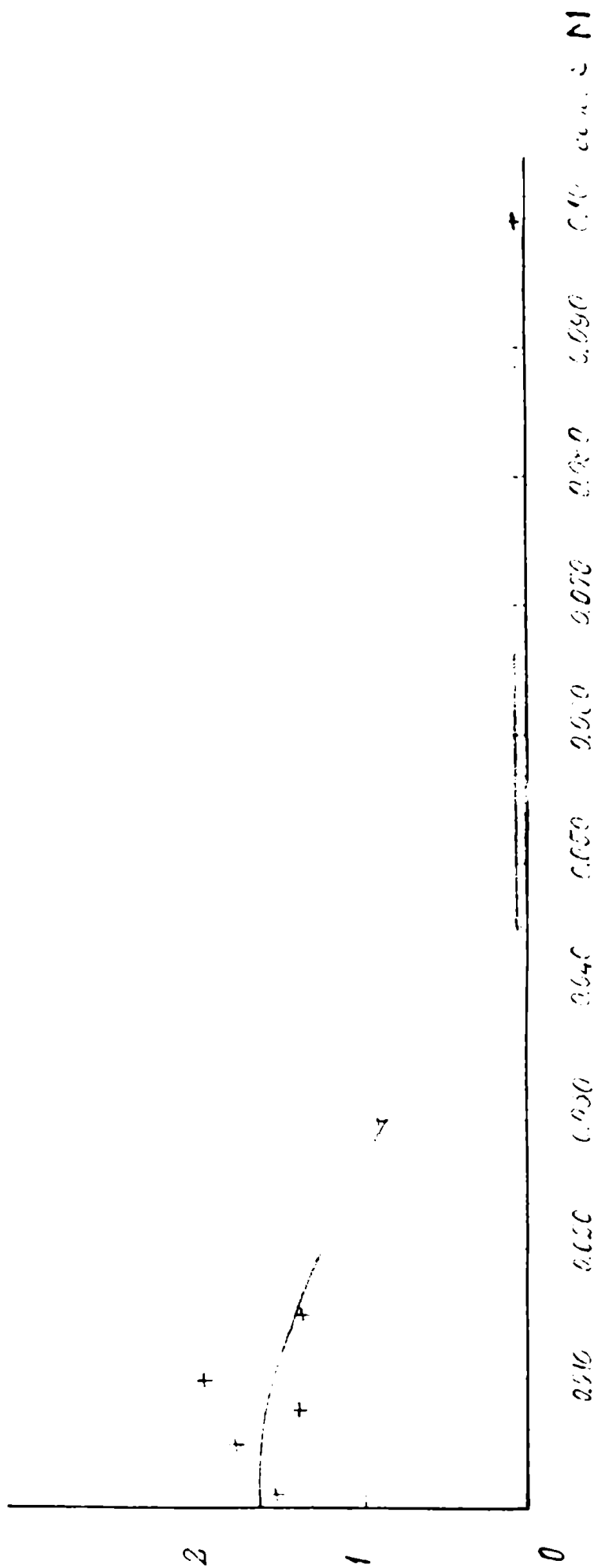
TABLA Nº 3

t: 30°C; pH 7,2; concentración ClAF $0,89 \times 10^{-3}M$
Ach después de incubar 5' la enzima (ChE purif) y ClAF

conc. Ach M	0,01	0,03	0,05	0,07	0,10
% inhib.	24	36,7	39,5	46,2	52

$$\frac{i \times \frac{V_i}{V_0} \times 10^{-3} M}{1 - \frac{V_i}{V_0}}$$

Fig. 4



TRATAMIENTO SEGUN HUNTER Y DOWNS

GRAFICO N° 5

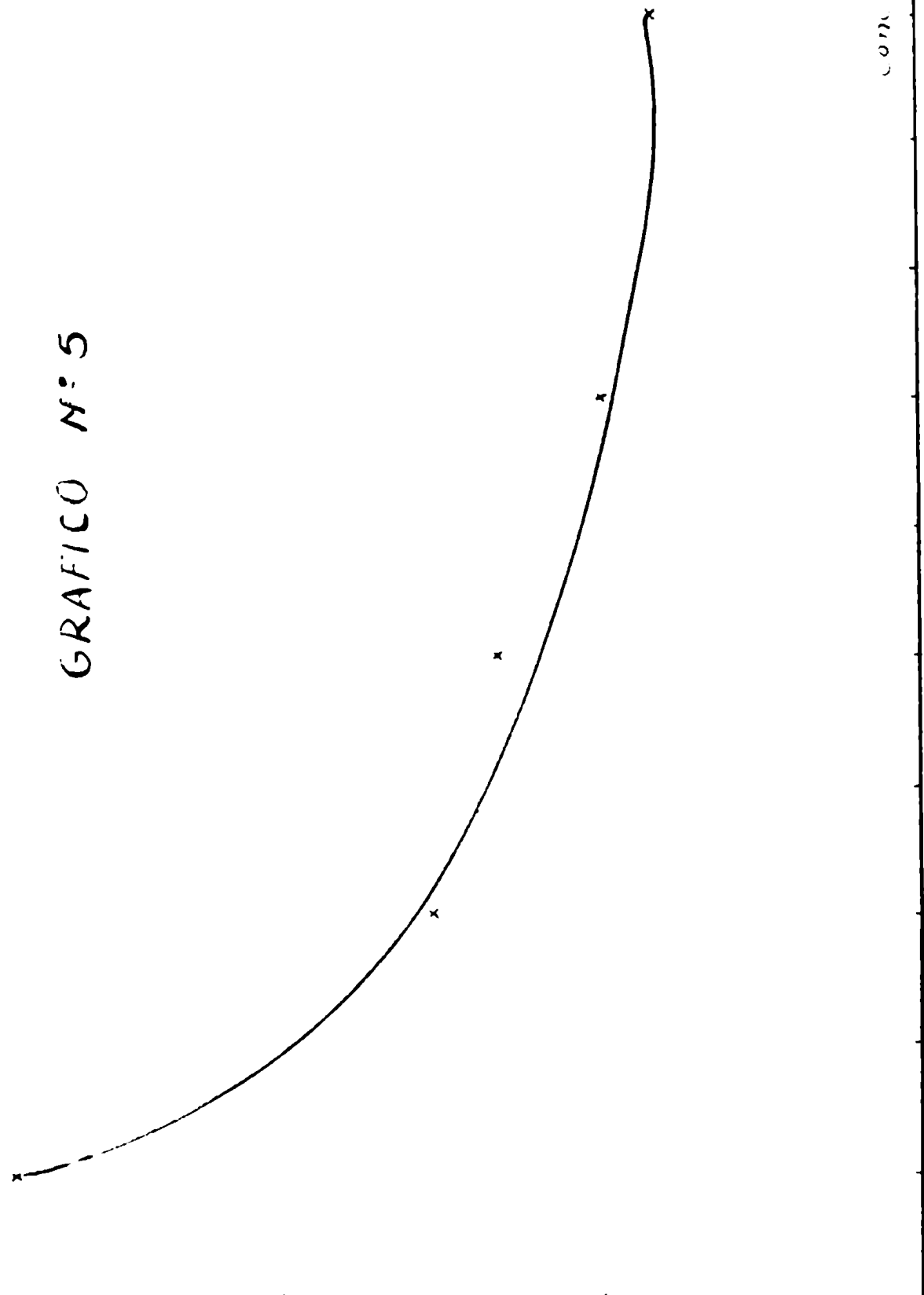
3

$$\frac{i \times \frac{V_c}{V_0}}{1 - \frac{V_c}{V_0}} \times 10^{-3} M$$

2

1

0



com D

0.010 0.020 0.030 0.040 0.050 0.060 0.070 0.080

do radicalmente las condiciones de la reacción; pH 7.2 t 25°C, concentración final del sustrato 0,01M, pero en este caso se le agregó después de actuar el inhibidor durante 5 minutos sobre la enzima (ChE purificada de plasma humano). Los resultados obtenidos fueron: (Tabla Nº 5)

El efecto protector de la BzCh se repite como en el caso anterior, así como el orden decreciente en los % de inhibición obtenidos Ach > BuCh > BzCh.

En realidad, en el caso del empleo de BzCh como sustrato no solamente no se observa inhibición, sino que existe cierto grado de activación con respecto al ensayo sin ClAF. En otras dos experiencias adicionales, usando idénticas condiciones se volvió a observar este efecto activador de la BzCh durante la inhibición por ClAF (en un caso 21% de actividad y en el otro 34%).

Con el objeto de poner en evidencia posibles efectos estéricos, se decidió realizar una experiencia similar pero empleando un inhibidor cuya estructura química fuese completamente distinta de la de ClAF y además tuviese un volúmen molecular mayor.

Se eligió la difenilaminocloroarsina, las condiciones fueron; pH 7.2 t 25°C, se incubó primero el tóxico con la enzima en concentración $0.5 \times 10^{-3}M$ durante 5 minutos y finalmente se añadieron los sustratos (conc. final 0,01M) Los resultados pueden observarse en la tabla Nº 6

También en este caso el orden de los % de inhibición observado fué Ach > BuCh > BzCh, aunque no se observa activación para la BzCh.

Como podría interpretarse que estos datos son el resultado de la acción de dos enzimas distintas, cuyo comportamiento frente a la BzCh y a ClAF es distinto, se decidió efectuar un ensayo de pureza de la fuente enzimática empleada, o sea suero

INIBICION DE CHE POR Cl.F EN PRESENCIA DE SUSTRATOS DISTINTOS.

Tabla N° 4

t: 25°C; pH 7,2; concentración de BuCh y BzCh final 0,01M. Primero inhibidor y sustrato, segundo la enzima (puer)

sustrato	% inhibición	conc. Cl.F
Ach	39,7	0,47
BuCh	19,	X
BzCh	13 (activ)	10^{-4} M
Ac	30,0	1,04
BuCh	24,0	X
BzCh	11,8 (activ)	10^{-3} M

Tabla N° 5

t: 25°C; pH 7,2; conc. final de Ach, BuCh y BzCh 0,01M. Primero se incubaron la enzima (CHE purificada) e inhibidor; segundo el sustrato.

sustrato	% inhibición	conc. Cl.F
Ach	21,3	2,7
BuCh	50,8	
BzCh	0	10^{-3} M

INHIBICION DE CHE POR DIFENILAMINOCLORARSINA

EN PRESENCIA DE DISTINTOS SUSTRATOS

TABLA N° 6

t: 25°C; pH 7,2; conc. Ach, BuCh y BzCh 0,01M.
Primero se incubaron la enzima (ChE purificada)
e inhibidor; segundo el sustrato.

sustrato	% inhibición	conc. DACL
Ach	78,2	0,5
BuCh	51,5	
BzCh	37,4	10 ⁻³ M

humano y ChE purificada de plasma humano.

Ensayo de pureza de acción enzimática del suero humano y de la ChE purificada de plasma humano (Sigma Chemical Co)

Se ha empleado con bastante frecuencia para comprobar si está actuando una enzima o dos, el método por mezcla de sustratos. Este es un método semi-cuantitativo sencillo para determinar cuando dos reacciones que se producen simultáneamente se deben a una misma enzima.

Cuando existen dos reacciones catalizadas por la misma enzima es evidente que ambos sustratos competirán entre sí por un mismo centro activo y por lo tanto la actividad que tendrá la enzima para la mezcla de sustratos será intermedia entre los valores obtenidos para cada uno, actuando separadamente en la misma concentración.

La velocidad con mezcla de sustratos puede obtenerse sobre las bases de la teoría de Michaelis-Menten, mediante (32)

$$V(\text{mezcla}) = \frac{(V \times S/K_m + V'S'/K_m)}{(1 + S/K_m + S'/K_m)}$$

S y S' representan las concentraciones de los sustratos; V y V' las velocidades máximas respectivas; K_m y K'_m las constantes de Michaelis correspondientes a cada uno.

En cambio, en el caso de ser dos enzimas independientes las que actúan, la velocidad para la mezcla será igual a la suma de los valores obtenidos independientemente.

Para el caso de colinesterasa de suero humano, se hizo el ensayo determinando la actividad con Ach 0,01 M; luego con BzCh 0,01 M y finalmente con una mezcla de ambos, cada uno de ellos en concentración 0,01 M. Los resultados obtenidos fueron:

actividad con Ach = 0,00948 ml NaOH 0,01N x minuto x 0,2 ml de suero; con BzCh = 0,00400 ml NaOH 0,01N x minuto x 0,2 ml de suero; con mezcla Ach + BzCh = 0,00433 ml de NaOH 0,01N x minuto x 0,2 ml de suero. Los resultados están completamente de acuerdo con la acción de una sola enzima sobre ambos sustratos.

La misma experiencia, empleando BuCh conc. final 0,01 M y BzCh 0,01 M dió estos resultados: con BuCh actividad = 0,0145 ml de NaOH 0,01N x minuto x 0,2 ml de suero; con BzCh = 0,00619 ml de NaOH 0,01N x minuto x 0,2 ml de suero y la mezcla de BuCh + BzCh = 0,0100 ml de NaOH 0,01N x minuto x 0,2 ml de suero. También en este caso la acción se debe a una sola enzima. (En esta oportunidad se usó ChE purificada).

Inhibición de ChE de suero humano con ClAF en presencia de mezcla de sustratos.

La experiencia se realizó del siguiente modo: se añadió el inhibidor a la enzima, previamente puesta en contacto con el sustrato (a pH 7,2 y $t = 25^{\circ}\text{C}$; concentración de inhibidor $3,6 \times 10^{-3}$ M; concentración del sustrato 0,0117 M) después de 5' de incubación se hizo una determinación de actividad (1ª parte) luego se añadió al sistema el otro sustrato (conc. final de ambos sustratos 0,01 M) y se volvió a determinar actividad (2ª parte). Paralelamente se efectuó un ensayo en blanco sin inhibidor.

En una de las experiencias se empleó BzCh en la primera parte y Ach + BzCh en la segunda. Los resultados fueron: 1ª parte 12,7 % de activación y 2ª parte 5,4 % de inhibición.

En la otra, se usó Ach en la primera parte y BzCh + Ach en la segunda; se obtuvieron 100% inhibición en la 1ª parte y 12,4% de activación en la 2ª parte.

Puede observarse que habiendo BzCh en la primera parte

no se produce inhibición y que el agregado posterior de Ach no genera una inhibición apreciable comparada con la que existe en ausencia de BzCh.

Cuando se emplea Ach en la primera parte y se añade BzCh después, el efecto es notable puesto que reactiva totalmente a la enzima inhibida.

También se hizo una determinación alterando algunas condiciones: se agregó la enzima a una mezcla de sustrato e inhibidor y después de incubar 5 minutos se determinó actividad (1ª parte) posteriormente se añadió el otro sustrato y se determinó actividad (2ª parte). En la 1ª parte el sustrato fue Ach (conc. 0,0119M) en la 2ª parte fue BuCh (conc. 0,010M y Ach también 0,010M). La concentración del inhibidor ClAF fue 2.0×10^{-3} M (pH 7.2, t 25°C)

En la primera parte se obtuvo 47,3% inhibición, en la segunda 35,7%.

Como puede apreciarse, disminuye algo el % de inhibición en presencia de BuCh.

Estas experiencias prueban que existe algún tipo de reversibilidad en la inhibición.

Efecto de la dilución sobre la inhibición de la ChE de suero humano por ClAF

Dado que existe una probable reversibilidad en la inhibición en estudio, se decidió investigar cuales eran los efectos de la dilución y la diálisis sobre la misma.

Primero se efectuó una inhibición agregando el inhibidor sobre una mezcla de enzima con sustrato; conc. sustrato 0,088M; conc. ClAF $2,2 \times 10^{-3}$ M y dejando incubar 5 minutos a pH 7.2 y t 25°C. Se determinó la actividad y posteriormente se agregó un volumen 4 veces mayor de agua y se volvió a determinar actividad. Los resultados obtenidos fueron: antes de diluir, 60,6% inhibición

después de la dilución, 31,6% de inhibición. (Se comparó contra un testigo efectuado en idénticas condiciones y sin inhibidor).

Una experiencia similar, en la cuál la concentración de Ach fué de $6 \times 10^{-3}M$ y la de CLAF $2,2 \times 10^{-3}M$ y finalmente diluida con 3,5 veces su volumen de agua; dando los siguientes resultados: antes de diluir, 54,4% de inhibición, después de diluir 27,2%.

Se observa por lo tanto un efecto reactivador por dilución.

Efecto de la diálisis sobre la inhibición por CLAF de la ChE de suero humano

Las experiencias realizadas fueron de dos tipos:

a) Incubando la enzima con CLAF (conc. $2.2 \times 10^{-3}M$) durante 5 minutos, en ausencia de sustrato y luego dividiendo la mezcla en dos partes iguales; en una se determinó actividad agregando Ach (conc. final 0,01M); en la otra se sometió a diálisis en tubo Visking durante 24 hs en la heladera, contra una solución 0,00113M en Cloruro de Magnesio y 0,113M en Cloruro de Sodio (con frecuente agitación y renovación de la solución). Después de cumplidas las 24 hs de diálisis, se determinó actividad en la muestra agregando Ach (conc. final 0,01M). Simultáneamente se hizo un ensayo testigo que no contenía inhibidor. Los resultados obtenidos fueron: antes de dializar, 61,8% de inhibición; después de dializar, 0% de inhibición, es decir que hubo completa recuperación de actividad.

b) Incubando la enzima con CLAF en presencia de Ach (conc. CLAF $2,2 \times 10^{-3}M$; conc. de Ach 0,01M) 5 minutos, luego se determinó actividad titrigráficamente en la mezcla. Posteriormente se sometió a ésta última a diálisis en iguales condiciones que en la experiencia anterior y finalmente se añadió Ach (conc. final 0,01M) para determinar actividad. En el mismo tiempo se hizo un

ensayo sin inhibidor en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos fueron: antes de dializar, 54,6% de inhibición; después de dializar, 95% de inhibición. En este caso también hubo recuperación total de la actividad enzimática.

Inhibición de la ChE de suero humano por ClAF en presencia de Cisteína:

Se intentó proteger a la ChE de suero humano con Cisteína, pensando en una probable competencia del sulfhidrilo de ésta con el de la enzima por reaccionar con ClAF.

Pero contrariamente a lo esperado se obtuvo mayor inhibición. La experiencia se realizó añadiendo ClAF a un sistema que ya tenía ChE, Ach y Cisteína (conc. Ach 0,006M; conc. Cisteína 0,1M; conc. ClAF 0,008M). Paralelamente se efectuaron ensayos de actividad e inhibición en ausencia de Cisteína y un ensayo de actividad con Cisteína.

Se obtuvieron los siguientes valores: en ausencia de Cisteína, 26,6% de inhibición; con Cisteína 53,3% de inhibición.

Acción de ClAF sobre ChE de plasma y cerebro "in vivo"

Las determinaciones de actividad colinesterásica en plasma e inhibición "in vivo" se efectuaron con ratas blancas hembras de aproximadamente 150 grs. de peso.

La dosis de ClAF fué de 0,3 ml de una solución en aceite de oliva de 100mg/ml, por vía intraperitoneal; en estas condiciones entre las 12-16 horas morían más de la mitad de los animales (no se pudo efectuar datos estadísticos por no disponer de cantidad suficiente de animales) y los restantes tenían síntomas manifiestos de intoxicación.

En los ensayos de actividad e inhibición por ClAF de la colinesterasa de cerebro, se emplearon ratones suizos hembras de aproximadamente 23-27 grs de peso. La dosis de ClAF dada intraperitoneal fué de 0,2 ml de una solución en aceite de oliva de 20 mg/ml. En estas condiciones los animales tenían una mortalidad de aproximadamente el 10 % a las 10-16 horas y los restantes tenían síntomas netos de intoxicación.

Los síntomas observados fueron: en las primeras horas no eran muy notorios, excepto que los animales caminaban con las patas traseras algo abiertas, pero lo hacían rápidamente (posiblemente se deba a la irritación local producida en la zona de inyección).

Poco tiempo después se notó una tendencia a quedarse quietos y encorvados.

Posteriormente pudo observarse un temblor arriba-abajo en la cabeza y un temblor lateral en el cuerpo al caminar.

Este síntoma y el notable descenso de la temperatura corporal son los efectos más característicos observados.

Existe un estado de debilidad e indiferencia en el animal muy manifiesto, y ya con intoxicación muy avanzada no intenta huir al tomarlo y no tiene fuerzas para sostenerse con las

patas.

En los casos en los cuales se les dieron dosis grandes de ClAF (especialmente en ratas) pudo observarse marcada cianosis en las patas, en especial las traseras.

Tanto en las experiencias con ratas como con ratones, se mantuvo a los animales sin comida y con agua "ad libitum" durante las 12-16 horas antes de sacrificarlos.

En todas las experiencias los resultados fueron comparados con un lote testigo sin intoxicar, tratado en condiciones iguales.

La sangre se obtuvo por punción de la vena porta (en algunas ocasiones también corazón) empleando heparina como anticoagulante.

El cerebro de raton, después de extraído se lavo con solución de ClK 0.154 M bien fría hasta eliminar los glóbulos rojos; posteriormente se preparó un homogenato al 10 % en sacarosa 0,25 M empleando un homogenizador tipo Potter-Elvehjem construido según (35)

Sobre una fracción del homogenato se determinó residuo seco a 100°C, los valores se refirieron luego a 1 gr. de éste residuo. Los resultados de estas dos experiencias pueden observarse en las tablas: N° 7 y N° 8

Acción de ClAF sobre ChE de córnea humana

Desafortunadamente no fué posible ensayar la acción de ClAF sobre ChE de córnea humana "in vitro".

Ello se debió a la gran dificultad para conseguir éste material ya sea de autopsia o de operaciones oculares.

Sin embargo, en experiencias realizadas "in vivo" con seres humanos (colaboradores amigos y yo mismo) permitieron observar que la lacrimación por ClAF no va acompañada de miosis.

Dado que la cantidad de inhibidores de ChE necesaria para producir miosis es muchísimo menor que la que produce lacrima-

ACCION DE CLAF SOBRE CHE DE PLASMA DE RATA "IN VIVO"

TABLA N° 7

NO INTOXICADOS PLASMA	INTOXICADOS PLASMA
M Ach/ h/ ml plasma	M Ach/ h/ ml plasma
50	
49	16,7
29	11,5
44	7,6
30,5	18,5
24,8	13
29	
V.M. = 39,4	V.M. = 13,4
D.M. = 9,8	D.M. = 3,3
D.S. = 10,24	D.S. = 3,9

ACCION DE CIAF SOBRE CHE DE CEREBRO DE RATON "IN VIVO"

TABLA Nº 8

NO INTOXICADOS	INTOXICADOS
CEREBRO	CEREBRO
M Ach/ h/ gr tejido	M Ach/ h/ gr tejido
619	557
633	648
786	456
734	768
488	640
580	414
588	530
587	
V.M. = 626	V.M. = 573
D.M. = 67,8	D.M. = 96
D.S. = 87,6	D.S. = 113
652	488
507	485
430	531
657	446
454	442
592	373
438	422
636	407
	417
V.M. = 545	V.M. = 445,6
D.M. = 88,5	D.M. = 37,1
D.S. = 92,8	D.S. = 45,7

ción (por lo menos en el caso de los inhibidores organofosforados (36) se puede suponer que la acción de ClAF sobre la colinesterasa de la córnea no es responsable de la lacrimación.

DISCUSION

1º) Posible rol de los grupos SH:

Si se observan los resultados obtenidos por acción de tóxicos sobre la colinesterasa de suero humano que figuran en la tabla Nº 1, podrá notarse inmediatamente que aquellos que ejercen acción inhibitoria (etilcloruroarsina, p-cloromercuribenzoico, cianuro de bromobencilo, bromuro de xililo, w-cloroacetofenona, difenilaminocloroarsina, etilmercuriotiosalicilato de sodio) son sustancias altamente reactivas con grupos SH. Esto indicaría que la colinesterasa, es una enzima sulfhidrífica. Pero habría que explicar en caso de aceptar dicha hipótesis algunas aparentes contradicciones como ser: 1) porqué no inhiben la cloropicrina, el ferricianuro, la bromoacetona y el bromoacetato de etilo. 2) Porqué requiere concentraciones tan elevadas de inhibidores potentes y específicos como el p-cloromercuribenzoato.

Estas series de contradicciones con respecto a un posible rol de los grupos sulfhidrilos en la actividad de la colinesterasa es un problema que aún no ha sido resuelto.

Las discusiones comenzaron con los trabajos de Nachmansohn y Lederer(37;38) quienes trabajando con colinesterasa de torpedo eléctrico, encontraron inhibición con glutatión oxidado, cistina, iodo, sales de cobre y iodo acetato. Basándose en esas observaciones la clasificaron como una enzima sulfhidrífica.

En contradicción Hargreaves (15) ensaya iodoacetato, ferricianuro y p-cloromercuribenzoato y excepto una pequeña inhibición observada con éste último, comprueba que no inhiben.

Augustinsohn (13) pudo establecer que la cistina tiene muy poco efecto o ninguno sobre la colinesterasa de varias fuentes de obtención. Esto fué confirmado por Wels y Repke (39).

En cambio las observaciones de que el sulfato de cobre inhibía y de que el iodo era un inhibidor excepcional fueron confirmadas por otros autores (14).

Otra de las aparentes divergencias consistió en la fuerte acción inhibidora del arsenito con respecto a los arsenicales orgánicos, los cuales si bien son inhibidores, lo hacen con menor intensidad, cosa que no está de acuerdo con la lógica (14;40;41;42;43).

Además el o-iodosobenczoato, un reactivo típico de grupo sulfhidrilo no la inhibe (14; 44) estos resultados no impidieron que Augustinsson (45) encontrara que este tóxico era un inhibidor comparativamente potente de la colinesterasa de suero humano y de caballo ($p I = 5,0$).

El oxígeno a presión de 7 atmósferas y a $38^{\circ}C$ no afecta a la colinesterasa de suero (44)

Otro hecho que se opondría a la existencia de un SH indispensable para su acción es la resistencia a las radiaciones UV de 2.537 a (15).

Mounter y Whittaker (14) aclararon el problema demostrando que muchas discrepancias se debían que la fuentes de preparación de la enzima eran diferentes.

En el trabajo estos autores estudiaron el comportamiento de la ChE de suero y de glóbulos humanos, frente a un grupo de compuestos. Encontraron inhibición con B-clorovinil dicloroarsina ($p I = 3 \quad 22\%$ inh); fenilarsenóxido ($p I = 3 \quad 35\%$); nitrato de fenilmercurio ($p I = 3 \quad 15\%$); p-cloromercuribenzoico ($p I = 2,2 \quad 50\%$); arsenito de sodio ($p I = 4,2 \quad 50\%$); difenilcloroarsina ($p I = 3 \quad 31\%$). No encontraron inhibición con iodoacetato, glutation oxidado y ferricianuro.

Estos autores no consideraron sin embargo una posible reacción con grupos SH por parte de esos inhibidores, fundamentalmente debido a que el arsenito es un inhibidor más potente

que los arsenicales y además porque la inhibición por arsenito aumenta con el pH, lo cual no está de acuerdo con la labilidad de la unión -S-As en medio alcalino (46).

Otros autores encontraron inhibición con *p*-clorovinil-dicloroarsina (43;47;48) con fenildicloroarsina (43); con 3 a 4-hidroxi-4-hidroxifenil arsenóxido (49).

Varios de estos compuestos arsenicales y mercuriales orgánicos han sido considerados como reactivos específicos de grupos SH de proteínas (50), contando con abundante soporte experimental. Por lo tanto no corresponde descartar la presencia de un grupo SH de algún modo influyente en el proceso enzimático, por el solo hecho de que el arsenito sea un inhibidor más potente que los arsenicales orgánicos y además más activo en medio alcalino.

Afortunadamente esta objeción perdió fuerza después del trabajo de Markwardt (41), el que demuestra que la reacción del arsenito con ChE es en el centro activo (protege con el sustrato y protege contra acción del parathion), y además demuestra que no es una reacción con grupo SH (enzima de glóbulos rojos).

Desaparecida esta objeción se analizaron los resultados obtenidos en este trabajo, para poder reforzar la idea de la existencia de grupos SH que influyen de alguna manera en la reacción enzimática.

El hecho de haber obtenido inhibición por compuestos como el *p*-cloromercuribenzoico, difenilamino cloroarsina, etildicloroarsina, cianuro de bromobencilo, bromuro de xililo, etilmercuritiosalicilato de sodio y *w*-cloroacetofenona, podría considerarse por sí mismo suficientemente probatorio. Además, el estudio detallado que se realizó con *w*-cloroacetofenona confirmó estos resultados en parte.

Antes de aceptar a la ClAF como reactivo específico de grupos sulfhidrúlicos se decidió poner a prueba dicha propiedad,

especialmente porque no cuenta con un aval bibliográfico tan abundante como los reactivos ya consagrados (47;20;51;52)

Estudiando una probable reacción de ClAF con aminoácidos se encontró que sólo reaccionaba con cisteína. Si bien esta experiencia no tiene carácter probatorio, tiene el valor de no haber introducido objeciones a la especificidad de la ClAF. En lo que respecta al caso especial de la ChE es importante que no se observara reacción con histidina, tirosina o serina, aminoácidos que la bibliografía menciona como participantes del centro activo de la enzima.(33) En efecto, si la ClAF hubiese reaccionado con ellos en el estado de aminoácido, sería muy probable una reacción similar con los mismos en la cadena proteica (lo contrario no es igualmente probable).

El comportamiento de ClAF frente a otros sistemas enzimáticos fué igualmente satisfactorio. Por ejemplo, la láctico dehidrogenasa de músculo de conejo se inhibió con ClAF y también con p-cloromercuribenzoico, lo cual está de acuerdo con la bibliografía (53;54;55)

También se obtuvo inhibición de la málico dehidrogenasa de corazón de lechón, empleando ClAF y p-cloromercuribenzoico, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Wolfe y Neillands (56;57;58)

La isocítrico dehidrogenasa de corazón de lechón también se inhibió con ClAF; además actuó del mismo modo la difenilaminocloroarsina, la bibliografía existente es perfectamente consecuente con estos resultados (59)

También la alcohol dehidrogenasa de levadura fué inhibida fuertemente por ClAF, éste comportamiento no es extraño; uada su conocida sensibilidad al iodoacetato (55) y otros inhibidores de SH (60;61)

Otra enzima inhibida por ClAF fue la gliceraldehido

3-fosfato dehidrogenasa de músculo de conejo, caso completamente típico de enzima sulfhidrúlica (50)

La fumarasa de corazón de lechón fué otra de las enzimas ensayadas, en este caso no se obtuvo inhibición con ClAF ni con difenilaminocloroarsina, resultados estos en total acuerdo con bibliografía (62;63)

La transaminasa glutámico oxalacética de corazón de lechón no se inhibió con ClAF en concentraciones de hasta $2 \times 10^{-3}M$, ésto concuerda con los datos obtenidos por Singer y Barron (64) y los mencionados por Cohen (65) en el sentido de poseer ésta enzima gran resistencia a los agentes alquilantes. Tal es así que no se inhibió, según los mencionados autores con concentraciones de iodoacetato de $10^{-2}M$ y recién la inhibe el p-cloromercuribenzoato $10^{-3}M$.

Tampoco la aldolasa de músculo de conejo se inhibió con ClAF, en cambio el p-cloromercuribenzoico sí la inhibe, hecho ya registrado en literatura (66), ésto resultado con ClAF sumado a la resistencia observada a la N-etilmaleimida y al hecho ya comprobado por otros autores de que es resistente a iodoacetato (65;67) demuestra que la enzima posee una especial resistencia a los agentes alquilantes. En cambio es sensible a los reactivos que forman mercaptidos como lo demuestra la ligera inhibición obtenida con difenilaminocloroarsina.

La enolasa no es considerada una enzima sulfhidrúlica en bibliografía (68;69); sin embargo Warburg y Christian (70) comprobaron que se inactiva con el Hg^{++} y que forma un compuesto Enzima $-(Hg^{++})_6-$. Este hecho explicaría la sensibilidad a la acción del p-cloromercuribenzoato y la no reacción con ClAF.-

Dado que en desarrollo de la técnica de aldolasa en el UV se encontraron presentes, triosafosfato isomerasa y alfa glicerofosfato dehidrogenasa, ambas de músculo de conejo en contac-

to con ClAF, queda... de... la...
 lo mismo podría... de la N-etil... Estos...
 concuerda con... de que... sean resistentes...
 tate (21). De... result... y
 bibliográficos existentes se... Cl F...
 ve... grupos SH en... sumamente útil...
 en su acción. En general es...
 mercuriales y arsenicales (que actúan por formación
 pero bastante más reactiva que el iodoacetato y...
 que son los alquilantes frecuentemente empleados para detectar SH.
 Ésta conclusión concuerda con la mencionada por Boyer (22)

Parecería ser por lo tanto que la reacción de...
 bre ClE, es sobre un grupo SH. Esta conclusión se ve reforzada
 por otras dos experiencias realizadas, una de ellas en la
 demostró que la inhibición era prácticamente instantánea...
 además se verificaba a pH ácido rápidamente.

Esto elimina una objeción que podría efectuarse por ana-
 logía con el iodoacetato o la iodoacetamida, que es la de una
 posible reacción con grupos amino u oxhidrilos fenólicos; la cuál
 es mucho más lenta que la alquilación de sulfhidrilos (23).

También la difenilamino-clorocarbina y el p-cloromercurio-
 benzoico reaccionaron rápidamente, lo que confirma el hallazgo
 anterior.

Habría también que explicar las anomalías encontradas
 con agentes oxidantes, para poder aceptar varias de las con-
 clusiones expuestas. Ya Barron y Singer (24) destacaron la fre-
 cuente resistencia de los grupos SH de enzimas frente a los agen-
 tes oxidantes debido usualmente empleados para su detección (fe-
 rriocianuro, porfirina, O-iodosobenzoato etc.). Atribuyen a este
 fenómeno a varias causas posibles, como ser: 1º) la existencia
 de otros SH cercanos, lo cual dificulta la formación de

-8-8- y hasta puede eliminar la posibilidad de oxidación, electronegatividad de grupos adyacentes, 2) factores estéricos.

Es evidente pues que la colinesterasa podría ser enzima con algunas de estas características dada su resistencia a los oxidantes. En éste caso habría que admitir que el sulfido experimentase sobre la colinesterasa, valiéndose de otro agente que no es un oxidante. Esta hipótesis estaría justificada, que es lo que se necesita al momento que se sabe que es un inhibidor específico de sufridrilos: sino que se sabe que es capaz de unirse también con la histidina y con la tirocina (41). Esta posibilidad es sumamente interesante, dado que varios aminoácidos han sido mencionados como pertenecientes al centro activo colinesterasa.

Los argumentos expuestos, parecerían indicar la existencia de grupos sufridrilos tales que: al reaccionar con compuestos orgánicos eficaces como compuestos arsenicales y mercuriales, se ve afectada la actividad enzimática.

No obstante es necesario hacer notar la existencia de varias contradicciones que resienten esta suposición:

1) La cloracetofenona reacciona con los grupos SH irreversiblemente; en cambio en éste caso la inhibición fue reversible por alcohol y diálisis.

2) algún tipo de conjugación especial de aminoácidos, podría comportarse frente a Cl-P de un modo similar a los grupos SH.

3) La probabilidad puede disminuirse, debido especialmente a que radicalmente se debe considerar que algunos agentes alquilantes hasta hace poco considerados como específicos de SH (iodoacetato y etilmercurialdo), pueden reaccionar con otros grupos, como la histidina (42).

4) Los compuestos que resultan inhibidores, tienen en común más de ser reactivos con grupos SH, otras características.

Como ser, poseer grandes cantidades en su
bría que con respecto al ella no puede decirse los años.

Sólo a la luz de otras experiencias podría dilucidarse
éste problema.

29) Ubicación del grupo reaccionante con el inhibidor

El solo hecho de que inhibidores habitualmente p
como el p-clorogercumbenzoico, inhibía a la colina acetilasa
re basando en concentraciones del orden 10^{-4} a 10^{-5}
esta indicando que en el caso que el gr

(hidrilo, tiene una activación
tífico.

Este grupo reaccionante se
las enzimas 10^{-4}
velocidades del orden de 10^{-4} a 10^{-5} M.

Otro grupo reaccionante que muestra inhibición
positiva, es la influencia que puede ejercer
del sustrato a distancia con respecto al inhibidor.

Es evidente que el sustrato interfiere a
con la acción de la p-clorogercetofenolasa. Este
no ataca al grupo activo de la enzima.

Cuando la inhibición es competitiva y es
por diferentes sitios en la de
enzimas β inhibición con cada uno de
de ser la inhibición en el centro activo, deberá ser
inhibidor con el sustrato y por lo tanto
iguales condiciones de sustrato (en
condiciones) de sustrato es la afinidad enzimática. Esto
puede verse en la ecuación para la inhibición competitiva

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{S} \left(1 + \frac{1}{K_i} \right)}$$

no decir cuanto mayor sea la afinidad en la enzima, cuanto mayor sea el \bar{v} de inhibición.

En el caso de inhibidores no-competitivos, el \bar{v} de inhibición es independiente del sustrato empleado.

$$v = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)}$$

A éste caso se refiere el gráfico que empleando \bar{v} y \bar{v}_0 como abscisas, se obtienen distintos \bar{v} de inhibición; este resultado experimentalmente se verifica con inhibidores no-competitivos.

Esta experiencia nos hace pensar que los datos no pueden significar de que la inhibición es no-competitiva, puesto que se sabe que existe algún tipo de enlace estérico o de que están actuando enzimas distintas. Como ésta experiencia fue comprobada tanto con ChE cruda como con purificada; se consideró conveniente efectuar con la técnica de mezclas de sustratos un ensayo de fuerza de ambas fuentes. Los resultados mostraron que los efectos observados son atribuibles total o casi totalmente a una sola enzima.

Analizando los resultados vemos que la inhibición es mayor con $\text{Ach} > \text{BuCh} > \text{BzCh}$; mientras que las afinidades de la enzima por el sustrato varían en el orden $\text{BuCh} > \text{Ach} > \text{BzCh}$. Esto demuestra que la inhibición no es competitiva, puesto que en ese caso debía ser el \bar{v} de inhibición con $\text{BzCh} > \text{Ach} > \text{BuCh}$.

Otra prueba de que la inhibición no es competitiva se obtuvo estudiando como varían los \bar{v} de inhibición con la concentración de sustrato.

Los gráficos que las figuras obtenidas, según la técnica de Lineweaver y Burk y aplicando el análisis de la línea recta por Eadie-Helfand o Mengwin-Davies (31) demostrarían que la inhibición es del tipo denominado "incompetitiva", además visto que

... influyen en las reacciones de todos los esteroides que se sintetizan.

Ensayos de la inhibición

Se supuso anteriormente que las inhibiciones observadas debían ser debidas a una reacción con grupos SH o a la presencia de iones en los compuestos ensayados.

Como se ha visto además que la reacción de los compuestos con grupos SH es reversible. Este hecho, así como la presencia de iones, no daría lugar a una inhibición directa en el sistema. En el caso de que la reacción observada sea una reacción sobre grupos SH, el pérdida de actividad podría ser la de tipo de un grupo fundamentalmente tres características: 1) Por favorecer cambios de estructura en el sistema por efectos estéricos o químicos del grupo unido al azufre. 2) Por formación de un grupo SH que tiene reactividad en la oxidación.

De estos dos últimos, el primero visto anteriormente nos permite descartar la primera.

De los otros dos, el segundo parecería ser más factible. Según el estudio que es evidente la existencia de algunos tipos de inhibición en el proceso de la inhibición.

En la experiencia de variación del % de inhibición por diferentes sustratos se demostró que el % de inhibición en el orden de afinidad era: $\text{CH}_3\text{CO} > \text{CH}_3\text{CO} > \text{CH}_3\text{CO} > \text{CH}_3\text{CO}$; visto que el orden de afinidad era $\text{CH}_3\text{CO} > \text{CH}_3\text{CO} > \text{CH}_3\text{CO}$. Por lo tanto, cabe ahora preguntarse, cuál es el único factor de diferencia entre estos sustratos que puede ser

ser que ClAF es pres. no... no inhibía nada.
(en varias ocasiones se... inhibe activación!!) Mientras que
con Ach y BuCh la inhibición es muy pronunciada.

Evidentemente que una característica diferencial de...
cada de BzCh con respecto a Ach y BuCh es su mayor volumen mole-
cular.

Otra experiencia que nos hace pensar en la existencia
de algún factor estérico en la inhibición, es que empleando dife-
rancia de ClAF, se observa también que los
de inhibición con Ach > BuCh > BzCh; pero la BzCh no anula com-
pletamente la inhibición o activa algo como con ClAF, sino que
en éste caso el de inhibición es menor que para BuCh o Ach.

Es decir que parecería ser que existe una interacción
estérica alguna entre el inhibidor y el sustrato; y no que uno de
ellos ocupa un lugar dado primero y luego no se distorsiona con
la interacción del otro.

Esta interpretación está de acuerdo con el hecho obs-
vado de que el de inhibición BzCh < BuCh < Ach se obtiene, ya sea
incubando primero la enzima con el inhibidor o la enzima con el
sustrato. Es decir que el mismo estado final se logra en ambos
sentidos.

Es notable que los mismos resultados puedan interpretarse
se como que la inhibición se debe a la presencia de grupos fenilos,
por algún tipo de afinidad especial (ej. fuerzas de Van der Waals)
para con la enzima.

En éste caso el efecto protector de la BzCh se puede in-
terpretar como producido por... por afinidad de su fenilo por
... con respecto a Cl F. El diferente comportamiento...
diferencia de ClAF, frente a BuCh:...
deberse tal vez a que la primera posee dos fenilos y...
... mayor afinidad para la enzima que ClAF.

Las experiencias realizadas no permiten discernir si la reacción es sobre grupo SH a la presencia de grupos funcionales, otra posibilidad.

Para poder decidir entre ambas, habría que estudiar otros reactivos con grupos SH alifáticos ya sea alquilantes, aromáticos o mercuriales.

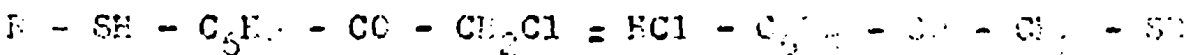
4º) Reversibilidad de la inhibición

El comportamiento de la enzima inhibida por Cl a la dilución y la diálisis prueba claramente la reversibilidad de la misma.

Además se ha visto que el arroyado posterior de Cl a sistema que contenía inhibidor, sustituyendo la enzima y su actividad era nula, al variar con Cl.

Este resultado no excluye la posibilidad de que en la inhibición comparta un mecanismo con el de la hipótesis de que la reacción inhibitoria es sobre grupo SH.

Ello se debe a que en la misma se genera un complejo muy estable y por lo tanto irreversible.



En cambio si la inhibición depende de la presencia de un grupo amino u otra característica a el relacionar, podría ser esta reversible.

Habría que decidir entre ambas posibilidades estudiando un agente alquilante alifático potente, puesto que desafortunadamente según literatura, el acetato no la inhibe.

El problema parece ser más complicado de lo que lo expuesto parecería indicar, dado que la experiencia de de se estudió la variación de inhibición con la concentración de ClF los resultados indican una acción irreversible.

6^o Resultados "in vivo"

Los valores obtenidos con los "tipos" de colinesterasa o sea la pseudocolinesterasa de plasma y la acetilcolinesterasa de cerebro, demostraron que en las condiciones empleadas: 1^o) la colinesterasa plasmática se inhibe "in vivo" marcadamente, aproximadamente un 66 % ; 2^o) la acetilcolinesterasa de cerebro de ratón no parece afectarse apreciablemente.

Los datos de inhibición por ClAF de la enzima de plasma "in vivo" podrían adjudicarle cierto rol en el proceso de intoxicación, puesto que se acercan a valores obtenidos en intoxicaciones con algunos tóxicos fosforados (ver tabla N^o 9 (33))

Tabla N^o 9Niveles de ChE (%) en sangre de animales intoxicados

compuesto	especie	ruta	1 ^{os} síntomas	cerca de la muerte
DFP	conejo	i-v	35 %	3 %
DFP	rata	oral	-	10 %
Sarin	hombre	oral	22 %	-
TEPP	perro	i-v	38 %	4 %
TEPP	hombre	i-m	19 %	-
TEPP	rata	oral	-	29 %
EPN	rata	oral	-	17 %
Paration	rata	oral	-	20 %
Schradan	rata	oral	-	27 %

Sin embargo, los síntomas de la intoxicación por ClAF no responden a los de la acción parasimpaticomimética que producen los tóxicos fosforados anti-colinesterasa, lo cual hace suponer que otras acciones de ClAF que no son sobre colinesterasa, determinan su acción tóxica.

Es muy probable que el efecto que produce, sea similar al del iodoacetato y los agentes alquilantes del tipo iperitas

de azufre o nitrógeno; o sea que inhiben la glicólisis en el músculo.

Se sabe que pequeñas dosis de inhibidores directos de la colinesterasa, ya sean compuestos del tipo fosforado o no, causan miosis cuando entran en contacto con el ojo (33).

Es importante que el inhibidor sea liposoluble, puesto que será mejor absorbido.(79)

Se produce recién miosis cuando la actividad de la ChE en el músculo del esfínter de la pupila cae por debajo del 15% de la normal (80).

También se ha demostrado que se necesitan mayores concentraciones de inhibidor para producir lacrimación, por inhibición de la ChE de la glándula lacrimal, que la necesaria para producir miosis (36).

Dado que ClAF es perfectamente liposoluble, el hecho de que produzca lacrimación sin generar miosis, indica que su mecanismo de acción no está basado en una inhibición de la ChE.

Esta conclusión concuerda con la expuesta por Facq (81) quien manifestó que la secreción producida por la acción de los lacrimógenos era independiente del sistema nervioso.

-CONCLUSIONES-

Del comportamiento de la ChE de suero humano y otros tipos de ChE, frente a diversos compuestos tóxicos tiol-privos a zinc, arsenicales y mercuriales se concluye que:

1º) La ChE de suero humano, no es una enzima típica. Sulfhidrúlica; aunque es muy probable que posea en su molécula un grupo SH tal que, al reaccionar con estos compuestos disminuya su actividad catalítica. Otros tipos de interacción entre los tóxicos ensayados y la enzima son también probables. El grupo reaccionante (SH o n°) no está ubicado en el centro activo de la enzima y el producto de reacción de éste con ClAF es reversible por diálisis, dilución y es desplazado por la BzCh.

2º) Los resultados de inhibición de ChE de suero humano "in vitro" hacen poco probable la hipótesis de que la lacrimación y la toxicidad general de ClAF se deban a una acción sobre la ChE. Los resultados "in vivo" sobre ChE de suero y cerebro de rata y los de córnea humana, indican que la ChE no es responsable de la acción tóxica local y general de los compuestos con actividad lacrimatoria.

3º) La acción de ClAF sobre otros sistemas enzimáticos "in vitro" indicaría como probable lugar de la "lesión bioquímica", varias enzimas del metabolismo de los Hidratos de Carbono.

Estos trabajos han sido realizados en la Sección Biológica del Laboratorio de Química y Metalurgia perteneciente al Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas.



JOSE ALBERTO CASTRO



Dr. FERNANDO GAUDY

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi sincero reconocimiento a mi padrino de tesis Dr. Fernando Gaudy por haberme guiado técnicamente en la ejecución de éste trabajo. Pero mucho más aún por el afecto y los sabios consejos que me dió, como persona con experiencia de la vida.

Debo expresar mi gratitud a mis amigos y colaboradores, O. Maza, H. Godoy, E. Charreau y a mi esposa, por sus inapreciables esfuerzos, durante la ejecución de éste trabajo.

Ellos fueron quienes me hicieron más leves los problemas de conseguir animales de laboratorio, cuidarlos y trabajar con ellos. También estuvieron presentes en la redacción de éste trabajo, ya sea haciéndome la "crítica" oportuna o corrigiendo la frase desacertada.

Además participaron activamente en la tarea titánica de pasar los escritos a máquina, reordenar bibliografía, hacer copias heliográficas, compaginar etc. Resumiendo, lo que han hecho, es mucho más de lo que se le puede pedir a alguien que "sólo es un simple amigo".

Mi agradecimiento más sincero al Dr. M.A. Rúveda y Sra E. M. de Moutier por haberme provisto de el di-isopropil-fluorfosfato, w-cloroacetofenona y bromoacetato de etilo, por ellos sintetizados; y por brindarme su colaboración en los problemas que se presentaron.

A la Dirección del Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las FF.AA. y en especial al Sr. Director del Laboratorio de Química a él perteneciente, Sr. Jorge D. Plater por el apoyo material y moral brindado.

Al Dr. Omar Guagnini por haberme permitido continuar con éstos trabajos, dentro del esquema de la Cátedra de Toxicología.

logía y Química Legal de la cual es actual Profesor.

Al Dr. Pedro Cattaneo por la confianza en mí depositada en momentos que más la necesitaba, espero con mi esfuerzo no haberla defraudado.

A los Dres Jorge F. Frattini, Andrés Casset y E. Gaya Noya, por haberme provisto de suero humano.

A los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, por haberme permitido exponer éste trabajo en uno de sus seminarios habituales, lo que contribuyó grandemente a esclarecer y ordenar mis ideas.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Gravilescu N. y Peters R. - Biochem. J. 25, 2150, 1931
- 2) O'Brien R. - Toxic phosphorus esters- Academic Press, New York 1960.
- 3) Peters y col. - Biochem. J. 40, 516, 1946 - Nature 150, 610 1945.
- 4) Peters R. - Disc. Faraday Soc. Nº 20, 1955
- 5) Peters R. - John Hopkins Hosp. Bull 97, 21 1955.
- 6) Dixon y col. - Reports to the Ministry of supply 1940-1946.
- 7) Aldridge W. - Enzymes and drug action.-Little Brown y Co Boston 1962.
- 8) Litter. - Farmacología - El Ateneo, 1963.
- 9) Handbook of toxicology. - Vol. III, W. Saunders Co. 1959.
- 10) Rees K. - Enzymes and drug action - Little Brown y Co - Boston 1962.
- 11) Bacq Z. y Alexander P. - Fundamentals of Radiobiology, Butterworths 1955.
- 12) Dixon M. y webb E. - Enzymes - Longmans Green y Co. Londres 1958
- 13) Augustinsson K.B. - Acta Physiol. Scand. Vol. 15, Suplemento 52.
- 14) Mounter y Whittaker. - Biochem. J. 53, 167 1953.
- 15) Hargreaves A.B. - Arch. Biochem. Biophys. 57, 41 1955.
- 16) Sartori M. - Chimica delle sostanze aggressive- U.Hoepli Milan 1933.
- 17) Ford-Moore A.H. Lermitt L. Stratford C. - J. Chem. Soc. 1776 1953.
- 18) Castro J.A. y Castro C.R. de - Anales Asoc. Quim. Arg. sept. 1963- En prensa.
- 19) Jørgensen K. - Scandinv. J. Clin & Lab. Investigation 282 11, 1959.
- 20) Dixon M. - Biochemical Society Symposium Nº 2- Cambridge University Press 1948.
- 21) Wróblewski-La Due. - J.S. Proc. Soc. exp N.Y. 90, 1955, 210
- 22) Laudahn. - Boletín técnico Boehringer
- 23) Giusti. - Boll. Soc. Ital. Sper. 34, 1957, 1958.

- 24) Wolfson S.K. y Williams-Ashman H.G. - Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 96, 231 1957.
- 25) Massey V. - Biochem. J. 51, 490 1952.
- 26) Reitman S. y Frankel S. - Amer. J. Clin. Path. 28, 1957, 56
- 27) Bruns. - Boletín técnico Boehringer.
- 28) Racker E. - Methods in Enzymology- tomo I, Academic Press, Colowick y Kaplan.
- 29) Velick S. - Methods in Enzymology- tomo I, Academic Press, Colowick y Kaplan.
- 30) Hunter A. y Downs C. - J. Biol. Chem. 157, 427 1945.
- 31) Friedenwald J. y Maengwyn-Davies. - The mechanism of enzyme action- The John Hopkins Press, Baltimore 1954, McElroy y Glass B. editor
- 32) Burch J. - Biochem. J. 58, 415 1954.
- 33) Heath D.F. - Organophosphorus Poisons, Pergamon Press 1961
- 34) Burgen A. - Brit. J. Pharmacol. 4, 219 1949.
- 35) Umbreit. - Manometric Techniques- Burgess, Publishing Co.
- 36) Scholz R.O. - J. Pharmacol. 88, 23 1946.
- 37) Nachmansohn y Lederer. - Bull. Soc. Chim. Biol. 21, 797 1939.
- 38) Nachmansohn y Lederer. - Compt. Rend. Soc. Biol. 130, 321 1939.
- 39) Wels y Repke. - Arch. Exptl. Path. Pharmacol. 204, 323 1947.
- 40) Vincent D. y Brigoo. - Bull. Soc. Chim. Biol. 28, 174 1946.
- 41) Markwardt F. - Naturwissenschaften 40, 341 (1953.
- 42) Massart y Dufait. - Enzimología 6, 282 1939.
- 43) Thompson R. - J. Physiol. 105, 370 1947.
- 44) Stadie, Riggs y Haugaard. - J. Biol. Chem. 161, 175 1945.
- 45) Augustinsson K. B. - Acta Chem. Scand. 13, 571 1959.
- 46) King y Strangeways. - J. Chem. Soc. 3043 1931.
- 47) Mackworth J. - Biochem. J. 42, 82 1948.
- 48) Barron E. y Miller Z. Bartlett G., Meyer T. y Singer T. Biochem. J. 41, 69 1947.
- 49) Barron E. y Singer T. - Science 97, 356 1943.

- 50) Boyer P.D. - The Enzymes - tomo I, Academic Press, Boyer, Lardy y Myrbäck.
- 51) Dickman S. - The Enzymes - tomo V, Academic Press, Boyer, Lardy y Myrbäck.
- 52) Stoppani A. y Brignone. - Arch. Biochem. Biophys. 60, 432 1957.
- 53) Neillands J.B. - J. Biol. Chem. 208, 225 1954.
- 54) Takenaka Yasuo y Schwert. - J. Biol. Chem. 223, 157 1956.
- 55) Dixon M. - Nature 140, 806 1937.
- 56) Wolfe R. y Neillands J. - J. Biol. Chem. 221, 61 1956.
- 57) Guzman Barron E. y Singer T. - J. Biol. Chem. 157, 221 1945
- 58) Green. - Biochem. J. 30, 2095 1936.
- 59) Lotspeich W. y Peters R. - Biochem. J. 49, 704 1951.
- 60) Wagner-Jaureg T. y Möller E. - Z. Physiol. Chem. 236, 222 1935.
- 61) Negelein E. y Wulff H. - Biochem. Z. 293, 351 1937.
- 62) Massey V. - Biochem. J. 55, 172 1953.
- 63) Favelukes G. y Stoppani A. - Biochem. Biophys. Acta 28, 654 1958.
- 64) Singer T y Guzmán Barron E. - J. Biol. Chem. 157, 241 1945.
- 65) Cohen P. - Sumner y Myrback - The Enzymes, tomo I Academic Press- Boyer Lardy y Myrback.
- 66) Rutter W.J. - The Enzymes, tomo V Academic Press- Boyer Lardy y Myrback.
- 67) Herbert D., Gordon A., Subrahmanyam V. y Green D. - Biochem J. 34, 1108 1940.
- 68) Malmström B.G. - The Enzymes, tomo V Academic Press- Boyer Lardy y Myrback.
- 69) Axelrod B. - Metabolic Pathways, tomo I Academic Press 1960
- 70) Warburg O. y Christian W. - Biochem. Z. 310, 384 1942.
- 71) Fraenkel-Conrat. - Methods in Enzymology, tomo IV Academic Press.
- 72) Goldstein y Doherty. - Arch. Biochem. Biophys. 33, 35 1951
- 73) Kauzmann W. - The mechanism of enzyme action - Mc Elroy y Glass editor, John Hopkins Press.
- 74) Wilson y Cabib E. - J. Am. Chem. Soc. 78, 202 1956.

75) J. H. ...
Pratt, C

...

... 1, 258 30.

76) Bergmeyer

...

...

77) Barrow ...
Ladenburg

...

78) McDonald ...
Cross, Colville

...

79) ...
...

...

80) ...
...

81) ...
...

82) Peters ...
Biochemical ...

...