

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA EN EL TEJIDO PULMONAR HUMANO Y SUS ALTERACIONES EN DISTINTOS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor Por la Universidad de Murcia

Pedro Martínez Moreno

2012



D. JOSE BAUTISTA TUDELA SERRANO, Catedrático de Universidad del Área Bioquímica y Biología Molecular y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, de la Universidad de Murcia,

INFORMA:

Que **"ESTUDIO** DE PROPIEDADES DE la Memoria titulada LAS ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA EN EL TEJIDO PULMONAR HUMANO Y SUS ALTERACIONES EN DISTINTOS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER **DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS**", que presenta D. Pedro Martínez Moreno para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia, ha sido realizada en los laboratorios de este Departamento, bajo la inmediata dirección y supervisión de los doctores D. Cecilio Jesús Vidal Moreno y D. Juan Cabezas Herrera, y que el Departamento ha dado su conformidad para que ésta sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 22 de mayo de 2012.

Fdo. JOSE BAUTISTA TUDELA SERRANO

Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A



D. CECILIO JESÚS VIDAL MORENO, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia, y D. JUAN CABEZAS HERRERA, Investigador del Instituto Murciano de Investigación Biomédica en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA EN EL TEJIDO PULMONAR HUMANO Y SUS ALTERACIONES EN DISTINTOS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS", ha sido realizada por D. Pedro Martínez Moreno para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A y, considerándola concluida, autorizan su presentación ante la comisión de Doctorado.

En Murcia, a 22 de mayo de 2012.

Cecilio J. Vidal Moreno

Juan Cabezas Herrera



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A UNIVERSIDAD DE MURCIA

Memoria presentada por el Licenciado D. Pedro Martínez Moreno para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia

En Murcia, a 22 de mayo de 2012.

Fdo. Pedro Martínez Moreno

Asistencia a Congresos:

Martínez-Moreno, P., Nieto-Cerón, S., Ruiz-Espejo, F., Torres-Lanzas, J., Tovar-Zapata, I., Vidal, C.J., Cabezas-Herrera, J. Acetylcholinesterase biogenesis is impaired in lung cancer tissues. VIIIth Internacional Meeting on Cholinesterases, Perugia, Italia, 2004

Martínez-Moreno, P., Nieto-Cerón, S., Torres Lanzas, J., Pons Castillo, A., Galbis Martínez, L., Del Pozo Luengo, S., Martínez-Hernández, P., Vidal Moreno C., Cabezas-Herrera, J. Descenso de la actividad butirilcolinesterasa y pérdida de componentes anfifílicos en cáncer de pulmón no microcítico. XXVIII Congreso de la SEBBM, Zaragoza 2005

Martínez-Moreno, P., Nieto-Cerón, S., Ruiz-Espejo, F., Torres-Lanzas, J., Tovar-Zapata, I., Vidal, C.J., Cabezas-Herrera, J. Acetylcholinesterase biogenesis is impaired in lung cancer tissues. Molecular markers in cancer therapy: present use and future perspectives. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid 2007

Martínez-Moreno, P., Nieto Cerón, S., Torres, J., Tovar, I., Martínez-Hernández, P., Cabezas-Herrera, J. Acetilcolinesterasa como modulador del "loop" autocrino de la acetilcolina en carcinoma de pulmón. V Jornadas Canarias de Oncología- II Conferencia Atlántica del Cáncer, Canarias, 2004.

Publicaciones presentadas:

Martínez-Moreno, P., Nieto-Cerón, S., Torres-Lanzas, J., Ruiz-Espejo, F., Tovar-Zapata, I., Martínez-Hernández, P., Rodríguez-Lopez, J.N., Vidal, C.J., Cabezas-Herrera, J. **"Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification** Carcinogénesis,A,Volumen:27 (3),Páginas inicial:429, final:436, 2006

Martínez-Moreno, P., Nieto-Cerón, S., Ruiz-Espejo, F., Torres-Lanzas, J., Tovar-Zapata, I., Vidal, C.J., Cabezas-Herrera, J. **Acetylcholinesterase biogenesis is impaired in lung cancer tissues**. Chem. Biol. Inter, Clave: A, Volumen: 157-158, Páginas, inicial:359, final:361, Fecha: 2005

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Profesor Cecilio J. Vidal Moreno, Director de esta Tesis Doctoral por darme la posibilidad de participar en su grupo de investigación.

Al Profesor Juan Cabezas Herrera, Co-director de esta Tesis. Sin su apoyo incondicional y sus ganas de aportar y transmitir sus conocimientos, los trabajos aquí recogidos nunca hubieran visto la luz. Gracias por no darme por un caso perdido.

Al Dr. Paco Ruiz Espejo por ayudarme cuando lo necesitaba y ser un punto de referencia en el camino de la investigación. Además de aportarme conocimientos me entregó su amistad y su inmenso sentido del humor.

A la Dra. Susana Nieto Cerón por su enorme disposición para enseñarme muchas de las técnicas descritas en esta memoria y el uso de la mayoría de los programas informáticos

A mis compañeros de laboratorio Ana, Aurelio, Ayoub, Liliana, Inma, Esperanza, Luis, Fernanda por la ayuda que en todo momento me prestaron.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia. En especial, a los Profesores Francisco Javier Campoy Menéndez, Encarnación Muñoz Delgado y Francisco García Cánovas, en quien encontré un trato cordial y una mano tendida.

Al Departamento de Cirugía Torácica del Hospital Virgen de la Arrixaca y de manera muy especial al Dr. Juan Torres Lanzas por su buena disposición, su trato amable y su compromiso con la investigación permitiéndome poder trabajar con muestras de tejido de pulmón. A todos los miembros del Servicio de Análisis del Hospital Virgen de la Arrixaca, que me hicieron sentir parte de su familia. En particular, a la Dra. Isabel Tovar, al Dr. Pedro Martínez Hernández, al Dr. Pedro Luis Tornell, al Dr. Paco Cañizares, a la Dra. Soledad Parra y a Jose Salmerón.

A mis compañeros de los cursos de doctorado. Muy especialmente a Carlos Gabaldón, por el aprecio que siempre me demostró.

A todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral. *A mis padres, Cecilia y Pedro, y a las mujeres de mi vida , Nuria, Ceci y Blanca*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	Х
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
ABREVIATURAS	XXI

<u>C/</u>	ΑΡΊΤΙ	ULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	1
1.	EL	CANCER	3
2.	CÁ	NCER DE PULMÓN	4
3.	2.1. 2.2. 2.3. 2.4. PR	Epidemiología Factores de riesgo Localización y estadiaje Genética del cáncer de pulmón OPIEDADADES GENERALES DE LAS COLINESTERASAS1	4 5 9 1
4.	3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 3.5. 3.6. GE	Introducción 1 Propiedades y Especificidad 1 Colinesterasas en vertebrados 1 Mecanismo catalítico y relación estructura-función 1 Estructura del centro activo 1 Inhibición de las colinesterasas 2 NÉTICA DE LAS COLINESTERASAS 2	1 2 3 5 6 1
F	4.1. 4.2. 4.3.	Estructura de los genes	:3 :4 :5
5.	5.1. 5.2. 5.3.	Introducción	0 33 55
	Ľ	5.3.1. Formas globulares anfifílicas y no anfifílicas: interacciones hidrofóbicas	6
		5.3.1.1.Formas globulares anfifílicas tipo I: Moléculas con subunidade AChE-H	17
		A) Monómeros y dímeros anfifílicos de tipo II	9

	B) Tetrámeros hidrofóbicos con subunidad de anclaje
	P (PRIMA)
-	5.3.2. Oligomerización de las subunidades de AChE
6. BI	DLOGÍA CELULAR DE LAS COLINESTERASAS
6.1. 6.2. 6.3. 6.4.	Biosíntesis y ensamblado
7. FU	NCIONES ALTERNATIVAS DE LAS COLINESTERASAS
7.1. 7.2. 7.3. 7.4.	Actividades catalíticas no colinérgicas
8. LA	S COLINESTERASAS EN DISTINTOS ESTADOS PATOLÓGICOS 54
8.1. 8.2. 8.3. 8.4. 8.5. 8.6.	Hemoglobinuria paroxismal nocturna55Defectos del tubo neural55Síndromes miasténicos56Las colinesterasas en trastornos neurodegenerativos57Las colinesterasas en las distrofias musculares59Las colinesterasas y la modulación de enfermedades asociadas al60
8.7.	Las colinesterasas y el cáncer61
OBJET <u>CAPÍT</u> 1. MA	IVOS
1.1. 1.2.	Reactivos
2. OB	TENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
2.1.	Pacientes
	2.1.1. Caracterización de los tumores pulmonares
	2.1.2. Extracción de AchE y BuChE de pulmón normal y tumoral
	2.1.3. AchE y BuChE en suero humano74
3. DE	TERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERÁSICA

	3.1. Fundamento del método de medida	. 75
	3.2. Medida de la actividad colinesterásica en cubeta	. 76
	3.3. Medida de actividad por un microensayo colorimétrico	. 77
4.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ACETILCOLINA	. 78
5.	VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	. 79
6.	ANÁLISIS DE SEDIMENTACIÓN	. 80
	6.1. Preparación de los gradientes de sacarosa	. 80
	6.2. Localización de las proteínas marcadoras	. 82
	6.3. Cálculo del coeficiente de sedimentación	. 83
7.	CONVERSIÓN DE FORMAS ANFIFILICAS EN HIDROFILICAS	. 83
8.	CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	. 84
9.	ENSAYOS CON LECTINAS INMOVILIZADAS	. 84
10	D. ELECTROFORESIS	. 85
	10.1. Preparación de los gradientes de sacarosa	. 85
	10.1.1.Preparación del gel separador y del gel concentrador	. 86
	10.1.2.Tratamiento de las muestras	. 88
	10.1.3.Aplicación de las muestras y recorrido	. 89
	10.1.4.Detección de las proteínas	. 89
11	L. WESTERN BLOT	. 90
	11.1.Electrotransferencia 11.2.Tinción de proteínas con el reactivo rojo Ponceau 11.3 Detección de las proteínas de interés con anticuernos	. 90 . 92 92
1-		02
14	2. ANALISIS DE LOS TRANSCRITOS EN POLMON NORMAL T'TOMORAL	. 93
	12.1.Extracción de ARN	. 94
	12.1.1.Medida de la concentración y pureza del ARN	. 96
	 12.2.Transcripción inversa o retrotranscripción 12.3.Amplificación de los transcritos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 12.4.Identificación de los productos amplificados en un gel de agarosa 	. 96 . 98 102
	12.4.1.Preparación de las muestras	103
	12.5.PCR a tiempo real de los transcritos de AChE y BuChE	104
	12.5.1.Sistema de detección de los productos de PCR a tiempo real	104

	12.5.2.Equipo para la PCR a tiempo real (LightCycler)
	12.5.3.Análisis de las curvas de disociación o curvas melting
	12.5.4.Cuantificación relativa de los transcritos mediante
	<i>Real-Time PCR</i> 108
	12.5.5.Tratamientos informáticos del Softwarte del LightCycler para la cuantificación relativa de los transcritos
	A) Método Fit Point112
	B) Método Second Derivative Maximum
	12.5.6.Análisis de la cuantificación relativa de los transcritos112
13	. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y CITOTOXICIDAD: MTT Y WST-8115
14	. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 117
<u>CA</u>	PÍTULO 3. RESULTADOS 119
1.	PACIENTES
2.	CONTENIDO DE PROTEÍNA123
3.	ACTIVIDAD ACHE Y BuCHE EN PIEZAS QUIRÚRGICAS DE PULMÓN SANO Y TUMORAL125
4.	NIVELES DEL NEUROTRANSMISOR ACETILCOLINA
5.	ACTIVIDADES ACHE Y BuCHE EN EL SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO128
6.	FORMAS MOLECULARES DE ACHE Y BuCHE EN TEJIDO PULMONAR SANO Y TUMORAL129
	 6.1. Componentes moleculares de AChE en adenocarcinomas de pulmón 130 6.2. Componentes moleculares de AChE en carcinomas epidermoides 132 6.3. Componentes moleculares de AChE en carcinomas de células grandes 133 6.4. Componentes moleculares de BuChE en tejidos pulmonares sanos y tumorales
7.	PROPIEDADES ANFIFÍLICAS DE LAS COLINESTERASAS DE PULMÓN 139
8.	ANCLAJE A LA MEMBRANA DE LOS DÍMEROS Y MONÓMEROS DE AChE POR GLICOFOSFATIDILINOSITOL (GPI)143
9.	INTERACCIÓN DE COLINESTERASAS DE PULMÓN SANO Y TUMORAL CON LECTINAS

10.	INMUNOENSAYOS DE COLINESTERASAS DE PULMÓN150
11.	IDENTIFICACIÓN Y VALORACIÓN DE LOS ARN MENSAJEROS DE
	PROTEÍNAS QUE COMPONEN EL SISTEMA COLINÉRGICO154
12.	ENSAYOS CON CULTIVOS DE CÉLULAS HUMANAS
<u>CA</u>	PÍTULO 4.DISCUSIÓN 167
1.	AChE Y BuChE EN TUMORES DE PULMÓN169
2.	ACTIVIDAD AChE Y BuChE EN SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN173
3.	COMPOSICIÓN DE FORMAS MOLECULARES DE ChES Y CÁNCER DE PULMÓN173
4.	PROPIEDADES DE LOS COMPONENTES DE ACHE Y BUCHE EN PULMÓN174
5.	ORIGEN DE LAS MOLÉCULAS DE AChE Y BuChE IDENTIFICADAS EN PULMÓN177
6.	INMUNODETECCIÓN DE ACHE Y BUCHE DE PULMÓN178
7.	EXPRESIÓN DE LOS GENES ACHE Y BUCHE EN PULMÓN179
8.	RELACIÓN ENTRE EL DESCENSO DE ACTIVIDAD ChE Y LA BIOLOGÍA TUMORAL DEL CARCINOMA DE PULMÓN181
<u>co</u>	<u>NCLUSIONES</u>
BIE	<u>BLIOGRAFÍA</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>CAPÍTULO 1</u>

Figura	1.1.	Anatomía de los pulmones	. 6
Figura	1.2.	Mecanismos de hidrólisis de la acetilcolinesterasa	16
Figura	1.3.	Estructura tridimensional de las colinesteresas	17
Figura	1.4.	Secuencia de aminoácidos en regiones esenciales para la	
		funcionalidad de la AChE de Torpedo.	18
Figura	1.5.	Estructura de la AChE	20
Figura	1.6.	Inhibidores de la AChE	22
Figura	1.7.	Sitios de unión para factores de transcripción hematopoyéticamente	
		activos en el locus de AChE	25
Figura	1.8.	Estructura de los genes de las colinesterasas de mamíferos	27
Figura	1.9.	Estructura del gen de la AChE mostrando el uso alternativo del	
		promotor	29
Figura	1.10.	Formas moleculares de las colinesterasas.	32
Figura	1.11.	Representación de la forma A12 de AChE	34
Figura	1.12.	Anclaje de las moléculas asimétricas de AChE a la matriz	
		extracelular	35
Figura	1.13.	Estructura del resto glicosilfosfatidilinositol (GPI) que fija la AChE a	
		la membrana	37
Figura	1.14.	Estructura de la forma molecular G4 ^A de AChE con la proteína	
		PRiMA	40
Figura	1.15.	Asociación de las subunidades AChE-H y AChE-T	42
Figura	1.16.	Regulación de la biosíntesis, maduración y transporte de las formas	
		moleculares de AChE.	44

<u>CAPÍTULO 2</u>

Figura 2.1	. Protocolo usado para extraer las Colinesterasas de pulmón humano	74
Figura 2.2	. Determinación de la actividad AChE por el método de Ellman	75
Figura 2.3	. Esquema de la reacción para la determinación de los niveles de ACh	
	mediante el método de Amplex Red	79
Figura 2.4	. Esquema del sistema para la formación de gradientes de densidad	
	continuos de sacarosa	81
Figura 2.5	. Esquema de la separación de proteínas basada en la diferencia de	
	velocidad de sedimentación	82

Figura 2.6.	Sistema de electroforesis Mini-Protean 3 de BioRad86
Figura 2.7.	Sistema de transferencia de Biorad para Western blot90
Figura 2.8.	Esquema para la purificación de ARNm empleando el kit de
	Chemagen95
Figura 2.9.	Posición de los cebadores específicos para los transcritos de AChE y
	BuChE humano
Figura 2.10	. Marcadores de ADN pGEM 103
Figura 2.11	. Unión del SYBR Green al ADN106
Figura 2.12	. Esquema del LighCycler de Roche Diagnostics
Figura 2.13	. Análisis de las curvas melting del transcrito H 108
Figura 2.14	. Cálculo de la pendiente de una curva con el Software del
	LightCycler
Figura 2.15	. Ejemplo del análisis de la cuantificación del transcrito H mediante el
	método Second Derivate Maximum113
Figura 2.16	. Ensayo de viabilidad celular con MTT115
Figura 2.17	. Mecanismo del ensayo de WST-8116

<u>CAPÍTULO 3</u>

Figura 3.1. Formas moleculares de AChE en adenocarcinoma de pulmón y tejido
adyacente no canceroso (TANC) en Brij 96130
Figura 3.2. Cambio en la migración de las formas moleculares de AChE en
adenocarcinoma de pulmón y tejido adyacente no canceroso (TANC)
en gradientes con TX-100131
Figura 3.3. Formas moleculares de AChE en carcinoma epidermiode y tejido
adyacente no canceroso (TANC)132
Figura 3.4. Formas moleculares de AChE en carcinoma de células grandes y
tejido adyacente no canceroso (TANC)134
Figura 3.5. Formas moleculares de BuChE en adenocarcinoma de pulmón y tejido
adyacente no canceroso (TANC) 135
Figura 3.6. Formas moleculares de BuChE en tumores epidermoides y tejido
adyacente no canceroso (TANC)136
Figura 3.7. Formas moleculares de BuChE en tumores de células grandes y tejido
adyacente no canceroso (TANC)137
Figura 3.8. Formas moleculares de BuChE en gradientes con Triton X-100138
Figura 3.9. Cromatografía hidrofóbica de la AChE en pulmón

Figura 3.10. Ci	romatografía hidrofóbica de la BuChE en pulmón142
Figura 3.11. Co	onversión de las formas globulares ligeras anfifílicas de AChE en
hi	idrofílicas con PIPLC144
Figura 3.12. Tr	ratamiento de la BuChE de pulmón con PIPLC145
Figura 3.13. In	nteracción con lectinas de colinesterasas del epitelio pulmonar
h	umano149
Figura 3.14. W	/estern blotting para las ChEs de pulmón sano y tumoral152
Figura 3.15. Aı	mplificación de los transcritos de colinesterasas en tejido pulmonar
sa	ino155
Figura 3.16. Co	uantificación relativa de los transcritos de AChE y BuChE en el
e	pitelio pulmonar157
Figura 3.17. Fo	ormas moleculares de AChE en células tumorales humanas en
CL	ultivo160
Figura 3.18. Fo	ormas moleculares de BuChE en células tumorales humanas en
CL	ultivo161
Figura 3.19. In	nteracción de las colinesterasas de células tumorales humanas en
CL	ultivo con lectinas163
Figura 3.20. In	nmunoblot de la AChE de células tumorales humanas en cultivo164
Figura 3.21. La	a modulación de la señalización colinérgica por carbacol afecta al
Cr	ecimiento de células tumorales humanas en cultivo
Figura 3.22. La	a modulación de la señalización colinérgica por nicotina afecta al
Cr	recimiento de células tumorales humanas en cultivo166

<u>CAPÍTULO 4</u>

Figura 4.1. Modelo de rutas o	de señalización de cáncer medidas por la	
estimulación colir	inérgica18	6

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

<u>CAPÍTULO 1</u>

Tabla 1.1. Clasificación y estadiaje del Cáno	cer de Pulmón 8
Tabla 1.2. Marcadores moleculares en NSC	LC y SCLC 10
Tabla 1.3. Propiedades y nomenclatura de	las colinesterasas 13

<u>CAPÍTULO 2</u>

Tabla 2.1. Cebadores específicos para los diversos transcritos AChE y BuChE 100

<u>CAPÍTULO 3</u>

Tabla 3.1. Concentración de Proteína en Extractos de Pulmón124
Tabla 3.2. Actividad Acetil- y Butirilcolinesterasa en tejido adyacente no
canceroso y en carcinomas de pulmón126
Tabla 3.3. Contenido de Acetilcolina en carcinomas de pulmón y tejido adyacente
no canceroso127
Tabla 3.4. Actividad Acetil- y butirilcolinesterasa en suero de pacientes con
cáncer de pulmón128
Tabla 3.5. Interacción de Colinesterasas de epitelios pulmonares con lectinas148
Tabla 3.6. Cuantificación relativa de los transcritos de Acetil- y
butirilcolinesterasa en tejidos de pulmón sano y tumoral
Tabla 3.7. Actividad Acetil- y butirilcolinesterasa en células humanas tumorales
de pulmón en cultivo159

ABREVIATURAS

1

ABREVIATURAS MÁS EMPLEADAS

Å:	Angström
A ₄ , A ₈ , A ₁₂ :	Formas asimétricas de las colinesterasas
A549:	Línea celular de pulmón, adenocarcinoma broncoalveolar
AAA:	Actividad aril-acilamidasa
Αβ:	Péptido β-amiloide
AC:	Adenocarcinoma
ACh:	Acetilcolina
AChE:	Acetilcolinesterasa (acetilcolina acetilhidrolasa, EC 3.1.1.7)
ACHE:	Gen de la AChE
AChE _s :	Acetilcolinesterasa de secreción (molécula G4 ^S)
AChE-H:	Subunidad H de AChE
AChE-R:	Subunidad R de AChE
AChE-S:	Subunidad S de AChE
AChE-T:	Subunidad T de AChE
AD:	Enfermedad de Alzheimer (del inglés, Alzheimer Disease)
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN copia
ADNf:	ADN final
ADNi:	ADN inicial
AFP:	a-fetoproteína sérica materna
Ag-Ac:	Complejo antígeno anticuerpo
ANCT:	Tejido adyacente no canceroso
ANS:	Ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico
AP2	Factor de transcripción Proteína 2 alfa (del inglés,
	Activating enhancer binding Protein 2).
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
ARP:	Péptido R (carboxilo terminal) de la subunidad R de AChE
Asp:	Ácido aspártico
ATCh:	Acetiltiocolina
BCIP :	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
β- ME:	β-mercaptoetanol
BrEt	Bromuro de etidio
Brij 96:	Polioxietilén 10-oleil éter

BSA:	Albúmina de suero bovino			
BuCh:	Butirilcolina			
BuChE:	Butirilcolinesterasa (acilcolina acilhidrolasa, EC 3.1.1.8)			
BUCHE:	Gen de la BuChE			
BuTCh:	Butiriltiocolina			
BW284C51:	Dibromuro de			
	1,5-bis-(alildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona			
C:	Catalasa			
C/EBP	Proteínas de unión potenciadoras del motivo CCAAT en los			
	promotores génicos (del inglés, Ccaat-enhancer-binding			
	proteins)			
c-erB2	Oncogén también conocido como HER2/neu			
c-fos	Proto-oncogén celular perteneciente a la familia de			
	factores de transcripción de genes de expresión rápida.			
Caco-2	Línea celular de adenocarcinoma de colon			
CHAPS:	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato			
CHAT:	Colina acetil tranferasa			
ChEs:	Colinesterasas			
CLAM:	Moléculas de adhesión similar a las Colinesterasas (del			
	inglés, Cholinesterase-Like Adhesión Molecules)			
Con A:	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>)			
CP:	Cáncer de pulmón			
Cp:	Ciclo en el que comienza a detectarse la fluorescencia en			
	PCR a tiempo real (<i>Crossing Point</i>)			
cpm:	Cuentas por minuto			
CREB:	Proteína que se une a elementos de respuesta de AMPc			
	(del inglés cAMP response element-binding)			
C16:	Anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de la			
	AChE de cerebro humano			
DEC:	Dominio extracelular			
DEPC:	Dietilpirocarbonato			
DFP:	Diisopropilfluorofosfato			
DMB:	Distrofia muscular de Becker			
DMD:	Distrofia muscular de Duchenne (del inglés, Duchenne			
	Muscular Dystrophy)			
DMSO:	Dimetilsulfóxido			
dNTPs:	Desoxinucleótidos trifosfato			
DTNB:	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico			
--	--	--	--	--
DTT:	Ditiotreitol			
E:	Eficiencia de la PCR			
E1-E6:	Exones del 1 al 6			
EB:	Eritrocito bovino			
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético			
EGTA:	Ácido etilenglicol-bis-(aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético			
Egr-1	Proteína 1 de respuesta al crecimiento temprano (del			
	inglés, Early growth response protein 1)			
EH:	Eritrocito humano			
F:	Fosfatasa alcalina (cuando se emplea como marcador en			
	los análisis de sedimentación)			
FA:	Fosfatasa alcalina			
FHB:	Racimo de cuatro hélices (del inglés, Four Helix Bundle)			
FI:	Fosfatidilinositol			
FLC-FI:	Fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol			
FLD:	Fosfolipasa D			
FRET:	Transferencia de energía fluorescente mediante resonancia			
G ₁ , G ₂ , G ₄ :	Formas globulares de las colinesterasas			
G ^A :	Molécula globular anfifílica de colinesterasa			
G ^н ։	Molécula globular hidrofílica o no anfifílica de colinesterasa			
G ₄ ^S :	Tetrámeros de acetilcolinesterasa completamente			
	hidrofílicos (AChE _s).			
g; g _{av} ; g _{máx} :	Aceleración en "g", valor medio o máximo			
GATA1	Factor de transcripción implicado en crecimiento celular y			
	cáncer.			
Gdn:	Clorhidrato de guanidina			
Glu:	Ácido glutámico			
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol			
GRE	Elementos de respuesta asociados al receptor de			
	glucocorticoides			
H0:	Primer homogenado del tejido en tampón TBS			
H1:	Segundo homogenado del tejido con tampón TBS-B			
H2:	Tercer homogenado del tejido con tampón TBS-B			
H157:	Línea celular de pulmón, carcinoma epidermoide			
H69:	Línea celular de pulmón, carcinoma de células pequeñas			
His:	Histidina			

HR2:	Anticuerpo monoclonal de ratón contra AChE humana			
IA:	Iodoacetato			
IgG o M:	Inmunoglobulina G o M			
IPA:	Isopropanol			
iso-OMPA:	Tetraisopropilpirofosforamida			
Kb:	Kilobase			
Kcat:	Constante de análisis enzimática			
KDa:	Kilodalton			
Km:	Constante de afinidad enzima-sustrato de Michaelis-			
	Menten			
LCA:	Aglutinina de lenteja (<i>Lens culinaris)</i>			
LCC:	Carcinoma de cèlulas grandes (del inglés, Large Cell			
	Carcinoma)			
LCR:	Líquido cefalorraquídeo			
mAb:	Anticuerpo monoclonal			
Mks:	Megacariocitos maduros			
MTT:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio			
Мус:	Familia de protooncogenes que regulan la transcripción de			
	otros genes			
МуоD	Proteína que interviene en la diferenciación muscular			
N19:	Anticuerpo policlonal de cabra generado frente a un			
	péptido del extremo amino de la AChE de origen humano			
N417:	Línea celular de pulmón, carcinoma de células pequeñas			
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina			
NAcGlu:	N-acetil D-glucosamina			
NBT:	Nitroblue tetrazolium			
NEM:	N-etilmaleimida			
NF-κΒ	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de			
	las células B activadas			
NMJ:	Unión neuromuscular (del inglés, Neuromuscular Junction)			
NL-1, NL-2	Neuroliguina1 y Neuroliguina2			
NSCLC:	Carcinoma de células no pequeñas			
OMS	Organización mundial de la salud			
<i>p</i> :	Mínimo error (probabilidad de aceptar la hipótesis cierta			
	cuando la cierta podría ser la hipótesis nula) al cual un			
	resultado es significativo			

P:	Subunidad estructural de 20 kDa en las moléculas G_4^A de			
	AChE y BuChE			
P1:	Primer precipitado obtenido en la homogenización con			
	tampón TBS			
P2:	Segundo precipitado obtenido en la homogenización con			
	tampón TBS-B			
P16:	Proteína supresora de tumores, conocida también como			
	CDKN2A, inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina			
p53:	Gen supresor de tumores			
PAS:	Sitio aniónico periférico			
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés,			
	Polymerase Chain Reaction)			
PIPLC:	Fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol			
PLD:	Fosfolipasa D			
PKA:	Proteína quinasa A o dependiente de AMP _C			
pNPP:	para-nitrofenilfosfato			
ProCh:	Propionilcolinesterasa			
PRIMA:	Anclaje a la membrana rico en prolina (del inglés, Proline-			
	Rich Membrane Anchor)			
PS:	Pulmón sano			
PT:	Pulmón tumoral			
PVDF:	Membrana de difluoruro de polivinilideno			
Q:	Subunidad colagénica de las formas asimétricas			
Q _N :	Extremo amino de la subunidad Q			
Q _c :	Extremo carboxilo de la subunidad Q			
Rb	Es la proteína del retinoblastoma (pRB), una proteína			
	supresora de tumores			
RCA:	Aglutinina de ricino (<i>Ricinus communis</i>)			
RE:	Retículo endoplasmático			
RER:	Retículo endoplasmático rugoso			
rpm:	Revoluciones por minuto			
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa tras una transcripción			
	inversa (del inglés, Reverse Transcriptase Polymerase			
	Chain Reaction)			
S:	Unidad Svedberg de coeficiente de sedimentación			
S1:	Primer sobrenadante obtenido con tampón TBS			
S2:	Segundo sobrenadante obtenido con tampón TBS-B			

SCC:	Carcinoma epidermoide o escamoso			
SCLC:	Carcinoma de células pequeñas			
SDAT:	Enfermedad senil tipo Alzheimer (del inglés, <i>Senile</i>			
	Dementia Alzheimer Type)			
SDS:	Dodecil sulfato sódico			
SDS-PAGE:	Electroforesis desnaturalizante con SDS, en gel de			
	poliacrilamida			
Ser:	Serina			
SFB:	Suero fetal bovino			
SK-N-SH:	Líneas celulares de neuroblastoma humano			
SP1	Factor de transcripción del desarrollo temprano de un			
	organismo.			
StRf:	Estéril y libre de RNasas			
TBE:	Tris 89mM, Ácido bórico 89mM, EDTA 2mM, pH 8.4			
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina			
TNM:	Sistema de estadio de tumores, nódulos y metástasis			
TRIS:	Tris (hidroximetil)-aminometano			
TSB:	Tampón Tris salino que contiene NaCl 1 M, MgCl ₂ 50 mM,			
	EDTA 3 mM, Tris 10 mM, pH 7.5			
TT:	Tampón de transferencia: metanol 10%, glicina 192 mM,			
	SDS 0,01%, Tris 25 mM, pH>8,3			
TTS-T:	Tampón Tris salino de bloqueo, Tris 25 mM, NaCl 0,9%,			
	pH 7,5, Tween 20 al 0,1%			
Тгр	Triptófano, un aminoácido esencial			
Triton X-100:	Polioxietilén _{9.6} p-t-octil fenol			
Tween 20:	Monolaurato de polioxietilensorbitano.			
TX-100:	Triton X-100			
Tyr:	Tirosina			
UA:	Unidades arbitrarias			
ω:	Aminoácido carboxilo terminal de AChE-H que recibe el			
	resto de GPI			
WAT:	Dominio de tetramerización anfifílica (del inglés,			
	Tryptophan Amphiphilic Tetramerization domain)			
WGA:	Lectina de germen de trigo (Triticum vulgaris)			
WST1:	Reactivo que convierte las sales de tetrazolio a formazán			

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

1. EL CÁNCER

El cáncer o neoplasia no es simplemente una enfermedad. Es una familia grande y compleja de más de 100 enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal y descontrolado de las células de un tejido particular y que pueden extenderse a otros. El cáncer se puede desarrollar en todos los órganos del cuerpo y aparecer a cualquier edad, aunque se da con más frecuencia en personas mayores de 50 años.

Las células del cuerpo se dividen y multiplican constantemente para reemplazar a las células viejas y dañadas. Algunas veces, las células comienzan a dividirse innecesariamente formando tejido en exceso conocido como un tumor. En la mayoría de los casos, los tumores son benignos, lo que significa que no son cancerosos. Según su tamaño y ubicación, los tumores benignos pueden causar algunos problemas de salud, pero no amenazan la vida.

Sin embargo, cuando una célula anormal (maligna, neoplásica) empieza a dividirse, puede formar un tumor maligno o canceroso. Ello es resultado de la acumulación de mutaciones en varios de los genes que controlan el crecimiento y la supervivencia de las células (oncogenes, genes supresores de tumor o genes que mantienen la integridad del ADN). La mayoría de los tumores malignos crecen con bastante rapidez, invadiendo órganos y tejidos cercanos. Las células cancerosas también pueden viajar a través del torrente sanguíneo a otras regiones del cuerpo. Cuando el cáncer se propaga a partir de su sitio original el proceso se denomina metástasis.

Cada cáncer es un proceso diferente ya que depende del tipo celular que lo produce, su etiología, mecanismo de desarrollo, grado de malignidad y otros factores. A nivel bioquímico, en las células y tejidos se producen anomalías que dan lugar a la aparición de una serie de marcadores tumorales.

Una célula tumoral presenta seis características principales: se divide en situaciones en las que las células normales permanecen en reposo, emitiendo sus propias señales de proliferación; no responden a las señales de inhibición del crecimiento; evaden la apoptosis; proliferan sin control; tienen la capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos para asegurar su supervivencia (angiogénesis); y son capaces de invadir tejidos cercanos e, incluso, de anidar y proliferar en otras regiones remotas (metástasis) (Hahn y Weinberg, 2002).

El cáncer es la enfermedad genética más frecuente; en los países occidentales afecta a una de cada tres personas y causa la muerte a una de cada cinco (Futreal y col., 2001). En Estados Unidos, el cáncer es la segunda causa de muerte (después de las enfermedades cardiovasculares); en 2010, se diagnosticaron más de 1,5 millones de nuevos casos (sin incluir el melanoma) y la cifra de muertes por cáncer fue mayor de 560.000 (Kohler y col., 2011).

No obstante, según la American Cancer Society, las tasas de mortalidad para las distintas clases de cáncer han ido disminuyendo en los últimos años, sobre todo entre los

hombres, quienes, en general, presentan tasas más elevadas que las mujeres. Esta disminución se debe a la caída del cáncer asociado al tabaco y a la menor mortalidad del cáncer colorrectal. La mayor concienciación por parte del público se ha traducido en un aumento del número de personas que cada año se someten a pruebas de detección de cáncer y en cambios del estilo de vida para reducir el riesgo de contraer cáncer.

2. CÁNCER DE PULMÓN

2.1. Epidemiología

El cáncer del pulmón aparece en el tejido esponjoso de los pulmones. Se divide en dos tipos principales: cáncer del pulmón de células no pequeñas y cáncer del pulmón de células pequeñas. El primero es más común y, por lo general, crece y se extiende más lentamente que el de células pequeñas.

El cáncer de pulmón sigue constituyendo un gran problema de salud pública. Es la mayor causa de muerte por cáncer en el mundo en hombres y mujeres; produce más de 5 millones de muertes al año y se estima que la cifra se duplicará en el año 2025 (Proctor, 2004).

En el año 2007, se diagnosticaron más de 200.000 nuevos casos de cáncer pulmonar en Estados Unidos. Actualmente, mueren más hombres que mujeres cada año por esta causa, pero la tasa de mortalidad sigue aumentando (Pauk y col., 2005). La incidencia de cáncer de pulmón en España es de unos 52 casos por cada 100.000 habitantes, 4 menos que la media europea, debido fundamentalmente a la tardía incorporación de las mujeres fumadoras (SEPAR, 2005). Según el Centro Nacional de Epidemiología y del Instituto de Salud Carlos III, cada año se diagnostican unos 18.500 casos nuevos y se producen unas 18.000 muertes por la misma (Situación del Cáncer en España, 2005).

La razón varón: mujer es de 4,5 en Europa y 11 en España, lo que refleja el retraso en la adquisición del hábito tabáquico y el menor riesgo laboral de las mujeres españolas. En términos de prevalencia parcial, la incidencia en los últimos cinco años se habrá traducido en unos 24.000 casos en España. La escasa diferencia entre el número de casos prevalentes e incidentes refleja la elevada mortalidad de este tumor. Aproximadamente, 6 de cada 10 personas con cáncer pulmonar han fallecido al año del diagnóstico y menos del 15% sobreviven a los cinco años del diagnóstico. Por ello, la mortalidad sigue siendo un buen indicador para estudiar la frecuencia de este tumor.

2.2. Factores de riesgo

La mayoría de los cánceres de pulmón se diagnostican entre fumadores habituales o quienes dejaron de serlo. Este hecho sugiere que el daño molecular asociado al tabaquismo produce una cascada de cambios genéticos, bioquímicos y celulares que perduran en el tiempo y que, eventualmente, conducen al cáncer, años después de dejar de fumar.

En cuanto a los factores de riesgo del cáncer de pulmón tenemos:

• El tabaco. Alrededor del 80-90% de los cánceres pulmonares en hombres y del 55-80% en mujeres se relacionan con el tabaquismo (La Vecchia y col., 2010). Ciertos agentes del tabaco, llamados carcinógenos, dañan las células pulmonares. El riesgo aumenta en proporción al número de cigarros diarios, con la profundidad de la calada y la duración del hábito. El humo de segunda mano también es un factor de riesgo.

La exposición a arsénico, asbesto, polvo radioactivo, radón y la contaminación atmosférica.

La exposición a radiaciones de fuentes laborales, médicas o ambientales

• Ciertas enfermedades pulmonares, como tuberculosis, aumentan el riesgo de cáncer de pulmón.

 El historial familiar de cáncer y la historia personal. Hay más posibilidades de que una persona con cáncer de pulmón desarrolle un segundo cáncer de que otra lo padezca por primera vez.

• La escasa ingesta de vegetales y fruta fresca, por la protección que aportan los agentes antioxidantes de estos alimentos. (Cranganu y Camporeale, 2009; Khan y col., 2010).

Aunque el número de fumadores disminuye cada año, en el año 2005 todavía fumaba el 31% de la población europea y el 34% de la española.

2.3. Localización y estadiaje

Los pulmones son los órganos esenciales del aparato respiratorio donde se realiza la oxigenación de la sangre. Están situados en la caja torácica y separados entre sí por el conjunto de órganos que constituyen el mediastino (**Figura 1.1**).

Son órganos blandos, esponjosos, flexibles, dilatables y compresibles de color rosáceo y presentan una forma de cono irregular cuyo vértice superior llega al nivel de la primera costilla y cuya base queda apoyada en el diafragma. El pulmón derecho es mayor que el izquierdo y está constituido por tres lóbulos desiguales; el pulmón izquierdo presenta dos.

En cada uno de los dos lóbulos pulmonares se distinguen diferentes segmentos, bien diferenciados, correspondiéndole a cada uno un bronquio segmentario, bronquios propiamente dichos, bronquiolos (terminales y respiratorios) y, por último, alveolos, donde se realiza el intercambio gaseoso del pulmón.



Figura 1.1. Anatomía de los pulmones

En el sistema **TNM** de estadiaje para el cáncer de pulmón, **T** indica el tamaño y lugar de asentamiento del tumor primario; **N** se refiere a la afectación ganglionar, de acuerdo con su localización; y **M** indica la presencia o ausencia de metástasis a distancia (**Tabla 1.1**.).

La cirugía continúa siendo la mejor opción para tratar el cáncer de pulmón en estadios precoces (I, II y casos seleccionados de IIIA). La precisión en el estadiaje ha conseguido reducir la tasa de toracotomías exploradoras o resecciones incompletas a menos del 10%.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica de manera histológica los tumores pulmonares en:

- Lesiones Preinvasivas
- Carcinoma in situ
- Displasia escamosa
- · Hiperplasia adenomatosa atípica
- Carcinoma de Células Pequeñas (20-25%)
- · Oat cells o células en grano de avena
- Indiferenciado
- Mixto o combinado
- Carcinoma Epidermoide o Escamoso (25-40%)
- Papilar
- Células claras
- Basaloide
- · Variante de Células Pequeñas

- Adenocarcinoma (25-40%)
- Acinar
- Papilar
- Broncoalveolar
- · Sólido con producción de mucina
- Mixto
- Carcinoma de Células Grandes (10-15%)
- Células Gigantes
- Células Claras
- Carcinoma Mixto Adenoescamoso (1.5%)
- Tumor Carcinoide (1%)
- Carcinomas de glándulas bronquiales
- · Carcinoma mucoepidermoide (0.05%)
- · Carcinoma adenoide quístico (0.04%)

De acuerdo con criterios morfológicos y resultados clínicos, la OMS clasifica el cáncer de pulmón en carcinoma de células pequeñas (small cell lung cáncer, SCLC) y no pequeñas (non-small cell lung cáncer, NSCLC). SCLC suponen el 20-25% de los casos; están muy asociados a fumadores (Khuder, 2001), son sensibles a quimioterapia y radiación, y desarrollan metástasis rápidamente. La supervivencia media tras el diagnóstico es tan solo de 2-4 meses, con detección temprana y terapia, un 10% de la población está libre de enfermedad a los 2 años, pero los 5 años la supervivencia es del 5-10%. NSCLC tiende a crecer y a diseminarse más gradualmente que SCLC. El tratamiento de elección para NSCLC es la cirugía si no hay diseminación y según sus características histológicas NSCLC se clasifica en adenocarcinomas (AC), carcinomas de células escamosas o carcinoma epidermoide (CE) y carcinomas de células grandes (CCG).

Los adenocarcinomas (AC) se dividen en dos tipos principales: 1) adenocarcinoma usual, más frecuente en mujeres y en no fumadores, de origen bronquial, localizado hacia la periferia y con menor tamaño y crecimiento más lento que los escamosos; y 2) carcinoma bronquioloalveolar, de origen en los bronquiolos terminales o paredes alveolares, supone el 1-9% de todos los cánceres de pulmón, tiene la misma frecuencia en ambos sexos y diseminación y metástasis tardía.

Los carcinomas epidermoides o escamosos (CE) son más frecuentes entre fumadores y en varones. Su origen se encuentra en los bronquios centrales mayores y, posteriormente, infiltra de modo local y produce metástasis tardías. La velocidad de crecimiento del tumor primario es mayor que en otros carcinomas. Suelen ser sólidos, con diferenciación córnea o presencia de abundantes puentes celulares.

	CATEGORÍA TNM Y CLASIFICACIÓN DE LOS ESTADÍOS							
		CAT		TULA			LUG LUTADIO	0
	Etapas T (tumor primario) en el cáncer de pulmón de células no pequeñas							
Тх	El tumor primario no puede ser evaluado o no ha sido visualizado por broncoscopia o imágenes pero sí se ha comprobado la presencia de células malignas en el esputo o secreciones bronquiales							
Т0	No hay evidencia de tumor primario							
Tis	Carcinoma in situ. El cáncer se encuentra en la capa de las células que cubren los conductos respiratorios. No se ha extendido a otros tejidos pulmonares.							
T1	El tumor tiene 3cm o menos en su mayor dimensión, rodeado por pleura pulmonar sin estar afectada y n hay evidencia broncoscópica de invasión más allá del lóbulo bronquial.							
Т2	El tumor puede tener cualquiera de las siguientes características: a) tener más de 3cm; b) compromete e bronquio principal pero no está a más de 2cm de la división de la tráquea en los dos bronquios, izquierdo derecho; c) se ha extendido a la pleura visceral; está asociado con síntomas como neumonías obstructiva o atelectasias colapso del pulmón), aunque no comprometen todo el pulmón.						de 3cm; b) compromete el s dos bronquios, izquierdo y mo neumonías obstructivas	
Τ3	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes zonas: pared torácica, diafragma, pleura mediastínica (membrana que rodea el espacio entre los dos pulmones), pericardio parietal (membrana que rodea el corazón); o un bronquio principal está afectado y el tumor está a menos de 2cm del punto de la tráquea en que se divide en los dos bronquios principales; el tumor ha crecido en los conductos respiratorios lo suficiente como para causar atelectasia (colapso pulmonar) o neumonitis obstructiva en todo el pulmón.							
Τ4	Un tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes órganos: el mediastino, el corazón, los grandes vasos, la tráquea, el esófago, la columna vertebral, o el punto en que la tráquea se divide en los dos bronquios, izquierdo y derecho. Existen dos o más tumores separados en el mismo lóbulo. Hay un tumor con derrame pleural de células malignas.							
	Etapas	N (compror	niso ganglior	ar) en	el cáncer	de pul	lmón de célula	s no pequeñas.
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados							
N0	No hay metás	tasis en los g	ganglios linfátio	cos reg	jionales			
N1 N2 N3	 N1 Se ha extendido a los ganglios linfáticos dentro del pulmón, ganglios linfáticos hiliares. La propagación afecta sólo a los ganglios linfáticos del mismo lado del pulmón canceroso N2 Metástasis a los ganglios linfáticos mediastínicos, aquellos que se encuentran en el punto en que la tráquea se divide en los dos bronquios. Todavía se mantiene en el lado del pulmón canceroso. N3 El tumor se ha extendido a los ganglios linfáticos de la clavícula en cualquiera de los dos lados, a los ganglios linfáticos hiliares o a los mediastínicos en el lado opuesto del pulmón afectado. 							
	Etapas M (metástasis distante) en el cáncer de pulmón de células no pequeñas							
Мx	Mx La presencia de metástasis distante no puede ser evaluada							
M0	<i>I</i> 0 No hay metástasis distante							
M1	M1 Existe metástasis distante. Los lugares que se consideran distantes incluyen otros lóbulos de los pulmones, ganglios linfáticos más lejanos que los que se mencionaron en las etapas N y otros órganos o tejidos, tales como el hígado, los huesos o el cerebro							
	Agrupamiento en estadíos de los subgrupos TNM							
Card	cinoma oculto	Estadío 0	Estadío I		Estadío II		Estadío III	Estadío IV
	$T_xN_0M_0$	$TisN_0M_0$	$IA T_1 N_0 M_0$	IIA	$T_1N_1M_0$	IIIA	$T_1N_2M_0$	Cualquier T. cualquier N. M₁
			$\textbf{IB} \ T_2 N_0 M_0$	IIB	$T_2N_1M_0$		$T_2N_2M_0$	
					$T_3N_0M_0$		$T_3N_1M_0$	
						JIID		
						ШВ	T4Cualquier NM	
L								,

Tabla 1.1. Clasificación y Estadiaje del Cáncer de Pulmón

En cuanto a los carcinomas de células grandes (CCG), se encuentran formados por células más poligonales, de mayor tamaño que el resto de los carcinomas (el doble que las células pequeñas), con núcleos vesiculosos y son variantes mal diferenciadas de AC y CE.

Mientras la media de supervivencia para los carcinomas distintos de los de pulmón ha mejorado notablemente en la última década, la media de supervivencia de cáncer de pulmón a los 5 años sigue siendo muy baja (13-15%), a pesar de las innovaciones en el diagnóstico, pruebas, cirugía, técnicas quirúrgicas y tratamientos de quimioterapia. Los pobres resultados del cáncer de pulmón, comparado con otros tumores, podrían estar relacionados con peculiaridades de la biología broncopulmonar. La mejor comprensión de los mecanismos moleculares que llevan a las distintas clases de cánceres de pulmón podría abrir el camino a nuevas terapias para mejorar tanto la supervivencia como la calidad de vida del paciente.

Los carcinomas de células pequeñas (SCLC) y muchos de células no pequeñas (NSCLC) muestran características neuroendocrinas, incluyendo la producción de neuropéptidos, que junto con la expresión de receptores de la superficie celular producen ciclos repetidos de crecimiento celular (Khuder, 2001).

La señalización colinérgica es necesaria para el desarrollo del pulmón (Hoo y col., 1998) y para el crecimiento celular (Song y col., 2003; West y col., 2004). Prueba de ello es la acción mitogénica de la nicotina sobre las células de pulmón. Mediante la activación de ciclos autocrinos y paracrinos, la acetilcolina (ACh) posiblemente altera el crecimiento de las células de pulmón.

2.4. Genética del Cáncer de Pulmón

La patogénesis del CP conlleva la acumulación de múltiples anomalías moleculares durante mucho tiempo (Knudson, 2002; Peto y col., 1975). Las alteraciones pueden ocurrir a nivel de los genes silenciadores (vía metilación), cambios en la secuencia de DNA, amplificación o delección de segmentos del DNA, y/o ganancia o pérdida de cromosomas enteros. Los cambios ocurren al principio, en tejidos de apariencia normal, esto es que no tienen las características de las células cancerosas.

La alteración genética temprana más frecuente en el cáncer de células no pequeñas (NSCLC) es la pérdida de regiones genómicas en los cromosomas 3p y 9p, delección en brazos cromosómicos de 5p y mutaciones de p53 y K-ras (Thiberville y col., 1995). Las pérdidas en las regiones 3p y 9p has sido reconocidas como sucesos tempranos en la transformación tumoral, como lo demuestra su aparición en lesiones preinvasivas (Sundaresan y col., 1995) y en tejidos aparentemente normales de fumadores (Mao y col., 1997; Wistuba y col., 1997). En cambio, las mutaciones en p53 y K-ras aparecen en las últimas etapas de la preneoplasia o en lesiones invasivas. Otras alteraciones frecuentes son las amplificaciones de las regiones largas del

brazo q del cromosoma 3 tanto en carcinomas invasivos (Massion y col., 2002) como en lesiones preinvasivas (Massion y col., 2003).

Actualmente, se están buscando e identificando cambios genéticos específicos en células tumorales relacionadas con anomalías cromosómicas, inactivación de genes supresores de tumores específicos, la activación de oncogenes específicos, la expresión de receptores de hormonas y la producción del factor de crecimiento tumoral asociado con el desarrollo del cáncer.

Se ha encontrado una relación entre el pronóstico del CP de células no pequeñas y la actividad telomerasa, de tal modo que una actividad telomerasa elevada es un mal pronóstico con elevada recurrencia y mortalidad (Chen y col., 2006).

La finalización del proyecto genoma humano y la posibilidad de utilizar nuevas técnicas (microarrays) facilitarán el descubrimiento de anomalías genéticas pre-invasivas e invasivas en cáncer de pulmón y el hallazgo de marcadores que faciliten la detección precoz.

MARCADORES MOLECULARES EN NSCLC					
GENES	ALTERACIÓN	FRECUENCIA	PRONÓSTICO		
	Sobreexpresión				
P53	Mutación	30-70%	En discusión		
	Delección				
c-erB2	Sobreexpresión	30%	En discusión		
K-ras	Mutación	30-80%	En discusión		
BCL2	Sobreexpresión	10-35%	En discusión		
P16	Mutación	70%	Se desconoce		
Rb	Delección	15 200/	En discusión		
	Mutación	13-30-70			

MARCADORES MOLECULARES EN SCLC					
GENES	ALTERACIÓN	FRECUENCIA	PRONÓSTICO		
myc	Amplificación	20-40% *	En discusión		
p53	Mutación	90%	En discusión		
	Sobreexpresión	50%			
BCL2	Sobreexpresión	75-95%	En discusión		
Rb	Mutación	0.0%	No		
	Delección	90%			

 Tabla 1.2. Marcadores Moleculares en NSCLC y SCLC. Resultados procedentes de tumores

 o de líneas celulares (*).

1. Introducción y Objetivos

3. PROPIEDADES GENERALES DE LAS COLINESTERASAS

3.1. Introducción

Las colinesterasas (ChEs) son las enzimas responsables de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh), liberado en las sinapsis colinérgicas. Su hallazgo se remonta a principios del siglo XX, cuando se inician las investigaciones para establecer los mecanismos de la transmisión sináptica y para estudiar sus componentes, localización, naturaleza y función. En 1914, Dale propuso la existencia de la acetilcolina (ACh) y seis años más tarde Loewi demostró que la ACh era el neurotransmisor de las uniones neuromusculares en vertebrados. En 1926 Loewi y Navratil (Loewi y Navratil, 1926) demostraron la existencia de una enzima en los tejidos excitables que hidrolizaba la ACh con gran eficiencia, la acetilcolinesterasa (AChE). Más tarde, en 1938 Marnay y Nachmansohn detectaron altas concentraciones de acetilcolinesterasa (AChE) en las uniones neuromusculares de diversos mamíferos y en los órganos eléctricos de *Torpedo* y *Electrophorus* (Marnay y Nachmansohn, 1937),(Marnay y Nachmansohn, 1938) lo que asentó el papel de esta enzima en los mecanismos de transmisión colinérgica.

Los investigadores concluyeron que la AChE era esencial para que la ACh liberada tras la estimulación nerviosa asociada con la transmisión neuromuscular, se eliminara de forma inmediata, dentro de los límites del periodo refractario (unos pocos milisegundos).

El estudio de la biología celular y molecular de AChE, su distribución en los tejidos y los aspectos relativos a su funcionalidad se han visto favorecidos por la alta eficiencia catalítica de la enzima, la sensibilidad y precisión de los ensayos de espectrofotometría (Ellman y col., 1961) y radiometría (Johnson y Russell, 1975), así como por la calidad de los métodos histoquímicos (Karnovsky y Roots, 1964).

Hechos como la clonación de los genes de acetilcolinesterasa (Schumacher y col., 1986; Sikorav y col., 1987) y butirilcolinesterasa (Arpagaus y col., 1990), la resolución de la estructura tridimensional para la AChE de *Torpedo* (Sussman y col., 1991a), mamífero (Marchot y col., 1996b; Marchot y col., 1996a), y *Drosophila* (Harel y col., 2000), así como el establecimiento del modelo tridimensional de la BuChE humana (Nachon y col., 2002) han permitido el diseño de nuevos plaguicidas, menos tóxicos para humanos y vertebrados y más selectivos para insectos nocivos. Además, el descubrimiento de la participación de las ChEs en procesos no relacionados con la neurotransmisión, tales como la morfogénesis, hematopoyesis, tumorogénesis y apoptosis (Brimijoin y Koenigsberger, 1999; Grisaru y col., 1999a; Layer y Willbold, 1995; Soreq y Seidman, 2001; Yang y col., 2002), han supuesto un fuerte impulso a las investigaciones centradas en las acciones no colinérgicas de las colinesterasas

3.2. Propiedades y Especificidad

Las colinesterasas hidrolizan ésteres de colina a mayor velocidad que otros ésteres, comparando la velocidad de hidrólisis en condiciones óptimas de concentración de sustrato, pH y fuerza iónica, en preparaciones libres de otras esterasas. Todas las esterasas que presentan esta especificidad se inhiben con pequeñas cantidades (10-5 M) de fisostigmina, un alcaloide natural conocido también como eserina. Las ChEs se incluyen en el grupo de las serín-hidrolasas (pues contienen serina en el centro activo) y, por tanto, se inhiben de forma irreversible por compuestos organofosforados.

Aunque está plenamente aceptada la división de las ChEs en acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, de acuerdo con el sustrato preferente (Silver, 1974), tal división resulta un tanto imprecisa ya que sólo los vertebrados superiores poseen ambas colinesterasas, cada una codificada por su propio gen (Tabla 1.3).

El término acetilcolinesterasa (AChE), o acetilcolina: acetil-hidrolasa (E.C. 3.1.1.7), se aplica a las enzimas que hidrolizan con preferencia acetilcolina o sus tioanálogos. En cambio, los términos butirilcolinesterasa (BuChE) o acilcolina: acilhidrolasa (E.C. 3.1.1.8), colinesterasa plasmática, pseudocolinesterasa o colinesterasa no específica, se reservan para las enzimas que actúan de modo más eficiente sobre ésteres sintéticos (butirilcolina, propionilcolina o sus tioanálogos).

Acetilcolina

Butirilcolina

Otro criterio que distingue AChE de BuChE es la afinidad por ciertos inhibidores selectivos. AChE se inhibe fuertemente por BW284C51, mientras que etopropazina, iso-OMPA y bambuterol reducen la actividad BuChE. Además, AChE se inhibe por exceso de sustrato, lo que no le ocurre a la BuChE.

AChE y BuChE se diferencian también en el tamaño de la subunidad catalítica (ligeramente superior en BuChE) y en su inmunoreactividad. En general, los anticuerpos contra AChE o BuChE no dan reacción cruzada (Brimijoin y Rakonczay, 1986), salvo algunas excepciones (Dreyfus y col., 1988).

	ACETILCOLINESTERASA	BUTIRILCOLINESTERASA
Nombre sistemático	Acetilcolina: acetilhidrolasa	Acilcolina:acilhidrolasa
Número de la E.C.	3.1.1.7	3.1.1.8
Sustrato óptimo	Acetilcolina	Butiril o propionilcolina
Exceso de sustrato	Inhibición	No inhibición
Butiril- o benzoilcolina	No sustrato	Sustrato
D-Acetil-β-metilcolina	Sustrato	No sustrato
pH óptimo	7,5 - 8,0	8,5
Inhibición por BW284c51	Inhibición fuerte	Inhibición débil
Inhibición por etopropazina	Inhibición débil	Inhibición fuerte
Tejidos con alta actividad	Hematíes, tejido nervioso, timo, placenta	Suero sanguíneo, páncreas, hígado

Tabla 1.3. Propiedades y nomenclatura de las colinesterasas.

3.3. Colinesterasas en Vertebrados

Aunque todos los organismos animales expresan enzimas capaces de hidrolizar ACh (Silver, 1974), no todas pueden denominarse ChEs, según la definición aceptada. Mientras los vertebrados poseen un solo gen de AChE, en invertebrados existe una gran variedad en cuanto al número de genes que codifican "colinesterasas". En *Drosophila melanogaster* hay un sólo gen y en *Caenorhabditis elegans* cuatro. Además, en los invertebrados la preferencia por el sustrato es intermedia entre AChE y BuChE (Hall y Spierer, 1986).

La dualidad AChE/BuChE está presente en los vertebrados superiores, y su origen, probablemente proceda de la duplicación de un gen en un ancestro de los gnatostomados (Toutant y col., 1985a). De hecho, en el músculo de algunos peces se ha encontrado, además de la actividad AChE, una actividad intermedia (Brodbeck y col., 1973; Leibel, 1988b; Leibel, 1988a; Stieger y col., 1989a; Yassine y col., 1991). En el pez *Torpedo*, un elasmobranquio, la afinidad por el sustrato no permite diferenciar entre ambas ChEs, ya que BuChE hidroliza mejor ACh que propionil (ProCh) o butirilcolina (BuCh) (Toutant y col., 1985b), mientras que el ciclóstomo *Pretromyzon marinus* sólo tiene AChE (Pezzementi y col., 1987)

Parece que no hay una correspondencia directa entre AChE y BuChE, y su localización en los tejidos (Edwards y Brimijoin, 1982) (Tabla 1.2). AChE predomina en el músculo y en el sistema nervioso de vertebrados (Marnay y Nachmansohn, 1937; Marnay y Nachmansohn, 1938), en donde está acompañada por una pequeña cantidad de BuChE (Chatonnet y Lockridge, 1989; Li y col., 2000), especialmente en estadíos tempranos del desarrollo. Lo cierto

es que, al menos en vertebrados, todos los tejidos tienen cantidades variables de AChE y BuChE, aunque la relación de actividades AChE/BuChE depende del tipo de tejido y de la especie animal que se estudie.

Todos los fluidos biológicos, excepto lágrimas, sudor y orina, contienen actividades AChE y BuChE y su detección en algunos fluidos puede tener importancia desde el punto de vista clínico. Así, el nivel de actividad AChE en el líquido amniótico sirve para diagnosticar anomalías en el desarrollo del tubo neural en fetos (Dale y col., 1981). Un descenso en la relación de actividades AChE/BuChE del líquido cefalorraquídeo puede indicar un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Tornel y col., 1993; Tornel y Vidal, 1991).

Si bien es lógica la expresión de actividad AChE en los tejidos neurales, sorprende su presencia en la totalidad de los tejidos, sean o no excitables y con independencia del estadio de desarrollo (embrionario o adulto) (Layer y Willbold, 1995). Así, se ha medido actividad AChE en hígado (Gomez y col., 2000), células de la sangre: eritrocitos (Vidal, 1996), linfocitos (Kawashima y Takeshi, 2000) y plaquetas (Martin-Valmaseda y col., 1995), timo (Rossi y col., 1991), bazo (Nieto-Ceron y col., 2004), placenta (Rama Sastry, 1997), y células epiteliales normales (Taisne y col., 1997; Ummenhofer y col., 1998) y tumorales (Vidal, 1996). Por otra parte, también se ha observado amplificación y/o expresión aberrante del gen *ACHE* (que codifica a la enzima humana) en varios tejidos neoplásicos y líneas celulares tumorales (Soreq y Zakut, 1993).(Soreq y Zakut, 1990a; Zakut y col., 1988b; Zakut y col., 1990)

Casi todos los tejidos tienen actividad BuChE, excepto eritrocitos, linfocitos y placenta; abunda en hígado (donde es sintetizada y vertida al plasma), corazón y cerebro.

Mientras que el papel de AChE en la transmisión colinérgica es incuestionable, aún se desconoce la función principal de BuChE. Por su abundancia en el plasma sanguíneo, se ha sugerido que participa en procesos de detoxificación (Reddy y col., 1990). Además, como sucede con AChE, diversos sistemas celulares proliferativos muestran elevada actividad BuChE, tales como las células del sistema hematopoyético y ciertas células tumorales (Soreq y Zakut, 1993).

Dado que la BuChE puede actuar sobre numerosos sustratos, se ha sugerido que la elevada cantidad de BuChE que circula libremente en el plasma de los mamíferos ejerce una función protectora, bien hidrolizando agentes tóxicos ingeridos oralmente, bien eliminando la propia ACh vertida a la sangre, con el fin de prevenir acciones nicotínicas o muscarínicas no deseadas. A pesar de las numerosas variantes alélicas de BuChE en humanos, parece que la actividad BuChE no es imprescindible pues no se han observado anomalías fisiológicas o cambios patológicos en individuos deficientes o desprovistos de BuChE (Grisaru y col., 1999a; Layer, 1995; Layer y Willbold, 1995; Soreq y col., 1994b; Soreq y Seidman, 2001).

3.4. Mecanismo Catalítico y Relación Estructura-Función

Las colinesterasas figuran entre las enzimas de acción más rápida. Su eficiencia catalítica sólo está limitada por la difusión molecular (límite máximo teórico impuesto para la catálisis de una enzima) (Hasinoff, 1982; Quinn, 1987). Una sola molécula (o cada subunidad) de AChE es capaz de hidrolizar unas 25,000 moléculas de ACh por segundo, esto es una molécula de ACh en menos de 0.05 milisegundos. La eficiencia catalítica de la AChE sólo se ve superada por la catalasa. Dada su distribución en la naturaleza, el estudio de su mecanismo catalítico no sólo es importante desde el punto de vista teórico sino también a nivel práctico, porque las ChEs son el blanco de algunos pesticidas y gases nerviosos usados en la "guerra química", con fatales consecuencias para los humanos (Main, 1979; Padilla y col., 1995).

El conocimiento pleno de su modo de acción permitiría obtener agentes terapéuticos y antídotos para administrar en casos de envenenamiento por organofosforados (Li y col., 1995). También se podrían conseguir plaguicidas selectivos contra el sistema nervioso de insectos indeseables, sin alterar la cadena trófica e incluso diseñar nuevos inhibidores de AChE, más efectivos que los disponibles actualmente (tacrina, rivastigmina, donepezil y galantamina) para mejorar la función colinérgica en el sistema nervioso central (SNC) y aliviar el déficit cognitivo en los pacientes con Alzheimer (Giacobini, 1997).

Tanto el mecanismo de hidrólisis de un sustrato acil-colina (ChO-COR) por parte de una ChE (EnzOH), como la base de la inhibición por organosfosforados podrían esquematizarse según se muestra en la **Figura 1.2** (Schwarz y col., 1995a).

En la primera etapa, la enzima se une al sustrato, de modo que el grupo acilo queda unido covalentemente a la serina del centro activo (Ser200 en *Torpedo* o Ser203 en mamíferos) (Rachinsky y col., 1990). Se rompe el enlace éster del sustrato, se libera la colina y se produce un intermedio acil-enzima (Rosenberry, 1975). En la segunda etapa interviene una molécula de agua para liberar el grupo acilo y la enzima (**Esquema A**).

En el **esquema B** se detalla la base molecular de la toxicidad por organofosforados (XPO(OR₂R₃). Los organofosforados incorporan un grupo fosfato a la Ser catalítica, en lugar del resto acilo que aporta el sustrato natural. Se forma así un enlace covalente entre el fósforo nucleofílico y la serina, que se hidroliza muy lentamente o casi nada (Aldridge y Reiner, 1972). La incapacidad de la enzima-fosforilada para hidrolizar ACh conlleva su acumulación en las sinapsis colinérgicas, la sobre-activación de los receptores nicotínicos y muscarínicos, la interrupción de la transmisión nerviosa y el deterioro de la función pulmonar y cardíaca, que eventualmente lleva a la muerte, de ahí la fuerte toxicidad de los compuestos organofosforados. Sólo un agente nucleofílico muy potente (representado como B, por ejemplo, una oxima cuaternaria o un ión fluoruro) puede desplazar al organofosforado de la Ser catalítica (Schwarz y col., 1995b).

 $ChO-COR + EnzOH \longrightarrow EnzO-COR + ChOH$



B) Fosforilación y reactivación :

XPO(OR')2 + EnzOH → EnzO-PO(OR')2 + HX

EnzO-PO(OR')2 + B: \rightarrow B-PO(OR')2 + EnzOH

 $EnzO-COR + OH \longrightarrow OOCR + EnzOH$



Figura 1.2. Mecanismo de hidrólisis de la acetilcolinesterasa. A. Catálisis de un sustrato acil-colina. **B.** Inhibición por organofosforados.

3.5. Estructura del Centro Activo

La cristalización de la AChE dimérica de *Torpedo* (Sussman y col., 1988) y el posterior análisis estructural mediante técnicas de difracción de rayos X (Sussman y col., 1991b) han sido decisivos para conocer con detalle la topología del sitio activo y el mecanismo de catálisis.

La estructura terciaria de la subunidad de AChE es parecida a la de otras serína-hidrolasas, y coincide en lo esencial con el modelo propuesto a partir de los resultados de dicroísmo circular (Manavalan y col., 1985) y espectroscopía Raman (Aslanian y col., 1987; Aslanian y col., 1991). Estos estudios revelan que los monómeros de AChE de mamífero (AChEm) y *Torpedo* tienen forma elipsoidal con dimensiones 45x60x65 Å (Sussman y Silman,

1992). Aunque muchas de las proteínas de la familia difieren en su secuencia primaria, todas comparten las líneas maestras del plegamiento. La topología común consiste en una estructura central con 8-11 hebras tipo β dispuestas de forma paralela y flanqueadas por hélices a (Krejci y col., 1991; Ollis y col., 1992; Sussman y col., 1991b). La triada catalítica queda en el interior de una estructura globular compacta (**Figura 1.3**).





El análisis por cristalografía de rayos X ha revelado la composición de la triada catalítica: Ser200, confirmada por marcaje con DFP radiactivo, posterior digestión con tripsina y análisis de los péptidos generados (MacPhee-Quigley y col., 1985; Schumacher y col., 1986); His440, identificada por estudios de mutagénesis (Gibney y col., 1990); y Glu327 (Sussman y col., 1991b). La triada Glu-His-Ser es responsable de la hidrólisis del sustrato, aumentando el carácter nucleofílico del grupo hidroxilo de la Ser200 y facilitando la transferencia de protones durante la catálisis. La Ser200 se sitúa cerca del fondo de un canal estrecho y profundo, de unos 20 Å, proyectado hacia el interior de la proteína. En todas las moléculas de AChE secuenciadas hasta ahora (excepto en *Electrophorus*), se conservan los aminoácidos próximos a la Ser catalítica, en particular el hexapéptido PheGlyGluSerAlaGly. Esta secuencia existe también en otros miembros de la familia de las serín-hidrolasas (**Figura. 1.4**).



Figura 1.4. Secuencia de aminoácidos en regiones esenciales para la funcionalidad de la AChE de Torpedo. Se muestra la composición de los aminoácidos del centro activo y del sitio aniónico periférico. Los aminoácidos de la triada catalítica se señalan con asterisco. Los restos que participan de alguna manera en la catálisis aparecen subrayados. También se indican los sitios potenciales de N-glicosilación (CHO) y las cisteínas que forman enlaces disulfuro inter o intracatenarios. La región C-terminal varía en función del procesamiento alternativo en el extremo 3' del gen. Se incluyen las abreviaturas de los aminoácidos. (Tomado de (Massoulie y col., 1993).

Según el modelo clásico, el centro activo de la AChE está compuesto por dos subsitios:

El subsitio aniónico, con carga negativa, en donde el grupo amonio cuaternario del sustrato se fija a la enzima por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, de modo que el enlace éster queda perfectamente alineado y próximo a la Ser del centro activo.

El subsitio esterásico, en donde se localiza la Ser que participa en la separación de colina y acetato (Wilson y Bergman, 1950).

El primer paso del mecanismo catalítico es la formación del complejo Michaelis-Menten (enzima-sustrato), para lo cual el sustrato interacciona con la Ser200, concretamente con el oxígeno del hidroxilo. En la AChE, el canal de acceso al sitio catalítico está tapizado por 14

1. Introducción y Objetivos

aminoácidos aromáticos, un 40% de la superficie total (Cygler y col., 1993; Sussman y col., 1991b). Se genera así un microambiente de anillos aromáticos ("guía aromática") que facilita la difusión del sustrato hacia el sitio activo (Sussman y col., 1991b). En cambio, el hueco homólogo de la BuChE sólo tiene 8 restos aromáticos (Harel y col., 1992).

En el canal por donde pasa el sustrato hay algunos restos ácidos, entre los que se encuentran Asp276 y Glu278, en la boca de entrada formando parte de un sitio periférico, Asp72 en el dominio del subsitio aniónico y Glu199 en la parte más interna, en el subcentro esterásico.

De esta forma, desde la boca del canal se extiende un poderoso campo electrostático, que proporciona la fuerza que, primero atrae, y luego conduce a la ACh al fondo del canal, en donde más tarde se re-orienta para quedar perfectamente acoplada al centro activo con la ayuda de los grupos aromáticos.

El mecanismo típico de las triadas de serín-hidrolasas con Asp-His-Ser (Blow y col., 1969) contempla la transferencia de dos protones, ya que la triada catalítica funciona principalmente como fuente y sumidero de protones (catálisis ácido-base).

El dominio catalítico está compuesto por varios subdominios en las regiones Nterminal y C-terminal, que sin llegar a solaparse, mantienen un estrecho contacto entre sí. La interacción es notable en el sitio periférico, de modo que las mutaciones en esta región comprometen la estabilidad y flexibilidad de la proteína. Ello sugiere que tanto la actividad catalítica de AChE como su especificidad por el sustrato vienen determinadas por movimientos dinámicos de la estructura proteica y no por una adaptación fija entre el centro activo y sus ligandos, según la hipótesis de "llave y cerradura" (**Figura 1.5**) (Morel y col., 1999).

Estos datos coinciden con las propuestas teóricas basadas en la dinámica proteica, que sugieren la existencia de una ruta alternativa, denominada "puerta trasera" (del inglés, *back door*), mediante la cual la colina abandonaría el centro activo. Se evitarían así los problemas de tráfico entre las moléculas que salen y las que entran por el pasillo catalítico (Kronman y col., 1994). Los detractores de esta idea se basan en los datos de mutagénesis dirigida (Kronman y col., 1994), pero lo cierto es que los ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales apoyan fuertemente esta hipótesis (Simon y col., 1999).

Se ha propuesto que AChE tiene otra región, el sitio aniónico periférico (PAS), del que carece la BuChE. Está situado en la superficie de la proteína, cerca de la entrada del pasillo catalítico, y engloba diferentes sitios de unión para activadores e inhibidores alostéricos (Bourne y col., 2003). El mecanismo molecular por el cual el PAS se acopla con el centro activo, para modular la catálisis, no se ha aclarado del todo. El PAS colabora en la unión de sustratos con carga positiva, y en su posterior orientación hacia el centro activo, mediante la formación de dipolos electrostáticos entre restos de la proteína cargados negativamente y el sustrato catiónico. Parece que el PAS está implicado en el fenómeno de inhibición por exceso de sustrato. Los



Figura 1.5. Estructura de la AChE. El esquema muestra la localización del centro activo (AS), el sitio aniónico periférico (PAS), los puentes disulfuro (verde) y los sitios de N-glicosilación (átomos de oxígeno y nitrógeno en rojo y azul, respectivamente). Tomado de (Bourne y col., 2006).

estudios con AChE humana han revelado los restos que conforman el PAS: el Trp279, la Tyr70 y la Tyr121. Estos aminoácidos son de gran importancia en la fijación de ligandos al sitio aniónico periférico. Se cree que existe comunicación entre el PAS y el centro activo de la AChE; numerosas pruebas apoyan que en la conexión participa el Asp72, dado que interviene en procesos que ocurren en ambos sitios de la molécula. También es posible que el Asp74, cercano a la boca del hueco catalítico, informe al centro activo de la ocupación del sitio periférico mediante el resto Tyr334, al que se liga por puente de hidrógeno, y que sea éste último el que transmita la información al aminoácido Phe330. La Phe330 se localiza en el subsitio hidrofóbico y su rotación, impulsada por el movimiento de Tyr431, impide el acceso de otros ligandos al sitio activo (Barak y col., 1994; Ordentlich y col., 1993; Shafferman y col., 1992). Por otro lado, algunos datos sugieren que los aminoácidos Trp279 del PAS y Trp84 del centro activo se comunican entre sí. Se ha propuesto que el intercambio de información entre esos dos restos decide la orientación que adopta Trp84, lo que puede facilitar o entorpecer la estabilización de

1. Introducción y Objetivos

los complejos enzima-sustrato. No obstante, todavía no se ha podido demostrar que el Trp279 esté realmente implicado en la inhibición por exceso de sustrato característica de la AChE

Así mismo, la capacidad del PAS para unir cationes podría explicar la dependencia de la hidrólisis de ACh con la fuerza iónica del medio, a través de variaciones en Kcat y Km para la AChE que podrían ser importantes para su función fisiológica en las sinapsis (Berman y Nowak, 1992). También se ha propuesto la implicación del PAS en las asociaciones proteicas heterólogas que ocurren en los procesos de sinaptogénesis o neurodegeneración. La capacidad de unir ligandos al PAS, que tiene la AChE pero no la BuChE, puede ser de gran utilidad para diseñar nuevos compuestos capaces de inhibir a la AChE en mayor o menor medida, sin afectar a la BuChE (Lewis y col., 2002).

De la similitud entre los sitios activos de AChE y BuChE se infiere que los mecanismos de acción de estas enzimas también deben ser muy semejantes. La BuChE humana y la AChE de *Torpedo* tienen un número de aminoácidos parecido, muchos de los cuales se han conservado. Esto ha permitido diseñar un modelo tridimensional de BuChE (Harel y col., 1992), que predice una estructura mínimamente reordenada respecto a la de AChE. El modelo conserva la triada catalítica, pero no el número de aminoácidos aromáticos en las paredes del hueco catalítico (ocho en lugar de catorce). Las diferencias en la composición y conformación del hueco explicarían la mayor capacidad de BuChE, respecto a AChE, para alojar sustratos artificiales voluminosos y de diferente naturaleza (Masson y col., 1998). Sin ninguna prueba concluyente sobre la existencia de un sitio aniónico periférico en la BuChE, todo indica que el mecanismo de catálisis es esencialmente el mismo para AChE y BuChE, salvo en lo referente a la regulación por el PAS.

3.6. Inhibición de las colinesterasas

El uso de diversos inhibidores ha sido de gran ayuda para conocer la estructura del centro activo de las ChEs. El subsitio aniónico fue descubierto gracias a los carbamatos fisostigmina y prostigmina, que se comportan como inhibidores competitivos de AChE (Wilson y Bergman, 1950). Aunque difieren en su estructura (fisostigmina es una amina terciaria mientras que la prostigmina posee un grupo amonio cuaternario, **Figura 1.6**), ambos impiden la unión de ACh en el rango de pH en el que los carbamatos poseen carga positiva. Este subsitio aniónico es también el blanco de otros inhibidores reversibles de AChE, tales como el edrofonio y la tacrina.

En cambio, los inhibidores irreversibles se unen al centro activo de la AChE, reaccionan con la Ser catalítica y actúan como verdaderos sustratos de la enzima. Dentro de este grupo destacan los agentes organofosforados, como el diisopropilfluorofosfato (DFP) y el ecotiopato, y los organosulfatos, como la dimetoxona.



Figura 1.6. Inhibidores de AChE. El efecto inhibidor de fisostigmina, prostigmina, edrofonio y tacrina sobre la AChE reside en su capacidad de unión al sitio aniónico del centro activo. El propidio, en cambio, interacciona con el centro aniónico periférico (PAS). Los compuestos bis-cuaternarios decametonio y BW284c51 pueden fijarse a los dos centros aniónicos.

La existencia de los sitios aniónicos periféricos se puso de manifiesto al comprobar que la unión de la AChE con el inhibidor reversible propidio no impedía la unión simultánea de otros inhibidores al sitio catalítico, lo que llevó a pensar que quizás este sitio periférico podría estar relacionado con el fenómeno de inhibición alostérica que manifiesta la AChE. A su vez, existen inhibidores bis-amonio cuaternario, que poseen la capacidad de unirse a los dos centros aniónicos, el periférico y el principal, siempre y cuando los grupos amonio disten entre sí al menos 14 Å. Este es el caso del decametonio y el BW284c51, que se erigen como potentes inhibidores específicos de la AChE.

4. GENÉTICA DE LAS COLINESTERASAS

4.1. Estructura de los Genes

El número de genes que codifican las colinesterasas varía en función del organismo. Mientras que la mayoría de los invertebrados poseen un solo gen para AChE (*Drosophila*) (Fournier y col., 1992), en *Culex (Sutherland y col., 1997)* y en el cefalocordado *Amphioxus* hay dos (Sutherland y col., 1997), y en el nematodo *Caenorhabditis elegans* hay cuatro genes, aunque la mayor parte de la actividad enzimática procede de la expresión de uno de ellos (Arpagaus y col., 1998; Combes y col., 2001; Grauso y col., 1998).

En vertebrados, el gen *ACHE* fue clonado por primera vez del órgano eléctrico de *Torpedo* (Schumacher y col., 1986; Sikorav y col., 1987), donde se identificó un solo gen. Lo mismo se observó poco después en ratón (Li y col., 1991; Rachinsky y col., 1990). Más tarde se identificaron en pollo dos clases de subunidades con tamaños de 100 kDa y 110 kDa, debido a las variantes alélicas del mismo gen (Randall y col., 1994).

Las subunidades catalíticas de AChE y BuChE en vertebrados están codificadas por dos genes distintos, *ACHE y BUCHE* (Soreq y Zakut, 1993; Taylor y Radic, 1994). Ambos genes muestran una organización similar en exones e intrones, pero difieren en la composición de nucleótidos; *ACHE* es rico en pares de guanina-citosina (G+C), mientras que *BUCHE* lo es en adenina-timina (A+T) (Chatonnet y Jbilo, 1991; Chatonnet y Lockridge, 1989). Es posible que la duplicación del gen ancestral que originó los genes ACHE y BUCHE ocurriese antes de la evolución de los primeros vertebrados (Soreq y Zakut, 1990b; Taylor, 1991); al proceso inicial le debió seguir otro de divergencia que produjo cambios en la composición de bases, según la expresión específica de los genes en los tejidos. La identificación de dos genes distintos, uno para AChE y otro para BuChE, en todos los vertebrados estudiados sugiere que ambas proteínas son necesarias para su supervivencia y que, previsiblemente, desarrollan funciones distintas.

El gen de AChE humana se localiza en la región q22 del cromosoma 7 (Ehrlich y col., 1992; Getman y col., 1992) y el de BuChE se sitúa en dos cromosomas, en el 3 (3q26) (Gnatt y col., 1991) que codifica la subunidad catalítica de BuChE (gen CHE1) y también en el cromosoma 16, del que se desconoce totalmente su significado biológico.

El gen *ACHE* humano tiene un tamaño de 7 Kb e incluye 6 exones y 4 intrones; el exón 1 no se traduce pero alberga dos orígenes de transcripción; los exones 2, 3 y 4 constituyen la mayor parte de la secuencia codificadora invariable (4.5-4.7 Kb), y aportan toda la información necesaria para producir una proteína catalíticamente activa (en *Torpedo* son dos los exones que generan el dominio catalítico). El ensamblado alternativo de los exones 5 y 6, en el extremo 3', proporciona varios ARNm, cuyos productos proteicos difieren en el extremo C-terminal. La región C-terminal es responsable del polimorfismo molecular de AChE (Massoulie, 2002).

El gen *BUCHE* es mucho mayor (73 Kb) que el gen *ACHE* y está formado por 4 exones: el primero no se traduce pero incluye dos sitios potenciales de inicio de la transcripción; el exón 2 contiene la mayor parte de la secuencia codificadora (83%) e incluye el extremo N-terminal, el centro activo y posiblemente un tercer sitio de inicio de la traducción; el exón 3 es de pequeño tamaño; y por último, el exón 4 codifica el extremo C-terminal. Además, el gen presenta tres intrones, el intrón 1, de tamaño pequeño (6.5 Kb), y los intrones 2 y 3 de unas 32 Kb cada uno (Arpagaus y col., 1990; Gnatt y col., 1991).

4.2. Elementos de Control

Una vez establecida la existencia de un solo gen para AChE en vertebrados, mediante pruebas de clonación y análisis de *Southern blot*, se propuso la existencia de distintos elementos que regulan su expresión en distintos tejidos y tipos celulares y que son responsables, en parte, de la diversidad de formas moleculares. El promotor de *ACHE* incluye una región de 596 pares de bases, la cual es esencial para la expresión del gen en tejidos sanos y posee secuencias consenso para la unión de varios factores de transcripción (Ben Aziz-Aloya y col., 1993; Getman y col., 1995)

Muchas de estas secuencias corresponden a genes que se expresan de manera específica en aquellos tejidos o tipos celulares en los que abunda la AChE. Entre éstas figuran secuencias aceptoras de factores de transcripción propios del sistema nervioso, como Egr-1, CREB y AP2, secuencias asociadas con la expresión génica específica del músculo (factor MyoD), y los motivos Zeste, GAGA y USF, conocidos como sitios de reconocimiento para genes inducidos durante el desarrollo embrionario (Aziz-Aloya y col., 1993). Sin embargo, como la secuencia promotora no explica por sí sola la complejidad del patrón de expresión del gen *ACHE* humano en cada tejido particular, se ha propuesto la presencia en el gen de elementos de control adicionales (Schwarz y col., 1995a).

El promotor incluye, entre otros, motivos consenso para AML1/Runx1, un factor asociado a la leucemia (Perry y col., 2002), y para c-fos, otro factor de transcripción conocido por regular la expresión del gen *ACHE* bajo condiciones de estrés (Kaufer y col., 1998); 17Kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de *ACHE* existe un dominio de potenciamiento distal que incluye sitios de unión a factores osteogénicos, tales como el 17β-estradiol y la 1,25-

dihidroxivitamina D3, un elemento de respuesta a corticoides, y sitios de unión para NF- κ B, cfos y C/EBP (Shapira y col., 2000). A su vez, el control transcripcional de la producción de AChE depende de un potenciador interno, situado en el primer intrón, que contiene sitios consenso de unión para AP2, SP1, NF- κ B y GATA1 (Chan y col., 1999). Todas estas áreas en el locus *ACHE* están consideradas como controladores potenciales de la expresión del gen *ACHE* en tumores cerebrales. En la **Figura 1.7** se muestran los sitios de unión para los factores de transcripción hematopoyéticos en el potenciador distal, en el promotor proximal y en el dominio potenciador del intrón-1 de AChE. Estos incluyen motivos altamente conservados de actuación cis de AP1, NF- κ B, HNF3, Stat5, LMO2, SP1 y GATA3, así como los elementos palindrómicos de respuesta a glucocorticoides (GRE).



Figura 1.7. Sitios de unión de algunos factores de transcripción hematopoyéticamente activos en el locus de AChE. En la figura se muestran los motivos de unión de factores de transcripción hematopoyéticos y relacionados con el estrés, localizados en las distintas áreas del gen AChE (Perry y col., 2002).

La expresión coordinada de los genes que codifican al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) y a AChE en las sinapsis colinérgicas (Kristt y Kasper, 1983) refleja un control preciso de la expresión de diversos genes implicados en la síntesis de las proteínas que participan en la sinapsis.

4.3. Ensamblado Alternativo de Exones

La eliminación de secuencias no codificantes del transcrito primario (intrones) y el posterior ensamblado de las secuencias adyacentes (exones) representa un nuevo nivel de control de la expresión de la AChE en los tejidos.

La estructura primaria de la subunidad catalítica madura de las ChEs está constituida por un dominio común grande, de unos 540 aminoácidos, seguido de una región C-terminal pequeña, variable y muy importante por su papel en la oligomerización de las subunidades y en el destino celular de las mismas. El dominio común muestra gran homología en todas las ChEs de invertebrados y vertebrados.

El origen del polimorfismo de la AChE en mamíferos y *Torpedo* reside en el ensamblado alternativo de los exones finales para generar los ARNm maduros en los que el exón E4 se une al E5, al E6 o al pseudointrón I4. Además, el procesamiento postraduccional de la AChE, que comprende cambios fuertemente regulados a lo largo del desarrollo del tejido y es específico de cada tipo celular, contribuye a la variedad de formas moleculares, a través de la glicosilación, incorporación de restos de glicosilfosfatidilinositol (GPI), asociación de subunidades entre sí y con proteínas estructurales no catalíticas. El estado de agregación de las subunidades catalíticas y la adición o no de subunidades estructurales son factores que determinan las propiedades hidrodinámicas de las moléculas de AChE y su localización subcelular.

Así, en mamíferos y *Torpedo* se han hallado tres transcritos diferentes, que se originan por la reorganización de los exones del gen *ACHE*, denominados transcritos T, H y R. En los tres casos, el polipéptido codificado consta de unos 540 aminoácidos, y muestra elevada homología en todas las ChEs de invertebrados y vertebrados.

El transcrito T (del inglés, *tailed*) lleva los exones (E1) -E2-E3-E4-E6. Al eliminar el intrón I4 y el exón E5, en el extremo C-terminal aparece una región de 40 aminoácidos (41 en BuChE) denominada péptido T o WAT (del inglés *tryptophan amphiphilic tetramerization domain*), que presenta una cisteína (en la posición -4 en vertebrados) y varias series de restos aromáticos. Dicha cisteína genera enlaces disulfuro entre subunidades catalíticas o entre subunidades catalíticas y no catalíticas. Las moléculas de AChE con subunidades T se localizan principalmente en cerebro y músculo de mamífero. El péptido T aporta propiedades hidrofóbicas a la proteína, así como la capacidad para formar asociaciones cuaternarias. Mientras que el péptido T parece estar implicado exclusivamente en el proceso de tetramerización, en la dimerización interviene una zona común para las subunidades H y T.

Las subunidades AChE-T generan monómeros anfifílicos (G_1^A) , dímeros anfifílicos (G_2^A) , tetrámeros anfifílicos (G_4^A) , tetrámeros no anfifílicos (G_4^{NA}) y una especie intracelular no anfifílica (de 13,5 S, probablemente un hexámero) (Bon y Massoulié, 1997). También producen las asociaciones heteroméricas de tetrámeros de AChE con la subunidad colagénica Q (ColQ) (moléculas *collagen-tailed*) o con una subunidad de anclaje a la membrana rico en prolina (PRiMA; del inglés *Proline-rich membrane anchor*) (moléculas ancladas a la membrana).

El ARNm (E1)-E2-E3-E4-E5-(E6), el transcrito H (*hydrophobic*), genera subunidades H que forman los dímeros anfifílicos tipo I. Estos dímeros llevan restos de glicosilfosfatidilinositol



(GPI), uno por cada subunidad de AChE, mediante los cuales los dímeros (y monómeros) son capaces de fijarse a la superficie de las células hematopoyéticas (**Figura. 1.8**).

Figura 1.8. Estructura de los genes de las colinesterasas de mamíferos. El esquema muestra las subunidades de AChE producidas por ensamblado alternativo de los exones comunes (1, 2, 3 y 4) (de color rojo), que poseen toda la información necesaria para generar un polipéptido catalíticamente activo, y los exones alternativos 5 o 6 (en diferentes colores), que proporcionan la región C-terminal responsable de las propiedades hidrodinámicas de la subunidad y del modo de anclaje a las membranas. Los intrones se muestran de color blanco, a excepción del pseudointrón I4. Se acepta que todas las formas moleculares de BuChE derivan de un solo transcrito.

En mamíferos, aunque el exón E6 permanece unido al E5, no se lee, ya que la secuencia E5 contiene un codón de terminación. La región C-terminal hidrofóbica o péptido H (de 31 aminoácidos en humanos) tiene una o dos cisteínas próximas al dominio catalítico, que establecen uniones intercatenarias por puente disulfuro, y una señal para la sustitución enzimática de gran parte del péptido (29 restos) por un resto GPI (Turner, 1994).

El péptido H contiene además un sitio de corte denominado ω , que pasa a ser el resto C-terminal de la proteína madura y está localizado aguas arriba de una secuencia hidrofóbica. La falta de homología entre los péptidos H de la AChE de *Drosophila*, *Torpedo* y mamíferos, indica que admite ciertas variaciones siempre y cuando el péptido H contenga tres elementos indispensables: el resto de Cys, un sitio de corte ω y una secuencia hidrofóbica.

La subunidad H se expresa en varios tejidos de *Torpedo* (músculos, órgano eléctrico) y de mamíferos, en las células hematopoyéticas, donde degrada cualquier resto de acetilcolina

1. Introducción y Objetivos

presente en la corriente sanguínea. Los transcritos H y su proteína producto, la AChE con anclaje de GPI, no se han detectado en peces teleósteos, reptiles o aves.

Por último, encontramos el tercer tipo de transcrito, el R (*readthrough*). Dicho transcrito se ha identificado en *Torpedo* (Sikorav y col., 1988), mamíferos (Legay y col., 1993) y en varias líneas celulares tumorales (Karpel y col., 1994; Karpel y col., 1996). Normalmente, no se detecta en cerebro de ratones adultos, pero aparece en situaciones de estrés. El transcrito R tiene la particularidad de mantener la secuencia intrónica I4 en el extremo 3' que sigue al último exón codificante del dominio catalítico, E4. De este modo, la organización del ARNm (maduro) es (E1)-E2-E3-E4-I4-(E5)-(E6). La secuencia codificadora incluye E4 y una parte de I4, donde un codón de parada señala el final de la traducción. Estudios experimentales han desvelado que la supresión antisentido de AChE-R reduce la migración neuronal y favorece la proliferación de células progenitoras; la sobreexpresión de AChE-R no ejerce afecto alguno (Dori y col., 2005).

El extremo C-terminal de la subunidad R consta de 30 aminoácidos (péptido R o ARP) y carece de Cys para formar enlaces disulfuro con otras subunidades catalíticas y/o estructurales. Como la subunidad R no tiene secuencias hidrofóbicas expuestas para interaccionar con los fosfolípidos de las membranas, es probable que las subunidades permanezcan como monómeros solubles. El producto R, se ha encontrado en *Torpedo* y en mamíferos y su péptido ARP se observó en tejidos embrionarios y cerebro de ratón adulto (Massoulie y col., 2005).

Se ha observado una sobreexpresión de transcritos R en cerebro de ratones expuestos a agentes anticolinesterásicos o sometidos a estrés (Kaufer y col., 1998; Meshorer y col., 2002). La Dra. Soreq y sus colaboradores atribuyen a la AChE-R, y más concretamente al péptido ARP, un papel destacado en la proliferación/diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Este hecho permitiría mantener la homeostasis hematopoyética y superar agresiones de diversa índole. Sus estudios sugieren el posible uso clínico del péptido ARP para el mantenimiento y expansión *ex vivo* de las células progenitoras (Deutsch y col., 2002; Grisaru y col., 2001).

Algunos datos indican que la AChE-R en neuronas del hipocampo interviene en la adquisición de la memoria a largo plazo, tras un período de agresión intensa (Nijholt y col., 2004). Por otra parte, parece que en el interior de las neuronas, la AChE-R interacciona con la proteína RACK1 y ambas con la quinasa CβII (PKCβII) que participa en el acondicionamiento al miedo. En ratones normales sometidos a estrés aumentan los niveles de AChE-R y PKCβII. Estos resultados sugieren que la AChE-R puede regular la funcionalidad de la PKCβII neuronal (Birikh y col., 2003).

Los dominios C-terminales de las subunidades de AChE determinan el procesamiento postraduccional y el destino de las moléculas. Si un organismo produce distintas clases de subunidades, éstas se expresan de manera específica en cada tejido o tipo celular. Por ejemplo,

1. Introducción y Objetivos

en mamífero adulto, las células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y, según la especie animal, plaquetas) producen principalmente AChE-H, mientras los tejidos nerviosos central y periférico, y los músculos expresan subunidades AChE-T (Massoulié y col., 1993). Además, en función de la especie animal, la expresión de los diversos tipos de subunidades difiere notablemente en los tejidos; *Drosophila* contiene AChE-H en su sistema nervioso, *Torpedo* posee AChE-H en sus músculos y los mamíferos expresan subunidades AChE-T en ambos tejidos.

La complejidad del polimorfismo de la AChE aumenta al considerar que, además de las variantes de ARNm que cambian en el extremo 3', y por tanto, en el extremo carboxilo terminal, otros transcritos se diferencian en el extremo 5', el que codifica el extremo amino de la proteína (Meshorer y col., 2004).(**Figura 1.9**).



Figura 1.9. Estructura del gen de la AChE mostrando el uso alternativo del promotor. Se muestran los transcritos con sus respectivas ORF (*Open Reading Frame*) para las variantes AChE-R (readthrough) y AChE-S (sináptica o variante T). Basado en Meshorer y col. 2004)

La elevada homología secuencial entre los genes *ACHE y BUCHE* sugiere que ambas enzimas desarrollan funciones fisiológicas parecidas. El gen *ACHE* tiende a duplicarse y a transcribirse en las etapas tempranas del ciclo celular. El gen incluye un dominio atenuador rico en G+C, posiblemente implicado en el control de su propia transcripción. En cambio, el gen *BUCHE* lleva secuencias codificadoras con niveles de actividad transitoriamente elevados en células en división (Soreq y col., 1990).

Hasta la fecha, se sabe poco del gen *BUCHE*. Los resultados descartan la formación de varios transcritos por ensamblado alternativo de exones. En consecuencia, se admite que todas las formas moleculares de BuChE proceden de la asociación de subunidades T, la proteína producto del único transcrito. Los datos sugieren que las proteínas de cada tejido específico

regulan el nivel de oligomerización de las subunidades de BuChE. Así, al inyectar el ARNm de BuChE (transcrito *in vitro*) en ovocitos de *Xenopus* se forman dímeros, mientras que en el tejido de origen, el mismo mensajero genera varias formas moleculares (Dreyfus y col., 1989; Soreq y col., 1989).

En humanos se han identificado distintas variantes alélicas naturales del gen *BUCHE*, como resultado de mutaciones puntuales (Furtado-Alle y col., 2008; La Du, 1989; Lockridge, 1990; Parmo-Folloni y col., 2008; Schwarz y col., 1995a; Schwarz y col., 1995b). Estas variantes difieren en la producción de enzima, estabilidad y actividad enzimática.

5. FORMAS MOLECULARES DE LAS COLINESTERASAS

5.1. Introducción

La extraordinaria diversidad molecular que muestran las ChEs procede de cambios a nivel genético, post-transcripcional y post-traduccional. Tales cambios van a ser determinantes para su localización y función en el contexto de las sinapsis colinérgicas y en regiones no sinápticas.

Las ChEs se hallan en los tejidos y fluidos biológicos como monómeros y oligómeros de subunidades catalíticas. La variedad de moléculas de AChE y BuChE procede de la agregación de subunidades catalíticas idénticas entre sí (homo-oligómeros), que a su vez pueden ligarse a proteínas estructurales, para formar hetero-oligómeros. Cada clase de molécula de AChE y BuChE corresponde a una forma molecular, entendiendo como tal la definición de la IUPAC-IUB (1971), que recomienda el uso del término "forma molecular" para proteínas derivadas de asociaciones cuaternarias que expresan la misma actividad enzimática y que no se inter-convierten de manera espontánea (Massoulié y Bon, 1982). Es importante señalar que la IUPAC recomienda el uso del término "isoenzima" para aquéllas proteínas oligoméricas cuyas subunidades procedan de genes distintos y, por tanto, con distinta secuencia polipeptídica.

El tamaño de la subunidad catalítica de AChE oscila entre 70 y 80 kDa, aunque ciertas subunidades tienen valores superiores (100-110 kDa), como ocurre con la AChE de cerebro de pollo (Rotundo, 1984a). Algunas de estas formas moleculares poseen subunidades de anclaje no catalíticas: subunidades colagénicas (subunidad Q; Apdo. 1.5.2.2) o subunidades hidrofóbicas (subunidad P; Apdo. 1.5.3.3). Se denominan formas homoméricas las que sólo presentan subunidades catalíticas y formas heteroméricas las que contienen subunidades estructurales adicionales (Massoulié y col., 1993).

1. Introducción y Objetivos

Todas las formas moleculares de AChE y BuChE se origina por procesos posttranscripcionales y post-traduccionales específicos de cada tejido y que están regulados por el desarrollo. Pese a que todas las formas moleculares muestran propiedades catalíticas similares, difieren en sus parámetros hidrodinámicos, solubilidad, interacciones iónicas o hidrofóbicas, dotación de carbohidratos y, además, en la estructura cuaternaria (probablemente el factor determinante de la localización celular preferente, según Massoulié y Bon (Massoulié y Bon, 1982). Aprovechando estas diferencias, existen diversos medios para separar los componentes moleculares de AChE y de BuChE homogeneizando los tejidos, por cromatografía de filtración en gel, sedimentación en gradientes de densidad de sacarosa y electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones no desnaturalizantes (Bon y col., 1991).

Las moléculas de AChE y BuChE se distribuyen en dos grupos muy diferentes: el de las formas asimétricas (A) y el de las formas globulares (G). Las formas G pueden ser monómeros (G₁), dímeros (G₂) o tetrámeros (G₄) de la subunidad catalítica. Las moléculas heteroméricas con la subunidad estructural P también son G₄. Las formas A, todas heteroméricas, contienen uno (A₄), dos (A₈) o tres tetrámeros catalíticos (A₁₂) asociados a una subunidad estructural o tallo de naturaleza colagénica. El subíndice señala el número de subunidades catalíticas en cada forma molecular. La **Figura 1.10** muestra las formas moleculares más representativas de AChE.

Las subunidades se clasifican como T, H o R, de acuerdo con la naturaleza del péptido C-terminal resultante del procesamiento alternativo del transcrito primario. Aunque este dominio no es esencial para la actividad catalítica, decide la organización estructural de los oligómeros y por consiguiente, su localización final.

En vertebrados superiores, las subunidades AChE-T y AChE-H son las más importantes desde el punto de vista fisiológico, porque originan las moléculas con estructuras más complejas. Las subunidades AChE-T generan varias formas homoméricas y heteroméricas. Entre las últimas figuran los tetrámeros de cerebro de mamífero, con la proteína estructural de 20 kDa (subunidad P), y las formas asimétricas de las uniones neuromusculares, con 1,2 o 3 tetrámeros ligados a una molécula particular de colágeno (subunidad Q).

La heterogeneidad estructural de AChE y de BuChE en vertebrados es parecida, como demuestra el hecho de que en todos los tejidos y especies investigados, a cada forma molecular de AChE le corresponde otra de BuChE (Chatonnet y Lockridge, 1989; Massoulie y col., 1993; Massoulié y Bon, 1982; Silman y Futerman, 1987a). El coeficiente de sedimentación de la molécula de AChE es ligeramente menor que el de su homóloga de BuChE, y lo que es más, no se han observado diferencias apreciables en el coeficiente de sedimentación de las formas de AChE (o BuChE) extraídas de distintos tejidos del mismo organismo ni en los procedentes de distintos organismos.



Figura 1.10. Formas moleculares de las colinesterasas. Se representa el gen de la AChE humana, los mensajeros maduros generados por ensamblado alternativo, y toda la variedad de formas moleculares que se obtiene de cada mensajero. El criterio básico de clasificación distingue las formas asimétricas (A) y las globulares (G). El polimorfismo molecular de la BuChE emana de un sólo transcrito y de la subunidad proteica correspondiente.
Suponiendo que el estado de agregación molecular es el responsable último de la localización celular, el polimorfismo estructural de las ChEs facilitaría el transporte, la localización y asociación estable de las enzimas en su sitio funcional. No parece que la disposición estructural represente una ventaja cinética, ya que la actividad hidrolítica de los centros activos es independiente del número y de la organización de las subunidades. Esta conclusión anterior se ve reforzada por la ausencia de cooperatividad entre las subunidades de los oligómeros (Vigny y col., 1978; Viratelle y Bernhard, 1980).

Dentro de una misma especie animal la distribución de las formas moleculares difiere mucho de un tejido a otro, hasta el punto de que cada tejido tiene una composición particular de moléculas de AChE y/o BuChE, seguramente para satisfacer sus necesidades funcionales específicas. Algunas patologías producen cambios en la distribución de los componentes moleculares de AChE y/o BuChE, lo que es importante a efectos de diagnóstico. Esto ocurre en las distrofias musculares (Cabezas-Herrera y col., 1994a; Cabezas-Herrera y col., 1997), en la enfermedad de Alzheimer (Saez-Valero y col., 1997) y en la de Hirschsprung (Caussé y col., 1987).

5.2. Formas Asimétricas

Las formas asimétricas de AChE y BuChE se caracterizan por la presencia de un tallo de colágeno, constituido por una triple hélice de tres subunidades colagénicas (Q). Como cada hélice puede contener un tetrámero de subunidades catalíticas tipo T, las formas asimétricas pueden ser A₄, A₈, y A₁₂, según lleven uno, dos o tres tetrámeros.

El tallo colagénico es rico en hidroxiprolina e hidroxilisina (Anglister y col., 1976; Rosenberry y col., 1980), sensible a colagenasa y reacciona con anticuerpos contra el colágeno (Anglister y col., 1979). En los tetrámeros unidos al tallo de colágeno, dos de las subunidades catalíticas permanecen unidas entre sí por enlace disulfuro, y las otras dos subunidades se asocian al tallo de colágeno por puentes disulfuro (Rosenberry y Richardson, 1977). Con todo, parece que las cisteínas no son imprescindibles para la unión de las subunidades catalíticas al tallo de colágeno.

La **Figura 1.11** muestra la estructura cuaternaria de la forma A₁₂ de la AChE.

Las formas asimétricas de AChE se hallan en todos los vertebrados y no han sido detectadas en invertebrados. Predominan en el músculo esquelético, y sobre todo en su placa motora (Bon y col., 1979; Fernandez y col., 1979a; Fernandez y col., 1979b). En mamíferos y aves, las formas A de AChE se localizan en músculo esquelético y cardíaco, nervio vago y ganglio periférico cervical superior (Gisiger y col., 1978; Skau y Brimijoin, 1980). En el tejido nervioso, los niveles de estas formas no superan el 1% de la actividad total de la enzima, al igual que sucede en el encéfalo de mamíferos y aves, siendo este porcentaje ligeramente mayor en peces, reptiles y anfibios.

1. Introducción y Objetivos

El hallazgo de formas asimétricas híbridas en músculo de pollos recién nacidos, en las que subunidades de AChE y BuChE están unidas a un mismo tallo colagénico, pone de relieve la similitud entre AChE y BuChE (Tsim y col., 1988b; Tsim y col., 1988a). Estas moléculas híbridas desaparecen en el pollo normal adulto (Tsim y col., 1988c), aunque permanecen en el músculo distrófico, posiblemente como restos de una organización molecular primitiva.





A baja fuerza iónica, las formas asimétricas pueden unirse a polianiones tipo glicosaminoglicano, que interaccionan con las cargas positivas del tallo colagénico (Bon y col., 1979; Bon y Massoulié, 1978). De ahí la necesidad de medios con alta concentración de sales para extraerlas de los tejidos. Esta interacción es responsable de la asociación de AChE a las cubiertas extracelulares, como la lámina basal del músculo (**Figura. 1.12**) (Hall y Kelly, 1971; Lwebuga-Mukasa y col., 1976; McMahan y col., 1978). Las formas globulares también se pueden unir a la lámina basal de esta manera, aunque con menos fuerza que las asimétricas. Además, las moléculas asimétricas pueden quedar inmovilizadas en la lámina basal del músculo por interacciones covalentes con otras proteínas, posiblemente con la participación de una transglutaminasa (Emmerling y col., 1981).

La triple hélice de colágeno de AChE contiene dos dominios HBDs (del inglés, *heparin-binding domains*), ambos incluyen la secuencia consenso (grupos de aminoácidos básicos) propio de las proteínas que se unen a heparina pero difieren en su afinidad por la misma. Es posible que los dominios HBD sean importantes a la hora de localizar las formas asimétricas en sitios específicos de la lámina basal, con el objetivo de garantizar su correcta orientación en la estructura supramolecular (Deprez y col., 2000; Deprez y Inestrosa, 1995).



Figura 1.12. Anclaje de las moléculas asimétricas de AChE a la matriz extracelular. Las formas asimétricas interaccionan con las cadenas de glicosaminoglicanos que contienen los proteoglicanos mediante el tallo colagénico, (Inestrosa y Perelman, 1990). Las formas asimétricas extraídas de los tejidos se agregan en medios con baja fuerza iónica. Sin embargo, tras un tratamiento suave con colagenasa, para eliminar la fracción distal del tallo, los productos líticos pierden la capacidad de agregación. Este hecho sugiere que la parte distal del tallo es responsable del anclaje a la matriz extracelular.

La liberación de las formas A por heparina, dermatán sulfato y condroitín sulfato, así como por heparinasas y condroitinasas, sugiere un papel específico de los proteoglicanos, heparán-sulfato y glicosaminoglicanos del grupo condroitín/dermatán sulfato en el anclaje de las formas asimétricas a la lámina basal.

5.3. Formas Globulares

Se encuadran en este grupo todas aquellas formas moleculares de AChE (o BuChE) que carecen de tallo colagénico. Las formas globulares son más abundantes y están más distribuidas en los tejidos y fluidos biológicos que las formas asimétricas, especialmente en vertebrados (Silman y Futerman, 1987b). Las formas globulares constituyen un grupo muy heterogéneo en el que, según sus propiedades hidrodinámicas, en particular el coeficiente de sedimentación, encontramos monómeros G₁ (entre 4 y 5S), dímeros G₂ (6-7S) y tetrámeros G₄ (9-11S).

Las formas G₄ de AChE y BuChE pueden ser anfifílicas o hidrofílicas, según lleven o no la subunidad hidrofóbica P. Las variantes con el péptido P son frecuentes en las membranas del sistema nervioso central (Boschetti y col., 1996; Inestrosa y col., 1987). En el órgano eléctrico de *Torpedo* aparecen complejos formados por dímeros de AChE y una proteína no catalítica (8S) (Bon y Massoulie, 1980), y en el plasma humano se han identificado monómeros de BuChE unidos de manera covalente a la albúmina (Masson, 1991).

5.3.1. Formas globulares anfifílicas y no anfifílicas.

Está plenamente demostrada la existencia de dos clases de formas globulares, las anfifílicas (G^A) y las no anfifílicas o hidrofílicas (G^{NA} o G^H).

A diferencia de las formas hidrofílicas, las moléculas anfifílicas de AChE y BuChE son capaces de fijarse en micelas de detergente o en liposomas preparados con fosfolípidos, bajo condiciones no desnaturalizantes. La razón estriba en la presencia de dominios hidrofóbicos en tales moléculas anfifílicas. Esta propiedad facilita su anclaje a las membranas y la asociación con micelas de detergente (**Figura. 1.10**). La formación de complejos enzima-detergente altera el coeficiente de sedimentación de la proteína, en mayor o menor medida, según sean las propiedades micelares del detergente (Moral-Naranjo y col., 1996), fenómeno que no ocurre, obviamente, con las moléculas hidrofílicas.

Además, se han observado cambios en el radio de Stokes y en la migración electroforética de las moléculas anfifílicas de AChE, en condiciones no desnaturalizantes (García-Ayllón y col., 1999). Por esto, usando distintos detergentes podemos conocer el comportamiento hidrodinámico de una determinada forma molecular de AChE o BuChE. Los detergentes más usados para este fin son el Triton X-100 y el Brij 96. La migración de las formas anfifílicas en un gradiente de sacarosa se retrasa si hay Triton X-100 en el medio, pero aún más si el gradiente lleva Brij 96 (que forma micelas de menor tamaño que el Triton X-100) (Cánovas-Muñoz y col., 1990; Grassi y col., 1982; Saez-Valero y col., 1993).

Normalmente, el tamaño de la enzima es mayor que el del dominio, o del componente hidrofóbico, por lo que las moléculas anfifílicas de AChE o BuChE se consideran ectoenzimas. Con digestión proteolítica limitada es posible eliminar los dominios hidrofóbicos de las ChEs. Así se liberan formas líticas catalíticamente activas, muy parecidas en tamaño a las originales, pero incapaces de asociarse con liposomas y detergentes (Moya-Quiles y col., 1992).

5.3.1.1. Formas globulares anfifílicas tipo I: Moléculas con subunidades AChE-H

Dentro de los dímeros anfifílicos de AChE, se conocen dos tipos (I y II), cada uno generado por un ARNm maduro distinto. Los dímeros y monómeros tipo I están formados por subunidades AChE-H; tienen un péptido C-terminal con una o dos cisteínas y una señal para incorporar glicosilfosfatidilinositol (GPI). El resto GPI, con etanolamina-glicano-fosfatidilinositol, se une por enlace amida al extremo carboxilo de la subunidad catalítica (Bon y col., 1988) (**Figura. 1.13**), de modo que el fosfolípido confiere propiedades anfifílicas a las moléculas de AChE y las capacita para ligarse a las membranas. El resto GPI de AChE se puede marcar con trifluoro-fenil-diazirina (Stieger y col., 1984) y, mediante tratamientos proteolíticos, se ha podido conocer su estructura y composición.



Figura 1.13. Estructura del resto glicosilfosfatidilinositol (GPI) que fija la AChE a la membrana. Los monómeros y dímeros de AChE de tipo I poseen GPI. R1 y R2 indican restos alquilo o acilo. En la AChE de eritrocito humano, el dominio hidrofóbico del glicolípido es un alquil (R1-O) acil (R2-COO) glicerol. Las flechas marcan los sitios de corte por la fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (PIPLC) (Basado en (Ferguson, 1991).

La fracción no peptídica contiene etanolamina, un glicano con 6-8 monosacáridos de composición variable (Ferguson, 1992), y fosfatidilinositol, cuyos restos de ácidos grasos saturados e insaturados quedan incluidos en la membrana.

Se han localizado formas anfifílicas G₂ tipo I de AChE en eritrocitos y linfocitos de mamíferos (Gomez y col., 2003; Low y Finean, 1977; Nieto-Ceron y col., 2005; Roberts y Rosenberry, 1985), órgano eléctrico de *Torpedo* (Futerman y col., 1983), músculo de *Xenopus*

(Inestrosa y col., 1988), riñón, hígado y timo de rata (Futerman y col., 1983) y ratón (Gomez y col., 2000; Nieto-Ceron y col., 2005), y en músculo esquelético y cardíaco de ratón (Garcia y col., 1988; Gomez y col., 1999; Moral-Naranjo y col., 2010). También se han encontrado dímeros y monómeros con GPI en células tumorales humanas (Saez-Valero y Vidal, 1995; Saez-Valero y Vidal, 1996) y monómeros en larvas de *Drosophila* (Toutant y col., 1988). No se han observado moléculas de BuChE con GPI, a excepción de un "intermedio" de colinesterasa en músculo de platija (Stieger y col., 1989b).

A pesar de que los péptidos C-terminales de las subunidades H de AChE de *Torpedo* y mamífero carecen de homología en su secuencia, tienen en común dos características funcionales: 1) la presencia de uno o dos restos de cisteína cerca del dominio catalítico, lo que permite la formación de dímeros por enlace disulfuro-intercatenario; y 2) la existencia de una región hidrofóbica en el extremo C-terminal del péptido H, precedida por una señal de corte (8-10 restos) donde puede incorporarse un resto de GPI (Massoulie, 2002).

La secreción de precursores no procesados de AChE-H puede contribuir, en parte, a la producción de AChE extracelular, como la que se encuentra en el plasma sanguíneo (Massoulie, 2002).En las células hematopoyéticas de mamíferos, la expresión de AChE-H se relaciona con la diferenciación (Lapidot-Lifson y col., 1989b; Patinkin y col., 1990). No obstante, se desconoce el significado biológico de la AChE con GPI en las células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y plaquetas), sobre todo porque su actividad varía mucho entre distintas especies animales, e incluso no aparece en las células sanguíneas de reptiles y aves.

Inmediatamente después de la síntesis de AChE en el retículo endoplásmico, la subunidad AChE-H incorpora rápidamente un resto de GPI preformado en el propio retículo. La acilación el anillo de inositol parece depender del equipo enzimático de la célula (Toutant y col., 1990), y no de la naturaleza del péptido que se elimina antes de añadir el glicofosfolípido.

La estructura del resto GPI va a depender de la maquinaria biosintética de cada célula. Por tanto, su composición varía en las formas G₂ ligadas a la membrana plasmática de varios tipos celulares o en las mismas células procedentes de diferentes mamíferos. Además, en un mismo tejido pueden coexistir varios tipos de dímeros de AChE que difieren en la fracción glucídica y/o lipídica. En humanos, el dominio hidrofóbico de los dímeros anfifílicos de AChE tipo I consiste en un alquilacilglicerol (Toutant y col., 1991; Toutant y Arpagaus, 1990)

Las fosfolipasas C específicas para el fosfatidilinositol (PIPLC) cortan la región hidrofóbica del glicolípido y convierten la enzima anfifílica en hidrofílica (Silman y Futerman, 1987a). Esta transformación no se produce cuando uno de los hidroxilos del inositol forma un éster con un resto acilo adicional. Esto ocurre en la AChE de eritrocito humano, donde un hidroxilo del inositol queda esterificado con el ácido palmítico (Roberts y col., 1988). Por esta causa, un 90% de la enzima del eritrocito humano (Toutant y col., 1989) y un 60% de la de ratón (Gomez y col., 2003) es resistente a la PIPLC. El resto acilo adicional en el inositol impide

la formación del intermedio fosfato cíclico del inositol. A pesar de que la AChE de eritrocito humano es sensible a la fosfolipasa D (PLD), la enzima resultante mantiene las propiedades anfifílicas porque el inositol conserva el resto acilo. Cuando esto sucede, se puede hidrolizar el grupo acilo adicional por tratamiento con hidroxilamina, en condiciones alcalinas. La incubación posterior con PIPLC o PLD facilita la conversión de la AChE anfifílica en hidrofílica.

Es posible que *in vivo* actúe una PIPLC endógena para liberar AChE de las membranas. Ello explicaría la presencia de abundantes formas líticas de AcHe en *Drosophila*. Por otro lado, la acción de la fosfolipasa endógena generaría diacilglicerol o alquilacilglicerol, dos segundos mensajeros activadores de la proteína quinasa C (Civenni y col., 1998).

5.3.1.2. Formas globulares derivadas de las subunidades AChE-T

Los vertebrados producen subunidades T de AChE y BuChE, las cuales generan una gran variedad de moléculas, que incluye desde monómeros, dímeros y tetrámeros sin proteínas estructurales a moléculas heteroméricas complejas (**Figura 1.10**). El péptido T de las subunidades AChE-T y BuChE-T de vertebrados está constituido por 40 y 41 aminoácidos, respectivamente (Massoulie, 2002). En ambos casos, hay un resto de cisteína en la posición –4 del extremo C-terminal, que permite la formación de enlaces disulfuro intercatenarios.

Las subunidades AChE-T producen las moléculas G_1^A , G_2^A , G_4^A , G_4^{NA} y, seguramente, un hexámero de 13,5 S, además de los tetrámeros asociados con PRiMA y ColQ.

A) Monómeros y dímeros anfifílicos de tipo II

Aunque los tejidos excitables y no-excitables expresan monómeros y dímeros anfifílicos (G_1^A y G_2^A) de AChE y BuChE, con subunidades AChE-T y BuChE-T, la relación de monómeros y dímeros de AChE (y BuChE) varía según la especie animal y el tejido que se considere.

Los dímeros de tipo II se diferencian de los de tipo I en su resistencia a las fosfolipasas y en la no agregación en medios acuosos en ausencia de detergentes. Debido a la semejanza con las propiedades de las formas anfifílicas tipo I, las moléculas homólogas pero sin GPI se denominan formas anfifílicas tipo II (**Figura. 1.10**) (Massoulie y col., 1993).

Respecto a la BuChE, se han encontrado dímeros de tipo II en células de la mucosa intestinal de rata (Sine y col., 1991). El plasma de ratón contiene pequeñas cantidades de moléculas G_2^A y G_1^A de BuChE, junto a las G_4^H , que son las formas más abundantes (Garcia-Ayllon y col., 1999a).

B) Tetrámeros hidrofóbicos con subunidad de anclaje P (PRiMA)

Son las moléculas de AChE más abundantes en el sistema nervioso de mamíferos y sus subunidades catalíticas están codificadas por el transcrito T. En el sistema nervioso, los

1. Introducción y Objetivos

tetrámeros de AChE se unen a las membranas celulares a través del PRIMA, de modo parecido a como las formas asimétricas se fijan a la lámina basal de la unión neuromuscular por la subunidad ColQ (Perrier y col., 2002).

Estos tetrámeros hidrofóbicos están constituidos por cuatro subunidades catalíticas, dos de ellas unidas entre sí por enlaces disulfuro y otros dos monómeros asociados al tallo hidrofóbico de 20 kDa por puente disulfuro. El tallo se denomina PRiMA (del inglés, *proline-rich membrane anchor*), y previamente "subunidad P". La proteína PRiMA es responsable de las propiedades anfifílicas de los tetrámeros y sirve para anclarlos a las membranas celulares del sistema nervioso (**Figura. 1.14**) (Gennari y col., 1987). Al igual que ColQ, la proteína PRiMA puede ligarse a las subunidades de BuChE. El uso de anticuerpos anti-PRiMA reveló que la proteína de anclaje formaba parte de los tetrámeros de AChE y BuChE en las membranas de cerebro, músculo y corazón de ratón (Perrier y col., 2002).



Figura. 1.14. Estructura de la forma molecular G₄^A **de AChE con la proteína PRiMA**. La proteína transmembranal PRiMA (20 kDa) sirve de anclaje a la membrana de los tetrámeros G_4^A . En la subunidad PRiMA se observan: 1) el péptido señal N-terminal, seguido de un dominio extracelular (DEC) con 5 cisteínas, una secuencia rica en prolinas (PRAD) y los sitios potenciales de N- y O-glicosilación; 2) el dominio transmembranal DTM; y 3) la zona C-terminal citoplásmica (DC), con las serinas susceptibles de fosforilación (Perrier y col., 2002).

Es importante señalar que las proteínas ColQ y PRiMA están codificadas por los genes correspondientes, que obviamente son distintos de los genes ACHE y BUCHE. Esto implica que

la cantidad de moléculas de AChE (y BuChE) con el tallo colagénico ColQ y con la proteína hidrofóbica PRiMA depende del nivel de expresión de los genes *COLQ y PRIMA*. La escasez de ColQ plenamente funcional, por mutaciones o por una menor eficiencia en la traducción de la proteína, supondrá un importante déficit de formas asimétricas en la unión neuromuscular. El resultado puede ser la aparición de patologías musculares, como es el caso de la miastenia congénita ocasionada por deficiencia de ColQ (Kimbell y col., 2004).

Por su parte, la disponibilidad de PRiMA también dependerá de la expresión del gen correspondiente. La menor expresión del transcrito PRiMA en el músculo esquelético y nervio ciático de ratones con distrofia muscular (Cabezas-Herrera y col., 2011; Moral-Naranjo y col., 2010), en comparación con la de los tejidos de ratones control, puede estar detrás de la importante reducción de los tetrámeros de AChE y BuChE anfifílicos (con PRiMA) en el músculo distrófico de ratón y humano. La deficiencia de dichos tetrámeros en la membrana superficial de la fibra muscular y neuronas puede contribuir a las anomalías funcionales observadas en el músculo esquelético y el nervio periférico de los enfermos con distrofia muscular.

Además de los tetrámeros anfifílicos de AChE (G_4^A), que suponen cerca del 80% del total de los tetrámeros, el cerebro de mamífero contiene tetrámeros hidrofílicos (G_4^H), que se extraen del tejido con alta fuerza iónica y sin detergente (Liao y col., 1994). En el cerebro humano, la actividad recuperada con alta concentración de sales alcanza un 20% de la actividad total (Saez-Valero y col., 1993). Además, en el líquido cefalorraquídeo aparece un tercer tipo de molécula tetramérica, totalmente hidrofílica. Como se libera desde el sistema nervioso central, se considera un componente de secreción (Dally y Greenfield, 1994; Tornel y col., 1993).

La mayor parte de la actividad BuChE en el SNC se debe a una molécula G_4^A , ligada a la membrana, requiere detergentes (Triton-X-100) o proteasas para su extracción y es resistente a la PIPLC (Treskatis y col., 1992).

5.3.2. Oligomerización de las subunidades de AChE.

Los dímeros formados con subunidades AChE-H poseen una estructura espacial en la que las hélices a_{7,8} y a₁₀ del dominio catalítico de una subunidad interaccionan con las correspondientes de la otra subunidad, en una zona de contacto denominada FHB (del inglés, *four-helix bundle*) (**Figura. 1.15**). Mediante mutaciones, como las sustituciones de aminoácidos, en la superficie de las hélices a se reduce la dimerización de las subunidades AChE-H y AChE-T, y se demuestra así que los dos tipos de subunidades utilizan el mismo dominio de interacción, el dominio FHB (ver **Figura. 1.15** en violeta) (Morel y col., 2001).

Los dímeros anclados por GPI sólo conservan unos pocos restos C-terminales del péptido H inicial, entre los que se incluyen la Cys que une las subunidades por puentes disulfuro. Mientras en los dímeros de AChE-H la cisteína se encuentra próxima al final del

dominio catalítico, en los de las subunidades AChE-T, la cisteína implicada en el enlace disulfuro se localiza cerca del extremo C-terminal. Si en las subunidades de AChE-H o AChE-T se sustituye la cisteína por serina se suprime la dimerización. La generación de dímeros también disminuye con subunidades truncadas, AChE-C (sin péptido H o T), pero persiste si tales subunidades retienen la Cys C-terminal (AChE-C2).

Dentro de los tetrámeros, la interfase dímero-dímero se extiende perpendicular al plano constituido por los dos haces de cuatro hélices. El pequeño bucle Ω , entre los aminoácidos Cys257-Cys272 (**Figura. 1.15**. en amarillo), está muy conservado en las moléculas de AChE junto con las hélices a adyacentes. Este bucle sobresale de la superficie de cada subunidad y se asocia con el sitio aniónico periférico de la subunidad adyacente, ocluyendo estéricamente la entrada al pozo catalítico. También existe un bucle Ω de mayor tamaño, entre los restos Cys69-Cys96 (en rosa) situado sobre la entrada al pozo.



Figura 1.15. Asociación de las subunidades AChE-H y AChE-T. Se observa cómo las hélices $a_{3,7,8}$ y a_{10} (en violeta) forman el FHB de los dímeros y tetrámeros y la interacción de los bucles Ω de cisteínas (amarillo) con el sitio aniónico periférico (PAS) de la subunidad adyacente.

6. BIOLOGÍA CELULAR DE LAS COLINESTERASAS

6.1. Biosíntesis y Ensamblado

Las colinesterasas, al igual que otras glicoproteínas de membrana y de secreción, son sintetizadas en ribosomas asociados el retículo endoplásmico rugoso (RER) como precursores inactivos. Después las subunidades de AChE y BuChE se liberan en el lumen, donde incorporan el oligoglicano base y los restos de GPI (si los hubiera), se elimina el péptido señal, las subunidades adquieren la estructura terciaria óptima, se generan los dímeros y oligómeros, y finalmente, las moléculas expresan actividad enzimática (Massoulie y col., 1993). Más tarde, los oligosacáridos se modifican en el aparato de Golgi y a menudo incorporan N-acetilglucosamina y galactosa. En función de la especie animal, las moléculas de AChE y BuChE pueden añadir ácido siálico. Al final, sólo aquellas moléculas que han completado con éxito el procesamiento de sus cadenas carbohidrato, se dirigen al exterior, como moléculas de secreción o permanecen asociadas a la superficie celular (Rotundo, 1984b).

Los estudios han revelado la existencia de depósitos de enzima inactiva en diversos tejidos. Mediante marcaje radiactivo y análisis de sedimentación se ha podido seguir el esquema de la biosíntesis de la AChE en la línea celular T28 de neuroblastoma de ratón (Lazar y col., 1984). En estas células T28 abundan las formas G_1 , mayoritariamente intracelulares, y las formas G_4 en la superficie celular. Además, las células vierten algunas formas G_1 y G_4 al medio de cultivo. Analizando la incorporación de aminoácidos radiactivos a la AChE sintetizada *de novo*, se observa que la forma G_1 se renueva rápidamente, en pocas horas, mientras que la sustitución de G_4 necesita varios días. Probablemente, cada forma proceda de varios depósitos, cada uno con diferente vida media. La actividad catalítica aparece 30 minutos después de completarse la síntesis polipeptídica. Al parecer, este periodo de latencia es necesario para que el precursor inactivo adquiriera el plegamiento adecuado y para que los puentes disulfuro estabilicen la conformación necesaria para expresar actividad.

Todo parece indicar que las diferencias estructurales entre las moléculas activas e inactivas son mínimas, lo que apunta a que la maduración del centro catalítico implica cambios conformacionales en la molécula de AChE en un estadio temprano de su biogénesis (Rotundo, 1987).

La glicosilación es útil para conocer la progresión de las ChEs a través de los diferentes compartimentos subcelulares, puesto que son conocidos los mecanismos por los que los glicanos se modifican en el aparato de Golgi. De hecho, mediante el uso de varias lectinas vegetales para identificar los monosacáridos terminales en los oligoglicanos, Rotundo fue capaz de demostrar que el ensamblaje de las formas con tallo de colágeno tiene lugar en las cisternas del Golgi trans (Rotundo, 1984b).

La **Figura 1.16** recoge algunos de los procesos implicados en la biosíntesis, ensamblado y transporte de la AChE.



Figura 1.16. Regulación de la biosíntesis, maduración y transporte de las formas moleculares de AChE. Modificado de (Vallette y col., 1991).

La estructura cuaternaria de las diferentes formas de ChEs (G_1 , G_2 y G_4) debería presentar una secuencia lógica de ensamblado progresivo, en la que las subunidades catalíticas (monómeros) oligomerizan para dar dímeros, que a su vez se asocian para formar tetrámeros (moléculas homoméricas) y finalmente, moléculas heteroméricas por la unión con subunidades estructurales. Aunque este esquema pueda ser cierto en lo esencial, todo apunta a que la situación *in vivo* es mucho más compleja, y difícil de reproducir *in vitro*, especialmente en lo que atañe a la composición particular de formas moleculares en cada tejido, debido a la acción de factores extracelulares y de otros elementos.

6.2. Glicosilación de las Colinesterasas

Al igual que sucede con otras glicoproteínas de secreción, las subunidades proteicas de las ChEs pasan por el retículo endoplásmico rugoso (RER), donde incorporan varias unidades del oligoglicano base (NAcGlc)2(Man)9(Glc)3 en restos de Asn de secuencias Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (X: cualquier aminoácido excepto prolina). Después de un procesamiento inicial y de superar el control de calidad, las glicoproteínas marchan con destino al Golgi.

Las glicoproteínas presentan una composición de oligosacáridos muy heterogénea, debido a las modificaciones que sufre el oligoglicano base en el Golgi. La adición secuencial de restos de azúcares transcurre en las diferentes cisternas del aparato de Golgi (cis, medio y trans); cabe destacar la eliminación de residuos de manosa y la adición de N-acetilglucosamina en el Golgi medio, y la de galactosa y ácido siálico en el Golgi trans.

Frente a su masa molecular, el porcentaje de carbohidratos es del 10-15% en la AChE (Massoulie y col., 1993) y algo superior en la BuChE, hasta un 25% (Weitnauer y col., 1999). Aunque todas las formas moleculares de AChE y BuChE contienen glicanos, se han encontrado diferencias en la composición de los oligosacáridos de moléculas homólogas en un mismo tejido de diferentes animales (Massoulie y col., 1993), entre distintos tejidos o fluidos del mismo animal (Tornel, 1992; Weikert y Layer, 1994) e incluso entre regiones subcelulares del mismo tejido (Cabezas-Herrera y col., 1997; Campoy y col., 1992).

Hasta hoy, no existen evidencias de O-glicosilación en las ChEs y el número de sitios de N-glicosilación depende del organismo (Arpagaus y col., 1991; Rachinsky y col., 1990). Por estudios de mutagénesis dirigida, se ha observado que la eliminación progresiva de los sitios de N-glicosilación de la AChE altera de forma gradual la síntesis y secreción de la enzima respecto a la molécula nativa, sin que ello afecte a la actividad de la enzima secretada (Velan y col., 1993).

Estos datos indican que la glicosilación correcta de las formas moleculares de las ChEs es importante para el ensamblado de las subunidades en oligómeros, para la apropiada secreción y para proteger a la enzima frente a la proteolisis. En algunos casos, las enzimas carentes de carbohidratos o glicosiladas de manera anómala pueden perder su actividad o dirigirse a un compartimento celular erróneo (Cabezas-Herrera y col., 1994b; Vidal, 1996).

Las lectinas vegetales constituyen una magnífica herramienta para el estudio de la glicosilación de las proteínas: la unión de concanavalina A (Con A), aglutinina de germen de trigo (WGA), aglutinina de ricino (RCA), de lenteja *lens culinaris* (LCA) o la lectina del artrópodo *Limulus* a una glicoproteína particular aporta evidencias indirectas de la presencia de manosa, N-acetilglucosamina, galactosa terminal o ácido siálico, respectivamente. Mediante el uso de lectinas se sabe que las formas de AChE confinadas en la membrana celular o secretadas contienen oligosacáridos complejos (Cabezas-Herrera y col., 1997; Moral-Naranjo y col., 1999). La distinta interacción de las moléculas asimétricas del músculo de ratón con la lectina RCA ha

permitido distinguir dos clases de moléculas que difieren en su localización subcelular final. Así, se ha observado que las especies asimétricas (A_{12}), con destino a la matriz extracelular del músculo esquelético, incorporan restos de galactosa terminal en el Golgi trans; en cambio, las que no adquieren galactosa pasan del Golgi a las membranas internas del músculo, más concretamente al retículo sarcoplásmico (Cabezas-Herrera y col., 1997).

El estudio de la glicosilación de las ChEs con lectinas también nos puede aportar información de su origen, en situaciones donde colinesterasas de diferentes tejidos confluyan en un mismo medio. Como ejemplo ilustrativo, la BuChE G_4^H del plasma humano interacciona casi por completo con RCA, pero no su homóloga de cerebro humano, lo que ha permitido deducir que la BuChE del LCR (líquido cefalorraquídeo) procede del cerebro y del plasma. En los casos de meningitis bacteriana, se ha observado que toda la BuChE G_4^H del LCR se une a RCA, lo que sugiere un trasvase de la enzima plasmática al LCR a consecuencia de la mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica que produce esta patología (Tornel y col., 1992).

Los trabajos relativos a la glicosilación de las ChEs siguen arrojando pruebas en cuanto a su posible utilidad diagnóstica. Se ha visto que la AChE del córtex frontal y LCR (extracción postmortem) de pacientes con Alzheimer presenta un modelo de glicosilación distinto que la enzima del grupo control o de enfermos con otro tipo de demencias. En cambio, la glicosilación de la AChE es normal en el cerebelo de individuos con Alzheimer, donde rara vez se forman depósitos de placas de amiloide. Estos resultados muestran que la proporción de moléculas ligeras de AChE (G_2^A y G_1^A) aumenta en la corteza cerebral y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los enfermos de Alzheimer, al tiempo que cambia el patrón de glicosilación respecto al de las formas homólogas de individuos sanos (Saez-Valero y col., 1997; Talesa, 2001).

6.3. Localización Celular de las Formas Moleculares de AChE

La gran variedad de formas moleculares de las colinesterasas se puede entender como un mecanismo para la ubicación correcta de las distintas moléculas en su sitio funcional concreto. Las formas globulares G₄ predominan en la superficie externa de las células; por el contrario, la mayoría de las formas ligeras G₁ y G₂ se localizan a nivel intracelular. Esta diferencia se ha ratificado *in vivo* en cerebro de rata empleando el anticuerpo monoclonal anti-AChE ZR1, que penetra en el sistema nervioso central cuando se inyecta en sangre. Tras la inyección en ratas, se observa que ZR1 interacciona *in vivo* con la forma G₄ de cerebro pero no con la G₁. En disolución, el anticuerpo reconoce por igual a ambas formas moleculares (Brimijoin y col., 1990). Los anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de las subunidades AChE-H o AChE-T muestran la diferente distribución de las formas moleculares de AChE. En las uniones neuromusculares, las formas asimétricas de AChE se localizan tanto dentro de las células como en la superficie celular, en asociación con la lámina basal (Rotundo y col., 2008). En cambio, las formas G_2^A (con GPI) están ausentes de la hendidura sináptica, y se localizan preferentemente en la superficie de las terminales nerviosas.

La distribución de formas moleculares de AChE en la membrana plasmática de las neuronas no es uniforme, concentrándose la enzima en la región axonal. De hecho, en el sistema nervioso de mamíferos la forma G_4^A con PRiMA (mayoritaria en cerebro de mamíferos) se localiza preferentemente en la membrana presináptica (Marquis y Fishman, 1985), dónde al menos una parte está integrada en microdominios de membrana o "rafts" (Xie y col., 2010).

6.4. Secreción de las Colinesterasas

En diversos tejidos, las colinesterasas son transportadas a la superficie celular y vertidas al medio extracelular, pero para ello deben adquirir el plegamiento correcto y los restos de carbohidratos adecuados. La mayoría de los fluidos corporales, como suero, LCR, saliva, etc., contienen formas solubles de AChE, aunque se desconoce la función que ejercen. Es previsible que la misión de las ChEs en estos fluidos biológicos sea hidrolizar cualquier resto de acetilcolina en el medio e impedir así una activación no deseada de los receptores colinérgicos.

En este sentido, la valoración de la actividad ChE en los fluidos biológicos puede tener aplicaciones en la clínica. Un ejemplo de ello lo constituye la importante reducción de la actividad de AChE en la saliva en los pacientes con Alzheimer (Sayer y col., 2004). Las diferencias en la actividad AChE son también considerables en los enfermos que responden o no a la terapia con inhibidores de colinesterasas. La alta variación intra-individual está retrasando su aplicación para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o como marcador de exposición a los agentes organofosforados (Ng y col., 2009).

In vivo, G₄ es la principal forma secretada por los músculos y los sistemas nerviosos central y periférico. La secreción de las formas A de AChE y BuChE precede al anclaje a la lámina basal, en las uniones neuromusculares. En cultivos de células PC12, la liberación de AChE se origina mediante los dos tipos de secreción conocida: exocitosis constitutiva y regulada. En cada caso se libera un conjunto distinto de formas moleculares de AChE, lo que sugiere que el empaquetamiento de las moléculas en los dos tipos de vesículas es independiente y que el espectro de formas de AChE liberadas depende de la naturaleza del estímulo. Los estudios indican que los dominios catalíticos y los péptidos C-terminales de las colinesterasas contribuyen a la formación y secreción de los distintos oligómeros (Liang y col., 2009).

7. FUNCIONES ALTERNATIVAS DE LAS COLINESTERASAS

La existencia de ChEs en tejidos y células no excitables sugiere que dichas enzimas participan en funciones "no colinérgicas", esto es no relacionadas con la transmisión colinérgica. Los datos acumulados apuntan a que, mediante las acciones no colinérgicas (o no catalíticas), las ChEs participan directamente en procesos de proliferación y diferenciación celular y en la morfogénesis. La AChE parece jugar un papel importante en el crecimiento axonal (Bigbee y col., 2000), sinaptogénesis (Sternfeld y col., 1998a), adhesión celular (Bigbee y Sharma, 2004) y migración neuronal (Byers y col., 2005; Dori y col., 2005), funciones independientes de la capacidad enzimática para hidrolizar ACh (Soreq y Seidman, 2001) y más relacionadas con la fuerte tendencia que muestran ciertos dominios estructurales de las ChEs de interaccionar con otras proteínas. Es importante destacar que las distintas variantes de las ChEs y/o sus péptidos C-terminal producidos por proteólisis difieren en la expresión estas funciones "no catalíticas" (Dori y col., 2005; Grifman y col., 1998; Massoulie y col., 2005; Sternfeld y col., 1998b). En general, aunque las variantes AChE-T (AChE sináptica) y AChE-R son inducibles por inhibidores de las colinesterasas o por daño neuronal, la expresión de AChE-R parece estar relacionada con los procesos de neuroprotección y reparación y la producción de AChE-T con fenómenos de neurotoxicidad (Cohen y col., 2002; Perrier y col., 2005).

Entre las funciones no clásicas, se puede incluir la hidrólisis de ACh en un contexto no sináptico, un papel que ejercen las ChEs circulantes en sangre, en forma soluble (BuChE) o ligadas a células sanguíneas (AChE). Las colinesterasas pueden incluso desarrollar acciones catalíticas distintas de la esterasa, como la actividad arilacilamidasa asociada a la BuChE y AChE (Balasubramanian y Bhanumathy, 1993; Boopathy y col., 2007; George y Balasubramanian, 1981; Montenegro y col., 2008a; Montenegro y col., 2008b).

Es posible que las ChEs estén involucradas en fenómenos de adhesión celular, sin necesidad de expresar actividad catalítica alguna (Bigbee y Sharma, 2004; Johnson y Moore, 2007; Paraoanu y Layer, 2008; Soreq y Seidman, 2001). Conviene señalar la presencia de ChEs en bacterias (Perez y col., 2002) e, inesperadamente, en plantas (Madhavan y col., 1995; Momonoki, 1997; Momonoki y col., 1998; Sagane y col., 2005), organismos en los que todavía se desconocen sus funciones. Algunas de estas funciones no clásicas se han atribuido al centro aniónico periférico (PAS). Entre ellas destacan los fenómenos de adhesión celular, formación de depósitos de amiloide y el crecimiento de las neuritas (Johnson y Moore, 2006).

7.1. Actividades Catalíticas no Colinérgicas

Las colinesterasas son enzimas altamente eficientes para la hidrólisis de ésteres de colina aunque no son sus únicos sustratos (Layer y Willbold, 1995). Así, la aspirina y sus derivados neutros son hidrolizados por estas enzimas (Masson y col., 1998).

Es muy probable que la AChE y la BuChE manifiesten actividad arilacilamidasa (AAA) inhibida por aminas. Mediante esta actividad, las ChEs hidrolizan el enlace amida de algunas arilacilamidas, como el sustrato *o*-nitroacetanilida (Allebrandt y col., 2005; George y Balasubramanian, 1980; Layer y col., 2005).

Los inhibidores clásicos de las ChEs y la 5-hidroxitriptamina (serotonina) reducen la actividad arilacilamidasa (Darvesh y col., 2003; George y Balasubramanian, 1980). Se desconoce la identidad del sustrato endógeno, por lo que falta por aclarar el significado fisiológico de la actividad AAA. Dado que varios analgésicos, como el paracetamol, contienen un grupo acilamida, que puede ser hidrolizado por la actividad AAA, algunos autores han sugerido que las ChEs podrían estar implicadas en la percepción y/o modulación del dolor. La serotonina prolongaría los efectos analgésicos al bloquear su hidrólisis, vía inhibición de la AAA de las colinesterasas (Balasubramanian y Bhanumathy, 1993).

La maduración y/o degradación de ciertos neuropéptidos, caso de los derivados de las encefalinas que se generan a partir de cromogranina A (Ismael y col., 1986), se asociaron, en un principio, a una actividad proteolítica en las ChEs (Lockridge, 1982). Sin embargo, los trabajos posteriores descartaron esa actividad proteasa o peptidasa de las ChEs (Checler y col., 1994; Checler y Vincent, 1989) y la atribuyeron a proteasas contaminantes en las enzimas purificadas (Chatonnet y Masson, 1985; Chatonnet y Masson, 1986; Checler y Vincent, 1989); de Serres y col., 1993).

La BuChE es la enzima responsable de la hidrólisis de succinilcolina (suxametonio, un anestésico miorrelajante). La degradación rápida del suxametonio por la BuChE plasmática es fundamental para que el paciente recupere la ventilación pulmonar. Una ralentización extrema, producida por la exposición a organofosforados (motivos laborales) o asociada a variantes genéticas silentes de la BuChE , puede llevar a la aparición de episodios de apnea prolongada y parálisis (Perez-Guillermo y col., 1987b; Perez-Guillermo y col., 1987a). Por otro lado, BuChE es capaz de hidrolizar drogas como fisiostigmina (Silver, 1974), cocaína (Lynch y col., 1997; Mattes y col., 1997) y heroína (Lockridge y col., 1980; Valentino y col., 1981). Muchas de estas acciones se atribuyen a su actividad colinesterásica, pero en algunos casos la BuChE actúa con actividad no esterásica.

Hay quienes consideran que la BuChE es una enzima superflua, apoyándose en el hecho de que un número indeterminado de personas, sin manifestación patológica alguna, son portadoras de variantes genéticas "silentes" de BuChE, cuya actividad enzimática es 0-10% de la normal. De las 39 variantes genéticas identificadas para BuChE, 30 corresponden a formas silentes (Lockridge y Masson, 2000). Tales variantes se originan por mutaciones puntuales y por cambios en la pauta de lectura durante su síntesis (Lockridge y Masson, 2000).

Por otro lado la capacidad de BuChE para hidrolizar acetilcolina sin sufrir inhibición por exceso de sustrato, permite considerarla como una "enzima de apoyo" en la hidrólisis del neurotransmisor, cuando la actividad AChE esté inhibida o ausente, como ocurre a elevada

concentración de acetilcolina o en ratones *knock-out* para AChE. Aunque se desconoce el sustrato biológico de la BuChE, a la vista del amplio repertorio de sustratos y agentes que transforma, puede que funcione como una proteína "fijadora" o "inactivadora" de agentes con actividad anticolinesterásica. La inmovilización de estos agentes por la BuChE protegería a la AChE sináptica de la inhibición e impediría el bloqueo de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos (Perez-Guillermo y col., 1987b; Perez-Guillermo y col., 1987a) (Loewenstein-Lichtenstein y col., 1996; Soreq y col., 1992b). La capacidad de la AChE eritrocitaria para hidrolizar heroína, una capacidad que no tiene la enzima de cerebro, se puede interpretar como un mecanismo de protección frente a agentes anticolinérgicos (Salmon y col., 1999).

Es de destacar que la síntesis de BuChE tiene lugar principalmente en hígado y que algunos de los intermedios de la β -oxidación, como el butiril-CoA pueden dar lugar, en presencia de colina, a butirilcolina. Por su parte, la butirilcolina ejerce una poderosa acción nicotínica, siendo necesaria su rápida eliminación para evitar la aparición de efectos tóxicos. Además, la presencia de BuChE en las células endoteliales de capilares corticales y vénulas postcapilares del hígado sugiere que BuChE ayuda a promover el crecimiento tisular previniendo la formación de ésteres de colina, potencialmente tóxicos, a consecuencia del intenso metabolismo de ácidos grasos en el tejido en crecimiento.

7.2. Funciones no Catalíticas

La expresión espacio-temporal de AChE durante estadios tempranos de la embriogénesis, en la extensión de las neuritas en embriones y en el desarrollo muscular, así como la presencia de AChE en contextos no colinérgicos, como en neuronas no colinérgicas y en células hematopoyéticas, osteogénicas y neoplásicas, sugiere que las ChEs ejercen "funciones no clásicas", "no colinérgicas" o "no catalíticas".

Se ha propuesto que la liberación de AChE en varias regiones del cerebro regula la acción de algunos neurotransmisores no colinérgicos (Layer y Willbold, 1995). Así, por ejemplo, En la sustancia negra, una estructura con apenas sinapsis colinérgicas, se libera actividad AChE junto con dopamina. La coliberación podría estar relacionada con la actividad motora o con la estimulación sensorial (Greenfield, 1985; Greenfield, 1991). La aplicación exógena de AChE a la sustancia negra produce la hiperpolarización reversible de una subpoblación de neuronas, efecto mediado por la apertura de canales de K⁺ dependientes de ATP (Webb y Greenfield, 1992). Todo indica que el efecto es específico de AChE y no de BuChE, y que es independiente de la actividad catalítica, ya que esta función moduladora persiste después de la inhibición irreversible de AChE con DFP (diisopropilfluorofosfato) o con preparaciones de AChE hervida (Massoulié y col., 1993).

La presencia de AChE en los progenitores de las células sanguíneas sentó la base de su posible participación en los procesos de hematopoyesis y trombopoyesis (Grisaru y col., 1999b; Lev-Lehman y col., 1997; Paoletti y col., 1992). Se ha demostrado la activación transcripcional del gen *ACHE* en linfocitos activados por hemaglutinina, y se ha puesto de manifiesto que en el proceso colaboran las acciones catalíticas y no clásicas de AChE (Kawashima y Takeshi, 2000).

La participación de las ChEs en las interacciones proteína-proteína fue inesperada y sorprendente por la variedad de funciones celulares implicadas. Las colinesterasas muestran homología secuencial con lipasas y esterasas, pero también con proteínas no catalíticas, un fenómeno atribuido a la diversificación evolutiva de una proteína ancestral común (Pezzementi y Chatonnet, 2010); En vertebrados, la primera proteína homóloga de la AChE que se identificó fue la tiroglobulina (Swillens y col., 1986). A ésta siguieron la neuroliguina-1 y la neuroliguina-2 (NL-1 y NL-2). En invertebrados, la glutactina, gliotactina y neurotactina de *Drosophila* muestran secuencias homólogas con proteínas de la familia de las serín-hidrolasas. El conjunto de proteínas que comparten dicha homología secuencial forman la familia CLAM ("<u>C</u>holinesterase-Like <u>A</u>dhesión <u>M</u>olecules") y parecen esenciales para la formación de uniones intercelulares (Gilbert y Auld, 2005).

Diferentes equipos de investigación han aportado pruebas acerca de la implicación de AChE en la extensión de las neuritas, con independencia de su capacidad hidrolítica (Bigbee y Sharma, 2004; Sharma y col., 2001; Sternfeld y col., 1998a). En un principio quedó muy clara la participación de AChE en la neuritogénesis mediante una actividad no catalítica, ya que el uso de inhibidores dirigidos a su centro activo, como edrofonio o tacrina, no bloqueaban tal efecto. En cambio, los inhibidores del sitio aniónico periférico (PAS), como el propidio o la galamina, demostraron que el PAS es el responsable de la actividad neurotrófica de AChE (Muñoz y col., 1999).

También ha quedado demostrada la participación del PAS en los procesos de adhesión, mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el sitio catalítico o contra el PAS de la molécula de AChE (Johnson y Moore, 1999; Johnson y Moore, 2000b). De hecho, se ha observado que la AChE humana es capaz de interaccionar, a través del PAS, con la laminina-1 de ratón y con el colágeno tipo IV humano, dos componentes importantes de la matriz extracelular.

7.3. Colinesterasas en la Proliferación Celular y el Desarrollo Embrionario

La aparición de los componentes del sistema colinérgico, incluidas las ChEs, antes de la sinaptogénesis (Filogamo y Marchisio, 1971), sustenta la hipótesis acerca de la existencia de un operador colinérgico primitivo en todas las neuronas en desarrollo e independiente del neurotransmisor que vayan a producir finalmente. Esta expresión transitoria de las ChEs se ha denominado "colinesterasa embrionaria" (Drews, 1975; Paraoanu y col., 2006). Las acciones de la expresión espacial y temporal de las ChEs durante la embriogénesis quedan patentes si se tienen en cuenta los efectos teratogénicos de inhibidores de las ChEs, como los compuestos organofosforados en embriones de aves

La detección de actividad BuChE en las células de Schwann (Dubovy y Haninec, 1990), y en otros tipos celulares que rodean a los axones, durante el desarrollo del pollo, sugiere que la enzima puede influir en los procesos de elongación axonal y locomoción. BuChE comparte esta función con AChE, ya que en estudios del desarrollo del embrión de pollo, se ha observado una expresión diferencial de AChE y BuChE en cerebro y retina (Paraoanu y Layer, 2008).

Puesto que la expresión de BuChE precede a la de AChE, se ha propuesto que la BuChE regula la expresión de AChE (Layer y Willbold, 1995). Koelle y colaboradores fueron los primeros en describir cierta dependencia entre la expresión de AChE y BuChE (Koelle y Ruch, 1983; Koelle y col., 1976). La presencia de moléculas activas de BuChE favorece la expresión de AChE, un fenómeno observado durante la diferenciación celular de neuronas o en periodos de recuperación de AChE tras su inhibición irreversible (Koelle y col., 1979; Koelle y col., 1982). El grupo del Prof. Layer ha propuesto que una relación BuChE/AChE anormal durante el desarrollo de un tejido particular puede indicar una alteración patológica grave (Layer, 1996).

La actividad BuChE es elevada en varios sistemas celulares proliferativos, como los de la periferia del ojo (Layer y col., 1992; Robitzki y col., 1997), los del sistema hematopoyético y ciertas células tumorales (Bartha y col., 1982; Soreq y col., 1991). En trabajos con tumores intracraneales (gliomas, meningiomas, etc.), se observa una relación directa entre la actividad BuChE del tumor y la capacidad proliferativa de las células (Barbosa y col., 2001; Vidal, 2005). Aunque se sabe que los inhibidores de la actividad BuChE reducen la proliferación celular, se desconocen los mecanismos moleculares por los que la BuChE estimula la mitosis.

En células de neuroblastoma, se ha observado que durante la etapa de diferenciación se produce un incremento en los niveles de AChE asociada a la membrana y de secreción, que corresponde principalmente a la molécula G₄. Con inhibidores específicos para AChE y BuChE, así como con anticuerpos, se ha demostrado la implicación de la AChE en la adhesión de las células de neuroblastoma. Esta función de adhesión es ejercida a través del PAS de la AChE. En cambio, la BuChE parece tener un efecto anti-adhesivo (Johnson y Moore, 2000a).

En estudios con células derivadas de un adenocarcinoma de colon humano, células Caco-2, se observan los cambios en la actividad de las ChEs dependientes de la diferenciación celular (Plageman y col., 2002). Los autores del trabajo observaron que la diferenciación celular (tras 21 días de cultivo continuo) lograba aumentar 7,5 veces la actividad AChE. La propuesta es coherente con el aumento simultáneo de la actividad AChE y de otros marcadores de diferenciación, como la fosfatasa alcalina (Plageman y col., 2002).

El hecho de que ratones "knock-out" para AChE, incapaces de expresar actividad AChE, sobrevivieran hasta tres semanas después de su nacimiento (Xie y col., 2000) sorprendió extraordinariamente a la comunidad científica, por cuanto estaba plenamente asumida la idea

1. Introducción y Objetivos

de que la AChE era una proteína esencial para la vida. Para explicar la supervivencia de los ratones en ausencia de AChE se propuso un papel compensatorio de BuChE (Li y col., 2000). El desarrollo relativamente normal de los ratones knock-out para AChE contrasta con el fenotipo letal en los mutantes de *Drosophila*, inviables ya desde el estado embrionario (Greenspan y col., 1980), un efecto que se relaciona con la falta de BuChE en *Drosophila*.

7.4. Papel de AChE en la hematopoyesis

A pesar de los numerosos estudios que describen la presencia de los componentes del sistema colinérgico en células de origen hematopoyético, incluyendo la colina acetil tranferasa (CHAT), las colinesterasas AChE y BuChE, y los receptores de acetilcolina, (Wessler y col., 1998; Deutsch y col., 2002) el papel del operador colinérgico en la regulación de la homeostasis hematopoyética todavía no ha sido totalmente aclarado.

Como la AChE se expresa en diferentes líneas hematopoyéticas (Burstein y col., 1980) (Deutsch y col., 2002; Serobyan y col., 2007; Soreq y Seidman, 2001), se ha propuesto que la enzima interviene en el ajuste de la composición celular hematopoyética normal. También, se ha correlacionado la exposición a insecticidas inhibidores de AChE con mayor riesgo de desarrollar leucemias (Perry y Soreq, 2004). Los estudios epidemiológicos han confirmado que existe una correlación significativa entre la disminución de las ChEs en sangre y la aparición de leucemias en trabajadores agrícolas expuestos a organofosforados (Brown y col., 1990).

Estudios con ratones transgénicos que sobre-expresan AChE-R sugieren que esta variante de AChE está parece estar relacionada con la recuperación trombopoyética, lo que aporta un nuevo mecanismo terapéutico para reforzar la producción de plaquetas. (Grisaru y col., 2006). Además, el gen *ACHE* reside en un locus cromosómico sujeto a frecuentes rupturas en procesos de malignidad hematopoyética (Ehrlich y col., 1992), mutación y amplificación génica en leucemias (Lapidot-Lifson y col., 1989a; Stephenson y col., 1996) y otras anormalidades de las células sanguíneas, incluyendo la deficiencia plaquetaria asociada al lupus eritematoso (Zakut y col., 1992).

La localización nuclear de AChE en los megacarioblastos humanos refuerza la hipótesis de un posible papel regulador durante la fase de proliferación temprana de los megacariocitos (Soreq y col., 1994a). Sin embrago, dado que la secuencia polipeptídica de AChE no incluye ninguna señal de localización nuclear, ha de haber alguna proteína (o proteínas), desconocida por ahora, que se encargue de transportar la AChE al núcleo. En este sentido, recientemente se ha descrito que la interacción entre AChE y la proteína RanBPM facilita su traslocación al núcleo, al menos durante la apoptosis (Gong y col., 2009).

Mientras que los eritrocitos humanos poseen elevada actividad AChE (Dutta-Choudhury y Rosenberry, 1984), no sucede lo mismo en los megacariocitos maduros (MKs). En cambio, en roedores la actividad AChE es considerable en los megacariocitos maduros y plaquetas, y muy baja en eritrocitos y en megacariocitos inmaduros (Matsumura-Takeda y col., 2007).

Por otro lado, la AChE parece ejercer una acción no colinérgica sorprendente en los macrófagos. Al cultivar macrófagos procedentes del peritoneo de rata en presencia de AChE, se observa un incremento en el consumo de oxígeno, independiente de la respiración mitocondrial. La incapacidad del BW284c51 para bloquear este efecto, descarta la implicación de la actividad catalítica de AChE. Estos estudios indican que la AChE activa sistemas no mitocondriales que consumen oxígeno en macrófagos, por acciones que son independientes de los sitios catalítico y periférico (Klegeris y col., 1994).

8. LAS COLINESTERASAS EN DISTINTOS ESTADOS PATOLÓGICOS

Debido a la importancia fisiológica de la ACHE para el mantenimiento de la vida, por un lado, y a la existencia de un solo gen *ACHE* en vertebrados, por otro, no se conocen patologías causadas por defectos de la estructura propia del gen. En cambio para BuCHE se han identificado distintas variantes derivadas de mutaciones genéticas naturales (La Du y col., 1991; Lockridge, 1991; Lockridge y col., 1991; Lockridge y col., 1997; Mikami y col., 2008; Primo-Parma y col., 1992; Takagi y Mori, 1997). Son muchos los ejemplos de patologías en las que se han detectado anomalías en los componentes del "operador colinérgico". Dicho operador está constituido por los elementos que participan en la síntesis del neurotransmisor ACh (colina acetiltransferasa), en su degradación (ChEs) y por los receptores (nicotínicos y muscarínicos). Respecto a las colinesterasas, las alteraciones en la expresión génica y en los procesos post-transcripcionales o post-traduccionales, que operan sobre los transcritos primarios o sobre las proteínas recién sintetizadas, pueden producir cambios que afectan al contenido de AChE y/o BuChE, a la composición de formas moleculares, o las propiedades estructurales de dichas enzimas (Grisaru y col., 1999a).

Las alteraciones de las propiedades de las ChEs son de utilidad clínica ya que pueden aportar información diagnóstica y/o pronóstica de la enfermedad en estudio. Sirva como ejemplo el caso de la AChE neural, cuyos cambios en su cantidad, actividad y estructura se podrían emplear para el diagnóstico precoz de patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o Parkinson (Garcia-Ayllon y col., 2007; Garcia-Ayllon y col., 2010) o en el diagnostico prenatal de defectos en la formación del tubo neural (Chen, 2008). En oncología, además de los estudios que sugieren una influencia de las colinesterasas en la tumorogénesis (control de la proliferación, diferenciación, apoptosis y metástasis), se ha propuesto que los cambios en la expresión y propiedades de las colinesterasas son de utilidad para predecir la supervivencia y la progresión de la enfermedad en cáncer de ovario (Motamed-Khorasani y col., 2007).

8.1. Hemoglobinuria paroxística nocturna

El síndrome de Marchiafava-Micheli, también conocido como hemoglobinuria paroxística nocturna, es un trastorno poco frecuente que se caracteriza por hemólisis y hemoglobinuria, más acentuada durante el sueño. El síndrome de Marchiafava-Micheli ocasiona una clase particular de anemia y es más frecuente en hombres de 20-30 años, pero ocurre en ambos sexos y a cualquier edad.

El origen de esta enfermedad es una anomalía que puede aparecer de modo natural o inducida por ciertos fármacos usados para mejorar la pancitopenia asociada a la anemia aplástica. El resultado de la enfermedad es un defecto de la membrana celular de las células sanguíneas, especialmente de los hematíes, que los hace muy vulnerables a la lisis mediada por el sistema complemento. La causa de la patología es una mutación somática en las células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Como resultado, las células madre y toda su progenie pierden la capacidad para producir proteínas con restos de glicosilfosfatidilinositol (GPI). La razón estriba en las mutaciones en el gen *PIG-A*, cuya expresión es necesaria para la última etapa de la síntesis de GPI. La falta del anclaje GPI impide la fijación a la membrana celular de las proteínas CD59 y CD55, cuyas actividades son de capital importancia a la hora de regular la lisis de los hematíes por el complemento (Taylor y Hooper, 2011). La deficiencia de GPI hace que varias proteínas, entre las que se incluye la AChE, no puedan quedar inmovilizadas en la membrana de los eritrocitos, por lo que escapan al medio externo (Chow y col., 1985; Rao y col., 1993).

8.2. Defectos del tubo neural

Con el nombre de defectos del tubo neural se conocen una serie de malformaciones congénitas debido a fallos en el cierre del tubo neural durante los primeros estadios del desarrollo embrionario. En España, la incidencia es de 0,80 por cada mil recién nacidos vivos (la mitad debido a anencefalia y la otra mitad a espina bífida). Desde la incorporación al programa de detección precoz la medida de a-fetoproteína (AFP) en el suero materno, la prevalencia de los defectos del tubo neural se ha reducido hasta prácticamente cero.

La AChE del líquido amniótico tiene un importante valor diagnóstico de posibles defectos del tubo neural. En tales casos, aumenta la actividad AChE en el líquido amniótico y en un gel de electroforesis no desnaturalizante (método más seguro de diagnosis, sin falsos positivos) se detecta una banda específica o una electro-variante anómala (Chubb y col., 1979; Smith y col., 1979).

En niños con meningitis bacteriana aumentan las actividades AChE y BuChE en el líquido cefalorraquídeo de modo significativo (Tornel y col., 1993; Tornel y Vidal, 1991). Por otro lado, mientras que la BuChE de origen neural apenas interacciona con la lectina de ricino (RCA⁻), la enzima plasmática se fija en su totalidad a la lectina (RCA⁺) (Tornel y col., 1992). En circunstancias fisiológicas normales, sólo un 60% de la enzima del líquido cefalorraquídeo (LCR) se liga a RCA, lo que prueba que en el LCR convergen la enzima neural y la plasmática. En niños con meningitis bacteriana, aumenta poderosamente la actividad BuChE en el LCR y el porcentaje de interacción con la lectina RCA, hechos que demuestran que el incremento de actividad se debe al tránsito de la BuChE plasmática hacia el LCR, probablemente por un deterioro de la barrera hematoencefálica y no por una alteración de la secreción de la BuChE neural. Se ha propuesto que la fracción de BuChE-RCA⁺ en el LCR puede servir como un índice del grado de integridad de la barrera sangre-cerebro. Dicha fracción BuChE reactiva aumenta a medida que se deteriora la permeabilidad de la barrera.

8.3. Síndromes Miasténicos

La miastenia *gravis* (MG; "debilidad muscular grave") es una patología neuromuscular que se caracteriza or debilidad extrema y fatiga de los músculos esqueléticos. El defecto subyacente es una disminución del número de receptores nicotínicos de acetilcolina en la unión neuromuscular. El déficit de receptores puede ser ocasionado por una repuesta inmune anormal o a mutaciones en alguna de las proteínas de la unión neuromuscular, que son esenciales para el correcto acoplamiento de la excitación con la contracción. La miastenia *gravis* es relativamente frecuente; afecta a 1 de cada 7.500 personas y aunque puede aparecer a cualquier edad, es más frecuente en mujeres de 20 a 40 años y en hombres de 50 a 70 años.

Uno de los síndromes miasténicos está relacionado con cambios en la composición de formas de AChE en las sinapsis neuromusculares (Engel y col., 1977). La ausencia casi total de formas asimétricas de AChE en las uniones neuromusculares causa fatiga y una debilidad muscular extrema, debido a la sobre-activación y desensibilización de los receptores nicotínicos. Esta situación empeora si se administra edrofonio, un inhibidor reversible de la AChE. En los enfermos, la subunidad catalítica de AChE es totalmente normal; en cambio, las mutaciones generan formas truncadas de la subunidad colagénica Q, que ahora son incapaces de unir los tetrámeros de AChE y, por tanto, de producir moléculas asimétricas. Como los músculos de los enfermos carecen de formas asimétricas de AChE, la cantidad de ACh en las proximidades de los receptores nicotínicos es mucho mayor de lo necesario, lo que se traduce en un funcionamiento anormal de los receptores (Ohno y col., 2000).

Otro de los síndromes miasténicos se debe a un déficit de receptores nicotínicos como resultado de una respuesta autoinmune, que produce anticuerpos frente a los receptores de acetilcolina y reduce el número de receptores necesarios para la excitación muscular. En el tratamiento de la *myasthenia gravis*, a causa de autoinmunidad, se vienen utilizando inhibidores de la AChE. Se pretende con ello evitar la hidrólisis del neurotransmisor, aumentar su cantidad

en el entorno de los receptores y compensar así la falta de receptores (Jaretzki, III y col., 2000; Keesey y col., 1982; Keesey, 2004). Sin embargo, estos inhibidores induce la sobreexpresión de la variante "readthrough" de la enzima, AChE-R, en el músculo de ratones sanos, al tiempo que dañan la integridad del músculo y la estructura de la unión neuromuscular (Brenner y col., 2003). A través del aumento de proteína AChE-R, ciertos fármacos podrían agravar algunas enfermedades. El aumento de la proteína AChE-R con fármacos anti-AChE y los efectos adversos de esta variante de AChE ponen en entredicho la utilidad de los inhibidores de AChE para detener la progresión de las miastenias y alertan sobre sus efectos nocivos en otras patologías. Recientemente se ha observado que el uso de oligonucleótidos antisentido, que disminuyen selectivamente los niveles de AChE-R en sangre, mejoran la supervivencia, fuerza muscular y el estado clínico de ratas en fase terminal con *myasthenia gravis* autoinmune experimental (Punga y Stalberg, 2009).

8.4. Las colinesterasas en enfermedades neurodegenerativas

Los niveles de actividad y/o la distribución de formas moleculares de AChE y/o BuChE cambian en numerosos trastornos neurológicos. Entre estos figuran la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, síndrome de Guillain-Barré, esquizofrenia, manía, depresión y neuritis alérgicas. Aunque todavía falta por demostrar la existencia de una relación causaefecto entre los cambios de las ChEs y esas patologías, es probable que las ChEs estén implicadas en el origen de alguna de ellas, por lo que su estudio puede ser de gran utilidad para la prevención y/o la aplicación de terapias apropiadas.

Por su frecuencia y gravedad, la enfermedad de Alzheimer es sin duda el trastorno neurodegenerativo más importante. Como sucede en la demencia fronto-temporal, Parkinson y el mal de de Creutzfeld-Jacob, el Alzheimer tiene su origen en el procesamiento aberrante de ciertas proteínas. La demencia senil tipo Alzheimer (SDAT) es la más frecuente de todas las demencias seniles irreversibles; se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria, en particular de la memoria reciente, de la función cognitiva y de la orientación temporo-espacial. Su origen es aún desconocido y probablemente multifactorial.

Una de las posibles causas del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es la pérdida de la inervación colinérgica del córtex. Así, se ha observado pérdida neuronal en el hipocampo, un centro de la memoria, y en la corteza cerebral implicada en el razonamiento, la memoria, el lenguaje y otros procesos del pensamiento. En la SDAT disminuye la actividad AChE, sobre todo las formas G₄ de AChE (Arendt y col., 1992; Atack y col., 1983), probablemente a consecuencia de la pérdida de fibras colinérgicas presinápticas. Para preservar la cantidad de ACh, se ha venido tratando a los pacientes desde hace más de diez años con inhibidores de AChE (Colombres y col., 2004), que frenan las alteraciones en los primeros estadios del Alzheimer. Sin embargo, estos fármacos pierden su razón de ser una vez que han degenerado las neuronas colinérgicas.

Los estudios bioquímicos indican que la AChE favorece la formación de fibras de amiloide y la producción de complejos AChE/beta-amiloide muy tóxicos. Tales efectos se pueden evitar con inhibidores que bloquean el PAS de la AChE, lo que abre una puerta al tratamiento del Alzheimer. Además, las observaciones citoquímicas han revelado ciertas diferencias entre las moléculas homólogas de AChE asociadas a placas seniles y las asociadas a neuronas (Inestrosa y col., 2005).

A principios de los ochenta, surgió la denominada "hipótesis colinérgica" para explicar el origen de la SDAT. Su desarrollo inicial está estrechamente vinculado a cambios estructurales en las sinapsis colinérgicas (Dekosky y Scheff, 1990), pérdida de receptores de ACh (Mash y col., 1985) y muerte de neuronas productoras de ACh (Davis y Maloney, 1976). La hipótesis colinérgica postula que la causa principal de la demencia es el descenso de la cantidad de ACh en regiones cerebrales relacionadas con la memoria y aprendizaje. Los resultados histoquímicos indican que la degeneración de las proyecciones colinérgicas que ascienden al córtex e hipocampo incide directamente en la etiología de la enfermedad.

La demencia produce cambios en los patrones de formas moleculares de AChE en ciertas regiones cerebrales, con una disminución selectiva de las formas G_4^A (Siek y col., 1990). Por el contrario, las formas monoméricas de AChE y BuChE aumentan ligeramente. La pérdida de las moléculas G_4^A ancladas a las terminales axónicas se relaciona con la degeneración de los elementos presinápticos que caracteriza a la patología (Dekosky y Scheff, 1990). En cambio, no se aprecian anomalías en la cantidad de las formas monoméricas, que se suponen asociadas a las estructuras postsinápticos, no alteradas por la enfermedad (Fishman y col., 1986).

El hallazgo de actividades AChE y BuChE en las estructuras histopatológicas (los denominados "nudos u ovillos neurofibrilares" y las "placas seniles") que se observan en el cerebro de pacientes fallecidos con Alzheimer llevó a pensar que las ChEs estaban implicadas en la agregación del péptido beta-amiloide o en la consolidación de las placas seniles. De hecho, al cruzar ratones transgénicos para el péptido amiloide humano con ratones transgénicos para la AChE humana, se observó que las crías, doble transgénicas para ambas proteínas, desarrollaban placas seniles un 30-50% más rápido que los padres. Su cantidad aumentaba con la edad y llegaban a ser mucho más numerosas en los dobles transgénicos al cabo de 9-12 meses (Rees y col., 2003; Rees y Brimijoin, 2003).

El grupo del Dr. Inestrosa ha demostrado que la AChE favorece el ensamblado de los péptidos Aβ. Sugieren que el entorno hidrofóbico próximo al PAS de la AChE facilita el plegamiento y posterior agregación de los péptidos (Dinamarca y col., 2010; Inestrosa y col., 2008). Además, han observado que, en comparación con la AChE del encéfalo normal, la enzima asociada a las placas seniles conserva su actividad a pH relativamente ácido, es menos sensible a los inhibidores y requiere mayor concentración de sustrato para inhibirse por exceso del mismo. Estas anomalías se atribuyen a cambios en el plegamiento de la subunidad de AChE (Geula y Mesulam, 1995; Inestrosa y Alarcon, 1998). Por otro lado, han observado que la

1. Introducción y Objetivos

toxicidad de los complejos AChE-Aβ es mayor que la de los agregados Aβ solos, y que su intensidad depende de la cantidad de AChE que se una al complejo y de la variante del péptido Aβ que intervenga en el mismo; los agregados AChE-Aβ40 son más tóxicos que los de AChE-Aβ42, (Alvarez y col., 1998; Munoz y col., 1999).

La reciente implicación de la AChE en la apoptosis de células de neuroblastoma, avala la hipótesis de la posible asociación entre AChE y la apoptosis neuronal en la enfermedad de Alzheimer (Yang y col., 2002). Se ha propuesto un papel inductor de apoptosis para las variantes de AChE N-extendidas (Toiber y col., 2008).

Hasta el momento, ningún tratamiento ha conseguido detener la progresión de la demencia. En base a la hipótesis colinérgica, la mayor parte de los trabajos para detener el deterioro cognitivo propio del Alzheimer se han centrado en la recuperación de los niveles de ACh, mediante inhibidores de AChE, cuyo éxito parece quedar reducido a las fases iniciales de la enfermedad. Por otro lado, se ha comprobado que la administración de los precursores del neurotransmisor no es efectiva. En la actualidad, las esperanzas de los investigadores están puestas en los inhibidores de colinesterasas de nueva generación (Pepeu y Giovannini, 2009).

8.5. Las Colinesterasas en las Distrofias Musculares

Las distrofias musculares constituyen un grupo diverso de enfermedades degenerativas y hereditarias, que afectan a humanos y animales. Están caracterizadas por la debilidad y el desgaste progresivo del músculo esquelético, aunque también pueden afectar al sistema nervioso y alterar las propiedades de las células sanguíneas (Engel, 1986). La distrofia muscular más frecuente y devastadora en humanos es la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Afecta a uno de cada 3500 varones nacidos y los pacientes mueren a causa de una insuficiencia cardiaca o respiratoria. La distrofia muscular de Becker (DMB) es más benigna que la de Duchenne, ya que su progresión y efectos son mucho menos dramáticos. A nivel celular, ambas miopatías suponen la pérdida de fibras musculares individuales y la destrucción de la ordenación regular de las miofibrillas, a causa de la degeneración y la necrosis (Anderson y Kunkel, 1992).

Algunas de estas miopatías afectan a la cantidad y/o composición de las formas moleculares de las ChEs y el estudio de estas enzimas en tejidos sanos y patológicos puede dar información acerca de los mecanismos que controlan la síntesis, ensamblado y procesamiento de las ChEs y aclarar su posible implicación en la enfermedad.

El análisis de las formas moleculares de las ChEs en músculo distrófico de ratón ha revelado una marcada disminución de los tetrámeros de AChE, hecho que parece reflejar la falta de maduración del músculo durante el desarrollo (Cabezas-Herrera y col., 1993; Cabezas-Herrera y col., 1997; Gisiger y Stephens, 1988; Skau, 1990). Además, en comparación con los músculos de los ratones sanos, los tejidos patológicos muestran mayores actividades AChE y

BuChE, y una mayor proporción de especies ligeras (Cabezas-Herrera y col., 1994b; Cabezas-Herrera y col., 1994a). Estas anomalías podrían ser específicas del tejido, puesto que no se observa en el suero de ratones distróficos (Cabezas-Herrera y col., 1994a), cerebro (Moral-Naranjo y col., 1996; Moral-Naranjo y col., 1997) o corazón (Gomez y col., 1999) y si en timo (Nieto-Ceron y col., 2006; Sanchez y col., 2005).

8.6. Las colinesterasas y la modulación de enfermedades asociadas al estrés

Es posible que la AChE sea un factor que regule la respuesta hematopoyética al estrés (Grisaru y col., 2006; Perry y col., 2007). En situaciones de estrés se producen cambios rápidos en la composición de las células sanguíneas, como demuestra el fuerte aumento de linfocitos y plaquetas. Al parecer, los cambios hematológicos asociados al estrés están acompañados por una sustitución de la variante AChE-T (forma sináptica) por la variante AChE-R (mielopoyética) (Perry y col., 2007).

Las células hematopoyéticas de los mamíferos contienen AChE; de hecho, esta enzima se usa como marcador citoquímico de los megacariocitos de ratón desde hace más de tres décadas (Saito, 1997; Zajicek, 1957) y, además, se sabe que la AChE está implicada en la megacariocitopoyesis y producción de plaquetas (Lev-Lehman y col., 1994).

El equipo de la Dra. Soreq ha demostrado el papel activo de la variante AChE-R en el sistema hematopoyético y su posible implicación en la respuesta al estrés. Ha observado que el tratamiento de los progenitores de las células CD34⁺ humanas con cortisol, a concentraciones similares a las del plasma durante el estrés moderado, aumenta 150 veces el nivel del ARNm para la AChE-R. Además, en ratones sometidos a estrés físico (esfuerzo por natación) se ha identificado el péptido C-terminal de AChE-R con anticuerpos. De hecho, los elementos promotores de AChE tienen sitios consenso para la unión de factores hematopoyéticos y para factores inducidos por estrés. El potenciador distal de AChE liga receptores de glucocorticoides mediante los elementos de respuesta (GRE). Así mismo, varios factores de transcripción hematopoyéticos tienen sitios de unión en el promotor de AChE, como STAT5, que junto con el receptor de glucocorticoides participa en la inducción transcripcional (**Figura 1.7**) (Weber y col., 1999) (Yamate y col., 2010).

Los estudios sugieren que ARP, el péptido C-terminal de AChE-R, es un nuevo factor de crecimiento hematopoyético, capaz de promover la expansión del linaje mieloide y la trombopoyesis característica del estrés. Se ha propuesto incluso que ARP puede mejorar la eficiencia de la expansión clonal de células madre hematopoyéticas *ex vivo*, para su posterior trasplante en la médula ósea (Deutsch y col., 2002).

Las células embrionarias y tumorales expresan la variante *readthrough* de AChE, AChE-R (Karpel y col., 1996) y su cantidad aumenta en respuesta al estrés y a la inhibición de

AChE (Meshorer y col., 2002). Después de un trauma, se observa una sobreexpresión persistente de AChE-R en cerebro de ratón, que, según parece, está implicada en los cambios en la estructura y función neuronales asociados al estrés (Cohen y col., 2002).

Las situaciones de estrés agudo aumentan el riesgo de neurodegeneración. La variante AChE-R se acumula en el cerebro de mamíferos en periodos de estrés intenso y parece atenuar la posible neurodegeneración. Al contrario sucede con la variante sináptica (codificada por el transcrito T), que intensifica todas las características propias de las respuestas al estrés neuronal (Sternfeld y col., 2000). Diversos estudios en ratones transgénicos (para las variantes T y R de AChE) y ratones control afianzan la función moduladora de AChE-R para prevenir el paso desde un estado de estrés agudo hacia una enfermedad neurológica progresiva (Sternfeld y col., 2000).

También se ha observado que bajo situaciones de estrés crónico celular, la regulación aberrante de AChE puede facilitar la apoptosis, la formación de placas, daños cognitivos y la degeneración de células colinérgicas nerviosas. (Toiber y Soreq, 2005). Los estudios *in vitro* e *in vivo*, practicados en condiciones de estrés, tras un golpe de calor o tras la inhibición de AChE con organofosforados, han revelado un aumento moderado del transcrito AChE-R, sin cambios aparentes en la actividad enzimática (Perrier y col., 2005).

La implicación de las variantes específicas de AChE en la progresión de enfermedades neurodegenerativas y síndromes neuromusculares abre nuevas vías terapéuticas basadas en dichas variantes o sus correspondientes RNAm (Meshorer y Soreq, 2006)

Aunque se ha relacionado la infertilidad masculina con el estrés, se desconoce la proteína o proteínas responsables. Cuando los ratones mutantes *readthrough*, que sobrexpresan la variante AChE-R, se someten a estrés disminuye el peso de su glándula seminal, el número de espermatozoides y su motilidad. El hecho de que la cantidad de AChE-R sea menor en los espermatozoides de hombres no fértiles que en los fértiles hace del transcrito R un posible marcador molecular de la infertilidad asociada al estrés (Mor y col., 2001). En humanos se han descrito variaciones en la expresión de las colinesterasas en relación con el cáncer de próstata y la infertilidad (Nieto-Ceron y col., 2010).

8.7. Colinesterasas y Cáncer

Numerosas evidencias experimentales sugieren que las ChEs pueden estar implicadas en el desarrollo del cáncer. La expresión, actividad y naturaleza de las colinesterasas se ve alterada a nivel genético y/o proteico en diversos carcinomas, por lo que estas enzimas pueden ser importantes marcadores de ciertos desórdenes del crecimiento celular. De este modo, las aberraciones del gen *ACHE* son comunes en leucemias (Lapidot-Lifson y col., 1989b), en carcinomas de ovario (Zakut y col., 1990) y en líneas celulares tumorales que expresan transcritos aberrantes de AChE por errores en el ensamblado alternativo (Karpel y col., 1994). Además, tanto en tumores cerebrales como no cerebrales se han observado cambios en la estructura y/o expresión del gen de *ACHE*, junto con la presencia de moléculas de ChE con propiedades anormales (Zakut y col., 1988a) (Greenfield, 1996) (Small y col., 1996).

En diversos tumores humanos, se ha encontrado una correlación entre el crecimiento de las células neoplásicas y la expresión anormal y/o amplificación de los genes para AChE y/o BuChE (Soreq y col., 1992a). Existe abundante información sobre la actividad colinesterásica y la composición de formas moleculares en meningiomas (Sáez-Valero y Vidal, 1995, 1996), gliomas(Garcia-Ayllon y col., 2001; Saez-Valero y col., 1996) neurinomas (Garcia-Ayllon y col., 1999b) y cáncer de mama (Ruiz-Espejo y col., 2002; Ruiz-Espejo y col., 2003)

En los tumores de mama aumenta la actividad AChE y disminuye fuertemente la BuChE (Ruiz-Espejo y col., 2002). En cambio, en los nódulos linfáticos afectados por metástasis de cáncer de mama cae la actividad AChE sin cambio aparente de la actividad BuChE (Ruiz-Espejo y col., 2003).

En los meningiomas y neurinomas predomina la actividad AChE, y en los gliomas (astrocitomas, oligodendrogliomas y meduloblastomas) la BuChE. Se ha observado una asociación entre la agresividad del astrocitoma humano y los cambio en la composición de las variantes de AChE (Perry y col., 2002). Los perfiles de formas moleculares de AChE y/o BuChE son diferentes en meningionas, gliomas y neurinomas, lo que puede ser útil para el diagnóstico, o en todo caso, para completar los resultados de los análisis histopatológicos. Los gliomas muestran niveles particularmente elevados de BuChE, en concordancia con la presencia de dicha enzima en las células gliales (Saez-Valero y col., 1996). La relación de actividades AChE/BuChE varía independientemente del grado de malignidad (Razon y col., 1984; Saez-Valero y Vidal, 1996; Wolleman y Zoltan, 1962).

Los genes ACHE y BUCHE se amplifican en algunas leucemias, cáncer de ovario, megacariocitopoyesis anormal y en otras neoplasias (Soreq y Zakut, 1990a; Zakut y col., 1990) (Grisaru y col., 1999b; Schwarz y col., 1995a). Al parecer, el grado de amplificación está relacionado con la gravedad del cáncer. También se ha observado co-amplificación de los genes ACHE y BUCHE con varios oncogenes en ciertas leucemias, megacariocitopoyesis anormales y en carcinomas malignos de ovario (Lapidot-Lifson y col., 1989b).

En el plasma de pacientes con diversos tipos de cáncer (pulmón, ovario, mama, tracto digestivo, etc.) sometidos a quimioterapia se ha encontrado una actividad ChE anormal, intermedia entre AChE y BuChE, porque responde a inhibidores de AChE (BW284C51) y BuChE (iso-OMPA) (Zakut y col., 1990). El grupo del Dr. Vidal ha identificado formas híbridas de ChEs (heterotetrámeros), formadas con subunidades de AChE y BuChE, en gliomas, pero no en cerebro normal, meningiomas o neurinomas (Garcia-Ayllon y col., 2001).

Los experimentos de hibridación del ADN de células sanguíneas de pacientes con policitemia verdadera o con leucemia mieloide aguda muestran una considerable amplificación

de los genes de las ChEs y de otros como c-raf, c-myc y c-fes/fos. Los resultados sugieren que, en estados precancerígenos, los genes amplificados de las ChEs podrían estar implicados en el mantenimiento del estado proliferativo. De hecho, en la mayoría de los tumores analizados, los genes de las ChEs se amplifican antes que los oncogenes, y el gen *BuChE* antes que el *ACHE* (Soreq y Zakut, 1993), de modo semejante a lo que sucede en el estado embrionario, donde la expresión de BuChE precede a la de ACHE (Layer, 1983).

Se sospecha que la AChE puede intervenir en enfermedades hematológicas. La idea se basa en el hecho de que los agentes organofosforados inhiben precursores de AChE que están relacionados con el descenso de la concentración de hemoglobina, la cantidad de eritrocitos y el nivel de hematocrito (Bukowska, 2005).

Los cambios en la actividad o en las propiedades estructurales que se producen en las ChEs de carcinomas abren la posibilidad de usarlas como marcadores tumorales. Sin embargo, la utilidad de su estudio va más allá, porque tal vez la sobreexpresión de las ChEs esté relacionada con la causa primaria del neoplasma y juegue un papel directo o indirecto en la neoplasia (Soreq y Zakut, 1990c; Soreq y Zakut, 1990a). Conviene recordar la intervención de las ChEs en los procesos de proliferación y diferenciación celular y en los fenómenos de adhesión intercelular. De hecho, se ha observado que la transfección de células de retina de pollo con oligonucleótidos antisentido del gen *BUCHE* incrementa la apoptosis (Robitzki y col., 1998). Por otro lado, los oligonucleótidos antisentido contra AChE modifican la hematopoyesis (Lev-Lehman y col., 1994; Soreq y col., 1994a) y los oligonucleótidos antisentido contra BuChE detienen la proliferación de megacariocitos, los precursores de plaquetas (Lapidot-Lifson y col., 1992).

También se ha visto que en células de eritroleucemia (K562) γ-irradiadas aumenta la actividad AChE al tiempo que cesa la proliferación (Schwenke y col., 1995). En los folículos de Graaf aumenta la actividad AChE en los procesos de maduración y ovulación (Guraya y col., 1995). Estos antecedentes, junto al papel reconocido de la AChE en los procesos de desarrollo embrionario (donde la apoptosis es necesaria para la remodelación de los tejidos) hicieron pensar en una posible relación entre la actividad AChE y la apoptosis.

En el contexto de las ChEs en cáncer, cabe destacar la participación activa de AChE en apoptosis (Park y col., 2004). La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo que, junto a la proliferación celular, permite asegurar la homeostasis en los tejidos. De hecho, los cambios en las rutas apoptóticas se relacionan con la aparición de resistencia a fármacos, a radiación o a la destrucción celular por respuestas inmunológicas.

La participación de AChE en la apoptosis se ha confirmado con inhibidores específicos de AChE (BW248c51, tacrina, eserina), y de BuChE (iso-OMPA), ya que la inhibición de la actividad AChE asegura la viabilidad celular. El mismo efecto se consigue con oligonucleótidos antisentido que impiden la expresión de AChE (Zhang y col., 2002).

Aunque se desconoce la contribución de AChE a la apoptosis, su expresión transcurre en estadios tempranos. De hecho, la AChE aparece primero en el citoplasma y desde ahí se traslada al núcleo, al tiempo que se inician los procesos de condensación y fragmentación del DNA que desencadenan la muerte celular. En la última fase, y antes de la ruptura de la membrana plasmática, la AChE se localiza exclusivamente en los núcleos rotos (Zhang y col., 2002). Es probable que la AChE afecte a los componentes nucleares responsables de la condensación de la cromatina y su posterior fragmentación. En este punto, cabe destacar la posible relevancia de las actividades no colinérgicas de AChE.

En el núcleo de células de neuroblastoma humano SK-N-SH, en condiciones de apoptosis inducida, se observó un aumento paralelo de las actividades AChE y caspasa-3 (principal responsable de la apoptosis y esencial para la fragmentación del DNA) (Zhang y col., 2002). Todavía quedan por aclarar los mecanismos por los que la AChE interviene al comienzo de la apoptosis (condensación y fragmentación de la cromatina) y la posible relación entre AChE y caspasas.

Los datos epidemiológicos y los estudios con animales han revelado que muchos pesticidas son cancerígenos. En este contexto, cabe señalar el hecho de que los agricultores constituyan uno de los grupos de población con mayor incidencia de leucemias y linfomas no Hodgkins (Perry y Soreq, 2004), lo cual podría estar relacionado con su exposición a insecticidas organofosforados. Aunque se desconoce el mecanismo molecular por el que la AChE participa en la transformación neoplásica, se ha demostrado que las ratas expuestas a organofosforados desarrollan tumores en glándula mamaria (Cabello y col., 2001; Cabello y col., 2003). Para explicar la relación entre los organofosforados y cáncer, y en base al papel de AChE en la apoptosis, se ha sugerido que la inactivación de la enzima con organofosforados desencadena la aparición de células tumorales resistentes a la apoptosis y proclives a la expansión celular incontrolada (Zhang y col., 2002).

El hecho de que el sustrato endógeno de AChE, la acetilcolina (ACh), actúe como un factor de crecimiento autocrino en el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) (Song y col., 2003) refuerza la importancia de la AChE y su relación con las neoplasias. En el tracto respiratorio, ACh actúa como neurotransmisor en ganglios y en nervios parasimpaticomiméticos postganglionares, pero además se comporta como un mediador paracrino, que se libera desde varias células no neuronales. Casi todos los tipos celulares presentes en el tracto respiratorio expresan receptores nicotínicos y muscarínicos que se activan por acetilcolina (Racke y col., 2006).

De todo lo expuesto queda patente la implicación de las colinesterasas en las neoplasias, aunque todavía queda un largo camino por recorrer antes de conocer plenamente los mecanismos moleculares que subyacen en el proceso.

OBJETIVOS

De un tiempo a esta parte, el grupo de investigación dirigido por el Dr. Vidal ha venido estudiando las actividades y formas moleculares de AChE y BuChE presentes en tumores. Los primeros trabajos aportaron valiosa información sobre la actividad colinesterásica en los tumores derivados de las meninges (meningiomas) (Saez-Valero y Vidal, 1995; Saez-Valero y Vidal, 1996), los de células gliales (gliomas) (Garcia-Ayllon y col., 2001; Saez-Valero y col., 1996) y los de nervios intracraneales (neurinomas) (Garcia-Ayllon y col., 1999b). Se pudo constatar que la relación de actividades AChE y BuChE era distinta según el tipo celular del que originara el tumor (células epiteliales de las meninges, células gliales o neuronales). Además, aunque en todos los casos la actividad se distribuía entre un conjunto de formas moleculares de AChE y BuChE, cada clase de neoplasma mostraba una composición particular de moléculas enzimáticas. De este modo, el perfil de formas moleculares de AChE y BuChE era distinto en meningiomas que en gliomas (astrocitomas y oligodendrogliomas) y ambos diferentes del de neurinomas. Esta línea de investigación dio un giro hacia el proceso tumoral en mama (Ruiz-Espejo y col., 2002) y en ganglios linfáticos (Ruiz-Espejo y col., 2003). En los tumores de mama, la actividad AChE aumenta y la BuChE disminuye, y en los ganglios la actividad AChE desciende bruscamente, manteniéndose la BuChE. En los tumores de colon humano, disminuye tanto la cantidad de RNAm para AChE y BuChE como la actividad de ambas enzimas (Montenegro y col., 2006), y en los de riñón, los cambios en la cantidad de RNAm y en la actividad AChE y BuChE dependen de la clase de tumor renal (Munoz-Delgado y col., 2010).

El objetivo principal de este trabajo fue averiguar mediante una serie de estudios experimentales, en qué medida variaba la expresión y las características de AChE y BuChE en pulmón sano (PS) y en los principales tipos histológicos de pulmón tumoral (PT), y comprobar si dichas enzimas podían ser usadas como marcadores tumorales en función de los distintos tipos histológicos.

Con estos estudios, se pretendía:

1.- Analizar si la transformación neoplásica afectaba a la actividad AChE y/o BuChE en tejidos pulmonares. Averiguar, por otro lado, si el tipo histológico de cáncer de pulmón no microcítico influía en dichos cambios.

2.- Establecer los patrones de las formas moleculares de ambas enzimas en tejidos afectados y no afectados, con el fin de detectar posibles modificaciones causadas por el proceso tumoral.

3.- Detectar las subunidades de AChE y BuChE y averiguar si sus tamaños cambiaban en los tumores. También nos propusimos comparar las relaciones actividad AChE/proteína AChE y actividad BuChE/proteína BuChE en las muestras sanas y tumorales.

4.- Identificar los ARNm de AChE y BuChE y conocer si su cantidad relativa se alteraba en los tumores.

5.- Averiguar si las células tumorales humanas en cultivo expresaban proteínas implicadas en la señalización colinérgica y si la estimulación colinérgica afectaba de algún modo a la proliferación celular.

Para dar respuesta a esos objetivos generales se procedió a:

1.- Extraer las colinesterasas débilmente unidas a las membranas de las muestras de pulmón, con tampones sin detergente y, posteriormente, las ligadas fuertemente, usando medios con detergente. En cada caso, se determinaron los porcentajes de solubilización, se identificaron las formas moleculares por su coeficiente de sedimentación, calculado éste a partir de los análisis de centrifugación en gradientes de sacarosa, y se analizaron los cambios en los patrones de formas moleculares de las colinesterasas en PS y PT.

2.- Valorar las actividades AChE y BuChE en muestras de pulmón normal, tumoral primario (en sus variantes adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma epidermoide).

 Examinar la posible relación entre la actividad colinesterásica en pulmón tumoral y diversos parámetros clinicopatológicos.

4.- Investigar si los dímeros y monómeros de AChE estaban anclados a las membranas por restos de glicosilfosfatidilinositol (GPI), y si las moléculas homólogas del tejido normal y patológico diferían en la composición del anclaje GPI.

5.- Averiguar el origen de las ChEs del tumor y conocer si la malignidad afectaba a la glicosilación de las moléculas de AChE y/o BuChE. Para ello, se usaron lectinas con distinta especificidad frente a los azúcares terminales de los oligoglicanos.

6.- Estudiar la expresión de los componentes del sistema colinérgico en células tumorales humanas en cultivo, sus propiedades y la respuesta a la estimulación colinérgica mediante agonistas.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS
1. MATERIALES

1.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o del mayor grado de pureza posible. Si no se indica lo contrario, las disoluciones fueron preparadas con agua Milli-RX purificada por electrodesionización, sistema RX, grado analítico tipo II. Los reactivos que lo requerían se disolvieron en agua Milli-Q Plus (tipo I, grado reactivo).

A continuación se detallan los productos usados y su procedencia.

Fueron de SIGMA todos los reactivos usados para extraer las ChEs de las muestras de pulmón y de las líneas celulares: EDTA, pepstatina A, bacitracina, inhibidor de tripsina (de soja), aprotinina, leupeptina; los reactivos para medir actividad ChE: ioduro de acetiltiocolina, ioduro de butiriltiocolina, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) tetraisopropil-pirofosforamida (iso-OMPA) y dibromuro de 1,5-bis-(4-allildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona (BW284c51); enzimas marcadoras de coeficiente de sedimentación (catalasa de hígado bovino y fosfatasa alcalina de intestino bovino), sacarosa, PIPLC de *Bacillus thuringiensis*, los detergentes Triton X-100 y Brij 96, y los reactivos para electroforesis y Western blot: albúmina de suero bovino (BSA), leche en polvo, acrilamida, bis-acrilamida, β-mercaptoetanol, persulfato amónico (PSA), TEMED, SDS, azul de Coomassie R-250, disolución reveladora de la actividad fosfatasa alcalina (BCIP/NBT, B-6404), Tween 20, papel de filtro especial para blotting, membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de tamaño de poro.

SIGMA nos proporcionó también la matriz Sepharose-4B y las lectinas Con A y LCA unidas a Sepharose y WGA a agarosa; también nos suministró el anticuerpo anti-β-actina y los reactivos HEPES, suero fetal bovino y tripsina-EDTA empleados en los cultivos de células tumorales de pulmón.

General Electric Healthcare nos proporcionó los marcadores de peso molecular Rainbow utilizados en Western-Blot (Full-Range Rainbow Molecular Markers), las membranas de PVDF (0.45 µm de tamaño de poro) y el reactivo de revelado para Western-Blot (ECL plus). De Merck fueron Tris, NaCl, CaCl₂, MnCl₂ y fosfato sódico.

El antisuero generado en cabra contra el extremo N-terminal de AChE humana (N-19) procedió de Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, California, USA. Las proteínas reconocidas por N19 se visualizaron con dos anticuerpos secundarios, ambos de SIGMA: un anti-IgG de cabra/oveja marcado con fosfatasa alcalina y otro anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). En cuanto a los reactivos de biología molecular, para la extracción del ARNm se usó el Chemagic mRNA Direct Kit (Chemagen) y para la retrotranscripción el Kit Gene Amp PCR de Applied Biosystems. Para la PCR a tiempo real usamos el equipo LightCycler de Roche Diagnostics. Con el fin de identificar los transcritos de colinesterasas, se utilizó el Kit SYBR Green premix Ex Taq[™] de la casa comercial Takara. Los cebadores (*primers*) específicos fueron sintetizados por Bonsai Technologies.

Para comprobar que la amplificación da cada producto de la PCR transcurre correctamente realizamos una electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se usó Agarose D-1 Low EEO de Pronadise y reactivos de Promega, pGEM®DNA Markers, como marcadores de tamaño, y la disolución pGEM® compuesta por naranja de acridina 0,4%, azul de bromofenol 0,03%, xileno cianol 0,4%, 15% de Ficoll®400, 10 mM de Tris-HCL (pH 7.5) y EDTA 50 mM.

1.2. Líneas celulares

En los estudios realizados con células en cultivo se han usado cuatro líneas celulares: dos procedentes de cáncer de pulmón de células no pequeñas (no microcítico; A549 y H157) y otras dos de tumores de pulmón de células pequeñas (microcítico; DMS79, H69). Las líneas celulares fueron gentilmente proporcionadas por el Profesor Luis M. Montuenga, Universidad de Navarra.

2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

2.1. Pacientes.

En este estudio se usaron muestras de carcinomas de pulmón y tejidos controles o sanos adyacentes no tumorales, obtenidos mediante extracción quirúrgica entre los años 2001 y 2008, y suministrados por el Dr. Juan Torres, Jefe de Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Virgen de la Arrixaca.

De los 31 pacientes de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (*non small cell lung cancer*, NSCLC), 28 fueron hombres y tres mujeres. El rango de edad fue de 45 a 79 años, con una media de 63,9 años. Las muestras malignas pesaron entre 28 y 431 mg; las sanas, entre 34 y 222 mg. Tras la escisión, todas las muestras se congelaron y mantuvieron a -80°C hasta su utilización posterior.



H157	E CE	
TIPO DE CRECIMIENTO: Adherente		
ORGANISMO: Homo sapiens (humano)		187777
MORFOLOGÍA: Epitelial.	S##/	NO 1998
ORIGEN: carcinoma epidermoide de pulmón.		
MEDIO CULTIVO: RPMI 1640 + 2 mM glutamina estable		
(Biowest P1031) + 1.5 g/L NaHCO3 + 10% v/v HEPES (Sigma H0887)		
+ 10% v/v suero fetal bovino inactivado por calor (Sigma F9665).		
ATMÓSFERA: 95% humedad, CO_2 5%. TEMPERATURA: 37°C.		
TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 28 horas		
Subcultivo:		
El mismo que el de las células A549.		

N417

TIPO DE CRECIMIENTO: Suspensión.

ORGANISMO: *Homo sapiens (*humano)

MORFOLOGÍA: Irregular, agregados multicelulares.

ORIGEN: Líquido pleural de paciente con carcinoma de pulmón de células pequeñas.

MEDIO CULTIVO: RPMI 1640 + 2 mM glutamina estable

(Biowest P1031) + 1.5g/L NaHCO₃ + 10% v/v HEPES (Sigma H0887)

+ 10% v/v suero fetal bovino inactivado por calor (Sigma F9665).

ATMÓSFERA: 95% humedad, CO₂ 5%. TEMPERATURA: 37°C.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 72 horas

Subcultivo:

1. Agitar frascos cultivo.

2. Centrifugar 5 min a 600x rpm (Centrífuga Bekman Allegra X-12).

3. Resuspender el precipitado en medio de cultivo completo. A una alícuota (25 μL) añadir el mismo volumen de azul-tripán; contar con cámara Neubauer.

4. Añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a frascos de cultivo para que queden a 1 x 10^5 células/mL.

H69

TIPO DE CRECIMIENTO: Suspensión.

ORGANISMO: *Homo sapiens* (humano)

MORFOLOGÍA: Irregular, agregados multicelulares esféricos.

ORIGEN: Líquido pleural de paciente con carcinoma de pulmón de células pequeñas.

MEDIO CULTIVO: RPMI 1640 + 2 mM glutamina estable

(Biowest P1031) + 1.5g/L NaHCO₃ + 10% v/v HEPES (Sigma H0887)

+ 10% v/v suero fetal bovino inactivado por calor (Sigma F9665).

ATMÓSFERA: 95% humedad, CO₂ 5%. TEMPERATURA: 37°C.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 39 horas (aproximado

Subcultivo:

1. Agitar frascos cultivo.

2. Centrifugar a 600x rpm (Centrífuga Bekman Allegra X-12), 5 min.

3. Resuspender el precipitado en medio de cultivo completo. A una alícuota (25 µL) añadir el mismo volumen de azul-tripán y contar con cámara Neubauer.

4. Añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a frascos de cultivo para que estén a 1 x 10⁵ células/mL.



2.1.1. Caracterización de los tumores pulmonares

Las distintas variedades histológicas fueron identificadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Arrixaca, tras el estudio anatomopatológico sistemático.

Una evaluación histológica de los tumores aplicando del criterio de la OMS (TNM), reveló que 14 correspondían a Adenocarcinoma (AC), 6 fueron Carcinomas de Células Grandes (CCG) y 11 de ellos se diagnosticaron como Carcinoma de Células Escamosas o Epidermoide (CE). Los estadios fueron asignados, también, de acuerdo con el sistema de clasificación internacional TNM. Todos los pacientes fueron informados de forma apropiada y dieron su consentimiento para el estudio.

2.1.2. Extracción de AChE y BuChE de pulmón normal (PN) y tumoral (PT)

Las muestran fueron descongeladas lentamente a 4°C, y a esa temperatura se realizó todo el proceso de extracción (Ruiz-Espejo y col., 2002). El tejido se pesó y troceó con bisturí y, luego, se homogeneizó (5% p/v) en buffer Tris salino (TSB) que llevaba NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, EDTA 3 mM, Tris 10 mM, pH 7.5. Antes de usarlo, se añadió al tampón de extracción una mezcla reciente de inhibidores de proteasas (inhibidor de trypsina 0,1 mg/ml, bacitracina 1 mg/ml, aprotinina 0,0022 TIU/ml, pepstatina A 10 µg/ml y leupeptina 20 µg/ml). La mezcla se preparó a partir de una solución concentrada 25x en tampón fosfato 10 mM y pH 7,5.

El tejido se homogeneizó con un homogeneizador (Polytron PT 3100), a 2000 rpm durante 20s. La suspensión obtenida se volvió a homogeneizar en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón. La muestra se sometió a 15 golpes con velocidad media. Se retiró una alícuota de la suspensión (H₀) y el resto se centrifugó en ultracentrífuga Beckman TLA (Centrikon T-1055), rotor Beckman 100.4, a 30.000 rpm, 35 min, a 4°C. Se recogió el sobrenadante (S₁), el cual contenía las ChEs solubles en el tejido o débilmente unidas a las membranas.

El precipitado (P₁) se volvió a homogeneizar con el tampón salino, en el mismo volumen e idénticas condiciones, sólo que ahora, además de las antiproteasas, el medio de extracción tenía Brij 96 al 1% p/v (TSB-B). Se usó Brij 96, en vez de TX-100, para evitar la fuerte inhibición que sufre la BuChE con este detergente (Moral-Naranjo y col., 1996). Se apartó una alícuota de la suspensión obtenida (H₁), y el resto se volvió a centrifugar como antes para recoger en el sobrenadante S₂ las proteínas fuertemente ligadas a las membranas (**Figura 2.1**).



Figura 2.1. Protocolo usado para extraer las Colinesterasas de pulmón humano.

2.1.3. AChE y BuChE de suero humano

Se partió de 4-5 mL de sangre recién extraída de donantes sanos y de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón. Las muestras control fueron suministradas por la Unidad de Análisis Clínicos del Hospital Virgen de la Arrixaca. La sangre se recogió en tubos "Z Serum Sep Clot Activator" de Vacuette, que luego se centrifugaron a 2500 rpm (1500g), 5 min a 4°C. El suero sobrenadante se repartió en alícuotas y se congeló a -80°C hasta su utilización.

3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD COLINESTERÁSICA.

3.1. Fundamento del método de medida

Las actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se valoraron por el método espectrofotométrico de Ellman (Ellman y col., 1961). Los sustratos fueron la acetiltiocolina (ATCh) para la actividad AChE y la butiriltiocolina (BuTCh) para la BuChE.

Las enzimas AChE y BuChE hidrolizan a los tioanálogos de sus sustratos preferentes y producen acetato (o butirato) y tiocolina. La tiocolina reacciona rápidamente con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y libera un cromógeno, el anión 5,5'-tio-2-nitrobenzoato. Este anión muestra un color amarillo intenso y un máximo de absorbancia a 412 nm (ϵ =1,36·10⁴ M⁻¹·cm⁻¹). Esta circunstancia permite seguir la aparición de tiocolina en el medio de reacción, mediante un colorímetro o espectrofotómetro. En la **Figura 2.2** se ilustra la reacción, para el caso de la AChE.

El inconveniente del método es la interferencia que producen los grupos tioles libres de las proteínas de la muestra. Estos grupos reaccionan con el DTNB ocasionando un cambio de absorbancia que no corresponde a la hidrólisis del sustrato. Para evitarlo, las muestras se incuban con el DTNB 20 min antes de añadir el sustrato. De esa manera, se valoran los grupos tioles de las proteínas antes de comenzar la reacción enzimática.



Figura 2.2. Determinación de la actividad AChE por el método de Ellman.

Aunque la especificidad de las ChEs por su sustrato preferente es elevada, para valorar de forma precisa de la actividad AChE, se recomienda añadir al medio de reacción Iso-OMPA, un inhibidor relativamente específico de BuChE. Para la medida de BuChE, es conveniente añadir BW284C51, un inhibidor selectivo de AChE (Austin y Berry, 1953).

3.2. Medida de la actividad colinesterásica en cubeta

Para valorar las actividades AChE y BuChE en cubeta se usó un espectrofotómetro de doble haz, Perkin-Elmer Lambda 25, a 37°C. El medio de reacción contenía tampón de medida (fosfato 0,1 mM, pH 8), DTNB 0,33 mM, 1 mM de sustrato (ioduro de acetiltiocolina para AChE o de butiriltiocolina para BuChE) y el inhibidor adecuado.

En un ensayo rutinario, en cubetas de plástico de 1,5 ml se depositaron: un volumen de tampón de medida, atemperado a 37°C, los reactivos y la muestra, hasta completar 1 ml. El volumen y la concentración de los reactivos fueron siempre los mismos, así como el orden de adición; 33 µl de disolución de DTNB (10 mM en tampón de medida), 25 µl de inhibidor (iso-OMPA 2 mM para AChE o BW284C51 0,4 mM para BuChE). Se añadían 25 µl de muestra, e inmediatamente después se agitaba el contenido de la cubeta y se dejaba incubar unos 10-15 min para permitir la reacción entre el DTNB y los grupos tioles libres de las proteínas. Pasado ese tiempo, se comprobaba que la absorbancia a 412 nm se mantenía constante. La reacción se iniciaba añadiendo 25 µl de sustrato (ATCh o BuTCh 40 mM en agua). Después de agitar la cubeta, se registraba el aumento de absorbancia a 412 nm (A412) y 37°C, frente a una cubeta con un ensayo "blanco", en el que el volumen de muestra se sustituía por tampón de medida. El blanco sirve para restar al ensayo con enzima el cambio de absorbancia debido a la hidrólisis espontánea (no enzimática) del tioanálogo (ATCh o BuTCh). Además, con el fin de valorar la contribución de las esterasas inespecíficas, presentes en los extractos, a la hidrólisis del sustrato, se realizaron medidas incluyendo los inhibidores de AChE y BuChE, BW284C51 e iso-OMPA. Por tanto, el aumento de absorbancia final se obtuvo restando al cambio de absorbancia en el ensayo enzimático (con el inhibidor de BuChE o de AChE), el debido a la hidrólisis no enzimática del sustrato y el producido por las esterasas no específicas (determinada en presencia de los inhibidores de AChE y BuChE).

El propio espectrofotómetro representaba los valores de A412 respecto al tiempo, y transformaba la pendiente de la recta en datos reales de actividad. La actividad enzimática se obtuvo multiplicando el incremento de absorbancia/minuto por un factor (F) que, para un paso óptico de 1 cm, se obtiene por la expresión:

$$F = \frac{1000 \cdot V_{T}}{1,36 \cdot 10^{4} \cdot V_{M}}$$

En la que V_T y V_M indican, respectivamente, los volúmenes de medio de reacción y de muestra, en mililitros; $1,36\cdot10^4$ M⁻¹·cm⁻¹ es el coeficiente de extinción molar del cromófero (ϵ 412), y 1000 es un factor de conversión. La actividad viene dada en unidades por ml de muestra (U/ml), en la que cada unidad de actividad AChE o BuChE (U) representa la cantidad de enzima que hidroliza un micromol de sustrato por minuto (µmol·min⁻¹) en las condiciones de ensayo. Por tanto, la actividad enzimática se expresa en µmoles·min⁻¹·ml⁻¹ (U/ml), o como actividad específica en µmoles·min⁻¹·mg⁻¹ (U/mg).

3.3. Medida de actividad por un microensayo colorimétrico

Para medir la actividad colinesterásica (acetil y butirilcolinesterasa) en las fracciones recogidas de los gradientes de sacarosa (ver Apdo. 2.1.4), y en muestras con baja actividad, se siguió el método de Ellman, modificado para convertirlo en un microensayo colorimétrico (Campoy y col., 1992). Se usaron placas de plástico transparente (Nunc), con 96 pocillos de fondo plano y con una capacidad de unos 400 µl, en los que transcurría la reacción.

Las concentraciones de sustrato, inhibidor y DTNB fueron las mismas para el microensayo y para la valoración en cubeta, e igual el tampón de medida, sólo que ahora el pH fue 7,5. De este modo, para un volumen final de 300 µl, se depositaron en los pocillos 25 µl de muestra, 250 µl de una "mezcla de reacción", con tampón fosfato 100 mM, DTNB 0,36 mM y el inhibidor de cada enzima a la concentración adecuada, y finalmente 25 µl del sustrato correspondiente (12 mM). En ocasiones, cuando la actividad enzimática era muy baja, se llegó a medir con 50 µl (el habitual para medirla en las fracciones de los gradientes de sacarosa), y hasta con 100 µl, modificando entonces los volúmenes y concentraciones de los reactivos para mantener las concentraciones finales fijas.

Tras añadir la muestra y la "mezcla de reacción" (tampón fosfato, DTNB y el/los inhibidores) en los pocillos, se incubaba todo unos 20 min para que reaccionara el DTNB con los grupos tioles de las proteínas. En cada microplaca, la primera columna de pocillos se usó como "blanco", sustituyendo la muestra por su volumen de agua. Además, para cada muestra se hizo otro "control", que contenía los reactivos (incluida la muestra) y los dos inhibidores de las ChEs, con el fin de valorar el incremento de absorbancia debida a la acción de esterasas inespecíficas.

La reacción comenzaba con la adición del sustrato, e inmediatamente después se medía la placa (tiempo cero); a continuación se practicaban medidas sucesivas a intervalos regulares de tiempo. Hay que asegurarse de que los incrementos de absorbancia son constantes en los sucesivos intervalos, es decir, que la actividad varía linealmente con el tiempo. En general, se invertían 2 h para valorar las actividades AChE y BuChE en las 38-42 fracciones recogidas de cada gradiente de sacarosa, y el incremento de absorbancia se comparaba en los intervalos de 0 a 60 min y de 60 a 120 min. Las medidas se realizaron en

un lector de placas (Whittaker Bioproducts EIA 400 FW), por el modo de doble longitud de onda: 405 nm y 620 nm. Los dos valores de absorbancia se restan entre sí, A405-A620, para descontar la posible diferencia en la absorbancia del plástico de la microplaca. La diferencia entre el incremento de absorbancia, en el intervalo de tiempo escogido, y el cambio de absorbancia en los pocillos "control", dividido entre los minutos del intervalo de medida proporciona el incremento de absorbancia por minuto.

La actividad colinesterásica medida por el microensayo se expresa en unidades arbitrarias (UA), que representan un incremento de 0,001 en la diferencia A405-A620, por min y por cada 25 μ l de muestra. De este modo, los valores de actividad en las fracciones del gradiente se normalizan de acuerdo con el volumen de muestra aplicado en el gradiente. Aunque la actividad se exprese en unidades arbitrarias, siempre se pueden convertir en μ moles·min⁻¹·ml⁻¹ (U/ml), aplicando el factor de conversión adecuado.

Aunque las condiciones de temperatura y pH cambian según la actividad se valore en cubeta (37°C, pH 8) o por microensayo (temperatura ambiente y pH 7,5), la medida en microplaca presenta varias ventajas respecto a las medidas en cubeta. Por un lado, la mayor sensibilidad del método permite valorar muestras con poca actividad, con tal de prolongar el tiempo de medida; la segunda ventaja es el ahorro de muestra y reactivos que supone el microensayo; la tercera, y tal vez la más importante, es que en los 96 pocillos se pueden medir hasta 88 muestras, además de los 8 blancos, de forma simultánea, una circunstancia especialmente importante a la hora de valorar la actividad AChE y BuChE en cada una de las 38-42 fracciones que se obtienen de un gradiente de sacarosa.

4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ACETILCOLINA

La cantidad de ACh se determinó mediante el kit Amplex® Red Acetylcholine/ Acetylcholinesterase Assay Kit (Invitrogen), método que permite medir los niveles de ACh en un fluorímetro. En primer lugar, la AChE escinde al sustrato ACh en acetato y colina, que por acción de la colina oxidasa se transforma en betaína y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El H₂O₂, en presencia peroxidasa de rábano, reacciona en proporción 1:1 con Amplex red para dar un compuesto fluorescente, resorufin, con un máximo de absorción a 563 nm y de emisión a 587 nm.

Con el fin de determinar la cantidad de ACh libre en las muestras, los extractos S_1+S_2 obtenidos de las piezas quirúrgicas de pulmón se filtraron a través de un filtro Amicon Ultra 10k-Device de Millipore. El objetivo de la filtración era eliminar las proteínas de gran tamaño, entre ellas la AChE, que podía interferir en la determinación de los niveles de ACh y de colina libre. Para determinar la ACh, se vierten en microplacas de 96 pocillos alícuotas de 100 µL de los extractos filtrados. A continuación, se añade la solución de trabajo compuesta por: reactivo Amplex Red 400 µM, HRP2 U/mL, colina oxidasa 0,2 U/mL y AChE1 U/mL.

2. Materiales y Métodos

Como control negativo sustituimos el volumen de muestra por tampón de reacción y para el control positivo se emplea H_2O_2 10 μ M. La concentración de ACh se obtiene de una curva estándar preparada con 0-100 mM ACh.



Figura 2.3.Esquema de la reacción para la determinación de los niveles de ACh mediante el método de Amplex Red.

5. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Para valorar la proteína se empleó el método de Bradford, mediante el kit comercial de BioRad, que permite medir la proteína en los homogenados y sobrenadantes obtenidos después de extraer las ChEs de las muestras de pulmón.

El método de Bradford es útil para muestras con bajo contenido de proteína; pues detecta cantidades del orden de microgramos. Se basa en el cambio del máximo de absorbancia, de 465 nm a 595 nm, que se produce cuando la disolución ácida del Azul de Coomassie G-250 se une a las proteínas. En medio ácido, el Coomassie es de color rojo pardo, y a pH alcalino azul intenso. En medio ácido, el cambio de color se debe a que sólo la forma aniónica (azul) es capaz de unirse a las proteínas. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

La elevada sensibilidad del método exige que el material esté muy limpio. Para valorar la proteína, se elabora una recta patrón, a partir de una disolución de BSA (1

mg/ml). Para ello, en los pocillos de una microplaca se vierten 2, 4, 6, 8, 10 y 12 µl de la proteína estándar y se completa con 200 µl de agua desionizada. Se preparan dos series. Las muestras se diluyen adecuadamente; se depositan en la microplaca cuatro volúmenes de cada una de ellas (10, 20, 40 y 50 µl) por duplicado. Los tampones también se diluyen en la misma proporción que las muestras y se sitúan en la microplaca en la misma disposición que aquellas. Servirán como blancos para eliminar cualquier interferencia debida a las sales. A continuación se vierte en cada pocillo 0,05 ml de reactivo de Bradford. La mezcla se incuba 5 min para completar la reacción y se lee la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas. La cantidad de proteína se calcula por referencia a la recta patrón.

6. ANÁLISIS DE SEDIMENTACIÓN

Para averiguar la composición de formas moleculares de las colinesterasas en los tejidos de pulmón, las muestras se centrifugaron en gradientes continuos de densidad de sacarosa del 5 al 20% p/v. Cada componente molecular se identificó por su coeficiente de sedimentación (S) particular, que se calculó de acuerdo con el método de Martin y Ames (Martin y Ames, 1961), según el cual se comparan las distancias recorridas en el gradiente por la molécula a identificar y la de una proteína estándar de coeficiente de sedimentación conocido.

La centrifugación en gradientes de sacarosa conteniendo Brij 96 o Triton X-100 permite conocer el carácter hidrofílico o anfifílico de las proteínas. En el caso de proteínas anfifílicas, el detergente impide su agregación al fijarse en sus dominios hidrofóbicos, y altera su migración en el gradiente porque en el mismo viajan los agregados proteínadetergente. Por tanto, el coeficiente de sedimentación de una proteína anfifílica cambia en presencia de detergente, cosa que no le ocurre a una molécula hidrofílica.

Por otro lado, los agregados proteína-Brij 96 entran en el gradiente menos que los complejos con TX-100, y las formas anfifílicas de AChE y BuChE se separan mejor si los gradientes llevan Brij 96 en vez de Triton X-100 (Moya-Quiles y col., 1992).

6.1. Preparación de los Gradientes de Sacarosa.

En cada depósito del formador de gradiente, a modo de vasos comunicantes, se vierten disoluciones de sacarosa al 5% y 20% p/v en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, conteniendo NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM y Brij 96 (0,5% p/v). En el vaso con salida al exterior se ponen 5 ml de sacarosa concentrada, y en el otro 5 ml de sacarosa diluida. El vaso donde se pone la sacarosa concentrada tiene una salida en su base, que se conecta a un tubo fino de silicona. El tubo se pasa por una bomba peristáltica (Gilson, Minipuls 3), de forma que su extremo desemboque en un tubo de centrífuga de 12 ml (Ultra-clearTM Beckman No.

344060). Al tiempo que se abre el paso que comunica los vasos, se pone en marcha la bomba peristáltica. El gradiente se forma a medida que la disolución de sacarosa diluida pasa hacia la cámara de la concentrada, en donde se mezclan mediante un agitador helicoidal. El flujo de salida se controla de forma constante con la bomba peristáltica.

Para poder calcular los coeficientes de sedimentación de las proteínas, antes de verter las muestras sobre el gradiente, se añaden 10 μ l de cada proteína estándar: catalasa de hígado bovino (11,4 S) y fosfatasa alcalina de intestino bovino (6,1 S).



Figura 2.4. Esquema del sistema para la formación de gradientes de densidad continuos de sacarosa.

Una vez depositadas las muestras (200-1000 μ l), los tubos con los gradientes se centrifugan 18 h a 36000 rpm y a 4°C, en un rotor basculante Beckman SW41Ti. Tras la centrifugación, los tubos se perforan por su base, con un perforador (Beckman), y se recogen fracciones (entre 38 y 42, de unos 260 μ l) con la ayuda de la bomba peristáltica y un colector de fracciones (Modelo 2110 de BioRad) (**Figura 2.5**).

En cada fracción del gradiente se determina la actividad ChE y la de las enzimas marcadoras. Se representan los resultados gráficamente y se localizan las fracciones con actividad máxima. También se averiguan las posiciones de las proteínas marcadoras. La proporción relativa de cada forma molecular, de AChE o BuChE, se obtiene sumando la actividad de las fracciones que componen cada pico y dividiendo la suma por la actividad total recuperada del gradiente. Si en los perfiles aparecen picos solapados, se separan mediante un programa de deconvolución en curvas de gauss (Peak-Fit de SPSS, versión 4)



Figura 2.5. Esquema de la separación de proteínas basada en la diferencia de velocidad de sedimentación.

6.2. Localización de las Proteínas Marcadoras

La catalasa y la fosfatasa alcalina se disuelven por separado en NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, a la concentración de 15 y 20 mg/ml, respectivamente. Se añaden a las muestras 10 μ l de cada marcador y, tras la centrifugación, se identifican las fracciones con mayor actividad.

La actividad catalasa (C) se determina mediante un método espectrofotométrico, adaptado a microplaca. Se registra la disminución de absorbancia a 240 nm de una mezcla de reacción que lleva 0,2 ml de H₂O₂ 18 mM, en tampón fosfato 50 mM, pH 7,0, y 5-10 µl de muestra. La mezcla de reacción se prepara poco antes de comenzar las medidas, añadiendo 200 µl de H₂O₂ (30% v/v) a 100 ml de tampón fosfato. La absorbancia disminuye conforme la catalasa convierte H₂O₂ (ϵ = 41 M⁻¹ cm⁻¹) en oxígeno molecular y agua y. La actividad catalasa se mide en microplaca, región UV (Greiner Bio-One[™], 96 Well UV-Star®) y a temperatura ambiente.

A pH alcalino, la fosfatasa alcalina (F) convierte p-nitrofenilfosfato (pNPP) en fosfato y p-nitrofenol, cuya aparición se mide a 405 nm (ϵ = 18,2·103 M⁻¹·cm⁻¹). Antes del ensayo, se mezclan 0,2 ml de pNPP 38 mM y 10 ml de tampón dietanolamina 0,1 M, pH 9,8. En cada pocillo de una microplaca se depositan 10 µl de muestra y 250 µl de mezcla de reacción. Las medidas se practican a temperatura ambiente, con el modo dual de longitud de onda, 405 y 620 nm, y se registra el incremento de absorbancia (A405-A620) en cada pocillo.

6.3. Cálculo del coeficiente de sedimentación

Una vez medidas las actividades AChE y BuChE y las de las enzimas marcadoras en las fracciones del gradiente, se calcula el coeficiente de sedimentación de cada componente molecular de AChE y BuChE, expresado en unidades Svedberg (S), por el método de Martin & Ames (Martin y Ames, 1961), según la siguiente fórmula:

$$S_{proteína\ problema} = \frac{(N_t-N_p)}{(N_t-N_e)} \times S_{20,w\ proteína\ estándar}$$

En la que Nt indica el número total de fracciones recogidas del gradiente; Ne, la fracción en la que la actividad de la enzima marcadora es máxima; y Np, la fracción con el valor máximo de actividad de la forma molecular de AChE o BuChE. En cada caso, es conveniente elegir la proteína estándar que migre a la posición más próxima a la forma molecular cuyo coeficiente de sedimentación se desea determinar, por ejemplo, catalasa para las moléculas más pesadas y fosfatasa alcalina para las ligeras.

7. CONVERSIÓN DE FORMAS ANFIFÍLICAS EN HIDROFÍLICAS.

La fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (PIPLC) sirve para saber si una ecto-proteína particular está anclada a la membrana por un resto de glicosilfosfatidilinositol (GPI). La PIPLC hidroliza el enlace fosfodiéster del fosfatidilinositol para dar diacilglicerol e inositol-1,2-monofosfato cíclico. La ectoproteína se libera de la membrana al separarse la porción proteica; el diacilglicerol permanece entre los lípidos. Con PIPLC de origen bacteriano se consigue solubilizar proteínas con GPI, siempre que los hidroxilos del inositol no lleven cadenas acilo. Si ocurre esto, la ectoproteína permanece unida a la membrana por esas cadenas, pese a la pérdida del diacilglicerol.

La PIPLC de *Bacillus thuringiensis* es útil para liberar proteínas ancladas por GPI. Tiene un tamaño de 34 kDa, es activa a pH neutro (pH óptimo 7-7,4), y su actividad no decae en presencia de sales (admite NaCl 0,15 M). También se utiliza con éxito en la conversión de proteínas anfifílicas con GPI en sus variantes hidrofílicas (Low y Huang, 1991; Ferguson, 1992; Sáez-Valero y Vidal, 1995).

Para investigar si la PIPLC podía transformar las formas G_1^A y G_2^A de AChE y BuChE en sus variantes hidrofílicas, en un tubo eppendorf se pusieron 0,5-1 ml de S₂ o del pico del gradiente de sacarosa con alto contenido de moléculas G1A y G2A de AChE. Se añadió PIPLC de B. thuringiensis (3 U/ml de muestra) y la mezcla se incubó 2 h a 37°C. Como control de la conversión se utilizó otra muestra incubada en las mismas condiciones, pero sin fosfolipasa. La conversión de las formas anfifílicas en hidrofílicas se verificó por análisis de sedimentación en gradientes con Brij 96.

8. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

La cromatografía de afinidad hidrofóbica en fenil-agarosa y/o octil-Sepharosa permite establecer el comportamiento hidrofílico o anfifílico de las proteínas. Las proteínas con dominios hidrofóbicos expuestos al medio se ligan a los anillos aromáticos (fenil-agarosa) y/o a las cadenas alifáticas (octil-Sepharosa) inmovilizadas en la agarosa. La eficiencia de la separación de las moléculas hidrofílicas y anfifílicas depende de las interacciones entre el ligando que tenga unido la agarosa, el agua y la proteína. El cambio de temperatura, pH y fuerza iónica, entre otros factores, influyen en la separación, lo que proporciona una gran versatilidad en el diseño experimental y en las condiciones de elución.

La técnica puede emplearse con extractos preparados sin o con detergentes, pues los soportes hidrofóbicos son totalmente estables frente a detergentes iónicos o no iónicos. En los experimentos se emplearon una mezcla de los sobrenadantes S_1 y S_2 , obtenidos por el método de extracción descrito en esta memoria.

Para el experimento, se rellena una columna cromatográfica (10 cm x 1 cm) con 5 ml de fenil-agorosa. Una vez depositada la matriz, se lava con 10 volúmenes de tampón salino (tampón de equilibrio) manteniendo un flujo de 5 ml/h con una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3). Después, se depositan 2 ml de la mezcla S_1+S_2 (1 ml de cada) en la superficie del gel, y sin dejar que se seque la superficie del gel, se añade medio de equilibrio (20 ml de tampón Tris 10 mM, pH 7,5), conservando el flujo de salida. Se recogen las proteínas no retenidas (formas hidrofílicas), y aún húmeda la superficie de la resina, se añade otros 20 ml del tampón Tris anterior, sin sales pero conteniendo el detergente Triton X-100 (2% p/v) para liberar las ChEs ligadas al gel (formas anfifílicas). Con un colector de fracciones (BioRad 2110) se recogen fracciones de aproximadamente 0,75 ml, tanto de las formas no retenidas com de las eluidas con detergente. Se determinan las actividades de AChE y BuChE en todas las fracciones. Después, se juntan, por una parte, las fracciones con las enzimas no retenidas y, por otra, las retenidas, y se establece la composición de formas moleculares de ambas, por análisis de sedimentación

9. ENSAYOS CON LECTINAS INMOVILIZADAS.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que tienen la capacidad de aglutinar células y precipitar carbohidratos complejos. Aunque se han aislado de virus, bacterias, animales invertebrados y vertebrados, las más conocidas son de origen

vegetal. Las lectinas participan en numerosos procesos biológicos, como el reconocimiento celular y la adhesión. Poseen una especificidad definida para unirse a glicanos de diferente composición sin modificarlos, por lo que se utilizan para identificar, de manera indirecta, la composición de los azúcares terminales de los oligosacáridos, e incluso sirven para purificar glicoproteínas.

Para averiguar la naturaleza de los azúcares terminales de los oligosacáridos unidos a las ChEs, los extractos se incubaron con las siguientes lectinas inmovilizadas: concanavalina A (Con A-Sepharosa), que se une específicamente a restos de a-D-glucosa y a-D-manosa; aglutinina de lenteja (*Lens culinaris* agglutinin, LCA-Sepharosa), que reconoce glucosa, siempre que el oligoglicano tenga fucosa unida a NAcGlc, y aglutinina de germen de trigo (wheat germ agglutinin, WGA-agarosa), que se fija a NAcGlc y ácido siálico. Como control de la unión específica de las ChEs al soporte se empleó Sepharosa-4B.

En los experimentos se utilizó el protocolo de centrifugación directa de los complejos lectina-colinesterasa. Para separar los complejos por centrifugación directa, se depositaron en tubos eppendorf 0,1-0,2 ml de cada matriz, con o sin lectina conjugada, y se lavaron 3 veces con TSB, por centrifugación y resuspensión. A cada tubo-lectina y control-Sepharosa-4B se añadieron 0,2-0,5 ml de la mezcla de los extractos S_1+S_2 y se incubó 16 h a 4°C, con agitación suave. Luego, se separaron los complejos enzima-lectina por centrifugación a 5000g, 15 min y a 4°C en microfuga. Finalmente, se recogió el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el gel. En los sobrenadantes se valoró la actividad colinesterásica y se analizaron las formas de AChE y BuChE no ligadas a las lectinas, mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. Tras la incubación con lectinas, el porcentaje de interacción de las ChEs se obtuvo restando el valor de actividad del control (considerado el 100%) respecto de los sobrenadantes.

10. ELECTROFORESIS.

10.1. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

Concepto. Se denomina electroforesis a la migración de moléculas con carga neta en un campo eléctrico. Cualquier ión o molécula cargada eléctricamente migrará cuando se someta a la acción de un campo eléctrico. A un pH determinado, muchas moléculas biológicas poseen carga eléctrica, cuya magnitud depende del pH y la composición del medio. El desplazamiento de las distintas moléculas depende su carga, peso molecular e intensidad del campo eléctrico aplicado. Con técnicas electroforéticas, es posible separar los diferentes componentes de una mezcla de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas cargadas. La electroforesis en gel de poliacrilamida es especialmente idónea para separar las proteínas individuales de mezclas complejas, como las de las muestras biológicas. Es un método conveniente, rápido y relativamente económico, a nivel de muestra, pues requiere unos pocos microgramos de proteína.

El método de electroforesis más usado para proteínas, se conoce como SDS-PAGE (SDS-polyacrilamide gel electrophoresis), electroforesis en gel de poliacrilamida practicado en presencia de SDS. Descrita por Laemmli (Laemmli, 1970), se trata de una electroforesis en condiciones de desnaturalización. Antes de la electroforesis, las muestras se desnaturalizan por calor y agentes desnaturalizantes (β-mercaptoetanol, que rompe los enlaces disulfuro; SDS, un detergente aniónico que desnaturaliza y comunica carga negativa a la proteína) Con la electroforesis, las proteínas se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

A lo largo de esta Tesis Doctoral, la electroforesis se llevó a cabo por el método de Laemmli, con un equipo Mini-Protean 3 de BioRad (BioRad labs, Ltd., Herts, Reino Unido) (**Figura 2.6**) y un sistema discontinuo de tampones. El sistema de pequeñas dimensiones permite aplicar poca cantidad de muestra y desarrollar la electroforesis en dos geles en poco tiempo.



Figura 2.6. Sistema de electroforesis Mini-Protean 3 de BioRad.

10.1.1. Preparación del gel separador y del gel concentrador

En primer lugar, se montan los cristales (7 x 8,5 cm) donde polimerizará la acrilamida, usando los espaciadores de 0,75 mm. Para el gel separador, la concentración de acrilamida fue del 7,5% (p/v), y para un volumen total de 10 ml se mezclaron:

Agua purificada	4,84 ml
Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	2,50 ml
SDS 10% (p/v)	0,10 ml
Acrilamida 29,2%-bisacrilamida 0,8%	2,50 ml
Persulfato amónico 10% (p/v)	0,05 ml
TEMED	0,01 ml

La mezcla se prepara sin persulfato ni TEMED. La polimerización comienza al añadirlos, se añade el persulfato (recién preparado) y el TEMED, se agita y la disolución se vierte entre los cristales hasta unos 2 cm del borde superior, evitando que se formen burbujas. Por cada gel se necesitan 3,5-4 ml de mezcla.

Inmediatamente después de poner la mezcla entre los cristales, se deposita sobre ella una capa de agua, con sumo cuidado y por los laterales. La capa de agua hace que la polimerización sea uniforme en el borde superior del gel separador y evita que penetre el oxígeno. La polimerización finaliza en menos de 1 h, a temperatura ambiente. Al añadir el agua, se aprecia una interfase entre ésta y la mezcla de acrilamida, pronto desaparece y vuelve a aparecer otra vez cuando el gel ha polimerizado.

Una vez que el gel separador ha polimerizado, se prepara el concentrador, que se diferencia del primero por su menor concentración de acrilamida (4%) y por el pH, ahora casi neutro (6,8), de ahí que se hable de un sistema discontinuo de tampones. Para un volumen de 10 ml se mezclan:

Agua purificada	6,04 ml
Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	2,50 ml
SDS 10% (p/v)	0,10 ml
Acrilamida 29,2%-bisacrilamida 0,8%	1,30 ml
Persulfato amónico 10% (p/v)	0,05 ml
TEMED	0,01 ml

Al igual que para el gel separador, la mezcla de polimerización se prepara, en principio, sin persulfato ni TEMED. Tras retirar la capa de agua del gel separador, se agita la mezcla e inmediatamente se vierte con cuidado hasta el borde de los cristales. Después, se coloca el peine que, tras la polimerización, formará los pocillos en el gel (10 calles). Es importante evitar la formación de burbujas debajo del peine. Se deja polimerizar la mezcla unos 45 min a temperatura ambiente.

10.1.2. Tratamiento de las muestras

Antes de la electroforesis, las muestras se incuban con β -mercaptoetanol (β -ME) y SDS. El SDS es un detergente aniónico que desagrega y desnaturaliza las proteínas; el β -ME es un reductor que rompe los enlaces disulfuro inter- e intracatenarios. Con este tratamiento, las proteínas oligoméricas se disocian en sus subunidades y los polipéptidos resultantes adoptan una conformación de ovillo al azar. Por eso, a este tipo de electroforesis se denomina disociante o desnaturalizante.

Al asociarse el SDS a los polipéptidos, aumenta la carga negativa de las proteínas y, por tanto, su movilidad electroforética. Esto hace que la carga intrínseca del polipéptido resulte insignificante, y que los diferentes complejos SDS-proteína tengan prácticamente la misma densidad de carga. Por tanto, en SDS-PAGE quedan anulados los efectos debidos a la carga y forma de la cadena polipeptídica, de modo que las proteínas se separan únicamente por su tamaño. La mayor o menor migración en el gel dependerá de su facilidad de paso a través del gel de poliacrilamida, cuyos poros forman un tamiz molecular. Ello permite calcular el tamaño de las proteínas, por referencia a proteínas patrones de masa molecular conocida.

Para calcular la masa de las subunidades de AChE y BuChE se usó una mezcla de proteínas estándares no coloreadas (Sigma, SDS-6H) de entre 30 y 200 kDa, que contenía: anhidrasa carbónica de eritrocito bovino (29 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), BSA (66 kDa), fosforilasa b de músculo de conejo (subunidad de 97,4 kDa), β galactosidasa de *E. coli* (subunidad de 116 kDa) y miosina de músculo de conejo (subunidad de 205 kDa). Los marcadores vienen liofilizados; se disuelven en tampón de desnaturalización o carga a una relación de 0,5 mg proteína/ml, aproximadamente. En algunos casos se empleó la mezcla de estándares coloreados de Amersham (Ful-Range Rainbow, Código No: RPN800E) con marcadores de 12, 17, 24, 31, 38, 52, 76, 102, 150 y 225 kDa.

Para desnaturalizar las proteínas, las muestras y la mezcla de proteínas patrones se incubaron, por separado, con tampón de carga (Tc), cuya composición, para un volumen final de 2 ml, es la siguiente:

Agua purificada	1,025 ml
Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	0,250 ml
SDS 10% (p/v)	0,400 ml
β-Mercaptoetanol	0,100 ml
Glicerina 30% (v/v)	0,200 ml
Azul de bromofenol (1 mg/ml)	0,025 ml

El SDS desnaturaliza las proteínas y el β -mercaptoetanol disocia los oligómeros. La glicerina, sustituida a veces por sacarosa, aumenta la densidad de la muestras y evita su difusión al depositarla sobre el gel. El azul de bromofenol se utiliza para facilitar la aplicación de las muestras y seguir el movimiento del frente.

La desnaturalización se completa calentando las muestras y las proteínas patrones a 95°C, 5 min en un bloque calefactor. Después de centrifugar, 0,5-1 min a 3000 rpm en microfuga, se recoge el sobrenadante y se aplica directamente al gel (25 µl) o se guarda en congelador. Como el SDS precipita en frío, hay que calentar las muestras a 95-100°C para que el SDS se disuelva. La relación mg SDS/mg proteína siempre fue mayor que la mínima recomendada, 3 mg SDS/mg proteína.

10.1.3. Aplicación de las muestras y recorrido

Finalizada la polimerización del gel concentrador, se retira el peine, se lavan los pocillos del gel con agua y se coloca el soporte de los geles en el sistema de electroforesis, comprobando que los depósitos con el tampón de recorrido están incomunicados entre sí.

Se vierte tampón de recorrido (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3) en los depósitos con los electrodos, con cuidado de no formar burbujas en las calles o bajo el gel separador. Se necesitan 400 ml de tampón para un sistema Mini-Protean. A continuación, se depositan las muestras (25 μ l) y las proteínas estándares (10 μ l). El color azul de las muestras, por el azul de bromofenol, permite comprobar que la muestra se ha depositado correctamente.

La electroforesis se desarrolló a voltaje constante (180 v) y a temperatura ambiente. Puesto que los geles no son muy gruesos (0,75 cm) y el recorrido dura poco tiempo (unos 45 min) apenas se produce calentamiento, lo que hace innecesario el sistema de refrigeración. El avance del frente se puede seguir observando el desplazamiento del azul de bromofenol, que forma una banda horizontal fina. Cuando el frente está a 1-2 mm del final del gel, se detiene la electroforesis.

10.1.4. Detección de las proteínas

Las proteínas se hicieron visibles por tinción con Azul de Coomassie. El Coomassie Brilliant Blue es un pigmento aniónico, tipo trifenilmetano, que se une de modo no covalente a restos lisina de las proteínas. El colorante es capaz de detectar 1 µg de proteína por banda.

Los pasos seguidos fueron:

- Sumergir el gel media hora en la disolución de tinción, que a la vez fijará las proteínas (0,1% azul de Coomassie, 40% etanol, 10% ácido acético).
- Para desteñir el gel, lavar el gel varias veces con la disolución de desteñido (ácido acético 10%, etanol 10%).

11. WESTERN BLOT.

Los experimentos de Western blot se utilizaron para la detección de proteínas de los tejidos homogeneizados o extractos mediante el uso de anticuerpos específicos para la proteína. Se utiliza la SDS-PAGE para separar las proteínas y, posteriormente, se transfieren desde el gel a la membrana (nitrocelulosa o PVDF). Después de revelar la membrana, se puede examinar la cantidad y/o tamaño de una proteína concreta en una mezcla compleja y comparar sus niveles en distintas condiciones fisiológicas.

11.1. Electrotransferencia

El sistema de transferencia utilizado es el que se muestra en la Figura 2.7.



Figura 2.7. Sistema de transferencia de Biorad para Western blot

Las proteínas pasan del gel a las membranas de nitrocelulosa o PVDF mediante electrotransferencia. Para ello, se pone el gel junto a la membrana y se aplica un campo eléctrico perpendicular al plano del gel. Como las proteínas tienen carga negativa, por el SDS, salen del gel conforme migran al polo positivo (ánodo) y quedan retenidas en la membrana. Luego, se bloquea la membrana y se incuba con anticuerpos primarios y secundarios.

Al acabar la electroforesis, se desmonta el sistema y se separan los dos cristales que contienen el gel. Se realiza un pequeño corte en una esquina del gel separador, para poder identificar la disposición de las muestras, y se elimina el gel concentrador. A continuación, se sumerge el gel separador en tampón de transferencia (TT), 10 min con agitación. El tampón de transferencia lleva metanol 10%, glicina 192 mM, SDS 0,01%, Tris 25 mM, pH>8,3. No es preciso ajustar el pH, pues al disolverse la glicina y el Tris el medio alcanza un valor próximo a 8,6. El SDS facilita la transferencia de las proteínas pero, como todos los detergentes, puede unirse y bloquear la membrana, dificultando así la unión de las proteínas. Por ello, se emplea a una concentración mucho menor que en la electroforesis. El metanol dificulta la salida de las proteínas del gel, pero mejora la adsorción a la membrana de las de pequeño tamaño (~80 kDa o menores). Por eso, deben ajustarse las cantidades de SDS y metanol en cada caso particular, teniendo en cuenta la clase de membrana utilizada. El gel se contrae un poco por el metanol; para evitar problemas en la transferencia, es conveniente incubar el gel unos 10 min en TT, antes de colocarlo junto a la membrana.

Para la transferencia de las proteínas, las membranas (con poros de 0,45 µm) se cortan con un tamaño ligeramente superior al del gel, y se ponen en agua, con cuidado de que no retengan aire. A continuación, se sumergen en agua y luego se incuban unos minutos en TT. A lo largo del proceso, se recomienda manejar las membranas con guantes de látex y pinzas, para evitar mancharlas con grasa y proteínas de las manos.

En este sistema de electrotransferencia, se pone el gel sobre la membrana y ambos se rodean de papel de filtro y esponjas dentro de un "casete" de plástico, para mantener el gel en contacto con la membrana. El casete se monta en una bandeja con abundante TT, para que sus componentes queden sumergidos, evitando que se formen burbujas. Previamente, se empapan en TT dos papeles de filtro para transferencia ("blotting paper"), recortados al tamaño de la membrana, y dos esponjas (Scotch-brite). Sobre la placa negra del casete (que luego quedará hacia el cátodo, polo negativo) se coloca, en este orden, una esponja, un papel de filtro, el gel (cuidando su orientación), la membrana (rodando sobre ella un tubo de ensayo para expulsar el aire y evitar burbujas entre gel y membrana), el otro papel de filtro, la otra esponja y, por último, la tapa clara del casete.

El casete se fija en el soporte que lleva los electrodos, vigilando la orientación de modo que el gel quede cerca del cátodo y la membrana del ánodo. Después, se sumerge el "porta-casete" en la cubeta de transferencia que contiene TT frío, así como un recipiente con un bloque hielo y una barra de agitación. Se tapa la cubeta y se coloca todo sobre un agitador magnético. La transferencia se realiza a 70 V, 3 h en cámara fría, para disipar el calor, y con agitación. Por efecto del campo eléctrico, las proteínas rodeadas de SDS migran al polo positivo, abandonan el gel y son retenidas en la membrana por fuerzas no covalentes. Conviene indicar que, si la transferencia se prolonga, las proteínas pueden atravesar la membrana.

Finalizada la transferencia, se desmonta el sistema y se recorta la membrana antes de separarla del gel (siguiendo el contorno de éste), y se marca una esquina para asegurar la orientación de la membrana.

Después de la transferencia, es conveniente teñir los geles por Coomassie. De esta manera, se comprueba que no quedan proteínas en el gel o que a lo sumo sólo permanecen las de elevado peso molecular, por su dificultad de transferencia en estas condiciones. Si se emplean marcadores preteñidos, su presencia en la membrana prueba que la transferencia ha sido buena.

11.2. Tinción de proteínas con el reactivo rojo Ponceau

El teñido con rojo Ponceau es muy útil para saber si la transferencia y fijación de las proteínas a la membrana han sido correctas. Además, permite localizar la posición de los marcadores no coloreados. Como la tinción con rojo Ponceau es reversible, no interfiere con el revelado final de la actividad fosfatasa. La tinción es muy simple: se moja la membrana con agua (por capilaridad), se sumerge 4 min en la disolución de teñido (0,1% Ponceau-S en 1% ácido acético), y se lava con agua hasta que se observan claramente las bandas de proteína en rojo. Se marca la posición de las bandas principales y la de los estándares (para calcular después la masa de la proteína problema). La membrana se puede fotografiar, fotocopiar o escanear. Finalmente, se elimina el colorante lavando la membrana con agua.

11.3. Detección de las proteínas de interés con anticuerpos

El proceso se desarrolla en tres etapas; las membranas se incuban sucesivamente con tres disoluciones (bloqueante, anticuerpo primario y secundario), intercalando fases de lavado, y al final, se revela la actividad fosfatasa alcalina. Los pasos son:

Bloqueo:

La membrana se incuba con disolución de BSA al 3% o con leche desnatada en polvo al 5%, en tampón TTS-T (Tween 20 al 0,1%, NaCl 0,9%, Tris 25 mM, pH 7,5). La incubación se prolonga 2 h, al menos, a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. Siempre con agitación suave.

La membrana y la disolución se introducen en bolsas de plástico (evitando que queden burbujas) y se sellan por calor. De esta forma, se reducen el volumen de la disolución de bloqueo y la cantidad de anticuerpo en etapas posteriores (10-12 ml/membrana). Durante el bloqueo, el detergente Tween-20 y la albúmina ocupan los puntos de la nitrocelulosa que quedaron libres, evitando que, más tarde, los anticuerpos se unan a la membrana de modo inespecífico. Tras el bloqueo, las membranas se lavan con

TTS-T, unos 15 min. Los lavados se realizan en una bandeja con abundante tampón, a temperatura ambiente y con agitación.

Incubación con el anticuerpo primario:

Después de bloquear la membrana, se incuba con el anticuerpo primario, convenientemente diluido en TTS-T con 1% BSA. El anticuerpo policional (N-19), generado en cabra contra un péptido del extremo N-terminal de la AChE humana y el antisuero de oveja contra la BuChE del plasma humano, se diluyeron 1/1000 y 1/5000, respectivamente. La disolución con el anticuerpo se añade a la membrana y se incuba en cámara fría toda la noche, con agitación suave. En ese tiempo, los anticuerpos se unen a las zonas de la membrana ricas en proteínas que posean el epítopo. La membrana control se incuba en las mismas condiciones, pero sólo con TTS-T y 1% de BSA.

Incubación con el anticuerpo secundario:

Tras retirar el anticuerpo primario, las membranas se lavan con TTS-T 30 min, cambiando el tampón cada 10 min. A continuación, se incuban 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina. El anticuerpo usado fue un anti-cabra frente al N-19 y al anti-BuChE, diluido 1/5000 en TTS-T con 1% de BSA.

Revelado de la actividad fosfatasa alcalina:

Tras retirar el anticuerpo secundario, la membrana se lava con TTS-T y la actividad fosfatasa se revela con el reactivo BCIP/NBT. El revelador lleva 0,48 mM nitroblue tetrazolium (NBT), 0,56 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y 59,3 mM MgCl₂ en Tris 10 mM, pH 9,2. La membrana se incuba con el revelador hasta que aparecen bandas violetas con la intensidad deseada (unos 10 min), y se lava con agua para detener la reacción. Las membranas se escanean y se guardan secas en bolsas de plástico selladas.

Para calcular la masa de las subunidades de AChE y BuChE en las muestras normales y tumorales se empleó el programa SigmaGel versión 1.0.

12. ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS EN PULMÓN NORMAL Y TUMORAL.

Con la identificación y cuantificación de los ARNm para las proteínas del sistema colinérgico en tejidos normales y tumorales pudimos desvelar la extraordinaria complejidad de los cambios en estos transcritos, en lo que atañe al cáncer de pulmón humano.

12.1. Extracción de ARN.

Como material de estudio, se utilizaron muestras de cáncer de pulmón y los controles (tejidos sanos adyacentes a la muestra) del mismo paciente, todas conservadas a - 80°C inmediatamente después de la intervención quirúrgica. Las piezas tumorales se clasificaron de acuerdo a sus características histopatológicas.

Antes de extraer el ARN, hubo que esterilizar todo el material y asegurarse de que estaba libre de RNasas (RNasa free). Puesto que el autoclave sólo esteriliza, para eliminar las ribonucleasas y los ácidos nucleicos contaminantes hay que calentar el material en un horno Pasteur 4-5 h a 150°C. Además, se añade dietilpirocarbonato (DEPC) al H₂0 y a todas las disoluciones, a una concentración final de 0,01% (v/v). Luego, se esterilizan en el autoclave.

Para extraer el ARN de tejidos sanos y tumorales se usaron dos métodos diferentes: el kit comercial de Invitrogen (PureLink RNA Mini Kit) para obtener RNA total y el sistema Chemagic mRNA Direct Kit (Chemagen) para extraer mRNA, de modo selectivo. El primer método es suficiente para identificar los transcritos; el segundo es idóneo para las pruebas de PCR a tiempo real (cuantificación relativa de los transcritos).

El ARN total se extrajo según las indicaciones del fabricante del kit. Brevemente, para comenzar se añade β ME (1%) a la disolución de lisis y se sumerge en ella la muestra a 4°C (0,6 ml/30 mg de tejido). Tras homogeneizar el tejido en un polytron (Ultra Turrax T8, IKA Werke), 1 min a alta velocidad, el homogeneizado se centrifuga a 2600 gav, 5 min a 25°C. Se pasa el sobrenadante a otro tubo y se añade un volumen de etanol al 70% y, tras agitar el tubo en vórtex 2 min, se vuelve a homogeneizar en el polytron 2 min a máxima velocidad. Se toma una alícuota de 600 µl de la mezcla, se pasa por un filtro específico para retener el ARN (RNA Spin Cartridge) y, tras centrifugar a 12000 gav, 15 s a 25°C, se elimina el filtrado. La operación se repite hasta filtrar toda la muestra. Se lava el filtro con 700 µl de tampón de lavado I. Se centrifuga a 12000g, 15 s a 25°C, se retira el volumen filtrado y se pasa el filtro a un tubo eppendorf nuevo de 2 ml. Se añade al filtro 500 µl de tampón de lavado II y, tras centrifugar como antes, se vuelve a eliminar el filtrado, Esta operación se repite otra vez más. Luego se centrifuga a 12000g, 1 min a 25°C, para secar el filtro por completo, se pasa a un tubo nuevo y se le añade un volumen de 30-100 μ l de H₂O estéril. Se deja reposar 1 min y se centrifuga de nuevo a 12000g, 2 min a 25°C, para recuperar el filtrado con el ARN del tejido. Este último paso se puede repetir dos o tres veces más para obtener varias alícuotas de ARN, aunque cada vez con concentración y pureza menores que la primera. Para concluir, se miden la concentración y pureza del ARN en las sucesivas alícuotas.

El ARNm de las muestras (pulmón sano y tumoral) se extrajo con el Chemagic mRNA Direct Kit. La estrategia se basa en el uso de pequeñas bolitas supermagnéticas de polivinil alcohol recubiertas de Oligo(dT) (M-PVA OdTx) (**Figura 2.8**). Su alto contenido en magnetita permite la separación de las moléculas de ARN poliadenilado tras la unión de las bolitas a un imán. Las bolitas son de elevado rendimiento, 40 µl M-PVA OdTx pueden unir 2 µg de ARNm.

Antes de comenzar la extracción del ARNm hay que atemperar todos los reactivos. Se transfieren 40µl de bolitas M-PVA OdTx a un tubo estéril de 1.5 ml y se lavan varias veces para su preparación. Finalmente se suspenden en 100 µl de tampón de lisis.

Los tejidos de pulmón, congelados en N_2 líquido y conservados a -80°C, y las células, mantenidas también a -80°C, son descongelados rápidamente en un baño termostatizado a 37°C. Inmediatamente se ponen en hielo.



Figura 2.8. Esquema para la purificación de ARNm empleando el kit de Chemagen.

Para extraer el ARNm, se emplean 10-100 mg de tejido y 10⁶-10⁷ células. El tejido se trocea con un bisturí y se homogeniza en 300 µl de tampón de lisis con un polytron (Ultra Turrax T8, IKA Labortechnik), 4 pulsos de 15 s a alta velocidad, con intervalos de 1 min. Luego, se añaden 600 µl de tampón de lisis y se elimina el debris celular por centrifugación en microfuga (Microfuge 22R, Beckman), 5 min a máxima velocidad. El sobrenadante se añade a un vial que ya contiene 40 µl de M-PVA OdTx. Tras resuspender las bolitas, se incuba la mezcla a 70°C 2 min, y luego a T^a ambiente, 7 min, con agitación ocasional. Con ello, se favorece la unión de las moléculas de RNA poliadenilado a las bolitas. Se coloca el vial en un imán, Chemagic Magnetic Separator, y tras asegurarnos de que todas las bolitas son atraídas hacia la pared del vial, aspiramos el sobrenadante y aplicamos varios ciclos de lavado con los distintos tampones suministrados en el kit.

Finalmente, se añaden 50-100 µl de tampón de elución y se incuban las bolitas a 70°C min, con agitación vigorosa, para facilitar la elución completa del ARNm. El vial se sitúa en el Magnetic Separator y el sobrenadante se transfiere a un tubo de 1.5 ml libre de RNasas.

12.1.1. Medida de la Concentración y Pureza del ARN.

La concentración y pureza del ARNm se midió en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Depositamos 1.5-2 μ L de ARNm y medimos la absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280nm. Como blanco se empleó 1 μ l del tampón de elución suministrado por el Chemagic mRNA Kit.

Los coeficientes de extinción más aceptados para los ácidos nucleicos son:

- ADN de doble cadena: 50 ng-cm/µL
- ADN de cadena sencilla: 33 ng-cm/µL
- ARN de cadena sencilla: 40 ng-cm/µL

Así, una unidad de absorbancia corresponde a 40 ng/ μ L de ARN de una sola hebra.

El NanoDrop 1000 puede usar longitudes ópticas de 1.0 y 0.2 mm, entre 10 y 50 veces menores que las de un espectrofotómetro convencional (10 mm). Por eso, el NanoDrop consigue medir cantidades de ARN 50 veces mayores que un espectrofotómetro estándar.

La relación de absorbancias (A260/A280) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico. Los ácidos nucleicos absorben fuertemente a 260 nm y las proteínas a 280 nm. Las preparaciones puras de ADN y ARN muestran valores de 1,8 y 2,0, respectivamente. Cuanto mayor sea la contaminación con proteínas, menor será la relación A260/A280. Una vez medida la concentración de RNA, las preparaciones de ARNm se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

12.2. Transcripción Inversa o Retrotrancripción.

La transcripción inversa es la técnica más sensible para la detección y cuantificación de ARN, seguida por la RT-PCR o reacción en cadena de la polimerasa. Consiste en sintetizar una hebra de ADN copia (ADNc) del ARN, vía retrotranscripción (RT), y posterior amplificación del ADNc por la polimerasa en una reacción de PCR. Con este fin, se diseña un programa en un termociclador (TC; Veriti, Applied Biosystems) que permita controlar las condiciones de temperatura requeridas en cada paso de la reacción.

Para la RT se usó el kit comercial Gene Amp PCR Kit de Applied Biosystems. Como la concentración de ARN en las muestras era muy baja, pues sólo había ARNm, hubo que introducir una pequeña modificación en el protocolo. Aumentamos el volumen de ARN a retrotranscribir hasta 10,2 µl, a costa de reducir el volumen de dNTPs, mediante el uso de una mezcla madre de dNTPs más concentrada, 25 mM. De este modo, logramos enriquecer

el contenido de ARN en el ensayo, sin modificar las concentraciones finales de los diversos componentes de la reacción.

Inmediatamente antes de su uso, se prepara la mezcla madre con el resto de los componentes de la reacción:

Orden	Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
1	10x PCR Buffer II (500mM KCl,	2	1x
	100mM Tris-Cl, pH 8,3)		
2	Solución MgCl ₂ 25mM	4	5mM
3	dNTPs 25mM	0,8	1mM
4	Random Hexamers 50 μ M	1	2,5µM
5	Inhibidor de Ribonucleasas (20U/µl)	1	1U/µl
6	Transcriptasa Reversa MuLV	1	2,5U/µl
	(50U/µI)		

El primer paso de la retrotranscripción es la desnaturalización de las hebras de ARNm, calentando a 80°C, 10 min. Así se eliminan las posibles estructuras secundarias que puedan impedir la unión de los cebadores o primers. Las muestras desnaturalizadas se ponen rápidamente en hielo para impedir que vuelvan a adoptar la conformación original.

Los hexámeros aleatorios, "Random Hexamers", son secuencias de nucleótidos al azar que se unen al ARN y actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de una cadena de ADNc. Al contrario que los cebadores específicos, permiten la amplificación de todo el ARN de la muestra, lo que es importante para amplificar los estándares internos en estudios de cuantificación.

Se añaden 9,8 μ l de la mezcla en cada tubo, de modo que el volumen final de la mezcla de reacción es 20 μ l. Agitamos suavemente con la mano y centrifugamos ligeramente para reunir el contenido del tubo. Como todos los reactivos están en exceso, el único elemento limitante de la reacción es el ARNm.

Colocamos los tubos en el termociclador y continuamos con el programa de RT-PCR. La primera etapa de la reacción tiene lugar a 25°C, 10min. En ella tiene lugar la unión de los Random Hexamers a la hebra de ARNm. La retrotranscripción se desarrolla 42°C, 15 min. En este tiempo la transcriptasa inversa permite la extensión de los primers sintetizando la cadena copia de ADN. Posteriormente, la temperatura se eleva a 99°C, 5 min, para inactivar la enzima y separar las hebras de ADNc y ARN. Finalizado el proceso, los tubos de reacción se centrifugan brevemente y se conservan a -20°C hasta su uso. Todos los reactivos se mantienen a -20°C. Cuando se necesitan, se descongelan lentamente en hielo, excepto la retrotranscriptasa que se mantiene a -20°C hasta el momento de su uso.

12.3. Amplificación de los Transcritos por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar más de un millón de veces una determinada secuencia de ADN. Para ello se usan dos oligonucleótidos sintéticos (cebadores o *primers*) de unas 20 bases complementarias a la zona que se quiere amplificar.

Como los diversos ARNm de AChE derivan del por corte y empalme (*splicing*) alternativo de un preARNm, con el que comparten gran parte de su secuencia, es necesario usar una batería de primers específicos capaces de amplificar de forma individual cada tipo de transcrito de AChE. Los cebadores se diseñaron de modo que contuvieran las secuencias terminales e iniciales de los exones que flanquean un intrón. Esto permite una amplificación selectiva de cada transcrito y también evita la amplificación de ADN genómico o del ADNc del ARN inmaduro, lo que falsearía por completo los ensayos de cuantificación. En la **Figura 2.9**., se indican las posiciones en las que hibridan los primers usados para la amplificación específica de cada transcrito.

Para amplificar los transcritos de AChE se emplean combinaciones de cebadores que hibridan en secuencias específicas de cada transcrito, según viene indicado en la **Figura 2.9**. El cebador forward, común para las subunidades H y T de AChE, se sitúa en la zona de empalme E3-E4, con lo que sólo amplificará los ARNm y no el ADN genómico ni el derivado de los transcritos primarios, que aún conservan el intrón I3. La amplificación selectiva de los transcritos R (E3-E4-I4-E5-E6) se asegura situando el cebador 3´ (I4R) en el intrón I4. Si situamos el cebador 3´ (E4E5R) entre los exones 4 y 5 únicamente se amplificaría el transcrito H (E3-E4-E5-E6). Para la amplificación del transcrito T (E3-E4-E6) empleamos el cebador 3´ que hibrida con el extremo 3´del exón 4 y el extremo 5´ del exón 6 (E4E6R). En la **Tabla 2.1** se recogen las secuencias de los pares de cebadores empleados para detectar los transcritos.



Figura 2.9. Posición de los cebadores específicos para los transcritos de AChE y BuChE humano. a) Esquema del gen AChE. El exón 1 ocupa las posiciones 2-120, tiene un tamaño de 119bp y no se traduce pero alberga dos orígenes de transcripción. Los exones 2, 3 y 4 aportan la mayor parte de la secuencia codificadora invariable. Le sigue el intrón I4, característico de las subunidades R (80pb) y el exón E5, común en los transcritos de R y H, aunque sólo se expresa en las subunidades H (753 pb). Finalmente, el exón E6, traducido únicamente en las subunidades T, posee un tamaño de 341pb. Se han identificado dos nuevos primeros exones en humanos: **1c**, de 106bp y situado en las posiciones -1681 y -1576 (respecto del sitio de inicio de la traducción ATG del exón 2), y el exón **1e**, de 403bp, localizado desde --2720 y -2318 del ATG del exón 2 y con un codón de inicio de la traducción (ATG) en la posición -2495 (Meshorer y col., 2004). **b)** Esquema del gen BuChE con los exones que lo constituyen (F significa "forward" y R "reverse").

Tabla 2.1. Cebadores específicos para los diversos transcritos AChE y BuChE.

Se indica la estrategia de hibridación del cebador para la amplificación específica del transcrito: (a) Atravesando el intrón, (b) Flanqueando el intrón.

TRANSCRITO	FORWARD REVERSE	TAMAÑO (pb)
AChE variante T	5′ AACTTTGCCCGCACAGGGGA	203 (a)
(E3E4F-E4E0K)	5 ′ GCCTCGTCGAGCGTGTCGGT	
AChE variante H	5´AACTTTGCCCGCACAGGGGA	201 (a)
	5 GGGAGCCTCCGAGGCGGT	
AChE variante R	5 CCCCTGGACCCCTCTCGAAAC	315 (b)
	5 ´ ACCTGGCGGGCTCCCATC	
AChE E1e	5 CCTGGTGACGAAAGTCCGA	247 (b)
	5 TCCTCCACCCAGGAGCCAGAG	
	5' TGTCTTTGGTTTACCTCTGGAA	
BuChE (BuChEF-BuChER)	5' CACTCCCATTCTGCTTATC	297 (b)
β-actina (BactE-BactP)	5´ AGAAAATCTGGCACCACACC	143 (b)
	5′ GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	

La reacción se lleva a cabo mediante una serie de ciclos, cada uno de los cuales incluye tres fases:

- Desnaturalización del ADN, por calentamiento a 94°C, que rompe los puentes de hidrógeno entre las bases y separa las dos hebras de ADN.
- Annealing o hibridación de los primers a las secuencias de los extremos del fragmento a amplificar.
- Extensión de los cebadores por la Taq polimerasa que incorpora nucleótidos a su extremo 3'.

En el sistema LightCycler de Roche, la reacción transcurre en capilares de vidrio de 20 µl de capacidad. Para amplificar los transcritos partimos de 1 µl de ADNc. Como en las reacciones de PCR se trabaja con volúmenes muy pequeños, es muy fácil cometer errores de pipeteo. Además, a la hora de cuantificar cada transcrito, es necesario que las reacciones de amplificación sean lo más homogéneas posibles. Por ello, se aconseja usar mezclas madre o cocktails de reactivos que se reparten entre los diferentes tubos. Para evitar amplificaciones

inespecíficas, todos los reactivos se mantienen en hielo, evitando que los cebadores entren en contacto con la muestra de ADNc hasta el momento de iniciar la reacción.

Antes de la amplificación de los transcritos, realizamos una serie de pruebas para conocer la temperatura óptima de annealing de los cebadores. De esta manera, podíamos trabajar en las mejores condiciones de amplificación, asegurándonos de que obteníamos un solo producto específico, a la vez que identificábamos su temperatura de melting.

El tiempo de extensión viene determinado por la longitud del transcrito a amplificar y puede calcularse mediante la fórmula: Tiempo de extensión (s)=longitud del producto (pb)/25. Con los cebadores usados, la T^a óptima de annealing fue de 60°C en todos los casos y el tiempo de extensión varió entre 10 y 12 s.

Preparamos una mezcla madre con los primers 5' y 3' idóneos para cada transcrito y agua. Añadimos 9 μ L de la mezcla de primers a cada capilar para que la concentración final fuera 0,3 μ M en los 20 μ L del volumen final de reacción, evitando el contacto con el ADNc hasta el momento de iniciar la PCR.

A continuación se añaden a los capilares 10μ L del reactivo SYBR Green premix Ex Taq (Takara), que contiene la mezcla de dNTPs (concentración final 10μ M), el tampón de reacción con MgCl₂ (2mM) y la polimerasa hot start Takara Ex TaqTM, alcanzando el volumen final de 20μ L. La enzima se encuentra inactivada por la unión de un anticuerpo a su centro activo. Se requiere un paso de desnaturalización previa a 95°C, 30s, para eliminar el anticuerpo.

Para comprobar la veracidad de los resultados se realizan varios controles en los que uno o varios componentes de la reacción (ADNc, cebadores o Taq polimerasa), se sustituyen por un volumen equivalente de H_2O .

Tras cubrir los capilares, se centrifugan a 800 gav, para reunir la mezcla de reacción en el fondo y se colocan en el LightCycler para iniciar el programa de PCR diseñado para cada transcrito.

El programa de PCR consta de tres etapas distintas cuyas condiciones se establecieron experimentalmente antes de analizar los transcritos:

- > Desnaturalización inicial a 95°C, 30s. Se separan las cadenas de ADN y se activa la polimerasa Ex Taq™.
- Amplificación de nuestro producto. Incluye las siguientes fases, que se repiten durante un número determinado de ciclos.

- Desnaturalización del ADN a 95°C, 3-5s. De esta manera conseguimos romper los puentes de hidrógeno entre las bases y separar las dos hebras.
- Annealing o hibridación de los cebadores, 55°C-60°C, 10s. Los cebadores se unen a las secuencias de los extremos del fragmento a amplificar.
- Extensión de los cebadores por la Taq polimerasa que va a incorporar nucleótidos al extremo 3´. Se realiza a 72°C, 10-15s.
- Melting (temperatura de melting, Tm, o de fusión). En ella se establece un gradiente de temperaturas. En primer lugar, se produce un calentamiento rápido a 95°C seguido de un enfriamiento hasta los 65°C. A partir de este momento se genera un calentamiento lento, a una velocidad de 0,1°C/seg, hasta alcanzar 99°C. En esta fase se va a producir la separación de las hebras de la doble hélice. La Tm depende de la longitud del segmento, de la fuerza iónica y de la cantidad de bases G y C que contiene.
- > Enfriamiento rápido a 40°C.

12.4. Identificación de los productos amplificados en un gel de agarosa

Los productos de reacción de la PCR se identifican por su temperatura de melting en el LightCycler de Roche. El producto de la reacción es específico si obtenemos un único pico de melting. Para determinar con mayor precisión si ese pico corresponde al fragmento que se desea amplificar, es necesario recuperar el producto de PCR y someterlo a una electroforesis en gel de agarosa.

Como los productos amplificados son de pequeño tamaño, entre los 140 y los 300bp, es necesario preparar un gel concentrado que proporcione buena resolución. Se diluyen 2 g de agarosa en 100 ml de tampón TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM, pH 8,4) para obtener una solución de agarosa al 2%. Se calienta la mezcla en un microondas para facilitar la disolución de la agarosa y posteriormente se deja enfriar ligeramente. Añadimos 10 µl del colorante GelRed (GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain, 10,000x). Se agita suavemente para evitar la formación de burbujas y se deposita la disolución de agarosa sobre un molde, colocando un peine para la formación de los pocillos. Dejamos unos 20 min para que se forme el gel.

GelRed es un colorante fluorescente que revela los ácidos nucléicos. GelRed es sensible, estable y ambientalmente seguro. Se ha diseñado para sustituir al bromuro de etidio (BE), muy tóxico, en la tinción de ADN de doble cadena, ADN de cadena sencilla o de ARN. Ambos colorantes son moléculas con baja fluorescencia en estado libre, pero con

elevada fluorescencia cuando se intercalan entre dos pares de bases de un polinucleótido. GelRed y BE comparten el mismo espectro, aunque el primero tiene mayor sensibilidad.

12.4.1. Preparación de las muestras

Tomamos 10 µl de cada producto de reacción de la PCR y añadimos 2 µl de una disolución colorante 6x (pGEM®, Promega) que va a quedar a 1x y que lleva naranja de acridina, 0,4%; azul de bromofenol, 0,03%; xileno cianol, 0,4%; Ficoll®400, 15%; 10 mM de Tris-HCl (pH 7.5) y 50 mM EDTA. El colorante facilita el depósito de la muestra y nos informa del avance del frente durante la electroforesis.

Para calcular el tamaño de los productos de PCR, usamos una mezcla de marcadores que nos darán una recta patrón, pGEM® DNA Markers (1 µg/µl, Promega). Ponemos 1 µg de los marcadores, completando el volumen a 10 µl con agua. También añadimos 2 µl del colorante de carga.



Figura 2.10. Marcadores de ADN pGEM. Consisten en 15 fragmentos de ADN con tamaños entre los 36 y los 2645pb. Se obtienen por digestión del vector de ADN de doble cadena pGEM®-3 con las endonucleasas HinfI, RsaI and SinI. En este caso, las bandas se han resuelto en un gel al 8% de acrilamida.

Una vez preparado el gel, cargamos las muestras y los marcadores $(12\mu l)$ en los pocillos. La electroforesis se desarrolla a 50V. Debido a su carga negativa, los ácidos nucleicos migran hacia el electrodo positivo (ánodo), separándose en función de su tamaño.

Para visualizar los productos amplificados, el gel se coloca en un trans-iluminador Transiluminador UV dual (302/365 nm) con control de intensidad (Alpha Innotech). El conjunto se acopla a un sistema de fotodocumentación con una cámara digital Canon PowerShot A640. Posteriormente, se analiza el tamaño de los fragmentos amplificados con el programa de software GelPro.

12.5. PCR a tiempo real de los Transcritos de AChE y BuChE.

La característica fundamental de la PCR a tiempo real (*real time* PCR) es que a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo durante la reacción de la polimerasa se puede medir la cantidad de ADN sintetizado por la polimerasa en cada ciclo, ya que la emisión de la fluorescencia producida es proporcional a la cantidad de producto formado. Esto permite conocer y registrar la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores usados en la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en todo momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde transcurre la amplificación. En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de forma simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior.

La PCR a tiempo real tiene muchas ventajas respecto a la PCR convencional. La primera es la rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Se puede completar la amplificación y detección en 30-40 min. También permite cuantificar la cantidad inicial de ADN (o ARN) en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor que en los procedimientos convencionales. Los equipos para PCR a tiempo real son muy versátiles; en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, identificación de mutaciones y PCR múltiple, entre otros.

12.5.1. Sistemas de detección de los productos de PCR a tiempo real

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: sondas de hibridación específicas marcadas con fluorocromos o agentes intercalantes.
Sondas de hibridación

Las sondas de hibridación son oligonucleótidos que están marcados con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor y el proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre los dos fluorocromos. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas *TaqMan*, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET.I. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es elevado y la optimización de las condiciones de la reacción es difícil.

Agentes Intercalantes (SYBR Green)

El SYBR Green 1 es el agente intercalante más empleado en PCR a tiempo real. Es un fluorocromo que en solución, como compuesto libre, emite una fluorescencia muy baja que aumenta notablemente cuando se une a ADN de doble hélice. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida (**Figura 2.7**).

Además, el SYBR Green I es una molécula extraordinariamente estable. Tras 30 ciclos de amplificación sólo pierde el 6% de la actividad, por lo que es muy útil para detectar y cuantificar los productos de PCR. El sistema de detección tiene, además, la ventaja de que es muy fácil optimizar las condiciones de la reacción y más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de estos agentes intercalantes, como el SYBR Green I, es su baja especificidad, dado a que se unen indistintamente a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad, se deben emplear condiciones de reacción óptimas y elegir cuidadosamente los cebadores para reducir el riesgo de formación de dímeros (*primers dimers*). Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (*Hot-start* PCR), una circunstancia que reduce, de forma notable, el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Con este fin, se suelen usar polimerasas recombinantes modificadas o bloqueadas con anticuerpos para que sólo funcionen después de ser activadas a temperaturas elevadas.

Al comienzo de la amplificación, la mezcla de reacción contiene ADN desnaturalizado, los primers y el SYBR Green I. El fluoróforo libre emite una ligera fluorescencia que aporta una señal de fondo que el programa del termociclador (LightCycler) resta durante el análisis del proceso. Tras la unión del primer a la hebra de ADN, algunas moléculas del fluoróforo ya pueden unirse a la doble cadena que se forma. La unión produce un considerable incremento de la fluorescencia que emite el SYBR Green 1 (**Figura 2.11**).



Figura 2.11. Unión del SYBR Green al ADN. A. Estructura química del SYBR Green. **B**. El fluorocromo en solución, como compuesto libre, emite escasa fluorescencia (1). La unión al ADN de doble cadena aumenta notablemente la fluorescencia (2). Durante la elongación del ADN se produce un aumento del número de moléculas de SYBR green unidas al ADN.

Durante la extensión, cada vez se van uniendo más moléculas del agente fluorescente a la nueva doble cadena de ADN recién sintetizado, con el correspondiente incremento en la fluorescencia emitida. Si se controla la reacción de forma continua, se puede observar en tiempo real el aumento de la fluorescencia emitida.

Durante la fase de desnaturalización del siguiente ciclo de PCR, las moléculas del fluoróforo se separan de la doble cadena de ADN y la señal de fluorescencia cae, alcanzando los valores de la señal de fondo. Al final de la fase de extensión de cada ciclo de PCR, se mide la fluorescencia emitida para controlar el aumento en la cantidad de ADN amplificado.

12.5.2. Equipo para la PCR a tiempo real (LightCycler)

Los experimentos de PCR a tiempo real se realizaron en el equipo LightCycler de la casa comercial Roche Diagnostics (**Figura 2.12**). El equipo consta de un termociclador y un lector de fluorescencia; está diseñado para poder registrar la fluorescencia emitida en cada uno de los viales usados y en cualquier momento de la reacción. Las características más importantes son la rapidez, el elevado número de muestras que se pueden procesar de forma simultánea, y la disponibilidad de varios canales de lectura, lo que permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez.



Figura 2.12. Esquema del LighCycler de Roche Diagnostics.

De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de ADN diana en la misma reacción (PCR múltiple) o bien para incorporar controles internos a la reacción, y poder detectar la presencia de inhibidores.

12.5.3. Análisis de las curvas de disociación o curvas melting

El equipo LightCycler permite realizar análisis detallado de la curva de melting de los productos de PCR después de la amplificación (**Figura 2.13**). Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas crecientes después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. De esta forma podemos calcular la temperatura de *melting* (Tm) específica de los productos amplificados.

El método SYBR Green I nos permite usar la Tm específica de cada producto para asegurar que la amplificación ha sido correcta. En el caso de que los cebadores posean cierta complementariedad entre sí, podrían aparecer *primer-dimers* que pueden distinguirse del producto específico por su Tm.



Figura 2.13. Análisis de las curvas melting del transcrito H. Observaciones con varios tubos de reacción que contienen distinta cantidad de ADNc de partida. En la ventana superior se muestra el rango de temperaturas seleccionadas para el melting y el notable descenso de la fluorescencia en los 92,5°C (Tm del transcrito H). En la ventana inferior vemos que esa caída se debe a la separación de un único tipo de hebra de doble cadena, ya que sólo hay un pico de melting, indicando que la amplificación es específica.

12.5.4. Cuantificación relativa de transcritos mediante Real-Time PCR

Para conocer el grado de expresión de un gen es necesario cuantificar el nivel de su ARNM. La variabilidad entre muestras (debida a la diferente calidad o cantidad del ARNM extraído de las muestras) y los errores de pipeteo se minimizan con el uso de un estándar interno. La expresión del estándar debe permanecer invariable a lo largo del ciclo celular y entre diferentes tipos celulares y no ha de verse afectado por las condiciones cambiantes de las células, en nuestro caso, la transformación neoplásica. La referencia de la amplificación de el gen objetivo, en nuestro caso ACHE y BUCHE, respecto a la de un estándar interno permite realizar una cuantificación relativa de la expresión génica. Dado que la función de la actina es necesaria para la supervivencia celular, se admite que su transcripción y traducción es prácticamente constante, independientemente de las condiciones experimentales. Por esta razón, se usa con frecuencia beta-actina como control interno, no sólo en ensayos de cuantificación de transcritos mediante PCR a tiempo real, sino también en la cuantificación de proteína por Western blot.

Como el gen de interés y el gen usado como estándar interno poseen secuencias diferentes, y los transcritos amplificados (amplicones) distintas longitudes, cabe la posibilidad de que ambos genes difieran en la eficiencia de la PCR. Por ello, un requisito experimental añadido a la invariabilidad de la expresión del control interno, es que posea una eficiencia de amplificación similar a la del gen en estudio Si las eficiencias de dos amplicones son iguales, dos volúmenes que tengan la misma cantidad de producto en un mismo número de ciclos tendrán la misma cantidad inicial de ADNc. Una eficiencia óptima de amplificación es aquélla que permite la replicación de todos los productos de PCR en cada ciclo (en cada ciclo se duplica la cantidad de producto).

Durante la PCR, el programa informático del LightCycler detecta en cada ciclo un incremento de fluorescencia proporcional al aumento de ADN. Esta información se registra gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada muestra y control. Estas curvas se adaptan a una sigmoide en la que se pueden distinguir: 1) una fase temprana de *background*, donde la fluorescencia del producto es menor que la del fondo del gel; 2) una fase de crecimiento exponencial, que comienza cuando se ha acumulado suficiente producto como para detectar su fluorescencia (se corresponde con la fase logarítmica lineal) y; 3) una fase de meseta o plateau en la que decae la eficiencia de la amplificación (**Figura 2.14**). Los datos obtenidos en la fase logarítmica son mucho más precisos que los obtenidos a tiempo final porque en el primer caso el incremento de la señal se corresponde directamente con un incremento del producto de PCR.



Figura.2.14. Cálculo de la pendiente de una curva con el Software del LightCycler.

En el LightCycler, el cálculo de los datos se realiza sobre el Crossing point (Cp) de cada muestra, es decir, el número de ciclo en el que el lector comienza a detectar un incremento significativo de fluorescencia. El Cp es inversamente proporcional a la cantidad de ADNc en la muestra.

Teoría de la eficiencia de amplificación

Una PCR ideal es aquella en la que se duplica el número de copias de ADN en cada ciclo de amplificación. De modo que la PCR puede representarse por la fórmula:

$$N=N_0x2^n$$

Donde **N** es el número de copias tras una serie de n ciclos, **N**₀ es el número inicial de copias de ADN y **n** es el número de ciclos de PCR realizados. Como hemos comentado anteriormente, teóricamente la eficiencia óptima en una PCR es 2.

Muchos parámetros de la PCR pueden afectar a la eficiencia de la misma y por ello, a menudo es muy diferente de 2:

$$N = N_0 x E^n$$

Para el cálculo de la eficiencia (E) de un transcrito el Software del LightCycler calcula la pendiente de una recta obtenida al representar la distancia relativa de los Cp de una serie de reacciones con diferente cantidad de material de ADN de partida de una misma muestra (**Figura 2.13**).

En consecuencia, la eficiencia de una PCR se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$F=10^{-1/pendiente}$$

Protocolo para la cuantificación relativa de transcritos

Para cuantificar la abundancia de un transcrito, respecto a la de un control interno, debemos conocer dos parámetros; por un lado, el Cp asociado a una determinada concentración de partida de ADN (o volumen), y por otro, la eficiencia de la amplificación.

Para el cálculo de la eficiencia se preparan series de capilares con distintas diluciones de un mismo ADNc de partida, para cada transcrito. Según los ensayos previos, de acuerdo con la cantidad y calidad de nuestro ADNc, hemos establecido los siguientes volúmenes de ADN a amplificar: 0.1, 0.5, 1, 2.5 y 5 μ l. En todos los casos se completa el volumen a 5 μ l con agua.

Se añaden 5 μ l de la mezcla de primers específicos para cada transcrito, de modo que en el volumen de reacción (20 μ l) queden a 0.3 μ M. Siguiendo la pauta de homogenización de las condiciones de ensayo entre muestras a comparar y de minimización de errores de manejo, se prepara una mezcla madre para un número de reacciones mayor que las que vamos a preparar, de la siguiente forma:

)
	H ₂ O	3.8µI	
F	orimer Forward 10µM	0.6µl	
k	orimer Reverse 10µM	0.6µl	X n reacciones
	Total	5µl	
			J

Finalmente, completamos la mezcla de reacción con la adición de 10µL del reactivo SYBR Green premix Ex Taq (Takara) e iniciamos la PCR bajo las condiciones de *annealing* y extensión establecidas en ensayos previos.

10 µl mezcla de reacción con SYBR green



12.5.5. Tratamientos informáticos del Software del LightCycler para la cuantificación relativa de los transcritos

Tenemos dos opciones a la hora de calcular los valores de Cp con el Software del LightCycler: el método Fit points y el Second derivative maximum.

A) Método Fit Point

Los errores de pipeteo o las diferencias en el ADNc de las muestras, van a producir variaciones de la fluorescencia basal. Éste método permite establecer las correcciones en la línea base (o banda de ruido) que permitan el posterior análisis de los datos. La banda de ruido se utiliza para discriminar los datos de fluorescencia que son significativos de aquellos datos que no pueden distinguirse de la señal de fondo y deben excluirse del análisis. Los datos que son significativos se localizan en la porción logarítmica de la curva de fluorescencia y comienzan a un número de ciclos donde la fluorescencia se eleva por encima del ruido o fondo. El programa informático calcula el Cp como el punto de intersección entre la curva de fluorescencia y la banda de ruido. Se representa el valor de Cp frente a la cantidad de ADNc para obtener una curva que se usa para calcular la eficiencia de la amplificación.

B) Método Second Derivative Maximum

Este método calcula automáticamente el número de ciclo o fracción donde la fluorescencia puede distinguirse del resto. Nos permite calcular la concentración con mucha precisión. En este caso, el Cp indica el número de ciclo en el que se obtiene el máximo de la segunda derivada de la fluorescencia para cada muestra. Los valores se representan frente al logaritmo de la cantidad de ADNc inicial y con la curva resultante se estima la concentración de ADNc de cada muestra.

El método no requiere definir el segmento logarítmico de cada curva, ni tampoco necesita establecer la banda de ruido para cada muestra. Es muy útil para analizar muestras con un elevado número de copias. Sin embargo, si el número es bajo se obtienen mejores resultados con el método Fit Point.

12.5.6. Análisis de la cuantificación relativa de los transcritos

Los resultados de la amplificación se analizaron por el método Second Derivative Maximum y Fit points. En ambos casos, el análisis de los resultados fue muy similar, por lo que decidimos trabajar con el primero. El programa de análisis calcula los valores de Cp para cada dilución de ADNc y para cada transcrito (incluido el control de β -actina) y los representa frente al volumen de ADNc añadido a cada vial (desconocemos el número de copias inicial en la muestra de ADNc, por lo que trabajamos con volúmenes en lugar de concentraciones) (**Figura 2.15**).



Figura 2.15. Ejemplo del análisis de la cuantificación del transcrito H mediante el método Second Derivate Maximum. Podemos apreciar la curva sigmoidea de aumento de la fluorescencia a lo largo de la reacción. En la ventana de la izquierda se refleja el Cp para cada uno de los volúmenes de ADNc ensayados y en el grafico inferior, la recta obtenida al representar Cp frente al logaritmo del volumen ensayado.

Como hemos indicado anteriormente, a partir de la pendiente de la recta, calculamos la eficiencia de la reacción:

$$E = 10^{-1/pendiente}$$

Lo ideal es que la eficiencia sea ~2,0 para que los datos obtenidos sean fiables y no se subestime la abundancia relativa de cada transcrito.

En el ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia (Cp), la cantidad de ADNc inicial (ADNi) y final (ADNf) están relacionados con la eficiencia (E) y el Cp por la expresión:

ADN f = ADN i x E
Cp

El Cp de cada tubo, corresponde a un mismo valor de fluorescencia, pero detectado a distinto número de ciclo y por tanto a una misma cantidad de ADNc final. Por lo que podemos decir:

ADN f $_{(\beta-actina)}$ = ADN f $_{(Transcrito)}$

El número de copias del ADNc de interés que hay en el vial por cada copia de β -actina se calcula aplicando los siguientes cálculos:

ADN f $_{(\beta\text{-actina})}$ = ADN i $_{(\beta\text{-actina})}$ x E ^{Cp $\beta\text{-actina}$}

ADN f $_{(Transcrito)}$ = ADN i $_{(Transcrito)}$ x E $^{Cp\ Transcrito}$

Igualamos la cantidad de ADNf:

ADN i
$$_{\beta$$
-actina x E ^{Cp β -actina} = ADN i $_{Transcrito}$ x E ^{Cp Transcrito}

O lo que es lo mismo:

ADN i _{β-actina}	_	E Cp Transcrito
ADN i Transcrito	_	E ^{Cpβ-actina}

Para facilitar la interpretación de los resultados, referimos el número de copias del transcrito estudiado por cada millón de copias del transcrito de β -actina.

13. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y CITOTOXICIDAD: MTT Y WST-8.

Este ensayo es un método colorimétrico sensible, cuantitativo y fiable para la determinación de la proliferación y viabilidad celular. El ensayo es capaz de medir el número de células presentes en el cultivo mediante la transformación de un compuesto coloreado debido a una reacción que únicamente tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, amarillo) es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazano (azul-morado), que queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma se puede cuantificar la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce un cambio de color de amarillo a azul-morado (**Figura 2.16**). La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células para reducir el MTT a formazano después de su exposición a un compuesto, permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.



Figura 2.16. Ensayo de viabilidad celular con MTT. En la microplaca comprobamos cómo el aumento del número de células resulta en un incremento de la coloración púrpura.

El WST-8 es un método similar al ensayo con MTT con la ventaja de que al ser soluble el producto final, no son necesarios agentes como el DMSO para su solubilización y permite valorar la proliferación celular y la toxicidad de compuestos en líneas celulares no adherentes, en las que no se posible retirar el medio de cultivo, ya que crecen en suspensión. El WST-8 emplea otra sal de tetrazolio: 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST). Es reducido por las deshidrogenasas celulares para generar un producto formazano anaranjado soluble en el medio de cultivo. La

cantidad de formazano producido es directamente proporcional al número de células vivas (**Figura 2.17**). La sensibilidad de detección del WST-8 es superior a la de otras sales de tetrazolio, como MTT, XTT o MTS.



Figura 2.17. Mecanismo del ensayo de WST-8. La ventaja de esta sal de tetrazolio soluble en agua (Water Soluble Tetrazolium salt) sobre el MTT es que su reducción tiene lugar fuera de las células, en combinación con un mediador de electrones PMS, rindiendo un compuesto formazano soluble en agua. Por ello, los ensayos WST pueden determinarse directamente (sin solubilización previa), disminuyen la toxicidad celular y ofrecen una señal más efectiva que la del MTT.

Procedimiento general para una placa de 96 pocillos:

Se prepara una disolución madre de MTT (5 mg/ml) en medio de cultivo sin rojo fenol y sin complementos y se filtra a través de un filtro de 0,22 µm. Se guarda a 4°C protegido de la luz. Se retira el medio de cultivo de la placa de los 96 pocillos en la que habían crecido las células y se añaden 200 µl/pocillo de medio fresco sin rojo fenol. Se adicionan 50 µl/pocillo de la disolución de MTT, se agita la placa y se protege de la luz con papel de aluminio. Se mantiene dentro del incubador de CO_2 a 37°C durante 2-4 horas (dependiendo de la línea celular). Pasado el tiempo necesario, se retira el medio con MTT y se adicionan 100 µl de DMSO para solubilizar el formazano. Se agita la placa y se mide la absorbancia a la longitud de onda 570nm (usando 690 nm como referencia para el plástico de la placa) mediante un lector de placas µQuant (Bio-Tek Instruments Inc).

2. Materiales y Métodos

En el caso del WST-8, se añaden directamente 10 µl del compuesto CCK-8 (Cell Counting Kit-8) al pocillo con las células y el medio. Se incuba de 3-4 horas (37°C, 5% CO2) y se mide la absorbancia directamente a 460 nm, usando como referencia la absorbancia del plástico (690 nm).

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En general, los resultados recogidos en la memoria se expresan como media \pm EST (error estándar de la media). Las posibles diferencias estadísticamente significativas en la actividad ChE entre tejidos patológicos y sanos fueron evaluadas por el test de t de Student (p<0.05). Para comparar si había correlación de los parámetros evaluados entre los diversos tipos histológicos de cáncer de pulmón usamos el test no paramétrico de Mann-Witney U. El análisis estadístico se hizo con el programa SPSS (versión 10 para Windows).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Resumen

El hecho de que diferentes clases de tumores expresen AChE y BuChE (Munoz-Delgado y col., 2010; Vidal, 2005) sugiere que estas enzimas pueden estar implicadas en la transformación neoplásica. La hipótesis se apoya en los siguientes datos: 1) los genes de las ChEs aparecen amplificados en leucemias y carcinomas de ovario (Mack y Robitzki, 2000; Zakut y col., 1990); 2) en neoplasmas de localización intracraneal, los genes *ACHE y BUCHE* muestran anomalías estructurales o se expresan de un modo anormal (Karpel y col., 1994); 3) las proteínas producto (ChEs) manifiestan propiedades anormales en meningiomas, glioblastomas, carcinomas de vejiga y otros (Soreq y col., 1991; Zakut y col., 1988); 4) la aplicación de oligonucleótidos antisentido antiAChE y/o antiBuChE afecta a la proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares (Mack y Robitzki, 2000; Robitzki y col., 1998; Vidal, 2005).

En trabajos previos desarrollados por el grupo del Dr. Vidal, se valoraron las actividades AChE y BuChE y se identificaron sus formas moleculares en meningiomas (Saez-Valero y Vidal, 1996), gliomas (Saez-Valero y col., 1996), neurinomas (Garcia-Ayllon y col., 1999), mama (Ruiz-Espejo y col., 2002) y ganglios linfáticos de axila (Ruiz-Espejo y col., 2003), cáncer colorrectal (Montenegro y col., 2006a; Montenegro y col., 2006b) y tumores de riñón (Munoz-Delgado y col., 2010).

En el presente trabajo, se investiga la expresión de AChE y BuChE en pulmón humano y si las actividades de estas ChEs, la distribución de sus formas moleculares o el procesamiento de sus restos oligosacáridos se ven afectados por la transformación neoplásica. Los posibles aumentos o descensos de las actividades de AChE y/o BuChE afectarían a la disponibilidad de ACh y, por tanto, a la duración de las respuestas colinérgicas, más prolongadas cuanto menor fuera la actividad ChE. Por otro lado, las anomalías en la distribución de las formas moleculares de AChE y/o BuChE en las piezas cancerosas revelarían cambios en la expresión de los ARNm o en la maquinaria de ensamblado que convierte a los monómeros en dímeros y tetrámeros. Tal subversión del programa de biosíntesis podría afectar al destino celular de las moléculas de AChE y BuChE y, por tanto, a la biología de las células neoplásicas. Finalmente, en el caso de que se detectaran cambios en la glicosilación de las formas moleculares de AChE o BuChE, cabría pensar que la neoplasia modifica la expresión de las glicosiltransferaras del Golgi y, por tanto, que la dotación de oligoglicanos en otras glicoproteínas también podría quedar alterada en las células malignas.

Los resultados presentados a continuación proporcionan, por primera vez, información detallada sobre las actividades AChE y BuChE en pulmón sano y sus cambios en los tumores. Así mismo, se muestra la composición de formas moleculares de AChE y BuChE en pulmón sano y canceroso y el comportamiento anfifílico o hidrofílico de dichas formas. Finalmente, la interacción

con varias lectinas vegetales, nos ha permitido conocer los cambios en los oligoglicanos unidos a las moléculas de AChE y BuChE, como consecuencia de la transformación maligna.

1. PACIENTES

Con el fin de comparar las actividades y propiedades estructurales de AChE y BuChE en pulmón normal (PN) y tumoral (PT), se analizaron un total de 31 muestras. Las muestras de PN y PT procedían de pacientes diagnosticados con cáncer primario de pulmón de células no pequeñas (*non small cell lung carcinoma*; **NSCLC**). Se tomó tejido adyacente no canceroso (TANC). Todas las muestras se consiguieron por intervención quirúrgica en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca en Murcia entre 2001 y 2010. De los 31 pacientes intervenidos, 28 eran hombres y 3 mujeres, con edades entre 45 y 79 años, la edad media fue de 63.9 años. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento de quimioterapia antes de la cirugía.

Las piezas malignas pesaron 28-431 mg y las sanas 34-222 mg. Todas se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su uso. El examen histológico de las piezas, según el criterio de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO), reveló que 14 correspondían a **Adenocarcinoma (AC)**, 6 a **Carcinoma de Células Grandes (CCG)** y 11 a **Carcinoma Epidermoide (CE)**. Sus estadios de desarrollo fueron asignados de acuerdo con el sistema de clasificación internacional TNM. Todos los pacientes fueron informados de forma apropiada y dieron su consentimiento.

El diagnóstico clínico del paciente se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica de Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca en Murcia y la presencia de células malignas y el tipo histológico del tumor fueron confirmados por técnicas de anatomía patológica.

2. CONTENIDO DE PROTEÍNA

Tras la extracción de las muestras (5% p/v) con tampón Tris-salino sin (S₁) y con el detergente Brij 96 (S₂), se analizó el contenido de proteína en los homogenados de partida (H₀) y en los sobrenadantes (S₁ y S₂) de las piezas quirúrgicas en los tres tipos histológicos de cáncer y en los tejidos adyacentes respectivos. En la **Tabla 3.1** figuran los datos relativos a la cantidad de proteína en las distintas preparaciones obtenidas. Agrupando los distintos tipos tumorales, el contenido en proteína total de las muestras de tejido adyacente no canceroso fue mayor que el de las piezas tumorales (2,99 ± 1,51 mg/ml frente a 1,97 ± 0,71 mg/ml; p=0,002).

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA						
	H₀ (mg/ml)	Valor-p	S ₁ (mg/ml)	Valor-p	S ₂ (mg/ml)	Valor-p
Todos los tip	oos histológicos					
TANC	4,99±2,51		2,85±1,47		1,62±0,43	
		0,002		0,066		0,156
TUMOR	3,97±7,71		2,04±1,09		1,80±0,85	
Adenocarcin	oma					
TANC	5,01±2,93		2,97±1,85		1,54±0,5	
		0,003		0,048		0,439
TUMOR	3,92±1,67		2,03±1,13		1,68±0,58	
Carcinoma de Células Grandes						
TANC	4,94±2,50		2,25±0,70		1,25±0,56	
		0,011		0,033		0,775
TUMOR	2,61±1,66		1,40±0,57		1,29±0,53	
Carcinoma Epidermoide						
TANC	5,00±2,28		3,02±1,12		1,94±0,72	
		0,011		0,178		0,247
TUMOR	3,61±1,66		2,42±1,16		2,28±1,13	

Tabla 3.1. Concentración de Proteína en Extractos de Pulmón. La tabla muestra la concentración de proteína medida en el homogenado inicial (H0) y en cada uno de los solubilizados (S1 y S2) del proceso de extracción secuencial de los tejidos tumoral (TUMOR) y adyacente no tumoral (TANC) de los diferentes tipos histológicos de cáncer de pulmón analizados. Los datos indican la media de los valores \pm DE. La diferencia estadística entre el contenido de proteína en piezas no cancerosas y tumorales se evaluó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, aplicados a muestras independientes para p<0,05.

3. ACTIVIDAD ACHE y BUCHE EN PIEZAS QUIRÚRGICAS DE PULMÓN SANO Y TUMORAL

Las medidas de actividad de las ChEs en las muestras de pulmón humano, sano y tumoral, se realizaron tras el proceso de extracción descrito en el **Apartado II.2.1.2.** Se midieron las actividades AChE y BuChE tanto en los homogenados de partida, como en los sobrenadantes S_1 y S_2 .

El método de extracción en dos pasos permitió extraer la mayor parte de la actividad ChE en tejido de pulmón sano (94,57 ± 5,11%) y canceroso (88,17 ± 3,53). Casi la mitad de la actividad AChE en CCG (43,4 ± 6,1%), CE (43,7 ± 15,2%), y algo menos en AC (33,4 ± 11,3%) y TANC (35,9 ± 12,6%), se liberó con tampón salino sin detergente (S₁), y el resto con Brij 96 (S₂). En cambio, casi toda la actividad BuChE (84,4 ± 15,2%) se extrajo con tampón salino.

No se observaron diferencias significativas entre los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón en cuanto al grado de extracción global de AChE ni en los porcentajes de extracción en S₁ y S₂. Este hecho reveló que aunque la actividad colinesterasa disminuía en CCG y CE, la neoplasia no afectaba a la síntesis de las moléculas individuales de AChE y BuChE ni al modo en que se asociaban a las membranas celulares.

La actividad AChE fue mayor en las piezas de pulmón no canceroso (TANC) de CCG que en las muestras de AC o CE (**Tabla 3.2**). Es posible que esta variación proceda de diferencias entre las distintas piezas de pulmón, en cuanto a la composición de tipos celulares. En las muestras tumorales, la actividad AChE no cambió en AC, disminuyó alrededor de un 50% en CCG y mucho más (casi un 80%) en CE. Los resultados sugieren que el cambio en la actividad AChE en tumores de pulmón depende de la biología particular del tipo de célula epitelial concreta que origine del tumor. El fuerte descenso de la actividad AChE en CE puede ser importante para la biología de las células escamosas.

Por otro lado, la actividad BuChE fue estadísticamente mayor en los tejidos no afectados (TANC) que en AC (p=0,036), CE (p=0,032), y casi en CCG (p=0,068), destacamos que en este último caso, solo disponíamos de cuatro muestras. El descenso de las actividades AChE y BuChE en CCG y CE descarta que la caída de AChE en esos tumores se compense por la actividad BuChE. Además, la fuerte disminución de la actividad AChE en los nódulos linfáticos afectados por metástasis de cáncer y el mantenimiento de la actividad BuChE sugieren que las dos enzimas están reguladas de manera independiente (Ruiz-Espejo y col., 2003).

A continuación, exploramos la posible aplicación de la variación en la actividad ChE para distinguir el tipo histológico de cáncer de pulmón. Aplicando el test no paramétrico U de Mann-Whitney se observó que el cambio de actividad AChE era estadísticamente significativo entre AC y CE y entre CCG y CE, pero no entre AC y CCG. No hubo correlación alguna entre el cambio de actividad ChE en cáncer de pulmón y factores clinicopatológicos, incluyendo el género de los pacientes, edad, tamaño del tumor, grado histológico y estado de los nódulos linfáticos.

Este estudio reveló que las actividades AChE y BuChE en los subtipos histológicos tumorales eran inferiores que las de sus correspondientes tejidos adyacentes. Es llamativo que los tejidos pulmonares contengan niveles comparables de actividad BuChE, y a veces superiores, a los niveles de actividad AChE. Aunque esta observación podría llevar a pensar que parte de la BuChE proceda del plasma sanguíneo, en apartados posteriores demostraremos que el tejido pulmonar es capaz de sintetizar BuChE.

ACTIVIDAD COLINESTERASA EN TEJIDO ADYACENTE NO CANCEROSO Y EN CARCINOMAS DE PULMÓN					
	AChE (mU/mg)	Valor-p	BuChE (mU/mg)	Valor-p	
Adenocarcinoma (AC)				
TANC	8,03±3,76 (18)		9,86±2,58 (14)		
		0,475		0,036	
TUMOR	6,38±4,03 (18)		3,06±3,25 (14)		
Carcinoma de Células	s Grandes (CCG)				
TANC	15,39±7,66 (6)		6,50±6,63 (4)		
		0,043		0,068	
TUMOR	7,52±3,32 (6)		2,94±2,01 (4)		
Carcinoma Epidermo	ide (CE)				
TANC	7,02±2,60 (15)		7,32±4,10 (15)		
		0,008		0,032	
TUMOR	1,97±2,05 (15)		4,90±2,83 (15)		
	Test U de Mann-Whitney				
	Valor-p		Valor-p		
AC <i>vs</i> CCG	0,766		0,184		
AC <i>vs CE</i>	0,001		0,350		
CCG vs CE	0,018		0,440		

Tabla 3.2. Actividades Acetil- y Butirilcolinesterasa específicas en pulmón. Se muestran las unidades de actividad colinesterasa normalizadas por miligramo de proteína en los extractos de piezas cancerosas y adyacentes no cancerosas (TANC). Una unidad de actividad ChE representa la hidrólisis de 1 µmol de sustrato por minuto a 37°C. LA diferencia estadística en las actividades AChE o BuChE entre TANC y muestras cancerosas de AC, CCG y CE, se calculó mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas (p<0,05). Mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas (p<0,05). Mediante el test no paramétrico de tumores.

4. NIVELES DEL NEUROTRANSMISOR ACETILCOLINA

Es bien conocido el papel fundamental que juega el neurotransmisor ACh en la transmisión nerviosa a nivel central y periférico. También se sabe que la ACh produce respuestas colinérgicas en contextos no sinápticos. En este sentido, se han identificado todas las proteínas que componen un operador colinérgico en células y tejidos no neurales. Entre ellos cabe citar células inmunes (linfocitos, timocitos y esplenocitos) (Kawashima y Fujii, 2008) y no inmunes (endoteliales y otras), y tejidos (intestino, hígado, riñón y otros) (Wessler y Kirkpatrick, 2008).

Se sabe que los carcinomas microcíticos de pulmón expresan receptores de ACh y que su activación con nicotina u otros agonistas favorece el crecimiento y la proliferación celular (Song y col., 2003). Además, las células de cáncer de pulmón microcítico y no microcítico son capaces de sintetizar, secretar y responder a ACh endógena, generando un ciclo autocrino de crecimiento celular (Song y col., 2003; Song y Spindel, 2008).

Para averiguar si la caída de actividad ChE en CCG y CE suponía un aumento en la cantidad de ACh procedimos a su valoración. Dado que los extractos de pulmón S_1+S_2 contenían AChE y BuChE capaces de degradar ACh, a la hora de determinar el neurotransmisor tuvimos que utilizar un filtro que retenía a ambas ChEs **(Apdo. II.4**).

CONTENIDO DE ACETILCOLINA				
	ACh (µM)	Valor-p		
Adenocarcinoma (AC)				
TANC	0,98±0,58 (7)			
		0,015		
TUMOR	1,44±0,46 (11)			
Carcinoma Células Grandes (CCG)				
TANC	0,42±0,13 (4)			
		0,029		
TUMOR	1,09±0,59 (4)			
Carcinoma Epidermoide (CE)				
TANC	1,01±0,44 (9)			
		0,014		
TUMOR	1,57±0,51 (10)			

Tabla 3.3. Contenido de Acetilcolina en carcinomas de pulmón y tejido adyacente no canceroso. El contenido de ACh viene dado como la media \pm DE (número de muestras). La diferencia estadística en el contenido de ACh entre TANC y las muestras cancerosas, AC, CCG y CE, se calculó por el test no paramétrico U de Mann-Whitney (p<0,05).

La **Tabla 3.3** muestra los niveles de ACh en las muestras de pacientes con cáncer de pulmón (adenocarcinoma, epidermoide y carcinoma de células grandes) y en sus respectivos extractos de tejido adyacente no canceroso (TANC). El análisis estadístico de los datos revela la cantidad de ACh es mayor en todos los tipos histológicos de cáncer de pulmón que en sus tejidos adyacentes respectivos.

5. ACTIVIDADES ACHE y BUCHE EN EL SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO

El suero de pacientes y sujetos control se obtuvo a partir de sangre recogida en tubos con heparina de litio. Se congelaron alícuotas a -80°C hasta su análisis. La actividad AChE se midió por el método de Ellman (**Apdo. II.3**). Las actividades AChE y BuChE se compararon con el test de la t de Student para datos independientes. El grupo de pacientes de cáncer de pulmón estaba constituido por 32 individuos y el grupo control por 51. La **Tabla 3.4** recoge los resultados obtenidos. Se observa que ambas actividades AChE y BuChE son ligeramente superiores en los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas.

ACTIVIDAD COLINESTERASA EN SUERO DE PACIENTES CONTROL Y CON TUMOR DE PULMÓN					
	AChE (U/ml)	Valor-p	BuChE (U/ml)	Valor-p	
Control	0,29±0,13 (51)		4,75±1,1 (51)		
		0,125		0,944	
Tumor	0,24±0,14 (30)		4,97±1,83 (30)		

Tabla 3.4. Actividades Acetil- y Butirilcolinesterasa en suero. Las actividades AChE y BuChE se indican como la media \pm DE (número de muestras). La diferencia estadística de las actividades AChE o BuChE entre sueros control y tumorales fue analizada con el test t de Student para muestras independientes (p<0,05).

6. FORMAS MOLECULARES DE ACHE y BUCHE EN TEJIDO PULMONAR SANO Y TUMORAL

Como se comentó en la Introducción de esta memoria, en los tejidos o células, las colinesterasas pueden encontrarse como monómeros u oligómeros de subunidades catalíticas que, además, poseen restos de oligosacáridos. Cuando las subunidades catalíticas se asocian a proteínas estructurales generan heterooligómeros. El conjunto de componentes moleculares o formas moleculares de AChE y/o BuChE (patrón de formas moleculares) es característico de cada tejido y, con frecuencia, el desarrollo de una patología modifica este patrón de formas moleculares. El perfil particular de componentes moleculares de las ChEs en un determinado tejido o tipo celular refleja con mucha probabilidad los requerimientos funcionales específicos en cada tejido y/o célula.

La centrifugación en gradientes continuos de sacarosa ha demostrado ser una herramienta extraordinariamente eficaz para separar los componentes moleculares de las ChEs. Las considerables diferencias en el tamaño entre monómeros, dímeros, tetrámeros y las formas asimétricas permiten su separación en gradientes de sacarosa y su posterior identificación por su coeficiente de sedimentación. Mediante la centrifugación en gradientes de sacarosa analizamos la distribución molecular de AChE y BuChE en pulmón sano y tumoral. El propósito era averiguar si la transformación neoplásica modificaba la distribución de los componentes moleculares de AChE y/o BuChE, esto, el programa de biosíntesis de tales componentes.

Los resultados revelan un patrón sencillo de formas moleculares de AChE y BuChE en pulmón humano. Sólo se observan formas globulares ligeras de AChE (dímeros y monómeros anfifílicos G_2^A y G_1^A) (**Figuras 3.1-3.3**), pero en algunos adenocarcinomas se detectaron moléculas tetraméricas G_4^A (**Figura 3.2**). La actividad BuChE se reparte entre tetrámeros hidrofílicos G_4^H y anfifílicos G_4^A , con algunos monómeros hidrofílicos G_1^H . Aunque los patrones de las formas moleculares de AChE no se modifican con la transformación neoplásica, la fracción G_4^A de BuChE disminuye significativamente.

Los tres tipos histológicos de carcinomas pulmonares y sus tejidos adyacentes no cancerosos presentan patrones similares de formas de AChE, lo cual nos indica que el mecanismo por el que las células tumorales desarrollan malignidad no afecta a la biosíntesis de moléculas de AChE pulmonar.

Para averiguar el patrón de formas moleculares de AChE en los tejidos pulmonares, los extractos S_1 y S_2 se centrifugaron en gradientes de sacarosa conteniendo Brij 96. La medida de la actividad AChE en las fracciones del gradiente proporcionó los perfiles de sedimentación en adenocarcinomas de pulmón y en sus respectivos tejidos adyacentes no cancerosos que se muestran en la **Figura 3.1**.



Figura 3.1 Formas moleculares de AChE en adenocarcinoma de pulmón y tejido adyacente no canceroso (TANC) en Brij 96. Tras una primera extracción con tampón salino sin detergentes (S_1) y otra posterior con tampón salino y Brij 96 (S_2), las formas moleculares de AChE se resolvieron en gradientes continuos de sacarosa (5-20%). Los coeficientes de sedimentación de las moléculas de AChE se calcularon por referencia a los marcadores de sedimentación catalasa de hígado bovino (**C**, 11,4 S) y fosfatasa alcalina de intestino bovino (**F**, 6,1 S).

La centrifugación en gradiente de los extractos de pulmón normal (TANC) y de adenocarcinomas reveló un patrón simple de formas moleculares de AChE con coeficientes de sedimentación de 6,0 ± 0,3 S (n=6), 4,2 ± 0,2 S (n=6) y 2,9 ± 0,2 S (n=6), y ocasionalmente 9,5 ± 0,3 S (n=6). Las formas moleculares fueron asignadas a dímeros hidrofílicos G_2^{H} (6,0 S), dímeros anfifílicos G_2^{A} (4,2 S), monómeros anfifílicos G_1^{A} (2,9 S) y tetrámeros anfifílicos (9,5 S). No se apreciaron diferencias en los coeficientes de sedimentación de las moléculas de AChE en pulmón sano (TANC) y en tumores.



Figura 3.2 Cambio en la migración de las formas moleculares de AChE en adenocarcinoma de pulmón y tejido adyacente no canceroso (TANC) en gradientes con TX-100. El carácter anfifílico de las moléculas G_1^A y G_2^A de AChE se demuestra por el cambio de coeficiente de sedimentación en gradientes con Triton X-100 respecto a los que llevan Brij 96 (Figura 3.1). Marcadores de sedimentación como en la Figura 3.1. El extracto S_1 de este adenocarcinoma concreto contiene formas G_4^A (10,6 S), no habituales en los epitelios pulmonares.

centrifugación en gradiente sustituyendo el Brij 96 por Triton X-100 (**Figura 3.2**). Las moléculas de 9,5 S, 4,2 S y 2,9 S migraron a 10,6 S, 5,6 S y 4,1 S, lo que confirmó el carácter anfifílico de las moléculas de AChE.

6.2. Componentes moleculares de AChE en carcinomas epidermoides

El patrón de formas moleculares de AChE en los tejidos pulmonares obtenidos de pacientes diagnosticados con carcinomas de tipo escamoso o epidermoides se muestra en la **Figura 3.3**.



Figura 3.3 Formas moleculares de AChE en carcinoma epidermoide y tejido adyacente no canceroso (TANC). Tras recoger los sobrenadantes $S_{1y}S_2$, se analizaron las formas moleculares de AChE en gradientes continuos de sacarosa conteniendo Brij 96. C y F señalan las posiciones de los marcadores de sedimentación catalasa y fosfatasa alcalina, respectivamente. Como en los adenocarcinomas, tanto en tejidos no afectados como en los cancerosos predominan las formas globulares ligeras anfifílicas.

6.3. Componentes moleculares de AChE en carcinomas de células grandes

La transformación neoplásica no altera la distribución de formas moleculares de AChE en carcinomas pulmonares de células grandes. En la **Figura 3.4** Se observa como de nuevo, los componentes globulares ligeros y de naturaleza anfifílica (G_2^A 4,2 S; G_1^A 2,6 S) aportan la práctica totalidad de la actividad AChE.

Los tres tipos histológicos de carcinomas pulmonares y sus TANC presentan patrones similares de formas de AChE, lo que demuestra que el mecanismo por el cual las células tumorales desarrollan malignidad y aberración no afecta a la biosíntesis de las moléculas de AChE pulmonar.

6.4. Componentes moleculares de BuChE en tejidos pulmonares sano y tumorales

Se procedió a investigar el patrón de las especies moleculares de BuChE en los extractos obtenidos sin detergentes (S₁) y en los que se añadió Brij 96 (S₂). En las **Figuras 3.5, 3.6 y 3.7** se muestran los perfiles de sedimentación con las moléculas de BuChE en los sobrenadantes S₁ y S₂ de adenocarcinomas, tumores epidermoides y carcinomas de células grandes. Con independencia del tipo histológico, la centrifugación del extracto S₁ demuestra que la actividad BuChE se reparte entre formas moleculares de 12,0 ± 0,2 S (n=14), 9,8 ± 0,2 S (n=14) y 4,6 ± 0,1 S (n=14). El extracto S₂ contiene las mismas formas pero destaca la mayor proporción de los componentes de 9,8 S. La condición patológica supuso un notable descenso en la proporción de estos últimos. De acuerdo con los valores de sedimentación, las formas moleculares de 12,0 S y de 4,6 S se asignaron a moléculas G₄^H y G₁^H, respectivamente. Las formas 9,8 S se asignaron a moléculas G₄^A, tras comprobar que su coeficiente de sedimentación aumentaba a 10,6 ± 0,2 S (n=4) cuando en el gradiente, el detergente Brij 96 era sustituido por Triton X-100 (**Figura 3.8**). Para la medida de actividad de los gradientes con Triton X-100 sobre la BuChE, mediante la formación de micelas mixtas (Moral-Naranjo y col., 1996).



Figura 3.4. Formas moleculares de AChE en carcinoma de células grandes y tejido adyacente no canceroso (TANC). Los sobrenadantes $S_{1y}S_2$ se centrifugaron en gradientes de sacarosa que contenían Brij 96. C y F señalan las posiciones de los marcadores catalasa y fosfatasa alcalina, respectivamente.











Figura 3.7. Formas moleculares de BuChE en tumores de células grandes y tejido adyacente no canceroso (TANC). Las muestras se extrajeron, primero con tampón salino (S₁) y luego con tampón salino y Brij 96 (S₂). Las formas moleculares se separaron por centrifugación en gradientes de sacarosa (5-20%). Interesa destacar la notable fracción de tetrámeros anfifílicos (G₄^A) en el extracto S₂ de tejido control y su menor proporción en los extractos tumorales. **C** y **F** señalan las posiciones de los marcadores de sedimentación catalasa y fosfatasa alcalina, respectivamente.



Figura 3.8 Formas moleculares de BuChE en gradientes con Triton X-100. Los extractos $S_{1 y} S_2$ de pulmón normal (PN) y tumoral (PT) se centrifugaron en gradientes con Triton X-100 para comprobar si había cambio en el coeficiente de sedimentación de las moléculas de BuChE. El cambio en su migración en gradientes con Brij 96 y con Triton X-100 confirmaría el carácter anfifílico. No se observan cambios en los coeficientes de sedimentación de las formas G_4^H (12,0 S) y G_1^H (4,6 S), pero las formas de 9,8 S (con Brij 96) migran a 10,6 S con el detergente Triton X-100.
7. PROPIEDADES ANFIFÍLICAS DE LAS COLINESTERASAS DE PULMÓN

La escasa diferencia en la migración de ciertas variantes enzimáticas con coeficientes de sedimentación próximos (p.e. las formas ligeras de AChE) impide su completa resolución por centrifugación en gradientes de sacarosa. La migración de las moléculas anfifílicas de AChE y BuChE cambia en función del detergente añadido al gradiente de sacarosa, Brij 96 o Triton X-100, e indica positivamente que dichas moléculas poseen propiedades anfifílicas. Sin embargo, para demostrar plenamente el comportamiento anfifílico de las proteínas, en general, y de las ChEs, en particular, se aconseja recurrir a la separación por cromatografía en soportes hidrofóbicos (Fernandez-Gomez y col., 2010).

Las moléculas hidrofílicas de AChE o BuChE no se pegan a matrices hidrofóbicas, como la fenil-agarosa, mientras que las moléculas anfifílicas con dominios hidrofóbicos quedan retenidas. Para su liberación se emplean detergentes como el Triton X-100. La secuencia de elución de las variantes de AChE y BuChE depende del grado de hidrofobicidad y del número de dominios hidrofóbicos en cada clase de molécula. Así, las variantes G_1^A (con un dominio) eluyen primero, después las G_2^A (con dos dominios) y por último las formas tetraméricas G_4^A , debido a su asociación con la proteína estructural (no catalítica) altamente hidrofóbica PRiMA.

La aplicación de cromatografía hidrofóbica en fenil-agarosa reveló que una gran parte de la actividad AChE (>90%) extraída de piezas quirúrgicas de pulmón humano por el método de doble extracción (S_1+S_2) quedó unida a la matriz de fenil-agarosa (**Figura 3.9A**). Después de lavar extensivamente la columna de afinidad, una fracción importante (75-85%) de la actividad AChE retenida se liberó con Triton X-100. Los resultados demostraron sin sombra de duda que la inmensa mayoría de las variantes de AChE del epitelio pulmonar tenían propiedades anfifílicas.

Las fracciones no retenidas por la fenil-agarosa (no retenidas, NR) y las recogidas tras añadir Triton X-100 (eluídas, EL) con mayor actividad enzimática se analizaron en gradientes de de sacarosa para identificar las formas moleculares en cada caso (**Figura 3.9B**). Como era de esperar, la fracción de AChE no retenida contiene moléculas de carácter hidrofílico, en concreto formas G_2^H y G_1^H , de 6,0 S y 4,2 S respectivamente. La actividad AChE eluída con Triton X-100 se repartió entre las moléculas de 4,2 S y 2,9 S confirmando la elevada proporción de dímeros (G_2^A) y monómeros (G_1^A) anfifílicos en el epitelio pulmonar humano. Ocasionalmente, en los extractos se observaron tetrámeros de AChE. La presencia de estas formas G_4 en la fracción EL y el cálculo de su coeficiente de sedimentación en gradientes con Brij 96 (9,5 S) confirmó que se traban de tetrámeros anfifílicos (G_4^A).



Figura 3.9 Cromatografía hidrofóbica de la AChE en pulmón. *A.* Una mezcla de extractos S_1 y S_2 (1 ml de cada) se pasó por una columna de fenil-agarosa. La actividad AChE no ligada eluyó con tampón de equilibrio, y las retenidas con tampón Tris + Triton X-100 (2% p/v) pH 7,5. **B.** Las fracciones con mayor actividad se mezclaron y se sometieron a centrifugación en gradientes con sacarosa y Brij 96 para determinar su composición molecular (NR, no retenida; EL, eluida con Triton X-100).

El análisis por cromatografía hidrofóbica de la mezcla S_1+S_2 de tejidos tumorales no deparó diferencias significativas con los obtenidos de tejidos adyacentes no cancerosos. Con todo, merece la pena señalar la ausencia de formas tretraméricas de AChE en todos los tejidos cancerosos ensayados y su presencia en algunas muestras control.

Respecto a la BuChE, una gran parte de la actividad (85-90%) de la mezcla de S_1+S_2 pasó libremente por la columna de fenil-agarosa (**Figura 3.10A**), lo que vino a confirmar que la gran mayoría de la actividad BuChE se compone de moléculas hidrofílicas. Los gradientes de sedimentación de las fracciones no retenidas por la matriz (NR) permitieron identificar moléculas con coeficientes de sedimentación de 12,0 S y 4,6 S para las formas las formas G_4^H y G_1^H , respectivamente (**Figura 3.10B**).

La baja proporción de enzima BuChE capaz de interaccionar con la fenil-agarosa y la presencia de Triton X-100 en las fracciones eluidas (EL) supusieron una grave dificultad para el cálculo de la actividad BuChE liberada con Triton X-100 y el posterior análisis de las formas moleculares. Pese a ello, estimamos que sólo un 30-40 % de la actividad BuChE que había quedado retenida en la matriz de fenil-agarosa eluía con el detergente. El análisis de sedimentación de la enzima ligada a la fenil-agarosa sólo se pudo completar en el tejido no patológico, donde se observan formas G_4^A (de aprox. 9,8 S). El pronunciado descenso, o la ausencia, de formas tetraméricas anfifílicas de BuChE en tejidos pulmonares patológicos se puede incluir en la larga lista de condiciones patológicas que afectan a la biogénesis de los tetrámeros tanto de AChE como de BuChE.



Figura 3.10 Cromatografía hidrofóbica de la BuChE en pulmón. *A.* Una mezcla de extractos S_1 y S_2 (1 ml de cada) se pasó por una columna de fenil-agarosa. La actividad BuChE no ligada (NR) eluyó con tampón de lavado, y las retenidas con Tris + Triton X-100 (2% p/v) pH 7,5 (EL). La flecha indica la adición del detergente. **B.** Las fracciones con mayor actividad se mezclaron y sometieron a gradientes de sacarosa con Brij 96 para determinar la composición molecular de enzima no unida a la matriz (NR) y la eluida con Triton X-100 (EL).

8. ANCLAJE A LA MEMBRANA DE LOS DÍMEROS Y MONÓMEROS DE ACHE POR GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI)

La detección de moléculas anfifílicas de AChE en el tejido pulmonar humano tanto normal como canceroso, mediante las pruebas de sedimentación y de cromatografía hidrofóbica, no nos permitía saber si las subunidades de AChE eran de tipo I o de tipo II. Las formas G_1^A y G_2^A tipo I proceden del ARNM AChE-H e incorporan restos de GPI durante su síntesis (Coussen y col., 2001). En cambio, (Massoulie, 2002)las isoformas de tipo II derivan del transcrito AChE-T y no incorporan GPI (Massoulie, 2002). Como se comentó en la Introducción de esta memoria, las subunidades de AChE tipo II consiguen su carácter anfifílico y su capacidad para interaccionar con las membranas celulares gracias a una serie de aminoácidos aromáticos en la región C-terminal. Estos aminoácidos adoptan una estructura helicoidal que facilita la asociación de las subunidades de AChE con las membranas (Massoulie, 2002).

La existencia de dímeros y monómeros de AChE tipo I (con restos GPI) en meningioma (Saez-Valero y Vidal, 1996), mama (Ruiz-Espejo y col., 2002), colon (Montenegro y col., 2006a; Montenegro y col., 2006b) y riñón (Munoz-Delgado y col., 2008; Munoz-Delgado y col., 2010) nos llevó a estudiar la posible existencia de restos GPI en las variantes homólogas de AChE en los epitelios de pulmón.

La sensibilidad del resto GPI a la digestión con la fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (PIPLC) permite conocer la existencia de GPI en las subunidades de AChE y, con ello, verificar que corresponden al tipo I, las que derivan del transcrito AChE-H. Las isoformas de AChE que tengan restos de GPI pueden perder la porción diacilglicerol (responsable de sus propiedades anfifílicas) por incubación con PIPLC y con ello convertirse en moléculas hidrofílicas. La sensibilidad a la PIPLC depende de la presencia de cadenas acilo en los hidroxilos del inositol. Cuando los restos GPI contienen cadenas acilo es necesario el tratamiento con hidroxilamina alcalina para eliminar las cadenas acilo antes de la incubación con PIPLC (Toutant y col., 1990).

Para probar el efecto de la PIPLC sobre la AChE de los epitelios pulmonares, se utilizó PIPLC de *Bacillus thurigiensis*, 3 U por mililitro de muestra (3 h en agitación y en oscuridad). Estas condiciones fueron establecidas previamente para la completa conversión de los dímeros anfifílicos de eritrocito bovino a dímeros hidrofílicos (Montenegro, 2006).

Al tratar las muestras de pulmón con PIPLC, se observó una conversión parcial del pico de 4,2 S (G_2^A) en otro de 6,1S (G_2^H), y una ligera reducción del componente de 2,9S (G_1^A) (**Figura 3.11**). Los resultados mostraron que parte de las moléculas G_2^A (4,2 S) se habían convertido en la variante hidrofílica G_2^H (6,1 S) a causa de la pérdida del dominio hidrofóbico. La digestión con PIPLC de los extractos de epitelios pulmonares no cancerosos proporcionó porcentajes discretos (10-40%) de conversión de moléculas anfifílicas a hidrofílicas, lo que



Figura 3.11 Conversión de las formas globulares ligeras anfifílicas de AChE en hidrofílicas con PIPLC. Una mezcla de extractos S_1 y S_2 se incubó con PIPLC y luego se analizó en gradientes de sacarosa. En los extractos tratados con PIPLC (•) se observa un desplazamiento de las variantes anfifílicas hacia las hidrofílicas, respecto al perfil de la muestra control (o). No se aprecian diferencias significativas en la resistencia a la PIPLC cuando se considera la malignidad o el tipo histológico de cáncer de pulmón.



Figura 3.12. Tratamiento de la BuChE de pulmón con PIPLC. El extracto S_2 de tejidos no cancerosos (sano) y cancerosos de adenocarcinoma (AC), epidermoides (CE) y carcinomas de células grandes (CCG) se sometió a tratamiento con PIPLC y después se analizó en gradientes de sacarosa. Como era de esperar, no se observa conversión de las formas anfifílicas de BuChE. Los coeficientes de sedimentación de las formas moleculares de extractos no tratados (o) o tratados con PIPLC (•) son los mismos.

demostró que una fracción variable de moléculas G_2^A y G_1^A de AChE, en pulmón normal y tumoral, contenían restos GPI para ligarse a las membranas.

Los análisis de conversión de moléculas anfifílicas a hidrofílicas no depararon diferencias entre los extractos obtenidos a partir de tejidos sanos o tumorales. Tampoco se observaron diferencias respecto al tipo histológico de cáncer de pulmón estudiado (**Figura 3.11**).

La conversión parcial de los dímeros anfifílicos de AChE en hidrofílicos por digestión con PIPLC muestra que una fracción de las moléculas de AChE contienen restos de GPI y por tanto provienen del transcrito AChE-H. Sin embargo, la presencia de restos acilo unidos al inositol puede conferir resistencia a la PIPLC (Li y col 1993), lo que impediría distinguir los dímeros de tipo I (con subunidades H) de los de tipo II (con subunidades T). El tratamiento con hidroxilamina alcalina antes de la digestión con PIPLC no aumentó de forma significativa la proporción de conversión (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos nos impiden descartar que las moléculas de AChE del epitelio pulmonar resistentes a la PIPLC procedan de subunidades derivadas del transcrito AChE-T (las de tipo II).

Como era de esperar, el análisis de la digestión de BuChE con PIPLC reveló que las moléculas de BuChE carecían de restos GPI (**Figura 3.12**). La figura 3.12 sólo muestra los resultados de la incubación de los extractos S_2 , en los que distinguen claramente las formas anfifílicas de BuChE (G_4^A) presentes en los epitelios pulmonares.

9. INTERACCIÓN DE LAS COLINESTERASAS DE PULMÓN SANO Y TUMORAL CON LECTINAS

Las lectinas o aglutininas vegetales, reconocen azúcares particulares en los oligoglicanos de las glicoproteínas. Como las colinesterasas son glicoproteínas, las lectinas representan un valioso instrumento para conocer si el procesamiento postraduccional de las ChEs cambia según el tipo celular, la localización tisular o si una patología concreta afecta a la adición de azúcares. Los restos de oligosacáridos de una proteína informan sobre su tránsito intracelular por los distintos orgánulos que participan en su síntesis y maduración. Los estudios de los restos azúcares en las ChEs han ayudado al diagnóstico de anomalías en la formación del tubo neural en fetos puesto que se altera el patrón normal de glicosilación de la AChE (Liao y col 1992). En enfermedades como la meningitis bacteriana cambia el patrón de glicosilación de la AChE en el líquido cefalorraquídeo (LCR), a consecuencia del aumento de BuChE plasmática en el mismo por la mayor permeabilidad de la barrera sangre-cerebro (Tornel, 1992; Tornel y col., 1993). En general podemos decir que la glicosilación de las colinesterasas es un proceso sensible a los

cambios que acompañan a numerosas patologías (Cabezas-Herrera y col., 1994; Cabezas-Herrera y col., 1997; Moral-Naranjo y col., 1997; Silveyra y col., 2006); (Munoz-Delgado y col., 2010).

Se analizó la capacidad de unión de las colinesterasas de epitelios de pulmón sano y tumoral a diferentes lectinas. El objetivo fue doble. Por un lado, quisimos analizar si la transformación tumoral afectaba a la composición de azúcares de los restos oligosacarídicos de las colinesterasas; y por otro, obtener información sobre el origen de la actividad BuChE, un tema controvertido dado que su extraordinaria abundancia en el plasma sanguíneo la convierte en una fuente potencial de la enzima identificada en pulmón sano y tumoral. De este modo, puede que el origen de la actividad BuChE medida en pulmón humano sea el plasma sanguíneo y no el propio epitelio pulmonar. Los estudios con lectinas podían aportar pruebas sobre la verdadera fuente de la BuChE observada en pulmón.

Una proporción elevada de la actividad AChE de epitelios pulmonares humanos no cancerosos se unió a las lectinas Con-A (~65%), WGA (~80%) y LCA (~82%), indicando que la acetilcolinesterasa contiene oligosacáridos con manosa, N-acetilglucosamina/ácido siálico y fucosa, respectivamente (**Tabla 3.5**). La unión parcial de las lectinas a la AChE de pulmón demuestra una gran heterogeneidad en la composición de azúcares entre las distintas isoformas de la enzima e incluso entre las mismas formas moleculares.

El análisis de interacción con lectinas de la AChE extraída de epitelios pulmonares tumorales deparó diferencias que conviene resaltar (**Tabla 3.5**; **Figura 3.13**). Así, mientras que los extractos enzimáticos de adenocarcinoma y carcinomas de células grandes no ofrecieron diferencias en el porcentaje de interacción con las lectinas, respecto de la interacción en extractos no cancerosos, el nivel de asociación de las lectinas Con-A, WGA y LCA con la enzima procedente de carcinomas epidermoides fue significativamente mayor, en comparación con su tejido adyacente no canceroso y con otros tipos tumorales. De hecho, la AChE "epidermoide" se ligó prácticamente en su totalidad a las lectinas ensayadas (Tabla 3.5).

La enzima AChE no reconocida por las respectivas lectinas se sometió a análisis de sedimentación, observando que las distintas formas moleculares de AChE eran reconocidas por cada aglutinina en un porcentaje prácticamente idéntico, descartando así diferencias en la dotación de azúcares según el estado de agregación de las moléculas de AChE (perfiles no mostrados).

Lectina	Azúcar reconocido (orgánulo)	AChE				BuChE			
		TANC	AC	CCG	CE	TANC	AC	CCG	CE
<i>Canavalia ensiformis</i> (Concanavalina-A, Con-A)	Manosa (RER)	69±11	62±9	60±17	'94±6	94±10	95±6	599±3	99,±9,
Triticum vulgaris (WGA)	(GlcNAc)₂ o Neu5Ac (Golgi temprano)	78±12	76±13	3 75±6	93±6	100±13	95±1	95±2	96±7
Lens culinaris (LCA)	Manosa terminal en glicanos con fucosa (Golgi medio)	81±11	77±7	75±4	96±7	96±8	90±3	86±1	98±6
Ricinnus communis (RCA)	Galβ1,4GlcNAc (Golgi distal)	89±4	79±7	84±6	88±7	89±4	78±7	'87±6	90±6

PORCENTAJE DE INTERACCIÓN DE COLINESTERASAS CON LECTINAS

Tabla 3.5. Interacción de Colinesterasas de epitelios pulmonares con lectinas. Se indican las lectinas ensayadas, así como el azúcar reconocido por cada una de ellas y el orgánulo subcelular en que el azúcar se incorpora a las glicoproteínas. Los cambios en la unión de las proteínas a cada lectina nos permiten detectar variaciones en su biosíntesis, asociadas a ciertas patologías, como el cáncer. Se observa una marcada diferencia en el grado de interacción de la AChE procedente de tejidos cancerosos tipo epidermoide. RER, retículo endoplásmico rugoso. Valores medios de al menos cinco experimentos completos.

En lo que respecta a la unión de la BuChE de pulmón, la mayor parte de su actividad se ligó a las lectinas, comprobando, además, que la presencia o no de cáncer, no afectaba al nivel de interacción (**Figura 3.13**). La fijación total de la BuChE plasmática a LCA y RCA (Saez-Valero y Vidal, 1996) y el elevado porcentaje de fijación de la BuChE extraída de pulmón a Con A, LCA, WGA y RCA no permite descartar que una parte de la actividad BuChE de las muestras de pulmón proceda del suero sanguíneo. Con todo, es posible que la BuChE medida en el pulmón se origine en el propio tejido y que el procesamiento de los oligoglicanos sea igual o muy parecido en el pulmón y en el hígado, la fuente de la BuChE plasmática (Lockridge, 1991).



Figura 3.13. Interacción con lectinas de colinesterasas del epitelio pulmonar humano. Una mezcla de extractos S_1+S_2 de tejidos no cancerosos (TANC) y cancerosos de adenocarcinoma (AC), carcinomas de células grandes (CG) y carcinomas epidermoides (CE) se incubó con Sefarosa 4B libre de lectinas (control) y con Con A-, LCA-, WGA-, y RCA-agarosa. Los complejos AChE-lectina se separaron por centrifugación. La actividad AChE libre (no ligada a las lectinas) se valoró en el sobrenadante. El porcentaje de interacción se calculó respecto a la actividad control de la mezcla incubada con Sefarosa 4B libre de lectinas. Valores medios de al menos cinco experimentos (* p<0,05).

Los resultados indican que el procesamiento postraduccional de la AChE puede estar alterado a consecuencia de la transformación tumoral de las células epiteliales de pulmón. Es de destacar que mientras en AC y CCG hay una ligera disminución en la proporción de moléculas activas de AChE con oligoglicanos con manosa (reconocida por Con A) y N-acetilglucosamina o ácido siálico terminal (WGA), en carcinomas de tipo epidermoide hay un significativo aumento de moléculas de AChE con dicha dotación de oligosacáridos, ya que son reconocidas por las lectinas Con A, LCA y WGA.

10. INMUNOENSAYOS DE COLINESTERASAS DE PULMÓN

Las pruebas de interacción entre proteínas y anticuerpos pueden aportar abundante información acerca de las diferencias estructurales entre las proteínas de tejidos normales y patológicos. Las aplicaciones de los ensayos basados en las reacciones inmunológicas se deben a las propiedades únicas de los anticuerpos y han supuesto un importante avance en el análisis de sustancias de interés en biología animal y vegetal difíciles de observar con los procedimientos bioquímicos habituales.

Dentro de los métodos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que se basan en la especificidad de la unión antígeno (Ag)-anticuerpo (Ac). La propiedad que tienen los Ac de unirse a un Ag, la especificidad de la unión y el hecho de que pueda observarse mediante los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, radioisótopos y enzimas) hacen que estos métodos sean ampliamente utilizados.

Existen diversos métodos basados en distintos procedimientos para visualizar la unión Ag-Ac. Así tenemos:

1. Técnicas de aglutinación. Cuando el antígeno se encuentra unido o formando parte de células, bacterias o partículas, la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado formado. Su fundamento es parecido al de la interacción oligoglicano-lectina.

2. Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo. Para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo, detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.

3. Técnicas de radioinmunoensayo. En estas técnicas al anticuerpo se une un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la radiactividad emitida.

4. Cromatografía de afinidad. La especificidad de la unión Ag-Ac puede emplearse para la purificación de anticuerpos o antígenos.

5. Inmunoprecipitación e inmunoblotting. Permite detectar la presencia y cantidad de antígenos o anticuerpos específicos.

Dado que las actividades AChE y BuChE de los tumores de pulmón variaban según el tipo histológico, nos propusimos estudiar, por procedimientos inmunológicos, si el descenso de las actividades AChE y BuChE se correspondía con una caída de la cantidad de proteína. Mediante la técnica de Western-blot se exploraron tanto las posibles diferencias de tamaño entre las subunidades de ChE de TANC y tejidos malignos, como la presencia de subunidades enzimáticas en estado inactivo.

En el Western blot, la mezcla de los extractos S_1+S_2 de tejidos sanos adyacentes y de tejidos neoplásicos se sometieron a electroforesis reductora. En las sucesivas calles de la lámina de poliacrilamida, se pusieronn las mismas unidades de actividad AChE o bien la misma cantidad de proteína de los extractos de pulmón normal y tumoral. Tras la transferencia, las membranas se incubaronn con anticuerpos primarios contra la AChE humana y posteriormente con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina o peroxidada. Se ensayaron los anticuerpos N19 (dirigido contra el extremo N-terminal de la AChE humana) o C16 (contra el extremo C-terminal de la AChE de cerebro humano). El anticuerpo N-19 reconoce a las tres subunidades de la AChE (AChE-H, AChE-T, y AChE-R), ya que la porción N-terminal es común a los tres tipos de subunidades producidas por el ensamblado alternativo del mensajero.

La inmunodetección con N-19 reveló proteínas de con 72, 68, 55 y 50 kDa (**Figura 3.14**), tamaños que coinciden con los descritos para subunidades de AChE humana (Darreh-Shori y col., 2002). Los tamaños de las subunidades en TANC (tejidos sanos) así como en los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón no microcítico (AC, adenocarcinoma; CCG, Carcinoma de células grandes y CE, carcinoma epidermoide) no variaron, lo que nos permitíó demostrar que la transformación neoplásica no altera el tamaño de las subunidades de AChE. Sin embargo, al comparar la intensidad de teñido de las bandas de proteína de AChE en las muestras pareadas (y con las mismas unidades de actividad AChE) procedentes de tejidos normales y cancerosos (**Figura 3.14 A**) se observa una mayor intensidad de teñido en los tejidos tumorales. Este hecho, muy evidente en los tumores de tipo epidermoide, apunta a la existencia de moléculas inactivas de AChE en el pulmón y a su aumento en los tumores.

La incubación de las membranas con el anticuerpo C-16 mostró bandas de 68 y 55 KDa (**Figura 3.14 C**), y como el anticuerpo reconoce específicamente el extremo C-terminal de las subunidades de AChE-T, la proteína de 68 kDa fue asignada a la subunidad T mientras que la



Figura 3.14. Western blotting para las ChEs de pulmón sano y tumoral. La mezcla de extractos S1+S2 de tejidos control (TANC) y canceroso, adenocarcinoma (AC), carcinoma de células grandes (CCG, LCC) y carcinoma epidermoides (CE, SCC), se sometieron a electroforesis reductora (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 7.5%. Tras la transferencia a membranas de nitrocelulosa, las proteínas se marcaron con el anticuerpo N19, contra el extremo N-terminal común de todas las clases de subunidades AChE (membranas A y B), o con anticuerpos C16, contra el péptido C-terminal de AChE-T (membrana C). La membrana D se incubó con un anticuerpo anti-BuChE. En la membrana A, las calles N (tejido normal) y T (tumoral) fueron cargadas en parejas con 0.2 (AC), 0.3 (CCG, LCC) y 0.07 (CE, SCC) mU de actividad AChE; la cantidad de proteína fue la misma (30 µg) en las calles de las membranas B y C. Las bandas marcadas fueron asignadas a la subunidad sináptica, AChE T (72 y 55 kDa), la subunidad unida al GPI, AChE H (68 kDa) y a la subunidad readthrough AChE R subunit (50 kDa). Se observa un aumento de cantidad de la proteína de 50 kDa en muestras de CE (representado por un asterisco). Como las calles N y T de la membrana A llevan las mismas unidades de actividad AChE, la mayor intensidad de la banda T para CE implica un aumento en la cantidad de proteína/unidad de actividad, indicando la presencia de moléculas inactivas de AChE-T en CE. No se observan diferencias significativas en la intensidad de la banda de BuChE (78 kDa) entre TANC (N) y cánceres de pulmón (T).

banda de 55 kDa puede representar a un producto lítico de la anterior. La banda de 72 kDa (marcada con N-19) puede corresponder a la subunidad AChE-H.

Finalmente, la proteína de 50 kDa puede representar la subunidad AChE R (la variante de AChE relacionada con el estrés). Esta banda es especialmente visible en carcinoma epidermoide (CE) (**Figura 3.14A**) y en menor medida en los otros dos tipos histológicos de cáncer de pulmón.

En la **Figura 3.14 D** se muestra un Western-blot para detectar las subunidades de BuChE. La sensibilidad y especificidad del anticuerpo no es la deseada. Se detectaron múltiples bandas y la mayoría de ellas deben ser inespecíficas. Se marca una banda de tamaño que coincide con el esperado de 78 kDa. En este caso y a diferencia de lo que ocurre con la AChE, no hay diferencias significativas entre los tejidos sanos (TANC) y sus correspondientes tejidos tumorales.

11. IDENTIFICACIÓN Y VALORACIÓN DE LOS ARN MENSAJEROS DE PROTEÍNAS QUE COMPONEN EL SISTEMA COLINÉRGICO

Los mamíferos poseen un gen para AChE y otro para BuChE. A partir de un solo gen y por ensamblado alternativo de exones, se generan los tres transcritos de AChE (R, H y T).

Estos ARNm van a producir las subunidades catalíticas R, H y T, que al combinarse entre sí y con subunidades estructurales generan la enorme variedad de componentes moleculares de AChE. En el caso de BuChE, su gen sólo genera un mensajero y una proteína producto, denominada con frecuencia BuChE-T por compartir con la AChE-T la capacidad de polimerizar y ligarse a proteínas estructurales.

Cada subunidad de AChE procede del correspondiente ARNm, que a su vez se genera por la unión de exones comunes y no comunes. La subunidad AChE-T deriva de la información contenida en los exones 2, 3, 4 y 6; la subunidad AChE-H viene codificada por los exones 2, 3, 4 y 5; y la subunidad AChE-R por el contenido de los exones 2,3,4 y parte del intrón I4. Además del procesamiento alternativo en el extremo 3` del marco de lectura, se han identificado varios promotores y patrones de ensamblado alternativos en la región 5´ implicados en la regulación de la transcripción. Además, las señales de poliadenilación pueden ser importantes para controlar la estabilidad de los ARNm.

La diversidad de las ChEs, tanto estructural como funcional, está regulada a distintos niveles, que incluyen la transcripción, modificaciones inmediatas a la transcripción y cambios postraduccionales. En general, estos procesos producen un modelo complejo de expresión que va a depender del tejido y las células que lo forman, de su condición fisiológica y de la respuesta a estímulos externos. La actividad y cantidad de proteína AChE o BuChE en cada tejido, la composición molecular, la formación de oligómeros, la relación de formas homólogas, hidrofílicas y anfifílicas, la distribución subcelular, la glicosilación y el procesamiento proteolítico están regulados por mecanismos que todavía no se conocen en profundidad.

Una vez que habíamos constatado que las actividades AChE y BuChE disminuían en los tumores de pulmón, intentamos averiguar si cambiaba la expresión de los genes *ACHE* y *BUCHE* en las piezas tumorales. Con este objeto, procedimos a identificar y comparar la cantidad de transcritos de AChE y BuChE en los tejidos de pulmón sano y tumoral.

Después de obtener los ARNm de los tejidos sanos y tumorales de pulmón y generar el correspondiente ADN copia (ADNc), se probó la capacidad de amplificación de los cebadores. De acuerdo con la **Tabla 2.1**, el tamaño de los fragmentos amplificados para los ADNc de AChE-T, AChE-H, AChE-R y AChE-E1e, con el par de cebadores correspondiente, debía ser 203, 201, 315 y 247 bp, respectivamente. El fragmento amplificado de BuChE debía tener un tamaño de

297bp. Como control de la reacción, siempre usamos la β -actina, cuyo fragmento amplificado consta de 143 bp. La aparición de un solo producto de reacción con el tamaño esperado para cada transcrito llevaba implícito que la amplificación era correcta, pues se admite que en la PCR no se produce la amplificación del ADN genómico o inespecífica de otros transcritos.

Para determinar qué variantes de ARNm en AChE y BuChE expresaban el pulmón sano (TANC) y los diversos tipos de cáncer de pulmón, se aplicó RT-PCR. Observamos los transcritos alternativos de AChE (T, H y R) y el ARNm de la BuChE tanto el pulmón normal como los tres tipos de tumores (**Figura 3.15**). Además, se comprobó la expresión del ARNm de AChE con un exón 5'alternativo, conocido como ARNm E1e AChE por el grupo de Soreq (Meshorer y col., 2004). El ARNm E1e de AChE fue detectado en cuatro de las cinco muestras de tejidos normales y su ausencia en el conjunto de piezas tumorales analizadas (tres muestras de AC y dos de CE) podría ser usado para el diagnóstico.



Figura 3.15. Amplificación de los transcritos de colinesterasas en tejido pulmonar sano. Para estudiar los ARNm para las ChEs de pulmón, se identificaron tanto el transcrito de BuChE como los diversos mRNAs de AChE a partir de un volumen considerable de ADNc de pulmón sano (2µI). Como control interno de la amplificación se usó β -actina. Como cada amplificación daba un solo producto del tamaño adecuado, se mantuvieron las condiciones de ensayo para las pruebas de cuantificación relativa.

Quisimos determinar si el nivel de expresión de los ARNm cambiaba por la patología tumoral y si además, el tipo histológico afectaba de manera diferente a la expresión de los ARNm, como sucedía con la actividad enzimática.

Para ello se emplearon piezas de tejido tumorales y sanas adyacentes de diferente tipo histológico. Los ensayos se realizaron como se describe en el **Apartado II. 12.3**. Se prepararon una serie de mezclas madre con los cebadores de los distintos transcritos a amplificar (AChE-H, -R, -T y BuChE), de modo que en el medio de reacción quedaran a la concentración adecuada, 0,3 μ M. Se añaden 5 μ l de esta mezcla a series de distintos volúmenes de ADNc: 0,1; 0,5; 1; 2,5 y 5 μ l. Tras añadir el resto de componentes al capilar de reacción, se inició la amplificación en LightCycler de Roche haciendo un seguimiento de la fluorescencia durante 50 ciclos.

El tratamiento de datos se realizó empleando el método *Second Derivative Maximum* para el cálculo de los *Crossing Points* (Cp). En todos los casos la eficiencia fue de 1,9-2, lo que facilitó la comparación entre transcritos para su cuantificación. De cualquier forma, siempre se empleó la β-actina como control interno (*housekeeping*) y por ello hablamos de cuantificación relativa.

En la **Figura 3.16** y en la **Tabla 3.6** aparecen los datos de expresión de cada transcrito en los tejidos ensayados, los cuales se expresan como media \pm desviación estándar del número de copias de cada transcrito por millón de copias del control β -actina.

CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS ARNM DE COLINESTERASAS							
	Nº COPIAS/10 ⁶ COPIAS DE β-ACTINA						
	TANC	AC	TANC	CE			
AChE-H	229,97±319,33	992,54±292,09	86,70±90,37	31,96±18,45			
AChE-R	165,87±153,48	139,81±8,80	13,16±11,56	6,75±7,94			
AChE-T	347,05±240,55	1378,16±1341,38	289,90±176,56	108,49±34,45			
BuChE	23,97±24,65	452,65±503,95	145,48±145,85	21,02±15,97			

Tabla 3.6. Cuantificación relativa de los transcritos de Acetil- y Butirilcolinesterasa en tejidos de pulmón sano y tumoral. Para la amplificación de cada transcrito se emplearon 5 volúmenes de ADNc de cada pieza de tejido. Se usó el tratamiento *Second Derivative Maximum* para el cálculo de los *Crossing Points* y la eficiencia de la amplificación. Los resultados se muestran como la media±DE.

Las muestras de pulmón sano y tumoral expresan los tres ARNm de AChE (AChE-H, AChE-R y AChE-T) así como el ARNm de BuChE. La expresión mayoritaria corresponde al transcrito AChE-T. En tumor epidermoide la cantidad de los ARNm AChE-H, AChE-R y AChE-T disminuye notablemente, respecto a la cantidad de transcritos en los tejidos adyacentes sanos. La menor expresión de los AChE-ARNm en los tumores epidermoides concuerda con el marcado descenso de la actividad AChE observada en estos neoplasmas.



Figura 3.16. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE y BuChE en el epitelio pulmonar. Los tejidos sanos expresan los tres transcritos de AChE (AChE-H, AChE-R y AChE-T) así como el de BuChE. La cantidad de todos los ARNm disminuye en los tumores epidermoides. En cambio, la cantidad de los ARNm AChE-H y AChE-T aumenta notablemente en los adenocarcinomas. El contenido del transcrito AChE-R no cambia en los adenocarcinomas.

Por el contrario, en los adenocarcinomas se observa un significativo aumento de la expresión de los ARNm AChE-H y AChE-T. Este hecho se contrapone con la invariabilidad del ARNm AChE-R. La explicación puede encontrarse en la diversidad de tumores que engloba la denominación adenocarcinoma. Uno de los mayores problemas con el adenocarcinoma pulmonar es la frecuente heterogeneidad histológica. De hecho, es mucho más frecuente la mezcla de subtipos histológicos en los adenocarcinomas que en otros tumores, tales como los del tipo acinar, papilar, bronquioloalveolar y adenocarcinoma sólido con formación mucinosa.

La diferenciación neuroendocrina de un porcentaje de los adenocarcinomas podría explicar el aumento de la expresión (ARNm) y/o actividad AChE. Las características neuroendocrinas quedan claramente de manifiesto, por inmunohistoquímica o microscopía electrónica, en un 10-30 % de los tumores pulmonares de células no pequeñas, sin que muestren rasgos morfológicos neuroendocrinos. Pese a ello, estos tumores son conocidos colectivamente como carcinomas pulmonares de células no pequeñas con diferenciación neuroendocrina. No se han segregado como un grupo particular de tumores en la clasificación de la OMS/IASLC, porque no se ha establecido claramente las consecuencias clínico-terapéuticas de la diferenciación neuroendocrina.

Por otro lado, la falta de correlación en pulmón humano entre la actividad ChE y la expresión génica de estas enzimas puede tener su origen en los mecanismos reguladores post-transcripcionales, bien impidiendo la traducción de los transcritos, bien bloqueando la activación de las moléculas de ChE recién sintetizadas. Esta última opción conllevaría a la existencia de un conjunto de moléculas inactivas en los compartimentos celulares, lo que concuerda con nuestros resultados de inmunodetección (**Figura 3. 14**).

12. ENSAYOS CON CULTIVOS DE CÉLULAS HUMANAS

Los experimentos con células en cultivo son útiles para estudiar eventos celulares bajo condiciones estandarizadas. No obstante, es importante resaltar que células en cultivo monocapa no mimetizan el crecimiento de un tumor *in vivo*. Los tumores sólidos constituyen sistemas mucho más complejos, puesto que, además de las células tumorales, contienen un estroma con fibroblastos, células del sistema inmunitario y células endoteliales de los vasos sanguíneos. Estos elementos celulares "no tumorales" no son meros acompañantes sino que participan activamente en la progresión tumoral. Con todo, los ensayos con cultivos celulares nos permiten estudiar procesos bioquímicos y moleculares sin la "contaminación" de los elementos celulares no tumorales.

En los estudios con cultivos celulares analizamos, en primer lugar, la expresión de AChE y BuChE en células A549 (adenocarcinoma), H157 (carcinoma epidermoide), N417 y H69 (ambas procedentes de carcinoma microcítico de pulmón). Las células se cultivaron en las condiciones descritas en el Capítulo de Materiales y Métodos de esta Memoria. Cuando alcanzaron el 80-90 % de confluencia, se tripsinizaron (células adherentes) o aspiraron (células flotantes) y se centrifugaron a 600 rpm (100 x g), 5 min en una centrífuga Allegra X-12R de Beckman. Se retiró el sobrenadante y se lavaron 2 veces con tampón PBS. Seguidamente se comprobó la viabilidad celular mediante el test de exclusión con azul trypan. Las células se resuspendieron después en un tampón de lisis con detergente (NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, EDTA 3 mM, Tris 10 mM, 1 % Brij, pH 7.5) y se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón. Más tarde, se retiró una alícuota de la suspensión (H₀) y el resto se centrifugó en ultracentrífuga Beckman TLA (Centrikon T-1055), rotor Beckman 100.4, a 30.000 rpm, 35 min. a 4°C. El sobrenadante S₁ se guardó a -80° C hasta su procesamiento. Se determinaron las actividades AChE y BuChE así como su contenido de proteína. La **Tabla 3.7** recoge los resultados obtenidos. Se observa una alta variabilidad en las actividades AChE y BuChE expresadas por las distintas líneas celulares. Con todo, en las líneas celulares A549, N417 y H69 la actividad BuChE fue más abundante que la AChE, y al revés en las células H157. Nos llamó la atención la elevada actividad AChE en la línea celular H157, que procede de carcinoma epidermoide. Este hecho contrasta con el pronunciado descenso de la actividad AChE observado en los extractos de tumores epidermoides, respecto a tejidos adyacentes sanos, hasta el punto de que, precisamente, fueron los tumores epidermoides los que presentaron menor contenido de actividad AChE entre todos los extractos tumorales y no tumorales ensayados (**Tabla 3.2**). La medida de actividad BuChE en todas las líneas celulares alejó cualquier duda sobre la capacidad de las células para expresar BuChE. En todos los casos, el grado de extracción de ambas actividades enzimáticas, AChE y BuChE, fue próximo al 100 %, lo que puso de manifiesto la elevada eficiencia del tampón de lisis para liberar las enzimas.

ACTIVIDAD CHE ESPECÍFICA EN CÉLULAS							
	AChE	AChE (mU/mg)		(mU/mg)			
	Ho	S1	Ho	S ₁			
A549	0,92±0,24	1,06±0,10	2,76±0,9	2,85±0,56			
H157	3,17±1,62	2,88±1,81	1,35±0,87	1,16±0,74			
N417	3,16±1,42	2,98±1,68	7,70±2,03	6,62±2,07			
H69	1,61±0,60	1,38±0,51	8,96±2,4	8,74±1,27			

Tabla 3.7. Actividades Acetil- y Butirilcolinesterasa en células humanas tumorales de pulmón en cultivo. Las actividades específicas AChE y BuChE viene indicadas como la media ± DE. Una unidad de actividad ChE representa la hidrólisis de 1 μmol de sustrato por minuto a 37°C. Los resultados proceden de al menos tres experimentos independientes.

En cuanto a al patrón de formas moleculares de AChE y BuChE en las células estudiadas, la **Figura 3.17** muestra los perfiles de sedimentación de la AChE en gradientes de sacarosa con Brij 96. Se observa que las células procedentes de cáncer de pulmón no microcítico (A549 y H157) sólo expresan formas globulares ligeras de AChE con coeficientes de sedimentación de 3,94 ± 0,32 S y 2,83 ± 0,24 S y que se asignaron a dímeros (G_2^A) y monómeros (G_1^A) anfifílicos, respectivamente. Las dos líneas celulares de cáncer microcítico (H69 y N417) expresaron, además, una discreta cantidad de tetrámeros G_4^A de 9,70 ± 0,22 S. Su producción podría estar estrechamente relacionada con la naturaleza neuroendocrina del tumor de pulmón microcítico.



Figura 3.17. Formas moleculares de AChE en células tumorales humanas en cultivo. Tras la extracción con tampón salino y Brij 96, las formas moleculares de AChE se resolvieron en gradientes de sacarosa (5-20%). Los coeficientes de sedimentación de las moléculas de AChE se calcularon por referencia a los marcadores de sedimentación catalasa de hígado bovino (**C**, 11,4 S) y fosfatasa alcalina de intestino bovino (**F**, 6,1 S).

Respecto a la BuChE, también se observaron diferencias significativas entre las distintas líneas celulares (**Figura 3.18**). Las células derivadas de adenocarcinoma (A549) expresaron mayoritariamente formas globulares ligeras de $4,36 \pm 0,27$ S y de $3,30 \pm 0,13$ S y algunos tetrámeros de $11,62 \pm 0,41$ S. El perfil de moléculas de BuChE fué muy similar en las células de adenocarcinoma A549 y de carcinoma epidermoide H157. Los resultados son importantes ya que indican, sin lugar a dudas, que las células del epitelio pulmonar son capaces de sintetizar BuChE, un punto siempre controvertido cuando se analizan extractos tisulares, debido a que la gran abundancia de BuChE en el suero sanguíneo



Figura 3.18. Formas moleculares de BuChE en células tumorales humanas en cultivo. Después de extraer las células con tampón salino y Brij 96, las moléculas de BuChE se resolvieron en gradientes de sacarosa (5-20%). Los coeficientes de sedimentación de las moléculas de BuChE se calcularon por referencia a los marcadores catalasa de hígado bovino (**C**, 11,4 S) y fosfatasa alcalina de intestino bovino (**F**, 6,1 S).

Los perfiles de sedimentación de BuChE en células tumorales microcíticas N417 y H69 (**Figura 3.18**) mostraron diferencias significativas respecto a los perfiles de células no microcíticas. Se observó una notable proporción de tetrámeros, que se distribuyeron entre variantes hidrofílicas (11,62 ± 0,41S) y anfifílicas G_4^A (9,61 ± 0,24 S).

Estos resultados sugieren que las células microcíticas (de naturaleza neuroendocrina) poseen la maquinaria para la síntesis de tetrámeros de AChE y BuChE, una característica que no tienen las células tumorales no pequeñas. En estos momentos, tratamos de explorar una explicación alternativa que relaciona el tipo de crecimiento de las células en cultivo, adherente para células no microcíticas y en suspensión para las microcíticas, con la expresión de formas tetraméricas de AChE y BuChE.

Para averiguar si había diferencias entre los extractos tisulares y los celulares en la dotación de oligosacáridos de la AChE y BuChE se analizó su interacción con lectinas. Los resultados revelaron que el grado de interacción de la AChE en las células A549, H157, N417 y H69 con las lectinas Con A y WGA fue aproximadamente del 60 % y con LCA varió según la línea celular (40-50 %) (**Figura 3.19**). Respecto a la asociaciación de BuChE con las lectinas, al igual que en los extractos de tejidos, en las células observamos una interacción cercana al 100% (**Figura 3.19**). El resultado más destacado de estos experimentos fue la interacción con las lectinas de la AChE de la línea celular H157 (carcinoma epidermoide). Así, mientras que en las piezas de carcinomas epidermoides el grado de interacción de AChE con Con A, LCA y WGA fue mucho mayor que en los tejidos normales, adenocarcinomas y carcinomas de células grandes, no se observaron diferencias importantes en el grado de interacción con lectinas de la AChE en las líneas celulares ensayadas.

A continuación, nos propusimos determinar el tamaño de las subunidades de AChE y explorar la presencia de subunidades enzimáticas en estado inactivo, mediante ensayos de Western-blot con anticuerpos anti-AChE.

Para este fin, practicamos una electroforesis reductora con los extractos de las células, de modo que poníamos la misma cantidad de proteína (15 µg) en las calles. Tas la transferencia, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios dirigidos contra la AChE humana, como el N19 contra el extremo N-terminal de la AChE humana. El anticuerpo N-19 reconoce a las tres subunidades de la AChE (AChE-H, AChE-T, y AChE-R) ya que la porción N-terminal es la misma en los tres tipos de subunidades.

El empleo de N-19 reveló proteínas de 136, 71, 67, 56 y 51 kDa (**Figura 3.20**). Sus tamaños coincidieron con los calculados para las subunidades de AChE en los tejidos de pulmón. Aunque los tamaños de las bandas AChE fueron los mismos en las distintas líneas celulares, la intensidad de teñido fue mucho mayor en las células microcíticas (N417 y H69). Este hecho fue particularmente evidente para las bandas de 56 y 51 kDa. La falta de correspondencia entre la actividad AChE de cada tipo celular depositada en el gel de la electroforesis y la intensidad de las bandas fortaleció la posible existencia de AChE inactiva en el epitelio pulmonar, cuya abundancia parece depender del tipo celular.







Figura 3.20. Inmunoblot de la AChE de células tumorales humanas en cultivo. Extractos celulares (15 µg) de de células tumorales de pulmón no microcíticas (H157 y A549) y microcíticas (N417 y H69) se sometieron a electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE) en gel de acrilamida al 7.5%. En las calles se depositaron 47,5 mU de actividad AChE para las células H157, 13,8 mU para la línea A549, 47,4 mU para N417 y 24,1 mU para H69 Después de la transferencia a las membranas de PVDF, las proteínas fueron marcadas con anticuerpos N19, contra el extremo N-terminal (común en los tres tipos de subunidades AChE).

Numerosos datos han revelado el importante papel que juegan los factores de crecimiento autocrinos en el crecimiento del cáncer de pulmón. La nicotina, un agonista de los receptores de acetilcolina, estimula la proliferación o crecimiento del cáncer pulmonar. Esto sugiere que el neurotransmisor ACh puede ser un factor de crecimiento autocrino o paracrino para las células del epitelio pulmonar. Mediante el uso de agonistas de los receptores colinérgicos nicotínicos, nos propusimos averiguar si la estimulación colinérgica afectaba al crecimiento de células tumorales humanas en cultivo. Para ello, incubamos las células con concentraciones crecientes (0,1; 1 y 10 µM) de carbacol (carbamilcolina; un análogo de ACh, pero resistente a la acción hidrolítica de las ChEs) o nicotina y se midió la proliferación celular a los 3, 6 y 9 días. Dado que las células no microcíticas (A549 y H157) crecen en monocapas de células adherentes y las células microcíticas en suspensión, la proliferación de las primeras se valoró mediante el ensayo del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), mientras que para las células en suspensión se empleó el reactivo WST-1.

Los resultados mostraron que tanto el carbacol (**Figura 3.21**) como la nicotina (**Figura 3.22**) aumentaban la proliferación de las células tumorales humanas en cultivo. Los datos

indican que la acción proliferativa depende no sólo de la naturaleza y concentración del agonista, sino también del tiempo de exposición. En la **Figura 3.21**, se puede ver que a los 6 y 9 días de incubación, el carbacol 1 μ M fue efectivo sobre las células A549, N417 y H69, pero no sobre las H157. En cambio, la nicotina 0,1 μ M favoreció la proliferación de las células A549 tras 6 o 9 días de exposición. Con nicotina 1 μ M aumentó la proliferación de las células N417 y H69 a los 6 y 9 días de incubación. La incubación a concentraciones mayores (10 μ M) atenuó el aumento de la proliferación a los 12 días de tratamiento y, en ocasiones, se redujo, en comparación con efectos producidos con nicotina 1 μ M.



Figura 3.21. La modulación de la señalización colinérgica por carbacol afecta al crecimiento de células tumorales humanas en cultivo. Los histogramas muestran los porcentajes de proliferación celular medidos por MTT (H157 y A549) o por el ensayo con WST-1 (N417 y H69), en presencia de 0; 0,1;1 y 10 µM de carbamilcolina (* p<0.05 Test t de Student, respecto al crecimiento de las células sin carbacol).



Figura 3.22. La modulación de la señalización colinérgica por nicotina afecta al crecimiento de células tumorales humanas en cultivo. Los histogramas muestran los porcentajes de proliferación celular medidos por MTT (H157 y A549) o por el ensayo con WST-1 (N417 y H69, en presencia de 0; 0,1;1 y 10 μ M de nicotina (* p<0.05 Test t de Student, respecto al crecimiento de las células sin nicotina).

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

1. ACHE y BuCHE EN TUMORES DE PULMÓN

Sobre la base de la acción mitogénica que ejerce la ACh en tejidos no excitables y células aisladas, como osteoblastos (En-Nosse y col., 2009) y linfocitos (Soreq y col., 2008), a través de señales mediadas por receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR), en los últimos veinte años se viene investigando la posible relación entre ChEs y cáncer. A favor de esta posibilidad figuran una serie de hechos, entre los que cabe citar 1) la amplificación del gen *ACHE* y la pérdida de heterozigosidad (LOH) en la región 7q22 (el locus del gen *ACHE*) en carcinomas de ovario (Perry y col., 2002); 2) la relación negativa entre la sobre-expresión de *ACHE*, inducida por andrógenos, en cáncer de ovario y la supervivencia de las pacientes (Motamed-Khorasani y col., 2007); y 3) el papel de AChE en la apoptosis de diversos tipos celulares (Jiang y Zhang, 2008). Este último punto podría llevar a pensar que el silenciamiento del gen *ACHE* o la pérdida de la actividad catalítica de AChE favorecerían la supervivencia celular, un hecho especialmente grave, en el caso de las células cancerosas.

En la presente Memoria se recoge información de interés acerca de las actividades AChE y BuChE en los epitelios de pulmón humano normal y su variación en tumores pulmonares no microcíticos. En este sentido, hemos apreciado un descenso estadísticamente significativo de las actividades de AChE y/o BuChE en los subtipos histológicos más importantes de tumores pulmonares de células no pequeñas, tales como adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma epidermoide. También aportamos datos sobre la distribución de formas moleculares de AChE y BuChE en pulmón no afectado, el tamaño de las subunidades enzimáticas, la interacción con lectinas vegetales y la expresión de mRNAs para AChE y BuChE. Finalmente, completamos los estudios moleculares con los efectos de la transformación maligna del pulmón sobre la glicosilación de AChE y la cantidad de proteína AChE marcada con anticuerpos.

En cuanto al papel de las proteínas del operador colinérgico en las vía respiratorias, desde hace tiempo se sabe que las células epiteliales (ciliares, basales y secretoras) producen y vierten ACh al medio externo, y que el neurotransmisor ejerce un importante papel regulador de las funciones de las vías respiratorias. Así, a través de señales transmitidas por los mAChR, la ACh se comporta como un potente bronco-constrictor (Schlenz y col., 2010). También que la ACh y la activación muscarínica impulsa la proliferación de fibroblastos y mio-fibroblastos aislados de biopsias de pacientes aquejados de fibrosis pulmonar a causa de Enfermedad Crónica Obstructiva Pulmonar (COPD). Lo más interesante a este respecto es que el antagonista del mAChR M3, bromuro de tiotropium, conocido en clínica como Spiriva y usado para atenuar la COPD, inhibe fuertemente la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos (Pieper y col., 2007). Además, la ACh y los mAChR M3 están implicados en el fuerte aumento de la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-8, asociada al consumo de tabaco (Oenema y col., 2010). ACh interviene en la estimulación de la secreción mucosa y en ciertas patologías actúa como un remodelador de las paredes de las vías aéreas (Gosens y col., 2004). La ACh modula la respuesta inmunitaria en las vías respiratorias (Kummer y col., 2008), y en el cáncer de pulmón de células pequeñas, la ACh alimenta un circuito autocrino que estimula la proliferación de las propias células epiteliales (Song y col., 2003b). Este último hallazgo fue el que, definitivamente, nos impulsó a investigar la posible variación de la actividad y expresión de las enzimas degradativas de la ACh y su relación con el desarrollo del cáncer de pulmón.

Nuestros resultados relativos a los niveles de actividad AChE en pulmón humano normal revelan que el epitelio pulmonar contiene una cantidad moderada de actividad AChE (entre 6.1 y 15.4 mU/mg de proteína), menor que el nódulo linfático de axila (21 mU/mg) (Ruiz-Espejo y col., 2003), aproximadamente la misma que los gliomas (~13 mU/mg) (Saez-Valero y col., 1996) y neurinomas (~9 mU/mg) (Garcia-Ayllon y col., 1999) y mayor que los tumores de meninge (2,6 mU/mg) (Saez-Valero y Vidal, 1996), el epitelio mamario normal (~1.6 mU/mg) (Ruiz-Espejo y col., 2002a), colon sano (2,2 mU/mg) (Montenegro y col., 2005; Montenegro y col., 2006a; Montenegro, 2006), cerebro (3,8 mU/mg) (Saez-Valero y col., 1993) y riñón sano (~1.5-2 mU/mg) (Munoz-Delgado y col., 2008; Munoz-Delgado y col., 2010). En ovario, la tinción inmuno-histoquímica de AChE está inversamente asociada con la supervivencia y, por tanto, la tinción es un factor de mal pronóstico (Motamed-Khorasani y col., 2007). Dado que la tinción inmuno-histoquímica no distingue entre formas enzimáticas catalíticamente activas e inactivas, no permite conocer si el aumento de la tinción asociado a un mal pronóstico se debe a un aumento de la actividad catalítica o de la proteína (activa e inactiva). Trabajos previos indican que la actividad AChE en los tumores de los epitelios glandulares y/o tejidos hormonodependientes tiende a aumentar a consecuencia de la transformación neoplásica. Es lo que ocurre en el cáncer de mama (Ruiz-Espejo y col., 2002a), ovario (Motamed-Khorasani y col., 2007) y próstata (Nieto-Ceron y col., 2010).

El hallazgo de actividad AChE en pulmón humano corrobora resultados previos en los que se identificó la enzima en vías aéreas y células epiteliales bronquiales de cerdos. A partir de estos datos, se propuso que la AChE ejercía un papel regulador de la contracción del músculo liso de las vías aéreas (Taisne y col., 1997). En tales vías, concretamente en venas y arterias, la actividad ChE se relaciona con la regulación del tono de la musculatura vascular (Walch y col., 1997). La expresión de AChE y de los demás componentes del sistema colinérgico en el tejido pulmonar y en líneas celulares tumorales (Racke y Matthiesen, 2004; Song y col., 2003b; Song y col., 2003a) demuestra que el epitelio pulmonar puede responder a las señales inducidas por ACh y/o agonistas colinérgicos. Los datos experimentales permiten asegurar que la maquinaria de señalización colinérgica de las vías aéreas desempeña un papel funcional relevante para la fisiología normal y en estados patológicos (Improgo y col., 2011).

En tumores de pulmón de células no pequeñas, la actividad AChE cae ~80% en CE, un 50% en CCG y 20% en AC (**Tabla 3.2**), lo que demuestra que la actividad AChE cambia en función del tipo histológico del tumor de pulmón. La idea anterior se refuerza poderosamente con lo que sucede en tumores renales, sólo que ahora la actividad AChE no disminuye sino que aumenta, unas 2,6 veces en cáncer renal papilar y 1,5 veces en cáncer renal tipo cromófobo

(Munoz-Delgado y col., 2010). En cuanto a la variación de la actividad AChE en adenocarcinoma de pulmón, la heterogeneidad celular y el origen diverso de los cánceres que se engloban en el grupo de AC (acinar, papilar, carcinoma sólido con producción de moco) pueden enmascarar cualquier posible cambio entre la actividad AChE del pulmón sano y de un subtipo particular de adenocarcinoma. La caída de actividad AChE en tumores de células epidermoides coinciden con los obtenidos en los fluidos secretados por las células, con una actividad AChE significativamente menor en los aspirados de los carcinomas de células epidermoides (Martinez-Lopez y col., 2008). En cuanto a BuChE, su actividad cae ~35-45 % en AC y en CCG y ~55 % en CE.

El descenso de actividad AChE en carcinomas de pulmón de células grandes, tumores epidermoides, nódulos linfáticos con metástasis (Ruiz-Espejo y col., 2003) y cáncer de colon (Montenegro y col., 2005; Montenegro y col., 2006a; Montenegro y col., 2006b; Montenegro, 2006) podría llevar a pensar que, con independencia del origen celular, la expresión y/o actividad catalítica de las ChEs disminuye en los tejidos cancerosos, es decir, que el descenso de la actividad AChE y BuChE representa una característica general de las neoplasias. Sin embargo, hay tumores donde no se produce una alteración significativa de la actividad AChE, como en AC de pulmón y en neoplasias prostáticas (Nieto-Ceron y col., 2010) y, todavía más, en algunos tumores la actividad AChE aumenta de forma significativa, como ocurre tejido mamario tumoral (Ruiz-Espejo y col., 2002a) y en algunos tumores renales (Munoz-Delgado y col., 2010). Los datos recogidos en esta Memoria y los publicados por otros autores indican claramente que, a la hora de estudiar la actividad AChE (o BuChE) en tumores humanos o de otros animales, no se puede ir con ideas preconcebidas; la actividad AChE puede cambiar o no entre tumores de distintos tejidos, en incluso de un mismo tejido, pero de distinto origen celular. Además si la actividad AChE (o BuChE) cambia, puede disminuir o aumentar, lo que posiblemente esté relacionado con la biología celular normal (y sus fallos) en el tipo celular concreto del que emane el tumor. Todo ello, sin olvidar que la biología de la célula trasformada puede verse modificada a lo largo del desarrollo del tumor.

El descenso de la actividad AChE en carcinoma de pulmón de células grandes y, sobre todo, en el de tipo epidermoide, puede contribuir al crecimiento del tumor por aumento de la ACh y su impacto sobre la proliferación celular y el desarrollo del tumor. A este respecto, es importante recordar la importancia de la señal colinérgica en la fisiología del pulmón, la acción mitogénica del agonista nicotina en SCLC y los efectos de los antagonistas colinérgicos para el crecimiento de las células de pulmón (Song y col., 2003a; Song y col., 2003b; Song y col., 2008). La activación de las rutas de señalización mediadas por ACh, su repercusión en la biología del cáncer de pulmón y sus aplicaciones en la práctica clínica serán comentadas más adelante.

En lo que se refiere a BuChE, el epitelio pulmonar humano expresa entre 6,5 y 9,6 mU/mg de proteína, una actividad mucho mayor que la del cerebro (1,5 mU/mg) (Saez-Valero y col., 1993) y meningioma (0,9 mU/mg) (Saez-Valero y Vidal, 1996) y parecida a la de neurinoma

(4,6 mU/mg)(Garcia-Ayllon y col., 1999), colon (4,2 mU/mg) (Montenegro y col., 2005; Montenegro, 2006; Montenegro y col., 2006a), mama (5,2 mU/mg) (Ruiz-Espejo y col., 2002b) y riñón (2,7-4,1 mU/mg) (Munoz-Delgado y col., 2010). La actividad BuChE es menor en pulmón humano que en glioma (15,2 mU/mg) (Saez-Valero y col., 1996), líquido cefalorraquídeo (17,3 mU/mg) (Tornel, 1992) y, naturalmente, el suero humano (63,1 mU/mg) (Tornel, 1992). En atención a la extremadamente alta actividad BuChE del suero, los datos de actividad BuChE deben tomarse con precaución debido a la contribución que puedan tener los restos de sangre a la actividad BuChE en la muestras. No obstante lo anterior, en la presente Memoria se aportan datos inequívocos que prueban la expresión de BuChE en las células del pulmón normal y tumoral. En los tumores no microcíticos de pulmón, todos los tipos histológicos ven reducida su actividad BuChE un 35 % en CE, 40 % en AC y 55 % en CCG.

En relación con la caída de las actividades AChE y BuChE en tumores de pulmón, conviene comentar las diferencias entre los tejidos sanos y tumorales, en cuanto a la cantidad de ACh medida en ellos. Desde luego, la cantidad de ACh en el epitelio pulmonar es más que suficiente para activar la señalización colinérgica. Las medidas indican que los tejidos normales poseen entre 0,42 μ M y 1,01 μ M de ACh; en los tumorales la concentración se eleva significativamente hasta 1,09-1,57 µM. El aumento de ACh se puede atribuir a la caída de las actividades AChE y BuChE y/o por un aumento en la síntesis del neurotransmisor. En el tejido pulmonar normal, la ACh es vertida desde el epitelio de las vías aéreas superiores, vías aéreas pequeñas y células neuroendocrinas (Klapproth y col., 1997; Proskocil y col., 2004). Al igual que las células neurales, el epitelio pulmonar contiene la enzima colina-acetil transferasa (ChAT) que genera ACh a expensas de acetil~CoA y colina de la dieta. Sin embargo, a diferencia de la neurona, la célula del epitelio pulmonar no emplea el transportador de colina de alta afinidad (CHT1) (Song y Spindel, 2008), sino el transportador de colina de baja o media afinidad (CTL) (Traiffort y col., 2005). Las células cancerosas de pulmón utilizan los mismos componentes de señalización colinérgica que las células normales (Thunnissen, 2009), los cuales de forma autocrina o paracrina favorecen la proliferación celular.

2. ACTIVIDAD ACHE Y BUCHE EN SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN

Algunos datos indican que la actividad colinesterásica cambia en el suero de pacientes con cáncer. Así, por ejemplo, se ha señalado que, con respecto a personas sanas, la actividad BuChE disminuye significativamente en enfermos con cáncer colorrectal (Morera Ocon y col., 2007). En la misma dirección van los resultados en cáncer gástrico (Gu y col., 2005) y en ciertas leucemias (Cucuianu y col., 1992). Sin embargo, esta información debe ser considerada con suma precaución ya que estos cambios en la actividad BuChE del suero pueden estar ocasionados por los distintos tratamientos quimio-terapéuticos más que con el propio cáncer (Zakut y col., 1988). Nuestras observaciones descartan la existencia de diferencias significativas en las actividades AChE y BuChE enel suero de los pacientes con cáncer de pulmón.

3. COMPOSICIÓN DE FORMAS MOLECULARES DE CHES Y CÁNCER DE PULMÓN

Los análisis de sedimentación en gradientes de sacarosa nos permitieron conocer la composición de formas moleculares de las ChEs en los distintos subtipos histológicos de pulmón tumoral. En todos los casos, los perfiles de sedimentación revelaron abundantes dímeros anfifílicos (G_2^A) de AChE y pocos monómeros (G_1^A) (**Figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4**). Los patrones de formas moleculares de AChE en pulmón humano fueron muy parecidos a los hallados en meningioma (Saez-Valero y Vidal, 1995), mama (Ruiz-Espejo y col., 2002a), intestino (Montenegro, 2006), próstata (Nieto-Ceron y col., 2010) y riñón (Munoz-Delgado y col., 2010). Nuestros datos y los aportados por otros autores sugieren que los tejidos constituidos por células epiteliales producen moléculas globulares monoméricas y, sobre todo, diméricas.

Conviene recordar que los tejidos normales y tumorales están constituidos por una mezcla muy heterogénea de elementos celulares (epiteliales, endoteliales, inmunes, fibroblastos) y que la mayoría, si no todas estas células, contribuyen a la actividad AChE medida en un tejido dado, como a la composición de formas moleculares. En general, y en comparación con los tejidos sanos adyacentes, los tejidos tumorales expresan un patrón más sencillo de formas moleculares de AChE. Teniendo en cuenta la mayor cantidad de células epiteliales (malignas) en carcinomas que de los demás tipos celulares, es lógico que el patrón de formas moleculares de AChE en los tumores se parezca al de las células en cultivo. Esta idea explica la notable semejanza entre los perfiles de formas moleculares de AChE en tumores de pulmón, colon y riñón humano, por un lado, y la exclusiva presencia de dímeros G_2^A y monómeros anfifílicos G_1^A de AChE en las células aisladas de cáncer de pulmón (A549 y H157) (**Figura 3.18**) y colon (Caco-2) (Martinez-Lopez y col., 2008). La simplicidad del patrón de formas de AChE en ganglios linfáticos axilares con metástasis por cáncer de mama (con formas asimétricas A_8 y A_4 y tetraméricas G_4^H de AChE, además de las especies G_2^A y G_1^A) (Ruiz-Espejo y col., 2003), podría entenderse como un mecanismo en el que la invasión de las células epiteliales tumorales (con un patrón sencillo de formas moleculares de AChE) desplaza al conjunto de células de los ganglios sanos (con un patrón complejo de moléculas).

En cuanto a las moléculas de BuChE, las piezas de pulmón sano y tumorales, con independencia del tipo histológico del cáncer, contienen el mismo conjunto de moléculas de BuChE: G_4^H , G_4^A y G_1^H (**Figuras 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8**). Aunque la cantidad de formas G_4^A disminuye de forma significativa con el cáncer, el patrón de formas moleculares de BuChE apenas se ve afectado por la escasa contribución de las formas G_4^A al total de la actividad BuChE. Sin embargo, antes de seguir, conviene hacer algunas consideraciones. La primera hace referencia al posible papel de la BuChE en el tejido pulmonar. Si tenemos en cuenta que la función primordial de las colinesterasas es la hidrólisis de ACh y que las distintas variantes moleculares de AChE y BuChE pueden ser necesarias para ejercer esta función en los distintos compartimentos celulares, la ausencia de formas G_4^A de AChE (tanto en tejidos normales como cancerosos) y de BuChE (a consecuencia de la transformación neoplásica) puede producir un exceso de ACh en dichos compartimentos y, por tanto, fallos en la señalización colinérgica. La segunda consideración nace del conocimiento sobre las alteraciones de las ChEs en distintas patologías. Parece que las formas G_4^A , tanto de AChE como de BuChE, se comportan como marcadores inespecíficos de enfermedades. Las células musculares de ratones distróficos (Cabezas-Herrera y col., 1993; Cabezas-Herrera y col., 1994), tumores de colon (Montenegro y col., 2006a), cáncer de próstata (Nieto-Ceron y col., 2010) y cáncer de pulmón (resultados de esta Memoria) tienen en común la pérdida o disminución de las formas G_4^A . Por último, habría que considerar el posible interés clínico de la desaparición de las formas G4^A de BuChE en tumores pulmonares, como una herramienta útil para el diagnóstico y/o pronóstico.

4. PROPIEDADES DE LOS COMPONENTES DE ACHE Y BUCHE EN PULMÓN

La presente Memoria aporta una detallada información sobre las propiedades anfifílicas de las colinesterasas de pulmón, la presencia del anclaje GPI y su dotación de oligosacáridos.

El carácter anfifílico de las moléculas de AChE en pulmón humano quedó patente, en primer lugar, por su distinta migración en gradientes de sacarosa según llevaran Triton X-100 o Brij 96. La cromatografía hidrofóbica con fenil-agarosa corroboró el comportamiento anfifílico de las moléculas mayoritarias de AChE y las propiedades hidrofílicas de las moléculas de BuChE (**Figuras 3.9 y 3.10**). Los resultados permitieron descartar cambios significativos entre los perfiles de elución obtenidos de los extractos con muestras sanas y tumorales.
Respecto a las moléculas de AChE, conviene señalar que la cromatografía en fenil-agarosa reveló, junto a las formas anfifílicas principales G_2^A y G_1^A , una reducida fracción de especies aparentemente hidrofílicas Su pequeña contribución impedía identificarlas en gradientes de sacarosa al quedar englobadas entre los componentes mayoritarios.

El paso de BuChE por la columna de fenil-agarosa deparó los resultados esperados. Así, la mayor parte de la actividad BuChE pasó libremente y con independencia de que los extractos procedieran de tejidos sanos o tumorales (**Figura 3.10**). Una pequeña porción de la actividad BuChE quedo retenida en la matriz hidrofóbica; su elución con Triton X-100 reveló que contenía moléculas G_4^A . Los análisis por cromatografía hidrofóbica pusieron de manifiesto, de nuevo, el notable descenso o desaparición de los tetrámeros G_4^A , en las piezas cancerosas.

Para aclarar el origen de las propiedades anfifílicas de las moléculas G_2^A y G_1^A de AChE y de las formas G_4^A de BuChE, los extractos se trataron con fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (PIPLC) y se analizó la posible conversión de tales moléculas anfifílicas en hidrofílicas, por pérdida del anclaje GPI (**Figuras 3.11 y 3.12**).

El tratamiento anterior reveló que una parte de las formas $G_2^A y G_1^A$ de AChE tenían restos de GPI (glicosil-fosfatidilinositol.) Esto significa que las células pulmonares producen moléculas catalíticamente activas de AChE con subunidades tipo AChE-H, que, naturalmente, proceden del ARNM AChE-H. El porcentaje de conversión de las formas $G_2^A y G_1^A$ de AChE en sus variantes $G_2^H y G_1^H$ fue superior en pulmón (10-40%) que en glándula mamaria (10-25%) (Ruiz-Espejo y col, 2002) o nódulo linfático de axila sin o con metástasis (15-20%) (Ruiz-Espejo y col., 2003), pero parecido al calculado en colon (50-60%) (Montenegro, 2006) y riñón (40-50%) Muñoz-Delgado y col, 2010). La conversión parcial de las referidas formas anfifílicas en hidrofílicas con PIPLC puede indicar, bien que el anclaje GPI está protegido de la acción de la PIPLC, vía esterificación con ácidos grasos, bien que en los referidos tejidos coexisten dímeros y monómeros anfifílicos con GPI (tipo I, sensibles a PIPLC) y sin GPI (tipo II, resistentes a PIPLC). El aumento en la conversión de las moléculas anfifílicas en hidrofílicas del 20 al 60% en extractos de colon, incubados con hidroxilamina alcalina (para separar los restos de ácido graso ligados al inositol), antes del tratamiento con PIPLC, apoya fuertemente la primera posibilidad.

Durante mucho tiempo se pensó que las moléculas generadas con subunidades AChE-H eran exclusivas de las células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y macrófagos), hasta el punto de que en los últimos años prestigiosos investigadores en el ámbito de las ChEs han sustituido la denominación AChE-H (hidrófóbica) por AChE-E (de eritrocito) (Meshorer y Soreq, Trends in Neuroscience, 2006). Sin embargo, nuestros resultados y los del equipo del Dr. Vidal en tumores de meninges (Saez-Valero y Vidal, 1996) y en tejidos normales y cancerosos de mama, ganglios linfáticos e intestino (Ruiz-Espejo y col., 2002a)(Ruiz-Espejo y col, 2002)(Montenegro, 2006) han demostrado claramente, y por primera vez, que las moléculas de AChE con GPI no quedan

restringidas a las células sanguíneas; en dichos tejidos epiteliales, tales moléculas contribuyen en gran medida, si no a la totalidad, de la actividad AChE. Además, el grupo del Dr. Vidal ha publicado recientemente la identificación de estas formas enzimáticas en riñón (Munoz-Delgado y col., 2010), que sumado a su existencia en hígado (Gomez y col., 2000) parece indicar que en tejidos no nerviosos los dímeros y monómeros con subunidades AChE-H suponen un porcentaje importante del conjunto de moléculas de AChE. En cambio, las moléculas de AChE en músculo, cerebro y nervio se generan con subunidades AChE-T.

Los datos anteriores apoyan la hipótesis según la cual, pese a la expresión de los ARNM AChE-R, AChE-H y AChE-T tanto en tejidos nerviosos, como cerebro (Fernandez-Gomez y col., 2010), músculo (Moral-Naranjo y col., 2010) y nervio (Cabezas-Herrera y col., 2011), como los no nerviosos, como colon (Montenegro, 2006) y riñón (Muñoz-Delgado y col, 2010), los nerviosos producen, con preferencia, la proteína AChE-T y los no nerviosos, por defecto, la proteína AChE-H. La razón, se desconoce, de momento, pero la síntesis de subunidades AChE-T en los tejidos excitables puede verse favorecida por la expresión de los ARNm y las proteínas producto de las subunidades estructurales (no catalíticas) PRiMA o ColQ, necesarias para formar los tetrámeros G_4^A y los componentes asimétricos (A_4 , A_8 , A_{12}), respectivamente. La presencia en los tejidos no nerviosos de oligonucleótidos que detengan la traducción del ARNm AChE-T y en los nerviosos la síntesis de proteínas AChE-H es una alternativa que merece ser contemplada en futuros trabajos.

Dado que en los tejidos se han identificado dos clases de dímeros y monómeros anfifílicos de AChE, los que llevan subunidades AChE-H (tipo I), sintetizados principalmente en tejidos no excitables, y los localizados principalmente en los tejidos excitables (tipo II), que presentan subunidades AChE-T, cabe la posibilidad de que estos últimos sean monómeros y dímeros "en ruta" hacia la conversión en tetrámeros. En cambio, los monómeros y dímeros con AChE-H, incapaces de generar tetrámeros, necesitan restos GPI para su unión a la membrana y posterior transporte a su destino celular. La identificación de monómeros y dímeros tipo I (con GPI) pero no los de tipo II (sin GPI) en dominios particulares de la membrana plasmática, conocidos como "balsas lipídicas" (lipid rafts) (Moral-Naranjo y col., 2010) apoya fuertemente la hipótesis anterior.

En cuanto a los oligoglicanos unidos a las ChEs de los epitelios del pulmón, la mayor asociación de la lectina Con A con AChE de carcinoma epidermoide que con la enzima del tejido adyacente (**Tabla 3.5** y **Figura 3.13**) demuestra que la neoplasia afecta a la dotación de oligosacáridos que incorpora la AChE. No sucede igual en adenocarcinoma ni en carcinoma de células grandes. La glicosilación aberrante de AChE en un determinado tipo celular de las vías aéreas, al igual que en células humanas de hepatoma HuH-7 (Hada y col., 1987) y en mama maligna (Ruiz-Espejo y col., 2002a) concuerda con la idea aceptada por numerosos autores,

según la cual las neoplasias afectan a la expresión y función de las glicosil-transferasasas (Brooks y col., 2008; Kim y col., 2009).

La mayoría de la actividad BuChE de pulmón se unió a las lectinas, y el grado de unión no se vio afectado por el cáncer. Es posible que el mayor número de oligoglicanos unidos a la BuChE (9 sitios de N-glicosilación) que a la AChE humana (3 sitios) dificulte la detección de posibles cambios en la unión de las lectinas entre los tejidos normal y tumoral.

5. ORIGEN DE LAS MOLÉCULAS DE ACHE Y BUCHE IDENTIFICADAS EN PULMÓN

Los resultados de las **Figuras 3.1 y 3.3** revelan que en el tejido pulmonar la actividad AChE se reparte entre formas G_2^A y G_1^A . Aunque, ocasionalmente, se observaron dímeros hidrofílicos (G_2^H) y tetrámeros anfifílicos (G_4^A), su contribución siempre fue escasa.

Dada la alta densidad vascular en los pulmones y el alto contenido de formas G_2^A de AChE en los eritrocitos, no se puede descartar que parte de la actividad AChE de los epitelios pulmonares proceda de la sangre. Sin embargo, distintas pruebas demuestran que los epitelios pulmonares producen AChE. La primera prueba viene de la presencia de moléculas G_1^A de AChE en las piezas pulmonares, que no hay en los eritrocitos. La fijación a lectinas de la AChE en el pulmón representa otro indicio: los dímeros de los eritrocitos humanos se ligan un 35% a la lectina Con A, un 80% a WGA y un 70% a LCA (Vidal, 1996) y las moléculas homólogas de pulmón sano algo más de un 69% a Con A, un 78% a WGA y un 81% a LCA. Los mayores porcentajes de interacción de AChE de carcinomas epidermoides con las lectinas fortalecen la idea de la síntesis de AChE en las células de pulmón. Por último, todas las líneas celulares de cáncer de pulmón, bien las derivadas de carcinomas microcíticos (N417 y H69) o de carcinomas no microcíticos (A549 y H157) expresaron actividad AChE (**Tabla 3.7**) distribuida entre monómeros y dímeros anfifílicos (**Figura 3.18**). Todos los datos obtenidos indican que las células pulmonares, y posiblemente las de otros epitelios, poseen la capacidad de sintetizar subunidades AChE-H para formar monómeros y dímeros.

Las moléculas G_4^A de AChE son características de tejidos neurales. De hecho, las especies G_4^A de AChE (y BuChE) son especialmente abundantes en tejidos excitables como cerebro, nervio y músculo. La identificación de formas G_4^A de AChE en algunos adenocarcinomas (**Figura 3.2**) y moléculas G_4^A de BuChE en adenocarcinomas, tumores de células grandes y en tumores de tipo epidermoide (**Figuras 3.5, 3.6** y **3.7**) podría llevar a pensar que las formas G_4^A de AChE y BuChE derivan de la inervación del pulmón canceroso, más acusada en las piezas de pulmón tumoral que en las muestras sanas. Como se han descrito al menos 12 tipos distintos de células epiteliales en la superficie de las vías respiratorias y cinco tipos celulares en las glándulas

(Kummer y col., 2008), no se puede descartar que determinados tipos celulares sean capaces de expresar el ARNm de PRiMA y su proteína producto para generar las formas G_4^A de AChE y BuChE.

No obstante lo anterior, la presencia de moléculas G_4^A de AChE y BuChE en células microcíticas, N417 y H69 (**Figuras 3.18** y **3.19**), que obviamente carecen de inervación y de otros tipos celulares, deja el camino abierto a la producción de la proteína PRiMA y moléculas G_4^A de AChE y BuChE con PRiMA en dichas células tumorales y, por tanto, en algunos tumores de pulmón.

Respecto al origen de la actividad BuChE en las muestras de pulmón y considerando su abundancia en el suero, podría ocurrir que la actividad BuChE del pulmón viniera de los restos de sangre en las piezas quirúrgicas. También podría producirse en el propio pulmón. Aunque es probable que parte de la actividad BuChE medida en pulmón proceda del suero, hay pruebas a favor de la síntesis de BuChE en las células del pulmón. Los perfiles de sedimentación de la BuChE pulmonar (**Figuras 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8**) nos proporcionan la primera prueba: la distinta relación entre las formas tetraméricas, diméricas y monoméricas en las piezas tumorales y el suero. Mientras que en el suero sólo hay moléculas G_4^H de BuChE, las muestras pulmonares contienen moléculas G_4^H , G_4^A , G_2^A y G_1^A .

La presencia de G_4^H de BuChE en cerebro humano así como la escasa o nula cantidad en tejidos epiteliales como meningioma (7%) (Saez-Valero y Vidal, 1996) o mama (Ruiz-Espejo y col., 2002a) sugieren que tal y como sucede con las formas análogas de AChE, las de BuChE pueden proceder en parte de las terminaciones nerviosas del pulmón. La presencia de formas ligeras (monoméricas y diméricas) y tetrámeros (hidrofílicos y anfifílicos) en los extractos de células en cultivo (**Figura 3.19**) prueba que los epitelios pulmonares producen su propia enzima BuChE. En este sentido, es llamativo que las células tumorales no microcíticas no sean capaces de producir formas G_4^A pero sí las células microcíticas. Este hecho puede tener relación con la naturaleza neuroendocrina de los tumores de pulmón de células pequeñas. De ser así, la presencia de variantes G_4^A de BuChE podría ser útil para el tipaje de algunos carcinomas, en función de sus propiedades neuroendocrinas. El conocimiento más detallado del sistema colinérgico de las vías aéreas y su función en el cáncer están abriendo nuevas alternativas terapéuticas (Wu y col., 2011).

6. INMUNODETECCIÓN DE ACHE Y BUCHE DE PULMÓN.

Las pruebas de Western blot (**Figura 3.15**) con anticuerpos contra el péptido N-terminal de AChE humana nos permitieron identificar proteínas de 72, 68 y 50 kDa. En cambio, con anticuerpos contra el extremo C-terminal de la subunidad AChE-T sólo se detectó la banda de

68 kDa. De todo ello concluimos que las proteínas de 72, 68 y 50 kDa probablemente correspondían a las subunidades AChE-H, AChE T y AChE R, respectivamente. Aunque la asignación definitiva de las tres proteínas a las subunidades de AChE requiere estudios más profundos, como hipótesis, podemos proponer que el pulmón es capaz de producir las tres subunidades de AChE. Los resultados de RT-PCR (**Figura 3.16**), en los que se observan los tres ARNm de AChE, los que codifican las subunidades AChE-H, AChE-T y AChE-R apoyan esta idea.

Además, la mayor intensidad de la señal para las proteínas de 68 y 50 kDa, en ensayos con las mismas unidades de actividad, indica que la cantidad de proteína AChE por unidad de actividad AChE es mayor en tumores epidermoides que en pulmón no tumoral. La situación es análoga a la descrita en estudios con la AChE de timo de ratón sano y con distrofia muscular (Nieto-Ceron y col., 2005), en los que se demuestra la presencia en el timo de moléculas catalíticamente inactivas de AChE. De este modo, nuestros resultados con anticuerpos no sólo prueban que el pulmón contiene AChE inactiva, sino que además demuestran que el contenido de AChE inactiva depende del tipo histológico del tumor. Dado que todavía no se ha abordado la caracterización molecular de la AChE inactiva, se desconoce el estado de agregación de las moléculas (G₁, G₂, G₄). Pero con independencia del estado que adopte la AChE inactiva, lo más importante desde el punto de vista oncológico es la abundancia de AChE inactiva en los tumores epidermoides. Este hecho abre la posibilidad de que el descenso de la actividad AChE asociado al tipo histológico de tumor pulmonar no microcítico derive de un daño en el proceso que convierte AChE inactiva en activa. De ser así, podríamos concluir que los cambios en la biología de las ChEs en células malignas no es un fenómeno colateral. Al contrario, puede que dichos cambios tengan un significado funcional. Como suele ser habitual en la investigación científica, se abren nuevas vías para dilucidar como estos cambios afectan a la biología tumoral.

7. EXPRESIÓN DE LOS GENES ACHE Y BUCHE EN PULMÓN

Los resultados de RT-PCR **(Tabla 3.6)** revelan que el pulmón sano y el tumoral poseen la capacidad de expresar las tres clases de AChE-ARNm. En las piezas sanas, la cantidad de ARNm AChE-H oscila entre 86 y 229 copias por millón de copias del ARNm para β -actina; el ARNm AChE-R, entre 13 y 165 copias; y el ARNm AChE-T, entre 289 y 347 copias. En total, la cantidad de los tres AChE- ARNm es algo mayor en pulmón humano (~500 copias) que en riñón (~150 copias) (Munoz-Delgado y col., 2010) y menor que en colon (~2 000 copias) (Montenegro y col., 2006b). Como cabía esperar, a juzgar por la importancia funcional de la AChE en los tejidos neurales (o excitables), el contenido de transcritos de AChE en los tres tejidos epiteliales es mucho menor que en los neurales (o excitables): cerebro de ratón (~35000 copias) (Fernandez-Gomez y col., 2008) y músculo de ratón (~10000 copias) (Moral-Naranjo y col., 2010).

Llama la atención el hecho de que, si bien pulmón, riñón y colon producen transcritos AChE-H, AChE-T y AChE-R, los tres órganos expresan, principalmente, moléculas catalíticamente activas derivadas del transcrito AChE-H, las que incorporan restos de GPI. Puede que en los epitelios la eficiencia de traducción del ARNm AChE-H sea mucho mayor que las de los ARNm AChE-R y AChE-T. También es posible que las subunidades R y T permanezcan en estado inactivo, que se degraden rápidamente o que marchen al medio extracelular, poco después de la síntesis. La identificación en el pulmón de moléculas inactivas de AChE por *Western blotting* no excluye las demás posibilidades.

En cuanto a las diferencias entre el pulmón sano y canceroso en el contenido de ARNm para AChE, es de destacar su descenso en tumores epidermoides (de 200-300 copias en piezas sanas a 100-150 copias en los tumores) y el aumento en adenocarcinoma (de 500-600 copias a 2000-2500 copias) (**Tabla 3.6**). La cantidad de los ARNm para AChE y BuChE en los tumores cambian en paralelo. Recordando las variaciones en la actividad AChE asociados con el tipo histológico de cáncer de pulmón, podemos ver que hay cierta relación entre dichos cambios en la actividad enzimática y el nivel de expresión génica. A nivel histopatológico, en el caso de que los cambios en la expresión génica de las ChEs sean exclusivos de la transformación neoplásica, puede que la cantidad de ARNm de AChE se vea alterada en lesiones preneoplásicas del pulmón (o de tumores en distinta localización), lo cual tendría gran interés para el pronóstico.

Pese a las diferencias en el nivel de expresión de los ARNm de AChE en pulmón sano y maligno, la coexistencia de variantes de AChE activas e inactivas en pulmón humano y en otros tejidos, nos lleva a pensar que las variaciones de la actividad AChE en los tumores de pulmón, y tal vez en otros, posiblemente estén más relacionadas con los cambios en la ratio de moléculas activas/inactivas de AChE que con anomalías en la expresión del gen *ACHE*. Por tanto, la caída de actividad AChE en CE y CCG, así como en nódulos linfáticos axilares en pacientes con cáncer de mama (Ruiz-Espejo y col., 2003), podría deberse a fallos en los procesos post-traduccionales implicados en la conversión de las variantes inactivas de AChE en activas, más que a anomalías en los patrones de *splicing* o en la cantidad de los ARNm de AChE.

En lo que se refiere a la producción de ARN mensajeros de AChE en tejidos neoplásicos, merece la pena mencionar las observaciones que relacionan la agresividad del astrocitoma y el cambio en el *splicing* alternativo de exones para favorecer la síntesis de AChE-R en detrimento de AChE-T (Perry y col., 2002). En los últimos años, el Grupo de la Dra Soreq ha descubierto que los tejidos humanos expresan variantes de AChE N-extendidas, las cuales se generan con los ARNm que contienen el exon E1e (Meshorer y col., 2004). Por otra parte, la expresión de AChE-E1e parece estar vinculada a la apoptosis, al menos en neuronas (Toiber y col., 2008). En las células neurales, según varios autores, la AChE-E1e podría actuar como "freno" para prevenir o atenuar la progresión tumoral (Munoz-Delgado y col., 2010). Con estos antecedentes, decidimos explorar, mediante RT-PCR, la presencia de tales variantes N-extendidas de AChE en

pulmón sano y/o tumoral. Los ensayos revelaron la existencia AChE-ARNm con E1e en los epitelios de pulmón no canceroso, pero no en los tumores. De confirmarse este hallazgo, con el análisis de un número mayor de muestras, la expresión diferencial de los ARNm de AChE con el exon E1e podría ser útil para distinguir pulmón sano y tumoral.

8. RELACIÓN ENTRE EL DESCENSO DE ACTIVIDAD CHE Y LA BIOLOGÍA TUMORAL DEL CARCINOMA DE PULMÓN.

En nuestros estudios, ha quedado claro que la actividad AChE no cambia en AC, disminuye en CCG, y mucho más en CE, lo que demuestra que la variación de actividad depende del subtipo histológico de tumor pulmonar. Los resultados concuerdan con la expresión variable de AChE en sistemas celulares en proliferación. De este modo, en la hematopoyesis de ratón, la expresión de AChE aumenta con la proliferación de células de la sangre y su supervivencia (tras un silenciamiento transitorio de los ARNm) (Soreq y col., 1994). Por el contrario, la expresión de la proteína AChE se modera durante la proliferación de células del osteosarcoma Saos-2 (Grisaru y col., 1999) y la de megacariocitos (Lev-Lehman y col., 1997).

Dada la compleja relación entre ChEs y cáncer, es conveniente enfocar la discusión desde distintos puntos de vista. Uno de ellos, tiene que ver con la utilidad clínica de estos estudios. En este sentido, algunos trabajos avalan el uso potencial de los trabajos con las ChEs para obtener información de utilidad para profesionales de la medicina y, por ende, para los propios enfermos. En nuestra opinión, desde el punto de vista clínico, tiene especial relevancia el estudio de las ChEs en tumores de ovario (Motamed-Khorasani y col., 2007), en los que se relacionó el aumento de la inmuno-tinción de AChE plasmática con la transición de lesiones benignas a malignas y con un peor pronóstico de las pacientes. Más recientemente, en cáncer de hígado se ha observado lo contrario. En este caso, una reducida expresión de AChE parece ser indicativa de una mayor agresividad tumoral, un elevado riesgo de recurrencia y una baja tasa de supervivencia (Zhao y col., 2011). De lo anterior se desprende la necesidad de más estudios para aclarar las bases moleculares de la relación entre ChEs y cáncer.

Otro punto a considerar es la función que pueda jugar la AChE en eventos moleculares claves para el cáncer, como son los que regulan la muerte celular programada o apoptosis. En los últimos años, se han acumulado numerosos datos a favor de la participación de AChE en la apoptosis. En este ámbito, se ha observado repetidamente que la expresión de AChE aumenta en distintas líneas celulares cuando entran en apoptosis (Yang y col., 2002; Zhang y col., 2002). Además, el silenciamiento de los AChE-ARNm con ARN de interferencia protege a las células de la apoptosis, lo que deja pocas dudas sobre la intervención de AChE en la apoptosis(Park y col., 2004), aunque todas las observaciones señalan que por sí sola, la AChE no puede iniciarla (Jin y col., 2004).

Dado que hay células que expresan niveles basales de actividad AChE y no entran en apoptosis, debe haber diferencias en la expresión de AChE cuando las células crecen en condiciones normales y con agentes inductores de apoptosis. En este sentido, parece que la AChE participa la apoptosis a través de fragmento lítico de 55 kDa. El fragmento se produce por ruptura proteolítica de AChE-T (68 kDa) por la acción de caspasas, cuya activación depende de la ruta PI3K/Akt (fosfatidil-inositol 3-quinasa/(Akt = PDK, quinasa dependiente de fosfoinosítidos) (Xie y col., 2011). En estudios con cáncer colorrectal, se ha sugerido que la AChE puede jugar un papel doble, con acción anti-apoptótica en los primeros estadios y favoreciendo el crecimiento no-dependiente del anclaje, en etapas más avanzadas de la transformación neoplásica (Syed y col., 2008).

Por otro lado, se ha propuesto que las variantes AChE-T y AChE-R están implicadas en la regulación de la apoptosis, en un modelo de estrés oxidativo (Hartl y col., 2011). Según este modelo, AChE-T es necesaria para inducir la apoptosis vía caspasas; al contrario la AChE-R ejerce acción anti-apoptótica a través de Bcl-2. Al parecer, la síntesis "de novo" de proteína AChE-T, más concretamente, de un fragmento de ella de unos 55 kDa producido por caspasas (Xie y col., 2011), induce apoptosis en varias líneas celulares (Park y col., 2004; Park y col., 2008). Los datos del trabajo sugieren que los tejidos cancerosos, con escasa capacidad para producir AChE activa, no responden a estímulos pro-apoptóticos, lo cual posiblemente se traduce en un aumento de la supervivencia celular. Por contra, los tejidos con la maquinaria de síntesis de AChE intacta (tejidos normales y cancerosos de mejor pronóstico) responden adecuadamente a tales estímulos pro-apoptóticos. El conjunto de evidencias que relacionan la AChE con el cáncer y la apoptosis ha supuesto que el gen *ACHE* sea considerado un gen supresor de tumores.

Por último, creemos que la implicación de la señalización colinérgica en el cáncer merece una atención especial. Numerosas evidencias sugieren que el desarrollo de los cánceres humanos y su sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos están muy influenciados por el desajuste entre la activación e inhibición de las señales producidas por neurotransmisores, como acetilcolina, adrenalina y noradrenalina. Entre otros muchos efectos, estas moléculas modulan la proliferación, apoptosis, angiogénesis y metástasis del cáncer (Schuller, 2008). Como el descenso de la actividad AChE (y BuChE) en cáncer de pulmón supone una mayor disponibilidad de ACh, el escenario de una progresión tumoral sostenida o ayudada por la sobre-activación de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos cobra sentido. La fuerte asociación entre carcinomas epidermoides y el consumo de tabaco, mayor que en otros carcinomas de pulmón de células no pequeñas, puede estar relacionada con el marcado descenso de la actividad AChE y la mayor concentración de ACh en los tumores de pulmón tipo CE.

En cuanto a los efectos de la actividad colinérgica sobre la oncogénesis, desde hace años se conocen la acción mitogénica del agonista nicotina en SCLC y los efectos de los antagonistas colinérgicos para el crecimiento de las células de pulmón (Song y col., 2003b; Song y col.,

2003a; Song y col., 2008). La ACh, la nicotina y sus derivados metabólicos actúan como factores de crecimiento autocrinos o paracrinos en el cáncer de pulmón, tanto de células pequeñas como no pequeñas. La acción de la ACh y nicotina es parecida en otros tumores, como el cáncer colorrectal (Cheng y col., 2008; Pettersson y col., 2009), cáncer vesical (Chen y col., 2008) y mama (Chen y col., 2010). Todo ello sugiere que la señalización colinérgica favorece la progresión tumoral en varios tipos celulares de los epitelios. Obviamente, la acción mitogénica de la ACh y otros agonistas se produce mediante la activación de los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR).

Por razones obvias, las investigaciones para esclarecer la relación entre el cáncer y la señalización colinérgica están más avanzadas en cáncer de pulmón. El consumo de tabaco es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo y progresión de varias clases de cáncer (Burns, 2003). Numerosas evidencias apoyan el consumo de tabaco como la causa principal no sólo del cáncer de pulmón, sino también del tracto urinario inferior, incluyendo la pelvis renal y vejiga; el tracto superior aéreo-digestivo, desde la cavidad oral hasta la faringe, la laringe y el esófago; y en el páncreas (Vineis y col., 2004). El tabaco puede también producir cáncer en la cavidad nasal, senos paranasales y nasofaringe, adenocarcinoma de esófago, cáncer de estómago, hígado, cérvix uterina, mama y leucemia mieloide (Vineis y col., 2004). De los miles de compuestos químicos hallados en el humo del tabaco, los principales y más potentes carcinógenos son los hidrocarburos policíclicos aromáticos y las nitrosaminas derivadas de la nicotina (Hecht, 2006; Shah y Karnes, 2010). En fumadores, los metabolitos de tales agentes forman aductos con el DNA y causan mutaciones en genes que suponen la pérdida de función en anti-oncogenes, como Rb y p53, sobre-activación de proto-oncogenes y conversión de proto-oncogenes en oncogenes (K-Ras).

Los experimentos de nuestro laboratorio han demostrado que la estimulación colinérgica por nicotina o carbacol incrementa significativamente la proliferación celular en células tumorales de pulmón (**Figuras 3.23 y 3.24**). Las observaciones concuerdan con resultados previos e indican que la estimulación colinérgica afecta a proteínas reguladoras del ciclo celular (Dasgupta y col., 2006; Dasgupta y Chellappan, 2006; Davis y col., 2009). Los datos disponibles sobre este particular indican que la exposición a nicotina dispara la activación de Raf-1, la inducción de la actividad quinasa mediada por las ciclinas D y E, que promueven el paso de la fase G_1 a la S en las células, la fosforilación de Rb y su disociación de E2F1. También se observa que la estimulación con nicotina ocasiona la disociación de Rb de ciertos promotores de proliferación (cdc6 y cdc25A), mientras que aumenta la unión de E2F1 a dichos promotores (Singh y col., 2011).

Tales eventos moleculares se relacionan con los efectos mitogénicos de la nicotina en varias líneas celulares, como A549 (carcinoma bronquioloalveolar humano), NCI-H23 y NCI-H441 (adenocarcinoma de pulmón) y NCI-H226 (carcinoma de células escamosas de la efusión

pleural) de cáncer de pulmón no microcítico, así como en células epiteliales bronquiales normales humanas, células epiteliales de las vías aéreas pequeñas, células endoteliales aórticas humanas y células endoteliales microvasculares humanas (Improgo y col., 2011). Los efectos mitogénicos de la nicotina se detienen con antagonistas de la subunidad a7 del receptor nicotínico, como a-bungarotoxina y metil-alil acotinina (MAA), pero no con a-lobelina (un inhibidor de las subunidades $a4\beta2$) o dihidro β -eritoidina (DH β E; un inhibidor de las subunidades $a3\beta2$ y $a4\beta2$). Los datos sugieren que las subunidades a7 son responsables de los efectos mitogénicos de la nicotina. También se ha observado que, por estimulación con nicotina, la proteína de unión β -arrestina-1 se asocia con la tirosina quinasa Src y el conjunto se traslada hacia los nAChRs (Dasgupta y col., 2006). El silenciamiento de β -arrestina-1 o de Src previene la proliferación inducida por nicotina, lo cual claramente implica al eje de señalización β -arrestina-1-Src en el aumento de la proliferación celular mediada por los receptores nicotínicos con la subunidad a7 (**Figura 4.1**).

Además de en el cáncer de pulmón, en queratinocitos orales y esofágicos se ha visto que la nicotina promueve la activación tanto de los receptores nicotínicos homoméricos α7 como de los heteroméricos α3-α5 (Arredondo y col., 2006a). En células cancerosas esofágicas Het-1A expuestas a las nitrosaminas 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK)) y N'-nitrosonornicotine (NNN) aumentan los transcritos y las proteínas PCNA y Bcl-2, así como los factores de transcripción GATA3, NF-κB, y STAT1. Por su parte, células orales epiteliales inmortalizadas aumentan su proliferación en respuesta a las nitrosaminas señaladas antes, a través de la activación de la cascada de las MAP quinasas, Ras-Raf-ERK1-ERK2, de la ruta JAK2-STAT3 y del factor de transcripción NF-κB (Arredondo y col., 2006a). Además, la exposición crónica de los queratinocitos orales a nicotina o al humo de tabaco ambiental, induce la sobre-expresión selectiva de las subunidades α5- y α7-nAChR, lo que lleva a un aumento de las respuestas mediadas por nicotina (Arredondo y col., 2006b).

En el cáncer de mama, también se ha demostrado la importancia del nAChR para la progresión tumoral. Experimentos con las líneas epiteliales mamarias humanas MCF10A y cancerosas MCF7 han revelado que su exposición a nicotina potencia la actividad proteína quinasa Cα como diana de la proliferación y migración inducida por nicotina (Guo y col., 2008). Se ha sugerido que la proliferación de las células tumorales de mama inducida por nicotina depende de la expresión de la subunidad a9-nAChR y de la ciclina D3 (Chen y col., 2010). El estudio de los efectos mitogénicos de la nicotina, sobre una población de células madre cancerosas en MCF7, usando la aldehído deshidrogenasa (ALDH) como marcador de células madre, reveló que la nicotina aumentaba la población de células madre vía a7-nAChR y la ruta dependiente de PKC-Notch (Hirata y col., 2010).

Además de las respuestas directas de los nAChRs, las indirectas pueden también contribuir al crecimiento tumoral y a la supervivencia celular. Dado que los nAChR son canales

iónicos, la entrada de Ca²⁺ a través de los a7-nAChR puede activar diversas vías de señalización (Sheppard y col., 2000). En este sentido, se ha visto que los agentes que bloquean los canales de Ca²⁺ reducen significativamente la síntesis de DNA en respuesta a nicotina o NNK en SCLC. El aumento sistémico (mediado por nAChR) de los neurotransmisores de estrés, adrenalina y noradrenalina, que además son agonistas β -adrenérgicos, aumenta notablemente el nivel de AMP cíclico, subsiguiente a la actividad adrenérgica, y la transactivación de la cascada EGFR, a través de la secreción de EGF en células epiteliales de las vías aéreas pequeñas tratadas con NNK (Laag y col., 2006; Schuller y col., 1999; Schuller, 2007). En la misma dirección van los trabajos relativos al aumento sistémico y celular de noradrenalina, a través de la nicotina, con la consiguiente sobre-activación de los receptores noradrenérgicos y potenciación de sus efectos sobre el crecimiento y angiogénesis en injertos cancerosos pancreáticos, gástricos y de colon. Estas acciones parecen estar mediadas por una sobre-activación de la ruta ERK1-ERK2, COX2, prostaglandina E2, VEGF y transactivación β-adrenérgica, así como de la señalización de EGFR en células cancerosas de colon (Wong y col., 2007). También se ha publicado la activación de ERK1-ERK2 y STAT3 en respuesta a la nicotina en células cancerosas de vejiga aguas debajo de los nAChRs y de los receptores β -adrenérgicos (Chen y col., 2008).

La nicotina mimetiza a la ACh y se une a las subunidades a de los nAChRs (Lindstrom, 1997). La afinidad de la nicotina por los nAChR heteroméricos $\alpha4\beta2$ es mayor que por los homoméricos $\alpha7$ (Gotti y col., 1997). Sin embargo, la ocupación del receptor $\alpha4\beta2$ lleva a su desensibilización rápida. Al final, son los receptores a7 los principales inductores del desarrollo y progresión del cáncer *in vivo*. Además de la nicotina, las nitrosamina específica del tabaco NNK se une al receptor homomérico a7 y la NNN al heteromérico $\alpha\beta$ -nAChR (Gotti y Clementi, 2004). La afinidad de NNK el receptor $\alpha7$ -es 1300 veces mayor que la de nicotina, y la del NNN por el receptor $\alpha\beta$, 5000 veces superior (Arredondo y col., 2006a; Schuller y Orloff, 1998).

Los intentos para aclarar los acontecimientos moleculares que tras la señalización colinérgica desembocan en la progresión tumoral han aportado abundante información, que se resume en el esquema de la **Figura 4.1**. En cáncer de pulmón de células pequeñas, la activación selectiva de los receptores a7-nAChR por nicotina o la nitrosamina NNK activa a la proteína quinasa C (PKC), la quinasa Raf-1, las quinasas activadas por mitógenos ERK1 y ERK2 y los factores de transcripción Fos, Jun y Myc, a través de la activación (Jull y col., 2001). También se ha demostrado la especificidad estérica de los AChRs hacia la (-) nicotina. Recientemente, se ha publicado que la exposición aguda y repetitiva a nicotina, induce una morfología/apariencia similar a las neuronas en la línea celular de SCLC N417, las cuales crean tumores mayores y más vascularizados en ratones, mediante la activación del eje quimioquina CXCL12/receptor CXR4. En células tratadas con nicotina, aumenta la expresión de CXCR4 dependiente de nAChR (Martinez-Garcia y col., 2010). Las líneas celulares de NSCLC forman carcinomas de células grandes, carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas; todos muestran activación de la ruta PI3KAKT y de NF-κB en respuesta al tratamiento con nicotina o NNK (Tsurutani y col.,

2005; West y col., 2003). En células tumorales de pulmón tratadas con NNK y deficientes en FOXO3a, la restauración de este gen aumenta la sensibilidad a apoptosis tras un daño en el DNA mediado por NNK. El estudio propone que FOXO3a puede jugar un papel importante en la supresión del adenocarcinoma de pulmón, actuando como un agente protector frente al estrés carcinogénico (Blake, Jr. y col., 2010).



Figura 4.1. Modelo de rutas de señalización de cáncer mediadas por la estimulación colinérgica. Basado en Improgo y col. 2001 (Improgo y col., 2011).

El consumo de tabaco es un factor de riesgo bien documentado para muchos cánceres. Como se resume en la **Figura 4.1**, la nicotina, el principal componente adictivo del tabaco, así como otras nitrosaminas actúan sobre los nAChRs en células no neuronales para facilitar el crecimiento tumoral, angiogénesis, metástasis, supervivencia y quimio-resistencia, a través de diversas rutas de señalización. La unión de agonistas nicotínicos facilita la formación de un complejo proteico entre el nAChR, la proteína β -arrestina-1 y la tirosina quinasa Src. La activación *in vitro* de Src impulsa el crecimiento de células cancerosas, la proliferación de células endoteliales y la formación de túbulos angiogénicos. La estimulación indirecta de los receptores β -adrenérgicos (β -AR) refuerza la acción mitogénica de los nAChR activados. Además, la expresión de la proteína survivina, inducida por nicotina, y la activación de NF- κ B bloquean la apoptosis inducida por quimioterapia. La activación de los nAChR también promueve los cambios del tipo "transición epitelio-mesénquina" y la diseminación metastásica de células tumorales primarias.

A la vista de la capacidad de la nicotina para impulsar los procesos moleculares relativos al crecimiento tumoral y metástasis, cabe pensar que los antagonistas de los nAChR puedan ser útiles para detener o atenuar el crecimiento y la progresión tumoral. En este sentido, se ha demostrado recientemente que a-cobratoxina (a-CbT) bloquea in vitro e in vivo el crecimiento de un conjunto de líneas celulares de NSCLC (Paleari y col., 2009) y de mesotelioma (Catassi y col., 2008). El efecto más llamativo de la a-CbT es su capacidad para inhibir eficazmente el potencial metastásico de las células cancerosas de pulmón trasplantadas en ratones inmunodeprimidos. Este hallazgo abre el camino al empleo de los antagonistas de nAChR como terapia adyuvante para prevenir la proliferación celular y la diseminación metástásica del cáncer de pulmón. Antes de ello, habrá que analizar los efectos adversos que tales antagonistas puedan producir en la actividad cerebral y en el sistema nervioso central. Además, la acción de la nicotina por sí misma en la tumorogénesis obliga a revisar los potenciales efectos mitogénicos y metastásicos de la terapia de sustitución de nicotina. Por último, los aspectos que conciernen al impacto de las nitrosaminas derivadas del tabaco sobre los nAChR requieren una investigación más detallada. En la medida que conozcamos, en profundidad, los acontecimientos moleculares que se suceden tras la interacción de la variedad de receptores nicotínicos con nicotina y con nitrosaminas derivadas de la combustión del tabaco, estaremos más cerca de encontrar terapias que ayuden a detener o ralentizar la progresión del cáncer de pulmón.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El epitelio pulmonar humano contiene una cantidad apreciable de actividad ChE, que se reparte entre las actividades AChE y BuChE. Los tres tipos histológicos de tumores de pulmón de células no pequeñas analizados también expresan actividades AChE y BuChE. La actividad ChE en los carcinomas de pulmón disminuye en función del tipo histológico. Así, la actividad AChE cae un 80% en carcinomas epidermoides o escamosos, un 50% en carcinomas de células grandes y un 20% en adenocarcinomas. Por su parte, la actividad BuChE disminuye un 40% en adenocarcinomas, un 50% en carcinomas de células grandes y un 30% en carcinomas epidermoides o escamosos.

2. La cantidad de acetilcolina (ACh) es superior en pulmón patológico que en tejido sano. El aumento de ACh puede ser a consecuencia de la menor actividad ChE en los tumores. Los efectos inductores de la proliferación celular que ejercen los agonistas colinérgicos, tanto endógenos (ACh) como exógenos (nicotina y sus derivados), apoyan el papel de las ChEs en la biología de las células tumorales de pulmón.

3. Los análisis de sedimentación en gradientes de sacarosa indican que el pulmón humano produce, casi exclusivamente, formas moleculares G_1^A y G_2^A de AChE. En ocasiones, se observan formas G_4^A , pero siempre minoritarias. La distribución de las moléculas de AChE no cambia en los tumores, lo que implica que la biosíntesis de las moléculas de AChE no se ve afectada por neoplasia

4. La conversión parcial de las variantes anfifílicas $G_1^A y G_2^A$ en hidrofílicas $(G_1^H y G_2^H)$ con fosfolipasa C específica para los fosfolípidos de inositol demuestra que una parte, al menos, de las moléculas $G_1^A y G_2^A$ del pulmón llevan restos de glicofosfatidilinositol. Esto implica que dichas moléculas están compuestas por subunidades de AChE tipo I, las que generan los transcritos AChE-H. La detección del ARNm AChE-H en las piezas de pulmón normal y tumoral apoya la producción de subunidades H en los epitelios pulmonares.

5. La dotación de oligosacáridos en la AChE es distinta según la enzima se extraiga del epitelio normal o tumoral. Las diferencias dependen del tipo histológico y podrían ser útiles para el diagnóstico.

6. Las formas moleculares de BuChE que predominan en los epitelios pulmonares son G_4^H , G_4^A , G_2^H y G_1^H . La presencia de moléculas G_4^A , G_2^H y G_1^H , que no se hallan en el suero sanguíneo, demuestra que los epitelios pueden producir su propia actividad BuChE. Las diferencias en el patrón de interacción de varias lectinas, especialmente con la Concanavalina-A confirma que los epitelios del pulmón producen BuChE activa.

7. Los resultados de Western-blot apoyan la existencia en el pulmón de moléculas de AChE catalíticamente inactivas. Lo demuestra el hecho de que la caída de actividad AChE en los tumores no le acompañe una reducción de la cantidad de proteína. Además, las diferencias en la cantidad de AChE-ARNm en tejidos normales y tumorales no pueden explicar por si solas

los cambios en la actividad AChE. En nuestra opinión, la caída de la actividad AChE en los tumores de pulmón analizados se debe más a cambios en el procesamiento post-traduccional de la AChE que en la expresión del gen.

8. Los ensayos con células tumorales de pulmón humano han permitido corroborar, sin ningún género de duda, que las células epiteliales de pulmón poseen el conjunto de proteínas necesario para la actividad colinérgica. En tejidos normales, las señales colinérgicas contribuyen a la homeostasis celular, pero las células tumorales las aprovechan para acelerar su proliferación. Otros autores han ido más allá y relacionan la señalización colinérgica con la progresión tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Nuestro trabajo demuestra que en el cáncer de pulmón disminuye la actividad ChE y aumenta la cantidad de ACh. Como las ChEs son absolutamente necesarias para aminorar la disponibilidad de ACh y duración de las respuestas colinérgicas, la disminución de la actividad ChE en las piezas de cáncer de pulmón puede contribuir a la progresión tumoral.

9. Los resultados actuales y futuros pueden aclarar la implicación del sistema colinérgico en el cáncer de pulmón. La información puede ser valiosa, no sólo desde el punto de vista de la biología molecular del cáncer, sino también para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, que mejoren la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aldridge WN, Reiner E (**1972**), "Enzyme inhibitors as substrates. Interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids", *Front.Biol.*, 26: 1-328

Allebrandt KV, Rajesh V, Layer PG (**2005**), "Expression of acetylcholinesterase (AChE) and aryl acylamidase (AAA) during early zebrafish embryogenesis", *Chemico-Biological Interactions*, 157-158:353-5.: 353-355

Alvarez A, Alarcon R, Opazo C, Campos EO, Munoz FJ, Calderon FH, Dajas F, Gentry MK, Doctor BP, de Mello FG, Inestrosa NC (**1998**), "Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils", *J.Neurosci.*, 18: 3213-3223

Anderson MS, Kunkel LM (**1992**), "The molecular and biochemical basis of Duchenne muscular dystrophy", *Trends Biochem.Sci.*, 17: 289-292

Anglister L, Rogozinski S, Silman I (**1976**), "Detection of hydroxyproline in preparations of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric eel", *FEBS Lett.*, 69: 129-132

Anglister L, Tarrab-Hazdai R, Fuchs S, Silman I (**1979**), "Immunological cross-reactivity between electric-eel acetylcholinesterase and rat-tail-tendon collagen", *European Journal of Biochemistry*, 94: 25-29

Arendt T, Bruckner MK, Lange M, Bigl V (**1992**), "Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development--a study of molecular forms", *Neurochemistry International*, 21: 381-396

Arpagaus M, Chatonnet A, Masson P, Newton M, Vaughan TA, Bartels CF, Nogueira CP, La Du BN, Lockridge O (**1991**), "Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates", *Journal of Biological Chemistry*, 266: 6966-6974

Arpagaus M, Combes D, Culetto E, Grauso M, Fedon Y, Romani R, Toutant JP (**1998**), "Four acetylcholinesterase genes in the nematode Caenorhabditis elegans", *J.Physiol Paris.*, 92: 363-367

Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O (**1990**), "Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy", *Biochemistry.*, 29: 124-131

Arredondo J, Chernyavsky AI, Grando SA (**2006a**), "Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells", *Cancer Biol.Ther.*, 5: 511-517

Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (**2006b**), "Receptormediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes", *FASEB J.*, 20: 2093-2101 Aslanian D, Grof P, Bon S, Masson P, Negrerie M, Chatel JM, Balkanski M, Taylor P, Massoulie J (**1991**), "A comparative Raman spectroscopic study of cholinesterases", *Biochimie.*, 73: 1375-1386

Aslanian D, Grof P, Negrerie M, Balkanski M, Taylor P (**1987**), "Raman spectroscopic study on the conformation of 11 S form acetylcholinesterase from Torpedo californica", *FEBS Lett.*, 219: 202-206

Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH, Tomlinson BE, Blessed G, Fairbairn A (**1983**), "Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form", *Neurosci.Lett.*, 40: 199-204

Austin L, Berry WK (**1953**), "Two selective inhibitors of cholinesterase.", *Biochemical Journal*, 54: 695-700

Aziz-Aloya R, Sternfeld M, Soreq H (**1993**), "Promoter elements and alternative splicing in the human ACHE gene", *Prog.Brain Res.*, 98:147-53.: 147-153

Balasubramanian AS, Bhanumathy CD (**1993**), "Noncholinergic functions of cholinesterases", *FASEB J.*, 7: 1354-1358

Barak D, Kronman C, Ordentlich A, Ariel N, Bromberg A, Marcus D, Lazar A, Velan B, Shafferman A (**1994**), "Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core", *Journal of Biological Chemistry*, 269: 6296-6305

Barbosa M, Rios O, Velasquez M, Villalobos J, Ehrmanns J (**2001**), "Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors", *Surg.Neurol.*, 55: 106-112

Bartha E, Szelenyi JG, Hollan SR (**1982**), "Acetylcholinesterase (AchE) activity of lymphocytes in chronic lymphoid leukemia (CLL)", *Leuk.Res.*, 6: 861-864

Ben Aziz-Aloya R, Seidman S, Timberg R, Sternfeld M, Zakut H, Soreq H (**1993**), "Expression of a human acetylcholinesterase promoter-reporter construct in developing neuromuscular junctions of *Xenopus* embryos", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90: 2471-2475

Berman HA, Nowak MW (**1992**), "Influence of ionic composition of the medium on acetylcholinesterase", en *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*, Plenum Press, New York p 149-156

Bigbee JW, Sharma KV (**2004**), "The adhesive role of acetylcholinesterase (AChE): detection of AChE binding proteins in developing rat spinal cord ", *Neurochem.Res.*, 29: 2043-2050

Bigbee JW, Sharma KV, Chan EL, Bogler O (**2000**), "Evidence for the direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons", *Brain Res.*, 861: 354-362

Birikh KR, Sklan EH, Shoham S, Soreq H (**2003**), "Interaction of "readthrough" acetylcholinesterase with RACK1 and PKCbeta II correlates with intensified fear-induced conflict behavior", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100: 283-288

Blake DC, Jr., Mikse OR, Freeman WM, Herzog CR (**2010**), "FOXO3a elicits a pro-apoptotic transcription program and cellular response to human lung carcinogen nicotine-derived nitrosaminoketone (NNK)", *Lung Cancer.*, 67: 37-47

Blow DM, Birktoft JJ, Hartley BS (**1969**), "Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin", *Nature*, 221: 337-340

Bon S, Lamouroux A, Vigny A, Massoulie J, Mallet J, Henry JP (**1991**), "Amphiphilic and nonamphiphilic forms of bovine and human dopamine beta-hydroxylase", *Journal of Neurochemistry*, 57: 1100-1111

Bon S, Massoulie J (**1980**), "Collagen-tailed and hydrophobic components of acetylcholinesterase in Torpedo marmorata electric organ", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 77: 4464-4468

Bon S, Massoulié J (**1978**), "Collagenase sensitivity and aggregation properties of <u>Electrophorus</u> acetylcholinesterase", *European Journal of Biochemistry*, 89: 89-94

Bon S, Massoulié J (**1997**), "Quaternary associations of acetylcholinesterase. I Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail", *Journal of Biological Chemistry*, 272: 3007-3015

Bon S, Toutant JP, Meflah K, Massoulie J (**1988**), "Amphiphilic and nonamphiphilic forms of Torpedo cholinesterases: I. Solubility and aggregation properties", *Journal of Neurochemistry*, 51: 776-785

Bon S, Vigny M, Massoulie J (**1979**), "Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 76: 2546-2550

Boopathy R, Rajesh RV, Darvesh S, Layer PG (**2007**), "Human serum cholinesterase from liver pathological samples exhibit highly elevated aryl acylamidase activity", *Clin.Chim.Acta.*, 380: 151-156

Boschetti N, Brodbeck U, Jensen SP, Koch C, Norgaard-Pedersen B (**1996**), "Monoclonal antibodies against a C-terminal peptide of human brain acetylcholinesterase distinguish between erythrocyte and brain acetylcholinesterases", *Clin.Chem.*, 42: 19-23

Bourne Y, Radic Z, Sulzenbacher G, Kim E, Taylor P, Marchot P (**2006**), "Substrate and product trafficking through the active center gorge of acetylcholinesterase analyzed by crystallography and equilibrium binding", *Journal of Biological Chemistry*, 281: 29256-29267

Bourne Y, Taylor P, Radic Z, Marchot P (**2003**), "Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site", *EMBO J.*, 22: 1-12

Brenner T, Hamra-Amitay Y, Evron T, Boneva N, Seidman S, Soreq H (**2003**), "The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of myasthenia gravis", *FASEB J.*, 17: 214-222

Brimijoin S, Balm M, Hammond P, Lennon VA (**1990**), "Selective complexing of acetylcholinesterase in brain by intravenously administered monoclonal antibody", *Journal of Neurochemistry*, 54: 236-241

Brimijoin S, Koenigsberger C (**1999**), "Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications", *Environmental Health Perspectives*, 107 : 59-64

Brimijoin S, Rakonczay Z (**1986**), "Immunology and molecular biology of the cholinesterases: current results and prospects", *Int.Rev.Neurobiol.*, 28:363-410.: 363-410

Brodbeck U, Gentinetta R, Lundin SJ (**1973**), "Multipe forms of a cholinesterase from body muscle of plaice (Pleuronectes platessa) and possible role of sialic acid in cholinesterase reaction specificity", *Acta Chemica Scandinavica*, 27: 561-572

Brooks SA, Carter TM, Royle L, Harvey DJ, Fry SA, Kinch C, Dwek RA, Rudd PM (**2008**), "Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies", *Anticancer Agents Med.Chem.*, 8: 2-21

Brown LM, Blair A, Gibson R, Everett GD, Cantor KP, Schuman LM, Burmeister LF, Van Lier SF, Dick F (**1990**), "Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota", *Cancer Res.*, 50: 6585-6591

Bukowska B (**2005**), " [Acetylcholinesterase--apoptosis induction, role in neurological diseases and leukemia]", *Postepy Biochem.*, 51: 154-161

Burns DM (2003), "Tobacco-related diseases", Semin.Oncol.Nurs., 19: 244-249

Burstein SA, Adamson JW, Harker LA (**1980**), "Megakaryocytopoiesis in culture: modulation by cholinergic mechanisms", *J.Cell Physiol.*, 103: 201-208

Byers DM, Irwin LN, Moss DE, Sumaya IC, Hohmann CF (**2005**), "Prenatal exposure to the acetylcholinesterase inhibitor methanesulfonyl fluoride alters forebrain morphology and gene expression", *Brain Res.Dev.Brain Res.*, 158: 13-22

Cabello G, Juarranz A, Botella LM, Calaf GM (**2003**), "Organophosphorous pesticides in breast cancer progression", *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.*, 35: 1-9

Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, Duran V, Rudolph I, Hrepic N, Calaf G (**2001**), "A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition", *Environmental Health Perspectives*, 109: 471-479

Cabezas-Herrera J, Campoy FJ, Vidal CJ (**1993**), "Molecular forms of acetylcholinesterase in microsomal membranes of normal and dystrophic muscle", *Biochem.Soc.Trans.*, 21: 108S

Cabezas-Herrera J, Campoy FJ, Vidal CJ (**1994a**), "Amphiphilic properties of molecular forms of acetylcholinesterase in normal and dystrophic muscle", *Journal of Neuroscience Research*, 38: 505-514

Cabezas-Herrera J, Campoy FJ, Vidal CJ (**1994b**), "Amphiphilic properties of molecular forms of acetylcholinesterase in normal and dystrophic muscle", *Journal of Neuroscience Research*, 38: 505-514

Cabezas-Herrera J, Moral-Naranjo MT, Campoy FJ, Vidal CJ (**1994c**), "G4 forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse muscle differ in their interaction with Ricinus communis agglutinin", *Biochim.Biophys.Acta.*, 1225: 283-288

Cabezas-Herrera J, Moral-Naranjo MT, Campoy FJ, Vidal CJ (**1997**), "Glycosylation of acetylcholinesterase forms in microsomal membranes from normal and dystrophic Lama2dy mouse muscle", *Journal of Neurochemistry*, 69: 1964-1974

Cabezas-Herrera J, Moral-Naranjo MT, Nieto-Ceron S, Sanchez del Campo LF, Montenegro MF, Campoy FJ, Muñoz-Delgado E, Vidal CJ (**2011**), "Changes in the expression and structure of cholinesterases in excitable and nonexcitable tissues of the merosin-deficient *lama2dy* mouse, a model of congenital muscular dystrophy", *En prensa*,

Campoy FJ, Cabezas-Herrera J, Vidal CJ (**1992**), "Interaction of AChE with Lens culinaris agglutinin reveals differences in glycosylation of molecular forms in sarcoplasmic reticulum membrane subfractions", *Journal of Neuroscience Research*, 33: 568-578

Catassi A, Paleari L, Servent D, Sessa F, Dominioni L, Ognio E, Cilli M, Vacca P, Mingari M, Gaudino G, Bertino P, Paolucci M, Calcaterra A, Cesario A, Granone P, Costa R, Ciarlo M, Alama A, Russo P (**2008**), "Targeting alpha7-nicotinic receptor for the treatment of pleural mesothelioma", *Eur.J.Cancer.*, 44: 2296-2311

Caussé E, Vaysse P, Fabre J, Valdiguié P, Thouvenot JP (**1987**), "Cholinesterase activities in resected bowel specimens from children with Hirschsprung's disease", *Clinica Chimica Acta*, 167: 51-57

Cánovas-Muñoz MD, Campoy FJ, Muñoz-Delgado E, Vidal CJ (**1990**), "Amphiphilic and hydrophilic molecular forms of acetylcholinesterase in membranes derived from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1039: 323-330

Chan RY, Boudreau-Lariviere C, Angus LM, Mankal FA, Jasmin BJ (**1999**), "An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse- and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers ", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96: 4627-4632

Chatonnet A, Jbilo O (**1991**), "Rabbit Butyrylcholinesterase gene: an evolutionary perspective", en *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*, American Chemical Society, Washington p 157-161

Chatonnet A, Lockridge O (**1989**), "Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase", *Biochemical Journal*, 260: 625-634

Chatonnet A, Masson P (**1985**), "Study of the peptidasic site of cholinesterase: preliminary results", *FEBS Lett.*, 182: 493-498

Chatonnet A, Masson P (**1986**), "Is the peptidase activity of highly purified human plasma cholinesterase due to a specific cholinesterase isoenzyme or a contaminating dipeptidylaminopeptidase?", *Biochimie.*, 68: 657-667

Checler F, Grassi J, Vincent JP (**1994**), "Cholinesterases display genuine arylacylamidase activity but are totally devoid of intrinsic peptidase activities", *Journal of Neurochemistry*, 62: 756-763

Checler F, Vincent JP (**1989**), "Peptidasic activities associated with acetylcholinesterase are due to contaminating enzymes", *Journal of Neurochemistry*, 53: 924-928

Chen CP (**2008**), "Prenatal diagnosis, fetal surgery, recurrence risk and differential diagnosis of neural tube defects", *Taiwan.J.Obstet.Gynecol.*, 47: 283-290

Chen CS, Lee CH, Hsieh CD, Ho CT, Pan MH, Huang CS, Tu SH, Wang YJ, Chen LC, Chang YJ, Wei PL, Yang YY, Wu CH, Ho YS (**2010**), "Nicotine-induced human breast cancer cell proliferation attenuated by garcinol through down-regulation of the nicotinic receptor and cyclin D3 proteins", *Breast Cancer Research and Treatment*,

Chen KY, Lee LN, Yu CJ, Lee YC, Kuo SH, Yang PC (**2006**), "Elevation of telomerase activity positively correlates to poor prognosis of patients with non-small cell lung cancer", *Cancer Letters*, 240: 148-156

Chen RJ, Ho YS, Guo HR, Wang YJ (**2008**), "Rapid activation of Stat3 and ERK1/2 by nicotine modulates cell proliferation in human bladder cancer cells", *Toxicol.Sci.*, 104: 283-293

Cheng K, Samimi R, Xie G, Shant J, Drachenberg C, Wade M, Davis RJ, Nomikos G, Raufman JP (**2008**), "Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation", *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.*, 295: G591-G597

Chow FL, Telen MJ, Rosse WF (**1985**), "The acetylcholinesterase deficit in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Evidence that the enzyme is absent from the cell membrane", *Blood*, 66: 940-945

Chubb IW, Pilowsky PM, Springell HJ, Pollard AC (**1979**), "Acetylcholinesterase in human amniotic fluid: An index of fetal neural development?", *Lancet.*, 1: 688-690

Civenni G, Test ST, Brodbeck U, Butikofer P (**1998**), "In vitro incorporation of GPI-anchored proteins into human erythrocytes and their fate in the membrane", *Blood.*, 91: 1784-1792

Cohen O, Erb C, Ginzberg D, Pollak Y, Seidman S, Shoham S, Yirmiya R, Soreq H (**2002**), "Neuronal overexpression of "readthrough" acetylcholinesterase is associated with antisense-suppressible behavioral impairments", *Mol.Psychiatry.*, 7: 874-885

Colombres M, Sagal JP, Inestrosa NC (**2004**), "An overview of the current and novel drugs for Alzheimer's disease with particular reference to anti-cholinesterase compounds", *Curr.Pharm.Des.*, 10: 3121-3130

Combes D, Fedon Y, Toutant JP, Arpagaus M (**2001**), "Acetylcholinesterase genes in the nematode Caenorhabditis elegans", *International Review Cytology*, 209:207-39.: 207-239

Coussen F, Ayon A, Le Goff A, Leroy J, Massoulie J, Bon S (**2001**), "Addition of a glycophosphatidylinositol to acetylcholinesterase. Processing, degradation, and secretion", *Journal of Biological Chemistry*, 276: 27881-27892

Cranganu A, Camporeale J (**2009**), "Nutrition aspects of lung cancer", *Nutr.Clin.Pract.*, 24: 688-700

Cucuianu A, Malide D, Petrov L, Patiu M, Vlaicu S, Cucuianu M (**1992**), "Serum cholesterol and apoprotein B levels and serum cholinesterase activity in selected hematologic malignancies", *Rom.J.Intern.Med.*, 30: 261-268

Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP (**1993**), "Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins", *Protein Science*, 2: 366-382

Dale G, Archibald A, Bonham JR, Lowdon P (**1981**), "Diagnosis of neural tube defects by estimation of amniotic fluid acetylcholinesterase", *British Journal Obstetr*, 88: 120-125

Dally JJ, Greenfield SA (**1994**), "The release of acetylcholinesterase in vivo is regulated by dopaminergic systems in the guinea-pig substantia nigra", *Neurochemistry International*, 25: 339-344

Darreh-Shori T, Almkvist O, Guan ZZ, Garlind A, Strandberg B, Svensson AL, Soreq H, Hellstrom-Lindahl E, Nordberg A (**2002**), "Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months", *Neurology.*, 59 : 563-572

Darvesh S, Walsh R, Martin E (**2003**), "Enantiomer effects of huperzine A on the aryl acylamidase activity of human cholinesterases", *Cell Mol.Neurobiol.*, 23: 93-100

Dasgupta P, Chellappan SP (**2006**), "Nicotine-mediated cell proliferation and angiogenesis: new twists to an old story", *Cell Cycle.*, 5: 2324-2328

Dasgupta P, Rastogi S, Pillai S, Ordonez-Ercan D, Morris M, Haura E, Chellappan S (**2006**), "Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways", *J.Clin.Invest.*, 116: 2208-2217

Davis P, Maloney AJ (**1976**), "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease", *Lancet*, 2: 1403

Davis R, Rizwani W, Banerjee S, Kovacs M, Haura E, Coppola D, Chellappan S (**2009**), "Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer", *PLoS One.*, %20;4: e7524

de Serres M, Sherman D, Chestnut W, Merrill BM, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr. (**1993**), "Proteolysis at the secretase and amyloidogenic cleavage sites of the beta-amyloid precursor protein by acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase using model peptide substrates", *Cell Mol.Neurobiol.*, 13: 279-287

Dekosky ST, Scheff SW (**1990**), "Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease:correlation with cognitive severity", *Ann.Neurol.*, 27: 457-464

Deprez P, Doss-Pepe E, Brodsky B, Inestrosa NC (**2000**), "Interaction of the collagen-like tail of asymmetric acetylcholinesterase with heparin depends on triple-helical conformation, sequence and stability", *Biochemical Journal*, 350 Pt 1:283-90.: 283-290

Deprez PN, Inestrosa NC (**1995**), "Two heparin-binding domains are present on the collagenic tail of asymmetric acetylcholinesterase", *Journal of Biological Chemistry*, 270: 11043-11046

Deutsch VR, Pick M, Perry C, Grisaru D, Hemo Y, Golan-Hadari D, Grant A, Eldor A, Soreq H (**2002**), "The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation", *Exp.Hematol.*, 30: 1153-1161

Dinamarca MC, Sagal JP, Quintanilla RA, Godoy JA, Arrazola MS, Inestrosa NC (**2010**), "Amyloidbeta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Abeta peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Mol.Neurodegener.*, 5:4.: 4

Dori A, Cohen J, Silverman WF, Pollack Y, Soreq H (**2005**), "Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development", *Cereb.Cortex.*, 15: 419-430

Drews U (**1975**), "Cholinesterase in embryonic development", *Progress in Histochemistry and Biochemistry*, 7: 1-52

Dreyfus P, Zevin-Sonkin D, Seidman S, Prody C, Zisling R, Zakut H, Soreq H (**1988**), "Crosshomologies and structural differences between human cholinesterases revealed by antibodies against cDNAproduced human butyrylcholinesterase peptides", *Journal of Neurochemistry*, 51: 1858-1867 Dreyfus PA, Seidman S, Pincon-Raymond M, Murawsky M, Rieger F, Schejter E, Zakut H, Soreq H (**1989**), "Tissue-specific processing and polarized compartmentalization of clone-produced cholinesterase in microinjected Xenopus oocytes", *Cell Mol.Neurobiol.*, 9: 323-341

Dubovy P, Haninec P (**1990**), "Nonspecific cholinesterase activity of the developing peripheral nerves and its possible function in cells in intimate contact with growing axons in chick embryo.", *Int.J.Dev.Neurosci.*, 8: 589-602

Dutta-Choudhury TA, Rosenberry TL (**1984**), "Human erythrocyte acetylcholinesterase is an amphipathic protein whose short membrane-binding domain is removed by papain digestion", *Journal of Biological Chemistry*, 259: 5653-5660

Edwards JA, Brimijoin S (**1982**), "Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat", *Journal of Neurochemistry*, 38: 1393-1403

Ehrlich G, Viegas-Pequignot E, Ginzberg D, Sindel L, Soreq H, Zakut H (**1992**), "Mapping the human acetylcholinesterase gene to chromosome 7q22 by fluorescent in situ hybridization coupled with selective PCR amplification from a somatic hybrid cell panel and chromosome-sorted DNA libraries", *Genomics.*, 13: 1192-1197

Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Featherstone RM (**1961**), "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical Pharmacology*, 7:88-95.: 88-95

Emmerling MR, Johnson CD, Mosher DF, Lipton BH, Lilien JE (**1981**), "Cross-linking and binding of fibronectin with asymmetric acetylcholinesterase", *Biochemistry.*, 20: 3242-3247

En-Nosse M, Hartmann S, Trinkaus K, Alt V, Stigler B, Heiss C, Kilian O, Schnettler R, Lips KS (**2009**), "Expression of non-neuronal cholinergic system in osteoblast-like cells and its involvement in osteogenesis", *Cell and Tissues Research*, 338: 203-215

Engel AG (1986), "Duchenne dystrophy", en Myology, MacGraw-Hill, New York p 1185-1240

Engel AG, Lambert EH, Gomez MR (**1977**), "A new myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency, small nerve terminals, and reduced acetylcholine release", *Ann.Neurol.*, 1: 315-330

Ferguson MAJ (1991), "Lipid anchors of membrane proteins.", Curr.Opin.Struc.Biol., 1: 522-529

Ferguson MAJ (**1992**), "Glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors: the tale of a tail.", *Biochem.Soc.Trans.*, 20: 243-256

Fernandez-Gomez FJ, Munoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Vidal CJ, Jordan J (**2008**), "The level of butyrylcholinesterase activity increases and the content of the mRNA remains unaffected in brain of senescence-accelerated mouse SAMP8", *Chemico-Biological Interactions*, 175: 332-335 Fernandez-Gomez FJ, Munoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Vidal CJ, Jordan J (**2010**), "Cholinesterase activity in brain of senescence-accelerated-resistant mouse SAMR1 and its variation in brain of senescence-accelerated-prone mouse SAMP8", *Journal of Neuroscience Research*, 88: 155-166

Fernandez HL, Duell MJ, Festoff BW (**1979a**), "Cellular distribution of 16S acetylcholinesterase", *Journal of Neurochemistry*, 32: 581-585

Fernandez HL, Duell MJ, Festoff BW (**1979b**), "Neurotrophic control of 16S acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction", *J.Neurobiol.*, 10: 441-454

Filogamo G, Marchisio PC (**1971**), "Acetylcholine system and neural development", *Neurosci.Res.(N.Y.).*, 4:29-64.: 29-64

Fishman EB, Siek GC, MacCallum RD, Bird ED, Volicer L, Marquis JK (**1986**), "Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer type", *Ann.Neurol.*, 19: 246-252

Fournier D, Mutero A, Rungger D (**1992**), "Drosophila acetylcholinesterase. Expression of a functional precursor in Xenopus oocytes", *European Journal of Biochemistry*, 203: 513-519

Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA (**2008**), "Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index", *Chemico-Biological Interactions*, 175: 115-118

Futerman AH, Low MG, Silman I (**1983**), "A hydrophobic dimer of acetylcholinesterase from Torpedo californica electric organ is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *Neurosci.Lett.*, %19;40: 85-89

Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR (**2001**), "Cancer and genomics", *Nature.*, 409: 850-852

Garcia-Ayllon MS, Gomez JL, Vidal CJ (**1999a**), "Amphiphilic properties of acetylcholinesterase monomers in mouse plasma", *Neurosci.Lett.*, 265: 211-214

Garcia-Ayllon MS, Riba-Llena I, Serra-Basante C, Alom J, Boopathy R, Saez-Valero J (**2010**), "Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma", *PLoS.One.*, 5: e8701

Garcia-Ayllon MS, Saez-Valero J, Munoz-Delgado E, Vidal CJ (**2001**), "Identification of hybrid cholinesterase forms consisting of acetyl- and butyrylcholinesterase subunits in human glioma", *Neuroscience.*, 107: 199-208

Garcia-Ayllon MS, Saez-Valero J, Piqueras-Perez C, Vidal CJ (**1999b**), "Characterization of molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human acoustic neurinomas", *Neurosci.Lett.*, 274: 56-60

Garcia-Ayllon MS, Silveyra MX, Andreasen N, Brimijoin S, Blennow K, Saez-Valero J (**2007**), "Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase changes after treatment with donepezil in patients with Alzheimer's disease", *Journal of Neurochemistry*, 101: 1701-1711

Garcia L, Verdiere-Sahuque M, Dreyfus PA, Nicolet M, Rieger F (**1988**), "A dimeric form of acetylcholinesterase anchored through a glycolipid in mouse skeletal muscle", *Neurochemistry International*, 13: 327-332

García-Ayllón MS, Gómez JL, Vidal CJ (**1999**), "Amphiphilic properties of acetylcholinesterase monomers in mouse plasma", *Neurosci.Lett.*, 265: 211-214

Gennari K, Brunner J, Brodbeck U (**1987**), "Tetrameric detergent-soluble acetylcholinesterase from human caudate nucleus: subunit composition and number of active sites", *Journal of Neurochemistry*, 49: 12-18

George ST, Balasubramanian AS (**1980**), "The identity of the serotonin-sensitive aryl acylamidase with acetylcholinesterase from human erythrocytes, sheep basal ganglia and electric eel", *European Journal of Biochemistry*, 111: 511-524

George ST, Balasubramanian AS (**1981**), "The aryl acylamidase and their relationship to cholinesterase in human serum, erythrocyte and liver", *European Journal of Biochemistry*, 121: 177-186

Getman DK, Eubanks JH, Camp S, Evans GA, Taylor P (**1992**), "The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7", *Am.J.Hum.Genet.*, 51: 170-177

Getman DK, Mutero A, Inoue K, Taylor P (**1995**), "Transcription factor repression and activation of the human acetylcholinesterase gene", *Journal of Biological Chemistry*, 270: 23511-23519

Geula C, Mesulam MM (**1995**), "Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease", *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 9 Suppl 2:23-8.: 23-28

Giacobini E (**1997**), "From molecular structure to Alzheimer therapy", *Japanese J.Pharmacol.*, 74: 225-241

Gibney G, Camp S, Dionne M, MacPhee-Quigley K, Taylor P (**1990**), "Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87: 7546-7550

Gilbert MM, Auld VJ (**2005**), "Evolution of clams (cholinesterase-like adhesion molecules): structure and function during development", *Front Biosci.*, 10:2177-92.: 2177-2192

Gisiger V, Stephens HR (**1988**), "Localization of the pool of G4 acetylcholinesterase characterizing fast muscles and its alteration in murine muscular dystrophy", *Journal of Neuroscience Research*, 19: 62-78

Gisiger V, Vigny M, Gautron J, Rieger F (**1978**), "Acetylcholinesterase of rat sympathetic ganglion: molecular forms, localization and effects of denervation", *Journal of Neurochemistry*, 30: 501-516

Gnatt A, Ginzberg D, Lieman-Hurwitz J, Zamir R, Zakut H, Soreq H (**1991**), "Human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are encoded by two distinct genes", *Cell Mol.Neurobiol.*, 11: 91-104

Gomez JL, Garcia-Ayllon MS, Campoy FJ, Vidal CJ (**2000**), "Muscular dystrophy alters the processing of light acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase forms in liver of Lama2(dy) mice", *Journal of Neuroscience Research*, 62: 134-145

Gomez JL, Moral-Naranjo MT, Campoy FJ, Vidal CJ (**1999**), "Characterization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase forms in normal and dystrophic Lama2dy mouse heart", *Journal of Neuroscience Research*, 56: 295-306

Gomez JL, Nieto-Ceron S, Campoy FJ, Munoz-Delgado E, Vidal CJ (**2003**), "Purification and properties of hydrophilic dimers of acetylcholinesterase from mouse erythrocytes", *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 35: 1109-1118

Gong X, Ye W, Zhou H, Ren X, Li Z, Zhou W, Wu J, Gong Y, Ouyang Q, Zhao X, Zhang X (**2009**), "RanBPM is an acetylcholinesterase-interacting protein that translocates into the nucleus during apoptosis", *Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai).*, 41: 883-891

Gosens R, Zaagsma J, Grootte BM, Nelemans A, Meurs H (**2004**), "Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling?", *Eur.J.Pharmacol.*, 500: 193-201

Gotti C, Clementi F (**2004**), "Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology", *Progress in Neurobiology*, 74: 363-396

Gotti C, Fornasari D, Clementi F (**1997**), "Human neuronal nicotinic receptors", *Progress in Neurobiology*, 53: 199-237

Grassi J, Vigny M, Massoulie J (**1982**), "Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character", *Journal of Neurochemistry*, 38: 457-469

Grauso M, Culetto E, Combes D, Fedon Y, Toutant JP, Arpagaus M (**1998**), "Existence of four acetylcholinesterase genes in the nematodes Caenorhabditis elegans and Caenorhabditis briggsae", *FEBS Lett.*, 424: 279-284

Greenfield S (**1996**), "Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease", *Neurochemistry International*, 28: 485-490

Greenfield SA (**1985**), "The significance of dendritic release of transmitter and protein in the substantia nigra", *Neurochemistry International*, 7: 887-901

Greenfield SA (**1991**), "A noncholinergic action of acetylcholinesterase (AChE) in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement", *Cell Mol.Neurobiol.*, **11**: 55-77

Greenspan RJ, Finn JA, Jr., Hall JC (**1980**), "Acetylcholinesterase mutants in Drosophila and their effects on the structure and function of the central nervous system", *J.Comp Neurol.*, 189: 741-774

Grifman M, Galyam N, Seidman S, Soreq H (**1998**), "Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroligin in mammalian neuritogenesis", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95: 13935-13940

Grisaru D, Deutsch V, Shapira M, Pick M, Sternfeld M, Melamed-Book N, Kaufer D, Galyam N, Gait MJ, Owen D, Lessing JB, Eldor A, Soreq H (**2001**), "ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities", *Mol.Med.*, 7: 93-105

Grisaru D, Lev-Lehman E, Shapira M, Chaikin E, Lessing JB, Eldor A, Eckstein F, Soreq H (**1999a**), "Human osteogenesis involves differentiation-dependent increases in the morphogenically active 3" alternative splicing variant of acetylcholinesterase", *Mol.Cell Biol.*, 19: 788-795

Grisaru D, Pick M, Perry C, Sklan EH, Almog R, Goldberg I, Naparstek E, Lessing JB, Soreq H, Deutsch V (**2006**), "Hydrolytic and nonenzymatic functions of acetylcholinesterase comodulate hemopoietic stress responses", *J.Immunology*, 176: 27-35

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H (**1999b**), "Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology", *European Journal of Biochemistry*, 264: 672-686

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H (**1999c**), "Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology.", *European Journal of Biochemistry*, 264: 672-686

Gu SZ, Zhao XH, Quan P, Li SB, Pan BR (**2005**), "Alterations of serum cholinesterase in patients with gastric cancer", *World J.Gastroenterol.*, 11: 4604-4606

Guo J, Ibaragi S, Zhu T, Luo LY, Hu GF, Huppi PS, Chen CY (**2008**), "Nicotine promotes mammary tumor migration via a signaling cascade involving protein kinase C and CDC42", *Cancer Res.*, 68: 8473-8481

Guraya SS, Sharma J, Dhanju CK (**1995**), "Correlative histochemical and biochemical studies on acetylcholinesterase activity during ovulation in the rat", *Eur.J.Morphol.*, 33: 31-38

Hada T, Yamamoto T, Imanishi H, Takahashi S, Amuro Y, Higashino K, Sato J (**1987**), "Novel cholinesterase expression in the HuH-7 cell line", *Tumour.Biol.*, 8: 3-8

Hahn WC, Weinberg RA (**2002**), "Modelling the molecular circuitry of cancer", *Nat.Rev.Cancer.*, 2: 331-341

Hall LM, Spierer P (**1986**), "The Ace locus of Drosophila melanogaster: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader", *EMBO J.*, 5: 2949-2954

Hall ZW, Kelly RB (**1971**), "Enzymatic detachment of endplate acetylcholinesterase from muscle", *Nat.New Biol.*, 232: 62-63

Harel M, Kryger G, Rosenberry TL, Mallender WD, Lewis T, Fletcher RJ, Guss JM, Silman I, Sussman JL (**2000**), "Three-dimensional structures of Drosophila melanogaster acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors", *Protein Science*, 9: 1063-1072

Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulie J, Silman I (**1992**), "Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89: 10827-10831

Hartl R, Gleinich A, Zimmermann M (**2011**), "Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress", *Journal of Neurochemistry*, 116: 1088-1096

Hasinoff BB (**1982**), "Kinetics of acetylthiocholine binding to electric eel acetylcholinesterase in glycerol/water solvents of increased viscosity. Evidence for a diffusion-controlled reaction", *Biochim.Biophys.Acta.*, 704: 52-58

Hecht SS (**2006**), "Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms", *Langenbecks* Arch.Surg., 391: 603-613

Hirata N, Sekino Y, Kanda Y (**2010**), "Nicotine increases cancer stem cell population in MCF-7 cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 403: 138-143

Hoo AF, Henschen M, Dezateux C, Costeloe K, Stocks J (**1998**), "Respiratory function among preterm infants whose mothers smoked during pregnancy", *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 158: 700-705

Improgo MR, Tapper AR, Gardner PD (**2011**), "Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer", *Biochemical Pharmacology*,

Inestrosa NC, Alarcon R (**1998**), "Molecular interactions of acetylcholinesterase with senile plaques", *J.Physiol Paris.*, 92: 341-344

Inestrosa NC, Dinamarca MC, Alvarez A (**2008**), "Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease", *FEBS J.*, 275: 625-632

Inestrosa NC, Fuentes ME, Anglister L, Futerman AH, Silman I (**1988**), "A membrane-associated dimer of acetylcholinesterase from Xenopus skeletal muscle is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *Neurosci.Lett.*, %19;90: 186-190

Inestrosa NC, Perelman A (**1990**), "Association of acetylcholinesterase with the cell surface", *J.Membr.Biol.*, 118: 1-9

Inestrosa NC, Roberts WL, Marshall TL, Rosenberry TL (**1987**), "Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues", *Journal of Biological Chemistry*, 262: 4441-4444

Inestrosa NC, Sagal JP, Colombres M (**2005**), "Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta", *Subcell.Biochem.*, 38:299-317: 299-317

Ismael Z, Millar TJ, Small DH, Chubb IW (**1986**), "Acetylcholinesterase generates enkephalin-like immunoreactivity when it degrades the soluble proteins (chromogranins) from adrenal chromaffin granules", *Brain Res.*, 376: 230-238

Jaretzki A, III, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keesey JC, Penn AS, Sanders DB (**2000**), "Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America", *Neurology.*, 55: 16-23

Jiang H, Zhang XJ (**2008**), "Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme", *FEBS J.*, 275: 612-617

Jin QH, He HY, Shi YF, Lu H, Zhang XJ (**2004**), "Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells", *Acta Pharmacol.Sin.*, 25: 1013-1021

Johnson CD, Russell RL (**1975**), "A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations", *Analytical Biochemistry*, 64: 229-238

Johnson G, Moore SW (**1999**), "The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, %19;258: 758-762

Johnson G, Moore SW (**2000a**), "Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro", *Int.J.Dev.Neurosci.*, 18: 781-790

Johnson G, Moore SW (**2000b**), "Localization of a novel adhesion-promoting site on acetylcholinesterase using catalytic antiacetylcholinesterase antibodies displaying cholinesterase-like activity", *Appl.Biochem.Biotechnol.*, 83: 131-144

Johnson G, Moore SW (**2006**), "The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design", *Curr.Pharm.Des.*, 12: 217-225

Johnson G, Moore SW (**2007**), "Acetylcholinesterase readthrough peptide shares sequence similarity to the 28-53 peptide sequence of the acetylcholinesterase adhesion-mediating site and competes for ligand binding in vitro", *J.Mol.Neurosci.*, 31: 113-126

Jull BA, Plummer HK, III, Schuller HM (**2001**), "Nicotinic receptor-mediated activation by the tobacco-specific nitrosamine NNK of a Raf-1/MAP kinase pathway, resulting in phosphorylation of c-myc in human small cell lung carcinoma cells and pulmonary neuroendocrine cells", *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 127: 707-717

Karnovsky ML, Roots I (**1964**), "A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases", *J.Histochem.Cytochem.*, 12:219-21.: 219-221

Karpel R, Aziz-Aloya R, Sternfeld M, Ehrlich G, Ginzberg D, Tarroni P, Clementi F, Zakut H, Soreq H (**1994**), "Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins", *Experimental Cell Research*, 210: 268-277

Karpel R, Sternfeld M, Ginzberg D, Guhl E, Graessmann A, Soreq H (**1996**), "Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells", *Journal of Neurochemistry*, 66: 114-123

Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H (**1998**), "Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression", *Nature.*, 393: 373-377

Kawashima K, Fujii T (**2008**), "Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance", *J.Pharmacol.Sci.*, 106: 167-173

Kawashima K, Takeshi F (**2000**), "Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes", *Pharmacol.Ther.*, 86: 29-48

Keesey J, Naiem F, Lindstrom J, Roe D, Herrmann C, Jr., Walford R (**1982**), "Acetylcholine receptor antibody titer and HLA-B8 antigen in myasthenia gravis", *Archives of Neurology*, 39: 73-77

Keesey JC (2004), "A history of treatments for myasthenia gravis", Semin.Neurol., 24: 5-16

Khan N, Afaq F, Mukhtar H (**2010**), "Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies", *Cancer Letters*, 293: 133-143

Khuder SA (**2001**), "Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a metaanalysis", *Lung Cancer.*, 31: 139-148

Kim YS, Yoo HS, Ko JH (**2009**), "Implication of aberrant glycosylation in cancer and use of lectin for cancer biomarker discovery", *Protein Pept.Lett.*, 16: 499-507
Kimbell LM, Ohno K, Engel AG, Rotundo RL (**2004**), "C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse", *Journal of Biological Chemistry*, %19;279: 10997-11005

Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I (**1997**), "Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthezised by surface cells of rat and man", *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 355: 515-523

Klegeris A, Budd TC, Greenfield SA (**1994**), "Acetylcholinesterase activation of peritoneal macrophages is independent of catalytic activity", *Cell Mol.Neurobiol.*, 14: 89-98

Knudson AG (2002), "Cancer genetics", Am.J.Med.Genet., 111: 96-102

Koelle GB, Rickard KK, Smyrl EG (**1979**), "Steady state and regenerating levels of acetylcholinesterase in the superior cervical ganglion of the rat following selective inactivation of propionylcholinesterase", *Journal of Neurochemistry*, 33: 1159-1164

Koelle GB, Ruch GA (**1983**), "Demonstration of a neurotrophic factor for the maintenance of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the preganglionically denervated superior cervical ganglion of the cat", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80: 3106-3110

Koelle GB, Ruch GA, Rickard KK, Sanville UJ (**1982**), "Regeneration of cholinesterases in the stellate and normal and denervated superior cervical ganglion of the cat following inactivation by sarin", *Journal of Neurochemistry*, 38: 1695-1698

Koelle WA, Koelle GB, Smyrl EG (**1976**), "Effects of persistent selective suppression of ganglionic butyrylcholinesterase on steady state and regenerating levels of acetylcholinesterase: implications regarding function of butyrylcholinesterase and regulation of protein synthesis", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 73: 2936-2938

Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LA, Eheman C, Jemal A, Anderson RN, Ajani UA, Edwards BK (**2011**), "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system", *J.Natl Cancer Inst.*, 103: 714-736

Krejci E, Duval N, Chatonnet A, Vincens P, Massoulie J (**1991**), "Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88: 6647-6651

Kristt DA, Kasper EK (**1983**), "High density of cholinergic muscarinic receptors accompanies high intensity acetylcholinesterase-staining in layer IV of infant rat somatosensory cortex", *Brain Res.*, 284: 373-376

Kronman C, Ordentlich A, Barak D, Velan B, Shafferman A (**1994**), "The "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis", *Journal of Biological Chemistry*, 269: 27819-27822

Kummer W, Lips KS, Pfeil U (**2008**), "The epithelial cholinergic system of the airways", *Histochem.Cell Biol.*, 130: 219-234

La Du BN (**1989**), "Identification of human serum cholinesterase variants using the polymerase chain reaction amplification technique.", *Trends Pharmacol.Sci.*, 10: 309-313

La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Arpagaus M, Lockridge O (**1991**), "Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing", *Cell Mol.Neurobiol.*, 11: 79-89

La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, Bertuccio P, Negri E, Boyle P, Levi F (**2010**), "Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975", *Ann.Oncol.*, 21: 1323-1360

Laag E, Majidi M, Cekanova M, Masi T, Takahashi T, Schuller HM (**2006**), "NNK activates ERK1/2 and CREB/ATF-1 via beta-1-AR and EGFR signaling in human lung adenocarcinoma and small airway epithelial cells", *Int.J.Cancer.*, 119: 1547-1552

Laemmli UK (**1970**), " Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-685

Lapidot-Lifson Y, Patinkin D, Prody CA, Ehrlich G, Seidman S, Ben Aziz R, Benseler F, Eckstein F, Zakut H , Soreq H (**1992**), "Cloning and antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a human homolog of cdc2 required in hematopoiesis", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89: 579-583

Lapidot-Lifson Y, Prody CA, Ginzberg D, Meytes D, Zakut H, Soreq H (**1989a**), "Co-amplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 86: 4715-4719

Lapidot-Lifson Y, Prody CA, Ginzberg D, Meytes D, Zakut H, Soreq H (**1989b**), "Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86: 4715-4719

Layer PG (**1983**), "Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chicken brain", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80: 6413-6417

Layer PG (**1995**), "Nonclassical roles of cholinesterases in the embryonic brain and possible links to Alzheimer disease", *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 9 Suppl 2:29-36.: 29-36

Layer PG (**1996**), "Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease", *Neurochemistry International*, 28: 491-495

Layer PG, Allebrandt K, Andermann P, Bodur E, Boopathy R, Bytyqi AH, Paraoanu LE (**2005**), "On the multifunctionality of cholinesterases", *Chemico-Biological Interactions*, 157-158:37-41. Epub;%2005 Oct 24.: 37-41

Layer P.G., Weikert T, Willbold E. (**1992**). "Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity.". 268, 409-418.

Layer PG, Willbold E (**1995**), "Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease", *Progress in Histochemistry and Biochemistry*, 29: 1-94

Lazar M, Salmeron E, Vigny M, Massoulie J (**1984**), "Heavy isotope-labeling study of the metabolism of monomeric and tetrameric acetylcholinesterase forms in the murine neuronal-like T 28 hybrid cell line", *Journal of Biological Chemistry*, 259: 3703-3713

Legay C, Bon S, Vernier P, Coussen F, Massoulie J (**1993**), "Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementarity with a Torpedo collagenic subunit", *Journal of Neurochemistry*, 60: 337-346

Leibel WS (**1988a**), "Antisera probes to an atypical pseudocholinesterase from surgeonfish reveal immunochemical variability and tissue-specific molecular polymorphism", *J.Exp.Zool.*, 247 : 209-233

Leibel WS (**1988b**), " Characterization of a pseudocholinesterase purified from surgeonfish tissues confirms the atypical nature of this enzyme", *J.Exp.Zool.*, 247: 198-208

Lev-Lehman E, Deutsch V, Eldor A, Soreq H (**1997**), "Immature human megakaryocytes produce nuclear-associated acetylcholinesterase", *Blood.*, 89: 3644-3653

Lev-Lehman E, Ginzberg D, Hornreich G, Ehrlich G, Meshorer A, Eckstein F, Soreq H, Zakut H (**1994**), "Antisense inhibition of acetylcholinesterase gene expression causes transient hematopoietic alterations in vivo", *Gene Ther.*, 1: 127-135

Lewis WG, Green LG, Grynszpan F, Radic Z, Carlier PR, Taylor P, Finn MG, Sharpless KB (**2002**), "Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks", *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, 41: 1053-1057

Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O (**2000**), "Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse", *Journal of Neurochemistry*, 75: 1320-1331

Li WF, Furlong CE, Costa LG (**1995**), "Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice", *Toxicol.Lett.*, 76: 219-226

Li Y, Camp S, Rachinsky TL, Getman D, Taylor P (**1991**), "Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression", *Journal of Biological Chemistry*, 266: 23083-23090

Liang D, Blouet JP, Borrega F, Bon S, Massoulie J (**2009**), "Respective roles of the catalytic domains and C-terminal tail peptides in the oligomerization and secretory trafficking of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase", *FEBS J.*, 276: 94-108

Liao J, Boschetti N, Mortensen V, Jensen SP, Koch C, Norgaard-Pedersen B, Brodbeck U (**1994**), "Characterization of salt-soluble forms of acetylcholinesterase from bovine brain", *Journal of Neurochemistry*, 63: 1446-1453

Lindstrom J (**1997**), "Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease", *Mol.Neurobiol.*, 15: 193-222

Lockridge O (**1982**), "Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase", *Journal of Neurochemistry*, 39: 106-110

Lockridge O (**1990**), "Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine", *Pharmac.Ther.*, 47: 35-60

Lockridge O (**1991**), "Structure of human butyrylcholinesterase gene and expression in mammalian cells", en *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*, American Chemical Society, Washintong D.C. p 168-171

Lockridge O, Bartels CF, Nogueira CP, Arpagaus M, Adkins S, LaDu BN (**1991**), "Nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing", en *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*, American Chemical Society, Washington p 193

Lockridge O, Blong RM, Masson P, Froment MT, Millard CB, Broomfield CA (**1997**), "A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase", *Biochemistry.*, 36: 786-795

Lockridge O, Masson P (**2000**), "Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk", *Neurotoxicology.*, 21: 113-126

Lockridge O, Mottershaw-Jackson N, Eckerson HW, La Du BN (**1980**), "Hydrolysis of diacetylmorphine (Heroin) by serum cholinesterase", *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 215: 1-8

Loewenstein-Lichtenstein Y, Glick D, Gluzman N, Sternfeld M, Zakut H, Soreq H (**1996**), "Overlapping drug interaction sites of human butyrylcholinesterase dissected by site-directed mutagenesis", *Mol.Pharmacol.*, 50: 1423-1431 Loewi O, Navratil E (**1926**), "Über humorale ubertragbarkeit der herznervenwirkung. XI. Über den mechanismus der vaguswirkung von physostigmin und ergotamin", *Pflüger.Arch.Ges.Physiol.*, 214: 689-696

Low MG, Finean JB (**1977**), "Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *FEBS Lett.*, 82: 143-146

Lwebuga-Mukasa JS, Lappi S, Taylor P (**1976**), "Molecular forms of acetylcholinesterase from Torpedo californica: their relationship to synaptic membranes", *Biochemistry.*, 15: 1425-1434

Lynch TJ, Mattes CE, Singh A, Bradley RM, Brady RO, Dretchen KL (**1997**), "Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase", *Toxicology and applied Pharmacology.*, 145: 363-371

Mack A, Robitzki A (**2000**), "The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study", *Progress in Neurobiology*, 60: 607-628

MacPhee-Quigley K, Taylor P, Taylor S (**1985**), "Primary structures of the catalytic subunits from two molecular forms of acetylcholinesterase. A comparison of NH2-terminal and active center sequences ", *Journal of Biological Chemistry*, 260: 12185-12189

Madhavan S, Sarath G, Lee BH, Pegden RS (**1995**), "Guard cell protoplasts contain acetylcholinesterase activity", *Plant Science*, 109: 119-127

Main AR (1979), "Mode of action of anticholinesterases", Pharmac. Ther., 6: 579-628

Manavalan P, Taylor P, Johnson WC, Jr. (**1985**), "Circular dichroism studies of acetylcholinesterase conformation. Comparison of the 11 S and 5.6 S species and the differences induced by inhibitory ligands", *Biochim.Biophys.Acta.*, 829: 365-370

Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK (**1997**), "Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers", *J.Natl.Cancer Inst.*, 89: 857-862

Marchot P, Ravelli RB, Raves ML, Bourne Y, Vellom DC, Kanter J, Camp S, Sussman JL, Taylor P (**1996a**), "Soluble monomeric acetylcholinesterase from mouse: expression, purification, and crystallization in complex with fasciculin", *Protein Science*, 5: 672-679

Marchot P, Ravelli RBG, Raves M, Bourne Y, Vellom DC, Kanter J, Camp S, Sussman JL, Taylor P (**1996b**), "Soluble monomeric acetylcholinesterase from mouse: expression, purification, and crystallization in complex with fasciculin", *Protein Science*, 5: 672-679

Marnay A, Nachmansohn D (**1937**), "Cholinesterase in voluntary frog's muscle", *J.Physiol.*, 89: 359-367

Marnay A, Nachmansohn D (1938), "Choline esterase in voluntary muscle", J.Physiol., 92: 37-47

Marquis JK, Fishman EB (**1985**), "Presynaptic acetylcholinesterase.", *Trends Pharmacol.Sci.*, 6: 387-388

Martin-Valmaseda EM, Sanchez-Yague J, Cabezas JA, Llanillo M (**1995**), "Biochemical characterization of sheep platelet acetylcholinesterase after detergent solubilization", *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.*, 110: 91-101

Martin RG, Ames BN (**1961**), "A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes. Applications to protein mixtures", *Journal of Biological Chemistry*, 236: 1372-1379

Martinez-Garcia E, Irigoyen M, Gonzalez-Moreno O, Corrales L, Teijeira A, Salvo E, Rouzaut A (**2010**), "Repetitive nicotine exposure leads to a more malignant and metastasis-prone phenotype of SCLC: a molecular insight into the importance of quitting smoking during treatment", *Toxicol.Sci.*, 116: 467-476

Martinez-Lopez dC, Nieto-Ceron S, Aurelio PC, Galbis-Martinez L, Latour-Perez J, Torres-Lanzas J, Tovar-Zapata I, Martinez-Hernandez P, Rodriguez-Lopez JN, Cabezas-Herrera J (**2008**), "Cancerassociated differences in acetylcholinesterase activity in bronchial aspirates from patients with lung cancer", *Clin.Sci.(Lond).*, 115: 245-253

Mash DC, Flynn DD, Potter LT (**1985**), "Loss of M2 muscarinic receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation", *Science*, 228: 1115-1117

Massion PP, Kuo WL, Stokoe D, Olshen AB, Treseler PA, Chin K, Chen C, Polikoff D, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG, Jablons DM, Gray JW (**2002**), "Genomic copy number analysis of non-small cell lung cancer using array comparative genomic hybridization: implications of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway", *Cancer Res.*, 62: 3636-3640

Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton ME, Westfall MD, Roberts JR, Pietenpol JA, Carbone DP, Gonzalez AL (**2003**), "Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis", *Cancer Res.*, 63 : 7113-7121

Masson P (**1991**), "Structural and functional investigations of ChE* by means of affinity electrophoresis.", *Cellular and Molecular Neurobiology*, 11: 173-189

Masson P, Froment MT, Fortier PL, Visicchio JE, Bartels CF, Lockridge O (**1998**), "Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters", *Biochim.Biophys.Acta.*, 1387: 41-52

Massoulie J (**2002**), "The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases", *Neurosignals.*, 11: 130-143

Massoulie J, Bon S, Perrier N, Falasca C (**2005**), "The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring", *Chemico-Biological Interactions*, 157-158:3-14. Epub;%2005 Oct 28.: 3-14

Massoulie J, Sussman J, Bon S, Silman I (**1993**), "Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase", *Prog.Brain Res.*, 98:139-46.: 139-146

Massoulié J, Bon S (**1982**), "The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates.", *Annu.Rev.Neurosci.*, 5: 57-106

Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM (**1993**), "Molecular and cellular biology of cholinesterases", *Progress in Neurobiology*, 41: 31-91

Matsumura-Takeda K, Sogo S, Isakari Y, Harada Y, Nishioka K, Kawakami T, Ono T, Taki T (**2007**), "CD41+/CD45+ cells without acetylcholinesterase activity are immature and a major megakaryocytic population in murine bone marrow", *Stem Cells.*, 25: 862-870

Mattes CE, Lynch TJ, Singh A, Bradley RM, Kellaris PA, Brady RO, Dretchen KL (**1997**), "Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication", *Toxicology and applied Pharmacology.*, 145: 372-380

McMahan UJ, Sanes JR, Marshall LM (**1978**), "Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction", *Nature.*, 271: 172-174

Meshorer E, Erb C, Gazit R, Pavlovsky L, Kaufer D, Friedman A, Glick D, Ben Arie N, Soreq H (**2002**), "Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity", *Science.*, 295: 508-512

Meshorer E, Soreq H (**2006**), "Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies", *Trends Neurosci.*, 29: 216-224

Meshorer E, Toiber D, Zurel D, Sahly I, Dori A, Cagnano E, Schreiber L, Grisaru D, Tronche F, Soreq H (**2004**), "Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products", *Journal of Biological Chemistry*, 279: 29740-29751

Mikami LR, Wieseler S, Souza RL, Schopfer LM, Nachon F, Lockridge O, Chautard-Freire-Maia EA (**2008**), "Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population", *Pharmacogenet.Genomics.*, 18: 213-218

Momonoki YS (**1997**), "Asymmetric distribution of acetylcholinesterase in gravistimulated maize seedlings", *Plant Physiology*, 114: 47-53

Momonoki YS, Hineno C, Noguchi K (**1998**), "Acetylcholine as a signaling system to environmental stimuli in plants. III. Asymmetric solute distribution controlled by ACh in gravistimulated maize seedlings", *Plant Prod.Sci.*, 1: 83-88

Montenegro MF (**2006**), "Acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en el intestino grueso humano. Cambios en sus actividades, propiedades moleculares y cantidad de ARN mensajeros en carcinomas de colon.", *Tesis Doctoral: Universidad de Murcia, Murcia,*

Montenegro MF, Maria TM, de la Cadena MP, Campoy FJ, Munoz-Delgado E, Vidal CJ (**2008a**), "Human butyrylcholinesterase components differ in aryl acylamidase activity", *Biol.Chem.*, 389: 425-432

Montenegro MF, Moral-Naranjo MT, Paez dlC, Campoy FJ, Munoz-Delgado E, Vidal CJ (**2008b**), "The level of aryl acylamidase activity displayed by human butyrylcholinesterase depends on its molecular distribution", *Chemico-Biological Interactions*, 175: 336-339

Montenegro MF, Nieto-Ceron S, Ruiz-Espejo F, Paez dlC, Rodriguez-Berrocal FJ, Vidal CJ (**2005**), "Cholinesterase activity and enzyme components in healthy and cancerous human colorectal sections", *Chemico-Biological Interactions*, 157-158:429-30.: 429-430

Montenegro MF, Ruiz-Espejo F, Campoy FJ, Munoz-Delgado E, de la Cadena MP, Cabezas-Herrera J, Vidal CJ (**2006a**), "Acetyl- and butyrylcholinesterase activities decrease in human colon adenocarcinoma", *J.Mol.Neurosci.*, 30: 51-54

Montenegro MF, Ruiz-Espejo F, Campoy FJ, Munoz-Delgado E, de la Cadena MP, Rodriguez-Berrocal FJ, Vidal CJ (**2006b**), "Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma", *Cell Mol.Life Sci.*, 63: 2175-2182

Mor I, Grisaru D, Titelbaum L, Evron T, Richler C, Wahrman J, Sternfeld M, Yogev L, Meiri N, Seidman S, Soreq H (**2001**), "Modified testicular expression of stress-associated "readthrough" acetylcholinesterase predicts male infertility", *FASEB J.*, 15: 2039-2041

Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Campoy FJ, Vidal CJ (**1997a**), "Differential glycosylation of asymmetric acetylcholinesterase forms in external and internal muscle membranes", *Biochem.Soc.Trans.*, 25: 441S

Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Campoy FJ, Vidal CJ (**1997b**), "Glycosylation of cholinesterase forms in brain from normal and dystrophic Lama2dy mice", *Neurosci.Lett.*, 226: 45-48

Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Vidal CJ (**1996**), "Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse brain", *Journal of Neuroscience Research*, 43: 224-234

Moral-Naranjo MT, Campoy FJ, Cabezas-Herrera J, Vidal CJ (**1999**), "Increased butyrylcholinesterase levels in microsomal membranes of dystrophic Lama2dy mouse muscle", *Journal of Neurochemistry*, 73: 1138-1144

Moral-Naranjo MT, Montenegro MF, Munoz-Delgado E, Campoy FJ, Vidal CJ (**2010**), "The levels of both lipid rafts and raft-located acetylcholinesterase dimers increase in muscle of mice with muscular dystrophy by merosin deficiency", *Biochim.Biophys.Acta.*, 1802: 754-764

Morel N, Bon S, Greenblatt HM, Van Belle D, Wodak SJ, Sussman JL, Massoulie J, Silman I (**1999**), "Effect of mutations within the peripheral anionic site on the stability of acetylcholinesterase", *Mol.Pharmacol.*, 55: 982-992

Morel N, Leroy J, Ayon A, Massoulie J, Bon S (**2001**), "Acetylcholinesterase H and T dimers are associated through the same contact. Mutations at this interface interfere with the C-terminal T peptide, inducing degradation rather than secretion", *Journal of Biological Chemistry*, 276: 37379-37389

Morera Ocon FJ, Ripoll OF, Garcia-Granero XM, Pastor MJ, Bernal Sprekelsen JC (**2007**), "[Decrease of serum cholinesterase in colorectal cancer]", *Med.Clin.(Barc.).*, 129: 729-730

Motamed-Khorasani A, Jurisica I, Letarte M, Shaw PA, Parkes RK, Zhang X, Evangelou A, Rosen B, Murphy KJ, Brown TJ (**2007**), " Differentially androgen-modulated genes in ovarian epithelial cells from BRCA mutation carriers and control patients predict ovarian cancer survival and disease progression", *Oncogene.*, 26: 198-214

Moya-Quiles MR, Villalba-Sanchez J , Munoz-Delgado E, Vidal CJ (**1992**), "Alkaline treatment of muscle microsomes releases amphiphilic and hydrophilic forms of acetylcholinesterase", *Biochim.Biophys.Acta.*, 1121: 88-96

Munoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Kovacs G, Vidal CJ (**2010**), "Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types", *FEBS J.*, 277: 4519-4529

Munoz-Delgado E, Montenegro MF, Morote-Garcia JC, Campoy FJ, Cabezas-Herrera J, Kovacs G, Vidal CJ (**2008**), "The expression of cholinesterases in human renal tumours varies according to their histological types", *Chemico-Biological Interactions*, 175: 340-342

Munoz FJ, Aldunate R, Inestrosa NC (**1999**), "Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase", *Neuroreport.*, 10: 3621-3625

Muñoz FJ, Aldunate R, Inestrosa NC (**1999**), "Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase", *Neuroreport*, 10: 3621-3625

Nachon F, Nicolet Y, Viguie N, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Lockridge O (**2002**), "Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization", *European Journal of Biochemistry*, 269: 630-637

Ng V, Koh D, Wee A, Chia SE (**2009**), "Salivary acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposure", *Occup.Med.(Lond).*, 59: 120-122

Nieto-Ceron S, del Campo LF, Delgado EM, Vidal CJ, Campoy FJ (**2006**), "Thymus acetylcholinesterase activity is reduced in mice with congenital muscular dystrophy", *J.Mol.Neurosci.*, 30: 49-50

Nieto-Ceron S, del Campo LF, Munoz-Delgado E, Vidal CJ, Campoy FJ (**2005**), "Muscular dystrophy by merosin deficiency decreases acetylcholinesterase activity in thymus of Lama2dy mice", *Journal of Neurochemistry*, 95: 1035-1046

Nieto-Ceron S, Moral-Naranjo MT, Munoz-Delgado E, Vidal CJ, Campoy FJ (**2004**), "Molecular properties of acetylcholinesterase in mouse spleen", *Neurochemistry International*, 45: 129-139

Nieto-Ceron S, Vargas-Lopez H, Perez-Albacete M, Tovar-Zapata I, Martinez-Hernandez P, Rodriguez-Lopez JN, Cabezas-Herrera J (**2010**), "Analysis of cholinesterases in human prostate and sperm Implications in cancer and fertility", *Chemico-Biological Interactions*,

Nijholt I, Farchi N, Kye M, Sklan EH, Shoham S, Verbeure B, Owen D, Hochner B, Spiess J, Soreq H, Blank T (**2004**), "Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation", *Mol.Psychiatry.*, 9: 174-183

Oenema TA, Kolahian S, Nanninga JE, Rieks D, Hiemstra PS, Zuyderduyn S, Halayko AJ, Meurs H, Gosens R (**2010**), "Pro-inflammatory mechanisms of muscarinic receptor stimulation in airway smooth muscle", *Respir.Res.*, 11:130.: 130

Ohno K, Engel AG, Brengman JM, Shen XM, Heidenreich F, Vincent A, Milone M , Tan E, Demirci M, Walsh P, Nakano S, Akiguchi I (**2000**), "The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency", *Ann.Neurol.*, 47: 162-170

Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, . (**1992**), "The alpha/beta hydrolase fold", *Protein Engineering*, 5: 197-211

Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Segall Y, Ariel N, Cohen S, Velan B, Shafferman A (**1993**), "Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket", *Journal of Biological Chemistry*, 268: 17083-17095

Padilla S, Wilson VZ, Nostrandt AC (**1995**), "A novel method that markedly increases the sensitivity of the erythrocyte acetylcholinesterase assay, suitable for use in pesticide-treated rats", *Toxicology Methods*, 5: 41-49

Paleari L, Negri E, Catassi A, Cilli M, Servent D, D'Angelillo R, Cesario A, Russo P, Fini M (**2009**), "Inhibition of nonneuronal alpha7-nicotinic receptor for lung cancer treatment", *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 179: 1141-1150

Paoletti F, Mocali A, Vannucchi AM (**1992**), "Acetylcholinesterase in murine erythroleukemia (Friend) cells: evidence for megakaryocyte-like expression and potential growth-regulatory role of enzyme activity", *Blood.*, 79: 2873-2879

Paraoanu LE, Layer PG (**2008**), "Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation", *FEBS J.*, 275: 618-624

Paraoanu LE, Steinert G, Klaczinski J, Becker-Rock M, Bytyqi A, Layer PG (**2006**), "On functions of cholinesterases during embryonic development", *J.Mol.Neurosci.*, 30: 201-204

Park SE, Jeong SH, Yee SB, Kim TH, Soung YH, Ha NC, Kim ND, Park JY, Bae HR, Park BS, Lee HJ, Yoo YH (**2008**), "Interactions of acetylcholinesterase with caveolin-1 and subsequently with cytochrome c are required for apoptosome formation", *Carcinogenesis.*, 29: 729-737

Park SE, Kim ND, Yoo YH (**2004**), "Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation", *Cancer Res.*, 64: 2652-2655

Parmo-Folloni F, Nunes K, Lepienski LM, Mikami LR, Souza RL, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Chautard-Freire-Maia EA (**2008**), "Two new mutations of the human BCHE gene (IVS3-14T>C and L574fsX576)", *Chemico-Biological Interactions*, 175: 135-137

Patinkin D, Seidman S, Eckstein F, Benseler F, Zakut H, Soreq H (**1990**), "Manipulations of cholinesterase gene expression modulate murine megakaryocytopoiesis in vitro", *Mol.Cell Biol.*, 10: 6046-6050

Pauk N, Kubik A, Zatloukal P, Krepela E (2005), "Lung cancer in women", Lung Cancer., 48: 1-9

Pepeu G, Giovannini MG (**2009**), "Cholinesterase inhibitors and beyond", *Curr.Alzheimer Res.*, 6: 86-96

Perez-Guillermo F, Delgado EM, Vidal CJ (**1987a**), "Inhibition of human serum and rabbit muscle cholinesterase by local anesthetics", *Biochemical Pharmacology*, 36: 3593-3596

Perez-Guillermo F, Garcia-Carmona F, Garcia-Canovas F, Vidal CJ (**1987b**), "Influence of NaCl on the kinetic behaviour of mammalian muscle acetylcholinesterase", *Biochem.Int.*, 14: 385-394

Perez MJ, Rodriguez LA, Fernandez-Briera A, Nieto TP (**2002**), "A 45-kDa acetylcholinesterase protoxin of Aeromonas hydrophila: purification and immunogenicity in fish", *FEMS Microbiol.Lett.*, 211: 23-27

Perrier AL, Massoulie J, Krejci E (**2002**), "PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain", *Neuron.*, 33: 275-285

Perrier NA, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G, Massoulie J (**2005**), "The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo", *Journal of Neurochemistry*, 94: 629-638

Perry C, Pick M, Podoly E, Gilboa-Geffen A, Zimmerman G, Sklan EH, Ben Shaul Y, Diamant S, Soreq H (**2007**), "Acetylcholinesterase/C terminal binding protein interactions modify Ikaros functions, causing T lymphopenia", *Leukemia.*, 21: 1472-1480

Perry C, Sklan EH, Birikh K, Shapira M, Trejo L, Eldor A, Soreq H (**2002**), "Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors", *Oncogene.*, 21: 8428-8441

Perry C, Soreq H (2004), "Organophosphate risk of leukemogenesis", Leuk.Res., 28: 905-906

Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J (**1975**), "Cancer and ageing in mice and men", *Br.J.Cancer.*, 32: 411-426

Pettersson A, Nilsson L, Nylund G, Khorram-Manesh A, Nordgren S, Delbro DS (**2009**), "Is acetylcholine an autocrine/paracrine growth factor via the nicotinic alpha7-receptor subtype in the human colon cancer cell line HT-29?", *Eur.J.Pharmacol.*, 609: 27-33

Pezzementi L, Chatonnet A (**2010**), "Evolution of cholinesterases in the animal kingdom", *Chemico-Biological Interactions*,

Pezzementi L, Reinheimer EJ, Pezzementi ML (**1987**), "Acetylcholinesterase from the skeletal muscle of the lamprey Petromyzon marinus exists in globular and asymmetric forms", *Journal of Neurochemistry*, 48: 1753-1760

Pieper MP, Chaudhary NI, Park JE (**2007**), "Acetylcholine-induced proliferation of fibroblasts and myofibroblasts in vitro is inhibited by tiotropium bromide", *Life Sciences*, 80: 2270-2273

Plageman LR, Pauletti GM, Skau KA (**2002**), "Characterization of acetylcholinesterase in Caco-2 cells", *Exp.Biol.Med.(Maywood.).*, 227: 480-486

Primo-Parma SL, Bartels CF, Lightstone H, Van Der Spek AFL, La Du BN (**1992**), "Heterogeneity of the silent phenotype of human butyrylcholinesterase. Identification of eight mutations", en *Multidisciplinay Approaches to Cholinesterase Functions*, Plenum Press, New York p 61-64

Proctor RN (**2004**), "The global smoking epidemic: a history and status report", *Clin.Lung Cancer.*, 5: 371-376

Proskocil BJ, Sekhon HS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J, Spindel ER (**2004**), "Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells", *Endocrinology.*, 145: 2498-2506

Punga AR, Stalberg E (**2009**), "Acetylcholinesterase inhibitors in MG: to be or not to be?", *Muscle Nerve.*, 39: 724-728

Quinn DM (**1987**), "Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states", *Chemical Reviews*, 87: 955-979

Rachinsky TL, Camp S, Li Y, Ekstrom TJ, Newton M, Taylor P (**1990**), "Molecular cloning of mouse acetylcholinesterase: tissue distribution of alternatively spliced mRNA species", *Neuron.*, 5: 317-327

Racke K, Juergens UR, Matthiesen S (**2006**), "Control by cholinergic mechanisms", *Eur.J.Pharmacol.*, 533: 57-68

Racke K, Matthiesen S (**2004**), "The airway cholinergic system: physiology and pharmacology", *Pulm.Pharmacol.Ther.*, 17: 181-198

Rama Sastry BV (**1997**), "Human placental cholinergic system", *Biochemical Pharmacology*, 53: 1557-1586

Randall WR, Rimer M, Gough NR (**1994**), "Cloning and analysis of chicken acetylcholinesterase transcripts from muscle and brain", *Biochim.Biophys.Acta.*, 1218: 453-456

Rao N, Whitsett CF, Oxendine SM, Telen MJ (**1993**), "Human erythrocyte acetylcholinesterase bears the Yta blood group antigen and is reduced or absent in the Yt(a-b-) phenotype ", *Blood.*, 81: 815-819

Razon N, Soreq H, Roth E, Bartal A, Silman I (**1984**), "Characterization of activities and forms of cholinesterases in human primary brain tumors", *Exp.Neurol.*, 84: 681-695

Reddy MS, Jayaprada P, Rao KV (**1990**), "Impact of methylparathion and malathion on cholinergic and non-cholinergic enzyme systems of penaeid prawn, Metapenaeus monoceros", *Biochem.Int.*, 22: 769-779

Rees T, Hammond PI, Soreq H, Younkin S, Brimijoin S (**2003**), "Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex", *Neurobiol.Aging.*, 24: 777-787

Rees TM, Brimijoin S (**2003**), "The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Drugs Today (Barc.).*, 39: 75-83

Roberts WL, Myher JJ, Kuksis A, Low MG, Rosenberry TL (**1988**), "Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *Journal of Biological Chemistry*, 263: 18766-18775

Roberts WL, Rosenberry TL (**1985**), "Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 133: 621-627

Robitzki A, Mack A, Chatonnet A, Layer PG (**1997**), "Transfection of reaggregating embryonic chicken retinal cells with an antisense 5'-DNA butyrylcholinesterase expression vector inhibits proliferation and alters morphogenesis", *Journal of Neurochemistry*, 69: 823-833

Robitzki A, Mack A, Hoppe U, Chatonnet A, Layer PG (**1998**), "Butyrylcholinesterase antisense transfection increases apoptosis in differentiating retinal reaggregates of the chick embryo", *Journal of Neurochemistry*, 71: 413-420

Rosenberry TL (**1975**), "Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 72: 3834-3838

Rosenberry TL, Barnett P, Mays C (**1980**), "The collagen-like subunits of acetylcholinesterase from the eel electrophorus electricus", *Neurochemistry International*, 2C:135-47.: 135-147

Rosenberry TL, Richardson JM (**1977**), "Structure of 18S and 14S acetylcholinesterase. Identification of collagen-like subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits", *Biochemistry.*, 16: 3550-3558

Rossi A, Vicini E, Scarsella G, Biagioni S (**1991**), "Acetylcholinesterase distribution in subpopulations of murine thymocyte", *Journal of Neuroscience Research*, 29: 201-206

Rotundo RL (**1984a**), "Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 81: 479-483

Rotundo RL (**1984b**), "Synthesis, assembly, and processing of acetylcholinesterase in tissue cultured muscle", en *Cholinesterases: Fundamental and Applied Aspects*, Walter de Gruyter, Berlin

Rotundo RL (**1987**), "Biogenesis and regulation of acetylcholinesterase", en *The Vertebrate Neuromuscular Junction*, Liss, A.R., New York p 247-284

Rotundo RL, Ruiz CA, Marrero E, Kimbell LM, Rossi SG, Rosenberry T, Darr A, Tsoulfas P (**2008**), "Assembly and regulation of acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction", *Chemico-Biological Interactions*, 175: 26-29 Ruiz-Espejo F, Cabezas-Herrera J, Illana J, Campoy FJ, Munoz-Delgado E, Vidal CJ (**2003**), "Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes", *Breast Cancer Research and Treatment*, 80: 105-114

Ruiz-Espejo F, Cabezas-Herrera J, Illana J, Campoy FJ, Vidal CJ (**2002b**), "Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, 72: 11-22

Ruiz-Espejo F, Cabezas-Herrera J, Illana J, Campoy FJ, Vidal CJ (**2002a**), "Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, 72: 11-22

Saez-Valero J, Poza-Cisneros G, Vidal CJ (**1996**), "Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human glioma", *Neurosci.Lett.*, 206: 173-176

Saez-Valero J, Sberna G, McLean CA, Masters CL, Small DH (**1997**), "Glycosylation of acetylcholinesterase as diagnostic marker for Alzheimer's disease", *Lancet.*, 350: 929

Saez-Valero J, Tornel PL, Munoz-Delgado E, Vidal CJ (**1993**), "Amphiphilic and hydrophilic forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human brain", *Journal of Neuroscience Research*, 35: 678-689

Saez-Valero J, Vidal CJ (**1995**), "Monomers and dimers of acetylcholinesterase in human meningioma are anchored to the membrane by glycosylphosphatidylinositol", *Neurosci.Lett.*, 195: 101-104

Saez-Valero J, Vidal CJ (**1996**), "Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma", *Biochim.Biophys.Acta.*, 1317: 210-218

Sagane Y, Nakagawa T, Yamamoto K, Michikawa S, Oguri S, Momonoki YS (**2005**), "Molecular characterization of maize acetylcholinesterase: a novel enzyme family in the plant kingdom", *Plant Physiology*, 138: 1359-1371

Saito H (1997), "Megakaryocytic cell lines", Baillieres Clin.Haematol., 10: 47-63

Salmon AY, Goren Z, Avissar Y, Soreq H (**1999**), "Human erythrocyte but not brain acetylcholinesterase hydrolyses heroin to morphine", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26: 596-600

Sanchez dC, Nieto-Ceron S, Munoz-Delgado E, Vidal CJ, Campoy FJ (**2005**), "Muscular dystrophy with laminin deficiency decreases acetylcholinesterase activity in thymus of dystrophic Lama2dy mice", *Chemico-Biological Interactions*, 157-158:431-2.: 431-432

Sayer R, Law E, Connelly PJ, Breen KC (**2004**), "Association of a salivary acetylcholinesterase with Alzheimer's disease and response to cholinesterase inhibitors", *Clinical biochemistry*, 37: 98-104

Schlenz H, Kummer W, Jositsch G, Wess J, Krasteva G (**2010**), "Muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction is coupled to caveolae in murine airways", *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.*, 298: L626-L636

Schuller HM (**2007**), "Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis", *Prog.Exp.Tumor Res.*, 39:45-63.: 45-63

Schuller HM (**2008**), "Neurotransmission and cancer: implications for prevention and therapy", *Anticancer Drugs.*, 19: 655-671

Schuller HM, Orloff M (**1998**), "Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells", *Biochemical Pharmacology*, 55: 1377-1384

Schuller HM, Tithof PK, Williams M, Plummer H, III (**1999**), "The tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is a beta-adrenergic agonist and stimulates DNA synthesis in lung adenocarcinoma via beta-adrenergic receptor-mediated release of arachidonic acid", *Cancer Res.*, 59: 4510-4515

Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, Friedmann T, Taylor P (**1986**), "Primary structure of Torpedo californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence", *Nature.*, 319: 407-409

Schwarz M, Glick D, Loewenstein Y, Soreq H (**1995a**), "Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons", *Pharmacol.Ther.*, 67: 283-322

Schwarz M, Loewenstein-Lichtenstein Y, Glick D, Liao J, Norgaard-Pedersen B, Soreq H (**1995b**), "Succesive organophosphate inhibition and oxime reactivation reveals distinct responses of recombinant human cholinesterase variants", *Mol.Brain Res.*, 31: 101-110

Schwenke K, Peterson HP, Wangenheim KH, Feinendegen LE (**1995**), "Induction of differentiation in erythroleukemic K562 cells by gamma-irradiation", *Leuk.Res.*, 19: 955-961

Serobyan N, Jagannathan S, Orlovskaya I, Schraufstatter I, Skok M, Loring J, Khaldoyanidi S (**2007**), "The cholinergic system is involved in regulation of the development of the hematopoietic system", *Life Sciences*, 80: 2352-2360

Shafferman A, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Grosfeld H, Ordentlich A, Gozes Y, Cohen S, Ariel N, Barak D, . (**1992**), "Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding", *Journal of Biological Chemistry*, 267: 17640-17648

Shah KA, Karnes HT (**2010**), "A review of the analysis of tobacco-specific nitrosamines in biological matrices", *Crit Rev.Toxicol.*, 40: 305-327

Shapira M, Tur-Kaspa I, Bosgraaf L, Livni N, Grant AD, Grisaru D, Korner M, Ebstein RP, Soreq H (**2000**), "A transcription-activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases", *Human Molecular Genetics*, 9: 1273-1281

Sharma KV, Koenigsberger C, Brimijoin S, Bigbee JW (**2001**), "Direct evidence for an adhesive function in the noncholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth", *Journal of Neuroscience Research*, 63: 165-175

Sheppard BJ, Williams M, Plummer HK, Schuller HM (**2000**), "Activation of voltage-operated Ca2+-channels in human small cell lung carcinoma by the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone", *Int.J.Oncol.*, 16: 513-518

Siek GC, Katz LS, Fishman EB, Korosi TS, Marquis JK (**1990**), "Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain", *Biol.Psychiatry.*, 27: 573-580

Sikorav JL, Duval N, Anselmet A, Bon S, Krejci E, Legay C, Osterlund M, Reimund B, Massoulie J (**1988**), "Complex alternative splicing of acetylcholinesterase transcripts in Torpedo electric organ; primary structure of the precursor of the glycolipid-anchored dimeric form", *EMBO J.*, 7: 2983-2993

Sikorav JL, Krejci E, Massoulie J (**1987**), "cDNA sequences of Torpedo marmorata acetylcholinesterase: primary structure of the precursor of a catalytic subunit; existence of multiple 5'-untranslated regions", *EMBO J.*, 6: 1865-1873

Silman I, Futerman AH (**1987a**), "Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane", *European Journal of Biochemistry*, 170: 11-22

Silman I, Futerman AH (**1987b**), "Posttranslational modification as a means of anchoring acetylcholinesterase to the cell surface", *Biopolymers.*, 26 Suppl:S241-53.: S241-S253

Silver A. (1974). "The Biology of Cholinesterases".

Silveyra MX, Cuadrado-Corrales N, Marcos A, Barquero MS, Rabano A, Calero M, Saez-Valero J (**2006**), "Altered glycosylation of acetylcholinesterase in Creutzfeldt-Jakob disease", *Journal of Neurochemistry*, 96: 97-104

Simon S, Krejci E, Massoulie J (**1998**), "A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway", *EMBO J.*, 17: 6178-6187

Simon S, Le Goff A, Frobert Y, Grassi J, Massoulie J (**1999**), "The binding sites of inhibitory monoclonal antibodies on acetylcholinesterase. Identification of a novel regulatory site at the putative "back door"", *Journal of Biological Chemistry*, 274: 27740-27746

Sine JP, Ferrand R, Cloarec D, Lehur PA, Colas B (**1991**), "Human intestine epithelial cell acetyland butyrylcholinesterase", *Mol.Cell Biochem.*, 108: 145-149

Singh S, Pillai S, Chellappan S (**2011**), "Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis", *J.Oncol.*, 2011:456743. Epub;%2011 Mar 30.: 456743

Skau KA (**1990**), "On the specificity of the acetylcholinesterase defect in dystrophic mice", *Muscle Nerve.*, 13: 321-325

Skau KA, Brimijoin S (**1980**), "Multiple molecular forms of acetylcholinesterase in rat vagus nerve, smooth muscle, and heart", *Journal of Neurochemistry*, 35: 1151-1154

Small DH, Michaelson S, Sberna G (**1996**), "Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease", *Neurochemistry International*, 28: 453-483

Smith AD, Wald NJ, Cuckle HS, Stirrat GM, Bobrow M, Lagercrantz H (**1979**), "Amniotic-fluid acetylcholinesterase as a possible diagnostic test for neural-tube defects in early pregnancy", *Lancet.*, 1: 685-688

Song P, Sekhon HS, Fu XW, Maier M, Jia Y, Duan J, Proskosil BJ, Gravett C, Lindstrom J, Mark GP, Saha S, Spindel ER (**2008**), "Activated cholinergic signaling provides a target in squamous cell lung carcinoma", *Cancer Res.*, 68: 4693-4700

Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER (**2003a**), "Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma", *Cancer Res.*, 63: 214-221

Song P, Sekhon HS, Proskocil B, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER (**2003b**), "Synthesis of acetylcholine by lung cancer", *Life Sciences*, 72: 2159-2168

Song P, Spindel ER (**2008**), "Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of non-neuronal acetylcholine in lung cancer provides a new target for cancer therapy", *J.Pharmacol.Sci.*, 106: 180-185

Soreq H, Ben Aziz R, Prody CA, Seidman S, Gnatt A, Neville L, Lieman-Hurwitz J, Lev-Lehman E, Ginzberg D, Lipidot-Lifson Y, . (**1990**), "Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87: 9688-9692

Soreq H, Ehrlich G, Lapidot-Lifson Y, Gnatt A, Neville L, Ben-Aziz R, Seidman S, Ginzberg D, Zakut H (**1992a**), "Amplification and mutagenesis of the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in primary human tumors", en *Gene amplification in mammalian cells*, Marcel Dekker Inc., New York p 417-428

Soreq H, Gnatt A, Loewenstein Y, Neville LF (**1992b**), "Excavations into the active-site gorge of cholinesterases", *Trends Biochem.Sci.*, 17: 353-358

Soreq H, Lapidot-Lifson Y, Zakut H (**1991b**), "A role for cholinesterases in tumorigenesis?", *Cancer Cells.*, 3: 511-516

Soreq H, Lapidot-Lifson Y, Zakut H (**1991a**), "A role for cholinesterases in tumorigenesis?", *Cancer Cells*, 3: 511-516

Soreq H, Patinkin D, Lev-Lehman E, Grifman M, Ginzberg D, Eckstein F, Zakut H (**1994a**), "Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91: 7907-7911

Soreq H, Patinkin D, Lev-Lehman E, Grifman M, Ginzberg D, Eckstein F, Zakut H (**1994b**), "Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 91: 7907-7911

Soreq H, Seidman S (**2001**), "Acetylcholinesterase--new roles for an old actor", *Nat.Rev.Neurosci.*, 2: 294-302

Soreq H, Seidman S, Dreyfus PA, Zevin-Sonkin D, Zakut H (**1989**), "Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholine esterase in microinjected Xenopus laevis oocytes", *Journal of Biological Chemistry*, 264: 10608-10613

Soreq H, Zakut H (**1990a**), "Amplification of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase genes in normal and tumor tissues: putative relationship to organophosphorous poisoning", *Pharm.Res.*, 7: 1-7

Soreq H, Zakut H (1990b), Cholinesterase genes: Multileveled regulation; Monographs in Human Genetic, Karger, Bazel

Soreq H, Zakut H (**1990c**), "Expression and in vivo amplification of the human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes", *Prog.Brain Res.*, 84:51-61.: 51-61

Soreq H, Zakut H (1993), Human Cholinesterases and anticholinesterases, Academic Press, San Diego, CA p 300

Soreq L, Gilboa-Geffen A, Berrih-Aknin S, Lacoste P, Darvasi A, Soreq E, Bergman H, Soreq H (**2008**), "Identifying alternative hyper-splicing signatures in MG-thymoma by exon arrays", *PLoS.One.*, 3: e2392

Stephenson J, Czepulkowski B, Hirst W, Mufti GJ (**1996**), "Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML)", *Leuk.Res.*, 20: 235-241

Sternfeld M, Ming G, Song H, Sela K, Timberg R, Poo M, Soreq H (**1998a**), "Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini", *J.Neurosci.*, 18: 1240-1249

Sternfeld M, Patrick JD, Soreq H (**1998b**), "Position effect variegations and brain-specific silencing in transgenic mice overexpressing human acetylcholinesterase variants", *J.Physiol Paris.*, 92: 249-255

Sternfeld M, Shoham S, Klein O, Flores-Flores C, Evron T, Idelson GH, Kitsberg D, Patrick JW, Soreq H (**2000**), "Excess "read-through" acetylcholinesterase attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97: 8647-8652

Stieger S, Brodbeck U, Reber B, Brunner J (**1984**), "Hydrophobic labeling of the membrane binding domain of acetylcholinesterase from Torpedo marmorata", *FEBS Lett.*, 168: 231-234

Stieger S, Butikofer P, Wiesmann UN, Brodbeck U (**1989a**), "Acetylcholinesterase in mouse neuroblastoma NB2A cells: analysis of production, secretion, and molecular forms", *Journal of Neurochemistry*, 52: 1188-1196

Stieger S, Gentinetta R, Brodbeck U (**1989b**), "Cholinesterases from flounder muscle. Purification and characterization of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and collagen-tailed forms differing in substrate specificity", *European Journal of Biochemistry*, 181: 633-642

Sundaresan V, Heppell-Parton A, Coleman N, Miozzo M, Sozzi G, Ball R, Cary N, Hasleton P, Fowler W, Rabbitts P (**1995**), "Somatic genetic changes in lung cancer and precancerous lesions", *Ann.Oncol.*, 6 Suppl 1:27-31; discussion 31-2.: 27-31

Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I (**1991b**), "Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein", *Science.*, 253: 872-879

Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I (**1991a**), "Atomic structure of acetylcholinesterase from <u>Torpedo californica</u>: a prototypic acetylcholine-binding protein", *Science*, 253: 872-879

Sussman JL, Harel M, Frolow F, Varon L, Toker L, Futerman AH, Silman I (**1988**), "Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from Torpedo californica subsequent to solubilization with phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *J.Mol.Biol.*, 203: 821-823

Sussman JL, Silman I (**1992**), "Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions", *Curr.Opin.Struc.Biol.*, 2: 721-729

Sutherland D, McClellan JS, Milner D, Soong W, Axon N, Sanders M, Hester A, Kao YH, Poczatek T, Routt S, Pezzementi L (**1997**), "Two cholinesterase activities and genes are present in amphioxus", *J.Exp.Zool.*, 277: 213-229

Swillens S, Ludgate M, Mercken L, Dumont JE, Vassart G (**1986**), "Analysis of sequence and structure homologies between thyroglobulin and acetylcholinesterase: possible functional and clinical significance", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 137: 142-148

Syed M, Fenoglio-Preiser C, Skau KA, Weber GF (**2008**), "Acetylcholinesterase supports anchorage independence in colon cancer", *Clin.Exp.Metastasis.*, 25: 787-798

Taisne C, Norel X, Walch L, Labat C, Verriest C, Mazmanian GM, Brink C (**1997**), "Cholinesterase activity in pig airways and epithelial cells", *Fundam.Clin.Pharmacol.*, 11: 201-205

Takagi H, Mori M (1997), "New mutation site of cholinesterase gene", Intern. Med., 36: 1-2

Talesa VN (**2001**), "Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease", *Mech.Ageing Dev.*, 122: 1961-1969

Taylor, Hooper (**2011**), "Post-Translational Modifications in Health and Disease", en *Protein Reviews Series*, New York p 39-55

Taylor P (1991), "The cholinesterases", Journal of Biological Chemistry, 266: 4025-4028

Taylor P, Radic Z (**1994**), "The cholinesterases: from genes to proteins.", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34: 281-320

Thiberville L, Payne P, Vielkinds J, LeRiche J, Horsman D, Nouvet G, Palcic B, Lam S (**1995**), "Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus", *Cancer Res.*, 55: 5133-5139

Thunnissen FB (**2009**), "Acetylcholine receptor pathway and lung cancer", *J.Thorac.Oncol.*, 4: 943-946

Toiber D, Berson A, Greenberg D, Melamed-Book N, Diamant S, Soreq H (**2008**), "N-acetylcholinesterase-induced apoptosis in Alzheimer's disease", *PLoS.One.*, 3: e3108

Toiber D, Soreq H (**2005**), "Cellular stress reactions as putative cholinergic links in Alzheimer's disease", *Neurochem.Res.*, 30: 909-919

Tornel PL (1992), Las colinesterasas del líquido cefalorraquídeo en sujetos normales, con meningitis e hidrocefalia. Su relación con las enzimas del encéfalo y del plasma, Tesis doctoral, Universidad de Murcia, Murcia

Tornel PL, Campoy FJ, Vidal CJ (**1993**), "Cholinesterases in cerebrospinal fluid in patients with meningitis and hydrocephaly", *Clin.Chim.Acta.*, 214: 219-225

Tornel PL, Saez-Valero J, Vidal CJ (**1992**), "Ricinus communis agglutinin I reacting and non-reacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid", *Neurosci.Lett.*, 145: 59-62

Tornel PL, Vidal CJ (**1991**), "CSF acetyl and butyryl cholinesterase activities in children with bacterial meningitis", *Lancet.*, 337: 440

Toutant JP, Arpagaus M (**1990**), "Quaternary structure and hydrophobic interactions of <u>Drosophila</u> acetylcholinesterase in wild type flies and in mutants of the <u>Ace</u> locus ", en *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*, The Humana Press Inc., Clifton, N.J. p 239-242

Toutant JP, Arpagaus M, Fournier D (**1988**), "Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult Drosophila melanogaster: quaternary structure and hydrophobic character", *Journal of Neurochemistry*, 50: 209-218

Toutant JP, Krall JA, Richards MK, Rosenberry TL (**1991**), "Rapid analysis of glycolipid anchors in amphiphilic dimers of acetylcholinesterases", *Cell Mol.Neurobiol.*, 11: 219-230

Toutant JP, Massoulie J, Bon S (**1985a**), "Polymorphism of pseudocholinesterase in Torpedo marmorata tissues: comparative study of the catalytic and molecular properties of this enzyme with acetylcholinesterase", *Journal of Neurochemistry*, 44: 580-592

Toutant JP, Massoulié J, Bon S (**1985b**), "Polymorphism of pseudocholinesterase in <u>Torpedo</u> <u>marmorata</u> tissues: comparative study of the catalytic and molecular properties of this enzyme with acetylcholinesterase", *Journal of Neurochemistry*, 44: 580-592

Toutant JP, Richards MK, Krall JA, Rosenberry TL (**1990**), "Molecular forms of acetylcholinesterase in two sublines of human erythroleukemia K562 cells. Sensitivity or resistance to phosphatidylinositolspecific phospholipase C and biosynthesis", *European Journal of Biochemistry*, 187: 31-38

Toutant JP, Roberts WL, Murray NR, Rosenberry TL (**1989**), "Conversion of human erythrocyte acetylcholinesterase from an amphiphilic to a hydrophilic form by phosphatidylinositol-specific phospholipase C and serum phospholipase D", *European Journal of Biochemistry*, 180: 503-508

Traiffort E, Ruat M, O'Regan S, Meunier FM (**2005**), "Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants", *Journal of Neurochemistry*, 92: 1116-1125

Treskatis S, Ebert C, Layer PG (**1992**), "Butyrylcholinesterase from chicken brain is smaller than that from serum: its purification, glycosylation, and membrane association", *Journal of Neurochemistry*, 58: 2236-2247

Tsim KW, Randall WR, Barnard EA (**1988a**), "An asymmetric form of muscle acetylcholinesterase contains three subunit types and two enzymic activities in one molecule", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 85: 1262-1266

Tsim KW, Randall WR, Barnard EA (**1988b**), "Identification of a 17 S asymmetric butyrylcholinesterase in chick muscle by monoclonal antibodies", *Neurosci.Lett.*, 86: 245-249

Tsim KW, Randall WR, Barnard EA (**1988c**), "Synaptic acetylcholinesterase of chicken muscle changes during development from a hybrid to a homogeneous enzyme", *EMBO J.*, 7: 2451-2456

Tsurutani J, Castillo SS, Brognard J, Granville CA, Zhang C, Gills JJ, Sayyah J, Dennis PA (**2005**), "Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells", *Carcinogenesis.*, 26: 1182-1195

Turner AJ (1994), "PIG-tailed membrane proteins", Essays Biochem., 28: 113-127

Ummenhofer WC, Brown SM, Bernards CM (**1998**), "Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are expressed in the spinal meninges of monkeys and pigs", *Anesthesiology.*, 88: 1259-1265

Valentino RJ, Lockridge O, Eckerson HW, LaDu BN (**1981**), "Prediction of drug sensitivity in individuals with atypical serum cholinesterase based on in vitro biochemical studies", *Biochemical Pharmacology*, 30: 1643-1649

Vallette FM, De La Porte S, Massoulié J (**1991**), "Regulation and distribution of acetylcholinesterase molecular forms in vivo and in vitro. Cholinesterases:structure,function,mechanism,genetics and cellular biology.", *Chemical Society*, 98-102

Velan B, Kronman C, Ordentlich A, Flashner Y, Leitner M, Cohen S, Shafferman A (**1993**), "N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis", *Biochemical Journal*, 296: 649-656

Vidal CJ (**1996**), "Glycosylation of cholinesterases and its alteration in some pathological processes", *Recent Res.Devel.Neurochem.*, 1: 37-54

Vidal CJ (**2005**), "Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours", *Chemico-Biological Interactions*, 157-158:227-32. Epub;%2005 Oct 27.: 227-232

Vigny M, Bon S, Massoulie J, Leterrier F (**1978**), "Active-site catalytic efficiency of acetylcholinesterase molecular forms in Electrophorus, torpedo, rat and chicken", *European Journal of Biochemistry*, 85: 317-323

Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC , Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R (**2004**), "Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence", *J.Natl Cancer Inst.*, 96: 99-106

Viratelle OM, Bernhard SA (**1980**), "Major component of acetylcholinesterase in Torpedo electroplax is not basal lamina associated", *Biochemistry.*, 19: 4999-5007

Walch L, Taisne C, Gascard JP, Nashashibi N, Brink C, Norel X (**1997**), "Cholinesterase activity in human pulmonary arteries and veins", *Br.J.Pharmacol.*, 121: 986-990

Webb CP, Greenfield SA (**1992**), "Non-cholinergic effects of acetylcholinesterase in the substantia nigra: a possible role for an ATP-sensitive potassium channel", *Exp.Brain Res.*, 89: 49-58

Weber U, Brank M, Grubic Z (**1999**), "Glucocorticoids differentially control synthesis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in rat liver and brain", *Chemico-Biological Interactions*, 119-120:341-7.: 341-347

Weikert T, Layer PG (**1994**), "The carbohydrate epitope HNK-1 is present on all inactive, but not on all active forms of chicken butyrylcholinesterase", *Neurosci.Lett.*, 176: 9-12

Weitnauer E, Ebert C, Hucho F, Robitzki A, Weise C, Layer PG (**1999**), "Butyrylcholinesterase is complexed with transferrin in chicken serum", *Journal of Protein Chemistry*, 18: 205-214

Wessler I, Kirkpatrick CJ (**2008**), "Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans", *Br.J.Pharmacol.*, 154: 1558-1571

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (**1998**), "Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans", *Pharmacol.Ther.*, 77: 59-79

West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S, Dennis PA (**2003**), "Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells", *J.Clin.Invest.*, 111: 81-90

West KA, Linnoila IR, Belinsky SA, Harris CC, Dennis PA (**2004**), "Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway in vitro and in vivo", *Cancer Res.*, 64: 446-451

Wilson IB, Bergman F (**1950**), "Studies on cholinesterase. VII. The active surface of acetylcholinesterase derived from effect of pH on inhibitors ", *Journal of Biological Chemistry*, 185: 479-489

Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivastava S, Minna JD, Gazdar AF (**1997**), "Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers ", *J.Natl.Cancer Inst.*, 89: 1366-1373

Wolleman M, Zoltan L (**1962**), "Cholinesterase activity of cerebral tumors and tumorous cysts.", Archives of Neurology, 6: 161-167

Wong HP, Yu L, Lam EK, Tai EK, Wu WK, Cho CH (**2007**), "Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation", *Toxicol.Sci.*, 97: 279-287

Wu CH, Lee CH, Ho YS (**2011**), "Nicotinic acetylcholine receptor-based blockade: applications of molecular targets for cancer therapy", *Clin.Cancer Res.*, 17: 3533-3541

Xie HQ, Liang D, Leung KW, Chen VP, Zhu KY, Chan WK, Choi RC, Massoulie J, Tsim KW (**2010**), "Targeting acetylcholinesterase to membrane rafts: a function mediated by the proline-rich membrane anchor (PRiMA) in neurons", *Journal of Biological Chemistry*, 285: 11537-11546

Xie J, Jiang H, Wan YH, Du AY, Guo KJ, Liu T, Ye WY, Niu X, Wu J, Dong XQ, Zhang XJ (**2011**), "Induction of a 55 kDa acetylcholinesterase protein during apoptosis and its negative regulation by the Akt pathway", *J.Mol.Cell Biol.*,

Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O (**2000**), "Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase", *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 293: 896-902

Yamate S, Nishigori H, Kishimoto S, Tezuka Y, Fukushima A, Sugiyama T, Nishigori H (**2010**), "Effects of glucocorticoid on brain acetylcholinesterase of developing chick embryos", *J.Obstet.Gynaecol.Res.*, 36: 11-18

Yang L, He HY, Zhang XJ (**2002**), "Increased expression of intranuclear AChE involved in apoptosis of SK-N-SH cells", *Neuroscience Research*, 42: 261-268

Yassine M, Bacou F, Alami-Durante H (**1991**), "Biochemical characteristics of cholinesterases from Bar tissues", en *Cholinesterases: Function, Mechamnism, Genetics and Cell Biology*, American Chemical Society, Washington p 47

Zajicek JL (**1957**), "Studies on the histogenesis of blood platelets and megakaryocytes; histochemical and gasometric investigations of acetylcholinesterase activity in the erythrocyte-erythropoietic and platelet-megakaryocytic systems of various mammals", *Acta Physiol Scand.Suppl.*, 40: 1-32

Zakut H, Ehrlich G, Ayalon A, Prody CA, Malinger G, Seidman S, Ginzberg D , Kehlenbach R, Soreq H (**1990**), "Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas", *J.Clin.Invest.*, 86: 900-908

Zakut H, Even L, Birkenfeld S, Malinger G, Zisling R, Soreq H (**1988b**), "Modified properties of serum cholinesterases in primary carcinomas", *Cancer*, 61: 727-737

Zakut H, Even L, Birkenfeld S, Malinger G, Zisling R, Soreq H (**1988a**), "Modified properties of serum cholinesterases in primary carcinomas", *Cancer.*, 61: 727-737

Zakut H, Lapidot-Lifson Y, Beeri R, Ballin A, Soreq H (**1992**), "In vivo gene amplification in noncancerous cells: cholinesterase genes and oncogenes amplify in thrombocytopenia associated with lupus erythematosus", *Mutation Research*, 276: 275-284

Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, Guo LH, Alemany M, Zhang LY, Shi YF (**2002**), "Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types", *Cell Death.Differ.*, 9: 790-800 Zhao Y, Wang X, Wang T, Hu X, Hui X, Yan M, Gao Q, Chen T, Li J, Yao M, Wan D, Gu J, Fan J, He X (**2011**), "Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization", *Hepatology.*, 53: 493-503