



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Regulación de la Expresión de Acetilcolinesterasa
de Células Caco-2 de Adenocarcinoma
Colorrectal Humano por el Sistema Colinérgico**

D^a María Isabel Serrano Sánchez

2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Regulación de la expresión de acetilcolinesterasa de células Caco-2 de adenocarcinoma colorrectal humano por el sistema colinérgico

Memoria para aspirar al grado de Doctora en Biología

María Isabel Serrano Sánchez

2017

Directores

Dr. Francisco Javier Campoy Menéndez

Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis directores de Tesis D. Fco. Javier Campoy Menéndez y Dr. Cecilio J. Vidal Moreno por aceptarme en su grupo de investigación, por contagiarme su entusiasmo por la investigación y por ser siempre tan amables conmigo. Especialmente agradecer a Javier por todos estos años de aprendizaje a su lado, por su ayuda incondicional, por ser tan comprensivo y paciente conmigo así como el aprecio que siempre me ha demostrado. Sin su ayuda no habría conseguido acabar esta Tesis. También a la Dra. Encarnación Muñoz Delgado por ayudarme siempre que lo he necesitado y su trato tan amigable.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia, así como al personal del Servicio de Cultivo de Tejidos y del Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Murcia por su trato tan amigable, su ayuda y sus enseñanzas.

A mis compañeros de “pasillo”: Jesús, Magda, Alejandro, Vanesa, Mar, Ana, gracias por acogerme tan bien desde el principio y por las comidas compartidas tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis amigos, tanto los nuevos como los de siempre: María L., María P., Mamen, Marina, Laura, Antonio G., Inma, Nerea, Ana, Jesús, Antonio M., Gyo por vuestro apoyo en este largo camino, por sacarme unas risas cuando más lo necesito y por seguir estando ahí. También a mis compañeros y amigos del trabajo, tanto de ITUM como del IMIDA, por sus ánimos y palabras de aliento.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia y, sobre todo a mis padres. Ellos han estado conmigo tanto en los buenos como en los malos momentos y, gracias a sus ánimos y sus consejos soy la persona que soy ahora, tanto a nivel personal como profesional.

Espero que este largo camino que acaba ahora me sirva para comenzar uno aún mejor.

*“Incluso un camino sinuoso, difícil,
nos puede conducir a la meta si no lo
abandonamos hasta el final”*

Paulo Coelho

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICES	I
<i>ÍNDICE GENERAL.....</i>	<i>III</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS.....</i>	<i>VIII</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS.....</i>	<i>XII</i>
ABREVIATURAS	XV
RESUMEN.....	XXIII
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1. <i>PROPIEDADES GENERALES DE LAS COLINESTERASAS</i>	<i>3</i>
1.1. Introducción	3
1.2. Propiedades y especificidad de las colinesterasas.....	4
1.3. Las colinesterasas en los vertebrados	6
1.4. Mecanismo catalítico y relación estructura-función	7
1.5. Estructura del centro activo.....	9
1.6. Inhibición de las colinesterasas.....	14
2. <i>GENÉTICA DE LAS COLINESTERASAS</i>	<i>14</i>
2.1. Estructura de los genes.....	14
2.2. Elementos de control	18
2.3. Ensamblado alternativo de exones	20
3. <i>FORMAS MOLECULARES DE LAS COLINESTERASAS</i>	<i>25</i>
3.1. Introducción	25
3.2. Formas asimétricas.....	28
3.3. Formas globulares	30
3.3.1. Formas globulares anfífilas y no anfífilas: Interacciones hidrofóbicas	30
3.3.2. Formas globulares con subunidades AChE-H: Moléculas Anfífilas de Tipo I.....	31
3.3.3. Formas globulares derivadas de las subunidades AChE-T	34

3.3.3.1. Monómeros y dímeros anfifílicos de tipo II.....	34
3.3.3.2. Tetrámeros hidrofóbicos con la subunidad de anclaje PRiMA	35
3.3.4. Oligomerización de las subunidades AChE-H y AChE-T	37
4. <i>BIOLOGÍA CELULAR DE LAS COLINESTERASAS</i>	37
4.1. Biosíntesis y ensamblado.....	37
4.1.1. Glicosilación de las colinesterasas	39
4.2. Localización celular de las formas moleculares de AChE.....	42
4.3. Secreción de las colinesterasas	42
4.3.1. Transporte axonal de AChE	43
4.4. Regulación de la síntesis de AChE	44
4.4.1. Regulación por el calcio	45
4.4.2. Otros participantes en la regulación de la síntesis de AChE.....	48
5. <i>FUNCIONES ALTERNATIVAS DE LAS COLINESTERASAS</i>	50
5.1. Las colinesterasas en distintos estados patológicos.	53
5.1.1. Colinesterasas y cáncer	56
5.1.2. Colinesterasas y apoptosis.....	61
6. <i>SISTEMA COLINÉRGICO</i>	63
6.1. Introducción	63
6.2. Síntesis de acetilcolina en neuronas y células no neuronales	64
6.3. Papel de la ACh en la proliferación celular y la apoptosis	64
6.4. Receptores de acetilcolina	67
6.4.1. Receptores nicotínicos	67
6.4.1.1. Agonistas y antagonistas de los nAChR	77
6.4.2. Receptores muscarínicos	80
6.5. Implicación del sistema colinérgico en el cáncer	85
7. <i>OBJETIVOS</i>	90
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	93
1. <i>MATERIALES</i>	95
1.1. Reactivos	95
1.2. Líneas celulares	96

2. MÉTODOS.....	98
2.1. Tratamientos y obtención de lisados celulares.....	98
2.2. Determinación de la actividad colinesterasa.....	100
2.2.1. Fundamento del método de medida.....	100
2.2.2. Medida de actividad por un microensayo colorimétrico.....	101
2.3. Ensayo de células viables: ensayos de reducción del MTT.....	103
2.4. Cuantificación relativa de los mensajeros de los componentes del sistema colinérgico por RT-PCR a tiempo real.....	104
2.4.1. Extracción de RNA con TRIZOL.....	104
2.4.2. Medida de la concentración y pureza del RNA.....	106
2.4.3. Transcripción inversa o retrotranscripción.....	106
2.4.4. PCR a tiempo real.....	108
2.4.5. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.....	114
2.4.6. Purificación del DNA de las bandas de los geles de agarosa.....	116
2.5. Valoración de la concentración de proteína.....	117
2.6. Análisis de sedimentación.....	117
2.6.1. Preparación de los gradientes de sacarosa.....	118
2.6.2. Localización de las proteínas marcadoras.....	119
2.6.3. Cálculo del coeficiente de sedimentación.....	119
2.7. Electroforesis y Western blot.....	120
2.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	120
2.7.1.1. Preparación de los geles de poliacrilamida.....	121
2.7.1.2. Preparación de las muestras.....	122
2.7.1.3. Aplicación de las muestras y recorrido.....	123
2.7.2. Detección de las proteínas.....	124
2.7.3. Western blot.....	124
2.7.3.1. Electrotransferencia (método normal o húmedo).....	125
2.7.3.2. Tinción de proteínas con el reactivo rojo Ponceau.....	126
2.7.3.3. Detección de las proteínas de interés con anticuerpos.....	126
2.8. Tinción con Hoechst.....	128

2.9. Tinción histocitoquímica de acetilcolinesterasa.....	129
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	129

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 131

1. AUMENTO DE LA ACTIVIDAD AChE DE LAS CÉLULAS CACO-2 POR BW Y CARBACOL	133
2. BLOQUEO DEL AUMENTO DE ACTIVIDAD AChE POR CICLOHEXIMIDA....	140
3. DETECCIÓN DE AChE POR WESTERN BLOTTING	142
4. EXPRESIÓN DE RNA MENSAJEROS DE AChE EN CÉLULAS CACO-2	143
4.1. AChE-mRNA en células Caco-2 control	146
4.2. Efecto de BW y carbacol sobre los AChE-mRNA de Caco-2.....	151
5. FORMAS MOLECULARES DE AChE EN CACO-2: EFECTO DE CARBACOL Y BW	152
6. ENSAYO PARA CÉLULAS APOPTÓTICAS CON HOECHST	158
7. TINCIÓN HISTOCITOQUÍMICA DE AChE.....	159
8. EFECTO DE OTROS AGONISTAS SOBRE LA AChE DE CACO-2	162
8.1. Acetilcolina.....	162
8.2. Un agonista muscarínico: oxotremorina M	165
8.3. Agonistas nicotínicos: nicotina y colina	167
9. EFECTO DE ANTAGONISTAS SOBRE LA AChE DE CACO-2.....	170
9.1. Un antagonista muscarínico: atropina	170
9.2. Antagonistas nicotínicos: hexametonio, mecamilamina y metillicaconitina.....	170
9.3. Información del estudio farmacológico de los AChR implicados.....	175
10. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ACh EN CÉLULAS CACO-2.....	175
10.1. AChR-mRNA en células Caco-2 control.....	175
10.2. Efecto del carbacol sobre los AChR-mRNA de Caco-2	178
11. EXPRESIÓN DE COLINA ACETILTRANSFERASA (ChAT).....	180
12. ENSAYOS DE WESTERN BLOTTING PARA AChR	181

13. PAPEL DEL CALCIO EN LA SOBRRREGULACIÓN DE AChE POR CARBACOL	184
13.1. Calcio, receptores de ACh y regulación de AChE	184
13.2. Efecto del calcio extracelular en la sobrerregulación de AChE.....	186
13.3. Efecto de los quelantes de calcio en la sobrerregulación de AChE	187
13.4. Efecto del ionóforo A23187 sobre la actividad AChE	191
14. EFECTO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS SOBRE LA AChE DE CÉLULAS SW480.....	194
15. EXPRESIÓN DE LOS DISTINTOS mRNA PARA AChE EN CÉLULAS SW480	196
16. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ACh EN CÉLULAS SW480	197
16.1. AChR-mRNA en células SW480 control.....	197
16.2. Receptores de ACh en células SW480	201
16.3. Efecto del carbacol sobre los AChR-mRNA de SW480	202
17. DISCUSIÓN GENERAL	202
17.1. AChE de las células Caco-2.....	202
17.2. Sobrerregulación de AChE por carbacol o BW.....	205
17.2.1. Estudio farmacológico de los AChRs implicados en la sobrerregulación de AChE	207
17.2.2. Dotación de receptores de ACh en las células Caco-2 y SW480 ...	208
17.2.3. Traducción de AChE y sobrerregulación por agonistas.....	209
17.2.4. Mecanismo intracelular de la sobrerregulación de AChE por agonistas colinérgicos.....	211
CONCLUSIONES	215
BIBLIOGRAFÍA	219

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Estructuras de acetilcolina y butirilcolina.....	4
Figura I.2. Estructura tridimensional de AChE.....	12
Figura I.3. Inhibidores de AChE.....	15
Figura I.4. Unión de acetilcolina y BW a la AChE.....	16
Figura I.5. Sitios de unión de factores de transcripción en el locus de AChE	19
Figura I.6. Estructura de los genes de las colinesterasas de mamíferos.....	21
Figura I.7. Formas moleculares de las colinesterasas.....	27
Figura I.8. Estructura del resto glicosilfosfatidilinositol (GPI) que fija las subunidades AChE-H a la membrana.....	32
Figura I.9. Estructura de la forma molecular G_4^A de AChE con la proteína PRiMA.....	36
Figura I.10. Regulación de la biosíntesis, maduración y transporte de las formas moleculares de AChE.....	39
Figura I.11. Combinaciones de subunidades de los receptores nicotínicos de ACh.....	68
Figura I.12. Arquitectura del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$	70
Figura I.13. Estados conformacionales del receptor nicotínico de ACh.	73
Figura I.14. Sitios de unión de ligandos en los receptores nicotínicos de ACh.....	74
Figura I.15. Aumento del calcio citosólico tras la activación de los nAChRs.....	76
Figura I.16. Ruta de señalización por nAChRs implicada en la proliferación celular.	78
Figura I.17. Estructuras de la acetilcolina, el carbacol y el BW.....	80
Figura I.18. Unión de nicotina y carbacol a la AChBP.	81
Figura I.19. Estructura de los receptores muscarínicos.....	83
Figura I.20. Vías de señalización de AChR muscarínicos y nicotínicos.	86
Figura I.21. Señalización muscarínica que regula la proliferación en células del epitelio de colon.....	89

Figura II.1. Morfología de las células Caco-2 y de las SW480.....	97
Figura II.2. Fundamento del método de medida espectrofotométrico de actividad AChE.	101
Figura II.3. Fundamento del método de medida de la viabilidad celular por reducción del MTT.	104
Figura II.4. Modo de acción del reactivo SYBR Green I.	111
Figura II.5. Posición de las secuencias diana de los cebadores para los mRNA de AChE.	114
Figura III.1. Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE de células Caco-2 en tratamientos de 3 a 5 días.....	134
Figura III.2. Efecto de la aplicación conjunta de BW y carbacol sobre la actividad AChE de Caco-2.	137
Figura III.3. Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE de células Caco-2 en tratamientos de 1 a 3 días.....	138
Figura III.4. Efecto de la cicloheximida sobre la actividad AChE inducida por carbacol.	141
Figura III.5. Efecto de BW284c51 sobre la cantidad de AChE de las células Caco-2.	143
Figura III.6. Curvas de amplificación de los productos de la RT-PCR a tiempo real.	145
Figura III.7. Tamaño de los productos amplificados mediante RT-PCR a partir de células Caco-2.	146
Figura III.8. Curvas de fusión de los productos obtenidos en la RT-PCR para los transcritos de AChE.....	148
Figura III.9. Curvas de fusión de los productos obtenidos en la RT-PCR para los principales transcritos de AChR.....	149
Figura III.10. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE en las células Caco-2.	150
Figura III.11. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE en las células Caco-2 tras tratamiento con BW284c51 y carbacol.....	152
Figura III.12. Formas moleculares de AChE en células Caco-2.	154
Figura III.13. Formas moleculares de AChE en células Caco-2 tratadas con carbacol.....	156

Figura III.14. Formas moleculares de AChE en células Caco-2 tratadas con BW284c51.....	157
Figura III.15. Tinción de células Caco-2 con el colorante Hoechst.	160
Figura III.16. Fotos de microscopía por contraste de fases de células Caco-2	161
Figura III.17. Tinción histocitoquímica de AChE en células Caco-2.....	163
Figura III.18. Tinción histocitoquímica de AChE en células Caco-2.....	164
Figura III.19. Efecto de la acetilcolina sobre la actividad AChE de células Caco-2.	166
Figura III.20. Efecto de la oxotremorina M sobre la actividad AChE de células Caco-2.	168
Figura III.21. Efecto de la nicotina sobre la actividad AChE de células Caco-2.	169
Figura III.22. Efecto de la colina sobre la actividad AChE de células Caco-2.	169
Figura III.23. Efecto de la atropina sobre la actividad AChE de células Caco-2 tratadas con BW284c51 o carbacol.	171
Figura III.24. Efecto del hexametonio sobre la actividad AChE de células Caco-2 tratadas con BW284c51 o carbacol.	173
Figura III.25. Efecto de distintos antagonistas colinérgicos sobre la actividad AChE en células Caco-2 tratadas con carbacol.....	174
Figura III.26. Efecto de varios antagonistas colinérgicos sobre la actividad AChE de células Caco-2 tratadas con BW284c51.....	174
Figura III.27. Cuantificación relativa de los AChRs presentes en las células Caco-2.	177
Figura III.28. Efecto del carbacol sobre los principales AChRs expresados en Caco-2.	180
Figura III.29. Efecto del BW284c51 sobre la cantidad del mAChR M3 de las células Caco-2.....	183
Figura III.30. Efecto del ión calcio sobre la actividad AChE de células Caco-2 tratadas con carbacol.....	188
Figura III.31. Efecto del quelante intracelular de calcio BAPTA-AM sobre la actividad AChE en células tratadas con carbacol.	190

Figura III.32. Efecto del quelante extracelular de calcio EGTA sobre la actividad AChE en células tratadas con carbacol.	190
Figura III.33. Efecto del ionóforo A23187 sobre la viabilidad de las células Caco-2.	192
Figura III.34. Efecto del ionóforo A23187 sobre la actividad AChE de células Caco-2.	193
Figura III.35. Efecto de la oxotremorina M sobre la actividad AChE en las células SW480.	195
Figura III.36. Efecto de la atropina sobre la actividad AChE en las células SW480 tratadas con oxotremorina M.	195
Figura III.37. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE en las células SW480.	196
Figura III.38. Efecto del carbacol sobre los transcritos de AChE en SW480.	197
Figura III.39. Cuantificación relativa de los principales mensajeros de AChR expresados en las células SW480.	198
Figura III.40. Tamaño de los productos amplificados mediante RT-PCR, a partir de células SW480.	200
Figura III.41. Diferencias en la expresión de los mensajeros de AChR tras el tratamiento con carbacol de las células SW480.	203

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Propiedades y nomenclatura de las colinesterasas	5
Tabla I.2. Subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina.	84
Tabla II.1. Agonistas y antagonistas de receptores de acetilcolina y otros agentes empleados.....	99
Tabla II.2. Composición de las mezclas de reacción.....	107
Tabla II.3. Principales primers empleados en los ensayos de rt-PCR.	113
Tabla II.4. Composición del gel separador.....	121
Tabla II.5. Composición del gel concentrador.....	122
Tabla II.6. Composición del tampón de muestra.	123
Tabla III.1. Comparación de los mensajeros de AChR presentes en células SW480 y Caco-2.....	199

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Å:	Angström.
α1- α10:	Subunidades de receptores nicotínicos.
α-BTX:	α-bungarotoxina.
A_{nm}:	Absorbancia a una determinada longitud de onda.
A₄; A₈; A₁₂:	Formas asimétricas de las colinesterasas.
AAA:	Actividad arilacilamidasas.
Aβ:	Péptido β-amiloide.
ACh:	Acetilcolina.
AChBP:	Proteína de unión a acetilcolina (del inglés <i>Acetylcholine Binding Protein</i>).
ACHE:	Gen de la acetilcolinesterasa.
AChE:	Acetilcolinesterasa.
AChE-H:	Subunidad H de AChE.
AChE-R:	Subunidad R de AChE.
AChE-S:	Subunidad S de AChE.
AChE-T:	Subunidad T de AChE.
Apaf-1:	Factor activador de la proteasa apoptótica-1
AREs:	Elementos ricos en AUUUA.
ARP:	Péptido R (carboxilo terminal) de la subunidad R de AChE.
Asn:	Asparagina.
Asp:	Ácido aspártico.
ATCh:	Acetiltiocolina.
β1-β4	Subunidades de receptores nicotínicos.
β-ME:	β-mercaptoetanol.
pb:	Par de bases.
BAPTA-AM:	Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético.
Brij 96:	Polioxietilén ₁₀ oleil éter.
BSA:	Albúmina de suero bovino.
BuCh:	Butirilcolina.
BCHE:	Gen de la butirilcolinesterasa.
BuChE:	Butirilcolinesterasa.
BuTCh:	Butiriltiocolina.
BW:	BW284c51.
BW284c51:	Dibromuro de 1,5-bis-(alildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona.
C:	Catalasa (cuando se emplea como marcador de coeficiente de sedimentación).

°C:	Grado centígrado.
C/EBP:	Proteína de unión al potenciador CCAAT (del inglés <i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>).
c-fos:	Proto-oncogén celular perteneciente a la familia de factores de transcripción de genes de expresión rápida.
C-terminal:	Carboxilo terminal.
Caco-2:	Una línea celular de adenocarcinoma de colon.
cAMP:	Adenosín monofosfato cíclico (AMP cíclico).
CBB:	Azul brillante de Coomassie (del inglés <i>Coomassie Brilliant Blue</i>).
cDNA:	ADN copia.
ChAT:	Colina acetiltransferasa.
ChE:	Colinesterasa.
ChEs:	Colinesterasas.
CHX:	Cicloheximida.
CLAM:	Moléculas de adhesión similares a las colinesterasas (del inglés <i>Cholinesterase-Like Adhesion Molecules</i>).
CMS:	Síndromes miasténicos congénitos.
Con A:	Concavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>).
CrAT:	Carnitina aciltransferasa.
CREB:	Proteína de unión a elementos de respuesta al cAMP (del inglés <i>cAMP Response Element-Binding</i>).
Ct:	Ciclo umbral (del inglés <i>threshold cycle</i>).
CTL:	Transportador de colina (del inglés <i>Choline Transporter-Like protein</i>).
Cys:	Cisteína.
DFP:	Diisopropil fluorofosfato.
DNA:	Ácido desoxirribonucleico.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
dNTPs:	Desoxinucleósidos trifosfato.
dsDNA:	ADN de doble cadena.
DTNB:	Ácido 5,5'-ditiobis nitrobenzoico.
DTT:	Ditiotreitol.
E1-E6:	Exones del 1 al 6 de AChE.
EC₅₀:	Concentración efectora media.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico.
EGTA:	Ácido etilenglicol-bis-(aminoetiléter)-N,N'-tetraacético.

ERAD:	Degradación asociada al retículo endoplásmico (del inglés <i>Endoplasmic Reticulum Associated Degradation</i>).
EtBr:	Bromuro de etidio.
F:	Fosfatasa alcalina (cuando se emplea como marcador en los análisis de sedimentación).
FHB:	Haz de cuatro hélices (del inglés <i>Four Helix Bundle</i>).
FRET:	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia..
G^A:	Forma globular “anfifílica” de colinesterasa.
G^{H/NA}:	Forma globular “hidrofílica” o “no anfifílica” de colinesterasa.
G₁; G₂; G₄:	Formas globulares de AChE o BuChE.
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GATA1:	Factor de transcripción implicado en crecimiento celular y cáncer.
gDNA:	ADN genómico.
Glc:	Glucosa.
Glu:	Glutamato.
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol.
HBD:	Dominio de unión a heparina (del inglés <i>Heparin Binding Domain</i>).
His:	Histidina.
IgG:	Inmunoglobulina G.
IP₃R:	Receptor de inositol (1,4,5)-trisfosfato.
iso-OMPA:	Tetraisopropil pirofosforamida.
Kb:	Kilobase.
Kcat:	Constante de catálisis enzimática.
KDa:	Kilodalton.
Km:	Constante de afinidad enzima-sustrato de Michaelis-Menten.
LCC:	Carcinoma de células grandes (del inglés <i>Large Cell Carcinoma</i>).
LCR:	Líquido cefalorraquídeo.
Leu:	Leucina.
Leupeptina:	Acetil-Leu-Leu-Arg-al.
M1-M5:	Subtipos de receptores muscarínicos.
mAChR:	Receptor muscarínico de acetilcolina.
nAChR:	Receptor nicotínico de acetilcolina.
Man:	Manosa.
MEC:	Mecamilamina.
MG:	Miastenia <i>gravis</i> .
miRNA:	micro ARN.
mk:	Marcadores de peso molecular.

MLA:	Metillicaconitina.
mRNA:	ARN mensajero.
MTT:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
Myc:	Una familia de protooncogenes que regulan la transcripción de otros genes.
MyoD:	Una proteína que interviene en la diferenciación muscular.
N-19:	Anticuerpo policlonal de cabra generado frente a un péptido del extremo amino de la AChE de origen humano.
N-AChE:	Acetilcolinesterasa con extensión N-terminal.
N-terminal:	Amino terminal.
GlcNac:	N-acetil D-glucosamina.
NF-κB:	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NGF:	Factor de crecimiento neural.
NL-1, NL-2:	Neuroliquina 1 y Neuroliquina 2.
OCTs:	Transportador de cationes orgánicos.
Naranja G:	1-Fenilazo-2-naftol-6,8-disulfonato de sodio.
OxoM:	Oxotremorina M.
P:	Subunidad estructural PRiMA.
p53:	Un gen supresor de tumores.
PAMs:	Moduladores alostéricos positivos.
PAS:	Sitio aniónico periférico de las subunidades de AChE.
PBS:	Tampón salino isotónico: NaCl 140 mM, fosfato 10 mM, pH 7,2.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>).
Phe:	Fenilalanina.
PIPLC:	Fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol.
PKA:	Proteína quinasa A.
PKC:	Proteína quinasa C.
Pm:	Peso molecular.
PRAD:	Dominio rico en prolina (del inglés <i>Proline-Rich Attachment Domain</i>).
PRiMA:	Proteína de anclaje a la membrana rica en prolina (del inglés <i>Proline-Rich Membrane Anchor</i>).
PSA:	Persulfato amónico.
p/v:	Relación peso/volumen.
Q:	Subunidad colagénica de las formas asimétricas.
RCA:	Aglutinina de ricino (<i>Ricinus communis</i>).

RE:	Retículo endoplásmico.
RER:	Retículo endoplásmico rugoso.
RNA:	Ácido ribonucleico.
rpm:	Revoluciones por minuto.
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa tras una transcripción inversa (del inglés <i>Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i>).
S:	Unidad Svedberg de coeficiente de sedimentación.
SCC:	Carcinoma epidermoide o escamoso.
SCLC:	Carcinoma de pulmón de células pequeñas.
SDS:	Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE:	Electroforesis desnaturalizante con SDS en gel de poliacrilamida.
Ser:	Serina.
SFB:	Suero fetal bovino.
siRNA:	ARN pequeño de interferencia.
SNC:	Sistema nervioso central.
SNP:	Sistema nervioso periférico.
SW480:	Una línea celular de adenocarcinoma de colon.
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.
Thr:	Treonina.
T_m:	Temperatura de <i>melting</i> o temperatura de fusión.
Tm:	Tampón de muestra.
Tris:	Tris (hidroximetil)-aminometano.
TX-100:	Triton X-100.
Triton X-100:	Polioxietilén _{9,6} p-t-octil fenol.
Trp:	Triptófano.
TT:	Tampón de Transferencia: glicina 192 mM, Tris 25 mM, metanol 10%, SDS 0,01%, pH 8,6.
TBS-T:	Tampón Tris salino con Tween 20 al 0,1% p/v.
Tween 20:	Monolaurato de polioxietilensorbitano.
Tyr:	Tirosina.
U.A.:	Unidades arbitrarias.
UTR:	Región no traducida de un gen.
V:	Voltio.
VAChT:	Transportador vesicular de acetilcolina.
Val:	Valina.
VDCCs:	Canales de calcio dependientes de voltage (del inglés <i>Voltage-Dependent Calcium Channels</i>).

- v/v:** Relación volumen/volumen.
- ω :** Aminoácido carboxilo terminal de AChE-H que recibe el resto de GPI.
- WAT:** Dominio anfifílico de tetramerización rico en triptófano. Péptido T.

RESUMEN

RESUMEN

Las colinesterasas, acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), hidrolizan la acetilcolina (ACh) y ejercen acciones no catalíticas, estando implicadas en los procesos de proliferación, diferenciación, morfogénesis, hematopoyesis, apoptosis y tumorigénesis.

En estudios previos habíamos observado un gran aumento de la actividad AChE en las células Caco-2 al ser tratadas con un inhibidor reversible y específico de AChE, el BW284c51, lo que podría reflejar la existencia de un mecanismo regulador de los niveles de AChE activa.

Así, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue obtener información sobre el posible mecanismo regulador de la actividad AChE mediado por los receptores de acetilcolina en las células de colon.

La metodología incluye el empleo de cultivos de células Caco-2 y SW480 con agonistas y antagonistas colinérgicos, los ensayos colorimétricos para la medida de actividad AChE y los ensayos de reducción del MTT para la medida de la viabilidad celular. La cuantificación relativa de los mensajeros de los componentes del sistema colinérgico se llevó a cabo mediante RT-PCR a tiempo real. Se realizaron análisis de sedimentación para determinar el contenido de formas moleculares de AChE y ensayos de Western blot para la detección de proteínas. Además se realizaron tinciones de Hoechst para la detección de células apoptóticas y tinciones histocitoquímicas de AChE.

Los resultados de estos estudios revelaron la existencia de un mecanismo regulador de la AChE de las células de colon por el que aumenta la actividad AChE, en respuesta a una exposición prolongada de los receptores de acetilcolina a agonistas colinérgicos como el carbacol.

Mediante el uso de cicloheximida se vio que el mecanismo de acción del carbacol requería la síntesis de nueva proteína AChE, además en los ensayos de Western blot se observó un aumento en el contenido de proteína AChE en células Caco-2 tratadas con BW.

La variante 3' del mensajero de AChE más abundante fue la de tipo H; además se observaron variantes 5' con los exones E1c y E1e. Los cambios que producen carbacol y BW en la expresión del gen ACHE no explican el aumento observado en la actividad AChE.

El patrón de formas moleculares de AChE en las células Caco-2 tampoco se vio modificado por el tratamiento con carbacol o con BW, siendo las formas moleculares predominantes en estas células las de tipos G_1^A y G_2^A .

Por su parte, la tinción con Hoechst mostró que el carbacol no induce apoptosis en las células Caco-2. Además, el teñido histocitoquímico indicó que el aumento de actividad AChE por carbacol se produce de forma similar en todas las células tratadas, descartando que la sobrerregulación de AChE se deba a la inducción de apoptosis.

Los tratamientos con quelantes de calcio demostraron un papel del calcio intracelular en el mecanismo de acción del carbacol que da lugar a su efecto sobrerregulador de AChE.

Por último, los estudios con agonistas (acetilcolina, carbacol, nicotina, colina, oxotremorina M) mostraron que la activación tanto de los mAChR como de los nAChR produce un aumento de la actividad AChE, lo que sugiere que acetilcolina y carbacol ejercen su acción sobrerreguladora de AChE actuando sobre ambos tipos de receptores, tanto en las células Caco-2 como en las SW480. Los resultados de los ensayos de RT-PCR sugieren que en ambas líneas podrían formarse receptores nicotínicos de tipos homomérico $\alpha 7$ y muscular, junto a posibles heterómeros $\alpha 3\beta 4\alpha 5$, $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ y $\alpha 4\beta 2\alpha 5$, además de mAChR M3; aunque serán necesarios más estudios para caracterizar los distintos tipos de receptores implicados en este mecanismo sobrerregulador de AChE y las distintas etapas del proceso.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. PROPIEDADES GENERALES DE LAS COLINESTERASAS

1.1. Introducción

Las colinesterasas (ChEs), acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), son las enzimas que hidrolizan a los ésteres de colina a más velocidad que a otros ésteres, en las condiciones óptimas para la catálisis. Por tanto, y entre otras funciones, las colinesterasas son las enzimas responsables de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (ACh), liberado en las sinapsis colinérgicas, colaborando así en el control preciso y temporal de la transmisión nerviosa y la contracción muscular. Históricamente, la investigación sobre las ChEs se desarrolló a partir de los estudios sobre el sistema nervioso colinérgico para establecer los mecanismos de la transmisión sináptica. Así, en 1914 Dale propuso la existencia de la acetilcolina (ACh), y seis años después Loewi demostró que la ACh era el neurotransmisor de las uniones neuromusculares en vertebrados. No fue hasta 1926 que Loewi y Navratil demostraron la existencia de una enzima en los tejidos excitables que hidrolizaba la ACh con gran eficiencia, la acetilcolinesterasa (AChE). Años más tarde, con la detección en 1938 por Marnay y Nachmansohn de altas concentraciones de AChE en las uniones neuromusculares de diversos mamíferos y en los órganos eléctricos de *Torpedo* y *Electrophorus*, se asentó el papel de esta enzima en la transmisión colinérgica. Se concluyó que la AChE era esencial para que la ACh liberada tras la estimulación nerviosa durante la transmisión neuromuscular se eliminara de forma inmediata, dentro de los límites del periodo refractario (unos pocos milisegundos).

Desde entonces, las colinesterasas han sido objeto de numerosos estudios. Gracias a su elevada eficiencia catalítica y al desarrollo de técnicas sensibles de detección y cuantificación, como son la espectrofotometría y la radiometría (Ellman y col., 1961; Johnson y Russell, 1975) y a la calidad de los métodos histoquímicos (Koelle y Friedenwald, 1949; Karnovsky y Roots, 1964), se ha logrado establecer su estructura molecular, aspectos de su biología celular, interacciones con la membrana y con la matriz extracelular, su localización, así como su función biológica. Además, 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 de la AChE de *Torpedo* (Sussman y col., 1991), de mamífero (Marchot y col., 1996) y de *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. Por otro lado, se observó la participación de las ChEs en procesos no relacionados con la neurotransmisión, tales como la morfogénesis,

hematopoyesis, tumorigénesis y apoptosis (Layer y Willbold, 1995; Brimijoin y Koenigsberger, 1999; Soreq y Seidman, 2001; Zhang y col., 2002; Vidal, 2005; Zhang y Greenberg, 2012), lo que dio lugar a una activa investigación sobre las acciones no colinérgicas de las colinesterasas. Sin embargo, aún quedan por aclarar algunos puntos relativos a su amplia distribución en los tejidos, el complejo polimorfismo molecular y la síntesis y transporte de las diferentes moléculas a distintos compartimentos celulares. También es importante dilucidar si los cambios experimentados por las colinesterasas en ciertas patologías son causa o consecuencia de las mismas.

1.2. Propiedades y especificidad de las colinesterasas

Las colinesterasas hidrolizan a los ésteres de colina más rápidamente que a otros ésteres, si se compara la catálisis en condiciones óptimas de concentración de sustrato, pH y fuerza iónica. Lo que diferencia a las ChEs de otras esterasas es que pueden ser inhibidas con pequeñas cantidades de fisostigmina (10^{-5} M), un alcaloide natural también conocido como eserina. Además, se incluyen en el grupo de las serín-hidrolasas (pues contienen serina en el centro activo), por lo que se inhiben irreversiblemente por compuestos organofosforados.

Aunque en función del sustrato preferente las ChEs se dividen en acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (Silver, 1974), sólo los vertebrados superiores poseen ambas enzimas, cada una codificada por su propio gen (**Tabla I.1**).

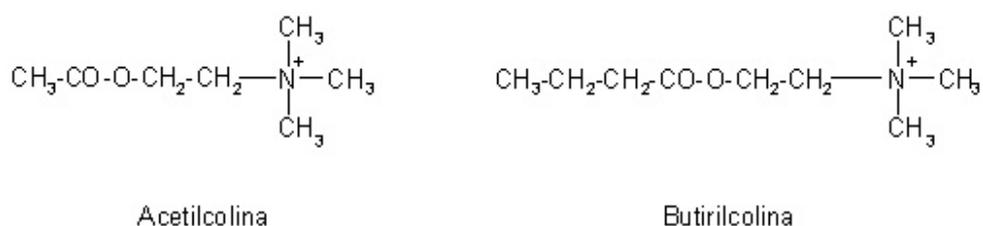


Figura I.1. Estructuras de acetilcolina y butirilcolina.

Con el término acetilcolinesterasa (AChE) o acetilcolina: acetil-hidrolasa (E.C. 3.1.1.7) se hace referencia a aquellas enzimas que hidrolizan preferentemente acetilcolina o sus tioanálogos. Por su parte, los términos butirilcolinesterasa (BuChE) o acilcolina: acilhidrolasa (E.C. 3.1.1.8), colinesterasa plasmática, pseudocolinesterasa o

colinesterasa no específica, se aplican para las enzimas que actúan de modo más eficiente sobre ésteres sintéticos (butirilcolina, propionilcolina o sus tioanálogos) (Fig. I.1).

AChE y BuChE también se distinguen por la afinidad a ciertos inhibidores selectivos. Así, AChE se inhibe fuertemente por BW284c51, mientras que etopropazina, *iso*-OMPA y bambuterol reducen la actividad BuChE. Además, la AChE se inhibe por exceso de sustrato, lo que no le ocurre a la BuChE.

	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 (Ki 10 nM)	Inhibición débil (Ki 6 μ M)
Inhibición por etopropazina	Inhibición débil (Ki 170 μ M)	Inhibición fuerte (Ki 20 nM)
Tejidos con alta actividad	Hematíes, tejido nervioso, timo, placenta	Suero sanguíneo, páncreas, hígado

Tabla I.1. Propiedades y nomenclatura de las colinesterasas

Otro criterio que diferencia a estas dos enzimas es el tamaño de la subunidad catalítica (ligeramente superior en la BuChE) y la interacción con anticuerpos. En general, los anticuerpos contra AChE o BuChE no dan reacción cruzada (Brimijoin y Rakonczay, 1986), salvo algunas excepciones (Dreyfus y col., 1988).

1.3. Las colinesterasas en los vertebrados

En todos los animales hay enzimas capaces de hidrolizar acetilcolina (Silver, 1974), pero no todas pueden ser consideradas colinesterasas, según la definición aceptada.

Los invertebrados tienen un número variable de genes para las ChEs. En *Caenorhabditis elegans* encontramos cuatro genes, y en *Drosophila* un solo gen. De hecho, numerosos insectos tienen una sola colinesterasa, con una preferencia de sustrato intermedia entre AChE y BuChE (Hall y Spierer, 1986). Por su parte, los vertebrados poseen un solo gen para AChE, aunque aves y mamíferos disponen de otro gen para BuChE. La dualidad AChE/BuChE queda bien definida en vertebrados superiores, y probablemente proceda de la duplicación de un gen en un ancestro de los gnatostomados (Toutant y col., 1985). En el pez elasmobranquio *Torpedo* (raya eléctrica) la afinidad por el sustrato no permite diferenciar entre ambas ChEs, ya que la BuChE hidroliza mejor a la ACh que a la propionil- o butirilcolina (Toutant y col., 1985), mientras que en el pez ciclóstomo *Petromyzon marinus* (lamprea) sólo se ha encontrado AChE (Pezzementi y col., 1987).

No existe una correspondencia directa entre ambas colinesterasas y su localización en los tejidos (Edwards y Brimijoin, 1982). La AChE predomina en el músculo y en el sistema nervioso de vertebrados (Marnay y Nachmansohn, 1937; 1938), acompañada de una pequeña cantidad de BuChE (Chatonnet y Lockridge, 1989; Li y col., 2000a), especialmente en estadios tempranos de desarrollo. No obstante, todos los tejidos tienen cantidades variables de AChE y BuChE, al menos en vertebrados, aunque la relación de actividades AChE/BuChE depende del tejido particular y de la especie animal que se considere.

Los fluidos biológicos, excepto lágrimas, sudor y orina, muestran también actividades AChE y BuChE, y su medida en algunos de ellos puede tener importancia desde el punto de vista clínico. Así, el nivel de actividad AChE en el líquido amniótico sirve para el diagnóstico de anomalías en el desarrollo del tubo neural en fetos (Liao y col., 1992). En el líquido cefalorraquídeo, un descenso en la relación de actividades AChE/BuChE posiblemente refleje un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Tornel y col., 1992; 1993).

Teniendo en cuenta la importancia de la AChE en la transmisión colinérgica, es lógica su expresión en tejidos neurales y en músculo, pero no deja de sorprender que todos los tejidos excitables y no excitables, embrionarios y adultos, posean esta actividad enzimática (Layer y Willbold, 1995). Así, se ha detectado actividad AChE en hígado (Gómez y col., 2000), placenta (Rama Sastry, 1997), timo (Rossi y col., 1991; Nieto-Cerón y col., 2005) y bazo (Nieto-Cerón, 2004), eritrocitos (Vidal, 1996),

linfocitos (Kawashima y Fujii, 2000), plaquetas (Marcos y col., 1998) y células epiteliales normales (Taisne y col., 1997; Ummenhofer y col., 1998) y tumorales (Sáez-Valero y Vidal, 1996). Por otra parte, también se ha podido observar 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).

La actividad BuChE se extiende a casi todos los tejidos, excepto en eritrocitos, linfocitos y placenta. Es abundante en hígado, donde es sintetizada y vertida al plasma. Además abunda en corazón y cerebro. Pese a los numerosos trabajos realizados sobre BuChE, aún no está claro su sustrato biológico y su papel fisiológico (Mack y Robitzki, 2000). Por su abundancia en el plasma sanguíneo, se ha sugerido que participa en procesos de detoxificación (Reddy y col., 1990). Se sabe que la BuChE interviene en la degradación de succinilcolina, un miorelajante usado en las intervenciones quirúrgicas, que si no se elimina rápidamente puede producir apnea al ralentizar la vuelta a la respiración normal. También es capaz de hidrolizar heroína (Lockridge y col., 1980; Valentino y col., 1981), fisostigmina y aspirina (Masson y col., 1998; Silver, 1974) y de activar al agente antiasmático bambuterol (Tunek y col., 1988). Además, como sucede con la AChE, varios sistemas celulares proliferativos muestran una elevada actividad BuChE, tales como las células del sistema hematopoyético y ciertas células tumorales (Soreq y Zakut, 1993).

Puesto que la BuChE puede actuar sobre numerosos sustratos, se ha sugerido que la elevada cantidad de BuChE que circula libremente en el plasma de mamíferos ejerce una función protectora, bien sea hidrolizando agentes tóxicos ingeridos oralmente o bien eliminando la propia ACh que llegue a la sangre, con el fin de prevenir acciones nicotínicas o muscarínicas no deseadas. No obstante, a pesar de las numerosas variantes alélicas de BuChE en humanos, parece que la enzima es prescindible ya que no se aprecian consecuencias fisiológicas o patológicas en individuos deficientes o desprovistos de BuChE (Lockridge, 1990; Lockridge y Masson, 2000).

Aún queda por aclarar el papel de las ChEs fuera del sistema neuromuscular, pero hay pruebas de su participación en procesos de proliferación y diferenciación celular, morfogénesis y apoptosis (Drews, 1975; Greenfield, 1996; Grisaru y col., 1999a; Layer, 1995; Soreq y Seidman, 2001; Zhang y Greenberg, 2012).

1.4. Mecanismo catalítico y relación estructura-función

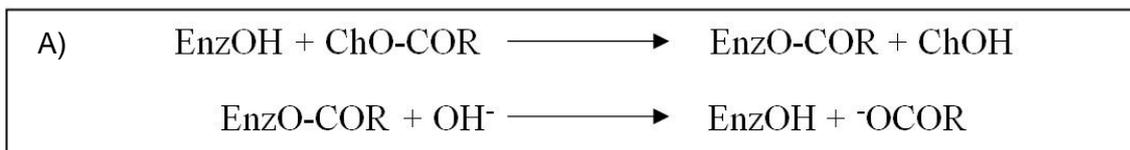
Las colinesterasas figuran entre las enzimas más eficientes que se conocen. Su eficiencia catalítica sólo depende de la difusión molecular (límite máximo teórico

impuesto para la catálisis de una enzima) (Hasinoff, 1982; Quinn, 1987). La eficiencia catalítica para AChE (kcat/Km) es $1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, de modo que una sola molécula de AChE es capaz de hidrolizar unas 25.000 moléculas de ACh por segundo.

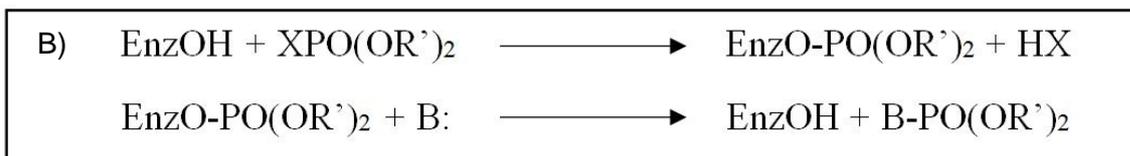
Debido a la amplia distribución de la AChE en la naturaleza, tanto a nivel tisular como en la escala filogenética, y su implicación en diversas patologías, es importante el estudio de su mecanismo catalítico, tanto desde el punto de vista teórico como práctico, ya que las ChEs son diana de pesticidas y gases nerviosos (Main, 1979; Padilla, 1995). El conocimiento de su modo de acción facilitará la obtención de agentes terapéuticos y antídotos para casos de envenenamiento por organofosforados (Li y col., 2000b). También ayudaría a conseguir plaguicidas más selectivos para el sistema nervioso de insectos indeseables, evitando así la alteración de la cadena trófica. Incluso será posible diseñar nuevos inhibidores de AChE más efectivos que los actuales (tacrina, rivastigmina, donepezil y galantamina) para mejorar la función colinérgica en el sistema nervioso central y aliviar el déficit cognitivo en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Giacobini, 1997).

Tanto el mecanismo de hidrólisis de un sustrato de acil-colina (ChO-COR) por parte de una ChE (EnzOH), así como la base de la inhibición por organofosforados, podrían esquematizarse de la siguiente manera (Schwarz y col., 1995):

Hidrólisis catalítica por las ChEs:



Fosforilación y reactivación:



La hidrólisis de una acil-colina (ChO-COR) por una ChE (EnzOH) (esquema A) transcurre en dos etapas. En una primera etapa, se rompe el enlace éster del sustrato, liberándose colina (ChOH) y produciéndose un intermedio acil-enzima (EnzO-COR). Dicho intermedio se produce tras la adición del acetilo de la acetilcolina al hidroxilo de

la Ser catalítica (Rosenberry, 1975). En una segunda etapa, se hidroliza el acetil-enzima con una molécula de agua, dando un resto ácido y la enzima libre. En el esquema B se muestra la base molecular de la toxicidad por compuestos organofosforados ($XPO(OR')_2$). Estos compuestos tienen la capacidad de fijarse a la Ser catalítica, pero a diferencia de lo que ocurre en la acilación, el enlace covalente entre el fósforo nucleofílico y la Ser no se hidroliza o lo hace muy lentamente (Aldridge y Reiner, 1972). Sólo un nucleófilo muy potente (una oxima cuaternaria o un ión fluoruro) (B:) consigue desplazar al organofosforado, liberar la Ser y restaurar la actividad enzimática.

1.5. Estructura del centro activo

La cristalización de la AChE dimérica de *Torpedo* (Sussman y col., 1988) y su posterior análisis estructural por difracción de rayos X (Sussman y col., 1991) fueron decisivos para conocer la topología del sitio activo y el mecanismo de catálisis de la enzima. A ese estudio pionero siguieron otros, y actualmente hay accesibles en el *Protein Data Bank* casi 200 estructuras tridimensionales de AChE obtenidas por difracción de rayos X. La mayoría de ellas corresponden a la enzima de la raya *Torpedo californica* (recientemente renombrada como *Tetronarce californica*), a la de ratón o a la humana, pero también se han determinado las estructuras de AChE de serpiente (*Bungarus fasciatus*), de anguila eléctrica (*Electrophorus*) y de *Drosophila*. De hecho, se conoce la estructura de AChE unida a una variedad de ligandos, incluyendo sustratos (acetilcolina, acetiltiocolina) e inhibidores (tacrina, galantamina, edrofonio, decametonio, BW284c51, huprina, huperzina y fasciculina, entre otros). Esos estudios revelaron que la estructura terciaria de la subunidad de AChE es similar a la de otras serín-hidrolasas y coincide en lo esencial con el modelo que se propuso a partir de resultados de dicroísmo circular (Manavalan y col., 1985) y espectroscopía Raman (Aslanian y col., 1987; 1991).

Las ChEs se incluyen en la familia de las hidrolasas con plegamiento α/β . La topología común consiste en una estructura central con 8-11 hebras β dispuestas paralelamente, flanqueadas por hélices α (Sussman y col., 1991; Krejci y col., 1991a; Ollis y col., 1992). De esta forma, la estructura catalítica queda en el interior de una estructura globular compacta. Este plegamiento α/β es compartido por diversas enzimas hidrolíticas con distinto origen filogenético y función catalítica. Es el caso de la glutactina y neurotactina; ambas proteínas participan en procesos de interacción entre células heterólogas durante el desarrollo embrionario y comparten cierta homología estructural con las ChEs. Esta información revela que el dominio que comparten estas

tres enzimas podría ser responsable de las acciones morfogenéticas de las ChEs (Krejci y col., 1991b; Soreq y Seidman, 2001).

Al comparar las secuencias de proteínas de la familia de las hidrolasas, se observa que los aminoácidos superficiales se han conservado menos que los del interior, siendo los periféricos los que definen la especificidad de sustrato (Cygler y col., 1993). Los aminoácidos de las regiones internas determinan el plegamiento de la proteína y alinean a triada catalítica. Aquellos aminoácidos con propiedades parecidas, conforman el núcleo de la estructura en diversas proteínas de esta familia (Greer, 1990).

Numerosos datos experimentales demuestran que el centro activo de las ChEs contiene serina e histidina, las cuales forman parte de una triada catalítica. Dicha triada catalítica está compuesta por Ser200-His440-Glu327 en *Torpedo* (en humano Ser203-His447-Glu334) (Dvir y col., 2010) y es responsable de la hidrólisis del sustrato, aumentando el carácter nucleofílico del OH de la Ser200 y facilitando la catálisis ácida. La Ser200 se sitúa cerca del fondo de una hendidura de unos 20Å, que se proyecta hacia el interior de la proteína (Gibney y col., 1990; MacPhee-Quigley y col., 1985; Schumacher y col., 1986; Sussman y col., 1991).

Según el modelo clásico, el centro activo de la AChE está compuesto por dos subsitios: A) 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, y B) el subsitio esterásico, con la Ser que interviene en la separación de colina y acetato (Wilson y Bergmann, 1950; Hasan y col., 1980). La característica más destacable de la estructura de la AChE es la presencia de un profundo y estrecho pasillo, de unos 20 Å de longitud, que penetra en la proteína y se prolonga en su base. Esta cavidad se denomina “pasillo o pozo del sitio activo”, porque contiene la triada catalítica (**Fig. I.2**). En todas las moléculas de AChE secuenciadas hasta ahora (excepto en la anguila *Electrophorus*), se conservan los aminoácidos próximos a la Ser catalítica, en particular el hexapéptido PheGlyGluSerAlaGly.

Los restos aromáticos que ocupan la superficie del pasillo y las secuencias que los flanquean, se sitúan principalmente en los bucles entre las cadenas β y son responsables de la especificidad de la AChE frente a distintos ésteres de colina, así como frente a inhibidores selectivos. Dichos restos contribuyen a la unión del ligando, creando un microambiente de anillos aromáticos (la llamada “guía aromática”) que facilita la difusión del sustrato desde la entrada del pozo al fondo, donde se aloja la Ser

catalítica (Sussman y col., 1991). Sin embargo, en el hueco homólogo de la BuChE sólo hay 8 restos aromáticos, en lugar de 14 como en la AChE (Harel y col., 1992).

En el canal por donde accede el sustrato hay algunos restos ácidos, entre los que se encuentran Asp276 y Glu278 en la parte superior, formando parte de un sitio periférico, Asp72 (Asp74 en humanos) en el dominio del subsitio aniónico y Glu199 en la parte más interna, en el subcentro esterásico. De esta forma, se genera un poderoso campo electrostático desde la boca del canal que proporciona la fuerza para conducir a la ACh al fondo del canal, donde más tarde se reorienta para quedar perfectamente acoplada al centro activo con la ayuda de los grupos aromáticos.

Parece ser que en la interacción AChE-ligando, el grupo amonio cuaternario de la ACh entra en contacto directo con el anillo indol del Trp84 de la enzima. Este resto se ha conservado en todas las ChEs y forma parte del sitio de unión a la colina o subsitio aniónico, donde estabiliza un intermedio tetraédrico gracias a la interacción favorable entre los electrones π y el amonio de la colina (Shafferman y col., 1992a). Por su parte, los restos Phe288 y Phe290, que forman parte del subsitio esterásico, orientan sus cadenas laterales hacia el sitio de unión del sustrato, delimitando el “hueco de acomodo del resto acilo” en torno a la Ser200. Así, la Ser200 queda perfectamente alineada para el ataque nucleofílico al carbonilo de la ACh. Para que la reacción ocurra, el anillo imidazólico de la His440 exalta el carácter nucleofílico del hidroxilo de la Ser catalítica. El efecto polarizante del anión carboxilato del Glu327, unido por puente de hidrógeno a la His440, facilita el proceso. En cuanto a la desacilación (recuperación de la enzima por hidrólisis del intermedio acetil-enzima) seguramente transcurre por inversión de las etapas anteriores.

El dominio catalítico está compuesto por varios subdominios en las regiones N-terminal y C-terminal que, sin llegar a solaparse, mantienen un estrecho contacto entre sí. Esta interacción es notable en el sitio periférico, donde 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” (Morel y col., 1999).

Los datos concuerdan con las propuestas teóricas basadas en la dinámica proteica, las cuales sugieren la existencia de una ruta alternativa, denominada “puerta trasera” (del inglés “back door”), por la cual la colina abandonaría el centro activo evitando cualquier problema de tráfico con la entrada de sustratos a lo largo del pasillo catalítico (Gilson y col., 1994; Kronman y col., 1994). Pese a los detractores de esta propuesta,

los ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales y los experimentos de simulación apoyan esta hipótesis (Simon y col., 1999). Al estudiar cómo diferentes ligandos abandonan el centro activo de la AChE de *Torpedo* se observa que los ligandos pequeños y apolares como el ión amonio y el metano salen por varias rutas.

La ruta principal es a través del pasillo catalítico; otra salida es por la puerta trasera cerca del Trp84, y la tercera es la ruta lateral, situada a 45° de la salida principal. En cuanto a los ligandos grandes (metilamonio) o polares (ácido acético) salen por la vía principal, pero el tetrametilamonio y el neopentano (muy voluminosos), así como el ión acetato (pequeño) quedan atrapados en el hueco catalítico durante el tiempo de la simulación.

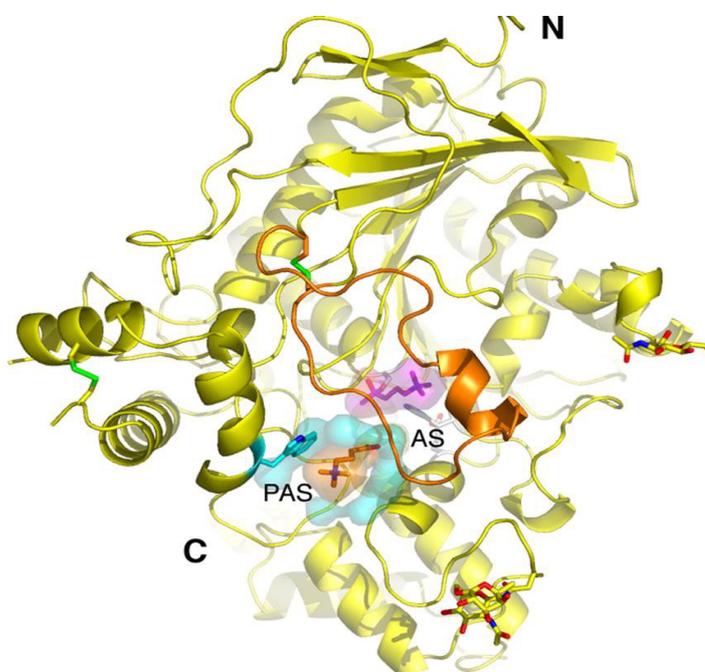


Figura I.2. Estructura tridimensional de AChE. El modelo de cintas muestra la localización del centro activo (AS), el sitio aniónico periférico (PAS), los puentes disulfuro (verde) y los sitios de N-glicosilación (en varillas, con átomos de oxígeno y nitrógeno en rojo y azul). El bucle Ω Cys69-Cys96 está indicado en naranja. Tomada de Bourne y col, (2006).

Se ha propuesto que AChE tiene otra región, el sitio aniónico periférico (PAS), del que carece la BuChE. Éste 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 PAS colabora en la unión de sustratos

con carga positiva, y en su posterior orientación hacia el centro activo, formando dipolos electrostáticos entre restos de la proteína cargados negativamente y el sustrato catiónico. Esta región parece que también está implicada en el fenómeno de inhibición por exceso de sustrato.

En la AChE humana los aminoácidos que conforman el PAS y que son cruciales en la fijación de ligandos al sitio periférico, son: Trp286, Tyr72 y Tyr124 (Trp279, Tyr70 y Tyr121 en *Torpedo*). Se cree que existe cierta comunicación entre el PAS y el centro activo de la AChE; numerosas pruebas apoyan que en la conexión participa el Asp74 (Asp72 en *Torpedo*), dado que interviene en procesos que ocurren en ambos sitios de la molécula. También es posible que el Asp74, cercano a la boca de la hendidura catalítica, informe al centro activo de la ocupación del sitio periférico mediante el resto Tyr331 (Tyr334 en *Torpedo*), al que se une por puente de hidrógeno, y que sea éste último el que transmita la información al aminoácido Tyr337 (Phe330 en *Torpedo*). La Tyr 337 se localiza en el subsitio hidrofóbico del centro activo y su rotación, impulsada por el movimiento de Tyr431, impide el acceso de otros ligandos al sitio activo (Shafferman y col., 1992b; Ordentlich y col., 1993; Barak y col., 1994).

Así mismo, la capacidad del PAS para ligar cationes podría explicar la dependencia de la hidrólisis de ACh con la fuerza iónica del medio, a través de variaciones en k_{cat} y K_m 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 y neurodegeneración. La capacidad de unir ligandos en el 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 esta manera se podría optimizar la disponibilidad de acetilcolina y la respuesta de los receptores colinérgicos.

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. La mayoría de las diferencias entre la BuChE humana y la AChE de *Torpedo* se limitan a los residuos que recubren el hueco catalítico, donde varios restos aromáticos han sido reemplazados por otros de tipo hidrofóbico en la BuChE; al hueco de unión al resto acilo, con las sustituciones de Phe288 y Phe290 de la AChE por Leu286 y Val288 en BuChE, respectivamente; y a la conformación de dicho hueco, lo cual permite alojar sustratos artificiales voluminosos y de diferente naturaleza en la BuChE (Masson y col., 1998; Nicolet y col., 2003). 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.

1.6. Inhibición de las colinesterasas

La existencia del sitio aniónico periférico 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 (Taylor y Lappi, 1975).

Los organofosforados (DFP y ecotiopato), organosulfatos (dimetoxona) y carbamatos (fisostigmina y prostigmina) se encuentran entre los inhibidores irreversibles (o muy lentamente reversibles) de AChE y BuChE. Los intermedios fosfato entre estas enzimas y los organofosforados son estables frente a la hidrólisis, con vidas medias entre pocas horas y varios días. Los intermedios con carbamatos y sulfonatos son más inestables.

Entre los inhibidores reversibles de AChE figuran el edofronio y la tacrina, que ocupan el subsitio aniónico, mientras que los ligandos bis-amonio cuaternario, decametonio y BW284c51 (**Fig. I.3**), con grupos amonio separados unos 14Å, se fijan a la vez al centro aniónico principal y al periférico, e impiden el acceso de otros inhibidores a cualquiera de ellos (Berman y col., 1980). La unión del BW284c51 a la AChE de *Torpedo* se muestra en la **Figura I.4**.

Las fasciculinas son péptidos pertenecientes a la familia de α -neurotoxinas de serpiente. Éstas no ocluyen completamente el acceso del ligando a la Ser del centro activo, sino que se unen al sitio periférico para impedir la catálisis (Bourne y col., 1995; 2003)

2. GENÉTICA DE LAS COLINESTERASAS

2.1. 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 como ocurre en *Drosophila* (Fournier y col., 1992), en el mosquito *Culex* y en el cefalocordado *Amphioxus* hay dos (Sutherland y col., 1997), y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* hay cuatro genes, que codifican moléculas activas pero se

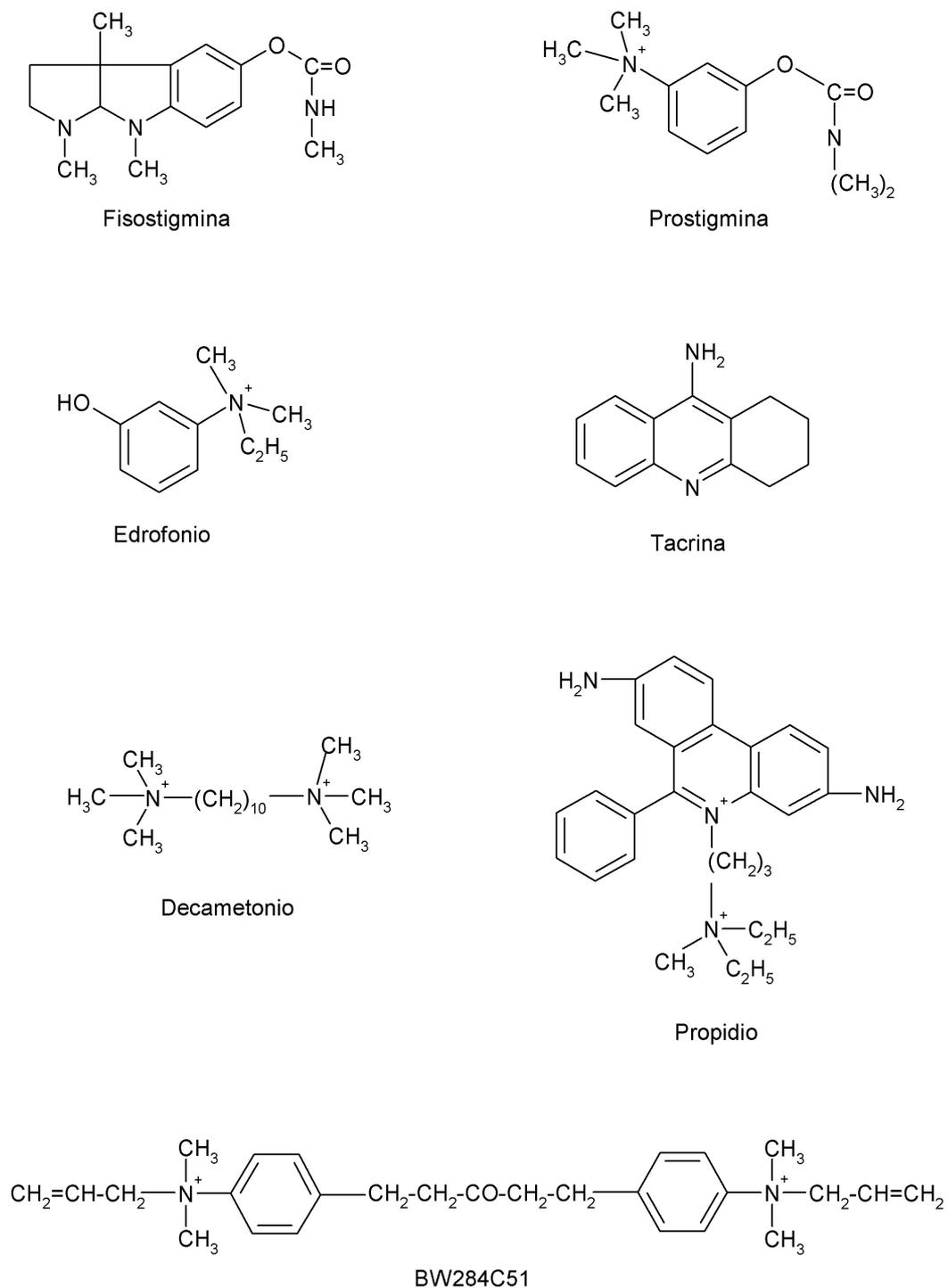


Figura I.3. Inhibidores de AChE. La inhibición de AChE por fisostigmina, prostigmina, edrofonio y tacrina se debe a su capacidad para unirse al sitio aniónico del centro activo. En cambio, el propidio interacciona con el centro aniónico periférico (PAS). Los compuestos bis-cuaternarios decametonio y BW284c51 pueden fijarse a los dos centros aniónicos.

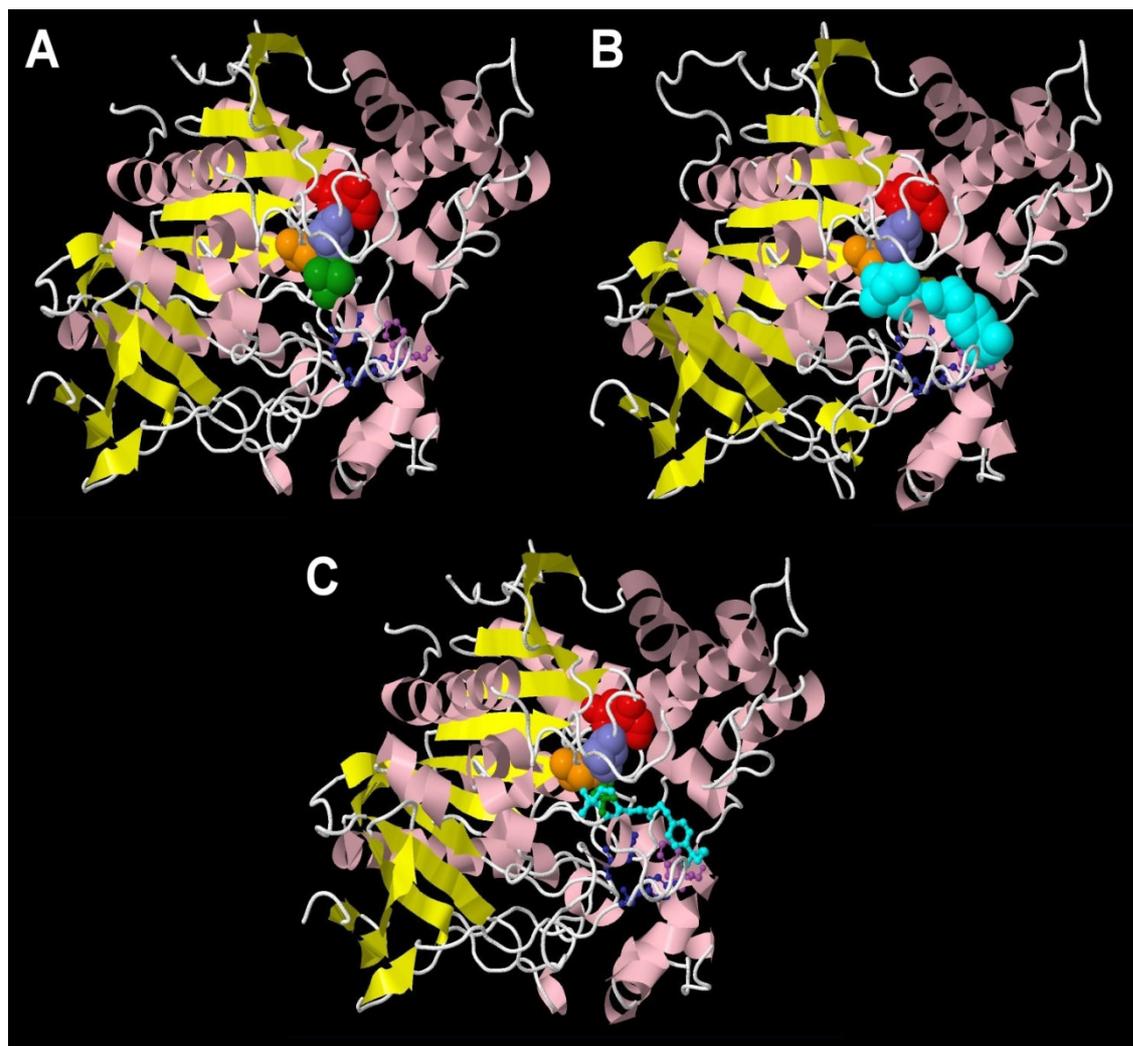


Figura I.4. Unión de acetilcolina y BW a la AChE. Se muestran dos modelos moleculares de la AChE de Torpedo (ahora llamado *Tetronarce californica*) obtenidos por difracción de rayos X. **A)** Estructura de AChE unida a ACh, en verde (PDB ID: 2ACE; 2,5 Å de resolución) (Raves y col., 1997). **B)** AChE unida a BW284c51, en azul turquesa (PDB ID: 1E3Q; 2,8 Å) (Felder y col., 2002). **C)** Solapamiento de ambas estructuras, mostrando por simplicidad sólo la cadena polipeptídica de la estructura 2ACE. En las tres figuras la proteína aparece en modelo de cintas, con las hélices en rosa y las hebras β en amarillo. La acetilcolina y el BW aparecen ambos en modelo espacial excepto en la Fig. C, donde se muestran como bolas y varillas para mostrar su solapamiento. Los aminoácidos de la triada catalítica están en modelo espacial en su color estándar: Ser200 en naranja, His440 en violeta y Glu327 en rojo. Tres residuos del PAS (Tyr70, Tyr121 y Trp279) se ven como bolas y varillas, en azul oscuro y violeta claro. Se observa cómo el sustrato ACh se une al centro activo, mientras que el BW es un inhibidor biquaternario que se une a la vez al centro activo y al PAS. El solapamiento se obtuvo con StrucAlign, una herramienta del PDB RCSB (www.rcsb.org/pdb), y la visualización se preparó con Jmol (www.jmol.org/).

diferencian en ciertas propiedades, como la Km y la sensibilidad a eserina (Arpagaus y col., 1998; Grauso y col., 1998; Combes y col., 2001).

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, como se vio poco después que ocurre en humano (Soreq y col., 1990) y en ratón (Rachinsky y col., 1990; Li y col., 1991). Posteriormente, se identificaron en pollo dos clases de subunidades de 100 KDa y 110 KDa, que representan los productos de 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 BCHE (Soreq y Zakut, 1993; Radic y col., 1994). Ambos genes muestran una organización similar en exones e intrones, pero difieren en la composición de nucleótidos; ACHE es rico en pares guanina-citosina (G+C), mientras que BCHE lo es en adenina-timina (A+T) (Chatonnet y Lockridge, 1989; Chatonnet y Jbilo, 1991). Probablemente la duplicación del gen ancestral que originó los genes ACHE y BCHE ocurrió antes de la evolución de los primeros vertebrados (Soreq y col., 1990; Taylor, 1991); y a la duplicación debió seguir un proceso de divergencia, de acuerdo con la expresión específica del tejido o del estadio de desarrollo. Esta divergencia se tradujo en cambios en la composición de bases, para acomodarse a las regiones genómicas que incluyen los genes de ACHE y BCHE (Chatonnet y col., 1991). Existe una ChE en el pez teleosteo *Oryzias latipes* que es diferente a la AChE o BuChE de los vertebrados y que podría considerarse una forma de transición entre las dos (Pezementi y col., 2011). La identificación de los dos genes distintos en todos los vertebrados sugiere que ambos productos proteicos son importantes para su supervivencia, y que desarrollan funciones distintas.

El gen humano de AChE se localiza en el cromosoma 7 (región q22) (Ehrlich y col., 1992; Getman y col., 1992) y el de BuChE en el cromosoma 3 (3q26) (Gnatt y col., 1991).

El gen ACHE humano (7 Kb) incluye 6 exones y 4 intrones. El exón 1 clásico no se traduce; los exones 2, 3, y 4 (4,5-4,7 Kb) aportan toda la información necesaria para generar una proteína catalíticamente activa. El ensamblado alternativo de los exones 5 y 6, en el extremo 3', da lugar a varios mRNA cuyos productos proteicos difieren en el extremo C-terminal. La región C-terminal es la principal responsable del polimorfismo molecular de AChE. Como resultado de los distintos modos de procesamiento del transcrito primario, las subunidades de AChE pueden ser subunidades T, H, R o S, según sea su péptido C-terminal, como se discute más adelante (**apdo. 2.3**). El

dominio C-terminal no es necesario para la actividad catalítica, pero decide la capacidad de oligomerización y el destino final de los oligómeros (Maulet y col., 1990; Grisaru y col., 1999b; Legay, 2000; Massoulié, 2002). El uso de distintos promotores da lugar a variantes en 5' del mRNA de AChE con distintos exones E1 (E1e, E1c y E1a, en humanos). Los mRNA con E1e generan subunidades N-extendidas (Meshorer y Soreq, 2006).

El gen BCHE (73 Kb) es mucho mayor que el de AChE, y está formado por 4 exones. El segundo exón contiene la mayor parte de la secuencia codificadora (83%) y codifica el extremo N-terminal y el centro activo; el exón 3 es de pequeño tamaño, y el exón 4 codifica el extremo C-terminal. Además, el gen presenta tres intrones: el intrón 1, de pequeño tamaño (6,5 Kb), y los intrones 2 y 3 de unas 32 Kb cada uno (Arpagaus y col., 1990; Gnatt y col., 1991). A diferencia de AChE, existen un gran número de variantes alélicas de la BuChE humana, que difieren en su actividad, estabilidad o producción enzimática (Lockridge, 1990).

2.2. Elementos de control

La variedad de moléculas de AChE están codificadas por un único gen en especies como *Drosophila* (Hall y Spierer, 1986), *Torpedo* (Schumacher y col., 1986; Sikorav y col., 1987; Maulet y col., 1990), rata (Legay y col., 1993a), ratón (Li y col., 1991) y humano (Soreq y Zakut, 1990b).

Una vez establecida la existencia de un solo gen para AChE en vertebrados, 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 esencial para la expresión del gen en tejidos sanos, y posee secuencias consenso para la unión de varios factores de transcripción, incluyendo secuencias de reconocimiento para factores de transcripción propias de genes que se expresan en los tejidos muscular y nervioso, en células hematopoyéticas, y durante el desarrollo embrionario. Por tanto, incluye secuencias que se corresponden con la abundancia de AChE en ciertos tejidos (Getman y col., 1992; Ben Aziz-Aloya y col., 1993b).

El promotor incluye motivos consenso para AML1/Runx1, un factor asociado a la leucemia (Perry y col., 2002) y para c-fos, otro factor de transcripción que regula la expresión del gen ACHE bajo condiciones de estrés (Kaufer y col., 1998). A unas 17 Kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de ACHE, hay un dominio potenciador distal con sitios de unión a factores osteogénicos, tales como el 17- β -estradiol y la 1,25-dihidroxitamina D3, dos sitios adyacentes de unión a HNF3 β ,

un elemento de respuesta a corticoides y sitios de unión para NF- κ B, c-fos y C/EBP (Shapira y col., 2000). El control transcripcional de la producción de AChE depende también de un potenciador interno, situado en el primer intrón, que posee 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. También posee secuencias asociadas con la expresión génica específica del músculo (factor MyoD) y motivos Zeste, GAGA y USF conocidos como sitios de reconocimiento de factores de transcripción, propios de genes inducidos durante el desarrollo embrionario (Ben Aziz-Aloya y col., 1993b). La **Figura I.5.A** muestra los sitios de unión para algunos factores de transcripción que regulan la expresión del gen ACHE.

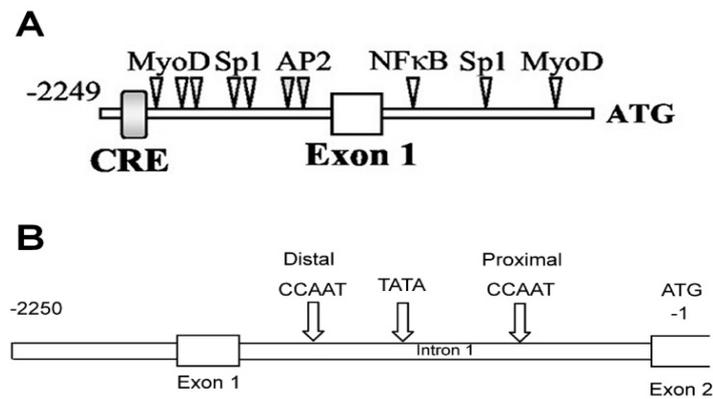


Figura I.5. Sitios de unión de factores de transcripción en el locus de AChE. En la figura **A)** se muestran los motivos de unión de algunos factores de transcripción localizados en distintas áreas del gen ACHE. Tomada de Siow y col. (2002). En **B)** se muestra uno de los sitios implicados en la regulación de la expresión de la AChE por calcio, el sitio CCAAT distal. Tomada de Zhu y col. (2007a). Con permiso de Elsevier.

Por otro lado, diversos factores de transcripción hematopoyéticos tienen sitios de unión en el promotor de AChE, tales como STAT5. Éste, junto con el receptor de glucocorticoides, participa en la modulación de la inducción transcripcional (Chida y col., 1998; Pfitzner y col., 1998; Batshake y col., 1999; Fuller y Zhang, 2001).

2.3. Ensamblado alternativo de exones

La eliminación de secuencias no codificantes del transcrito primario (intrones) y el posterior ensamblado de las secuencias adyacentes (exones), representa otro importante 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 y variable, muy importante por su papel en la oligomerización de las subunidades y en el destino celular de la proteína. Esta región C-terminal varía según sea el procesamiento del transcrito primario.

El procesamiento postranscripcional del mRNA de la AChE depende del tipo celular y del grado de desarrollo del tejido. Los procesos de corte y unión alternativa para dar los mRNA maduros, junto a los cambios postraduccionales, como glicosilación, adición de glicosilfosfatidilinositol (GPI), oligomerización de las subunidades catalíticas y/o adición de subunidades estructurales, son responsables en gran medida de la diversidad de formas moleculares de las ChEs, su localización subcelular y, por tanto, su función fisiológica. En mamíferos y *Torpedo* se han hallado tres tipos de mRNA de AChE diferentes, denominados transcritos T, H y R, que se originan por distintos modos de procesamiento en la zona 3' del mensajero primario de AChE (**Fig. I.6**).

El transcrito T (del inglés *tailed*, también llamado S, de *synaptic*) lleva los exones (E1)-E2-E3-E4-E6, ya que el exón E4 se une directamente al exón E6, por eliminación de la secuencia que los conecta, I4-E5. 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. El péptido T aporta propiedades hidrofóbicas a la proteína, así como la capacidad de tetramerización, mientras que en la dimerización interviene una zona común para las subunidades H y T. Las moléculas de AChE con subunidades T se localizan principalmente en cerebro y músculo de mamífero.

Las subunidades AChE-T generan monómeros y dímeros anfifílicos (G_1^A y G_2^A), tetrámeros anfifílicos (G_4^A) y tetrámeros no anfifílicos (G_4^{NA}) (Bon y Massoulié, 1997). También producen las asociaciones heteroméricas de tetrámeros de AChE con la subunidad colagénica Q (ColQ) (moléculas asimétricas o con tallo de colágeno) o con una subunidad de anclaje a la membrana rica en prolina (PRiMA, del inglés *Proline-rich membrane anchor*), dando moléculas ancladas a la membrana.

El mRNA con (E1)-E2-E3-E4-E5-(E6), el transcrito H (de *hydrophobic*, también llamado E, de *erythrocytic*), genera las subunidades H que forman los dímeros anfífilos de tipo I. Estos dímeros son capaces de fijarse a la membrana plasmática de células hematopoyéticas y otras células a través de un resto de glicosilfosfatidilinositol (GPI). En mamíferos, aunque el exón E6 permanece unido al E5 no se traduce, ya que la secuencia E5 contiene un codón de terminación. La región C-terminal hidrofóbica de las subunidades H (de 31 aminoácidos en humanos) contiene una o dos cisteínas próximas al dominio catalítico, que establecen uniones intercatenarias por puente disulfuro, y una señal para la sustitución enzimática de parte del péptido (29 restos) por un resto GPI en el retículo endoplasmático (Turner, 1994).

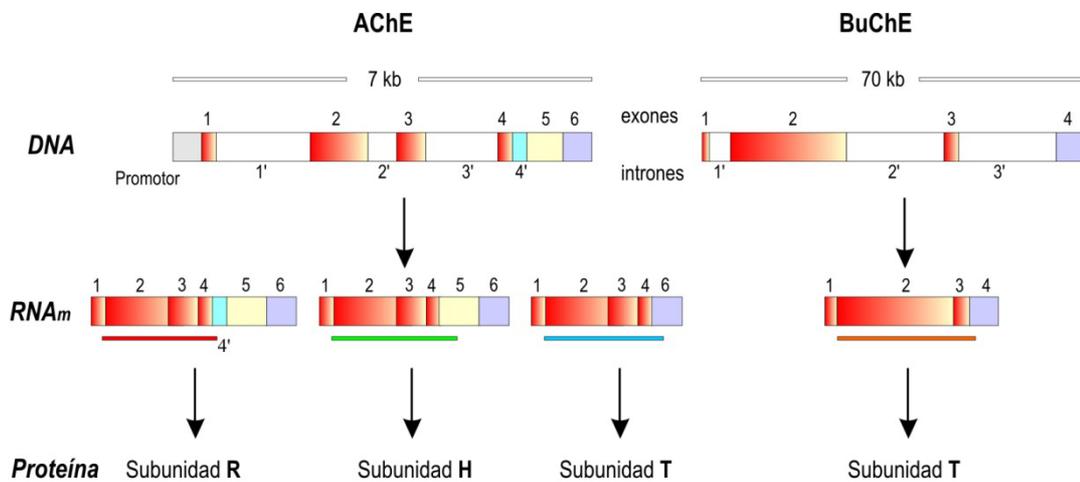


Figura I.6. Estructura de los genes de las colinesterasas de mamíferos. El esquema muestra las subunidades de AChE obtenidas por ensamblado alternativo del transcrito primario. Los exones comunes 2, 3 y 4 (de color rojo) poseen la información necesaria para generar un polipéptido catalíticamente activo, los exones alternativos (5 o 6) y el pseudointrón I4 (en diferentes colores) 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. La figura no recoge la variabilidad en 5', debida a distintos exones 1. Véanse Massoulié (2002) y Meshorer y Soreq (2006).

El péptido H contiene un sitio de corte denominado ω , que se convierte en el resto C-terminal de la proteína madura y que 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, siendo su localización más característica las células hematopoyéticas, donde degrada cualquier resto de acetilcolina presente en la corriente sanguínea. No obstante, las formas H se han detectado en muchos otros tejidos. De hecho, en muchos tejidos periféricos las formas más abundantes de AChE son las formas ligeras, es decir, dímeros y monómeros. Además, moléculas con subunidades H ancladas por GPI son la forma de AChE única o predominante en muchos órganos periféricos (distintos del sistema nervioso o del músculo), como riñón (Muñoz-Delgado y col., 2010), colon humano (Montenegro y col., 2006) y en hígado de ratón (Gómez y col., 2000). Los transcritos H y su proteína producto, la AChE con anclaje de GPI, no se han detectado en peces teleósteos, reptiles o aves.

Encontramos un tercer tipo de mRNA, el transcrito R (de *readthrough*), en *Torpedo* (Sikorav y col., 1988), en mamíferos (Legay y col., 1993a) y en varias líneas celulares tumorales (Karpel y col., 1994; 1996). Este mensajero conserva la secuencia pseudointrónica I4 situada en el extremo 3' a continuación del exón E4, seguida de los exones E5 y E6, quedando un mRNA maduro con la composición (E1)-E2-E3-E4-I4-(E5)-(E6). La secuencia codificadora incluye una parte de I4, donde un codón de parada señala el final de la traducción. El extremo C-terminal de la subunidad R consta de 30 aminoácidos (péptido R o ARP) y carece de Cys que le permitan formar dímeros por enlace disulfuro. Al parecer la subunidad R no tiene secuencias hidrofóbicas para interaccionar con los fosfolípidos de las membranas. Sin embargo, la inmunodetección con antisueros contra la AChE-R han revelado que la proteína R no sólo se halla como monómeros sino también como oligómeros y que la cantidad de AChE-R disminuye y la de AChE-T aumenta en el LCR de pacientes con Alzheimer (Grisaru y col., 2001; Darreh-Shori y col., 2004).

Se ha observado una sobreexpresión de transcritos R en el 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. Sus estudios sugieren el posible uso clínico del péptido ARP para el mantenimiento y expansión *ex vivo* de las células sanguíneas progenitoras (Mor y col., 2001; Deutsch y col., 2002; Grisaru y col., 2001).

Además se ha descrito que la AChE-R está implicada en la adquisición de la memoria a largo plazo en neuronas del hipocampo, tras un período de agresión intensa (Nijholt y col., 2003). Parece ser que en el interior de las neuronas, la AChE-R interacciona con la proteína RACK1 y ambas con la quinasa C β II (PKC β II) que participa en el acondicionamiento al miedo. En ratones normales sometidos a estrés moderado aumentan los niveles de AChE-R y PKC β II. Estos resultados sugieren que la AChE-R podría regular la funcionalidad de la PKC β II neuronal (Birikh y col., 2003).

En ciertas serpientes (*Bungarus*, *Naja*, etc.) se ha identificado un cuarto mRNA, el transcrito S (soluble o *snake*). En *Bungarus fasciatus*, el único gen ACHE carece de exón E5, conserva el E6 e incluye otro exón, llamado S, aguas abajo del E6. El exón S codifica un dominio C-terminal hidrofílico, con unos 15 aminoácidos y sin cisteínas (Cousin y col., 1998). El transcrito S se expresa en las glándulas productoras de veneno, aunque también en el hígado y músculo y genera monómeros solubles de AChE (Cousin y col., 1996). Durante la maduración postraducciona, se eliminan los últimos 8 restos del péptido S, tal vez inmediatamente antes de la secreción. La presencia de moléculas de AChE-S en los venenos de serpientes hizo pensar que el exón S surgió para la expresión de AChE en contextos diferentes de las sinapsis, lo que apoyó la existencia de las funciones no colinérgicas de AChE (Cousin y Bon, 1997).

El procesamiento postraducciona y el destino subcelular de las moléculas de AChE vienen determinados principalmente por los dominios C-terminales. Así, los diferentes tipos de subunidades se expresan de manera específica en distintos tejidos y tipos celulares. En mamífero adulto, las células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y, según la especie animal, plaquetas) producen principalmente AChE-H, mientras que los tejidos nerviosos central y periférico, y los músculos expresan subunidades AChE-T (Toutant y Massoulié, 1988; Legay y col., 1993b). Además, en función de la especie animal, la expresión de los diversos tipos de subunidades difiere notablemente en los tejidos; por ejemplo *Drosophila* contiene AChE-H en su sistema nervioso y *Torpedo* posee AChE-H en sus músculos, mientras que los mamíferos expresan subunidades AChE-T en ambos tejidos.

La complejidad del polimorfismo de la AChE es aún mayor ya que, además de las variantes de mRNA que se diferencian por su extremo 3' y, por tanto, producen subunidades con distintos extremos carboxilo terminales, también se distinguen varios tipos de transcritos según sea su extremo 5', el que codifica el extremo amino de la proteína (Meshorer y col., 2004). Existen 3 exones E1 en humanos y 5 en ratón. Aunque la mayoría de estos exones producen sólo regiones no traducidas (UTRs), uno

de ellos (E1e en humanos) da lugar a una proteína que posee un extremo N-terminal extendido, denominada N-AChE, y cuya expresión está regulada en el desarrollo y/o en la respuesta al estrés (Meshorer y Soreq, 2006). Dadas las diferentes combinaciones alternativas en 5' y 3' son posibles 12 mRNAs distintos en humanos (si incluimos la posible eliminación de un intrón críptico en E5), y unos 15 en ratón.

Parece ser que esta extensión N-terminal sirve como un dominio transmembrana, lo que permite a la AChE unirse a la membrana sináptica (Meshorer y Soreq, 2006) o a otras membranas celulares (Montenegro y col., 2017). Así, el extremo N-terminal de la N-AChE humana permite a la AChE-T o a la AChE-R monoméricas atravesar la membrana, confiriendo funciones fisiológicas sobre su dominio citoplasmático (Meshorer y col., 2004). El acoplamiento directo de la AChE a la membrana sináptica explicaría su presencia en regiones cerebrales que carecen de la subunidad de anclaje a la membrana rica en prolina (PRiMA), necesaria para anclar los tetrámeros de la AChE-T a la membrana sináptica (Perrier y col., 2002; 2003).

Por otro lado, los análisis secuenciales han revelado que este extremo N-terminal de AChE incluye múltiples sitios de interacción proteína-proteína. Entre ellos se encuentra un dominio de interacción SH3, así como sitios de unión a GSK3 (una quinasa asociada a ciclina G), lo cual indica la participación de variantes N-AChE en la vía apoptótica. Se ha visto que la N-AChE-T causa la muerte celular y alteraciones morfológicas en los cultivos cerebrales, activando una vía apoptótica que incluye la activación de GSK3, Bax y caspasas (Toiber y col., 2008).

La elevada homología en las secuencias de los genes ACHE y BCHE sugiere que ambas enzimas desarrollan funciones fisiológicas parecidas. El gen ACHE tiende a replicarse y transcribirse en las etapas tempranas del ciclo celular e incluye un dominio atenuador rico en G+C, implicado en el control de su propia transcripción. Sin embargo, el gen BCHE lleva secuencias codificadoras para aumentar la expresión durante la división de las células (Soreq y col., 1990).

Se sabe poco sobre el procesamiento del gen BCHE. Los resultados descartan la formación de varios transcritos por ensamblado alternativo de exones, por tanto, se admite que todas las formas moleculares de BuChE proceden de la subunidad T, el producto del único transcrito. Parece ser que la oligomerización de las subunidades de BuChE está regulada por proteínas que se expresan en tejidos específicos. Así, cuando se inyecta mRNA para BuChE (transcrito *in vitro*) en ovocitos de *Xenopus* se forman dímeros, mientras que en el tejido de origen (cerebro y músculo humanos), el mismo mensajero proporciona varias formas moleculares (Dreyfus y col., 1989; Soreq y col., 1989).

En humanos se han identificado distintas variantes alélicas naturales del gen BCHE, como resultado de mutaciones puntuales (Furtado-Alle y col., 2008; Parmo-Folloni y col., 2008; Jensen y col., 1995). Estas variantes difieren en la actividad de la enzima, estabilidad e, incluso, en la cantidad de proteína producida. Así, se ha visto que en la variante silenciosa de BuChE Ala328Asp, el carboxilato del Asp328 puede formar enlaces iónicos con la Lys339 o puentes de hidrógeno con la His438, dificultando la unión de sustratos catiónicos al centro catalítico y convirtiéndose en una variante no activa catalíticamente (Lushchekina y col., 2016).

3. FORMAS MOLECULARES DE LAS COLINESTERASAS

3.1. Introducción

La extraordinaria diversidad molecular que muestran las ChEs procede de cambios a nivel genético, transcripcional, postranscripcional y postraducciona. Éstos van a determinar su localización y función en las sinapsis colinérgicas y en regiones no sinápticas.

La variedad de moléculas de AChE y BuChE que podemos encontrar en los tejidos y fluidos biológicos resulta de la asociación de un número variable de subunidades catalíticas idénticas entre sí (entre 1 y 12), que pueden presentarse como monómeros o como homo-oligómeros, pero también pueden unirse a proteínas estructurales, dando lugar a hetero-oligómeros. Cada molécula de AChE y BuChE corresponde a una forma molecular, siguiendo 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 interconvierten de manera espontánea (Massoulié y Bon, 1982). Algunos autores utilizan el término de “isoenzima” para referirse a las formas moleculares de las ChEs, pero según la IUPAC, dicho término se aplica a proteínas oligoméricas cuyas subunidades proceden de genes distintos y que por tanto, difieren en la secuencia polipeptídica.

La subunidad catalítica de AChE tiene una masa molecular que varía entre 70 y 80 KDa, aunque en algunos casos alcanza los 100-110 KDa, como ocurre con la AChE de cerebro de pollo (Rotundo, 1984b). Algunas de las formas moleculares poseen una subunidad de anclaje no catalítica que puede ser colagénica (subunidad ColQ o Q) o hidrofóbica (subunidad PRiMA o P). Se denominan formas homoméricas las que sólo presentan subunidades catalíticas, y formas heteroméricas las que además contienen subunidades estructurales (Massoulié y col., 1993a).

Aunque todas las formas moleculares tienen las mismas propiedades catalíticas, difieren en la solubilidad, interacciones iónicas o hidrofóbicas y restos de carbohidratos, además de en sus propiedades hidrodinámicas y estructura cuaternaria (factor que determina la localización celular, según Massoulié (1982). En base a estas diferencias, existen diversos medios para separar los componentes moleculares de AChE y BuChE tras la homogenización de los tejidos, tales como la sedimentación en gradientes de densidad de sacarosa, la cromatografía de exclusión en gel, y la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes (Bon y col., 1991).

Las moléculas de AChE y BuChE se clasifican en dos grupos diferentes: el de las formas globulares (G) y el de las formas asimétricas (A) y se nombran como G o A, más un subíndice que indica el número de subunidades catalíticas. Las formas G pueden ser monómeros (G_1), dímeros (G_2) o tetrámeros (G_4) de subunidades catalíticas. Las formas G_4 pueden presentarse como moléculas homoméricas o moléculas heteroméricas con la subunidad hidrofóbica PRiMA. Las formas A son todas heteroméricas y contienen uno, dos o tres tetrámeros catalíticos (A_4 , A_8 y A_{12}) asociados a un tallo colagénico (subunidad ColQ) (Bon y col., 1979; Toutant y Massoulié, 1987). En la **Figura I.7** se muestran las principales formas moleculares de AChE.

La heterogeneidad estructural de AChE y de BuChE en vertebrados es parecida, ya que a cada forma molecular de AChE le corresponde otra de BuChE (Massoulié y Bon, 1982; Silman y Futerman, 1987; Chatonnet y Lockridge, 1989; Massoulié y col., 1993b).

Cada forma molecular de AChE (o BuChE) se identifica por su coeficiente de sedimentación (una medida de su velocidad de migración durante una centrifugación), siendo el de cada forma de AChE ligeramente menor que el de la forma correspondiente de BuChE. No se han observado diferencias apreciables en dicho coeficiente entre las formas de AChE (o BuChE) extraídas de distintos tejidos del mismo organismo o de distintos organismos.

Dado que el estado de asociación molecular es el responsable en gran medida de la localización celular, el polimorfismo estructural de las ChEs servirá para facilitar el transporte, la localización y la asociación estable de las enzimas en su sitio funcional. No parece que la variabilidad estructural represente una ventaja cinética, puesto que la actividad hidrolítica de los centros activos es independiente del número y de la organización de las subunidades, hecho que se ve reforzado por la falta de

cooperatividad entre las subunidades de los oligómeros (Vigny y col., 1978; Viratelle y Bernhard, 1980).

La distribución de las formas moleculares en una misma especie animal difiere mucho de un tejido a otro, hasta el punto de que cada tejido tiene una composición

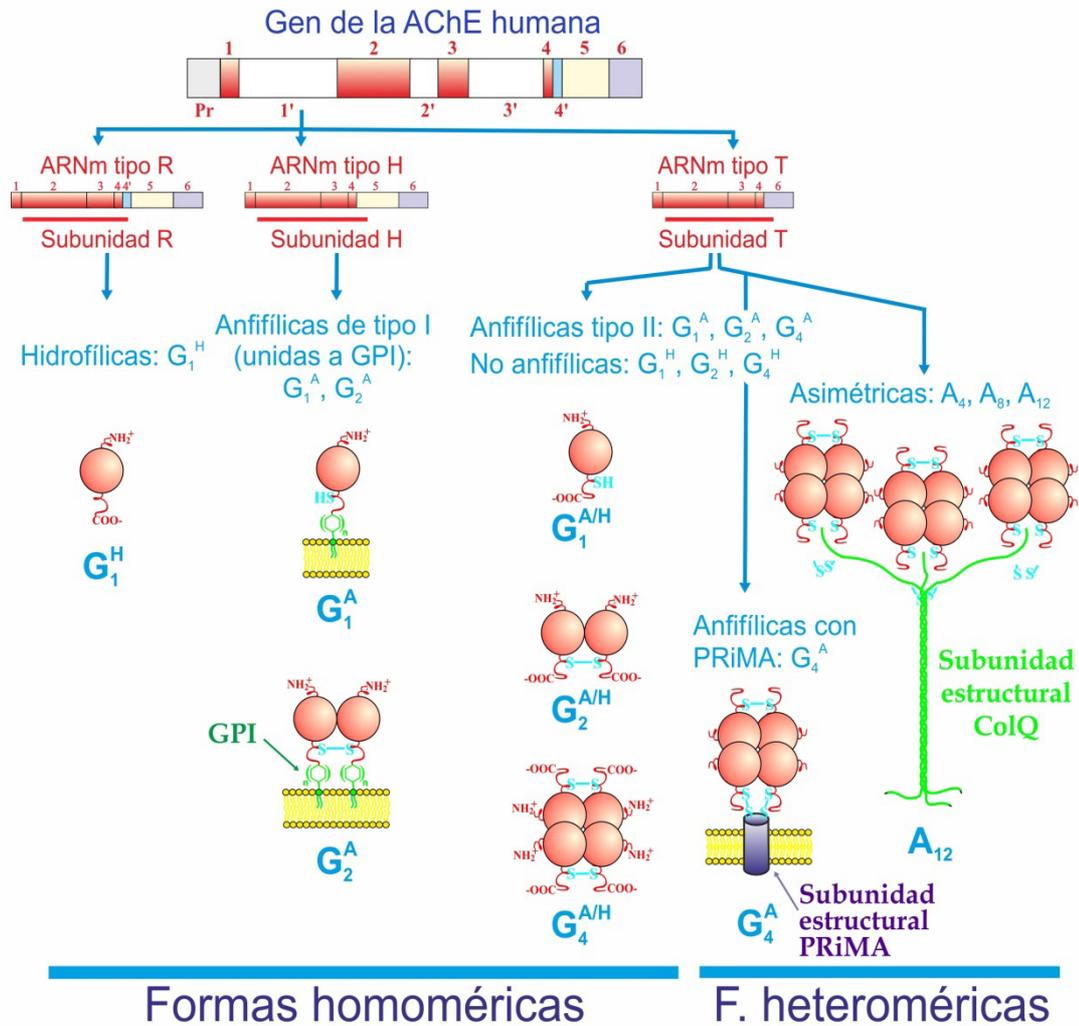


Figura I.7. Formas moleculares de las colinesterasas. Se representa el gen de la AChE humana, los mensajeros generados por ensamblado alternativo, y la variedad de formas moleculares que se obtiene de cada mensajero. El criterio básico de clasificación distingue entre formas globulares (G) y asimétricas (A); éstas tienen una subunidad ColQ de naturaleza colagénica. Las moléculas homoméricas tienen sólo subunidades catalíticas, mientras que las formas heteroméricas tienen también una subunidad estructural (PRiMA o ColQ). Este esquema no refleja la variación debida a la presencia o no de la N-extensión. Véase Massoulié (2002; 2005).

particular de moléculas de AChE y/o BuChE, seguramente para satisfacer sus necesidades funcionales específicas. En algunas patologías el patrón de formas moleculares se altera y el cambio en su distribución ayuda al diagnóstico. Es el caso de las distrofias musculares (Cabezas-Herrera y col., 1997), de la enfermedad de Alzheimer (Sáez-Valero y col., 1997; 1999) y de la de Hirschsprung (Caussé y col., 1987).

En cuanto a la distrofia, se sabe que los ratones distróficos *Lama2dy*, que son deficientes en merosina (cadena $\alpha 2$ de laminina), y son por ello un modelo de distrofia muscular congénita, presentan un importante déficit de tetrámeros anfifílicos (G_4^A) de AChE y BuChE en músculo (1994b; Cabezas-Herrera y col., 1994a), así como de los G_4^A de BuChE en nervio ciático (Moral-Naranjo y col., 2002). Estos tetrámeros anfifílicos contienen la subunidad estructural PRiMA, y su disminución por la distrofia se explica por una menor disponibilidad de esta subunidad, ya que los niveles del mRNA para PRiMA disminuyen mucho en el nervio y especialmente en el músculo de los ratones distróficos en comparación con los sanos (Moral-Naranjo y col., 2010; Vidal y col., 2013).

El patrón de formas moleculares de las ChEs también se ve alterado en diversos procesos tumorales (Vidal, 2005). Por ejemplo, en los nódulos linfáticos axilares la metástasis de cáncer de mama altera mucho el patrón de formas de AChE, produciendo la pérdida de las formas A_8 y A_4 (Ruiz-Espejo y col., 2003), y los componentes G_4^A de BuChE disminuyen mucho en las muestras cancerosas de pulmón (Martínez-Moreno y col., 2006).

3.2. 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 cadenas colagénicas (ColQ). Cada cadena puede llevar unido un tetrámero de subunidades catalíticas tipo T, por lo que se distinguen formas A_4 , A_8 y A_{12} , según lleven uno, dos o tres tetrámeros.

El tallo colagénico es rico en hidroxiprolina e hidroxilisina (Anglister y col., 1976; Rosenberry y col., 1980), es sensible a colagenasa y reacciona con anticuerpos contra el colágeno (Anglister y col., 1979). El gen de ColQ se clonó primero en *Torpedo* (Krejci y col., 1991a) y después en mamíferos (Krejci y col., 1997; Massoulié, 2002). En los tetrámeros unidos al tallo, dos de las subunidades catalíticas permanecen unidas entre sí por enlace disulfuro dando un dímero, y las otras dos se asocian al tallo también por puentes disulfuro (Rosenberry y Richardson, 1977). A pesar de esto, se

ha visto que las cisteínas no son imprescindibles para la unión de las subunidades catalíticas al tallo de colágeno. Dicho tallo contiene dos dominios HBDs (del inglés *heparin-binding domains*); ambos incluyen la secuencia consenso propia de las proteínas que se unen a heparina (grupos de aminoácidos básicos), 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).

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., 1978; 1979). 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 (Hall y Kelly, 1971; Lwebuga-Mukasa y col., 1976; McMahan y col., 1978). Además, pueden quedar inmovilizadas en la lámina basal del músculo por interacciones covalentes con otras proteínas, probablemente con la participación de una transglutaminasa (Emmerling y col., 1981). 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 en el anclaje de las formas asimétricas a la lámina basal.

Las formas asimétricas de AChE se hallan en todos los vertebrados, pero no han sido detectadas en invertebrados, por lo que debieron aparecer en alguna etapa temprana en la evolución de los vertebrados, cuando aún existía un único gen de colinesterasas (Massoulié y col., 1993a).

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. Los órganos eléctricos de *Torpedo* y *Electrophorus* son también ricos en formas asimétricas de AChE.

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 estructural entre ellas (1988c; Tsim y col., 1988b). Estas moléculas híbridas desaparecen en el pollo normal adulto (Tsim y col., 1988a), aunque permanecen en el músculo distrófico, posiblemente como restos de una organización molecular primitiva.

3.3. Formas globulares

Formas globulares son todas aquellas formas moleculares de las ChEs 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, 1987).

Constituyen un grupo heterogéneo de moléculas que se pueden agrupar según diferentes criterios. De acuerdo con su coeficiente de sedimentación, encontramos monómeros G_1 (entre 3,5 y 5S), dímeros G_2 (5-7S) y tetrámeros G_4 (9-11S). Las formas G_4 de AChE y BuChE pueden ser anfifílicas o hidrofílicas, siendo anfifílicas las que llevan la subunidad hidrofóbica PRiMA. Las variantes con PRiMA son frecuentes en las membranas del sistema nervioso central (Inestrosa y col., 1987; Boschetti y Brodbeck, 1996).

3.3.1. Formas globulares anfifílicas y no anfifílicas: Interacciones hidrofóbicas

Las formas globulares de AChE y BuChE se pueden encontrar como variantes anfifílicas (G^A) y no anfifílicas o hidrofílicas (G^{NA} o G^H). Las formas anfifílicas llevan una región hidrofóbica que permite su asociación a los lípidos de las membranas, liposomas y micelas de detergente. La formación de agregados enzima-detergente afecta al 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 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 desnaturizantes (García-Ayllón y col., 1999). Por esto, usando distintos detergentes podemos conocer el comportamiento hidrodinámico de una determinada forma molecular de AChE o BuChE, siendo los detergentes más usados para este fin 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 (Grassi y col., 1982; Cánovas-Muñoz y col., 1990; Sáez-Valero y col., 1993). En general, el tamaño del dominio, o del componente hidrofóbico, es mucho menor que la enzima, por lo que las moléculas anfifílicas de AChE o BuChE se consideran ectoenzimas. Algunas formas anfifílicas pierden sus dominios hidrofóbicos por exposición a fosfolipasas, dando moléculas catalíticamente activas, muy parecidas en tamaño a las originales, pero incapaces de asociarse con liposomas y detergentes (Moya-Quiles y col., 1992).

3.3.2. Formas globulares con subunidades AChE-H: Moléculas Anfifílicas de Tipo I

Se conocen dos tipos de dímeros anfifílicos (I y II), cada uno generado por un mRNA maduro distinto. Los dímeros de tipo I poseen subunidades H, que llevan un péptido C-terminal con una o dos cisteínas y una señal para incorporar un resto de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Como ocurre con otras proteínas ancladas por GPI, cuando se sintetizan las subunidades H quedan unidas por su extremo C-terminal a la membrana del retículo endoplásmico, pero rápidamente la GPI transamidasa corta la proteína cerca de su anclaje a la membrana, y une un resto de GPI preformado (fosfatidilinositol-oligosacárido-etanolamina) al nuevo extremo carboxilo terminal, por enlace amida (Bon y col., 1988). El fosfolípido confiere propiedades anfifílicas a las moléculas, de modo que les sirve de anclaje. Cada resto de GPI contiene etanolamina, por la que se une a la cadena polipeptídica; un glicano con 4 monosacáridos de composición variable (Toutant y col., 1990), y fosfatidilinositol, cuyos restos de ácidos grasos saturados e insaturados quedan incluidos en la membrana (**Fig. I.8**).

Se han localizado formas anfifílicas G₂ tipo I en eritrocitos y linfocitos de mamíferos (Low y Finean, 1977; Roberts y Rosenberry, 1985; Gomez y col., 2003; Nieto-Cerón, 2004; Nieto-Cerón y col., 2005), 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., 1999; Nieto-Cerón y col., 2005), y en músculo esquelético y cardíaco de ratón (Gomez y col., 1999; Moral-Naranjo y col., 2010; García y col., 1988). Aunque la bibliografía refleja una tendencia a considerar que en mamíferos la AChE con GPI se limita a las células sanguíneas (Massoulié y col., 2005), en humanos los dímeros y monómeros de AChE anclados por GPI están presentes en mama (Ruiz-Espejo y col., 2002), intestino (Montenegro y col., 2006), pulmón (Martínez-Moreno y col., 2006), riñón (Muñoz-Delgado y col., 2010) y epitelio respiratorio (Castillo-González y col., 2015). De hecho, en estos órganos son las formas predominantes de AChE, si no las únicas. También se han encontrado dímeros y monómeros con GPI en células tumorales humanas (Sáez-Valero y Vidal, 1995; Sáez-Valero y col., 1996) y monómeros en larvas de *Drosophila* (Toutant y col., 1988). No se han detectado moléculas de BuChE con GPI, a excepción de un “intermedio” de colinesterasa en músculo de platija (Stieger y col., 1989).

A pesar de que los péptidos C-terminales de las subunidades H de AChE de *Torpedo* y de mamíferos carecen de homología de secuencia, tienen en común dos características funcionales: 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 la existencia de una región hidrofóbica en el extremo C-terminal del péptido H, precedida por una señal de corte que permite la incorporación de un resto de GPI (Massoulié, 2002; Massoulié y col., 2008).

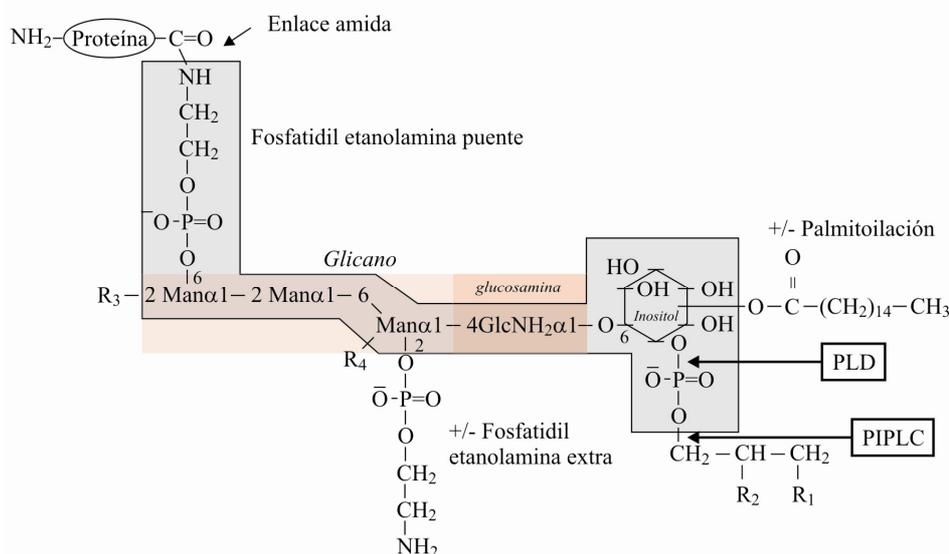


Figura I.8. Estructura del resto glicosilfosfatidilinositol (GPI) que fija las subunidades AChE-H a la membrana. Los monómeros y dímeros de AChE de tipo I tienen GPI. R_1 y R_2 indican restos alquilo o acilo. En la AChE de eritrocito humano, el dominio hidrofóbico del glicolípido es un alquil ($\text{R}_1\text{-O}$) acil ($\text{R}_2\text{-COO}$) 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 secreción de precursores no procesados de AChE-H puede contribuir, en parte, a la producción de AChE libre, como la que se encuentra en el plasma sanguíneo (Massoulié, 2002). En las células hematopoyéticas de mamíferos, la expresión de AChE-H se relaciona con la diferenciación (Lapidot-Lifson y col., 1989; Patinkin y col., 1990). No obstante, no está claro su significado biológico en la membrana de las células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y plaquetas), porque su actividad varía mucho entre distintas especies animales, e incluso no aparece en las células sanguíneas de anfibios, reptiles y aves. Probablemente sirve, junto con la BuChE plasmática, para hidrolizar la ACh que pudiera difundir al plasma (Massoulié y col., 2008). También se le han propuesto funciones en la regulación de la permeabilidad de la membrana (Massoulié y col., 2005).

Inmediatamente después de la síntesis de AChE en el retículo endoplasmático, la subunidad AChE-H incorpora rápidamente un resto de GPI preformado en el propio retículo. La estructura del resto GPI depende de la maquinaria biosintética de la célula, por lo que su composición varía entre las formas G₂ ligadas a la membrana plasmática de varios tipos celulares, o en las mismas células de diferentes mamíferos. En un mismo tejido pueden coexistir varios tipos de dímeros de AChE que difieran en la fracción glucídica y/o lipídica. Por ejemplo, en humanos y *Drosophila*, el dominio hidrofóbico de los dímeros anfifílicos de AChE tipo I consiste en un alquilacilglicerol (Toutant y Arpagaus, 1990; Toutant y col., 1991).

Un criterio muy usado para demostrar la presencia de un resto de GPI en una proteína de membrana es la conversión de la proteína de anfifílica en hidrofílica por tratamiento con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) (Toutant y col., 1990). Las fosfolipasas C cortan el enlace entre el grupo fosfato y el diacilglicerol de un fosfolípido. No obstante, la acilación del anillo de myo-inositol 1-2 monofosfato (Li y col., 1993) confiere resistencia a la fosfolipasa C, ya que no se puede formar el intermedio cíclico, siendo necesario un tratamiento previo con hidroxilamina alcalina para eliminar el grupo acilo. Esto ocurre con la AChE de eritrocito humano, en la que un hidroxilo del inositol está esterificado con palmitato (Roberts y col., 1988).

Se propuso que un posible significado biológico de la incorporación del resto GPI en la AChE podría ser servir para el control selectivo de su liberación, que puede tener lugar a varios niveles. Un punto de control vendría establecido por la acción de fosfolipasas endógenas, en respuesta a determinados estímulos (Low y col., 1986). A su vez, la acción de la fosfolipasa endógena generaría diacilglicerol o alquilacilglicerol, dos segundos mensajeros que activan la proteína quinasa C (Varela-Nieto y col., 1996; Brodbeck, 1998). Parece probable que una PIPLC endógena pueda actuar *in vivo* liberando AChE de las membranas, como sugiere la presencia de abundantes formas líticas en *Drosophila*.

Por otra parte, hay datos que sugieren que la acilación del glicosilfosfatidilinositol es necesaria para generar el precursor del glicofosfolípido de anclaje. Así se establece otro punto de control de la liberación de AChE, ya que la desacilación del glicofosfoinositol o de un precursor inmediato es un paso crítico para que la AChE se libere con la fosfolipasa (Li y col., 1993).

Se ha visto que las moléculas con anclaje a la membrana a través de GPI no tienen una distribución uniforme en la membrana plasmática, sino que se sitúan en unos microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol, denominados “rafts” o “balsas lipídicas”. De este modo, se ha encontrado que la AChE-H glipiada producida en

hígado de ratón se encuentra confinada en estos microdominios (Montenegro y col., 2017), en los que, además, se ha demostrado la existencia de ciertos componentes del sistema colinérgico como el mAChR-M3 (Montenegro y col., 2017; Oldfield y col., 2009); el nAChR- $\alpha 7$ (Hicks y col., 2011) y un transportador de colina (Cuddy y col., 2014). Esto podría estar relacionado con su papel en la transducción de señales (Stetzkowski-Marden y col., 2006). También se han observado moléculas de AChE-H con GPI en rafts del músculo de ratón, lo que sugiere que es necesaria la incorporación de GPI a estas moléculas para su localización en la membrana plasmática (Moral-Naranjo y col., 2008).

3.3.3. Formas globulares derivadas de las subunidades AChE-T

Las subunidades T de AChE y BuChE de vertebrados tienen la capacidad de asociarse para generar un amplio rango de formas moleculares, que incluye desde monómeros, dímeros y tetrámeros sin proteínas estructurales a moléculas heteroméricas complejas. El péptido T de las subunidades AChE-T y BuChE-T de vertebrados está constituido por 40 y 41 aminoácidos, respectivamente (Massoulié, 2002; 2008). 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 y G_2^A de tipo II (sin GPI), los tetrámeros homoméricos G_4^A y G_4^{NA} , y los tetrámeros asociados a las subunidades estructurales PRiMA y ColQ (Massoulié, 2002).

3.3.3.1. Monómeros y dímeros anfifílicos de tipo II

Las subunidades T de AChE y BuChE producen formas G_1^A y G_2^A de tipo II en proporciones variables, 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 que no se agregan en medios acuosos en ausencia de detergentes. Debido a que sus propiedades son semejantes a las de las formas anfifílicas tipo I, las moléculas homólogas pero sin GPI se denominan formas anfifílicas tipo II (Massoulié y col., 1993a).

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 (García-Ayllon y col., 1999).

3.3.3.2. Tetrámeros hidrofóbicos con la subunidad de anclaje PRiMA

En el sistema nervioso, los tetrámeros de AChE se unen a las membranas celulares a través de PRiMA, de modo similar a como las formas asimétricas se fijan a la lámina basal de la unión neuromuscular por la subunidad ColQ (Perrier y col., 2002). Los tetrámeros con PRiMA son las moléculas de AChE más abundantes en el sistema nervioso de mamíferos y sus subunidades catalíticas están codificadas por el transcrito T.

Estos tetrámeros hidrofóbicos están constituidos por cuatro subunidades catalíticas, dos de ellas unidas entre sí por enlaces disulfuro y otras dos subunidades asociadas al tallo hidrofóbico de 20 KDa por puentes disulfuro. El tallo se denomina PRiMA (del inglés, *proline-rich membrane anchor*), y anteriormente “subunidad P” (**Fig. I.9**). La proteína PRiMA es responsable de las propiedades anfifílicas de estos tetrámeros y sirve para anclarlos a las membranas celulares del sistema nervioso (Gennari y col., 1987). Al igual que ColQ, la proteína PRiMA puede unirse a las subunidades de BuChE. El uso de anticuerpos anti-PRiMA reveló que esta 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).

Es importante señalar 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 menor expresión del transcrito PRiMA en el músculo esquelético y nervio ciático de ratones con distrofia muscular (Moral-Naranjo y col., 2010; Vidal y col., 2013), 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 (Gisiger y Stephens, 1984; 1994b; Cabezas-Herrera y col., 1994a; 2012; Moral-Naranjo y col., 2002). La deficiencia de dichos tetrámeros en la membrana externa de la fibra muscular y las 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 (Sáez-Valero y col., 1993). Además, en el líquido cefalorraquídeo aparece un tercer tipo de molécula tetramérica, totalmente hidrofílica. Al ser liberada desde el sistema nervioso central, se considera un componente de secreción (Tornel y col., 1993; Dally y Greenfield, 1994).

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

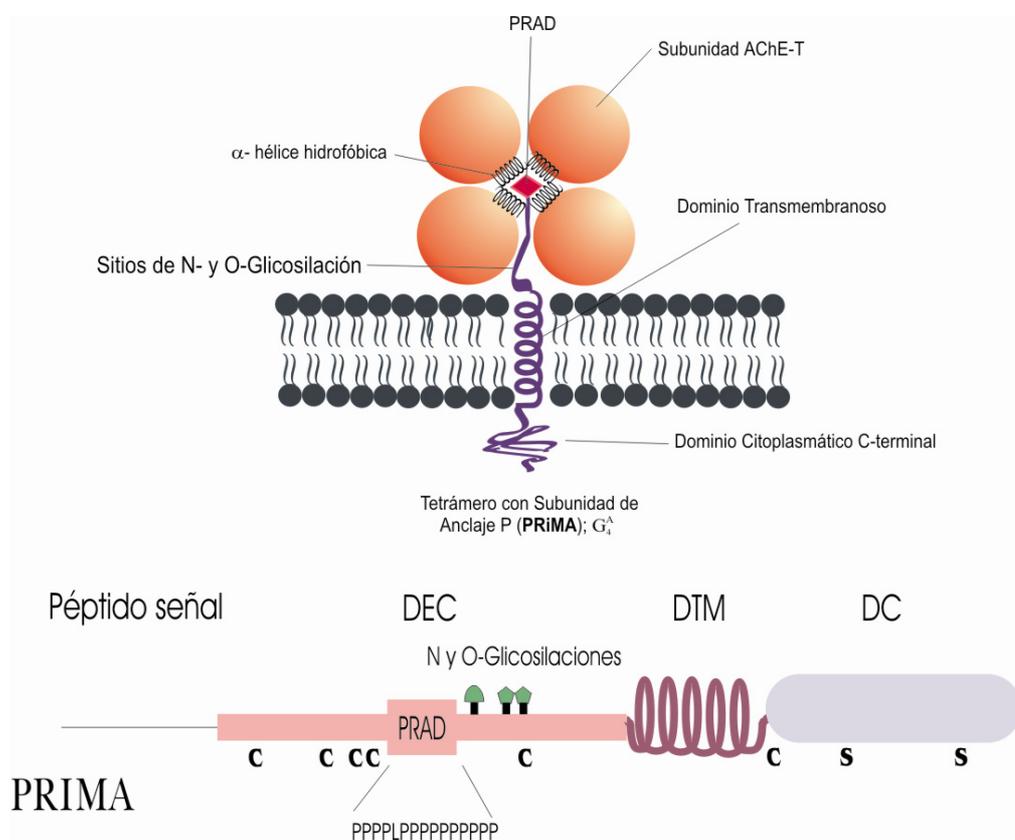


Figura I.9. Estructura de la forma molecular G_4^A de AChE con la proteína PRiMA. La proteína transmembranal PRiMA (20 kDa) sirve de anclaje a la membrana de los tetrámeros G_4^A . En la subunidad PRiMA se observan: **1)** el péptido señal N-terminal, seguido de un dominio extracelular (DEC) con 5 cisteínas, una secuencia rica en prolina (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. Tomada de Perrier y col. (2002). Con permiso de Elsevier.

3.3.4. Oligomerización de las subunidades AChE-H y AChE-T

Los dímeros formados con subunidades AChE-H poseen una estructura espacial en la que las hélices $\alpha_{7,8}$ y α_{10} del dominio catalítico de una subunidad interaccionan con las correspondientes de la otra subunidad, formando un haz de cuatro hélices (FHB, del inglés *four-helix bundle*). Los dímeros anclados por GPI sólo conservan algunos restos C-terminales del péptido H original, incluyendo la Cys que une las subunidades por puentes disulfuro, situada cerca del dominio catalítico. Las subunidades AChE-T también pueden formar dímeros, pero en este caso los puentes disulfuro intercatenarios se establecen entre Cys situadas cerca del extremo C-terminal del péptido T. Si en las subunidades T o H se sustituye la Cys por Ser se impide la dimerización. Las subunidades truncadas que contienen sólo el dominio catalítico (subunidades AChE_C) permanecen monoméricas, mientras que si conservan una cisteína terminal (AChE_{C2}) forman dímeros (Massoulié, 2002).

Experimentos de mutagénesis dirigida, en los que se sustituyeron aminoácidos en la superficie de las hélices α del FHB, mostraron que esas sustituciones disminuían mucho la formación de dímeros, tanto de las subunidades AChE-H como de las AChE-T, demostrando así que los dos tipos de subunidades utilizan el mismo motivo de interacción, el FHB (Morel y col., 2001).

La interfase dímero-dímero de los tetrámeros se extiende en una dirección perpendicular al plano constituido por los dos haces de cuatro hélices. El pequeño bucle Ω que hay entre los aminoácidos Cys257-Cys272, está muy conservado en las moléculas de AChE junto con las hélices α 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, situado sobre la entrada al pozo (Bourne y col., 1999).

4. BIOLOGÍA CELULAR DE LAS COLINESTERASAS

4.1. Biosíntesis y ensamblado

Las colinesterasas, al igual que otras glicoproteínas de membrana y de secreción, se sintetizan en ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso (RER) como precursores inactivos. Las cadenas de AChE y BuChE van entrando al lumen, donde incorporan el oligosacárido núcleo, pudiendo incorporar también restos de GPI, y pierden el péptido señal. Seguidamente, las subunidades adoptan la estructura terciaria óptima, generándose los dímeros y oligómeros, y adquieren actividad

enzimática (Massoulié y col., 1993a). Los oligosacáridos se modifican en el aparato de Golgi, donde a menudo incorporan N-acetilglucosamina y galactosa. También pueden incorporar ácido siálico, en función de la especie animal. Al final, sólo aquellas moléculas que hayan completado con éxito el procesamiento de sus cadenas de carbohidrato se dirigen al exterior, donde se liberan como moléculas de secreción o bien quedan asociadas a la superficie celular (Rotundo, 1984c). La **Figura I.10** esquematiza algunos de los procesos implicados en la biosíntesis, ensamblado y transporte de la AChE.

Diversos estudios han revelado la existencia de depósitos de AChE inactiva en distintos tejidos. Mediante marcaje radiactivo y análisis de sedimentación se ha podido seguir la biosíntesis de la AChE en la línea celular T28 de neuroblastoma de ratón (Lazar y col., 1984). En estas células abundan las formas G₁, mayoritariamente intracelulares, y las formas G₄ en la superficie celular. Además, las células vierten algunas formas G₁ y G₄ al medio de cultivo. Analizando la incorporación de aminoácidos radiactivos a la AChE sintetizada de *novo*, se observa que la forma G₁ se renueva rápidamente, en pocas horas, mientras que la sustitución de G₄ 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 adquiera el plegamiento adecuado y para que los puentes disulfuro estabilicen la conformación necesaria para la expresión de actividad.

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 y lugares 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, se pudo demostrar que el ensamblaje de las formas con tallo de colágeno tiene lugar en las cisternas del Golgi *trans* (Rotundo, 1984a; Chen y col., 2011). La estructura cuaternaria de las diferentes formas de ChEs (G₁, G₂ y G₄) 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

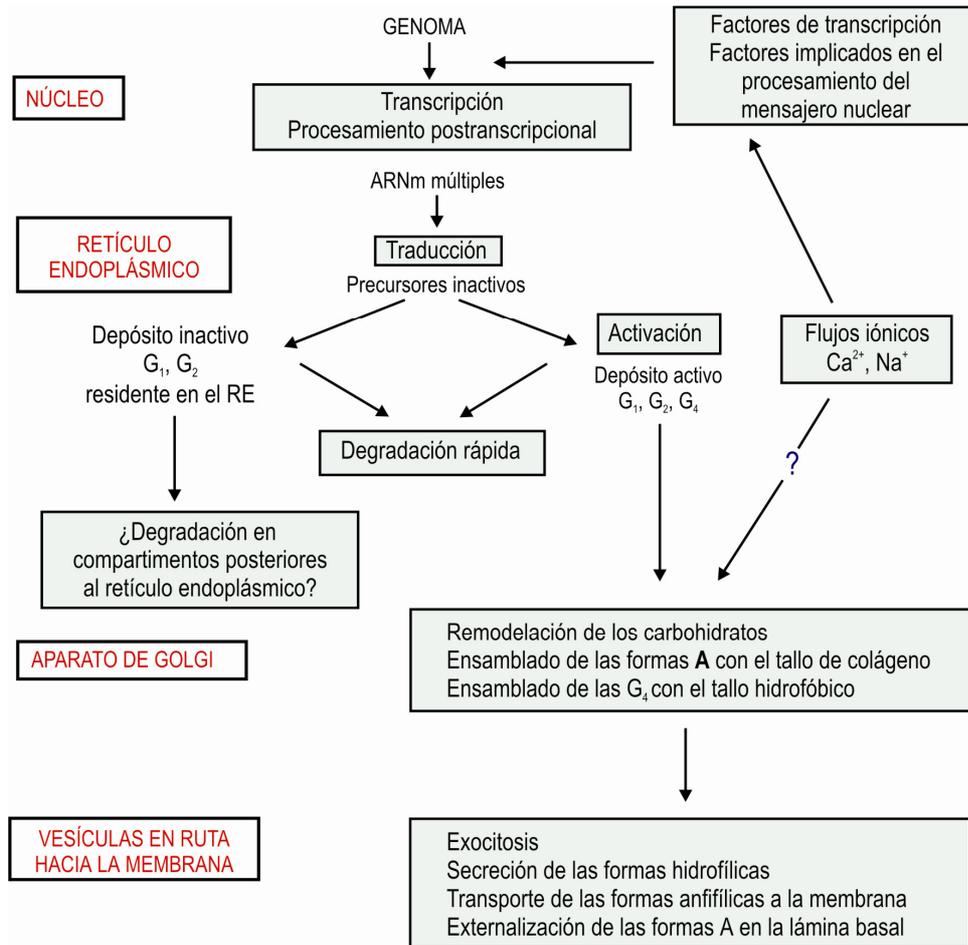


Figura I.10. Regulación de la biosíntesis, maduración y transporte de las formas moleculares de AChE. Modificado de Vallette (1991).

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.

4.1.1. Glicosilación de las colinesterasas

Como sucede con otras glicoproteínas, las subunidades proteicas de las ChEs pasan por el retículo endoplasmático rugoso (RER), donde se N-glicosilan incorporando varias unidades del oligosacárido núcleo (GlcNAc)₂(Man)₉(Glc)₃ en

restos de Asn con secuencias Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Después de un procesamiento inicial y de superar el control de calidad, las glicoproteínas continúan su ruta con destino al Golgi.

Debido a las modificaciones que sufre el oligosacárido núcleo en el Golgi, las glicoproteínas presentan una composición de oligosacáridos muy heterogénea. 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 en Golgi *cis* y medio, la adición de *N*-acetilglucosamina en el Golgi medio, y la de galactosa y ácido siálico en el Golgi *trans*.

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 (Massoulié y col., 1993a), entre distintos tejidos o fluidos del mismo animal (Tornel, 1992; Weikert y Layer, 1994) e incluso, entre regiones subcelulares del mismo tejido (Campoy, 1992; Cabezas-Herrera y col., 1997). Además, la glicosilación de las ChEs se ve alterada en estados patológicos, como la distrofia muscular (Cabezas-Herrera y col., 1994b), el Alzheimer (Sáez-Valero y col., 1999; 2003), y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Silveyra y col., 2006).

La secuencia de la AChE y BuChE humanas contienen 3 y 9 sitios de *N*-glicosilación respectivamente (Lockridge y col., 1987), todos ellos situados en la periferia de la molécula. En la AChE humana, se localizan en 296 (secuencia NDT), 381 (NES) y 495 (NYT) (Xu y col., 2015). Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado 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). En cambio, otros autores han visto que subunidades H mutadas para que no se glicosilaran tenían menor actividad; estas subunidades dimerizaron, pero no fueron al Golgi (Luk y col., 2012). No se han encontrado sitios de *O*-glicosilación en las colinesterasas (Liao y col., 1992).

Los datos experimentales 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 proteólisis. 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., 1994a; Vidal, 1996).

Las lectinas vegetales constituyen una herramienta idónea 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) o la lectina del artrópodo *Limulus* (cacerola de las Molucas) 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 dar información acerca de su origen, en situaciones donde colinesterasas de diferentes tejidos coexistan en un mismo medio. Por ejemplo, la BuChE G_4^H del plasma humano interacciona casi por completo con RCA, pero no su homóloga de cerebro humano, lo que permitió deducir, a la vista de su glicosilación, que la BuChE del líquido cefalorraquídeo (LCR) 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, 1992).

Los trabajos realizados sobre la glicosilación de las ChEs han arrojado pruebas de su posible utilidad diagnóstica. Por ejemplo, se ha visto que la AChE del córtex frontal y LCR (extracción *postmortem*) de pacientes con Alzheimer presenta un modelo de glicosilación distinto al de la enzima del grupo control o de enfermos con otro tipo de demencias. Sin embargo, en los individuos con Alzheimer, la glicosilación de la AChE es normal en el cerebelo, donde rara vez se forman depósitos de placas de amiloide. Estos estudios 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 (Sáez-Valero y col., 1997; Talesa, 2001).

4.2. 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 administra por vía intravenosa. Tras la inyección, se observa que ZR1 puede interactuar *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 revelan 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 G₂^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. En general, en el sistema nervioso de mamíferos la forma G₄^A con PRiMA (mayoritaria en cerebro de mamíferos) se localiza preferentemente en la membrana presináptica (Marquis y Fishman, 1985), donde al menos una parte está integrada en microdominios de membrana, los “rafts” lipídicos (Xie y col., 2010a; Moral-Naranjo y col., 2010).

La AChE también está asociada a los rafts de las membranas musculares. El músculo de rata (Xie y col., 2007) y pollo (Mok y col., 2009) expresan PRiMA de forma contralada durante la maduración. Así se ha encontrado AChE ligada a PRiMA en la membrana pre- y postsináptica en las uniones neuromusculares de vertebrados (Xie y col., 2010b). En los rafts de músculo hay dímeros de AChE con GPI (Moral-Naranjo y col., 2010).

4.3. 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., muestran cantidades variables de AChE y BuChE. Es previsible que la función de las ChEs en los fluidos biológicos sea eliminar cualquier resto de acetilcolina, previniendo así la estimulación accidental 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 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).

La principal molécula de secreción de AChE *in vivo* es una forma hidrofílica G₄, tanto en el músculo como en el sistema nervioso central y periférico. La secreción de formas asimétricas de AChE precede a su fijación en la lámina basal de 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 patrón 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).

4.3.1. Transporte axonal de AChE

En estudios con cultivos celulares de ganglio cervical superior de rata, en los que la extensión de las neuritas es promovida por el factor de crecimiento neural (NGF), se observa que en los cuerpos celulares predominan las formas globulares, G₄, G₂ y G₁, junto a trazas de A₁₂, mientras que en los axones hay principalmente formas A₁₂ y, en menor medida, formas G₄, localizadas en la superficie externa de la membrana axonal (Rotundo y Carbonetto, 1987).

En los nervios motores, la AChE viaja hacia las terminales nerviosas por el flujo axonal, cuyo componente lento transporta formas ligeras G₁ y G₂ mientras que el flujo axonal rápido lleva la totalidad de formas A₁₂ y el 20% de G₄, permaneciendo el resto en estado estacionario. Por estimulación de las motoneuronas se liberan las formas G₄

en las uniones neuromusculares (Skau y Brimijoin, 1978) y en el sistema nervioso central (Greenfield, 1985).

4.4. Regulación de la síntesis de AChE

Los mecanismos moleculares que regulan la expresión de AChE se han estudiado principalmente en células musculares, en neuronas y en células hematopoyéticas (Xie y col., 2009b; Deutsch y col., 2002; Lau y col., 2016; Jiang y col., 2003; Girard y col., 2006). Se han descrito varios elementos reguladores del promotor de AChE que regulan la transcripción del gen ACHE en varias especies. Entre los sitios de unión de factores de transcripción que son importantes para la transcripción de AChE se incluyen los de SP1, AP-2, EGR-1, Elk, MyoD, el elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE) y los motivos caja-E y caja-N, entre otros (Ben Aziz-Aloya y col., 1993a; Mutero y col., 1995; Getman y col., 1995; 2003; Siow y col., 2002; Choi y col., 2001).

Los mecanismos reguladores postranscripcionales desempeñan un papel importante en la inducción de AChE, pudiendo operar mediante la estabilización de sus transcritos, por ejemplo durante la diferenciación del músculo (Luo y col., 1994; 1999) o las neuronas (Coleman y Taylor, 1996), y en otros casos (Zhu y col., 2007a). El mRNA de AChE contiene en su región 3' no traducida (3'UTR) un elemento AUUUA; los elementos ricos en AUUUA (AREs) son capaces de dirigir a los mRNAs que los contienen a una degradación rápida (Barreau y col., 2006). Una proteína de unión a RNA, HuD, regula la expresión de AChE a nivel post-transcripcional, uniéndose directamente a la región 3'UTR de AChE (Deschenes-Furry y col., 2003). La proteína Pumilio2 se une a una secuencia llamada elemento de respuesta a Nanos (NRE), que se encuentra en la región 3'UTR del mRNA de AChE, y reprime la traducción de AChE en la unión neuromuscular (Rotundo y col., 2008; Marrero y col., 2011). La regulación postranscripcional puede tener lugar por cambios en la vida media, como sucede en el aumento en actividad AChE en células de neuroblastoma tratadas con péptidos A β , que se debe a una degradación más lenta (Hu y col., 2003).

Estudios recientes han demostrado que la expresión de la AChE puede ser controlada a través de pequeños RNAs no codificantes llamados microRNAs (miRNAs), que se unen a sus mRNA diana por complementariedad de sus secuencias con la región 3' no traducida o 3'UTR. Esto conduce a la inhibición de la traducción y/o a la degradación del mRNA (Shaked y col., 2009; Krek y col., 2005; Djuranovic y col., 2012).

La expresión de estos miRNAs varía con el tipo celular, el tejido y el estadio de desarrollo (Baek y col., 2008). Por ejemplo, se ha visto que la supresión mediada por

miRNA-132 sobre la AChE del hipocampo media los déficits cognitivos producidos por el estrés (Shaltiel y col., 2013). La supresión de AChE por miRNA-132 puede atenuar el proceso de inflamación vía señalización colinérgica (Shaked y col., 2009). En otros casos, la inhibición de miRNA-134 da lugar a una sobreexpresión de CREB y de miRNA-132, reprimiendo la expresión de AChE, contribuyendo a la supervivencia de células ganglionares de la retina (Shao y col., 2015). Por otro lado, se ha demostrado que el miRNA-212 ejerce un efecto anti-apoptótico a través de la represión directa de la expresión de la AChE sináptica (AChE-S) en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Lu y col., 2013).

Cabe destacar que la variante AChE-T posee una 3'UTR más corta en comparación con la de AChE-R (Hanin y Soreq, 2011), con una alta probabilidad de que los miRNAs que participen en su regulación sean diferentes. En cuanto al gen BCHE, posee una 3'UTR diferente a la de AChE, con un menor contenido en G+C (Soreq y Seidman, 2001).

4.4.1. Regulación por el calcio

El ión calcio es un importante segundo mensajero, y no es de extrañar que juegue un papel importante en la regulación de los niveles de AChE. En efecto, diversos trabajos han revelado la participación de rutas de señalización dependientes de calcio en la regulación de la expresión o actividad de AChE en músculo y en neuronas. Así, durante la diferenciación de mioblastos en miotubos, la elevación del calcio intracelular aumenta los niveles del mensajero de AChE (Luo y col., 1994). En miotubos de pollo en cultivo, el ATP estimula la expresión de AChE actuando a través del receptor de ATP, en un proceso mediado por la proteína quinasa C y la liberación de calcio intracelular (Choi y col., 2003). En neuronas corticales de rata, la movilización del calcio interviene en la inducción de AChE cuando se activan los receptores P2Y2 (Choi y col., 2013). Y en células P19 de carcinoma embrionario y en células de retina, péptidos de la proteína β amiloide A β (como A β 1-40 y A β 25-35) aumentan la actividad AChE por un mecanismo en el que interviene la entrada de calcio (Sberna y col., 1997; Melo y col., 2003).

En cuanto a otros tipos celulares, el grupo de Zhang ha estudiado el papel del calcio en la regulación de la expresión de AChE, en células HeLa (de epitelio cervical) y MDA-MB-435s (de carcinoma de mama), en el contexto de la apoptosis inducida por el aumento del calcio intracelular (Zhu y col., 2007a; 2007c; 2007b; Gao y col., 2009). En estos estudios emplearon el ionóforo de calcio A23187, que equilibra la concentración de calcio a ambos lados de la membrana provocando un aumento

rápido del calcio intracelular, así como tapsigargina, un inhibidor de la Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplásmico/endoplásmico, que aumenta la concentración de calcio citosólica vaciando las reservas de calcio del retículo endoplásmico, y secundariamente activando canales de calcio de la membrana plasmática permitiendo la entrada de calcio extracelular.

En condiciones normales, las células HeLa y MDA no expresan AChE detectable. En células HeLa y MDA, tanto A23187 como tapsigargina producen un aumento en la expresión de AChE, a niveles de mRNA y de proteína (Zhu y col., 2007a). Ensayos de transfección con constructos del promotor humano de AChE (2.2Kb) unido al gen de luciferasa mostraron que A23187 y tapsigargina aumentan la actividad del promotor de AChE en ambos tipos celulares. Además, ensayos de bloqueo de la transcripción con actinomicina D revelaron que A23187 aumenta la estabilidad del mRNA de AChE. BAPTA-AM, un quelante de calcio intracelular, inhibió la inducción de AChE (mRNA y proteína) por A23187 y tapsigargina, así como sus efectos sobre la actividad del promotor y la estabilidad del mensajero (Zhu y col., 2007a).

Estos trabajos revelaron algunos de los sitios del promotor y de los factores proteicos implicados en la inducción de AChE debida al aumento de calcio intracelular. Así, la activación del promotor humano de AChE por A23187 y tapsigargina se debe en parte al motivo CCAAT distal, al que se puede unir un factor de unión a CCAAT, CBF/NF-Y (Zhu y col., 2007a). El motivo CCAAT es un elemento presente en el promotor de muchos genes de mamífero transcritos por la RNA polimerasa II. Como vemos en la **Fig. I.5.B**, el promotor de AChE contiene dos motivos CCAAT, el motivo distal localizado entre -1270 y -1248, aguas arriba de la caja TATA, y el motivo CCAAT proximal, entre -592 y -571. Ambos se sitúan en el intrón 1, antes del ATG iniciador de la traducción de las formas clásicas (no N-extendidas) de AChE (Zhu y col., 2007c).

El motivo CCAAT distal podría en principio ser reconocido por diversos factores, pero ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) con sondas del sitio distal marcadas y extractos nucleares mostraron la formación de complejos DNA-proteína, cuya formación se inhibía por anticuerpos contra CBF y por oligos consenso para CBF pero no por los oligos para otros factores. Además, ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos contra CBF confirmaron que CBF se une al motivo CCAAT distal del promotor de AChE en vivo (Zhu y col., 2007c).

Otros ensayos mostraron que la unión de CBF al motivo CCAAT suprime la actividad del promotor, y que la activación del promotor de AChE durante la apoptosis inducida por A23187 se debe en parte a la disociación de CBF del sitio CCAAT distal (Zhu y col., 2007c). Como en el promotor de AChE se solapan el sitio CCAAT distal y

el sitio de unión de Sp1, es posible que la ausencia de CBF aumente la unión de Sp1 estimulando así la actividad del promotor.

Otro motivo de respuesta al calcio en el promotor de AChE es el elemento de unión a Smad, TTGCAGACA, localizado entre -601 y -571, en el intrón I1 (Gao y col., 2009). Las Smads son proteínas que intervienen en diversas cascadas de señalización reguladas por calcio, siendo dianas de quinasas como la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) y los receptores de TGF- β . Cuando Smad2/3 es fosforilada, se une a Smad4 en un complejo trimérico que migra al núcleo activando la transcripción de sus genes diana. La mutación del sitio de unión a Smad de AChE redujo de modo importante el efecto estimulador de A23187 y taspigargina sobre la actividad del promotor, mientras que la sobreexpresión de Smad3 aumentó mucho su actividad. Ensayos de EMSA y de CHIP demostraron la unión de Smad2/3 y Smad4 a este elemento *in vivo*. El aumento de la concentración citosólica de calcio por el ionóforo o la taspigargina produjeron la acumulación de Smad3 en el núcleo (un efecto bloqueado por el quelante BAPTA-AM), lo que permitió su acción estimuladora de la transcripción de AChE (Gao y col., 2009).

Las proteínas calpaína, calcineurina y NFAT también intervienen en la regulación de la expresión de AChE durante la apoptosis de células HeLa inducida por A23187 (Zhu y col., 2007b; Zhu y col., 2007a). La calpaína es una cisteín-proteasa citosólica activada por calcio, la calcineurina es una proteína fosfatasa (de Ser/Thr) dependiente de calcio y calmodulina, y los NFAT (factor nuclear de células T activadas) son factores de transcripción. Dos isoenzimas de calpaína de expresión ubicua son las calpaínas I y II, que se activan por concentraciones de calcio de micro- y milimolar, respectivamente. La calpaína modula la apoptosis dependiente de calcio mediante diversos mecanismos, que incluyen la activación proteolítica de caspasa 12 y de la quinasa cdk5, así como de calcineurina, lo que conduce a la muerte celular. A su vez, los NFAT son dianas de calcineurina; tras la movilización del calcio, la calcineurina activada desfosforila los NFATs, lo que provoca su translocación al núcleo (Zhu y col., 2007b).

Calpaína, calcineurina y NFAT participan en el aumento de la expresión de AChE en células HeLa tratadas con A23187 (Zhu y col., 2007b). En efecto, el ionóforo de calcio aumenta la actividad de calpaína y calcineurina, además de la expresión de AChE (mRNA y proteína). Los inhibidores de calpaína (calpeptina) y calcineurina (FK506 y ciclosporina A) inhiben la expresión de AChE y suprimen la actividad de su promotor. A su vez, en presencia de A23187 la sobreexpresión de calcineurina y la de NFATc3 y NFATc4 aumentan mucho la actividad del promotor de AChE. Además, la

sobreexpresión de calcineurina constitutivamente activa o de NFATc4 de localización constitutivamente nuclear aumentan la actividad del promotor incluso en ausencia del ionóforo (Zhu y col., 2007b).

Estas proteínas también regulan AChE en otros modelos; así, durante la diferenciación de las células musculares C2C12 la activación de calcineurina aumenta la estabilidad del mRNA de AChE (Luo y col., 1999), y los NFATs modulan la transcripción del promotor de AChE en músculo en cultivo (Cohen y Randall, 2004).

De todas estas observaciones se concluye que el calcio modula la expresión de AChE a nivel transcripcional y postranscripcional.

4.4.2. Otros participantes en la regulación de la síntesis de AChE

Durante la diferenciación de las neuronas, en la regulación de AChE y PRiMA participan la ruta de la MAP kinasa y una ruta dependiente de AMP cíclico (cAMP). Así, La sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de Raf, un miembro clave de la cascada de la MAP kinasa, indujo la transcripción de AChE-T y PRiMA en neuronas de rata (Xie y col., 2009b). Por otra parte, en las células PC12 de feocromocitoma una ruta dependiente de cAMP aumenta la expresión de los mensajeros de AChE-T y PRiMA y el nivel de formas G₄ y G₁ de AChE, como se demostró con un análogo del cAMP y con forskolina, un activador de adenilato ciclasa (Tsim y col., 2008).

El cAMP también regula la expresión de AChE y ColQ durante la miogénesis y la innervación del músculo. Un análogo de cAMP y la forskolina aumentan la expresión de proteína AChE en miotubos de pollo, aunque se produce AChE inactiva, mientras que reducen la actividad del promotor de AChE humana transfectado en esas células (Choi y col., 2001). Ambos efectos crecen si se sobreexpresa la proteína CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP). CREB se activa por cAMP y se une a un sitio CRE en el promotor humano. Durante la diferenciación de mioblastos de ratón C2C12 en miotubos, la actividad AChE va elevándose. Durante la etapa de mioblasto, el alto nivel intracelular de cAMP, con la resultante alta actividad de PKA y elevada fosforilación de CREB, suprime la actividad transcripcional del gen ACHE, una supresión mediada por el sitio CRE del promotor (Siow y col., 2002).

El ATP, que libera el nervio junto con la ACh, regula la AChE en neuronas y músculo actuando sobre los receptores purinérgicos (Cui y col., 2016). Por ejemplo, en neuronas del córtex la activación de los P2Y1R conduce a la fosforilación del factor de transcripción Elk-1, su unión al promotor de AChE, y la inducción de la expresión de

AChE (Siow y col., 2010). La estimulación de P2Y2R con ATP aumenta la expresión de AChE, PRiMA y ChAT en neuronas, por un proceso mediado por la movilización de calcio y la activación de las quinasas ERK1/2 (Choi y col., 2013). En miotubos los agonistas de los P2Y1R estimulan la transcripción de AChE, por una ruta donde participan la proteína quinasa C, la liberación de calcio intracelular, la cascada Raf/MEK/ERK y la activación de Elk-1 (Choi y col., 2003). Y en ratones deficientes en el receptor P2Y1 (P2Y1R^{-/-}) se reduce mucho la expresión de AChE, PRiMA y ColQ en el músculo (Xu y col., 2015) pero no en cerebro (Cui y col., 2016).

La expresión de AChE se regula por mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA (Lau y col., 2016) y la modificación de histonas (Sailaja y col., 2012). En el promotor de AChE hay una región conservada muy rica en secuencias CpG (una isla CpG) con múltiples sitios de unión para factores de transcripción (como SP1, AP2 y EGR1) que regulan la expresión de AChE durante la diferenciación del músculo (**Fig. I.5**) (Mutero y col., 1995). Durante la diferenciación de mioblastos en miotubos de las células C2C12, se metila un sitio de unión de SP1 localizado en posición -1826 pb, lo que bloquea completamente la unión de SP1 (Lau y col., 2016). Esto explica que la expresión de AChE aumente si se inhibe la metilación del DNA con 5-azacitidina. En hipocampo de ratón, la disminución de los AChE-mRNA con los exones E1c y E1b por el estrés se debe a cambios en la acetilación y metilación de la lisina 9 de H3 (H3K9) localizada en cierta región del promotor (Sailaja y col., 2012).

Diversos grupos han descrito aumentos en los niveles de AChE como consecuencia del tratamiento con inhibidores de AChE como DFP o piridostigmina (Kaufer y col., 1998; Shapira y col., 2000; Keller y col., 2001; Meshorer y col., 2002; Perrier y col., 2005; Farchi y col., 2007; Livneh y col., 2010; Duysen y Lockridge, 2011). En algunos casos el aumento afecta especialmente al mensajero AChE-R (Kaufer y col., 1998; Livneh y col., 2010). Ese aumento se ha considerado una respuesta a estrés (Kaufer y col., 1999), y otros autores proponen que se deba a la inducción de apoptosis por el inhibidor (Duysen y Lockridge, 2011). Se ha propuesto que los complejos de AChE con el inhibidor podrían actuar sobre rutas de señalización intracelular, por la interacción de AChE con otras proteínas (Kaufer y col., 1999). La elevación en AChE-mRNA se ha relacionado con el aumento previo en el mensajero del c-Fos, un factor de transcripción con sitios de unión en el promotor de AChE (Kaufer y col., 1999). Aumentos en la actividad AChE se han visto también en respuesta a otros tipos de estrés, como la natación forzosa (Kaufer y col., 1998).

Se han descrito muchos otros casos de regulación de AChE. Así, las dioxinas reprimen la expresión de AChE a nivel de la transcripción por una ruta dependiente del

receptor AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) y a nivel postranscripcional mediante miRNA (Xie y col., 2013; 2016). En ratones con un defecto en la secreción de reelina, una glicoproteína de la matriz extracelular, es mayor la actividad AChE del cerebelo y del hipocampo que en los ratones control, y es mayor la proporción de tetrámeros respecto a monómeros (García-Ayllon y col., 2003). Algunos aspectos de los cambios en AChE en relación con el Alzheimer y el cáncer se describen en el **apdo. I.5**.

5. FUNCIONES ALTERNATIVAS DE LAS COLINESTERASAS

Además de su función clásica de hidrolizar la ACh en las sinapsis, la AChE desempeña otras funciones. Esas funciones no clásicas las lleva a cabo por la hidrólisis de ACh en otros contextos y por su actividad catalítica sobre otros sustratos, así como por sus actividades no catalíticas. La existencia de ChEs en células no excitables y en fluidos sugiere que dichas enzimas participan en funciones no relacionadas con la transmisión colinérgica. Una serie de datos apuntan a que, mediante las acciones no clásicas, las ChEs participan directamente en procesos de proliferación, diferenciación celular y morfogénesis. La AChE parece jugar un papel importante en el crecimiento axonal (Bigbee JW y col., 2000), sinaptogénesis (Sternfeld y col., 1998), adhesión celular (Bigbee y Sharma, 2004) y migración neuronal (Dori y col., 2005; Byers y col., 2005), funciones independientes de la capacidad enzimática para hidrolizar ACh (Soreq y Seidman, 2001) y más relacionadas con la fuerte tendencia a interactuar con otras proteínas que muestran ciertos dominios estructurales de las ChEs. Cabe destacar que las distintas variantes de las ChEs y/o sus péptidos C-terminales, producidos por proteólisis, difieren en la expresión de estas funciones “no catalíticas” (Grifman y col., 1998; Massoulié y col., 2005). En general, aunque las variantes AChE-T 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 pueden ejercer las ChEs circulantes en sangre, en forma soluble (BuChE) o unidas a las células sanguíneas (AChE), así como las ChEs de diversos tejidos distintos del muscular o nervioso, como el intestino (Montenegro y col., 2006), el hígado (Zhao y col., 2011) o el riñón (Muñoz-Delgado y col., 2010). Las ChEs también actúan sobre otros sustratos. Así, además de ésteres de colina, BuChE hidroliza diversos sustratos, incluyendo cocaína, heroína y aspirina (Li y col., 2005).

BuChE también secuestra los glicoalcaloides tóxicos solanina, chaconina y solanidina, que aparecen en las patatas verdes y en otras solanáceas como tomate, pimiento y berenjena (Nigg y col., 1996). Por ello, BuChE puede tener una función protectora frente a diversos tóxicos. Además, BuChE inactiva la octanoil grelina, una hormona estimuladora del apetito (De y col., 2004). Las colinesterasas pueden incluso desarrollar acciones catalíticas distintas de la esterasa. Así, la AChE y la BuChE presentan actividad arilacilamidasa (AAA) inhibida por aminas. Mediante esta actividad, las ChEs hidrolizan el enlace amida de algunas arilacilamidas, como el sustrato *o*-nitroacetanilida (Balasubramanian y Bhanumathy, 1993; Boopathy y col., 2007; Montenegro y col., 2008; 2009). 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.

Pero sin duda, la función más sorprendente de la AChE es su actividad DNasa, descrita recientemente (Du y col., 2015). El grupo del Prof. Zhang, una autoridad en el campo de la relación de AChE con la apoptosis, demostró que AChE corta el DNA desnudo, a pH fisiológico, en un proceso dependiente de calcio y magnesio. La AChE también corta el DNA en cromosomas, tanto en células prefijadas como durante la apoptosis. Además, la eliminación del gen ACHE reduce la rotura del DNA durante la apoptosis; dicha reducción se rescata por sobreexpresión de la AChE normal pero no si se sobreexpresa una AChE que carece de los aminoácidos 32 a 138 (Du y col., 2015). Aunque esta sorprendente actividad catalítica de AChE aún no ha sido confirmada por otros grupos, podría explicar el papel mediador de AChE en la apoptosis, como sugieren los autores. El papel de la AChE en la apoptosis se describe en el **apdo. I.5.1.2.**

Las ChEs desarrollan sus funciones no clásicas mediante actividades catalíticas, pero también no catalíticas. No obstante, en muchas ocasiones no queda claro si una acción de AChE o BuChE se debe o no a su actividad catalítica. Así, aunque la supresión de un efecto (por ejemplo sobre el crecimiento celular) cuando se añaden inhibidores de AChE o BuChE se ha usado como criterio de que el efecto se debe a la actividad catalítica (Zhao y col., 2011), en otras ocasiones se ha achacado a un efecto de los inhibidores sobre la estructura de la enzima (Toiber y col., 2008).

Entre las funciones no catalíticas de las ChEs, se encuentra su participación en interacciones proteína-proteína. Las colinesterasas muestran homología de secuencia 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 (Auld y col., 1995). El conjunto de proteínas que comparten dicha homología secuencial forman la familia CLAM (*Cholinesterase-Like Adhesion Molecules*) y parecen esenciales para la formación de uniones intercelulares.

Conviene señalar la presencia de ChEs en bacterias (Perez y col., 2002) e, inesperadamente, en plantas (Madhavan y col., 1995; Momonoki, 1997; 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 el crecimiento de las neuritas, los fenómenos de adhesión celular y la formación de depósitos de amiloide (Johnson y col., 2008).

La aparición de los componentes del sistema colinérgico, incluidas las ChEs, antes de la sinaptogénesis (Filogamo y Marchisio, 1971), sustenta la hipótesis 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., 2007).

Los estudios *in vivo* e *in vitro* acerca de la correlación espacial y temporal de las ChEs durante la embriogénesis demuestran que AChE y BuChE ejercen acciones morfogenéticas (Layer, 1983; 1990; Layer y Willbold, 1994). Tales acciones se manifiestan por los efectos teratogénicos de los organofosforados en embriones de aves (Meneely y Wyttenbach, 1989), efectos que se atenúan por reactivación de la AChE inhibida (Misawa y col., 1981).

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 (Sternfeld y col., 1998; Sharma y col., 2001; Bigbee y Sharma, 2004). En un principio quedó claro que AChE participaba 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, 2000; 1999). De

hecho, se ha observado que la AChE humana es capaz de interactuar, a través del PAS, con la laminina-1 de ratón y con el colágeno tipo IV humano, dos componentes importantes de la matriz extracelular (Johnson y Moore, 2003).

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). Por ejemplo, en la sustancia negra, una estructura con apenas sinapsis colinérgicas, se libera actividad AChE junto con dopamina. Dicha coliberación podría estar relacionada con la actividad motora o con la estimulación sensorial (Greenfield, 1985; 1991).

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 (Paoletti y col., 1992; Lev-Lehman y col., 1997; Grisaru y col., 1999b). Se ha observado 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 Fujii, 2000). Un péptido con 26 aminoácidos del extremo C-terminal de AChE-R, llamado ARP, promueve la expansión y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas tempranas en linajes mieloides y megacariocíticos (Grisaru y col., 2001; Deutsch y col., 2002). Estudios con ratones transgénicos que sobreexpresan AChE-R sugieren que esta variante de AChE podría estar relacionada con la recuperación trombopoyética, lo que aporta un nuevo mecanismo terapéutico para reforzar la producción de plaquetas (Grisaru y col., 2006).

5.1. Las colinesterasas en distintos estados patológicos

Las alteraciones en la expresión génica y en los procesos postranscripcionales o postraduccionales, 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., 1999b; Grisaru y col., 1999b; Grisaru y col., 1999b).

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. 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), lo que hace que varias proteínas, entre las que se incluye la AChE, no puedan quedar inmovilizadas en la membrana de los eritrocitos y escapen al medio externo (Chow y col., 1985; Rao y col., 1993; Chow y col., 1985; Rao y col., 1993).

La miastenia gravis (MG, “debilidad muscular grave”) es una patología neuromuscular que se caracteriza por debilidad extrema y fatiga de los músculos esqueléticos. La causa más frecuente de MG es una respuesta autoinmune contra el receptor nicotínico de ACh (nAChR); otros pacientes tienen anticuerpos contra la quinasa específica de músculo (MuSK), una proteína de la unión neuromuscular que se asocia con los AChR y ayuda a su ensamblado (Mehndiratta y col., 2014). Como consecuencia, se produce un déficit de receptores nAChR en la unión neuromuscular. Además existen síndromes miasténicos congénitos (CMS) debidos a mutaciones en genes de proteínas de la unión neuromuscular, tales como la subunidad ϵ del nAChR muscular (gen CHRNE), ChAT, rapsina, y la subunidad estructural de AChE ColQ (gen COLQ); mutaciones en ColQ causan un 10-15% de los casos de CMS (Engel y col., 2003; Abicht y col., 2003).

Mutaciones en el gen de ColQ causan un síndrome miasténico con deficiencia congénita en la AChE de la placa motora (Spuler y Engel, 1997; Engel y col., 2003; Mihaylova y col., 2008; Ohno y col., 2014). Unas mutaciones afectan al PRAD e impiden la unión del tetrámero de AChE a ColQ; otras impiden la asociación de las tres hebras de ColQ entre sí o su unión a la lámina basal. El resultado es la falta de formas asimétricas de AChE en la unión neuromuscular. Debido a la falta de AChE, la acetilcolina liberada por el nervio permanece en la unión neuromuscular un tiempo más largo del normal, lo que provoca la desensibilización de los nAChR musculares. También se produce una miopatía de la placa motora, con pérdida de AChRs. El tratamiento de la MG emplea inhibidores de la AChE, como neostigmina y piridostigmina (Mehndiratta y col., 2014), pero estos inhibidores no son efectivos en el CMS causado por la mutación de ColQ.

Por otro lado, los niveles de actividad y/o la distribución de formas moleculares de AChE y/o BuChE cambian en numerosos trastornos neurológicos. Entre estos figuran las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, el síndrome de Guillain-Barré, esquizofrenia, manía, depresión y neuritis alérgicas. Hay pruebas que apoyan que las ChEs están 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, el Parkinson y el mal de Creutzfeld-Jacob, el Alzheimer tiene su origen en el procesamiento aberrante de ciertas proteínas. Una de las posibles causas del

desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es la pérdida de la inervación colinérgica del córtex.

Los estudios bioquímicos indican que la AChE favorece la formación de fibras de amiloide y la producción de complejos AChE/ β -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. El grupo del Dr. Inestrosa demostró que la AChE favorece el ensamblado de los péptidos A β , lo que sugiere que el entorno hidrofóbico próximo al PAS de la AChE facilita el plegamiento y posterior agregación de los péptidos (Inestrosa y col., 2008). La sobreexpresión de AChE, o la adición de AChE al medio de cultivo, producen un aumento de los niveles de preselinina 1 (PS1), el componente catalítico del complejo γ -secretasa, una proteasa que participa en la producción del péptido β -amiloide (Campanari y col., 2014). La regulación es recíproca, pues en células CHO transfectadas con AChE-T y PRiMA, la inhibición de la γ -secretasa causó un aumento de la cantidad de PRiMA y de AChE con PRiMA, y se vio que la γ -secretasa puede cortar a PRiMA (García-Ayllon y col., 2014). Por otro lado, se demostró que la glicosilación de AChE está alterada en el cerebro de pacientes con Alzheimer (Sáez-Valero y col., 1997; 1999; 2000).

En cuanto a las distrofias musculares, afectan a la cantidad de las ChEs y/o a la proporción de sus formas moleculares. Como comentamos anteriormente, el análisis de las formas moleculares de las ChEs en músculo distrófico de ratón ha revelado una marcada disminución de los tetrámeros de AChE (Cabezas-Herrera y col., 1993; 1997; Gisiger y Stephens, 1988; Skau, 1990). 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 (1994b; Cabezas-Herrera y col., 1994a).

Los cambios también afectan a otros tejidos. Así, en el nervio ciático de los ratones distróficos *Lama2dy* la actividad AChE disminuye un 40%, mientras que la actividad BuChE aumenta casi al doble (Moral-Naranjo y col., 2002). El nervio ciático de ratón contiene abundantes moléculas G₄^A (75%) y menos G₁^A (10%), G₂^A (7%), G₄^H (5%) y A₁₂ (3%) de AChE. Pese a que la actividad AChE cae un 40% en los nervios de ratones con distrofia muscular, la proporción de las moléculas se mantiene (Moral-Naranjo y col., 2002). En cambio, la actividad BuChE aumenta al doble por la distrofia y la contribución de las distintas moléculas de BuChE cambia; disminuye el porcentaje de formas G₄^A y aumenta el de las moléculas G₁^A, G₂^A y G₄^H.

Del mismo modo, disminuye la cantidad del mRNA para las subunidades AChE-T, y aumenta la del mRNA de BuChE. También es patente en nervio la gran disminución de la proporción de tetrámeros anfifílicos de BuChE. La reducción en el contenido del mRNA para PRiMA en el músculo y en el nervio de los ratones distróficos (Moral-Naranjo y col., 2010; Vidal y col., 2013) puede explicar la pérdida de tetrámeros anfifílicos (por tanto, con PRiMA) de AChE y BuChE en los animales distróficos (Cabezas-Herrera y col., 2012). La actividad AChE aumenta al doble en el bazo, pero disminuye en el timo de los ratones *Lama2dy* (Nieto-Cerón y col., 2005; Cabezas-Herrera y col., 2012).

Al parecer, 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). También se ha observado que 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). 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).

5.1.1. Colinesterasas y cáncer

Hace tiempo que se conoce la implicación de las colinesterasas en la proliferación celular, apoptosis y tumorigénesis (Massoulié y col., 2008; Soreq y col., 1991; Vidal, 2005; Jiang y Zhang, 2008; Zhang y Greenberg, 2012). Así, numerosas evidencias experimentales sugieren que las ChEs pueden estar implicadas en el desarrollo del cáncer. La expresión, actividad y propiedades de las colinesterasas se ven alteradas a nivel genético y/o proteico en diversos carcinomas, por lo que estas enzimas pueden ser importantes marcadores de ciertos desórdenes del crecimiento celular. Estudios epidemiológicos han demostrado que el uso ocupacional de pesticidas que inhiben AChE, incrementa el riesgo de leucemia (Vidal, 2005), linfoma (Navaranjan y col., 2013) y otros cánceres (Vidal, 2005). Amplificaciones y/o deleciones de los genes de AChE y BuChE son frecuentes en algunos tipos de cánceres, tales como leucemia y cánceres de ovario (Soreq y col., 1991; Soreq y Zakut, 1990a; Zakut y col., 1990), mama (Bernardi y col., 2010) y pulmón (Vidal, 2005; Brass y col., 1997). En algunos casos, también se observan alteraciones estructurales de estos genes (Soreq y col., 1991). En efecto, las aberraciones del gen ACHE son comunes en leucemias (Lapidot-Lifson y col., 1989), 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). Los efectos de AChE y BuChE en hematopoyesis u osteogénesis revelan la implicación de las ChEs en el control de la proliferación celular (Vidal, 2005; Grisaru y col., 2001).

El contenido y propiedades de las colinesterasas está alterado en muchos tumores (Song y col., 2008; Zhao y col., 2011; Perry y col., 2002; Lu y col., 2013). Nuestro grupo ha analizado la alteración en la actividad de las colinesterasas, en sus propiedades y en los niveles de sus mRNAs en una serie de tumores humanos (Vidal, 2005; Ruiz-Espejo y col., 2002; 2003; Montenegro y col., 2006; Martínez-Moreno y col., 2006; Muñoz-Delgado y col., 2010; Castillo-González y col., 2015). En muchos casos, la actividad ChE cambia entre el tejido normal y las muestras de cáncer de un órgano dado. Considerando el papel del sistema colinérgico en proliferación, apoptosis, metástasis, angiogénesis y función inmune (Wessler y Kirkpatrick, 2008; Egleton y col., 2008), estas alteraciones en el contenido en ChE pueden ser relevantes en la progresión del tumor. Sin embargo, no hay una regla general para el cambio en la actividad ChE en tumores, por tanto depende del tipo celular implicado. Por ejemplo, en los tumores de mama aumenta la actividad AChE y disminuye fuertemente la BuChE con respecto al tejido control, mientras que en los nódulos linfáticos axilares afectados por metástasis de cáncer de mama, la actividad AChE disminuye considerablemente (Ruiz-Espejo y col., 2002; 2003).

Conviene destacar que en muchos tejidos periféricos, y en los tumores derivados de ellos, las formas moleculares más abundantes de AChE son las formas ligeras, esto es, dímeros y monómeros. Así, las formas ligeras son las únicas moléculas de AChE en tejidos sanos y cancerosos de mama (Ruiz-Espejo y col., 2002), colon (Montenegro y col., 2006), riñón (Muñoz-Delgado y col., 2010), pulmón (Martínez-Moreno y col., 2006) y epitelio respiratorio superior (Castillo-González y col., 2015), así como en meningioma (Sáez-Valero y Vidal, 1995) y líneas celulares de mama, colon y pulmón (células pequeñas, SCLC, y células no pequeñas, NSCLC) de humanos (Martínez-López de Castro y col., 2008). La mayoría, si no todas, de estas formas ligeras en células no neuronales o musculares son moléculas que contienen GPI (Montenegro y col., 2014), como demuestra el cambio en el coeficiente de sedimentación después del tratamiento con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), que hemos observado para moléculas de AChE en mama (Ruiz-Espejo y col., 2002), colon (Montenegro y col., 2006), riñón (Muñoz-Delgado y col., 2010) y meningioma (Sáez-Valero y Vidal, 1995). Por tanto, éstas deberían consistir en subunidades H. Se sabe que estos dímeros de AChE predominan en

eritrocitos y otras células sanguíneas (Massoulié y col., 2005). Es de especial atención que estas formas H son de algún modo ignoradas en estudios de AChE y proliferación. Obviamente, las subunidades H carecen de los péptidos C-terminales de las subunidades AChE-T y AChE-R, los cuales están implicados en proliferación y producen efectos apoptóticos en varios sistemas (Grisaru y col., 2001; Perry y col., 2004; Toiber y col., 2008; Day y Greenfield, 2004), y tampoco tienen la señal de localización nuclear (NLS) contenida en el péptido C de AChE-T (Perry y col., 2002). Sin embargo, las tres variantes comparten la mayoría de la secuencia, incluyendo un dominio con capacidad pro-apoptótica (del aminoácido 2 al 138) (Du y col., 2015). Además, dado que las moléculas AChE-H predominan en colon humano (Montenegro y col., 2006) e hígado de ratón (Gómez y col., 2000), la inhibición de AChE-H es probablemente la responsable de los efectos proliferativos de los inhibidores de AChE en células de cáncer de colon H508 (Cheng y col., 2008) y en células de cáncer de hígado SMMC-7721 (Zhao y col., 2011); ambas líneas celulares producen ACh.

El análisis de 55 pares de muestras demostró una disminución tanto de actividad AChE como BuChE en tejido canceroso de colon humano, respecto al tejido sano (Montenegro y col., 2006). Los componentes predominantes de AChE en el colon control y canceroso eran formas anfifílicas G_2^A y G_1^A , cuya sensibilidad a los tratamientos con hidroxilamina y PIPLC indicó que contenían restos de GPI y por tanto, estaban compuestas por subunidades H (Montenegro y col., 2006). Respecto a los mensajeros para AChE, el de AChE-H era claramente el predominante de las variantes 3' tanto en tejido de colon sano como tumoral. En este caso la disminución de la actividad AChE en colon canceroso era paralela a la gran disminución del contenido de varios mRNA de AChE. El contenido de mRNA de BuChE era muy bajo, y también disminuía considerablemente en muestras cancerosas. En vista de la liberación de acetilcolina por las células de cáncer de colon (Cheng y col., 2008), y los efectos proliferativos y anti-apoptóticos de ACh y la activación de los AChRs en ellas (Cheng y col., 2008; Pettersson y col., 2009a; Wong y col., 2007a; Raufman y col., 2008; Dinicola y col., 2013), la disminución observada de AChE y BuChE probablemente contribuya al desarrollo del cáncer colorrectal por incremento de la disponibilidad local de ACh y la activación de los AChRs, especialmente muscarínicos M3 (Cheng y col., 2008; Raufman y col., 2008) y nicotínicos $\alpha 7$ (Pettersson y col., 2009a; Wong y col., 2007a; Dinicola y col., 2013).

Se ha visto que las actividades AChE y BuChE disminuyen en varios tipos de cáncer de pulmón, comparado con el tejido sano adyacente. Así, la actividad AChE disminuye significativamente en carcinoma de células grandes (LCC) y escamosas

(SCC), y la actividad BuChE en adenocarcinoma (AC) y SCC (Martínez-Moreno y col., 2006). Hay que destacar la caída del 80% de actividad AChE en SCC de pulmón.

Existe abundante información sobre la actividad colinesterásica y la composición de formas moleculares en diversos tumores craneales y no craneales (Vidal, 2005; Campoy y col., 2016), incluyendo meningiomas (Sáez-Valero y Vidal, 1995; 1996), gliomas (García-Ayllon y col., 2001; Sáez-Valero y col., 1996), neurinomas (García-Ayllon y col., 1999) y cáncer de mama (Ruiz-Espejo y col., 2002; 2003), colon (Montenegro y col., 2006), pulmón (Martínez-Moreno y col., 2006), riñón (Muñoz-Delgado y col., 2010) y epitelio respiratorio (Castillo-González y col., 2015).

En los meningiomas y neurinomas predomina la actividad AChE, y en los gliomas (astrocitomas, oligodendrogliomas y meduloblastomas) la BuChE. Los perfiles de formas moleculares de AChE y/o BuChE son diferentes en meningiomas, 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 (Sáez-Valero y col., 1996). El grupo de la Prof. Soreq ha visto por hibridación *in situ* que en los astrocitomas humanos el contenido de los mRNA AChE-T y AChE-R aumenta según aumenta la agresividad del tumor, desde grado I a grado IV, a la vez que se produce un cambio en el *splicing* a favor del mRNA AChE-R (Perry y col., 2002). También observaron que en células de glioblastoma U87MG, la transfección con AChE-R inducía la proliferación, un efecto que se inhibía por inhibidores de PKA y PKC y por un antisentido contra AChE, pero no por el DFP, un inhibidor irreversible de ChEs (Perry y col., 2004).

Los experimentos de hibridación del DNA 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 precancerosos, 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 BCHE 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).

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 (García-Ayllon y col., 2001).

En estudios con células derivadas de un adenocarcinoma de colon humano, células Caco-2, se observan cambios en la actividad de las ChEs que dependen de la diferenciación celular (Plageman y col., 2002). Los autores observaron que tras 21 días en cultivo continuo para producir la diferenciación celular, la actividad AChE aumentaba significativamente (más del doble). Este aumento de la actividad AChE, junto con el de marcadores de diferenciación conocidos como la fosfatasa alcalina, se pueden interpretar como una consecuencia de la diferenciación y no de la proliferación (Plageman y col., 2002).

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, 1990a). Conviene recordar la intervención de las ChEs en los procesos de proliferación y diferenciación celular y en los fenómenos de adhesión intercelular.

También se ha visto que en células de eritroleucemia (K562) y 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.

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 col., 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). Para explicar la relación entre los organofosforados y el 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., 2003b) 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.

5.1.2. Colinesterasas y apoptosis

Existe una creciente evidencia de que la expresión de AChE se induce durante la apoptosis en varios tipos de líneas celulares (Zhang y col., 2002). Así, un aumento en el contenido de AChE inducido por estímulos apoptóticos se manifiesta en células de cerebro, riñón y colon, linfocitos, células endoteliales, mioblastos, osteoblastos, condrocitos y células β pancreáticas, entre otras (Zhang y col., 2002; Park y col., 2004; Zhang y Greenberg, 2012; Campoy y col., 2016). Por lo tanto, la AChE puede usarse como un marcador apoptótico.

Se han estudiado algunos mecanismos responsables del aumento de la AChE en la apoptosis. En el cáncer de colon (Deng y col., 2006) y en las células renales (Zhang y col., 2008), la inducción de la AChE está regulada por la vía de la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK). En las células HeLa, el aumento del calcio citosólico por el tratamiento con el ionóforo A23187 disminuyó la represión del promotor de AChE por el factor de unión CCAAT (CBF / NF-Y) (Zhu y col., 2007a; 2007c), mientras que se produjo la acumulación nuclear de Smad3, que se une al promotor aumentando la transcripción de la AChE (Gao y col., 2009). En células PC12, el A23187 aumentó la actividad de

GSK3 β , el cual participa en la inducción de la expresión de la AChE sináptica durante la apoptosis (Jing y col., 2008).

Por otro lado, Park y col. (2004) propusieron que la AChE juega un papel importante en la formación del apoptosoma. Por ejemplo, en las células HT-29 de cáncer de colon tratadas con etopósido, el silenciamiento de la AChE mediante siRNAs hizo disminuir algunas características apoptóticas, pero no los eventos mitocondriales, lo que sugiere que la AChE podría actuar en un paso posterior a la liberación de factores mitocondriales y antes de la activación de la caspasa-9 (Park y col., 2004). Además, ensayos de inmunoprecipitación indicaron que el silenciamiento de la AChE prevenía la interacción entre el citocromo *c* y el factor activador de la proteasa apoptótica-1 (Apaf-1) (Park y col., 2004) y que la interacción de la AChE con el citocromo *c* era necesaria para la interacción del citocromo *c* con Apaf-1 (Park y col., 2008).

La participación de AChE en la apoptosis se ha confirmado con inhibidores específicos de AChE (BW248c51 y tacrina), 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 tiene lugar 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.

La aparición de AChE nuclear en las células sometidas a apoptosis, no sólo se ha demostrado por inmunofluorescencia (Jin y col., 2002; 2004; Xie y col., 2011; Du y col., 2015), y Western blot (Xie y col., 2011; Du y col., 2015), sino también por métodos no basados en anticuerpos, como la tinción citoquímica de AChE (Zhang y col., 2002; Yang y col., 2002; Jin y col., 2004) y la fusión de AChE a la proteína verde fluorescente (AChE-GFP) (Park y col., 2008; Xie y col., 2011; Du y col., 2015). En las células apoptóticas se ha observado un fragmento nuclear de AChE de 55 KDa, que resulta de la escisión de la AChE de 68 KDa en el extremo N-terminal, y cuya aparición se evita mediante el uso de inhibidores de caspasas (Xie y col., 2011).

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. Si se confirma la actividad DNasa de la AChE (Du y col., 2015), ésta explicaría la implicación de AChE en la apoptosis.

Aún quedan varias cuestiones por resolver, y se necesitan más estudios que aborden la función no clásica de la AChE en la apoptosis.

6. SISTEMA COLINÉRGICO

6.1. Introducción

La acetilcolina fue descubierta por primera vez en la naturaleza por Sir Henry Dale y Arthur Erwins en 1913, y posteriormente fue descrita como neurotransmisor por Otto Loewi en 1921. Podríamos definir al sistema colinérgico como el conjunto de enzimas, receptores y otras proteínas responsables de la síntesis, almacenamiento, reconocimiento e hidrólisis de acetilcolina.

La vida animal está controlada por neuronas, y entre ellas las neuronas colinérgicas juegan un papel importante. Dichas neuronas liberan acetilcolina (ACh), que a través de receptores nicotínicos y muscarínicos (nAChRs y mAChRs) median la neurotransmisión química en un proceso altamente integrativo. Además, los organismos responden a estímulos externos e internos para mantener y optimizar su supervivencia, de modo que el bloqueo de la neurotransmisión colinérgica es seguido por la muerte inmediata del organismo. Sin embargo, la comunicación colinérgica apareció ya desde el principio de la vida en organismos primitivos tales como bacterias, algas, protozoos, poríferos, hongos y plantas primitivas, que carecen de neuronas (Wessler y col., 1998; 2001; 2003).

Se ha demostrado que muchas células no neuronales de humanos y otros mamíferos, tales como las células madre embrionarias, células epiteliales (de la piel y vías aéreas e intestinales), endoteliales e inmunes (linfocitos) sintetizan ACh y el resto de componentes del sistema colinérgico (ChAT, nAChRs y mAChRs, colinesterasas), independientemente de la inervación neuronal. Además, la acetilcolina está implicada en procesos como proliferación, diferenciación, organización del citoesqueleto, en la liberación local de mediadores (como óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias),

locomoción, secreción y actividad ciliar (Wessler y col., 2001; 2003; Campoy y col., 2016).

La disfunción del sistema colinérgico no neuronal está implicada en la patogénesis de algunas enfermedades, tales como inflamación crónica o aguda, infección sistémica y local, aterosclerosis y cáncer (Wessler y col., 2001). La ubicuidad de la síntesis de ACh y de la expresión de nAChRs y mAChRs es un claro ejemplo de la complejidad de los sistemas biológicos.

6.2. Síntesis de acetilcolina en neuronas y células no neuronales

La producción neuronal de ACh es catalizada principalmente por una enzima citoplasmática denominada colina acetiltransferasa (ChAT), a partir de colina y acetil-CoA (Amenta y Tayebati, 2008). Debido a la alta eficiencia de la acetilcolinesterasa de las uniones sinápticas, la acetilcolina que liberan las neuronas es rápidamente hidrolizada a colina y acetato. Sin embargo, la presencia de ChAT y la producción de ACh en tejidos no neuronales fueron descubiertas ya en los años 30 por el grupo de Beyer. Así, se ha comprobado que muchos tipos celulares expresan ChAT, o tienen un mecanismo alternativo de producción de ACh mediante la enzima carnitina aciltransferasa (CrAT). En el sistema nervioso, la etapa limitante de la velocidad de síntesis de ACh es la recaptación de colina por el transportador de colina CHT-1 (Okuda y col., 2000). Algunas células no neuronales presentan CHT-1, pero en otras células el transporte de colina lo llevan a cabo proteínas similares al transportador de colina (CTL1) o transportadores de cationes orgánicos (OCTs) (Lips y col., 2005b; Yamada y col., 2011).

En neuronas, la ACh es almacenada y liberada por el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (Erickson y col., 1994), mientras que en células no neuronales VACHT sólo se expresa en tipo celulares específicos (Kummer y col., 2008). En aquellas células que no expresan dicho transportador, la ACh no es almacenada sino que es liberada directamente vía OCTs, como se observa en placenta (Lips y col., 2005; Koepsell y col., 2007).

6.3. Papel de la ACh en la proliferación celular y la apoptosis

Entre las funciones no neuronales de la ACh se incluyen proliferación, diferenciación, apoptosis, locomoción, migración, angiogénesis, funciones inmunes, secreción, organización del citoesqueleto y actividad ciliar (Wessler y Kirkpatrick, 2008; Egleton y col., 2008; Campoy y col., 2016). Dados los efectos proliferativos y anti-

apoptóticos de la activación de AChR en diferentes tipos celulares, además del hecho de que esta activación facilita la invasión tumoral y la angiogénesis, el sistema colinérgico no neuronal realiza un importante papel en la tumorigénesis (Egleton y col., 2008; Russo y col., 2014; Shah y col., 2009; Schuller, 2009; Schaal y Chellappan, 2014). La acción no neuronal de ACh tiene lugar de modo autocrino y paracrino, esto es, sobre las propias células productoras de ACh y en células vecinas, por ejemplo en colon (Pettersson y col., 2009a) y pulmón (Song y col., 2003a). Así, la ACh endógena producida por las células no neuronales, junto con la nicotina y nitrosaminas derivadas de nicotina en el caso de los fumadores, estimulan la proliferación en muchos cánceres, incluyendo los de pulmón, colon y mama. Los AChRs más relevantes, capaces de estimular la proliferación celular, son el homopentámero $\alpha 7$ (nicotínico) y M3 (muscarínico) en cáncer de pulmón, páncreas o colon; y $\alpha 9$ (nicotínico) en células de cáncer de mama (Russo y col., 2014; Schuller, 2009; von Rosenvinge y Raufman, 2011).

Una gran cantidad de información confirma el papel de ACh y los AChRs en el crecimiento celular. Así, se ha visto que la inhibición de la síntesis de ACh disminuye el crecimiento celular basal y que ACh, nicotina y otros agonistas colinérgicos estimulan la proliferación mientras que antagonistas de los AChRs la disminuyen. Por ejemplo, en células de cáncer de colon HT-29, las cuales expresan el receptor $\alpha 7$, la inhibición de ChAT atenúa el crecimiento celular basal y la nicotina lo aumenta (Pettersson y col., 2009a; Wong y col., 2007a). La adición de ACh estimula la proliferación de células H508, de cáncer de colon, que expresan el receptor M3. Esta estimulación es inhibida por antagonistas de mAChR como la atropina, la cual también disminuye el crecimiento basal, indicando que interfiere con la acción de la ACh endógena (Cheng y col., 2003). En células H82 de cáncer de pulmón de células pequeñas, las cuales producen ACh, los inhibidores de la síntesis de ACh, los antagonistas muscarínicos y nicotínicos y los siRNA contra M3 disminuyen la proliferación (Song y col., 2003a; 2008). La nicotina también estimula la proliferación de células de cáncer de vejiga (Chen y col., 2008), páncreas (Treviño y col., 2012), y otros órganos.

Los niveles de ChAT y receptores de ACh son elevados en muchos cánceres. Por ejemplo, mientras que los enterocitos de colon normal muestran una tinción inmunohistoquímica débil o negativa para ChAT, muestras de cáncer de colon muestran una tinción de moderada a fuerte (Cheng y col., 2008). La expresión del mRNA de M3 aumenta unas ocho veces en el cáncer de colon (Yang y Frucht, 2000). Las muestras de células de carcinoma de pulmón presentan un aumento de los niveles

de mRNA de ChAT y de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$ del nAChR (Song y col., 2008). El mRNA de $\alpha 9$ se expresa en niveles mucho más altos en muestras de cáncer de mama que en el tejido control (Lee y col., 2010). Además, el crecimiento de tumores se afecta por el contenido o actividad de los receptores de ACh. Así, la eliminación genética de M3 disminuye fuertemente el número y volumen de los tumores de colon inducidos por azoximetano en ratones homocigóticos negativos para M3 (Raufman y col., 2008), y el crecimiento de las células de cáncer de pulmón en xenoinjertos en ratones desnudos se inhibía por un antagonista de M3 (Song y col., 2003a; 2008). La nicotina estimulaba el crecimiento de xenoinjertos de HT-29 en ratones desnudos (Wong y col., 2007b) y de xenoinjertos de páncreas (Treviño y col., 2012). Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en las regiones codificantes de los genes de $\alpha 5$, $\alpha 3$ y $\alpha 9$ están asociados con el cáncer de pulmón (Improgo y col., 2011; Chikova y col., 2012; Niu y Lu, 2014).

En su papel de estimuladores de la proliferación, los receptores de ACh cooperan con otros receptores. En efecto, la unión de nicotina (y nitrosaminas derivadas de la nicotina del humo del tabaco) a receptores nicotínicos $\alpha 7$ estimula la secreción de adrenalina, noradrenalina y EGF, los cuales activan receptores adrenérgicos y receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los tres receptores cooperan para activar cascadas de señalización que promueven la proliferación y supervivencia, tales como las vías PI3K/Akt y los Ras/Raf/MEK/ERK (Schuller, 2009; Schaal y Chellappan, 2014; Wong y col., 2007a; 2007b). En células epiteliales de colon, la ACh activa los receptores M3, permitiendo la producción del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), el cual activa a receptores de EGF, lo que activa a su vez las vías de señalización de MEK/ERK y PI3K/Akt (Shah y col., 2009; von Rosenvinge y Raufman, 2011; Cheng y col., 2003).

Además de promover la proliferación, los receptores de ACh ejercen un efecto antiapoptótico. La nicotina confiere resistencia contra la apoptosis inducida por varios estímulos, y protege a las células de cáncer de pulmón, colon, mama, boca y otros cánceres contra la apoptosis causada por fármacos anticancerosos (Egleton y col., 2008; Cucina y col., 2012; Dinicola y col., 2013).

Estudios con células de pulmón y vías aéreas han mostrado que la nicotina induce la activación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y la inactivación de otras proapoptóticas como Bax y Bad, y el incremento en los niveles de varias proteínas que promueven la supervivencia celular incluyendo proteínas inhibitoras de apoptosis como la survivina y el factor de transcripción NF- κ B (Egleton y col., 2008; Schaal y Chellappan, 2014; Improgo y col., 2011). En líneas celulares de cáncer de colon, la

nicotina ejerce efectos antiapoptóticos a través de $\alpha 7$, ERK y Akt, con incremento de los niveles de survivina y Bcl-2 (Cucina y col., 2012; Dinicola y col., 2013). Además, la activación de M3 por ACh produce la traslocación de NF- κ B al núcleo, con efectos inhibidores de la apoptosis (von Roseninge y Raufman, 2011). La nicotina confiere resistencia a gemcitabina in vitro a las células de cáncer de páncreas y a xenoinjertos de tumores pancreáticos (Treviño y col., 2012).

Hay que destacar que la activación del receptor no siempre promueve la proliferación. Esto puede depender del receptor implicado. Así, en varios adenocarcinomas, la activación de los receptores homoméricos $\alpha 7$ produce la liberación de catecolaminas, con la consecuente activación de receptores β -adrenérgicos y adenilato ciclasa, síntesis de AMP cíclico y activación de la ruta PKA que favorece la proliferación. Por el contrario, la activación de los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ estimula la liberación de GABA, causando la inhibición de la adenilato ciclasa y, por tanto, este receptor actúa como supresor de tumores (Schuller, 2009).

6.4. Receptores de acetilcolina

6.4.1. Receptores nicotínicos

Como hemos dicho, existen dos tipos muy distintos de receptores de ACh: los receptores nicotínicos (nAChR) y los muscarínicos (mAChR).

Los receptores nicotínicos de acetilcolina son un tipo de canal iónico, y pertenecen a la superfamilia de receptores ionotrópicos “cys-loop” (bucle de cisteínas), activados por ligando. En vertebrados, constituyen una familia de proteínas con diversas funciones fisiológicas. Así, los nAChR postsinápticos localizados en la unión neuromuscular intervienen en la contracción del músculo esquelético. En el sistema nervioso autónomo, los receptores nicotínicos ganglionares son responsables de la rápida transmisión nerviosa. También se encuentran en las terminaciones nerviosas presinápticas de neuronas del sistema nervioso simpático y parasimpático, y en neuronas sensoriales. Los nAChRs de tipo neuronal están también presentes en cerebro y médula espinal, donde frecuentemente actúan como moduladores. Además, los nAChRs se pueden encontrar en células no neuronales, incluyendo células de la glía, inmunes y endoteliales, donde se cree que responden a la ACh sintetizada por dichas células.

La diversidad estructural y funcional dentro de esta familia de receptores ha estimulado el interés por los receptores nicotínicos como potenciales dianas terapéuticas para una amplia variedad de condiciones médicas (Hurst y col., 2013).

Todos los nAChR tienen una estructura pentamérica con cinco subunidades que pueden ser todas iguales (homopentámeros) o no (heteropentámeros) (**Fig. I.11**).

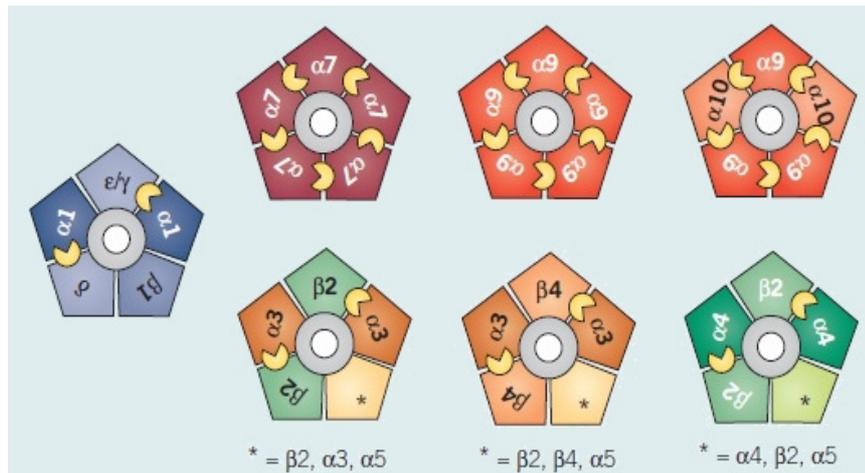


Figura I.11. Combinaciones de subunidades de los receptores nicotínicos de ACh. Los receptores nAChR son pentámeros que se forman a partir de 10 tipos de subunidades α (9 en mamíferos, que no expresan la $\alpha 8$) y 4 subunidades β , más otras subunidades típicas del receptor muscular (δ , γ , ϵ), lo que da lugar a un gran número de subtipos de receptor nicotínico con muy diversas estequiometrías. Se muestran sólo algunas combinaciones, con los sitios de unión de ACh en amarillo. El receptor muscular tiene una estequiometría $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ en adultos, y puede unir dos moléculas de ACh. Los homopentámeros $\alpha 7$ y $\alpha 9$ y los heterotetrámeros $\alpha 9\alpha 10$ pueden unir hasta 5 moléculas de ACh, mientras que otros heterotetrámeros tienen sólo dos sitios de unión. En los receptores heteroméricos de tipo neuronal la ACh se une en las interfases entre subunidades α y β . Modificado de Wonnacott (2014).

Los AChRs del músculo esquelético de vertebrados y sus homólogos en los órganos eléctricos de *Torpedo* y *Electrophorus* fueron los primeros receptores estudiados y caracterizados con detalle tanto a nivel estructural como funcional. La alta afinidad de estos receptores por las α -toxinas de serpientes, especialmente la α -bungarotoxina (α -BTX), permitió su purificación a partir de la electroplaca de *Torpedo* encontrándose 4 subunidades, designadas como α , β , γ , δ (Elliott y col., 1980). En la **Figura I.12** se muestra la estructura recién descrita del heteropentámero $\alpha 4\beta 2$ (Morales-Perez y col., 2016). Cada subunidad contiene 4 segmentos

transmembrana, en el que el segundo segmento (M2) forma parte del canal iónico. El dominio N-terminal (extracelular) de cada subunidad posee un “cys-loop” (bucle de cisteínas) que contiene dos residuos de cisteína: Cys128 y Cys142 (en la subunidad $\alpha 1$ de *Torpedo*), separadas por 13 aminoácidos y unidas por un puente disulfuro, formando un bucle, que es el responsable de la transducción de la señal tras la apertura del canal (Bouzat, 2012). Experimentos de mutagénesis y marcaje por fotoafinidad han demostrado la importancia de 4 residuos aromáticos, Tyr93, Trp149, Tyr190 y Tyr198 (en *Torpedo*), lo que demuestra que 3 bucles polipeptídicos en la subunidad α forman parte del principal sitio de unión de agonistas (Grutter y col., 2004; Bouzat, 2012). Estos residuos aromáticos estabilizan la unión de ligandos a través de interacciones catión- π (**Fig. I.12.D**).

La familia de los nAChR de mamíferos está compuesta por 8 subunidades que forman la parte principal de los sitios de unión de ligandos ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$) y de 8 subunidades estructurales ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, δ , ϵ , γ) que confieren propiedades funcionales y farmacológicas únicas a los receptores. En general, los nAChRs se agrupan en 3 grupos mayoritarios: los receptores que tienen gran afinidad por la nicotina como los que contienen $\alpha 4$, los receptores que unen a la α -bungarotoxina, que incluyen $\alpha 7$, $\alpha 9$ y el receptor muscular, y los receptores del sistema nervioso autónomo compuestos por subunidades $\alpha 3/\beta 4$ (Gahring y Rogers, 2006).

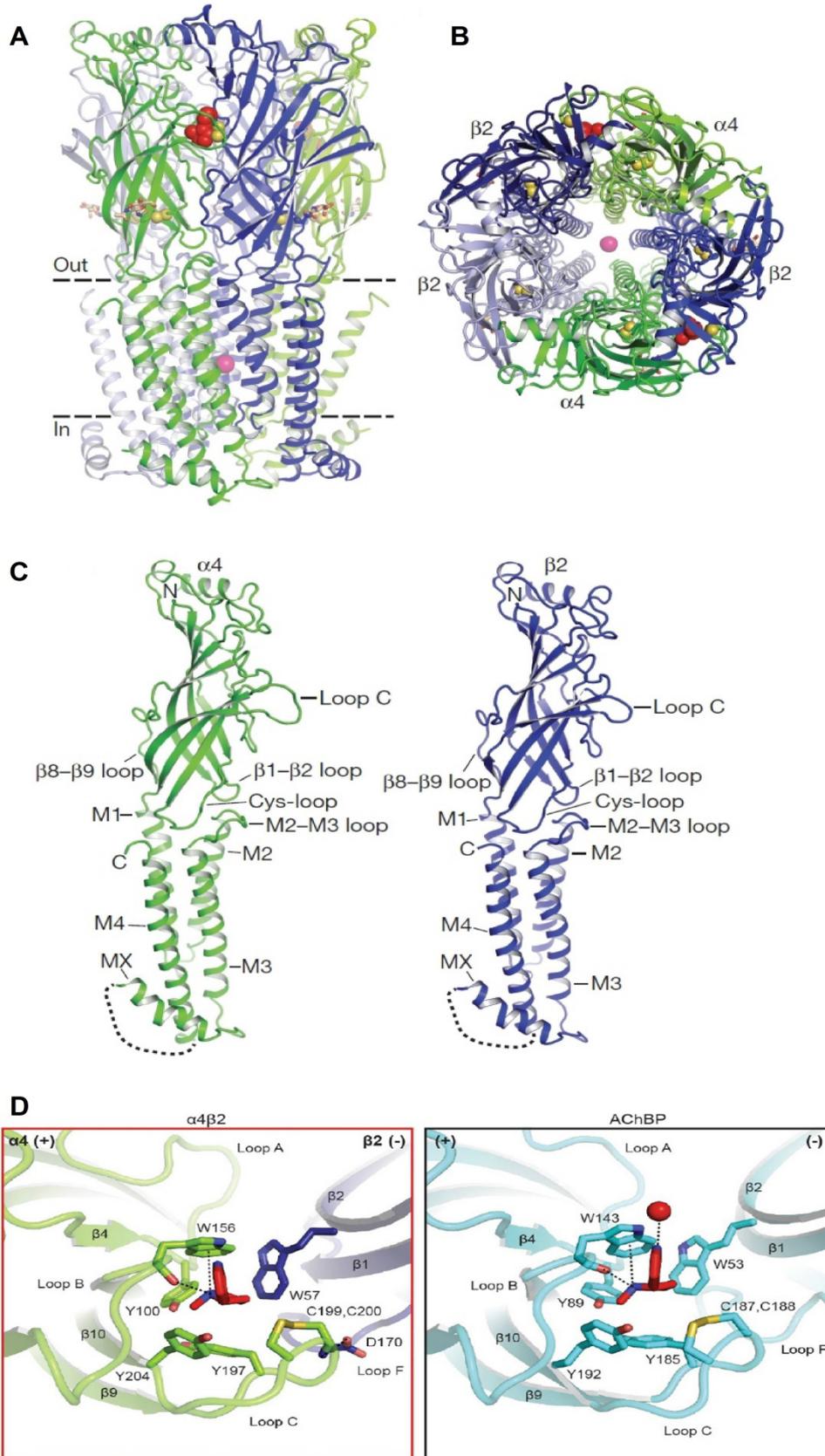
Las subunidades neuronales más abundantes son $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\alpha 7$, destacando los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ que suponen más del 90% de todos los nAChR neuronales (Corriveau y Berg, 1993). Las subunidades que componen el receptor $\alpha 4\beta 2$ pueden asociarse en dos estequiometrías diferentes, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ y $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ (Tapia y col., 2007). Los receptores $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ muestran una baja permeabilidad al Ca^{2+} y una alta afinidad por ACh y nicotina, mientras que los receptores $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ tienen una alta permeabilidad al Ca^{2+} y baja sensibilidad a la nicotina (Carbone y col., 2009; Anderson y col., 2009). Por su parte, el receptor $\alpha 7$ muestra, relativamente, una baja afinidad por ACh y una rápida cinética de desensibilización en presencia de ACh 100 μM o superior (Fenster y col., 1997), además de una alta permeabilidad al Ca^{2+} con relación a los de tipo $\alpha 4\beta 2$ (Seguela y col., 1993).

La permeabilidad al calcio viene determinada por aminoácidos cargados en el extremo extracelular del dominio transmembrana M2, que forman un anillo de aminoácidos en el extremo exterior del canal de cationes. Las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\beta 3$ tienen un resto de Glu conservado en M2 que contribuye a la alta permeabilidad al calcio, mientras que $\beta 2$ tiene Lys en esa posición (Tapia y col., 2007).

La permeabilidad al calcio de los nAChR depende mucho de la composición de subunidades, de modo que el cociente de permeabilidades al calcio y al sodio (P_{Ca}/P_{Na}) es cercano a 10 para los receptores homoméricos ($\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 9\alpha 10$), mientras que está en el rango 0.7-1.6 para los heteroméricos neurales ($\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$) y muscular de adulto, y es incluso más baja (~ 0.2) para el nAChR muscular embrionario (Fucile, 2004; Wonnacott, 2014). Esto como norma general, pues incluso entre los receptores $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2^*$ la permeabilidad varía según cual sea la quinta subunidad, de modo que los receptores $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2\beta 3$ y $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2\alpha 5$ son mucho más permeables al calcio que los $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ (Tapia y col., 2007).

Los nAChRs pueden existir espontáneamente en varios estados conformacionales interconvertibles: reposo (canal cerrado con el sitio de unión al agonista desocupado), activo (canal abierto), desensibilizado (canal cerrado con una alta afinidad por el agonista) y un estado inactivo que es un estado desensibilizado más prolongado (**Fig. I.13**) (Changeux y col., 1984; 1998; Gotti y Clementi, 2004; Hurst y col., 2013). Con la exposición a altas concentraciones de ACh o agonistas no selectivos de nAChR tales como la nicotina, el equilibrio entre estos estados conformacionales se desplaza

Figura I.12. Arquitectura del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$. Se muestra la estructura del receptor humano unido a nicotina, determinada por difracción de rayos X con 3,94 Å de resolución. Tomada de Morales-Pérez y col. (2016). Con permiso de Mcmillan Publishers Ltd. **A)** Vista transversal a la membrana plasmática, con las subunidades $\alpha 4$ en verde y las $\beta 2$ en azul. La nicotina (rojo) y el sodio (rosa) se representan como esferas. Los puentes disulfuro del bucle Cys (Cys-loop) y los del bucle-C se muestran como esferas amarillas. Los azúcares N-unidos (marrón) aparecen como varillas. Las líneas punteadas indican la posición aproximada de la membrana. **B)** Vista perpendicular a la membrana plasmática mirando desde el lado extracelular. **C)** Subunidades individuales, orientadas como en la Fig. A. Una línea discontinua indica los residuos del dominio intracelular que no se han modelado. **D)** Detalle del bolsillo de unión del nAChR $\alpha 4\beta 2$ (izquierda) y la AChBP (derecha), con nicotina unida (en rojo). Las líneas discontinuas representan puentes de hidrógeno e interacciones catión- π potenciales. La esfera roja es una molécula de agua. Obsérvese la semejanza entre los bolsillos de nAChR y de AChBP, y en su modo de unión al ligando. La estructura está ya depositada en el PDB (5KXI).



a un estado activo, permitiendo la transducción de la señal seguida por la desensibilización del receptor. Sin embargo, una exposición prolongada a bajas concentraciones de agonistas estabiliza el estado conformacional desensibilizado del receptor, que se convierte en refractario a la activación por el agonista. El sitio de unión de ACh para la activación de los nAChRs está situado en la interfase entre la subunidad α y una subunidad adyacente (Blount y Merlie, 1989). El nAChR $\alpha 4\beta 2$ contiene dos sitios de unión a ACh idénticos, mientras que el nAChR $\alpha 7$ homomérico contiene cinco sitios de unión a ACh (Palma y col., 1996). Aunque el nAChR $\alpha 7$ muestra una menor sensibilidad a la activación por ACh y una rápida desensibilización, se ha especulado que los cinco sitios de unión a ACh proporcionan un rango más versátil de sensibilidad y señalización que el que tienen otros subtipos de nAChRs (Jones y col., 2012).

La estructura tridimensional de los dominios extracelulares de las subunidades de los nAChRs se ha determinado a partir de las proteínas de unión a acetilcolina (AChBP, del inglés *Acetylcholine Binding Protein*), que comparten similitud de secuencia con la región extracelular de los nAChR (Brejc y col., 2001). También han sido importantes los estudios estructurales mediante microscopía electrónica con el propio receptor nicotínico (Unwin, 2005). Estos datos han ayudado a confirmar que los agonistas convencionales, como la acetilcolina y los antagonistas competitivos, tales como la metillicaconitina (MLA) se unen a un dominio de unión al agonista extracelular (el sitio de unión “ortostérico”), situado en la interfase entre las subunidades adyacentes (Taly y col., 2009) y distinto al poro transmembrana del canal iónico (Gill y col., 2011) (**Fig. I.14**).

En el receptor de tipo muscular la unión de ACh a las subunidades α desencadena un reordenamiento en el dominio de unión al ligando, que implica un desplazamiento hacia fuera de la porción extracelular de la subunidad β . Dicha subunidad interactúa con los extremos yuxtapuestos de las hélices α que conforman el poro. Las hélices de las subunidades β se inclinan hacia fuera para acomodar este desplazamiento, desestabilizando la disposición de las hélices de revestimiento del poro, las cuales, en el canal cerrado, se doblan hacia el interior simétricamente para formar una compuerta hidrófoba central. El enderezamiento y el movimiento tangencial de las hélices de revestimiento del poro efectúan la apertura del canal, ensanchando el poro asimétricamente y aumentando su polaridad en la región de la compuerta. Las hélices de revestimiento del poro de las subunidades α y δ , al flexionar entre conformaciones alternativas dobladas y rectas, experimentan los movimientos más grandes. Esta

transición alostérica acoplada desplaza la estructura desde un estado tenso (cerrado) hacia un estado más relajado (abierto) (Unwin y Fujiyoshi, 2012).

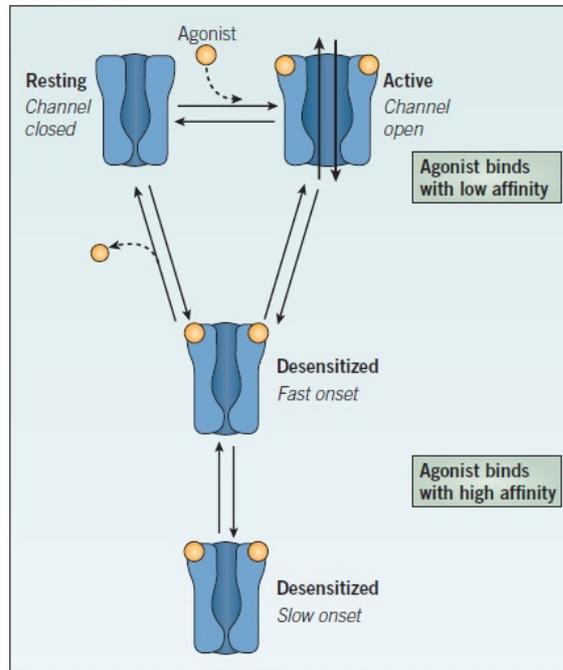


Figura I.13. Estados conformacionales del receptor nicotínico de ACh. Para los receptores nicotínicos, la apertura del canal tiene lugar en la escala de milisegundos, y va seguida de procesos de desensibilización rápido (~0,1 s) y lento (en una escala temporal del orden del minuto). Los datos cinéticos son consistentes con un modelo alostérico de cuatro estados: un estado de reposo de baja afinidad (B), un estado activo de canal abierto (A), y dos estados desensibilizados con el canal cerrado (I y D), que son refractarios a la activación y tienen alta (I) o muy alta (D) afinidad por los agonistas. En ausencia de agonistas, una fracción de receptores puede estar en el estado desensibilizado de alta afinidad. La transición entre los distintos estados depende de la unión de ligandos, y además puede estar regulada por fosforilación, como se ha visto para el receptor muscular (Changeux y Edelstein, 1998; Gotti y Clementi, 2004). La figura está tomada de Wonnacott (2014).

Una complejidad adicional de la estructura de los receptores nicotínicos se demuestra por los subtipos que contienen las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$, ya que estas subunidades no pueden formar canales funcionales, a menos que se coexpresen con otras subunidades α o β , por lo que se les denomina subunidades “huérfanas”

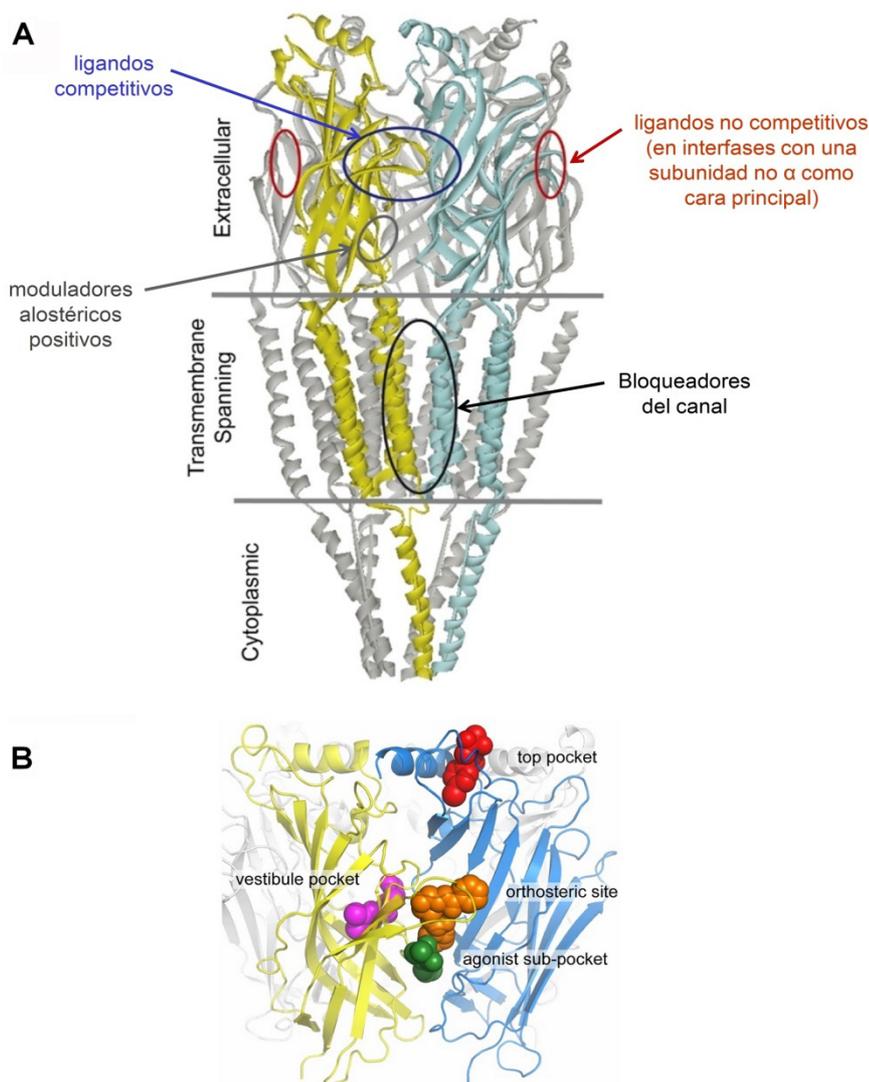


Figura I.14. Sitios de unión de ligandos en los receptores nicotínicos de ACh. A) Localización de los sitios de unión de ligandos competitivos y no competitivos del nAChR. Figura adaptada de Hansen y col. (2007), con permiso de Elsevier. Los óvalos en rojo indican la posición de los sitios de unión de los ligandos alostéricos no competitivos. En los receptores heteroméricos de tipo neuronal, una subunidad β ocupa el lugar de la subunidad γ/δ de la figura (en azul). Los óvalos en azul señalan los sitios de unión de ligandos competitivos, que en los receptores de tipo neuronal se forman entre una subunidad de tipo α (2, 3, 4, ó 6) y otra de tipo β (2 ó 4), o bien entre dos subunidades α (7, 9 ó 10) en el caso de los receptores homoméricos y de los heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$ (Zouridakis y col., 2009). **B)** Sitios de unión alostéricos descubiertos por estudios con la proteína quimérica $\alpha 7$ -AChBP (Spurny y col., 2015). El ligando en naranja que ocupa el sitio ortostérico de unión de agonistas es la lobelina. Se observa que el sitio ortostérico se encuentra en la interfase entre una subunidad principal y otra complementaria. Se muestran varios ligandos alostéricos unidos a diferentes bolsillos de unión.

(Lindstrom, 2000; Lindstrom, 2000). Por ejemplo, la subunidad $\alpha 5$ de pollo forma un subtipo $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ funcional en el cual la subunidad $\alpha 5$ participa directamente en el revestimiento del canal y le confiere propiedades distintas de las del subtipo $\alpha 4\beta 2$, como son una mayor tasa de desensibilización y permeabilidad al Ca^{2+} , y una concentración efectora media (EC_{50}) para agonistas nicotínicos más alta (Ramirez-Latorre y col., 1996). Sin embargo, cuando se expresa con las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 2$, $\alpha 5$ aumenta la sensibilidad a ACh, pero este efecto no se ve cuando la subunidad $\beta 2$ se sustituye por $\beta 4$ (Wang y col., 1996).

Un aspecto interesante de los nAChRs es que, a pesar de ser canales iónicos de rápida excitación, pueden estar localizados en muchas partes de la célula incluyendo agregados en el cuerpo celular, terminales presinápticas (donde contribuyen a modular la liberación de neurotransmisores), y/o junto a las terminales postsinápticas, incluso se han descrito en mitocondrias (Lykhmus y col., 2014). Además, la relativa alta permeabilidad al calcio de estos receptores (especialmente $\alpha 7$) parece contribuir a regular vías de señalización por segundos mensajeros como la de PI3-Kinasa/Akt, sistemas de activación transcripcional como CREB, y ciertos procesos proteolíticos (Meyer y col., 2002).

Hay varios tipos de señales citoplasmáticas de calcio que se inician por la activación de los nAChRs (**Fig. I.15**): el flujo directo de calcio a través del receptor, la entrada indirecta de calcio extracelular a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs, *Voltage-Dependent Calcium Channels*) que se activan por la despolarización de la membrana mediada por los nAChRs, y la liberación de calcio inducida por calcio desde el retículo endoplásmico (RE) al citosol a través de los receptores de rianodina (Tsuneki y col., 2000; Dajas-Bailador y col., 2002) y los receptores de inositol (1,4,5)-trisfosfato (IP_3Rs) que se desencadena por la entrada de calcio extracelular (Shen y Yakel, 2009; Sharma y Vijayaraghavan, 2001).

La nicotina imita las acciones de la acetilcolina al unirse como un agonista a las subunidades α de los nAChRs (Lindstrom y col., 1996). El cambio conformacional resultante en el receptor abre la puerta en el lado intracelular del canal iónico en la membrana plasmática, permitiendo que los iones fluyan desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula (Le Novère y Changeux, 1995). Aunque todos los nAChRs permiten el paso de diferentes cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), el $\alpha 7$ es especialmente permeable para el Ca^{2+} (Lindstrom y col., 1996; Gopalakrishnan y col., 1995). La entrada de los cationes reduce la carga negativa en el lado intracelular de la membrana plasmática, es decir, causa despolarización de la membrana. A su vez,

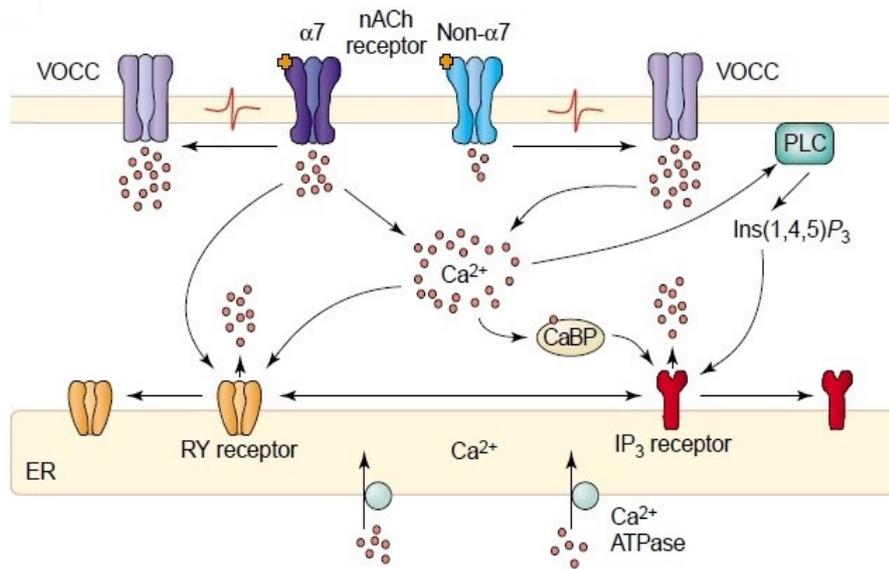


Figura. I.15. Aumento del calcio citosólico tras la activación de los nAChRs. Los receptores nicotínicos pueden incrementar la concentración de calcio intracelular reclutando Ca^{2+} de varias fuentes, entre las que se incluyen los canales de calcio activados por voltaje (VOCCs), activados como consecuencia de la despolarización de la membrana producida por la activación de los nAChRs. A su vez, la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (ER) inducida por Ca^{2+} está mediada por los receptores de rianodina (RY) y los receptores de IP_3 (inositol-1,4,5-trisfosfato). El IP_3 se produce por la activación dependiente de Ca^{2+} de la fosfolipasa C (PLC). De forma alternativa, los receptores de IP_3 pueden ser activados por proteínas de unión a calcio (CaBPs). Diferentes subtipos de nAChRs pueden acoplarse a una fuente determinada de Ca^{2+} . Por ejemplo, la mayoría de los subtipos que no contienen subunidades $\alpha 7$ amplifican sustancialmente las respuestas debidas al Ca^{2+} intracelular activando los VOCCs. Sin embargo, los receptores $\alpha 7$, que son altamente permeables al Ca^{2+} , parecen estar acoplados a la activación de los RYs del ER. De este modo, la activación de los nAChRs puede generar señales sostenidas de Ca^{2+} mediante la activación de los RY y de los de IP_3 . La figura está tomada de Dajas-Bailador (2004). Con permiso de Elsevier.

esta despolarización abre los canales de Ca^{2+} activados por voltaje de la membrana plasmática, dando lugar a la entrada adicional de Ca^{2+} . Los efectos cooperativos resultantes de los nAChR y de los canales de Ca^{2+} desencadenan diversas respuestas como la liberación de neurotransmisores y factores de crecimiento, factores angiogénicos y neurotróficos. Además, el aumento de las concentraciones de cationes intracelulares puede desencadenar la estimulación directa de las cascadas de

señalización intracelular que intervienen en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis, la migración y la diferenciación (Kunzelmann, 2005; Roderick y Cook, 2008; Schuller, 2009). En la **Figura I.16** se muestran las cascadas de señalización que se desencadenan tras la activación de los nAChRs.

6.4.1.1. Agonistas y antagonistas de los nAChR

En general, los agonistas de los nAChR se unen al dominio extracelular de las subunidades (Rucktooa y col., 2009). Los agonistas estabilizan el bucle de cisteínas móvil de la subunidad de unión principal en oposición a la subunidad adyacente (complementaria). Los antagonistas competitivos se unen cerca de los sitios de unión del agonista, impidiendo el acceso a los agonistas. A diferencia de los agonistas, los antagonistas competitivos estabilizan el bucle de cisteínas en una conformación extendida que impide la apertura del canal. Por lo tanto, el canal permanece cerrado y se evita el acceso al sitio de unión del agonista (Hansen y col., 2005; Celie y col., 2004; Taly y col., 2011).

Los agonistas de nAChR son estructuralmente diversos, comprendiendo productos naturales de una variedad de especies vegetales y animales y moléculas sintéticas.

La acetilcolina (ACh) es el agonista endógeno para todos los subtipos de nAChR. Es un agonista completo y una opción habitual para activar los nAChRs en experimentos electrofisiológicos (comúnmente usada a 100 μ M).

En cuanto a la colina, se trata de una amina cuaternaria considerada como un agonista selectivo completo de los nAChR $\alpha 7$ ($EC_{50}=1,6$ mM) y un agonista parcial de los $\alpha 3\beta 4\beta 2$, no activando a los de tipo $\alpha 2\beta 2^*$ (Albuquerque y col., 2009).

El cloruro de carbamilcolina o carbacol es un análogo carbamato de la ACh, resistente a la hidrólisis. Es un agonista de los mAChR y de los nAChR. En la **Figura I.17** se comparan las estructuras del carbacol y la ACh, y en la **Figura I.18** se muestra la unión del carbacol a la AChBP, una proteína homóloga del nAChR.

La nicotina, alcaloide del tabaco, es el agonista de nAChR utilizado históricamente para distinguir entre los receptores nicotínicos y los muscarínicos. Todos los subtipos de nAChR son activados por nicotina, con la excepción de los nAChR $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ que son bloqueados por ella (Verbitsky y col., 2000). La nicotina se une preferentemente y con una alta afinidad a los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ (K_i 1nM).

Por otro lado, los antagonistas competitivos interactúan con el nAChR en el sitio de unión del agonista o cerca de éste. La inhibición llevada a cabo por estos antagonistas puede ser superada mediante el aumento de la concentración del

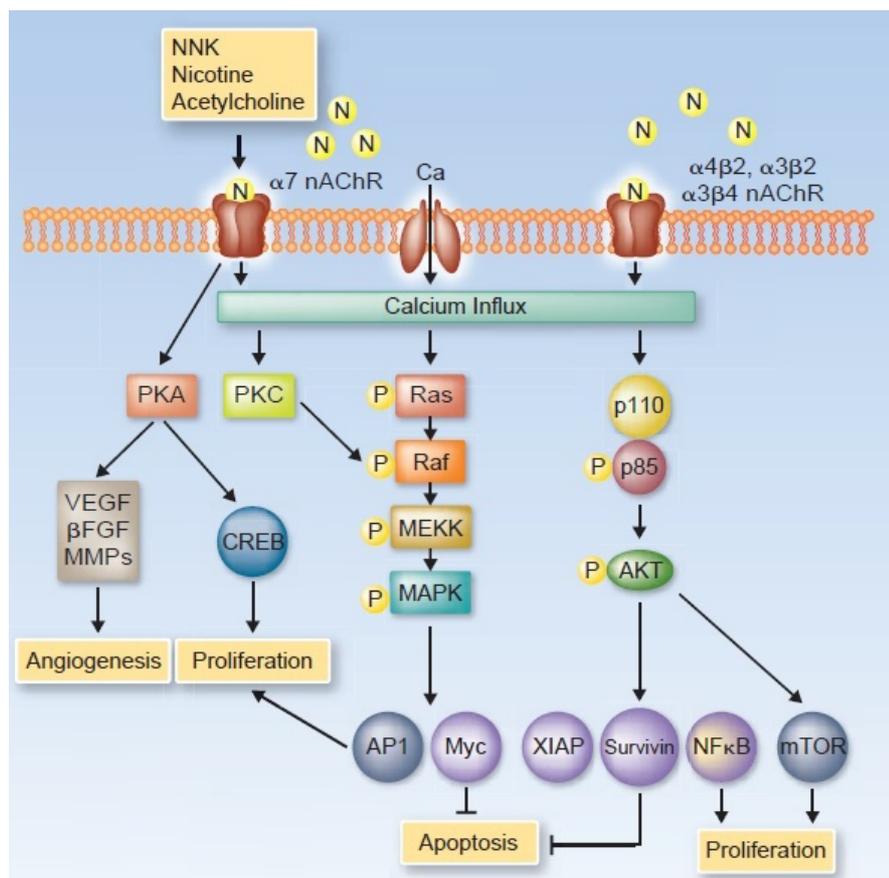


Figura I.16. Ruta de señalización por nAChRs implicada en la proliferación celular. Los agonistas nicotínicos como la acetilcolina, la nicotina y metabolitos procedentes de la nicotina como el NNK y el NNN aparecen ordenados según su afinidad por los distintos tipos de nAChRs. El NNK y la nicotina (N) tienen mayor afinidad por los nAChRs homopentaméricos $\alpha 7$ y $\alpha 9$, mientras que la acetilcolina y el NNN se unen, preferentemente, a los nAChRs heteropentaméricos ($\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ o $\alpha 3\beta 4$). En células de cáncer de pulmón y células neuronales, la señalización llevada a cabo tras la activación de los nAChRs $\alpha 7$ y los nAChRs heteropentaméricos promueve la proliferación y la angiogénesis, por la activación dependiente de Ca^{2+} de PKA, PKC, PI3K/Akt y MAPK, a través de la inducción de factores de transcripción como NF- κ B, AP1, CREB y mTOR. Por otro lado, la nicotina inhibe la apoptosis mediante la activación de factores de supervivencia celular tales como Myc, XIAP y la proteína survivina. La nicotina también desempeña un papel proangiogénico liberando MMPs, VEGF y β FGF de células endoteliales. Estas cascadas de transducción de señales generan un bucle de retroalimentación positiva, dando lugar a la progresión del tumor. Modificado de Wu y cols. (2011). Con permiso de AACR.

agonista. Por ejemplo, la α -bungarotoxina es un potente antagonista pseudo-irreversible del receptor muscular ($\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ y $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$), de los homopentámeros $\alpha 7$ y $\alpha 9$ y de algunos nAChRs de invertebrados. Se trata de una toxina polipeptídica aislada del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus*, y fue el instrumento para la caracterización y purificación de los nAChRs musculares. Normalmente, sólo es necesaria una preincubación de hasta una hora, con una concentración nanomolar baja (10 nM) de la toxina para lograr un bloqueo completo del receptor (Verbitsky y col., 2000; Dupuis y col., 2011). Por su parte, el citrato de metillicaconitina (MLA) es un alcaloide norditerpenoide producido por una planta del género *Delphinium* que actúa como un potente antagonista competitivo para los nAChRs $\alpha 7$ sobre otros subtipos de nAChRs (Ward y col., 1990; Absalom y col., 2013).

En cuanto a los antagonistas no competitivos, por definición, no compiten por la unión a los sitios de unión del agonista, no desplazan la unión de agonistas convencionales y su inhibición no es superable con una concentración creciente del agonista. Éstos interactúan con sitios distintos en el receptor bloqueando el canal e inhibiendo su función (Peng y col., 2013). Por ejemplo, el bromuro de hexametonio es relativamente no selectivo, bloquea los nAChR del músculo y diversos subtipos de receptores de tipo neuronal. Se suele usar en torno a 1-100 μ M para bloquear los nAChRs neuronales *in vitro* (Marks y col., 1999; Eaton y col., 2003). Por otro lado, la mecamilamina (hidrocloruro de mecamilamina o MEC) es una amina secundaria considerada como el antagonista no competitivo típico de los nAChR neuronales. Los estudios de acoplamiento molecular sugieren que, en su forma protonada, la MEC es atraída por la boca del canal e interactúa con el sitio luminal, convirtiéndose en un bloqueador de los canales abiertos (Arias y col., 2010). La MEC inhibe la mayoría de los nAChRs neuronales pero son ligeramente más sensibles los de tipo $\alpha 3\beta 4$. Para conseguir un bloqueo completo *in vitro* de estos receptores se suele usar una concentración de 10 μ M. Sin embargo, el antagonismo de la MEC sobre los nAChRs $\alpha 7$ es reversible, necesitándose mayores concentraciones para bloquear efectivamente este subtipo. La MEC también antagoniza los nAChRs musculares de una forma no competitiva y en un rango de concentración de entre 1-10 μ M. Si se emplea a altas concentraciones (100 μ M) puede inhibir transitoriamente los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (Papke y col., 2001).

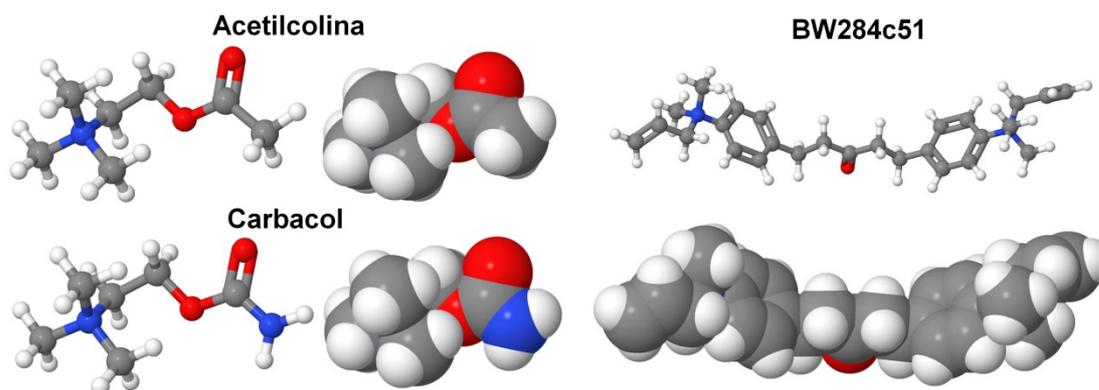


Figura I.17. Estructuras de la acetilcolina, el carbacol y el BW. Se muestran en el modelo de bolas y varillas y en el modelo espacial. La acetilcolina es el sustrato de AChE y el agonista natural principal de los AChR nicotínicos y muscarínicos. El carbacol es un análogo de la ACh, que es agonista de los nAChR y mAChR. El BW es un inhibidor reversible y potente de AChE. Los tres agentes se han usado en este estudio para ver su efecto sobre la cantidad de AChE de las células Caco-2. Figuras realizadas usando Jmol (an open-source Java viewer for chemical structures in 3 dimensions; <http://www.jmol.org>).

Los moduladores alostéricos son ligandos no competitivos que actúan en una variedad de sitios distintos para influenciar positiva o negativamente las interacciones de agonistas y/o la función de los nAChRs (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007). En este tipo de ligandos se incluyen cationes inorgánicos, esteroides, anestésicos y aminas. Los moduladores alostéricos positivos (PAMs) están siendo considerados como fármacos terapéuticos potenciales (Seo y col., 2009; Lynagh y Lynch, 2012).

6.4.2. Receptores muscarínicos

En 1869, Schmiedeberg y Kopp demostraron que las concentraciones crecientes de extractos del hongo *Amanita muscaria* disminuían de forma progresiva el latido del corazón de las ranas hasta llegar a detenerlo. Más tarde se descubrió que estos efectos estaban mediados por los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs),

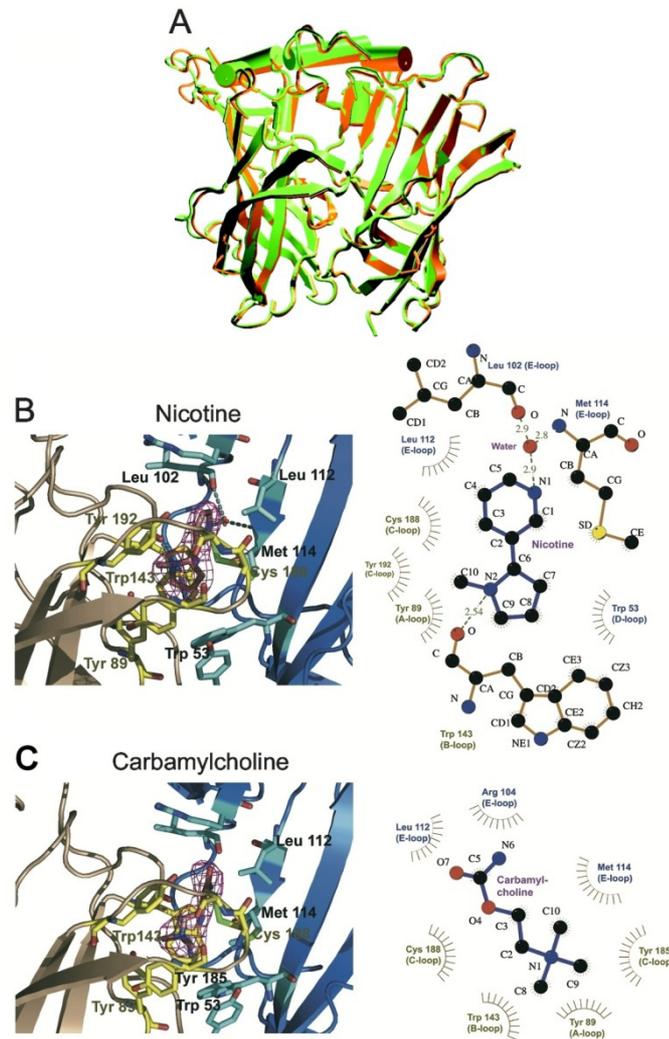


Figura 1.18. Unión de nicotina y carbacol a la AChBP. La proteína de unión a acetilcolina (AChBP) es un homopentámero soluble de moluscos como *Lymnaea stagnalis* o *Aplysia californica*, que presenta alta homología con el dominio amino terminal extracelular de los nAChR. **A)** Superposición de dos subunidades adyacentes de AChBP (verde) con dos subunidades adyacentes del modelo de $\alpha 7$ (naranja) (Le Novère y col., 2002). Se observa la gran similitud de sus modos de plegamiento. **B)** Unión de nicotina a la AChBP. El ligando aparece en bolas y varillas, con su densidad electrónica superpuesta. Los residuos del sitio de unión aparecen en color amarillento (sitio principal) o azulado (sitio complementario). A la derecha hay una representación esquemática de las interacciones entre el ligando y la proteína, que muestra los puentes de hidrógeno y las uniones de van der Waals. **C)** Unión del carbacol a la AChBP, con el mismo modo de visualización. Nicotina y carbacol se unen al mismo lugar, y causan cambios conformacionales locales similares en la proteína. Las Figuras B y C se han tomado de Celie y cols. (2004). Con permiso de Elsevier.

miembros de una superfamilia de receptores que activan las proteínas de guanosina 5-fosfato (receptores acoplados a proteínas G). Las proteínas G modulan la actividad de la adenilato ciclasa, los canales iónicos y el contenido en lípidos de fosfatidilinositol, regulando así un amplio repertorio de respuestas biológicas (Malbon, 2005; Gilman, 1984).

Los receptores muscarínicos están compuestos de siete dominios helicoidales transmembrana (**Fig. I.19**), conectados por tres bucles extracelulares y tres intracelulares, con el extremo amino-terminal en la parte extracelular y el extremo carboxilo-terminal en la intracelular. Los dominios amino-terminales de los diversos subtipos de mAChRs contienen residuos de asparagina que son sitios de N-glicosilación (Nathanson, 2004).

Inicialmente, basándose en la afinidad farmacológica selectiva por el agonista muscarínico pirenzepina, se describieron dos subtipos de receptores muscarínicos, M1 y M2 (Hammer y col., 1980). En 1987, utilizando técnicas de clonación molecular, (Bonner y col., 1987) describieron cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) (**Tabla I.2**).

Dentro de sus siete dominios transmembrana, estos cinco subtipos exhiben una homología de secuencia extensa, tanto entre los distintos subtipos como con otros receptores G (Hulme y col., 2003). Las secuencias de los receptores son más variables en el extremo amino extracelular y la porción central del tercer bucle intracelular (Wess, 1996). Tras activarse, los receptores muscarínicos de número impar (es decir, M1, M3 y M5) se unen a proteínas G de la familia Gq/11, que activan la fosfolipasa C para iniciar la cascada de señalización del fosfatidilinositol trifosfato. Los receptores muscarínicos de número par (M2 y M4) se unen a proteínas G de tipo Gi/o que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (**Fig. I.20**). Así, los receptores muscarínicos pueden mediar la regulación de una serie de cascadas de señalización reguladas por proteína-quinasa implicadas en el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Estas cascadas de proteína-quinasa conducen a la activación de las MAPKs Erk1 y Erk2, la quinasa p38 y la quinasa terminal de c-Jun (JNK) (Nathanson, 2004).

Experimentos de mutagénesis han implicado varios residuos específicos en el segundo, tercero, quinto, sexto y séptimo dominio transmembrana de los mAChRs, en la unión de ligandos colinérgicos. En el caso de la ACh, se une al receptor a través de un residuo de ácido aspártico cargado negativamente en el tercer dominio transmembrana, que interactúa con el grupo amonio (cargado positivamente) de la

ACh. La unión de la ACh al mAChR induce un cambio conformacional en el receptor que le permite activar una proteína G determinada (Nathanson, 2004).

Las regiones responsables de determinar la especificidad del acoplamiento del receptor a las proteínas G se ha estudiado principalmente por la construcción de receptores quiméricos entre dos mAChR, como M2 y M3, que se acoplan a diferentes proteínas G. La región proximal a la membrana del tercer bucle es la determinante de la especificidad del acoplamiento de la proteína G, aunque otras regiones como las del segundo dominio intracelular también pueden desempeñar un papel en las interacciones de la proteína G al receptor (Nathanson, 2004).

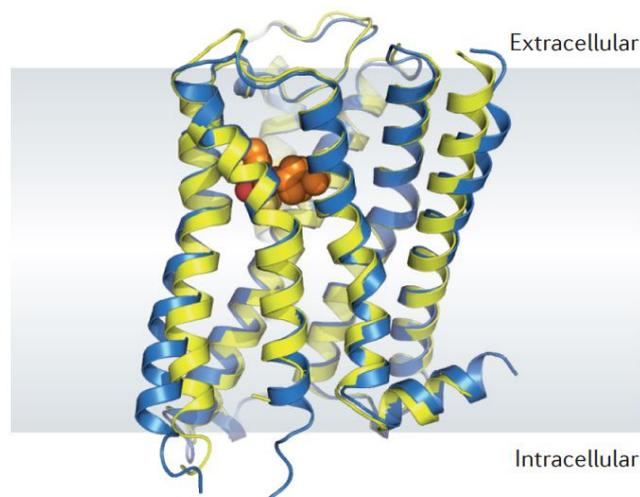


Figura I.19. Estructura de los receptores muscarínicos. Se muestran las estructuras superpuestas de los receptores M2 (azul) y M3 (amarillo), en su forma inactiva, unida a antagonista. Las estructuras son muy similares entre sí en su modo general de plegamiento. Por claridad, sólo se muestra el ligando del receptor M3 (tiotropium), en naranja. La arquitectura global de estos receptores es muy parecida a la de otros receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que unen a las aminas, con sitios ortostéricos similares de unión a ligandos. Figura tomada de Kruse y col. (2014). Con permiso de Elsevier.

Además de los sitios de unión a agonistas, los receptores muscarínicos poseen sitios alostéricos en los que los ligandos pueden modular la activación por agonistas (Christopoulos y col., 1998). Estos sitios alostéricos son distintos del sitio de unión del agonista y entre los subtipos (Birdsall y Lazareno, 2005).

Subtipos de Receptores Muscarínicos			
Subtipo	Número de aminoácidos	Distribución en los tejidos	Ruta de transducción de señales
M1	460	SNC (sistema nervioso central): córtex, hipocampo, <i>striatum</i> Epitelio gastrointestinal Corazón Útero	Activación de fosfolipasa C
M2	466	SNC: Cerebelo Corazón Células del músculo liso	Inhibición de adenilato ciclasa
M3	590	SNC: córtex, tálamo SNE (sistema nervioso entérico) Epitelio gastrointestinal	Activación de fosfolipasa C
M4	479	SNC: <i>striatum</i> Pulmón Útero	Inhibición de adenilato ciclasa
M5	532	SNC: hipocampo, tegmentum ventral	Activación de fosfolipasa C

Tabla I.2. Subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina.

Los ligandos alostéricos producen cambios conformacionales en el receptor que se manifiestan como una alteración en las propiedades de la unión de un ligando al sitio ortostérico clásico, y por el potencial para la activación directa de la señalización del receptor a través del sitio alostérico (Keov y col., 2011). Los moduladores alostéricos positivos (PAMs) aumentan la actividad ortostérica, los moduladores alostéricos negativos (NAMs) la inhiben, y los agentes que ocupan un sitio alostérico pero no cambian la actividad de los ligandos ortostéricos se denominan ligandos alostéricos neutros (NAL). Los efectos de los moduladores alostéricos son saturables, es decir, no se observa ninguna actividad adicional por encima de un cierto límite, independientemente de la dosis del modulador. Este fenómeno se produce por la

cooperatividad entre sitios ortostéricos y alostéricos, y puede variar desde sutiles ajustes hasta una gran modulación (Kruse y col., 2014).

Dentro de los mecanismos reguladores de estos receptores se incluyen procesos tales como la desensibilización del receptor (desacoplamiento rápido del receptor de las moléculas de señalización), internalización o endocitosis del receptor (translocación del receptor desde la superficie celular a vesículas intracelulares) y regulación negativa (translocación del receptor a lisosomas donde son degradados) (Davis y col., 2009).

Se ha visto que en células CHO (derivadas del ovario de hámster chino), la incubación con el agonista muscarínico oxotremorina M (15 μ M) durante 24 h produce la internalización de casi el 70 % de los mAChR-M1 presentes en la superficie de la membrana (Thomas y col., 2009). Sin embargo, Davies y col., han comprobado que el agonista ortostérico carbacol induce la translocación de los M1 de células HEK-293 en vesículas intracelulares, tras 5 minutos de tratamiento (Davis y col., 2009). La translocación de los receptores M1 observada con estos ligandos se bloqueó mediante tratamiento con el antagonista muscarínico atropina.

6.5. Implicación del sistema colinérgico en el cáncer

La expresión y la función de diversos receptores colinérgicos pueden verse afectadas en condiciones fisiopatológicas. Algunas alteraciones sustanciales del sistema colinérgico no neuronal han sido descritas en los cánceres de colon humanos. Parece ser que disminuye el valor promedio de actividad de AChE, incrementándose la cantidad de ACh (Montenegro et al., 2006). Por otra parte, Cheng y colaboradores demostraron que la tinción de la enzima ChAT es indetectable o muy débil en los enterocitos normales, pero es de moderada a fuerte en el 50% de los cánceres de colon examinados y en líneas celulares de cáncer de colon (Cheng y col., 2008). Estos datos muestran que las células de cáncer de colon poseen la capacidad de producir y liberar ACh, la cual podría actuar como un factor autocrino/paracrino. Si bien existen pocos datos sobre la regulación de la liberación de ACh durante la inflamación, se ha demostrado que los corticoides modulan negativamente el sistema colinérgico no neuronal mediante la regulación del transporte y síntesis de ACh, en particular, en la superficie epitelial de la tráquea y el intestino (Wessler y col., 1998).

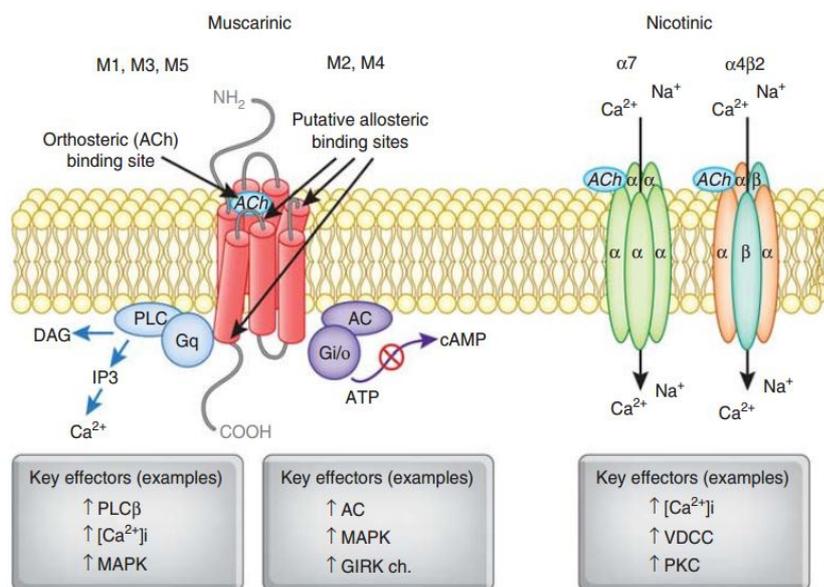


Figura I.20. Vías de señalización de AChR muscarínicos y nicotínicos. Los mAChR (izquierda) son proteínas con siete hélices transmembrana, que se engloban en dos clases funcionales. Los receptores M1, M3 y M5 se acoplan con proteínas G de tipo Gq/G11, lo que por la acción de una fosfolipasa C (PLC) conduce a la producción de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG), con el consiguiente aumento del calcio intracelular. En cambio, los subtipos M2 y M4 preferentemente activan proteínas G de tipo Gi/Go, de modo que se inhibe la adenilato ciclasa y disminuye la concentración intracelular de cAMP, lo que entre otros efectos puede prolongar la apertura de los canales de potasio. Los nAChR (derecha) son canales iónicos regulados por ligando, siendo especialmente abundantes entre los de tipo neuronal los tipos α4β2 y α7. La apertura del canal produce directamente la entrada de calcio y otros cationes, mientras que procesos posteriores contribuyen a aumentar el calcio intracelular. En efecto, los nAChRs α4β2 aumentan el calcio intracelular preferentemente por la activación de los canales de calcio sensibles al voltaje (VDCCs), mientras que los nAChR α7 preferentemente aumentan la liberación de calcio de almacenes intracelulares mediante liberación de calcio inducida por calcio (CICR). Figura tomada de Jones y col. (2012). Con permiso de Mcmillan Publishers Ltd.

La primera evidencia de que los nAChRs regulan el crecimiento de los tumores fue aportada por el Dr. H. M. Schuller en 1989. Desde entonces, varios estudios han descrito a los nAChRs como reguladores principales del crecimiento (Lee y col., 2010; Ho y col., 2005), angiogénesis (Cooke, 2007), metástasis (Wei y col., 2009) y apoptosis (Paliwal y col., 2010) durante la carcinogénesis. Además, los nAChR

estimulan las vías de señalización intracelular de forma específica según el tipo celular. Por ejemplo, la activación de factores de crecimiento (como VEGF y β FGF), inducida por nicotina es uno de los principales mecanismos moleculares subyacentes a los efectos proangiogénicos de nAChRs en varios tipos de células cancerosas (Cooke y Bitterman, 2004; Cooke, 2007; Jain y col., 2007). Además, se ha demostrado que la nicotina induce la activación de NF- κ B mediante las vías de señalización de la MAP quinasa p38 y PI3K/Akt, promoviendo la supervivencia, proliferación y angiogénesis de células endoteliales (Yu y col., 2009). Otros estudios muestran como las señales de supervivencia mediadas por Akt juegan un papel importante en el proceso carcinogénico, mediado por nicotina, en células de cáncer de mama humano (Shih y col., 2010).

Posteriormente, se ha visto que la expresión de nAChR α 9, inducida por estrógenos y nicotina, es regulada transcripcionalmente por el receptor de estrógenos (RE) a través de la maquinaria de señalización PI3K/Akt o MAPK, por fosforilación del RE en múltiples sitios (Lee y col., 2010). Los RE fosforilados también pueden actuar indirectamente alterando las actividades de otros factores de transcripción (por ejemplo, Sp1, AP1 y NF- κ B) en sus sitios de unión al DNA (Glidewell-Kenney y col., 2005).

Por otro lado, el nAChR α 7 y los transportadores de colina CTL-1-5 están presentes en las células de cáncer de colon (Song y col., 2013). Curiosamente, el bloqueo de CTL-4 puede conducir a la supresión del crecimiento celular, ya que hay una correlación entre la expresión de CTL-4 y la síntesis de ACh (Song y col., 2013). Como en otras células de cáncer, la estimulación de nAChR α 7 por ACh o nicotina puede inducir la proliferación celular e inhibir la apoptosis de estas células (Cucina y col., 2012). El nAChR α 7 está regulado negativamente por SLURP-1, el cual también está presente en células de cáncer de colon así como en células inmunes de la lámina propia y en el tejido del músculo liso del colon (Pettersson y col., 2008; 2009b).

Estudios previos indican que los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) se expresan en células de carcinoma originadas en el colon (Frucht y col., 1999; Yang y Frucht, 2000), pulmón (Williams y Lennon, 1990; Williams y col., 1993), próstata (Rayford y col., 1997; Batra y col., 1990), ovario (Oppitz y col., 2002), páncreas (Ackerman y col., 1989) y tracto digestivo (Kodaira y col., 1999; Park y col., 1990).

Estos carcinomas predominantemente expresan el subtipo M3 y menos comúnmente el M1 (Luthin y col., 1997). En tumores primarios, estos receptores expresados pueden ser activados por acetilcolina derivada de una variedad de tipos de células no neuronales, incluyendo células epiteliales e inmunes (Wessler y Kirkpatrick,

2001; Fujii y Kawashima, 2001). Por otro lado, se ha visto que la activación de M3 en células de carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) da lugar a la generación de inositol polifosfatos y se produce una movilización del Ca²⁺ intracelular (Williams y Lennon, 1990). Se ha sugerido que la hidrólisis de inositol-3-fosfato puede desempeñar un papel crucial en la capacidad de mAChR para regular la proliferación. Además, la activación de mAChR detiene el ciclo celular en las fases S y G2/M, lo que sugiere que su activación puede interrumpir la expresión o activación de una proteína que controla la progresión a través de estas fases del ciclo celular (Williams y Lennon, 1991). Por ejemplo, en la línea celular glial 1321N1 se ven alterados los niveles de mRNA y de proteína de *c-fos* y *c-jun* (Ibanez-Tallon y col., 2002). Como sugiere Williams y col. (2003) en células SCLC, las proteínas afectadas por la activación de mAChR son las implicadas en la regulación de la progresión del ciclo celular y la síntesis de DNA, incluyendo p34cdc2, proteína *c-myc*, timidina quinasa, antígeno nuclear de células proliferantes y proteínas supresoras de tumores tales como p53 y pRb (la proteína asociada a retinoblastoma). Es concebible que la expresión o activación de una o más de estas proteínas pueda ser alterada por la activación de mAChR, dando como resultado una disminución de la síntesis de DNA y la detención del ciclo celular.

Los mismos autores sugieren que en SCLC, la estimulación de mAChRs está relacionada con la activación de Rac1 (Williams y Lennon, 1991). Un modelo que representa la implicación de Rac1, PLC y PKC en la inhibición de la proliferación inducida por M3 se ha descrito en células CHO de ovario de hámster. La activación de M3 en células que expresan niveles normales de Rac1 conduce a la inhibición de la proliferación. En presencia de altos niveles de actividad de Rac1, la activación de M3 desencadena la muerte celular.

En contraste con lo observado en SCLC y en el modelo de células CHO, la activación de M3 induce la proliferación en el colon humano, mama y en células de cáncer de próstata (Williams y col., 1993).

En el tejido gastrointestinal, los principales tipos de receptores muscarínicos son M1, M2 y M3, pero las células epiteliales de colon expresan fundamentalmente M1 y M3 (O'Malley y col., 1995). Por otro lado, Frucht y colaboradores demostraron que las líneas celulares de colon y tejidos de cáncer de colon expresaban M3, incrementándose su expresión unas ocho veces más en comparación con el tejido normal (Frucht y col., 1999; Yang y Frucht, 2000). Dicha sobreexpresión está asociada a una disminución en la degradación de ACh y un incremento de su síntesis. Más tarde, se vio que los agonistas muscarínicos son capaces de estimular la migración de

células y la invasión mediante la inducción de la metaloproteinasa-1 de la matriz (Raufman y col., 2011). En la **Figura I.21** se muestra la regulación muscarínica de la proliferación de células epiteliales del colon.

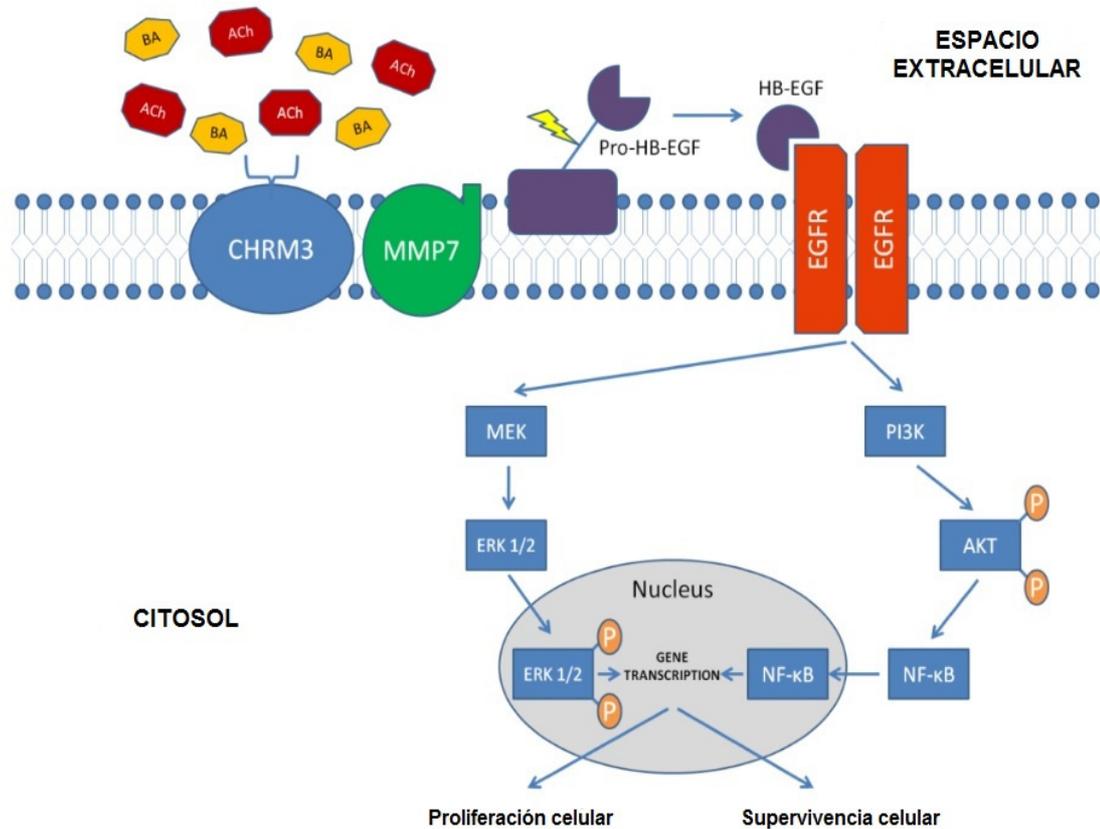


Figura I.21. Señalización muscarínica que regula la proliferación en células del epitelio de colon. La acetilcolina (ACh) y las sales biliares (BA) activan a los receptores muscarínicos (mAChR) que, a su vez, estimulan a metaloproteinasas (MMP7) que producen el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) a partir de Pro-HB-EGF. El HB-EGF transactiva los receptores de EGF (EGFR) produciendo una respuesta intracelular mediante las rutas de señalización MEK/ERK y PI3K/AKT. La fosforilación de ERK y AKT promueve la translocación de ERK y NF-κB al núcleo, induciendo la transcripción de determinados genes que promueven la proliferación y supervivencia celular (inhibición de apoptosis). Modificado de Rosenvinge y Raufman (2011).

7. **OBJETIVOS**

Durante nuestra investigación previa sobre el papel de la AChE en la diferenciación celular, habíamos observado un gran aumento de la actividad AChE de las células de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2 cuando eran tratadas con un inhibidor reversible y específico de AChE, el BW284c51 (BW), y se retiraba el inhibidor antes de la medida de actividad.

Una explicación para este efecto era que, al inhibir la AChE con el BW, no se hidrolizaba la acetilcolina liberada por las células, por lo que en el medio de cultivo se elevaba su concentración, de modo que aumentaba la activación de los receptores de acetilcolina. Esto nos llevó a pensar que los agonistas colinérgicos como la carbamilcolina (carbacol) o la acetilcolina podrían causar, igualmente, la subida de actividad AChE. De ser así, se revelaría la existencia de un mecanismo regulador de los niveles de AChE activa, que en respuesta a la interacción de un agonista (que en vivo sería la acetilcolina) con los receptores llevaría a un aumento de la actividad AChE de las células, acelerando así la degradación de la ACh para recuperar un cierto nivel de activación colinérgica. Decidimos investigar esta posibilidad. A este aumento de actividad AChE lo llamaríamos “sobreerregulación” de AChE, tomando el término que se emplea para el aumento del contenido en nAChRs por exposición a agonistas.

Así, el OBJETIVO GENERAL de esta Tesis Doctoral fue obtener información sobre el posible mecanismo regulador de la actividad AChE en función de la actividad de los receptores de acetilcolina, en las células de colon.

Dentro de ese objetivo general se plantearon los siguientes OBJETIVOS concretos:

1. Conocer si los agonistas colinérgicos producen un aumento de actividad AChE en las células Caco-2 similar al observado con el BW.
2. Determinar las formas moleculares y las variantes de mensajero de AChE que contienen las células Caco-2.
3. Saber si el aumento de actividad AChE provocado por el BW o los agonistas (en su caso) conlleva cambios en el contenido de AChE-mRNA o proteína AChE, y la forma molecular implicada.
4. Obtener información sobre la dotación de receptores de acetilcolina, nicotínicos y muscarínicos, expresados por las células Caco-2.
5. Identificar farmacológicamente los posibles receptores de acetilcolina implicados en la sobreerregulación de AChE por el BW y los agonistas colinérgicos.

6. Explorar los procesos intracelulares que tienen lugar en las células Caco-2 tras la unión del agonista al receptor.
7. Comprobar si este mecanismo de regulación de los niveles de AChE opera también en otra línea celular de colon, las células de adenocarcinoma colorrectal humano SW480.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. **MATERIALES**

1.1. **Reactivos**

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o del mayor grado de pureza posible. Las disoluciones fueron preparadas con agua desionizada. A continuación, se detallan los productos usados y su procedencia.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de SIGMA: ioduro de acetilcolina, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), dibromuro de 1,5-bis-(4-alildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona (BW284c51), cloruro de sodio, Triton X-100 y Brij 96, pepstatina A, bacitracina, benzamidina, inhibidor de tripsina de soja, leupeptina y aprotinina, β-mercaptoetanol (β-ME), fosfatasa alcalina de hígado bovino, azul de Coomassie R-250, Tween 20, persulfato amónico, TEMED, proteínas estándar para electroforesis (SDS-6H2), papel de filtro especial para blotting, membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm de tamaño de poro, SDS, sacarosa, bis-acrilamida, bromuro de etidio, el colorante naranja G, dimetilsulfóxido (DMSO), los marcadores de longitud de DNA (*Step ladder* 50 pb), el reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), además del formaldehído, etopósido y el colorante Hoechst.

También fueron de Sigma los agonistas: cloruro de carbamilcolina (carbacol), colina, acetilcolina, oxotremorina M y nicotina, así como los antagonistas: sulfato de atropina monohidrato, bromuro de hexametonio, mecamilamina y metillicaconitina. El EGTA, el ionóforo de calcio A23187 y el quelante de calcio BAPTA-AM, así como la cicloheximida (CHX) también fueron de Sigma.

El reactivo de Bradford fue de BioRad y el Tris, EDTA, CaCl₂, fosfato sódico, ácido acético, sulfato de cobre y cloroformo fueron de Merck.

Los anticuerpos contra la región 406-610 de AChE humana fueron de Novus (Nv-31329) y el dirigido al extremo N-terminal de AChE, de Santa Cruz Biotech (N-19, sc 6431). Los empleados contra el receptor α7 humano (H-302) y contra el receptor muscarínico M3 humano (H-210) fueron también de Santa Cruz. En cuanto a los anticuerpos secundarios empleados fueron todos de Sigma: un anti-IgG de conejo (A1949) y un anti-IgG de cabra (A5420), ambos marcados con peroxidasa.

Life Technologies proporcionó el reactivo TRIZOL para el aislamiento de RNA. El kit de extracción de RNA, los "random primers", el ditioneitol (DTT), la retrotranscriptasa M-MLV (retrotranscriptasa del virus de leucemia murina de Moloney) y el inhibidor de ribonucleasa fueron de Invitrogen. La mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) fue de Eppendorf y el kit de la DNasa, de Sigma.

Los productos empleados en la PCR a tiempo real, entre los que se incluyen una “máster mix” Power SYBR® GreenPCR de Applied Biosystems, que contiene la DNA polimerasa AmpliTaq Gold® y una mezcla de dTTP/dUTP, fueron proporcionados por el Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Murcia.

Las placas para los ensayos de actividad enzimática, medida de proteína y cultivo celular fueron de Nunc. Los frascos de 75 cm² para el cultivo celular fueron de Sarstedt. El medio de cultivo EMEM fue de Life Technologies y el RPMI de Sigma, el suero fetal bovino lo proporcionó Gibco y la tripsina fue de Sigma.

1.2. Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano: Caco-2 y SW480. Ambas líneas fueron proporcionadas por el Servicio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia.

La línea celular Caco-2 procede de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, USA). Estas células crecen en monocapa (**Fig. II.1.A**) y se pueden diferenciar a células intestinales por tratamiento con butirato, así como manteniendo el cultivo en confluencia.

En cuanto a la línea celular SW480, procede de la Colección Europea de Cultivos (ECACC) y consta de una mezcla de dos tipos celulares (epiteliales y bipolares) en el que predominan las células de tipo epitelial, con un crecimiento en monocapa, adheridas al sustrato (**Fig. II.1.B**) (Leibovitz y col., 1976).

Las células se usaron entre los pases 54-65 para las Caco-2 y entre los pases 10-33 para las SW480. Ambas se mantuvieron en incubadores del Servicio de Cultivo de Tejidos (Steri-Cult 3310 de Termo Scientific), a una temperatura de 37 °C, con un 5% de CO₂ y una humedad relativa de ≥ 95%. El medio de cultivo empleado fue EMEM (Life Technologies) suplementado con suero fetal bovino (SFB, de Gibco) al 10%, una mezcla de aminoácidos no esenciales, glutamina y antibióticos (estreptomicina y penicilina). Excepcionalmente se usó RPMI (Sigma), por su menor concentración de calcio. Para mantener las células, generalmente se sembraron 500.000 células en frascos de 75 cm², ventilados (Sarstedt). Para su recolección, las células se trataban con 4 ml de tripsina (Sigma) al 0,25 % con EDTA al 0,25 % durante 5 minutos a 37 °C. Después, se añadía medio de cultivo (conteniendo SFB), para detener la acción proteolítica de la tripsina y, tras pasar la suspensión celular a un tubo, eran sedimentadas por centrifugación a 200xg durante 10 minutos.

Posteriormente, se resuspendían en medio de cultivo para su contaje en un contador automático tipo Coulter antes de su siembra.

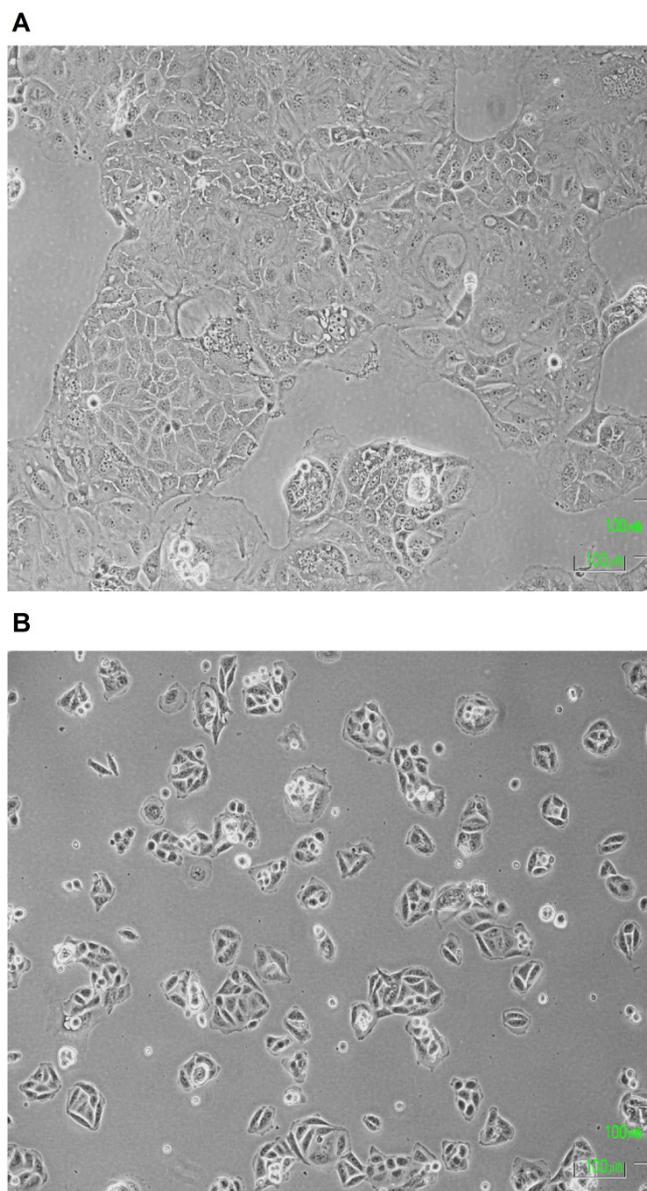


Figura II.1. Morfología de las células Caco-2 y de las SW480. En A) se muestra un cultivo de las células Caco-2 y en B) se muestra un cultivo de las células SW480.

2. MÉTODOS

2.1. Tratamientos y obtención de lisados celulares

Las células se cultivaron en microplacas de 96 pocillos para los experimentos donde se medía actividad acetilcolinesterasa o absorbancia de MTT, y en frascos de 75 cm², para experimentos de cuantificación de RNA mensajero, Western blot y gradientes de densidad. En estos casos, el medio de cultivo empleado era EMEM sin rojo fenol (éste interfiere en las medidas espectrofotométricas), suplementado de igual forma que la mencionada anteriormente (**apdo. II.1.2**), pero el SFB era previamente tratado con un inhibidor irreversible de AChE, denominado DFP (diisopropilfluorofosfato), para eliminar la actividad acetilcolinesterasa del suero. Para ello, se añadía DFP a 10⁻⁵ M a partir de una disolución a 12 M en isopropilalcohol, y se esperaba al menos un día antes de usar el SFB, para permitir la hidrólisis del DFP. Se sembraron entre 1.200 y 2.000 células/pocillo en 0,2 ml (3.790-6.320 células/cm²) cuando eran placas de 96 pocillos (0,3165 cm²/pocillo) y en torno a 300.000 u 800.000 células/frasco en 10 ml (4.000-10.700 células/cm²), dependiendo del tiempo de cultivo, para los frascos de 75 cm².

Después de dejar las células en cultivo al menos unos 3 días después de la siembra, se les añadían los agentes con o sin cambio de medio de cultivo, según las células se fueran a dejar más o menos tiempo antes de su lisis. En el caso de que se cambiara el medio de cultivo, sólo se hacía parcialmente, excepto en el caso de los experimentos en los que se añadía BAPTA-AM, que se cambiaba por completo. Los agentes eran previamente diluidos en medio de cultivo, a la concentración adecuada (**Tabla II.1**), antes de añadirlos a las células. Entre los agonistas empleados se encuentran: el carbacol, la acetilcolina, la colina y la oxotremorina M, todos ellos preparados en PBS (*Phosphate Buffered Saline*). En el caso de los antagonistas, las células se incubaban con éstos entre 60-120 min antes de añadir el agonista; entre ellos destacan la atropina, la mecamilamina, la metillicaconitina y el hexametonio; también preparados en PBS. En el caso del BAPTA-AM se hacía una preincubación de 45-60 minutos antes de retirarlo y añadir el carbacol.

En el caso de los experimentos en los que se estudió el efecto del calcio sobre la actividad AChE inducida por carbacol, los agentes que se emplearon fueron los siguientes: el ión calcio, dos quelantes de calcio, el EGTA (quelante de calcio extracelular) y el BAPTA-AM (quelante de calcio intracelular), y el ionóforo de calcio A23187; todos ellos preparados en PBS, excepto el A23187, que debía ser preparado en DMSO y el EGTA, en el que era necesario ajustar el pH para solubilizarlo.

Agente	Concentraciones finales empleadas	Función
BW284c51	1 μ M	Inhibidor reversible, potente y muy específico de AChE
Carbacol	0,25 mM y 1 mM	Agonista de mAChRs y nAChRs
Acetilcolina	0,2 mM y 0,5 mM	Agonista natural de todos los subtipos de nAChRs y mAChRs
Oxotremorina-M	0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM y 1 mM	Agonista de mAChRs
Nicotina	0,1 μ M, 0,5 μ M y 1 μ M	Agonista de nAChRs, con afinidad más alta por el subtipo α 4 β 2
Colina	0,2 mM, 0,5 mM y 1 mM	Agonista de algunos nAChRs, especialmente del subtipo α 7
Atropina	10 μ M, 100 μ M	Antagonista general de mAChRs
Hexametonio	0,1 mM	Antagonista de nAChR musculares y distintas combinaciones de nAChR neuronales
Mecamilamina	10 μ M y 50 μ M	Antagonista de nAChRs, principalmente de los subtipos heteroméricos, como α 3 β 4
Metillicaconitina	0,1 μ M y 0,5 μ M	Antagonista de algunos nAChRs, especialmente del subtipo α 7
Calcio	1,5 mM, 2 mM y 3 mM	Ión Ca ²⁺
BAPTA-AM	10 μ M y 20 μ M	Quelante intracelular de calcio
EGTA	1 mM y 2 mM	Quelante extracelular de calcio
A23187	20 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM y 500 nM	Ionóforo de calcio
Cicloheximida	50 μ g/ml	Inhibidor de la traducción del mRNA

Tabla II.1. Agonistas y antagonistas de receptores de acetilcolina y otros agentes empleados.

Una vez se añadían los agentes mencionados anteriormente, según el ensayo, se dejaban incubando con las células al menos 24 h. Tras la incubación, las células eran lisadas tanto para medir la actividad acetilcolinesterasa, como para la extracción de mRNA, los ensayos de Western blot y el análisis de formas moleculares por gradientes de densidad. Cuando las células se sembraban en microplacas de 96 pocillos, se les retiraba el medio de cultivo y se lavaban con PBS, para eliminar los posibles residuos de MC y SFB. Se añadían 50 µl/pocillo del tampón de lisis (Tris 10 mM, NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, Triton X-100 al 1%, pH 7), previamente suplementado con antiproteasas (inhibidor de tripsina de soja 12,5 µg/ml, benzamidina 250 µM, bacitracina 125 µg/ml, pepstatina A 1,25 µg/ml, leupeptina 0,1 µg/ml y aprotinina 20 U/ml). La placa era agitada durante 15 minutos a temperatura ambiente para completar la lisis. En los casos en los que se empleaban frascos de cultivo, las células se despegaban con tripsina, se sedimentaban por centrifugación a 200xg durante 10 minutos, y se lavaban con PBS. La lisis se realizaba con 0,2 ml del tampón de lisis con antiproteasas para los ensayos de Western blot y los gradientes de densidad y con 1 ml de Trizol, cuando se iba a extraer el RNA.

2.2. Determinación de la actividad colinesterasa

2.2.1. Fundamento del método de medida

La actividad acetilcolinesterasa se valoró por el método espectrofotométrico de Ellman (1961). El sustrato utilizado es la acetiltiocolina (ATCh), un tioanálogo del sustrato que es hidrolizado por AChE liberando acetato 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 (**Fig. II.2**). Este anión muestra un color amarillo intenso con un máximo de absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 1,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Esta circunstancia permite seguir la hidrólisis del sustrato en el medio de reacción, mediante un colorímetro o espectrofotómetro. La actividad BuChE se mide de modo análogo, usando butiriltiocolina (BuTCh) como sustrato.

Los grupos tioles libres en las proteínas u otros componentes de la muestra reaccionan con el DTNB produciendo un aumento de absorbancia que no corresponde a la hidrólisis del sustrato. Por ello, las muestras se incuban con el DTNB durante 20 minutos para que esos grupos tioles reaccionen antes de añadir el sustrato, de modo que no afecten a la medida.

Aunque la especificidad de la AChE por su sustrato preferente es elevada, para valorar de forma precisa la actividad AChE se recomienda añadir al medio de reacción *iso*-OMPA, un inhibidor específico de BuChE, y para valorar la de BuChE, se añade BW284c51, un inhibidor muy potente y selectivo de AChE (Austin y Berry, 1953).

El procedimiento de medida puede mejorarse más si para medir AChE se realizan ensayos sin y con BW, y la actividad se determina por la diferencia.

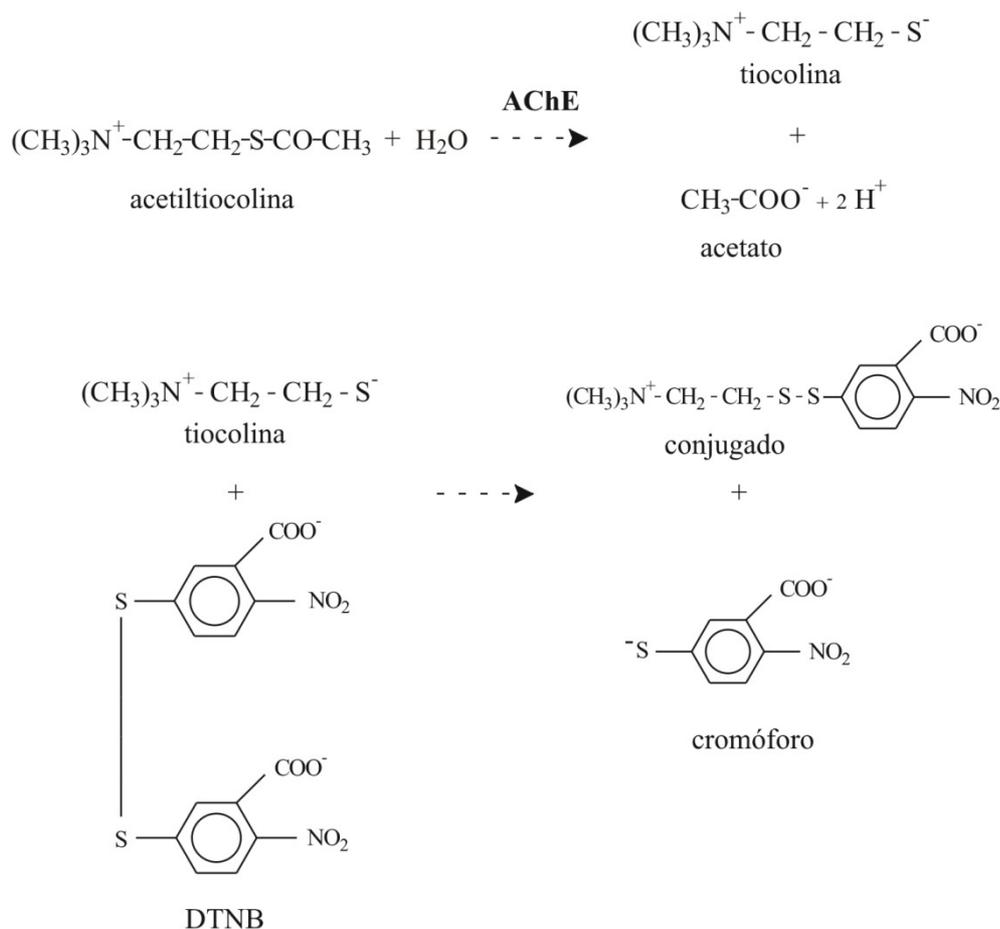


Figura II.2. Fundamento del método de medida espectrofotométrico de actividad AChE.

2.2.2. Medida de actividad por un microensayo colorimétrico

Para medir la actividad acetilcolinesterasa de las muestras recogidas (lisados celulares), se siguió el método de Ellman, modificado para su ensayo en microplaca (Campoy y col., 1992). Para ello, 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.

La actividad AChE se midió en unos pocillos en presencia de 50 µM *iso*-OMPA, un inhibidor específico de BuChE (de modo que la hidrólisis de ATCh y el aumento de absorbancia se deben a las actividades de AChE y de las posibles esterasas inespecíficas, además de la hidrólisis espontánea de la ATCh), y en otros pocillos en presencia de *iso*-OMPA y 10 µM BW284c51 (valorándose sólo la actividad de las esterasas inespecíficas y la hidrólisis espontánea de la ATCh). La diferencia de las dos medidas proporciona la actividad AChE. Es importante destacar que el BW284c51 es un inhibidor específico y reversible de AChE, de modo que el BW añadido a las células en cultivo, en algunos ensayos, se elimina al quitar el medio de cultivo y con el lavado posterior con PBS, de modo que la AChE de los lisados ya ha recuperado su actividad.

De este modo, para un volumen final de 275 µl, a los pocillos con 50 µl de muestra (lisados celulares), se añadieron 200 µl de una “mezcla de reacción”, con tampón fosfato 100 mM, DTNB 0,45 mM (pH 7,5) y el inhibidor *iso*-OMPA y, en su caso, BW284c51 a la concentración adecuada. Se incubaba unos 15-20 minutos y finalmente, se añadían 25 µl de ATCh (11 mM). Las concentraciones finales de ATCh y DTNB eran de 1 y 0,16 mM, respectivamente, y las de BW e *iso*-OMPA de 10 y 50 µM.

En medidas posteriores, tras observar que la actividad BuChE de los lisados celulares era indetectable, se decidió prescindir del inhibidor *iso*-OMPA en las medidas, disminuyendo la producción de productos tóxicos. Otra modificación que se introdujo consistió en realizar una preincubación de la ATCh con DTNB. La ATCh tiende a hidrolizarse de forma espontánea, por lo que con este cambio se asegura que la posible ATCh prehidrolizada ya haya reaccionado con el DTNB antes de añadirla al pocillo. Estas modificaciones supusieron un cambio en el resto de volúmenes de la mezcla de reacción para mantener las mismas concentraciones finales de los reactivos. Así, para un mismo volumen final de 275 µl, a 50 µl de muestra se añadían 100 µl del tampón fosfato 100 mM, DTNB 0,45 mM (pH 7,5) con o sin BW, y tras la incubación de 15-20 min, se añadían 125 µl de una mezcla de ATCh y el mismo tampón fosfato con DTNB, en proporción 25:100.

En cada microplaca, los pocillos de la primera fila se usan como “blanco”, sustituyendo la muestra por su volumen de tampón de lisis. En los pocillos de la última fila, se hace otro blanco distinto, sustituyendo el volumen de muestra por agua. A

ambos blancos se les trata como a los pocillos con células con el fin de valorar la hidrólisis espontánea del sustrato.

La reacción comienza con la adición del sustrato, y seguidamente se mide la absorbancia de la placa (tiempo cero); después se practican 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 absorbancia varíe linealmente con el tiempo. En general, se invertía 1 h para valorar la actividad AChE de los lisados celulares. Las medidas se realizaron en un lector de placas (Microplate Reader, Modelo 680, BioRad), por el modo de longitud de onda simple a 415 nm. La actividad se expresa en unidades arbitrarias (U.A.); una U.A. representa un incremento de absorbancia por minuto de 10^{-6} . La actividad normalizada para el número de células (actividad/célula) representa el cociente entre las U.A. y la absorbancia a 570 nm obtenida en ensayos de MTT de pocillos análogos.

2.3. Ensayo de células viables: ensayos de reducción del MTT

Este ensayo es un método colorimétrico sensible, cuantitativo y fiable para la determinación de la proliferación y viabilidad celular. Consiste en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), un compuesto amarillo y soluble en agua que, incorporado en las células vivas, es transformado por la succinato deshidrogenasa mitocondrial en un formazán, insoluble y de color azul-morado (**Fig. II.3**). Este producto forma cristales que no pueden atravesar la membrana plasmática, quedando retenido en el interior de las células. Para liberarlo, es necesario solubilizar las células con disolventes orgánicos como el DMSO (dimetilsulfóxido). De esta forma, 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.

En un ensayo general, en el que se sembraban las células en placas de 96 pocillos, se preparó una disolución madre de MTT (5 mg/ml) en medio de cultivo sin rojo fenol y sin SFB ni suplementos. Esta disolución se filtraba a través de un filtro de 0,22 μ m para su esterilización y se mantenía a 4 °C, en oscuridad hasta su uso. Para el ensayo, se retiraba todo el medio de cultivo de los pocillos y se añadían 200 μ l/pocillo de MTT 1 mg/ml (preparado a partir de la disolución madre de MTT 5 mg/ml, en medio de cultivo EMEM sin rojo fenol, sin suero ni complementos, filtrada por un filtro de 0.22 μ m). Se incubó la placa con el reactivo durante 1 hora a una temperatura de 37 °C, protegida de la luz. Pasado ese tiempo, se retiró el medio con MTT y se

añadieron 100 μ l de DMSO para solubilizar el formazán. La microplaca era agitada durante 5 minutos a 250 rpm y la absorbancia se midió en un lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech) a 570 nm y 690 nm. Los valores de absorbancia A570-A690, una vez restada la absorbancia de pocillos “blanco” (sin células pero tratados igual con MTT), son proporcionales al número de células viables en cada pocillo.

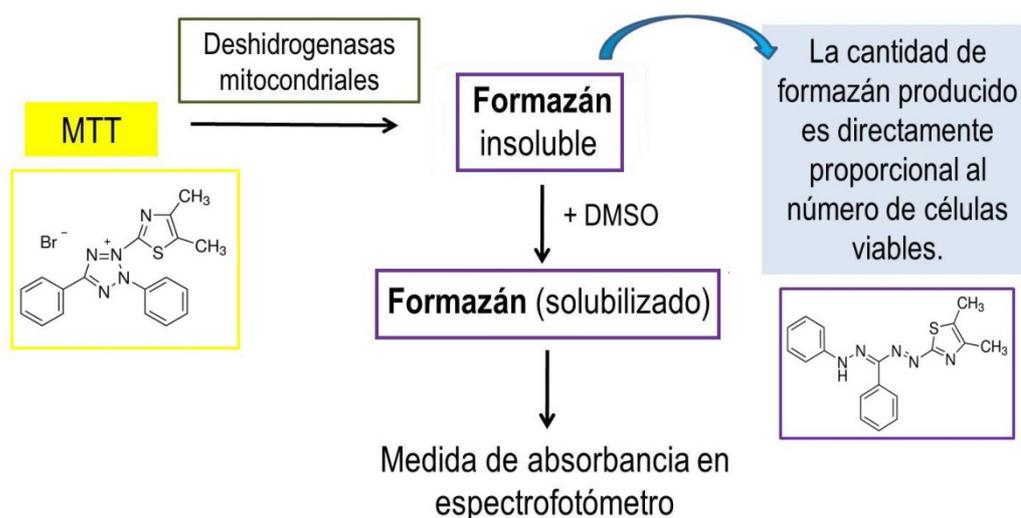


Figura II.3. Fundamento del método de medida de la viabilidad celular por reducción del MTT.

2.4. Cuantificación relativa de los mensajeros de los componentes del sistema colinérgico por RT-PCR a tiempo real.

2.4.1. Extracción de RNA con TRIZOL

Para la extracción del RNA total se partió de lisados celulares en TRIZOL, procesados el mismo día de extracción o bien conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, inmediatamente después de la lisis con TRIZOL. Todo el material usado durante el proceso estaba esterilizado y libre de RNasas.

Las células fueron sembradas en frascos de 75 cm^2 en un rango de densidad celular de entre 300.000 y 800.000 células/frasco ($4.000\text{-}10.700\text{ células/cm}^2$), según se fueran a mantener más o menos tiempo en cultivo antes de la extracción. Tras

añadir el agente de estudio e incubar las células en su presencia el tiempo deseado, se procedía a la recogida de las células para extraer el RNA total. Para ello, las células eran tratadas con tripsina 0,25% conteniendo EDTA 0,25% ó 0,02% hasta que las células se despegaban. La suspensión celular se centrifugaba a 200xg durante 10 minutos, se eliminaba el sobrenadante y el precipitado celular se lavaba con 10 ml de PBS. Las células volvían a ser centrifugadas de igual forma y se retiraba el sobrenadante. Al precipitado celular se le añadía 1 ml de TRIZOL por cada 5 a 10 millones de células. Posteriormente, se homogeneizaba dicha suspensión con una aguja hipodérmica de 21 *gauge* acoplada a una jeringuilla de 1 ml y, con ella, se hacía pasar la suspensión a un microtubo tipo *ependorf*.

La muestra se incubaba 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaba a 12.000xg durante 15 minutos. Posteriormente, se recogía el sobrenadante para añadirle 0,2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TRIZOL añadido anteriormente y se agitaba durante 15 segundos. Tras otra incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se volvía a centrifugar a 12.000xg durante 15 minutos, pero esta vez a 4 °C. De este modo, la muestra se separaba en tres fases: una fase inferior, que contiene el cloroformo; una fase intermedia, donde quedan las proteínas celulares y la fase superior (incolora), que es la que contiene el RNA.

Tras recoger la fase donde queda el RNA y pasarla a otro tubo, se añadía el mismo volumen de etanol al 70%. A partir de este punto, se utilizó el kit PureLinkTM RNA Mini de Invitrogen. Dicho kit consta de una columna de purificación de RNA insertada en un microtubo de centrífuga, al que se transfirieron 500 µl de la mezcla anterior. Se centrifugó a 12.000xg durante 15 segundos a temperatura ambiente y se descartó el volumen eluído. Este paso se repitió hasta procesar toda la muestra inicial. A continuación, se añadían 350 µl del tampón de lavado 1 (*Wash Buffer I*, incluido en el kit) a la columna de purificación y se centrifugaba a 12.000xg durante 15 segundos a temperatura ambiente, descartando también el eluído. Después de repetir el lavado 1, se añadían 500 µl del tampón de lavado 2 (*Wash Buffer II*, incluido en el kit) y se centrifugó a 12.000xg durante 15 segundos a temperatura ambiente, descartando el volumen eluído. Se repitió este paso una vez más y, a continuación se centrifugó la columna a 12.000xg durante 1 minuto para secar la membrana que contenía el RNA unido. Por último, se insertó la columna en un nuevo tubo de centrífuga y se añadieron 40 µl de agua libre de RNAsas. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, y finalmente, se eluyó el RNA mediante centrifugación a 12.000xg durante 2 minutos. El RNA total obtenido se mantuvo a -80 °C hasta su utilización.

2.4.2. Medida de la concentración y pureza del RNA

La concentración y pureza del RNA se midió en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Depositamos 1 µl de RNA y medimos la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda. Como blanco se empleó 1 µl de agua libre de RNAsas.

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 permite medir concentraciones de RNA consumiendo muy poco volumen de muestra.

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 DNA y RNA 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 RNA se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

2.4.3. Transcripción inversa o retrotranscripción

La RT-PCR, es decir, la transcripción inversa (RT) seguida por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más sensible para la detección y cuantificación de RNA. Consiste en sintetizar una hebra de DNA copia (cDNA) del RNA, mediante retrotranscripción (RT), y la posterior amplificación de la parte deseada del cDNA por una DNA polimerasa termoestable en una reacción de PCR. Para la RT se diseña un programa en un termociclador (*Master cycler Personal* de *Eppendorf*) que permita controlar las condiciones de temperatura requeridas en cada paso de la reacción.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar y detectar hasta una única molécula de DNA, por lo que las muestras de RNA deben ser tratadas con desoxirribonucleasas (DNasas) con el fin de eliminar el DNA contaminante antes de realizar la RT, ya que los métodos de purificación de RNA no consiguen eliminar totalmente la presencia de DNA de las muestras. En esta Tesis Doctoral se utilizó la DNasa I (AMPD1, de Sigma), aislada de páncreas bovino, que digiere el DNA de doble cadena o de cadena sencilla, a sus correspondientes mono y oligonucleótidos. Además, el diseño de los primers imposibilita, en la mayoría de los casos, la amplificación del DNA genómico (gDNA), bien porque uno o ambos cebadores se dirigen a las zonas de empalme exón-exón (que no están juntas en el gDNA), y/o bien

porque cada cebador se dirige a un exón distinto, y entre ellos quedan al menos una gran intrón que impide la amplificación del gDNA.

Para realizar la RT, se preparó el RNA, colocando 5 µg de RNA en cada microtubo y completando con agua libre de RNAsas hasta 7 µl de volumen final. A continuación, se realizó el tratamiento con DNasa, añadiendo 1 µl del tampón de reacción 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM MgCl₂, de Sigma) y 2 µl de DNasa I (1 unidad/µl), incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 1 µl de una solución de parada (*Stop Solution* de Sigma, 50 mM de EDTA) que une los iones de calcio y magnesio de la mezcla para inactivar la DNasa I. Además, el RNA tratado con DNasa se calentó a 70°C durante 10 minutos, para desnaturalizar la DNasa presente y evitar que pudiera digerir el cDNA formado durante el proceso de retrotranscripción posterior. Este paso de calentamiento también permite desnaturalizar el RNA y eliminar las posibles estructuras secundarias que dificultarían la unión de los cebadores. Inmediatamente después, el RNA desnaturalizado se pone rápidamente en hielo para impedir que vuelva a adoptar la conformación original.

Antes de su uso se preparan dos mezclas de reacción como se ve en la **Tabla II.2**.

Mezcla de reacción 1	Vol/mta. (µl)	Concentración final
<i>Random primers</i> 500 µM	1	24,39 µM
Mezcla de dNTPs 10 mM	1	487,8 µM

Mezcla de reacción 2	Vol/mta. (µl)	Concentración final
Tampón de reacción (<i>First Strand Buffer</i>) 5x	4	1x
DTT 0,1 M	2	9,76 mM
Inhibidor de ribonucleasas (RNaseOut Recombinant Ribonuclease Inhibitor) 40 U/µl	0,5	0,1 U/µl

Tabla II.2. Composición de las mezclas de reacción.

Los cebadores aleatorios, *random primers*, son secuencias de nucleótidos al azar que se unen al RNA y actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de cDNA. Estos cebadores producen cDNA de todo el RNA, y no sólo del mRNA como hacen los oligo(dT), pero los oligo(dT) tienen los inconvenientes de que requieren la presencia de una cola poli (A) en el RNA para poder hibridar con él y además, la presencia de estructuras secundarias en el RNA afecta más a la síntesis de cDNA que con cebadores al azar.

La mezcla de dNTPs es una solución acuosa (pH 7,5) de sales sódicas de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. La composición del tampón de reacción (5x) es Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM.

A continuación, se añadieron 2 µl de la mezcla de reacción 1 a cada tubo con el RNA desnaturalizado (volumen final 13 µl), que se agitó suavemente y se calentó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar los cebadores. Los tubos se colocaron en hielo y se añadieron 6,5 µl de la mezcla de reacción 2 (volumen final 19,5 µl). Se mantuvieron 2 minutos a 37°C para después, añadir 1µl de la retrotranscriptasa M-MLV (retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney). Después, se baja la temperatura a 25°C durante 10 minutos para que tenga lugar la unión de los cebadores a la hebra de mRNA. La retrotranscripción se desarrolla a 37°C durante 50 minutos, en la que la transcriptasa inversa extiende los cebadores sintetizando la cadena copia de DNA. Finalmente, la temperatura se eleva a 70°C, 15 minutos, para inactivar la enzima y separar las cadenas de cDNA y RNA. Los tubos se conservan a -80°C hasta su uso.

2.4.4. PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR, acrónimo del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*) es una técnica que permite la detección y cuantificación precisa del producto generado en la PCR, simultáneamente al proceso de amplificación. A partir de la fluorescencia emitida por un fluoróforo durante la reacción de la polimerasa se puede medir la cantidad de DNA 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.

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, que es el procedimiento que nosotros empleamos.

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.

Entre los agentes intercalantes más empleados destaca el *SYBR Green I*. Es un fluorocromo que en solución, como compuesto libre, emite una fluorescencia muy baja que aumenta notablemente cuando se une a DNA de doble cadena. El incremento de DNA en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Además es una molécula extraordinariamente estable, ya que tras 30 ciclos de amplificación sólo pierde el 6% de la actividad, siendo muy útil para detectar y cuantificar los productos de PCR.

Este sistema de detección tiene la ventaja de que es muy fácil optimizar las condiciones de la reacción y es más barato que las sondas específicas, pero el principal inconveniente es la baja especificidad de estos agentes intercalantes, dado que se unen indistintamente al producto deseado y a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Por este motivo, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de DNA a temperaturas elevadas (*Hot Star PCR*), lo cual disminuye notablemente el riesgo de amplificaciones inespecíficas, además de diseñar cuidadosamente los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros.

No obstante, la mayoría de equipos para PCR a tiempo real son capaces de determinar la curva de fusión o *melting curve* de los productos de la reacción. Una vez que han terminado los ciclos prefijados de amplificación, la muestra se calienta para desnaturalizar el DNA producto, mientras se registra la fluorescencia. La emisión de fluorescencia depende de la unión del *SYBR Green* a zonas de doble cadena de DNA,

por lo que a medida que las cadenas de DNA se separan por efecto de la temperatura, la fluorescencia disminuye. De estas curvas se obtiene un parámetro denominado temperatura de fusión o T_m (*melting temperature*) que hace referencia a la temperatura a la que el 50% del DNA está desnaturalizado. Por tanto, cada fragmento amplificado tendrá una curva de fusión y una T_m característica, que va a depender de su longitud y composición de bases. Esto nos permite comprobar con cierta garantía que los fragmentos detectados en la PCR son los que estamos analizando. En el caso de que los cebadores posean cierta complementariedad entre sí, podrían aparecer *primer-dimers* que pueden distinguirse del producto específico por su baja T_m .

Al comienzo de la amplificación, la mezcla de reacción contiene DNA desnaturalizado, los cebadores y una *máster mix* en la que se incluye el *SYBR Green I*, la polimerasa, dNTPs y otros componentes necesarios. El fluoróforo libre emite una ligera fluorescencia que aporta una señal de fondo. Tras la unión del cebador a la hebra de DNA, algunas moléculas del *SYBR Green* ya pueden unirse a la doble cadena que se forma, lo que incrementa considerablemente su fluorescencia. Durante la extensión, cada vez se van uniendo más moléculas del agente fluorescente a la nueva doble cadena de DNA recién sintetizado, con el correspondiente incremento en la fluorescencia emitida. Durante la fase de desnaturalización del siguiente ciclo de PCR, las moléculas del fluoróforo se separan de la doble cadena de DNA 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 DNA amplificado. En la **Figura II.4** se muestra la unión del SYBR Green a las moléculas de dsDNA.

En esta tesis, la PCR a tiempo real se empleó para el análisis de los niveles de expresión génica mediante la combinación de esta técnica con la técnica de retrotranscripción, anteriormente descrita (RT-PCR). Se realizó un método de cuantificación relativa, el cual no requiere curva de calibración, sino que se basa en la comparación entre el nivel de expresión del gen de estudio (cantidad de cDNA, que es proporcional al nivel de mRNA presente en la muestra de partida) respecto al nivel de expresión de un gen de referencia o estándar interno (*house-keeping gene*) cuya expresión en las células se considera constante, es decir, su expresión no se ve alterada en función de las condiciones a las que se sometan las células, y que en nuestro caso fue GAPDH.

Como el mRNA de interés y el mRNA usado como estándar interno poseen secuencias diferentes, y los productos amplificados (amplicones) tienen distintas

longitudes y requieren distintos cebadores, cabe la posibilidad de que ambos mRNA difieran en la eficiencia de la PCR. Por ello, un requisito experimental añadido a que sea constante la expresión del estándar interno, es que se amplifique con una eficiencia de amplificación similar a la del gen en estudio. Si las eficiencias para los dos amplicones son iguales, dos volúmenes que tengan la misma cantidad de producto tras un mismo número de ciclos, tendrán la misma cantidad inicial de cDNA. Una eficiencia óptima de amplificación es aquella que permite la replicación de todos los productos de PCR en cada ciclo (en cada ciclo se duplica la cantidad de producto), una eficiencia del 100%, que en PCR se suele llamar una eficiencia de 2.

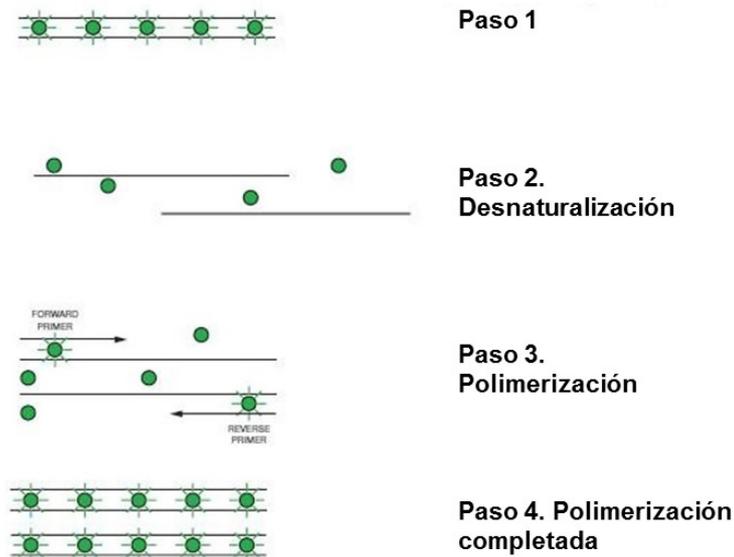


Figura II.4. Modo de acción del reactivo SYBR Green I. El SYBR Green I aumenta su emisión de fluorescencia cuando se une al DNA de doble cadena generado durante los ciclos de PCR. Modificado del Manual del equipo de rt-PCR de Applied Biosystem.

Durante la PCR, el programa informático del termociclador (equipo 7500 *Real Time PCR System*, de *Applied Biosystems*) detecta en cada ciclo un incremento de fluorescencia proporcional al aumento de DNA. Esta información se registra gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada muestra y mRNA. Estas curvas se adaptan a una sigmoide en la que se pueden distinguir: 1) una fase

temprana de fondo (*background*), donde la fluorescencia del producto es menor que la del fondo; 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. Los datos obtenidos en la fase logarítmica son mucho más precisos que los obtenidos a tiempo final porque en la fase logarítmica, el incremento de la señal se corresponde directamente con un incremento del producto de PCR. La línea horizontal fijada por el usuario en la fase logarítmica se denomina umbral o *threshold*, y el punto en el que la curva de fluorescencia cruza dicho umbral se denomina Ct.

Mediante el modelo matemático del delta Ct (ΔCt) podemos determinar el número de copias de un gen respecto al número de copias del gen de referencia (GAPDH, en nuestro caso), asumiendo que la eficiencia de amplificación de la PCR es del 100% para el gen en estudio y el de referencia:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen de estudio}) - Ct(\text{GAPDH})$$

$$2^{-\Delta Ct} = \text{número de copias del gen de interés por cada copia de GAPDH}$$

Cuando queremos conocer la variación en la expresión de un gen determinado cuando las células han sido sometidas a distintos tratamientos o expuestas a diferentes situaciones experimentales, se utiliza el modelo matemático del delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tratamiento}) - \Delta Ct(\text{condición control})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{expresión de un gen tras un tratamiento, respecto al control no tratado}$$

Los ensayos de PCR a tiempo real se llevaron a cabo utilizando placas de 96 pocillos (*Microamp optical 96 well reaction plates* de *Applied Biosystems*). En cada pocillo de la placa se adicionaron 5 μl del cDNA, 0,4 μl de cada uno de los *primers forward* y *reverse* (10 μM) (**Tabla II.3** y **Fig. II.5**) y 10 μl de la mezcla de reacción *Power SYBR Green PCR Master Mix*, que contiene el fluorocromo *SYBR Green I*, los cuatro dNTPs, la DNA polimerasa y el fluoróforo ROX como referencia pasiva, todo ello en un tampón se centrifugó a 2500 rpm durante 2 minutos. Por último,

	Forward				Reverse			
	mRNA (humano)	Amplión (pb)	nº	Posición	Secuencia	nº	Posición	Secuencia
Acetilcolinesterasa	ACHE-wh	163	231	E3/E4	CCAACTTTGCCCGCACAGGGGAT	232	E4	AAGCGTTCCAGAAAGGGCGCAG
	ACHE-R	221	69	E3/E4	CAGGGGATCCCAATGAGC	70	I4	GCTCCCACCTCCCCTCCTC
	ACHE-H	273	63	E3	CCCCTGGACCCCTCTCGAAAC	64	E4/E5	GGGAGCCTCCGAGGGCGGT
	ACHE-T	280	65	E3	GGATCCCCCTGGACCCCTCT	66	E4/E6	GCCTCGTCGAGCGTTCGGT
	ACHE-E1c	100	103	E1c	GGAGCGGGCGGTGTCA	104	E1c	CTGAGGGCGGCCGAGC
ACHE-E1e	116	41	E1e	AATGCTAGGCCCTGGTGATGT	42	E1e	GGCAGTGGAAACTTCTGGA	
Otras enzimas	BCHE	297	71	E2	TGCTTTGGTTTACCTCTGGAA	72	E4	CACTCCCATTTGCTTTCATC
	* ChAT (1ºpar)	153	235	E7	AATGGCTTCCAACGAGGACG	236	E8	CATACAAGCGAGATGCAGCG
	* ChAT (2ºpar)	228	261	E14	GCACTGGCTTTTGTGAGAGC	262	E16	CCGGTTGCTCATCAGGTAGG
mAChRs	CHRM1 (1ºpar)	109	201	E1	TACAGACCCCTCTTCAGCCC	202	E2	TGTTCATGGTGGCTAGGTGG
	CHRM1 (2ºpar)	201	251	E1	GGACCTACAGACCCCTCTT	252	E2	GGTGATCCCAATGAAGGCCA
	CHRM2	230	203	E5	GGGAGGCAACTGGAGCGAA	204	E3	TGCGTTCTCTAATCAGTAGCCAAAT
	CHRM3 (1ºpar)	154	205	E3	TGTGGCGTGGACCTGGTCT	206	E4	CCGGCATAGACAGAGGAGTG
	* CHRM3 (2ºpar)	234	255	E3	CACAATCTGGACACATTGTATTGG	256	E5	GAACAAGGGCGAGGTTGTACTG
nAChRs α	NARA1	128	211	E5	CCAGATGACTATGGCGGTGT	212	E6	TGCAGGAGCACCTTTGGTGAA
	NARA2	145	213	E4/E5	GCTAAACAGGAGTGGAGCGA	214	E6	GGTCACTGCAAACTCCCAT
	NARA3	135	215	E4	CGTGCCCTGCACAGAAAGAT	216	E5	GATGGCCGGAGGTATCCAAAG
	NARA4	179	217	E1	TGCTGCTGCTTCTGGGGA	218	E2	AATGAGCTGAGCGGATGGACA
	NARA5	130	219	E5	ATGAAAGGAAAATGATGCCGTGAG	220	E6	TAACAGGAACAAAAGCCCAAGAG
	NARA6	163	221	E5	AGCTTGCCACAAGCAAGAGA	222	E5/E6	TTCCAGTCATCTTACCTCCT
	* NARA7 (1ºpar)	166	223	E2	TGACTCGAACCACTCACCCGT	224	E4	ACGAAACAGTCTCACCCCTGGA
	NARA7 (2ºpar)	102	229	E4	CAGGGTGAAGACTGTTCTGTT	230	E5	TAGTGTGAAATGTGGCGTCAA
	NARA9	172	225	E3	TCTGGCACGATGCCATCTC	226	E4	ATCAGCCCATCATACCCGAG
	NARA10	203	227	E2/E3	CATCGACATGGATGAACGGGA	228	E4	CGTTGGTGTGGCGGAA
nAChRs β	NARB1	180	243	E2	AGGGTCGACTCCGGGAGAAA	244	E3/E4	TGTAGTCAGTCCACTCCAGGT
	NARB2	130	245	E5	CGCTTCATCCGACACCACAT	246	E6	TGGTGCCAAAAGACACAGACA
	NARB3	149	247	E2	GGGTCCGCCCTGTATTACATT	248	E4	CCAGCGTAACCTTGTGGTCTGT
	NARB4	123	249	E5	GAGGTTCCGACAGGATGTGC	250	E6	TCCACCACCATAGCCACGTA
mRNAs de referencia	GAPDH	175	31	E7	GCACCACCAACTGCTTAG	33	E8	GAGGCAGGGATGATGTTTC
	ACTB	142	34	E3	AGAAAATCTGGCACCACACC	35	E4	GGGGTGTGAAGGTTCTCAA

Tabla II.3. Principales primers empleados en los ensayos de rt-PCR. Los pares de primers marcados con asterisco (*) se probaron obteniéndose resultados similares a los del otro par sin que se aporten los resultados obtenidos con ellos.

optimizado para la reacción. Una vez añadidos todos los reactivos a los pocillos, la placa se selló con un adhesivo para evitar la evaporación durante el calentamiento y, se introdujo la placa en el termociclador (*7500 Real Time PCR System*) y se estableció el programa con las condiciones deseadas. El programa de amplificación consistió en una etapa de calentamiento inicial a 95°C (10 minutos) para activar la DNA polimerasa AmpliTaq Gold®, seguido de 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto, donde se produjeron cíclicamente la desnaturalización del DNA, el alineamiento de los cebadores y la extensión del DNA.

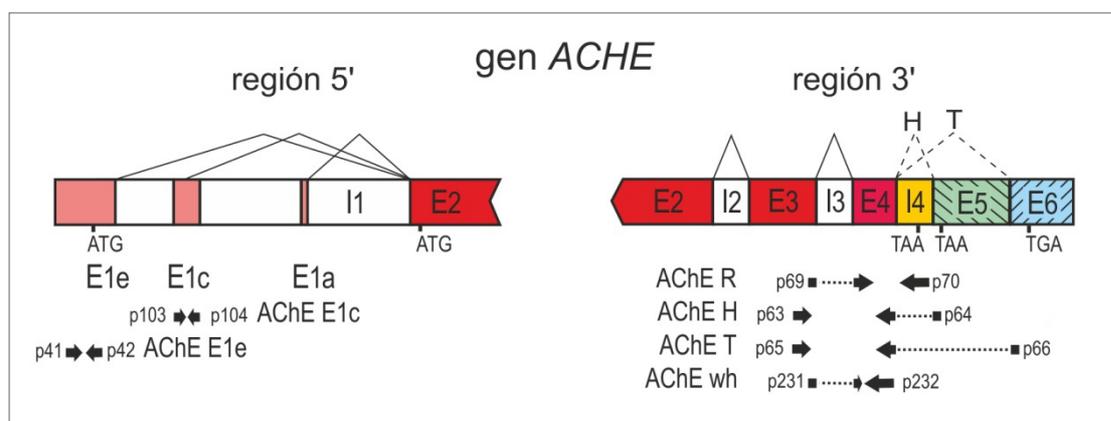


Figura II.5. Posición de las secuencias diana de los cebadores para los mRNA de AChE.

Se muestra un esquema de las porciones 5' y 3' del gen *ACHE*. Los exones E2-E4, que codifican la parte común de todas las subunidades de AChE, se muestran en rojo. Los distintos exones E1, que caracterizan a las variantes 5' de AChE-mRNA (tres en humanos), aparecen en rosa. El exón E1e contiene una región que se traduce, dando lugar a subunidades N-extendidas. Los exones E5 y E6 y el pseudo intrón I4, que codifican las regiones C-terminales de las subunidades H, T y R, y cuya presencia determina las diversas variantes 3' de mRNA, se muestran de varios colores. Los cebadores se representan como flechas, cuya punta indica el extremo 3' del cebador. En los cebadores que reconocen zonas de empalme exón-exón, las dos partes que se dirigen a distintos exones aparecen unidas por líneas de puntos. AChE wh indica los cebadores que amplifican todas las variantes de AChE-mRNA.

2.4.5. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa

Si el producto de la reacción es específico debemos obtener 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.

Esta técnica consiste en la separación de ácidos nucleicos a través de una matriz de agarosa que funciona a modo de tamiz molecular, separando las moléculas bajo la acción de un campo eléctrico, en función del tamaño que posean.

Para ello se prepara una solución de agarosa al 3 % en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5). Se calienta la mezcla en un microondas para facilitar la disolución de la agarosa y posteriormente se deja enfriar ligeramente. Añadimos el colorante bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0,5 µg/ml, se agita suavemente y se vierte sobre un molde donde colocamos el peine que forma los pocillos. Finalmente, dejamos pasar unos 60 minutos a temperatura ambiente, hasta que se forma un gel semisólido.

La agarosa forma una macrorretícula al gelificar debido al establecimiento de enlaces por puente de hidrógeno. Por otro lado, el BrEt es un agente fluorescente que se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos, lo que aumenta mucho su emisión de fluorescencia. Es altamente tóxico y con propiedades mutagénicas, por lo que debe manejarse con extremo cuidado en el laboratorio. A pesar de esto, sigue siendo uno de los agentes más utilizados para la visualización de DNA y RNA, aunque actualmente hay otros colorantes fluorescentes alternativos como *SYBR Safe*, *SYBR Gold*, *GelRed* entre otros, desarrollados específicamente para reducir estos riesgos.

Para preparar las muestras tomamos 15 µl de cada producto de reacción de la PCR y añadimos 3 µl de una disolución de carga 6x que contiene naranja G 0,25%, sacarosa 40%, EDTA 100 mM y SDS 0,25%, pH 8,0. 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 (*Step ladder* 50pb, Sigma). Ponemos, igual que nuestras muestras, 15 µl de los marcadores y les añadimos 3 µl de la disolución de carga.

Una vez preparado el gel, se pone en la cubeta y se cubre con TAE. A continuación, se cargan las muestras y los marcadores en los pocillos. La electroforesis se desarrolla a 100V, durante unos 90 minutos a temperatura ambiente. 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 transiluminador de luz UV, registrándose la imagen de fluorescencia con una cámara digital.

Posteriormente, se analiza el tamaño de los fragmentos amplificados con el software GelPro, en el que el tamaño de las bandas se calcula a partir de la distancia recorrida en relación con la de los estándares de tamaño conocido.

2.4.6. Purificación del DNA de las bandas de los geles de agarosa

En algunos casos, los productos de PCR separados en un gel se purificaron para su secuenciación posterior. Para ello, se utiliza el kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit* (General Electric Healthcare). Este kit está diseñado para la purificación y concentración rápida de fragmentos de DNA (de unos 50 pb a 10 kb) procedentes de reacciones de PCR o de geles de agarosa. En él se combina el uso de un tampón con un agente caotrópico y una columna tipo spin para purificar el DNA. Dicho tampón contiene además un indicador de pH ya que, para que el DNA se una de manera eficiente a la membrana de sílice de la columna, el pH debe ser inferior a 7,5.

El procedimiento consiste en recortar la banda de gel deseada (banda de los transcritos de AChE-wh, los nAChRs $\alpha 5$ y $\alpha 7$ y el mAChR M3), ajustándose lo máximo posible a ella y con ayuda de un transiluminador. La banda recortada se coloca en un tubo, el cual se pesa antes y después de colocar la banda, para calcular por diferencia el peso de la banda de gel. Posteriormente, se añade el tampón de captura, se calienta a 60°C en una placa calefactora para disolver la agarosa y se centrifuga brevemente para recoger la muestra en el fondo del tubo. La muestra se pasa por una columna de spin, colocada dentro de un tubo de recolección y se centrifuga a 16.000xg durante 30 segundos. Se descarta el líquido filtrado y se vuelve a repetir esta fase de unión tantas veces como sea necesario, hasta hacer pasar toda la muestra por la columna. Seguidamente, se añade a la columna el tampón de lavado y se centrifuga a 16.000xg durante 30 segundos, descartando el líquido filtrado. Por último, se añade agua estéril libre de nucleasas en la membrana de la columna y se centrifuga a 16.000xg durante 1 minuto para recoger el DNA purificado.

El DNA obtenido, junto con los primers adecuados, se llevaron al Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Murcia para su secuenciación.

En otros casos (transcritos de nAChR $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ y mAChR M3), la secuenciación se realizó a partir del producto de PCR directamente, sin llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa y su posterior purificación.

2.5. Valoración de la concentración de proteína

Para valorar la concentración de proteína en las muestras obtenidas, tanto de homogenados como de sobrenadantes de lisados celulares, se empleó el método de Bradford, mediante el kit comercial de BioRad.

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 el azul de Coomassie G-250 en disolución ácida se une a las proteínas. En medio ácido el Coomassie es de color rojo pardo, y a pH alcalino es 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 (0,5 mg/ml). Para ello, en los pocillos de una microplaca se vierten 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 µl de la proteína estándar y se completa hasta 50 µl con agua desionizada. Se preparan dos series. Las muestras se diluyen adecuadamente; depositándose 50 µl de cada una de ellas en la microplaca, con sus respectivas réplicas. El tampón de lisis incluido en las muestras también se diluye en la misma proporción que las muestras y se añade a la recta patrón para eliminar interferencias debidas al detergente que contiene. A continuación se diluye el reactivo de BioRad para medida de proteína en proporción 1:5, añadiéndose 200 µl/pocillo. 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 en los pocillos con muestra se calcula por referencia a la recta patrón.

2.6. Análisis de sedimentación

Para averiguar la composición de formas moleculares de las colinesterasas en los lisados celulares, 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 (1961), según el cual se comparan las distancias recorridas en el gradiente por la molécula a identificar y por 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 las proteínas viajan como agregados proteína-detergente. Por tanto, el coeficiente de sedimentación de una proteína anfifílica cambia en presencia de detergente, lo que no le ocurre a una molécula hidrofílica.

Por otro lado, los agregados proteína-Brij 96 migran 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 lugar de Triton X-100 (Moya-Quiles y col., 1992).

2.6.1. Preparación de los gradientes de sacarosa

Se utiliza un formador de gradientes que consta de dos depósitos a modo de vasos comunicantes, en los que se vierten las 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 Triton X-100 o, en su caso, Brij 96 (0,5% p/v). En el vaso con salida al exterior se ponen 5 ml del tampón con sacarosa al 20%, y en el otro 5 ml del tampón con sacarosa al 5%. 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 2), de forma que su extremo desemboque en un tubo de centrifuga de 12 ml (polialómero, Beckman No. 331372). 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, donde se mezclan mediante la hélice de un agitador. El flujo de salida se controla de forma constante con la bomba peristáltica. El final del tubo se mantiene en contacto con la pared del tubo de polialómero, para que la disolución de sacarosa vaya resbalando por la pared y caiga suavemente sobre el gradiente en formación, para que se deposite sobre él sin mezclarse.

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

Una vez depositadas las muestras (300 µl), los tubos con los gradientes se centrifugan 20 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 36 y 42, de unos 250 µl) con la ayuda de la bomba peristáltica y un colector de fracciones (Amersham).

En cada fracción del gradiente se determina la actividad AChE 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, se obtiene sumando la actividad de las fracciones que componen cada pico y dividiendo la suma por la actividad total recuperada del gradiente.

2.6.2. 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 µl de cada marcador y, tras la centrifugación, se identifican las fracciones con mayor actividad.

La actividad catalasa (C) se determina mediante un método espectrofotométrico, en el que se registra la disminución de absorbancia a 240 nm de una mezcla de reacción que lleva H₂O₂ al 0,09% (v/v) en tampón fosfato 50 mM, pH 7 y 10 µl de muestra. La absorbancia disminuye conforme la catalasa convierte el H₂O₂ ($\epsilon = 41 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en oxígeno molecular y agua. La actividad catalasa se mide en un espectrofotómetro en cubeta de cuarzo, ya que se trabaja en la región UV del espectro, y a temperatura ambiente.

La fosfatasa alcalina, a pH alcalino, hidroliza el *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) liberando fosfato y *p*-nitrofenol, cuya aparición se mide a 405 nm ($\epsilon = 18,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Antes del ensayo, se diluye el pNPP (37 mM) en tampón dietanolamina 100 mM, pH 9, en una relación 1:50. En cada pocillo de una microplaca, se depositan 20 µl de la muestra y 250 µl de la mezcla de reacción anterior. Se mide la absorbancia a 415 nm durante 2 horas, a temperatura ambiente.

2.6.3. Cálculo del coeficiente de sedimentación

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

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

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. 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.

2.7. Electroforesis y Western blot

2.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas que se basa en el movimiento que experimenta cualquier molécula cargada al ser sometida a 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 de 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 adecuada 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 practicada en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). Descrita por Laemmli (1970), se trata de una electroforesis en condiciones de desnaturalización. Antes de la electroforesis, las muestras se desnaturalizan por calentamiento en presencia del detergente desnaturalizante SDS. Además suele añadirse un agente reductor de los puentes disulfuro, como el β -mercaptoetanol. El tratamiento separa las subunidades unidas no covalentemente o covalentemente por puentes disulfuro, y los polipéptidos pierden su conformación nativa. Por eso, a este tipo de electroforesis se denomina disociante o desnaturalizante.

El SDS tiene la propiedad de unirse a las proteínas en una proporción constante, de aproximadamente 1,4 g SDS/g proteína, por lo que la carga de la proteína queda

enmascarada por la carga negativa de las múltiples moléculas de SDS y será proporcional al tamaño. Así, la relación carga/masa queda igual para todas las proteínas, y al ser sometidas a un campo eléctrico en un gel poroso, éstas se van a separar fundamentalmente en función de su peso molecular. 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 patrón de peso molecular conocido.

En esta Tesis Doctoral, la electroforesis se llevó a cabo por el método de Laemmli, con un equipo Mini-Protean III de BioRad (BioRad labs, Inc., Herts, Reino Unido) 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.

2.7.1.1. Preparación de los geles de poliacrilamida

En primer lugar, se montan los cristales del sistema Mini-Protean III utilizando espaciadores de 0,75 mm. A continuación, se prepara la disolución del gel separador. Para preparar dos geles al 10% (p/v) de acrilamida se adicionan los siguientes componentes en las cantidades indicadas en la **Tabla II.4.**

Gel separador	Volumen (ml)	Concentración final
Agua purificada	4,02	
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	2,50	0,375 M
Acrilamida-bisacrilamida (30%)	3,33	10%
SDS 10%	0,10	0,1%
Persulfato amónico 10%	0,05	0,05%
TEMED	0,01	

Tabla II.4. Composición del gel separador.

La disolución se agita y se vierte en el espacio que queda entre los cristales dejando sin cubrir una distancia de unos 2 cm en el extremo superior del cristal de menor tamaño. Este espacio se cubre con agua para evitar que el gel entre en

contacto con el O₂ del aire, puesto que éste dificulta la polimerización. Se deja polimerizar durante 35-40 minutos a temperatura ambiente.

Una vez que el gel separador ha polimerizado, se prepara el gel concentrador a una concentración de 3,9% de acrilamida y un pH de 6,8. Para preparar dos geles se adicionan los siguientes componentes en las cantidades indicadas en la **Tabla II.5**.

Gel concentrador	Volumen (ml)	Concentración final
Agua purificada	6,01	
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,50	0,125 M
Acrilamida-bisacrilamida (30%)	1,30	3,9%
SDS 10%	0,10	0,1%
Persulfato amónico 10%	0,05	0,05%
TEMED	0,01	

Tabla II.5. Composición del gel concentrador.

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. Es importante evitar la formación de burbujas debajo del peine. Se deja polimerizar la mezcla unos 45 min a temperatura ambiente.

2.7.1.2. Preparación de las muestras

Para calcular el peso molecular de las bandas de AChE y de receptores colinérgicos, se usó una mezcla de proteínas estándares no coloreadas (Sigma, SDS-6H2) 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 200 KDa).

Para desnaturalizar las proteínas, las muestras y la mezcla de proteínas estándar se incubaron, por separado, con tampón de muestra (Tm), cuya composición, para un volumen final de 10 ml, fue como se muestra en la **Tabla II.6.**

Tampón de muestra (2x)	Volumen (ml)	Concentración final (en la muestra)
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	0,5	0,0625 M
SDS 10%	0,8	2%
β -Mercaptoetanol	0,2	5%
Glicerol puro	0,4	10%
Azul de bromofenol (0,2%)	0,1	0,005%

Tabla II.6. Composición del tampón de muestra.

El SDS desnaturaliza las proteínas y elimina las interacciones no covalentes entre subunidades y el β -mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro de los oligómeros. El glicerol aumenta la densidad de las muestras y hace que queden en su lugar al depositarlas en los pocillos del 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, 30-60 s a 3000 rpm en microfuga, se recoge el sobrenadante y se aplica directamente al gel (20 μ l).

2.7.1.3. 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 el tampón de recorrido (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3) en los depósitos con los electrodos (unos 400 ml para un sistema Mini-Protean) y se aplican las muestras y las proteínas estándares en el gel (20 μ l en ambos casos). El color azul

de las muestras, debido al azul de bromofenol, permite comprobar que la muestra se ha depositado correctamente.

La electroforesis se desarrolla 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 60 min) apenas se produce calentamiento, lo que hace innecesario un sistema de refrigeración. El avance del frente se sigue por 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.

2.7.2. Detección de las proteínas

Las proteínas se hicieron visibles por tinción con azul brillante de Coomassie (CBB). El CBB es un pigmento aniónico, tipo trifenilmetano, que se une de modo no covalente a aminoácidos básicos de las proteínas. El colorante es capaz de detectar 50 ng de proteína por banda.

Para ello, se sumergió el gel en la disolución de tinción (0,1% azul brillante de Coomassie R-250, 40% etanol, 10% ácido acético), durante aproximadamente 30 minutos, en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, para desteñir el gel, se lavó varias veces con la disolución de desteñido (ácido acético 7%, etanol 5%), agitando a temperatura ambiente.

2.7.3. Western blot

Los experimentos de Western blot se utilizaron para la detección de proteínas de los lisados celulares mediante el uso de anticuerpos específicos para la proteína de interés. Se realiza una electroforesis SDS-PAGE previamente para separar las proteínas y, posteriormente, se transfieren desde el gel a una membrana de nitrocelulosa. Después de revelar la membrana, se puede determinar el tamaño de una proteína concreta en una mezcla compleja y comparar su nivel en distintas condiciones.

2.7.3.1. Electrotransferencia (método normal o húmedo)

Al acabar la electroforesis SDS-PAGE, 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), 15 min con agitación. El tampón de transferencia lleva Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%, SDS 0,01%, pH 8,3. No es preciso ajustar el pH, pues al disolverse la glicina y el Tris el medio alcanza el valor correcto. 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; por lo que para evitar problemas en la transferencia, se debe 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 0,2 μm) se cortan con un tamaño ligeramente superior al del gel, y se sumergen en agua, con cuidado de que no retengan aire. A continuación, se incuban unos minutos en TT. A lo largo del proceso, se deben manejar las membranas con guantes y pinzas, para evitar mancharlas con grasa y proteínas de las manos.

En este sistema de electrotransferencia húmeda (sistema Mini Trans-blot de BioRad), se pone el gel sobre la membrana y ambos se rodean de papel de filtro y esponjas dentro de un sistema a modo de "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 los papeles de filtro para transferencia ("blotting paper", de Sigma), 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, por este orden: una esponja, un papel de filtro, el gel (cuidando su orientación), la membrana, otro papel de filtro, 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 de hielo y una barra de agitación. Se tapa la cubeta y se coloca todo sobre un agitador magnético. La transferencia se realiza a 80 V, 1 h y 30 min 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 indicar 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.

2.7.3.2. 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 del anticuerpo secundario conjugado.

La tinción consiste en sumergir la membrana en la disolución de teñido (1 mg/ml Ponceau-S en 2% ácido acético), de 2 a 10 min, y lavar con agua hasta que se observan claramente las bandas de proteína en rojo. La membrana se escanea para tener un registro del resultado, lo que permitirá calcular después la masa de la proteína problema. Finalmente, se elimina el colorante lavando la membrana con agua.

2.7.3.3. 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 anticuerpo secundario), intercalando fases de lavado, y al final, se revela la actividad peroxidasa ligada al anticuerpo secundario. Los pasos son:

2.7.3.3.1. Bloqueo

La membrana se incuba con una disolución de leche desnatada en polvo al 5%, en tampón TBS-T (Tris 25 mM, NaCl 0,9%, Tween 20 al 0,1%, 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 reduce 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 TBS-T (3 lavados de unos 2 min cada uno). Los lavados se realizan en una bandeja con abundante tampón, a temperatura ambiente y con agitación.

2.7.3.3.2. Incubación con el anticuerpo primario

Después de bloquear la membrana, se incuba con el anticuerpo primario, convenientemente diluido en TBS-T con 1% leche desnatada en polvo. Los anticuerpos primarios empleados para detectar la AChE fueron: el anticuerpo policlonal N-19 (Santa Cruz), generado en cabra contra un péptido del extremo N-terminal de la AChE humana, y el anticuerpo policlonal NBP1-31329 (Novus), generado en conejo contra un péptido localizado entre los aminoácidos 406 y 610 de la AChE humana; ambos se diluyeron 1/1000. Para detectar los receptores de acetilcolina M3 y $\alpha 7$, se emplearon los siguientes anticuerpos: el H-210 (Santa Cruz), generado en conejo contra un péptido localizado entre los aminoácidos 271 y 480 del mAChR M3 humano y el anticuerpo H-302 (Santa Cruz), generado en conejo contra un péptido situado entre los aminoácidos 367 y 502 del extremo C-terminal del nAChR $\alpha 7$ humano, ambos diluidos 1/500. La disolución con el anticuerpo se añade a la membrana y se incuba a 4°C 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 epítipo.

2.7.3.3.3. Incubación con anticuerpo secundario

Tras retirar el anticuerpo primario, las membranas se lavan con TBS-T (3 lavados de 5 min cada uno). A continuación, se incuban 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. El anticuerpo usado fue anti-IgG de cabra-PO (A5420, Sigma) frente al N-19, diluido 1:5000 (en TBS-T con 1% de leche desnatada en polvo) y anti-IgG de conejo-PO (A1949, Sigma) frente al NBP1-31329, el H-210 y el H-302, diluido 1:2500.

2.7.3.3.4. Revelado de la actividad peroxidasa

Tras retirar el anticuerpo secundario, la membrana se lava con TBS-T y la actividad peroxidasa se revela con el kit *ECL plus WB Detection System* (Health Care, Amersham).

La membrana se incuba con la mezcla de revelado unos 5 min, y se retira el exceso de reactivo. Las membranas se colocan en una funda de plástico para escanearlas, empleando el equipo *Typhoon 9410 Amersham Variable Mode Imager*.

Para calcular la masa molecular de las subunidades de AChE y los receptores de acetilcolina en las muestras se empleó el programa GelPro.

2.8. Tinción con Hoechst

La tinción con el colorante de Hoechst es una técnica que nos permitió teñir el núcleo celular y ver si había células en proceso de apoptosis, en los tratamientos con carbacol.

El colorante de Hoechst (33258, Sigma) es un compuesto permeable a las células (tanto vivas como fijadas) que, cuando se une al DNA de doble cadena emite fluorescencia azul, con un máximo de emisión a 450 nm.

El procedimiento consistió en sembrar las células en unos portas (en torno a 6.750 células/ml). A los 4 días después de la siembra, unas células se trataron con etopósido 25 ó 100 μ M (como control positivo de apoptosis), otras con carbacol 1 mM, y un grupo de células se dejó sin tratar (control negativo).

Al cabo de 24 horas de incubación, se procedió a la fijación de las células. Para ello, se retiró la mitad del medio de cultivo de los pocillos (unos 500 μ l) y se añadió el mismo volumen del fijador Carnoy (una mezcla de metanol y ácido acético en una proporción 3:1). Se incubó durante 5 minutos y se retiró todo el volumen de los pocillos para después añadir 1 ml del mismo fijador e incubar 10 minutos. Tras esto, se retiró todo el fijador y se dejó secar el porta unos 45 minutos. A continuación, se añadieron 500 μ l del colorante Hoechst a una concentración final de 0,2 μ g/ml y se incubó durante unos 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se retiró todo el colorante y se realizaron 3 lavados sucesivos con agua desionizada y se dejó secar el porta en oscuridad. Finalmente se realizaron fotos de los distintos pocillos usando el microscopio óptico invertido, empleando el filtro para luz UV.

2.9. Tinción histocitoquímica de acetilcolinesterasa.

El método para la tinción histocitoquímica de AChE fue originariamente descrito por Karnovsky y Roots (1964). Se basa en la reducción del ferricianuro a ferrocianuro, gracias a la liberación de tiocolina producida al hidrolizarse la acetiltiocolina por la AChE. La posterior combinación de éste con iones Cu^{2+} forma ferrocianuro de cobre, que es insoluble y de color marrón. Los iones de Cu^{2+} del medio son acomplejados con citrato para prevenir la formación de ferricianuro de cobre. Por lo tanto, el color es producido directamente en el sitio donde haya actividad acetilcolinesterasa.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

Se sembraron 6.750 o 7.500 células/pocillo en un porta para cultivo celular. A los 4 días después de la siembra, se les añadió carbacol 1 mM (en medio de cultivo) a los pocillos nº 2 y 4, dejando como control los pocillos nº 1 y 3, a los que se añade sólo medio de cultivo.

A las 24 horas después del tratamiento, se les retiró todo el medio de cultivo. Las células se lavaron con PBS y, tras quitarlo, se fijaron con una disolución de formaldehído al 1,5 % (Sigma, F1635) y/o además, se permeabilizaron las células con Tween 20 al 0,01%.

Mientras tanto, se preparó la mezcla de reacción para realizar la tinción citoquímica, la cual contenía: fosfato de sodio 375 mM, citrato de sodio 25 mM, sulfato de cobre 15 mM, ferricianuro potásico 2,5 mM y acetiltiocolina 8,5 mM.

Una vez fijadas las células al porta, se les añadió a todos los pocillos 1 ml de la mezcla de reacción anterior. Tras distintos tiempos de incubación (10, 30, 90 y 120 minutos), se realizaron fotos con el microscopio óptico invertido (NIKON, ECLIPSE TE200-U). A las 8 ó 24 horas de incubación se retiró el reactivo y se volvieron a sacar fotos de las células.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En general, los datos de actividad AChE se expresan como media \pm error estándar, y la cantidad de cada mensajero como número de copias por millón de copias de GAPDH-mRNA, también como media \pm error estándar.

Las posibles diferencias estadísticamente significativas tanto en la actividad AChE como en el número de copias de mensajero entre células control y tratadas fueron evaluadas por el test de *t* de Student. El análisis estadístico se hizo con el programa SigmaPlot (versión 11 para Windows).

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. AUMENTO DE LA ACTIVIDAD AChE DE LAS CÉLULAS CACO-2 POR BW Y CARBACOL

En nuestros estudios previos sobre el papel de AChE en la diferenciación celular (Serrano-Sánchez, 2012), habíamos descubierto que el tratamiento de las células con un inhibidor muy potente, reversible y específico de AChE, el BW284c51 (BW), aumentaba mucho la actividad AChE de las células de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2. Ello nos llevó a investigar cuál era el mecanismo subyacente a este aumento de actividad. Una hipótesis probable era que el tratamiento con BW, al inhibir la AChE, aumentaba la concentración de acetilcolina en el medio de cultivo al no hidrolizarse la ACh liberada por las células. Esa ACh podría activar los receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) o nicotínicos (nAChR), como primera etapa del mecanismo de acción del BW. Pensamos que, de ser cierta esa hipótesis, el aumento podría conseguirse también mediante tratamientos con agonistas colinérgicos, como la carbamilcolina, también llamada carbacol.

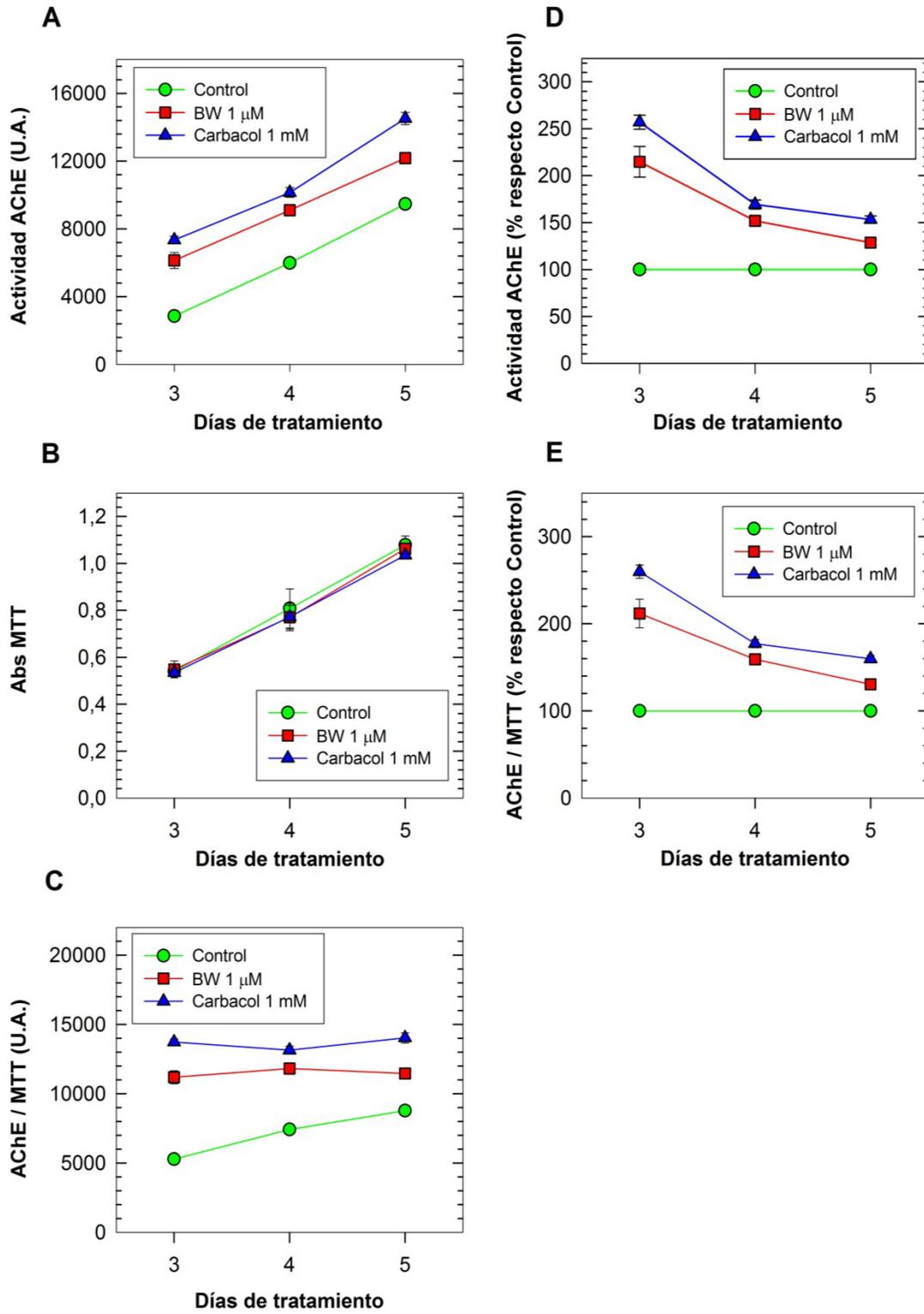
La carbamilcolina, un análogo de la ACh no hidrolizable por AChE, es un agonista de los AChR con carácter mixto muscarínico/nicotínico (Ohtani y col., 2009; Abreu-Villaca y col., 2011). Aunque se ha usado para activar los mAChR, también es agonista de los nAChR, por lo que se ha empleado para estudiar los nAChR musculares, aunque tiene menos afinidad hacia los nAChR $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Wonnacott, 2014); también actúa sobre los $\alpha 3\beta 4$ (Free y col., 2003) y los $\alpha 9$ (Verbitsky y col., 2000). En la AChBP, una proteína soluble homóloga del dominio de unión a ligandos de los nAChR, el carbacol se une al mismo sitio que la nicotina (Celie y col., 2004). El carbacol se ha empleado en células HT-29 de colon a la concentración de 1 mM (Yang y Frucht, 2000).

Para testar si un agonista de AChR era capaz de aumentar la actividad AChE, en los primeros experimentos tratamos las células Caco-2 cultivadas en placas de 96 pocillos con el BW o con carbacol, durante tiempos largos, 3-5 días. Tras cada tiempo las células se lavaban, se lisaban en un tampón con detergente, y se medía la actividad AChE en los lisados en la propia microplaca. Las células cultivadas y tratadas en paralelo en otras placas no se lisaban, sino que se usaban para medir el número de células viables por ensayos de MTT. Hay que tener en cuenta (**apdo. I.1.6**) que el BW es un inhibidor específico de AChE, que al ser reversible se elimina fácilmente por los lavados de las células previos a la lisis, de modo que la AChE manifiesta toda su actividad durante la medida.

Los resultados de uno de estos experimentos se muestran en la **Figura III.1**. Vemos como tanto el BW 1 μ M como el carbacol 1 mM produjeron un fuerte aumento de la actividad AChE, visible a los tres tiempos de tratamiento, siendo el efecto del carbacol mayor que el del BW (**Fig. III.1.A**). A este efecto lo llamamos sobrerregulación (*upregulation*) de AChE, empleando el término que se usa para el aumento que experimenta el contenido en receptores nicotínicos tras una exposición prolongada a agonistas (Govind y col., 2009). También nos referimos a él como efecto “inductor”, aunque no es un término totalmente apropiado, porque puede entenderse como que la inducción es a nivel de transcripción. Se ve además que tanto en las células control como en las tratadas la actividad AChE aumenta de modo importante con el tiempo de cultivo. Se ha descrito que la actividad AChE de las células Caco-2 aumenta durante la diferenciación, por ejemplo la que se produce por el cultivo prolongado, siendo mayor a los 12 días tras la siembra (células medio diferenciadas) que a los 3 días (Plageman y col., 2002; Xiang y col., 2008). Aunque nuestros tiempos de cultivo fueron menores, el aumento de actividad en las células control con el tiempo puede ser una consecuencia del comienzo de la diferenciación o del aumento de los contactos célula-célula.

Los ensayos de MTT de placas iguales mostraron que ni el BW ni el carbacol afectaban al número de células viables durante el tiempo de tratamiento (cinco días) (**Fig. III.1.B**). Se vio igualmente que el número de células aumentaba de modo

Figura III.1. Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE de células Caco-2 en tratamientos de 3 a 5 días. Las células se cultivaron en presencia de BW284c51 (1 μ M) o carbacol (1 mM). A los 3, 4 y 5 días se midió la actividad AChE y se determinó el número de células viables. **A)** Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE, expresada en unidades arbitrarias (U.A.). ($p < 0,001$ para BW y carbacol respecto al control a los tres tiempos). **B)** Efecto de BW y carbacol sobre la viabilidad celular. En los ensayos de MTT, la absorbancia es proporcional al número de células. **C)** Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE, expresada en U.A. y normalizada respecto al número de células. **D)** Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE, en % respecto al control (sin BW ni carbacol). **E)** Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE normalizada respecto al número de células, en % respecto al control.



importante con el tiempo, mostrando que están en fase de proliferación. Por tanto, los agentes no parecían causar daño celular durante el tiempo de tratamiento.

Parte del aumento de actividad AChE con el tiempo de cultivo se debía lógicamente al crecimiento celular. Por ello, en la **Figura III.1.C**, se normaliza la actividad frente al número relativo de células (la absorbancia del ensayo de MTT). Esta gráfica muestra que la actividad por célula va aumentando con el tiempo de cultivo, en las células control. Debido a este aumento de actividad por célula en las células no tratadas, el aumento de actividad expresado como porcentaje respecto al control (**Figs. III.1.D y E**) disminuyó notablemente con el tiempo de tratamiento, a pesar de que el aumento en términos absolutos no cambió mucho. Así, a los 3 días de tratamiento la actividad aumentó un 160% con carbacol y un 110% con BW (hasta ser x2,6 y x2,1 veces la del control) en este experimento, mientras que a los 5 días sólo aumentó un 70% y 40% respectivamente.

El aumento de actividad AChE por el tratamiento con carbacol, parecido al observado con el BW, era lo esperado si nuestra hipótesis de que el BW actuaba provocando la activación de los receptores AChR era cierta. Ensayamos a continuación si la adición conjunta de BW y carbacol conseguía un mayor aumento de actividad AChE (**Fig. III.2**). Observamos claramente que la presencia de BW no aumentaba el efecto del carbacol, lo que supuso un apoyo más a la hipótesis de que ambos agentes actúan por un mismo mecanismo, probablemente por activación de los AChR.

En los primeros experimentos se habían aplicado tratamientos largos, como los usados en nuestros estudios de diferenciación (Serrano-Sánchez, 2012). Pero, visto que el mayor efecto “inductor” de AChE se producía a los tres días, probamos tiempos de tratamiento más cortos (**Fig. III.3**).

Se comprobó así que los efectos del carbacol y del BW sobre la actividad AChE eran ya muy importantes tras un día de exposición, manteniéndose a tiempos mayores (**Fig. III.3.A**). A los distintos tiempos, el efecto del carbacol fue siempre mayor que el del BW. En todos los casos, la actividad AChE iba aumentando notablemente con el tiempo, siendo muy baja a los pocos días de cultivo. Así, en este experimento (**Fig. III.3.A**), sembrando 1.200 células por pocillo, a los 6 días de cultivo (lo que corresponde al día 1 de tratamiento) se obtuvo en las células control una actividad AChE de 850 unidades arbitrarias (U.A.). Los datos de actividad normalizados

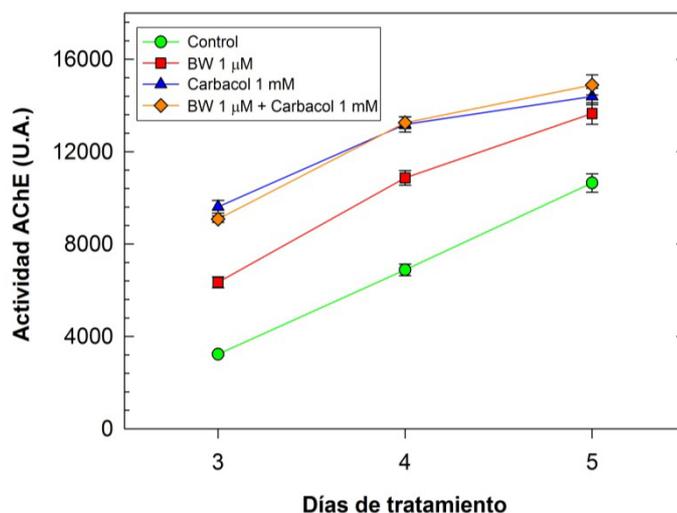


Figura III.2. Efecto de la aplicación conjunta de BW y carbacol sobre la actividad AChE de Caco-2. Las células se cultivaron en presencia de BW284c51 (1 μ M) o carbacol (1 mM) o de ambos simultáneamente. A los 3, 4 y 5 días se midió la actividad AChE. ($p < 0,001$ para BW y carbacol respecto al control a los tres tiempos de tratamiento).

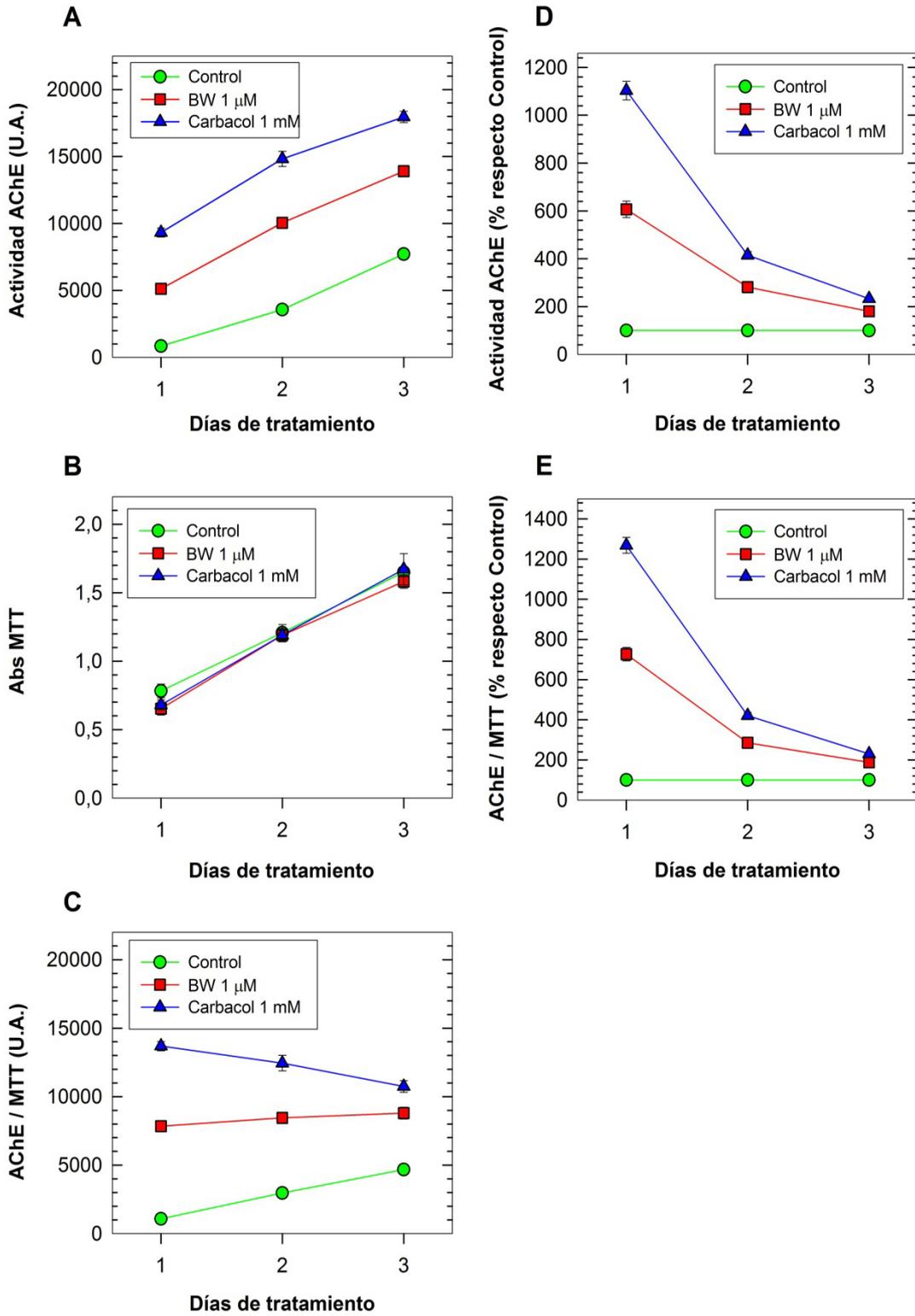
por el número relativo de células (**Figs. III.3.B y C**), que compensan el cambio debido a la multiplicación celular, confirmaron el aumento a lo largo del tiempo de la actividad por célula en las células control. Por ello, la proporción de actividad en células tratadas respecto a los controles disminuyó mucho con el tiempo (**Fig. III.3.D**), alcanzándose en el experimento mostrado actividades de x11 veces para carbacol y x6 veces con BW al primer día, que bajaron a x2,3 y x1,8 veces a los tres días. Por esta razón, la mayor parte de los experimentos posteriores se realizaron con un día de tratamiento.

Estos experimentos pusieron de manifiesto un mecanismo de regulación de la actividad AChE de las células de colon, mediado por los receptores de acetilcolina. Parece lógico que una exposición prolongada a agonistas de los receptores colinérgicos, bien sea acetilcolina en vivo o su análogo carbacol en nuestros ensayos, ponga en marcha un mecanismo que eleve los niveles de AChE, dirigido a aumentar la capacidad de hidrólisis de ACh, con el fin de restablecer el estado normal de activación colinérgica. Como el carbacol actúa sobre los receptores muscarínicos y nicotínicos (Ohtani y col., 2009) ambos tipos podrían estar implicados en la respuesta a carbacol. Nos propusimos profundizar en el estudio de este fenómeno.

Es importante destacar que las células Caco-2 producen y liberan ACh. En efecto, por RT-PCR se ha identificado el mensajero para ChAT -la principal enzima que sintetiza ACh- en Caco-2 y otras líneas celulares de cáncer de colon, como H508 (Cheng y col., 2008). Además, los ensayos de inmunofluorescencia mostraron la presencia de ChAT en el citoplasma. Empleando eserina para inhibir la AChE celular, se comprobó la aparición de ACh en el medio de cultivo, llegando a concentraciones de 7 μ M para Caco-2, correspondiendo a la liberación diaria de unos 4,5 nanomoles de ACh por millón de células (Cheng y col., 2008).

De hecho, se ha observado la producción de ACh, o al menos la expresión de ChAT, en muchos tipos celulares distintos del tejido nervioso, incluyendo células de los epitelios digestivo, respiratorio y de la piel, células inmunes y endoteliales, fibroblastos, y adipocitos (Wessler y Kirkpatrick, 2008) (**apdo. I.6.2**). Además de las células de colon, otras células en cultivo que producen ACh son las de cáncer de pulmón (Song y col., 2003a; 2008) e hígado (Zhao y col., 2011), y las células de leucemia (Kawashima y Fujii, 2000). Hoy día se sabe que la ACh ejerce diversas funciones en los tejidos periféricos (Wessler y Kirkpatrick, 2008; Campoy y col., 2016). Por ejemplo, los agonistas colinérgicos (nicotina y otros) estimulan la división de las células de cáncer de colon por un mecanismo que implica la activación de una cascada de señales que regula la proliferación y supervivencia celular (Cheng y col., 2007; Xie y col., 2009a). Esto apoya la posibilidad de que un mecanismo regulador de los niveles de AChE, en función de la mayor o menor activación de los AChR por la ACh que rodee a la célula, opere en diversos tipos celulares distintos al nervioso y muscular.

Figura III.3. Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE de células Caco-2 en tratamientos de 1 a 3 días. Las células se cultivaron en presencia de carbacol (1 mM) o BW284c51 (1 μ M). A 1, 2 y 3 días se midió la actividad AChE y se determinó el número de células viables. **A)** El efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE. ($p < 0,001$ para BW y carbacol respecto al control a los tres tiempos). **B)** Efecto de BW y carbacol sobre la viabilidad celular. **C)** Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE normalizada respecto al número de células. **D)** Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE, en % respecto al control. **E)** Efecto de BW y carbacol sobre la actividad AChE normalizada respecto al número de células, en % respecto al control.



La liberación de ACh por las propias células Caco-2 explicaría el efecto inductor del BW, como resultado del aumento de la cantidad de ACh en el medio debido a la inhibición de AChE, y el consiguiente aumento de la ocupación de los receptores de ACh. Según esta hipótesis, el mecanismo básico que explicaría el aumento de los niveles de AChE sería similar para el BW y para el carbacol.

Debemos mencionar las observaciones relativas al aumento en el contenido del mRNA para AChE-R en ciertas regiones cerebrales, tras el tratamiento con inhibidores de AChE como el DFP, el soman o la piridostigmina (Kaufer y col., 1998; Meshorer y col., 2002; Perrier y col., 2005; Livneh y col., 2010). Dos importantes diferencias con nuestro estudio es que estos trabajos muestran cambios en cerebro, y a nivel de mensajero y no de actividad. Al menos en algunos casos, el mRNA AChE-R suponía solo una parte ínfima del conjunto de mRNAs para AChE (Perrier y col., 2005).

Además, suelen ser estudios en vivo, donde los cambios en AChE pueden obedecer a causas más complejas, como el estrés que sufren los animales. También hay que tener en cuenta que el DFP es un inhibidor general de serín-proteasas, por lo que sería más probable un efecto inespecífico que en el caso del BW.

2. BLOQUEO DEL AUMENTO DE ACTIVIDAD AChE POR CICLOHEXIMIDA

Cambios en la actividad de una enzima pueden tener lugar a distintos niveles, incluyendo la transcripción, procesamiento y degradación del mRNA, la traducción y plegamiento de la cadena polipeptídica, el ensamblado de subunidades, las modificaciones postraduccionales, la secreción y la degradación de la proteína, además de la unión de ligandos (Luo y col., 1994; Zhu y col., 2007a; Lu y col., 2013; Marrero y col., 2011; Rotundo, 1988). Entre esas posibilidades, un punto clave es la síntesis de la cadena polipeptídica, por lo que quisimos averiguar si la sobreexpresión de AChE por carbacol requiere la traducción de la enzima. Dado que en algunas células, la mayoría de la AChE recién sintetizada se degrada rápidamente sin llegar a ser catalíticamente activa, una alternativa probable era que el carbacol favoreciera la adquisición de la conformación activa de AChE, o redujera su degradación (Rotundo, 1988).

Para abordar este aspecto se empleó un inhibidor de la traducción, la cicloheximida (CHX), que bloquea la actividad peptidil-transferasa de los ribosomas 80S eucarióticos impidiendo la traducción del mRNA en el citosol. La CHX se usa ampliamente para

conocer si un proceso requiere síntesis de proteína; por ejemplo, la adición de CHX reveló que la sobrerregulación del receptor nicotínico se produce a nivel postraducciona (Govind y col., 2009).

En la **Figura III.4.**, se observa que la CHX bloqueó en gran medida la sobrerregulación de la actividad AChE por carbacol. En este experimento, tras un día de tratamiento, el carbacol sin CHX aumentó la actividad más de un 800% (hasta x9,4 veces) respecto al control, pero en presencia de CHX 50 µg/ml sólo la aumentó un 73% (x1,7 veces). En ausencia de carbacol, la CHX suprimió toda la actividad AChE. Hay que tener en cuenta que en presencia de CHX el carbacol consigue no sólo que haya mayor actividad que en el control, sino “conservar” la actividad que se pierde con CHX sola. Considerando ambas, si comparamos 173% con 837%, el porcentaje del efecto del carbacol que la CHX no impide sería del 21%.

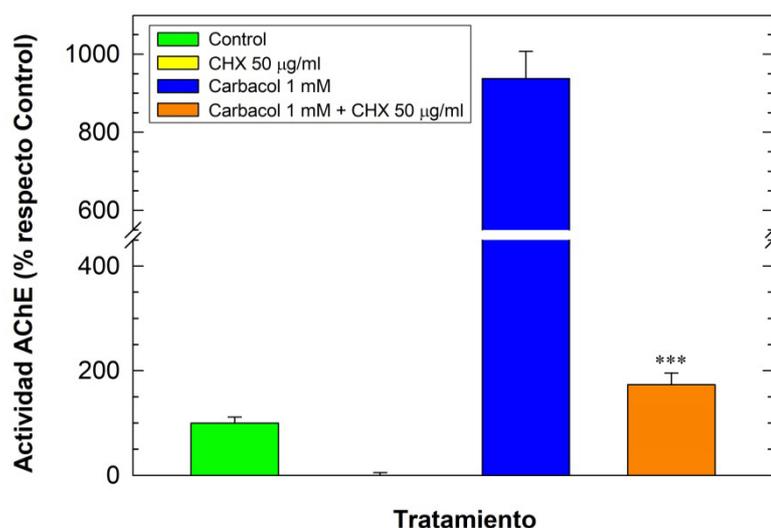


Figura III.4. Efecto de la cicloheximida sobre la actividad AChE inducida por carbacol. Las células se preincubaron con CHX durante 2 h antes de añadir el carbacol. A las 24 h se midió actividad AChE. En la figura se muestra la actividad AChE, en % respecto al control, de las células tratadas con carbacol, sin y con CHX. (***: $p < 0,001$ respecto a carbacol sin CHX).

El efecto de CHX apoya fuertemente que se requiere la traducción del mRNA de AChE, es decir, síntesis de la cadena polipeptídica de AChE, para que se produzca sobrerregulación. A la vista de los datos, es probable que todo el aumento de actividad requiera la síntesis de proteína AChE, y que el porcentaje no eliminado se deba

simplemente a que la concentración de CHX empleada no era suficientemente alta y/o el tiempo de pretratamiento no fuera lo bastante largo. Alternativamente, puede que haya un doble mecanismo de sobreexpresión, una parte principal dependiente de la síntesis de proteína AChE y otra parte que no lo sea; ésta podría tener lugar por ejemplo a nivel de plegamiento favoreciendo la conversión de un depósito previo de enzima inactiva en activa (Rotundo, 1988), algo parecido a lo que ocurre con el nAChR. Sin embargo, no se puede descartar que la CHX bloquee la sobreexpresión no directamente, inhibiendo la traducción de AChE, sino impidiendo la síntesis de un factor proteico necesario para activar un depósito intracelular previo de AChE inactiva. Ese factor proteico podría ser una chaperona particular. Así, se ha visto que los niveles y actividad de las chaperonas proteína disulfuro isomerasa (PDI), calnexina (chaperona muy importante para el plegamiento de glicoproteínas en el retículo), y ERp72 (un miembro de la familia PDI) son importantes para la expresión de AChE activa (Ruiz y Rotundo, 2009). No obstante, la explicación más probable del efecto de CHX es que el mecanismo de acción del carbacol requiere la síntesis de nueva AChE.

3. DETECCIÓN DE AChE POR WESTERN BLOTTING

El bloqueo por la cicloheximida de la sobreexpresión de AChE apoya fuertemente la necesidad de síntesis de nueva enzima. Para comprobar si la sobreexpresión suponía un cambio en el contenido en proteína AChE, se llevaron a cabo ensayos de Western blotting empleando dos anticuerpos contra AChE: el anticuerpo 31329 de Novus, dirigido contra la región 406-610 de la AChE humana, y el anticuerpo N-19 de Santa Cruz, contra un péptido del extremo N de la AChE humana.

Con el anticuerpo 31329 aparecieron varias bandas (**Fig. III.5.A**), destacando la de ~66 KDa, muy cercana a los ~68 KDa esperados por lo que la asignamos a AChE. Es evidente que esta banda fue más intensa para las células tratadas con BW (+94%), lo que confirmó que la sobreexpresión conlleva un aumento en el contenido de proteína AChE. También se vieron bandas en el rango 57-52 KDa, que podrían corresponder al fragmento de AChE de 55 KDa observado en células PC-12, y que se origina a partir de la forma de ~68 KDa (Xie y col., 2011). Fragmentos de 55 KDa con el extremo C-terminal de las subunidades AChE-T y AChE-R se han detectado en plasma humano, estando el de AChE-R elevado en el plasma de individuos con cirrosis hepática (García-Ayllon y col., 2012). De modo similar a lo visto con el anticuerpo 31329, con el N-19 (**Fig. III.5.B**) se observó una banda más intensa de

AChE de 66 KDa y otra de 52 KDa. Diferencias en la glicosilación podrían explicar la observación de otras bandas más débiles y de masa molecular cercana.

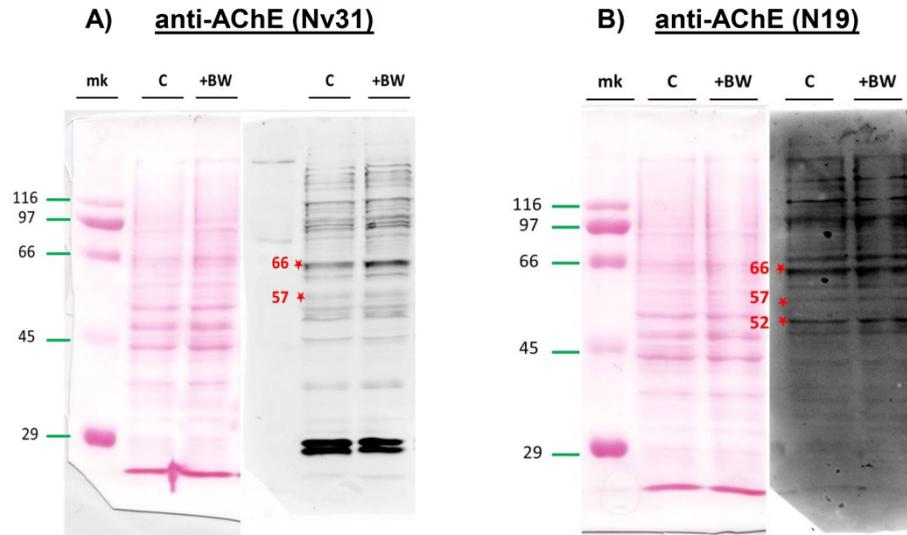


Figura III.5. Efecto de BW284c51 sobre la cantidad de AChE de las células Caco-2. Las proteínas de un lisado celular (20 µg/calle) se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a Western blotting con anticuerpos contra AChE. La membrana **A)** se incubó con el anticuerpo anti-AChE Novus 31329 y la membrana **B)** con el anticuerpo anti-AChE N19. Tras incubación con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, las membranas se revelaron con el reactivo ECL plus. La masa molecular de las proteínas se calculó por referencia a los marcadores (mk): β-galactosidasa (116 KDa), fosforilasa b (97 KDa), albúmina de suero bovino (66 KDa), albúmina de huevo (45 KDa) y anhidrasa carbónica (29 KDa). En cada caso se muestra a la izquierda la membrana tras la tinción de proteínas con Ponceau, y a la derecha la señal de actividad peroxidasa.

4. EXPRESIÓN DE RNA MENSAJEROS DE AChE EN CÉLULAS CACO-2

Todas las subunidades catalíticas de AChE derivan del mismo gen, pero de un conjunto de mRNAs que varían en 3' y 5'. Considerando las diferencias en 3' se distinguen 3 tipos de mRNA. El mensajero con los exones E1-E2-E3-E4-E6 (mRNA AChE-T) genera la subunidad T, que predomina en cerebro y músculo. El mRNA E1-E2-E3-E4-E5-E6 (donde E6 no se traduce) produce la subunidad AChE-H, que incorpora glicosilfosfatidilinositol (GPI); AChE-H es típica de células sanguíneas, pero

está presente en otros muchos tejidos (Montenegro y col., 2006; Muñoz-Delgado y col., 2010). El tercer mRNA incluye el pseudo-intrón I4, y tiene una organización E1-E2-E3-E4-I4-E5-E6; abunda en tejidos embrionarios y tumores, y produce la subunidad R, cuyas propiedades no se conocen plenamente (Meshorer y col., 2004; Meshorer y Soreq, 2006). El uso de distintos promotores da lugar a variantes en 5' del AChE-mRNA, con distintos exones E1. En humanos hay tres variantes 5': los mRNA con E1c son los clásicos, mientras que aquéllos con E1e generan subunidades N-extendidas y su expresión está regulada en el desarrollo (Meshorer y col., 2004). El exón E1a humano (hE1a) se identificó por homología con el de ratón (mE1a), pero ya entonces se afirmó que posiblemente hE1a no era un verdadero exón porque carecía de sitios de *splicing* consenso, y porque no se detectaron secuencias con hE1a en una base de datos de expresión (Meshorer y col., 2004). Dadas esas opciones en 5' y 3', en principio son posibles nueve mRNAs distintos. Sólo se ha detectado un mRNA para BuChE, cuya proteína producto genera toda la variedad de formas moleculares.

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 tipo celular, de su condición fisiológica y de la respuesta a estímulos externos.

A la vista del gran aumento que se producía en la actividad AChE en las células tratadas con carbacol o BW, y tras ver que ese aumento requería la síntesis de nueva proteína, decidimos investigar si el aumento se debía a una subida en la cantidad de mensajero, y si esa subida afectaba a una variante de mRNA concreta. Con este objetivo, se procedió primero a averiguar qué dotación de AChE-mRNA tienen las células Caco-2, para posteriormente analizar los posibles cambios por el tratamiento con los agentes.

Después de obtener el RNA total de las células y generar el correspondiente DNA copia (cDNA), se amplificaron los cDNA con cebadores diseñados para distinguir entre los distintos mRNA de AChE (**apdo. II.2.4; Tabla II.3**), y se calculó la cantidad de cada mRNA por el ciclo en que se alcanza un umbral de fluorescencia (**Fig. III.6**).

Para comprobar que los cebadores amplificaban correctamente el cDNA del mRNA deseado, se usaron varios criterios. Hay que tener en cuenta que, aunque la mayoría de cebadores para AChE ya se habían empleado y chequeado anteriormente (Montenegro y col., 2006; Muñoz-Delgado y col., 2010), tanto los cebadores para AChE total (AChE-wh) como los de AChR o ChAT se han diseñado para esta tesis.

Por una parte, mediante por electroforesis en gel de agarosa de las mezclas de reacción tras la PCR se comprobó que en cada caso se obtenía un solo producto, del tamaño esperado para el amplicón correspondiente (**Fig. III.7**). Más adelante se muestra un gel análogo para productos de PCR obtenidos de células SW480 (**Fig. III.40**). Aunque esto ya demuestra que se amplifica sólo el cDNA deseado, para mayor seguridad muchos de los productos de la PCR se secuenciaron, confirmándose la amplificación específica. Por otra parte, de cada experimento se examinaban las curvas de fusión (*melting curves*) obtenidas para los pocillos tras el último ciclo de amplificación, para comprobar la aparición de un único pico con una T_m alta, característica de cada mRNA (**Fig. III.8 y III.9**).

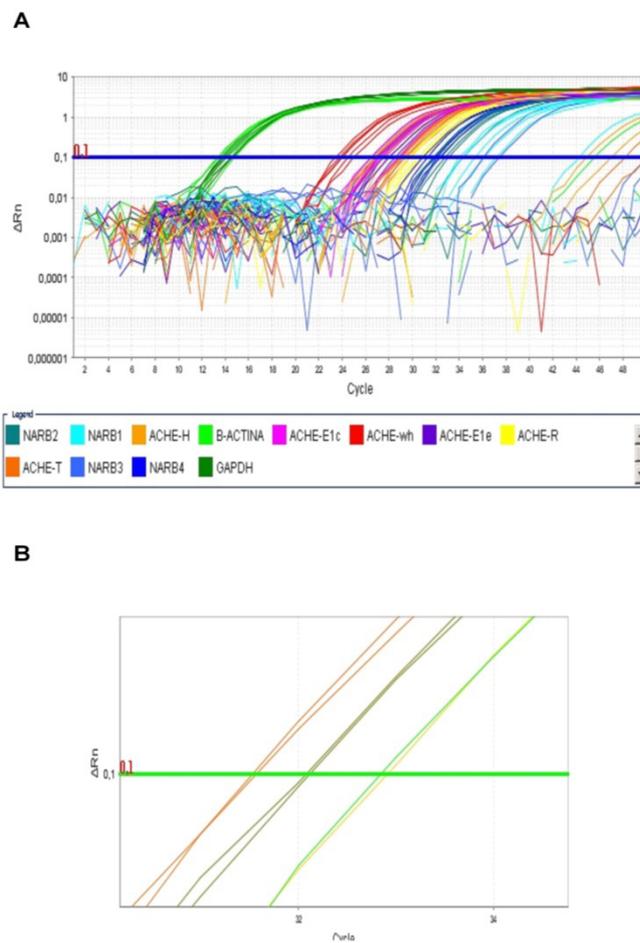


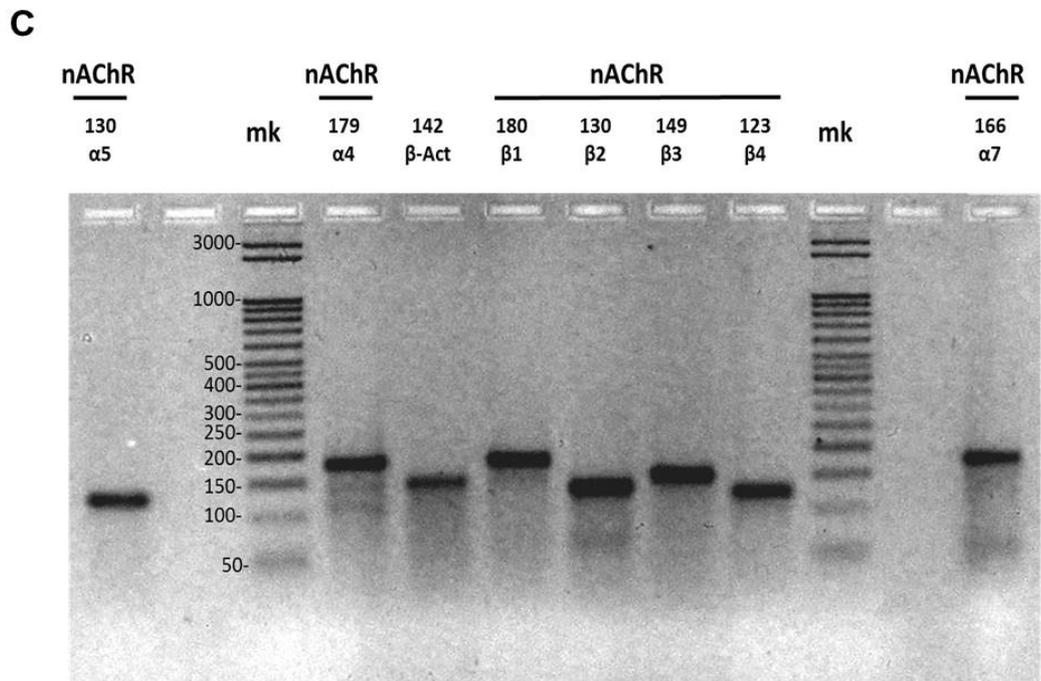
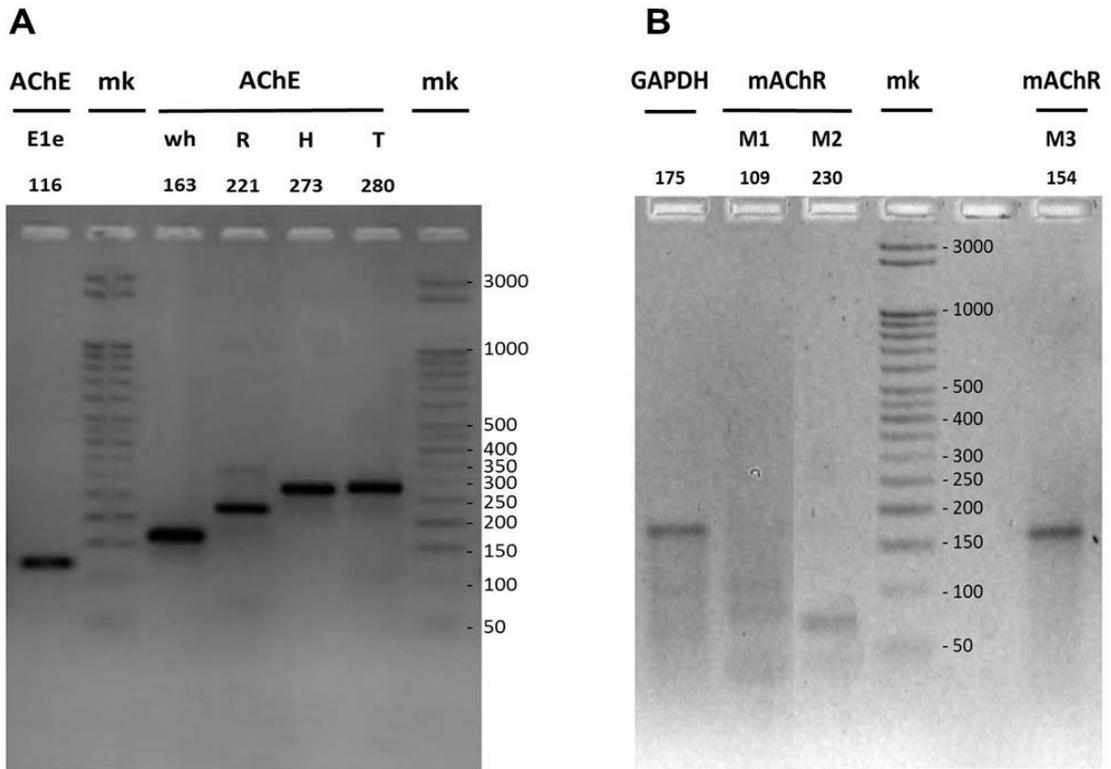
Figura III.6. Curvas de amplificación de los productos de la RT-PCR a tiempo real. En la figura **A)** se muestra un ejemplo de las curvas de amplificación obtenidas durante una PCR a tiempo real. Cada color corresponde a un mensajero. En la figura **B)** se muestran 3 curvas de amplificación, para un mismo mensajero, obtenidas con 3 diluciones distintas de una misma muestra, hechas por duplicado.

4.1. AChE-mRNA en células Caco-2 control

Para cuantificar los distintos tipos de AChE-mRNA expresados por las células Caco-2 se realizaron ensayos de RT-PCR a tiempo real, en los que el número de copias de cada mensajero se expresa en relación a las de un transcrito de referencia (GAPDH), que sirve a la vez como control de carga (**Fig. III.10**). De modo que se obtiene una cuantificación relativa.

Comparando el contenido de cada AChE-mRNA en las células Caco-2 control (**Fig. III.10**), se observó que el mensajero más abundante, en cuanto a las variantes en 3', es el AChE-H, con unas 150 copias por millón de copias de GAPDH, seguido del transcrito AChE-T, con unas 80 copias, y el AChE-R, con ~27 copias. Era de esperar que el mRNA AChE-H fuera la variante 3' más abundante, pues es el que codifica las subunidades de AChE con anclaje de GPI, que son las predominantes en tejidos epiteliales, así como en los eritrocitos y otras células sanguíneas (Montenegro y col., 2014; Massoulié, 2002). En cuanto a las variantes en 5' en las células Caco-2, predominan los mRNA "clásicos" con el exón E1c, con unas 300 copias, aunque hay un contenido relevante de mensajeros con E1e, los que codifican subunidades N-extendidas de AChE, con unas 80 copias. No se ha intentado amplificar el mRNA con el putativo exón E1a, ya que es un exón teórico y transcritos con E1a no fueron detectados en humanos ni en el trabajo original que los describe (Meshorer y col., 2004) ni por nosotros (Muñoz-Delgado y col., 2010). El contenido total de mRNA de AChE (visto con cebadores que no distinguen entre las distintas variantes en 3' y 5', lo que llamamos AChE-wh), fue de unas 1100 copias por millón de copias de GAPDH.

Figura III.7. Tamaño de los productos amplificados mediante RT-PCR a partir de células Caco-2. A partir de RNA aislado de células Caco-2 se obtuvo cDNA con cebadores al azar, y se amplificaron los fragmentos deseados con cebadores específicos. Los productos de RT-PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se detectaron con bromuro de etidio, junto con marcadores de longitud de DNA (mk). Sobre cada calle se indica el mensajero al que iba dirigido el par de cebadores, y la longitud del producto esperado (en pares de bases). **A)** Productos de RT-PCR para los distintos transcritos de AChE. **B)** Productos de RT-PCR para los mAChRs y GAPDH. **C)** Productos de RT-PCR para subunidades de nAChRs (α y β) y para β -actina. Los productos tenían el tamaño esperado, salvo para los mAChRs M1 y M2, cuyos mRNA ya sabíamos que estaban ausentes de las células Caco-2, a la vista de sus Ct y curvas de fusión.



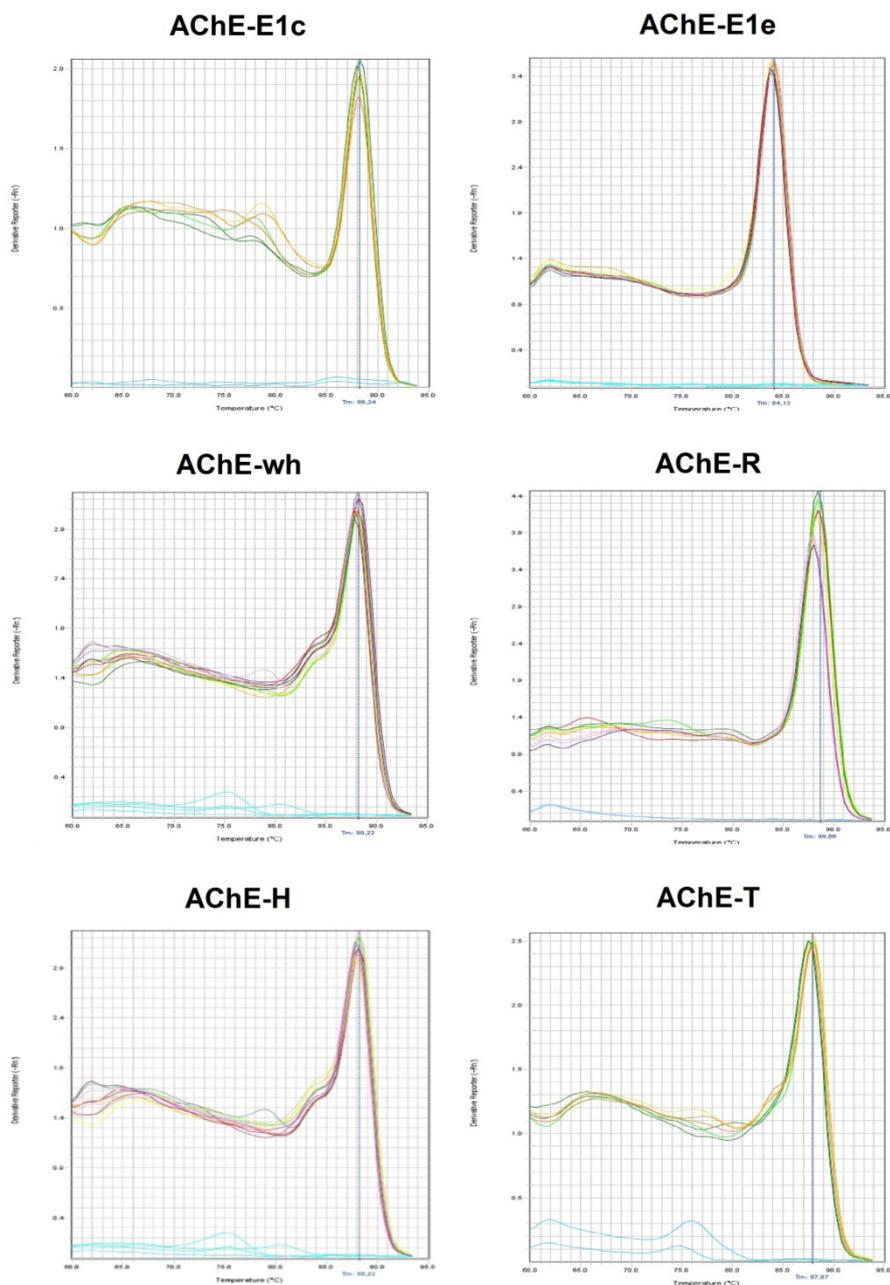


Figura III.8. Curvas de fusión de los productos obtenidos en la RT-PCR para los transcritos de AChE. Las curvas en azul corresponden al agua, y el resto de curvas pertenecen a muestras en distintas diluciones. Para cada par de primers se amplifica siempre el mismo producto, con una $T_m > 88^\circ\text{C}$.

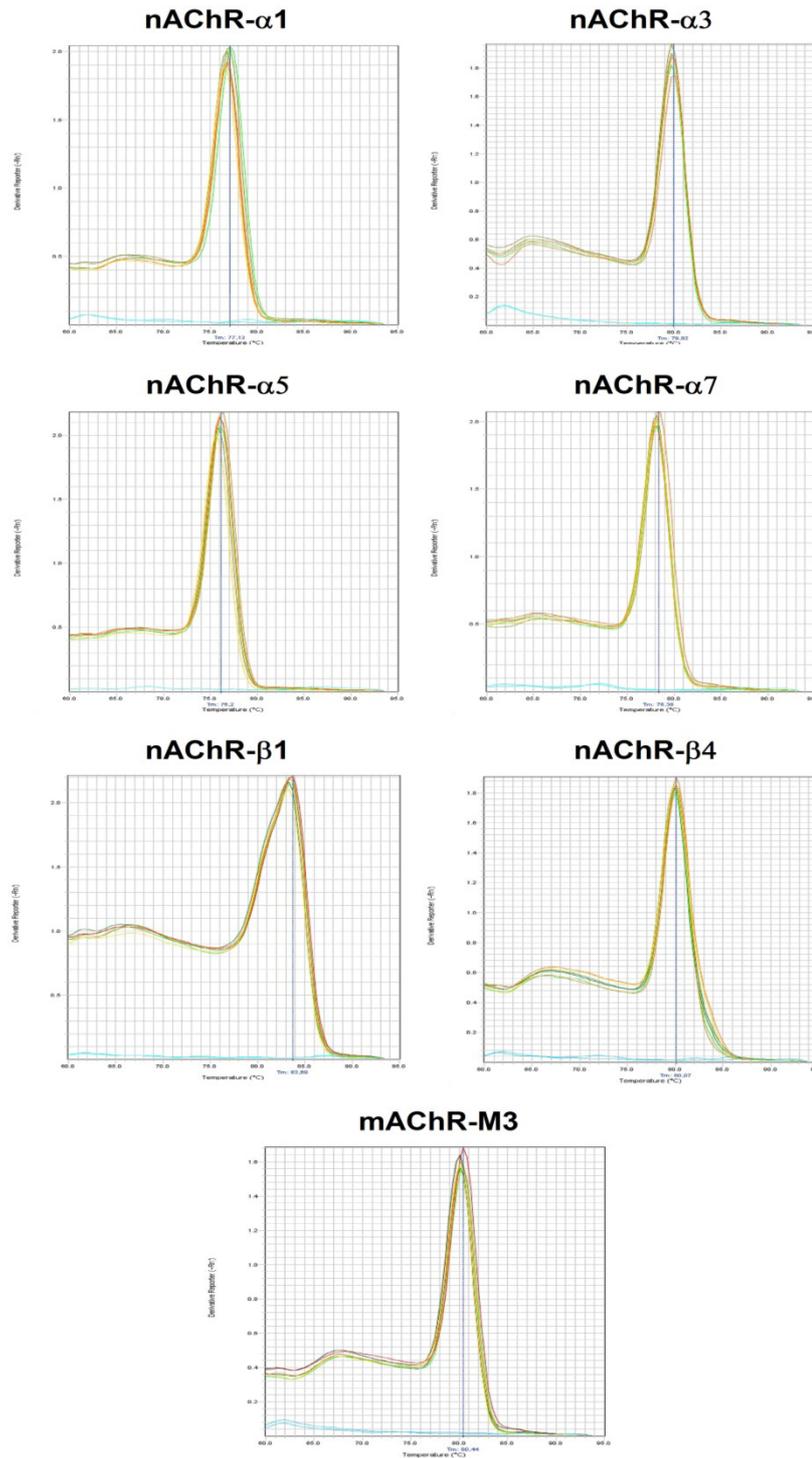


Figura III.9. Curvas de fusión de los productos obtenidos en la RT-PCR para los principales transcritos de AChR. Las curvas en azul corresponden al agua, y las demás curvas pertenecen a muestras a distinta dilución. Con cada par de primers se amplifica siempre el mismo producto, con una $T_m > 75^\circ\text{C}$.

El patrón de abundancia de las variantes 3' en Caco-2, H>T>R, es el mismo que se observa en muestras de colon (Montenegro y col., 2006). Las subunidades AChE-H sólo pueden formar moléculas ligeras anfifílicas G_2^A y G_1^A , ancladas a la membrana por GPI. Por tanto, la prevalencia del mensajero H coincide con el hecho de que las formas ligeras anfifílicas sean las únicas moléculas de AChE en Caco-2 (**Fig. III.12.A**), y las predominantes en las muestras de colon, donde hemos comprobado que contienen GPI (Montenegro y col., 2006). Además, las formas tetraméricas y asimétricas identificadas en el colon proceden probablemente de células nerviosas y musculares. La expresión del mRNA con E1e sugiere la producción en Caco-2 de subunidades N-extendidas de AChE, a las que la extensión aporta un modo alternativo de anclaje a la membrana (Meshorer y Soreq, 2006; Montenegro y col., 2017). Subunidades H con la N-extensión se han detectado en hígado de ratón, donde se localizan en los rafts (Montenegro y col., 2017).

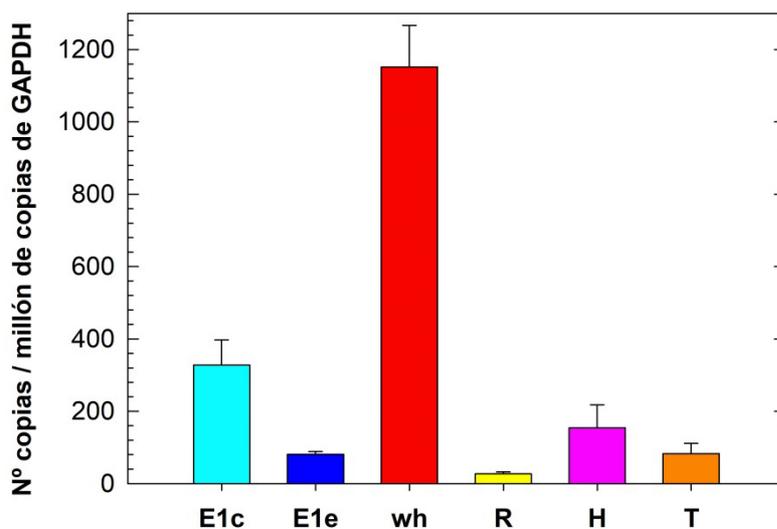


Figura III.10. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE en las células Caco-2. El histograma muestra el número de copias de cada transcrito de AChE respecto al número de copias de GAPDH. Las variantes 5' y 3' más abundantes son las que contienen el exón E1c y la AChE-H, respectivamente. Los ensayos de RT-PCR con cebadores para BuChE no detectaron BuChE-mRNA en las células Caco-2.

Un hecho anómalo que se observa al comparar las cantidades de los mensajeros es la falta de correlación entre la cantidad total de AChE-mRNA cuantificada con cebadores contra la parte común del mensajero (AChE-wh), y la suma de copias de todas las variantes de AChE 3' o 5'. Una probable explicación es que el RNA esté

parcialmente degradado debido a la acción de exonucleasas previa a la lisis; esa degradación afectaría más a las regiones de los extremos (3' y 5'), y menos a la región central (exones E3 y E4), que es la diana de los cebadores para AChE-wh. Por otra parte, la secuencia de *ACHE* tiene tramos ricos en G+C con tendencia a formar estructuras secundarias por apareamiento intracatenario (Soreq y col., 1990), que podrían dificultar la obtención de cDNA en la RT-PCR, lo que afectaría más a unas zonas que a otras. Por ejemplo, el producto amplificado del E1c-mRNA tiene un 81% de G+C. Se ha probado a hacer la PCR con DMSO para evitar la formación de estructuras secundarias pero los resultados fueron similares, y no se redujo esa discrepancia. El que se hayan usado cebadores al azar (y no con oligo(dT)) para la RT nos permite obtener cDNA de la parte central de una molécula de mRNA que tenga su región 3' degradada o formando estructuras secundarias, pero puede sobrevalorar la parte central del transcrito. La falta de correlación podría también deberse a que la eficiencia de los cebadores no sea perfecta, y a lo largo de los sucesivos ciclos que transcurren hasta alcanzar el umbral de fluorescencia (Ct) se acumule una cierta diferencia en el grado en que se amplifican unos transcritos y otros. Estos posibles problemas no afectarán a la comparación de la cantidad de un mismo mRNA entre células control o tratadas.

4.2. Efecto de BW y carbacol sobre los AChE-mRNA de Caco-2

El efecto de los agentes sobre los AChE-mRNA se presenta en la **Figura III.11**. Se observa que el BW aumentó la cantidad de los mensajeros de AChE, pero la subida, del ~30% para el conjunto de las variantes (AChE-wh), fue muy pequeña comparada con el aumento de actividad. En cambio, el nivel de AChE-wh disminuyó por el carbacol.

Estos resultados indican que el aumento de actividad AChE por los agentes no se debe a un aumento en la expresión del gen *ACHE*. La subida en AChE-wh-mRNA por BW es claramente insuficiente para explicar el aumento de actividad, y por carbacol AChE-wh incluso disminuye. Es probable que el nivel de mensajero dependa de la ventana temporal analizada tras el inicio del tratamiento (Xiang y col., 2008). Pero cambios en las etapas post-transcripcionales deben ser los responsables del aumento de actividad. Hemos visto que la sobrerregulación requiere síntesis de proteína, puesto que se bloquea por cicloheximida (**Fig. III.4**); además el BW aumenta la cantidad de proteína AChE (**Fig. III.5**). Los agonistas (carbacol y ACh, en el caso del BW) podrían provocar un aumento en la velocidad de traducción mediante cambios en la cantidad

de alguno de los miRNA reguladores de AChE, como miRNA-132 (Shaltiel y col., 2013; Shao y col., 2015) y miRNA-212 (Lu y col., 2013). También podrían actuar ralentizando la degradación de la cola de poli-A del extremo 3'.

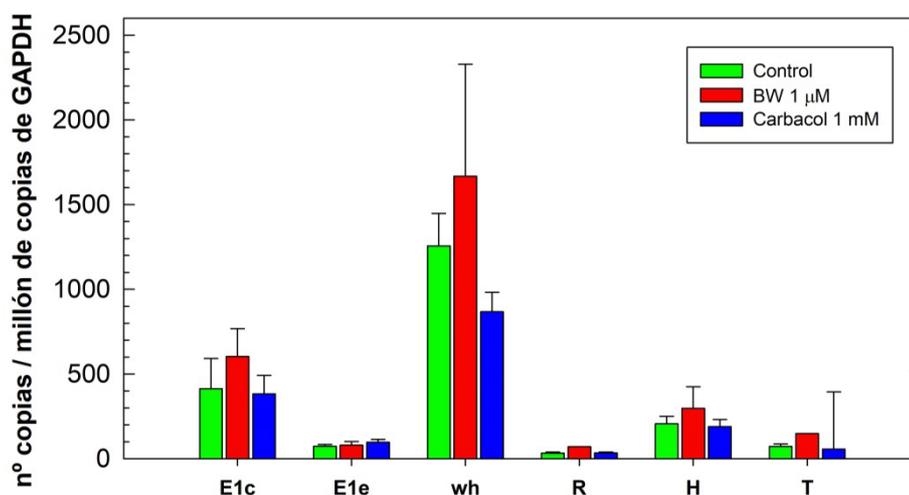


Figura III.11. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE en las células Caco-2 tras tratamiento con BW284c51 y carbacol. Las células se incubaron con BW 1 μM o carbacol 1 mM, durante 24 h. En la figura se muestra el número de copias obtenido para cada transcrito de AChE, respecto al número de copias de GAPDH, en células control y tratadas.

5. FORMAS MOLECULARES DE AChE EN CACO-2: EFECTO DE CARBACOL Y BW

Cada tipo celular tiene un rango de formas moleculares de AChE, que puede cambiar durante el desarrollo, por la actividad, o como consecuencia de una patología. Analizamos la composición de formas de AChE en las células Caco-2 y su posible variación por el carbacol, para saber si el agonista producía un aumento específico de alguna de las formas de la enzima. El patrón de formas moleculares de AChE de las células Caco-2 se determinó por centrifugación de los extractos solubles en gradientes de densidad de sacarosa conteniendo detergentes. La medida de la actividad AChE en las fracciones de gradiente proporcionó los perfiles de sedimentación, y los coeficientes de sedimentación de los máximos de actividad AChE (picos) se calcularon por referencia a la posición del marcador fosfatasa alcalina (F, 6.1S) (**apdo. II.2.6.3**).

Las células Caco-2 no tratadas (control) expresan dos formas moleculares de AChE, con coeficientes de 3.5S y 5.0S en gradientes con el detergente Triton X-100 (**Fig. III.12.A**). De acuerdo con resultados previos de nuestro grupo, el pico de 3.5S se asignó a monómeros (formas G_1), y el de 5.0S a dímeros (G_2) (Moral-Naranjo y col., 1996; Muñoz-Delgado y col., 2010). El contenido de las dos formas fue similar (58% y 42%, respectivamente). En gradientes con Brij 96 como detergente, los coeficientes de sedimentación fueron más bajos, de 2.5S para G_1 y 4.0S para G_2 (**Fig. III.12.B**). La disminución del coeficiente en gradientes con Brij 96, con respecto a los que llevan Triton X-100, indica que se trata de formas anfifílicas, esto es, que interactúan con detergentes (Montenegro y col., 2006). Son, por tanto, monómeros y dímeros anfifílicos (G_1^A y G_2^A).

Por tanto, las células Caco-2 sólo contienen formas ligeras (en el sentido de “livianas”) de AChE, G_1^A y G_2^A . Un estudio anterior de otros autores (Plageman y col., 2002) ya mostró que en Caco-2 sólo hay formas ligeras de AChE, aunque la peor resolución de los gradientes empleados, con un menor número de fracciones (24 y no >35 como en nuestros análisis) les llevó a concluir que sólo contenían formas G_1 . Otros autores también han observado las formas de AChE en Caco-2, pero sólo en gradientes con Brij 96, constatando como nosotros la presencia de formas G_1^A y G_2^A (Martínez-López de Castro y col., 2008).

Era de esperar que éstas fueran las formas presentes en las células Caco-2, de cáncer de colon, ya que las formas ligeras de AChE son las predominantes en muestras de colon humano sano, donde G_1^A y G_2^A suponen el 70% de la actividad, siendo su proporción aún mayor en muestras cancerosas (Montenegro y col., 2006). Además, las moléculas asimétricas (A_{12}) y tetraméricas (G_4^A) de AChE que se observan en muestras de colon no canceroso tienen con toda probabilidad un origen muscular y nervioso, respectivamente, siendo las moléculas ligeras las únicas que proceden de la mucosa intestinal (Montenegro y col., 2006).

El carácter anfifílico de las moléculas de AChE de las Caco-2 se debe a los restos de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que les sirven de anclaje a la membrana. Se trataría por tanto de subunidades H, cuyo extremo C-terminal está codificado por el exón E5, y que son las que sufren la adición de GPI en el retículo endoplásmico. En efecto, nuestro grupo ha demostrado que las formas G_1^A y G_2^A de colon humano contienen GPI, ya que el tratamiento con hidroxilamina alcalina, seguido de incubación con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), convierte estas formas de anfifílicas en hidrofílicas, de mayor coeficiente de sedimentación en gradientes con

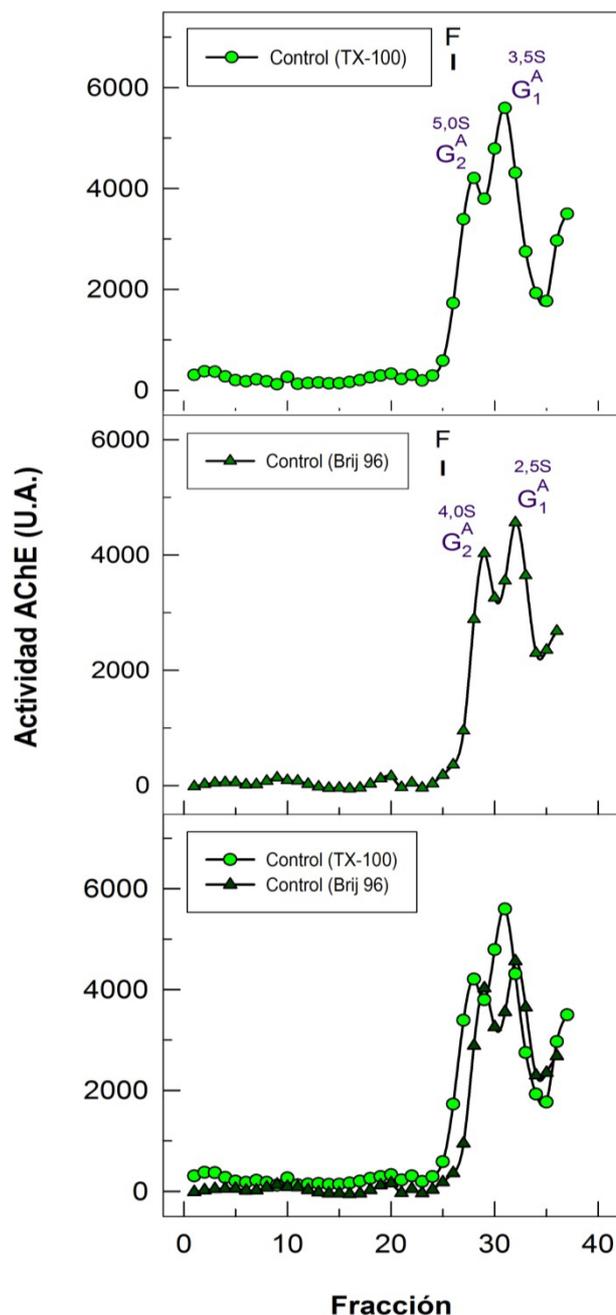


Figura III.12. Formas moleculares de AChE en células Caco-2. Tras obtener el lisado celular mediante tampón de lisis, las formas moleculares de AChE se resolvieron en gradientes continuos de sacarosa (5-20%), conteniendo Triton X-100 o Brij 96 (0,5% p/v). Los coeficientes de sedimentación de las moléculas de AChE se calcularon por referencia al marcador de sedimentación, fosfatasa alcalina de intestino bovino (F, 6,1S). En la figura se muestran los perfiles de sedimentación para las células sin tratamiento.

Brij 96 (Montenegro y col., 2006). Aunque no hemos tratado la AChE de Caco-2 con PIPLC, es muy previsible que sean sensibles a la enzima.

Conviene destacar que en muchos tejidos periféricos (distintos del tejido nervioso y muscular) las formas moleculares de AChE que predominan son los dímeros y monómeros (Campoy y col., 2016; Montenegro y col., 2014). De hecho, las formas ligeras son las formas únicas o mayoritarias de AChE en muestras humanas de mama (Ruiz-Espejo y col., 2002), riñón (Muñoz-Delgado y col., 2010), pulmón (Martínez-Moreno y col., 2006), epitelio respiratorio superior (Castillo-González y col., 2015) y meningioma (Sáez-Valero y Vidal, 1995), además de en colon; así como en líneas celulares de cánceres de mama y pulmón (Martínez-López de Castro y col., 2008). También son las formas predominantes en hígado, timo y bazo de ratón (Gómez y col., 2000; Nieto-Cerón y col., 2004; 2005). La mayoría de estas moléculas ligeras, si es que no todas, contienen GPI (Campoy y col., 2016; Montenegro y col., 2014), como demuestra el cambio en coeficiente tras el tratamiento con PIPLC observado para la enzima de mama (Ruiz-Espejo y col., 2002), riñón (Muñoz-Delgado y col., 2010) y meningioma (Sáez-Valero y Vidal, 1995).

El carbacol no produjo un cambio en el patrón de formas moleculares de AChE, ya que las células tratadas sólo contenían moléculas G_1^A y G_2^A , en similar proporción (**Fig. III.13.A**). Estas moléculas cambiaban su coeficiente de sedimentación en función del detergente (**Fig. III.13.C**), del mismo modo que las formas de las células control. Por tanto, el agonista aumentaba la actividad AChE sin producir la aparición de nuevas formas, lo que hubiera sugerido un cambio en el patrón de splicing del mRNA. Ya hemos comentado que las moléculas en Caco-2 están formadas por subunidades AChE-H, como las de colon y otros tejidos periféricos. Si se produjeran subunidades AChE-R en las células tratadas, se hubieran observados monómeros hidrofílicos G_1^H , ya que estas subunidades permanecen como monómeros al carecer de cisteína en su región C-terminal (Grisaru y col., 1999b). La aparición de formas asimétricas o tetraméricas habría indicado sin lugar a dudas la síntesis de subunidades AChE-T, aunque en ausencia de subunidades PRiMA o ColQ fácilmente habrían sido secretadas. Por tanto, pensamos que el carbacol eleva la actividad AChE aumentando la producción de subunidades AChE-H.

Como sucede con el carbacol, el tratamiento de las células con el inhibidor BW tampoco modificó el perfil de sedimentación, aparte de aumentar la cantidad de las

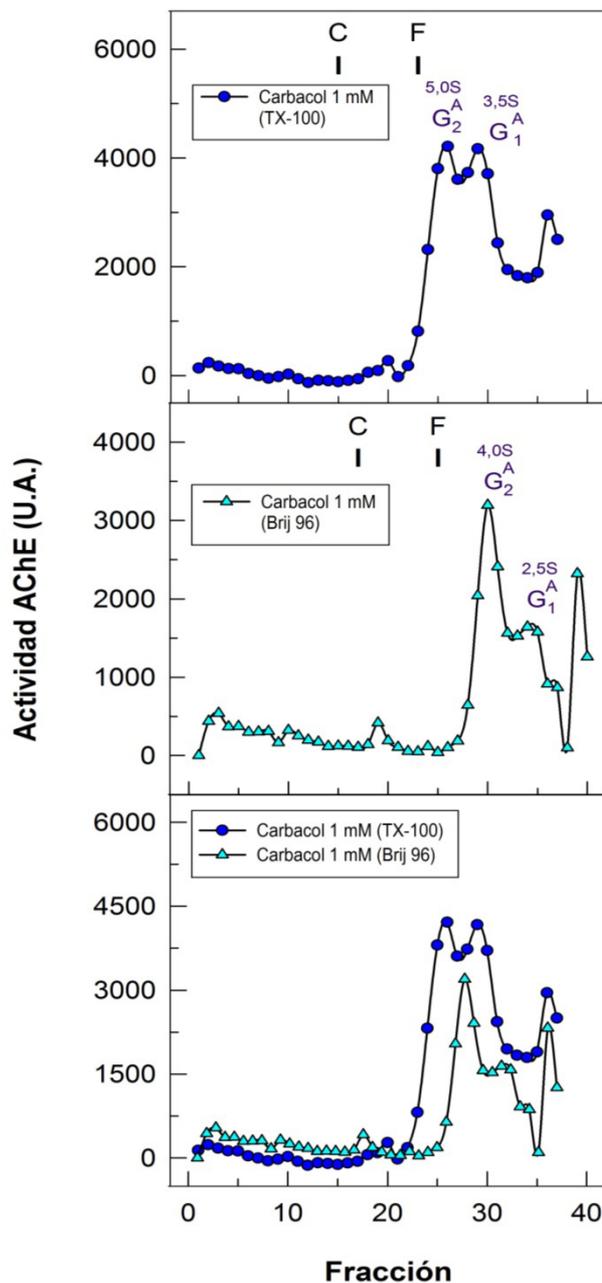


Figura III.13. Formas moleculares de AChE en células Caco-2 tratadas con carbacol. Las células se incubaron sin y con carbacol 1 mM, 24 h. Tras obtener el lisado celular, las formas moleculares de AChE se separaron en gradientes de sacarosa (5-20%), conteniendo TX-100 o Brij 96 (0,5% p/v). Los coeficientes de sedimentación se calcularon por referencia a la migración en el gradiente del marcador, fosfatasa alcalina (F, 6,1S). Se muestran los perfiles de sedimentación para las células tratadas con carbacol de un experimento distinto al mostrado en la Figura III.12.

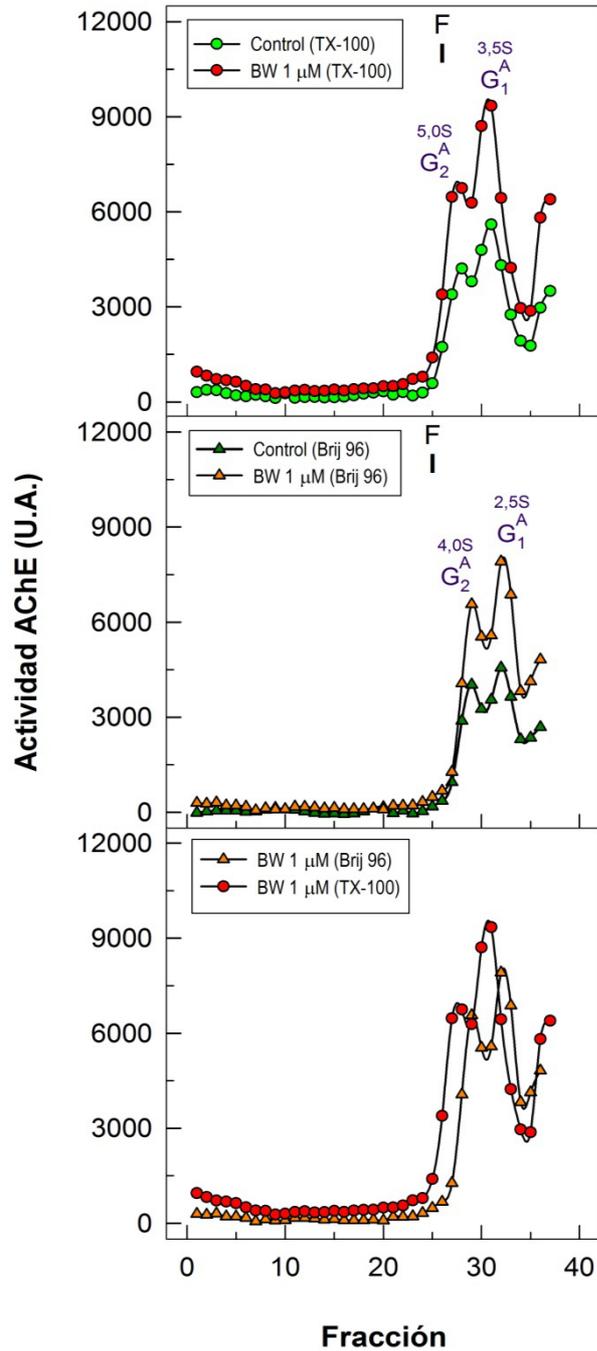


Figura III.14. Formas moleculares de AChE en células Caco-2 tratadas con BW284c51. Las células se incubaron sin y con BW 1 μM durante 24 h, y se lisaron. Las formas moleculares de AChE se resolvieron en gradientes de sacarosa (5-20%), conteniendo TX-100 o Brij 96 (0,5% p/v). Los coeficientes de sedimentación se calcularon por referencia al marcador, fosfatasa alcalina (F, 6,1S). En la figura se comparan los perfiles de sedimentación de la AChE de células tratadas o no con BW284c51.

dos formas, G_1^A y G_2^A (**Fig. III.14**). La comparación de los gradientes con Triton o Brij revela que no aparecen formas G_1^H a consecuencia del tratamiento (**Fig. III.14.C**).

Como era de esperar, tampoco aparecieron tetrámeros ni formas asimétricas. En cambio, en el caso del tratamiento con BW la aparición de monómeros hidrofílicos G_1^H , fruto del mRNA-R, no hubiera sido inesperada, ya que diversos estudios han mostrado aumentos en los niveles del mensajero R tras el tratamiento con inhibidores de AChE, tales como piridostigmina (Kaufer y col., 1998), DFP (Meshorer y col., 2002; Livneh y col., 2010; Shapira y col., 2000), o soman (Perrier y col., 2005). Aunque hay que aclarar que estos estudios en general se limitan a cerebro, son en vivo, y observan sólo cambios a nivel de mRNA y no de actividad o proteína. Además, el aumento de AChE-R sólo se da en ciertas zonas del cerebro, e incluso depende de la estirpe de ratón (Perrier y col., 2005; Livneh y col., 2010). En resumen, el análisis de sedimentación indica que el aumento de actividad AChE por carbacol o BW no conlleva un cambio en el patrón de splicing.

6. ENSAYO PARA CÉLULAS APOPTÓTICAS CON HOECHST

El aumento en el contenido en AChE durante la apoptosis es un fenómeno bien establecido, que se ha observado en un gran número de tipos celulares, incluyendo células de colon (Deng y col., 2006), y tras estímulos apoptóticos muy diversos (Zhang y Greenberg, 2012; Campoy y col., 2016) (**apdo. I.5.1.2**). Es más, la AChE puede jugar un papel favorecedor de la apoptosis. Aunque la medida de células viables con MTT ya nos indicaba que el carbacol no produce apoptosis en un número significativo de células (**Fig. III.1.B**), cabía la posibilidad de que un número muy bajo de células entrara en apoptosis, aumentara mucho su contenido en AChE, y fueran ellas las responsables del aumento de actividad por carbacol.

Para investigar si el aumento de actividad AChE tras el tratamiento con carbacol iba asociado a un aumento en la apoptosis, se realizaron experimentos de tinción con Hoechst en células control y tratadas (**Fig. III.15**). El Hoechst es un reactivo que se une al DNA, y es permeable a la membrana de modo que puede teñir el DNA en células vivas o fijadas. Sirve para teñir los núcleos, y se usa frecuentemente para distinguir los núcleos condensados de las células apoptóticas (Zhu y col., 2007a). Como control positivo de apoptosis se empleó etopósido, un inhibidor de topoisomerasa II que induce apoptosis en las células de colon (Deng y col., 2006; Talavera-Gutiérrez A., 2010). Las células control y las tratadas con carbacol 1 mM

fueron indistinguibles en la tinción con Hoechst (**Fig. III.15.A y B**). Los núcleos aparecen teñidos de un color azul no muy intenso, bastante homogéneo. En ambos casos se observan frecuentes mitosis, que aparecen unas veces como dos grupos de cromosomas cercanos y de similar tamaño, más brillantes por la condensación de la cromatina (flechas verdes). Otras veces una mitosis se ve como un anillo azul (flechas amarillas). Las mitosis indican que las células continúan proliferando, no apreciándose diferencias en el número de mitosis entre células control y las tratadas con carbacol.

En cambio, en las células tratadas con etopósido (**Fig. III.15.C y D**), los núcleos muestran un azul más brillante, y frecuentes granos de azul aún más intenso. Debe aclararse que todas las imágenes de la figura corresponden a un mismo experimento, con idéntica tinción y condiciones de fotografía. Las células con etopósido no presentan mitosis, y algunas muestran núcleos ya desintegrados, en forma de granos azules sueltos (flechas rojas), lo que no se vió en células tratadas con carbacol. La apariencia de las células con etopósido indica condensación nuclear y fragmentación del DNA, como corresponde a células en apoptosis (Zhu y col., 2007a; Cheng y col., 2004; Du y col., 2015).

Por tanto, podemos concluir que la incubación con carbacol 1 mM no produce apoptosis en las células Caco-2, de modo que la sobrerregulación de AChE por el carbacol no se debe a la inducción de apoptosis. En la **Fig. III.16** se muestra la imagen de contraste de fases de estos mismos campos.

7. TINCIÓN HISTOCITOQUÍMICA DE AChE

El aumento de actividad AChE provocado por carbacol podía ser un fenómeno que afectara de modo similar a todas las células tratadas, o bien deberse a que una parte de las células tuvieran una expresión muy alta, debido por ejemplo a un diferente estado de diferenciación. Por otra parte, nos preguntamos dónde se localizaba la AChE “inducida” por el carbacol. Para abordar estas cuestiones, decidimos emplear la técnica histocitoquímica de Karnovsky y Roots para AChE (**apdo. II.2.9**). Tras fijar las células con formaldehído, se añadió la disolución de tinte sin o con BW, para comprobar que la hidrólisis del sustrato (acetiltiocolina) se debía a AChE y no a otra esterasa.

Las **Figuras III.17 y III.18** muestran ejemplos de los resultados obtenidos, fotografiados a dos aumentos distintos. El precipitado marrón de ferrocianuro de cobre que indica la presencia de actividad AChE es mucho más abundante en las células

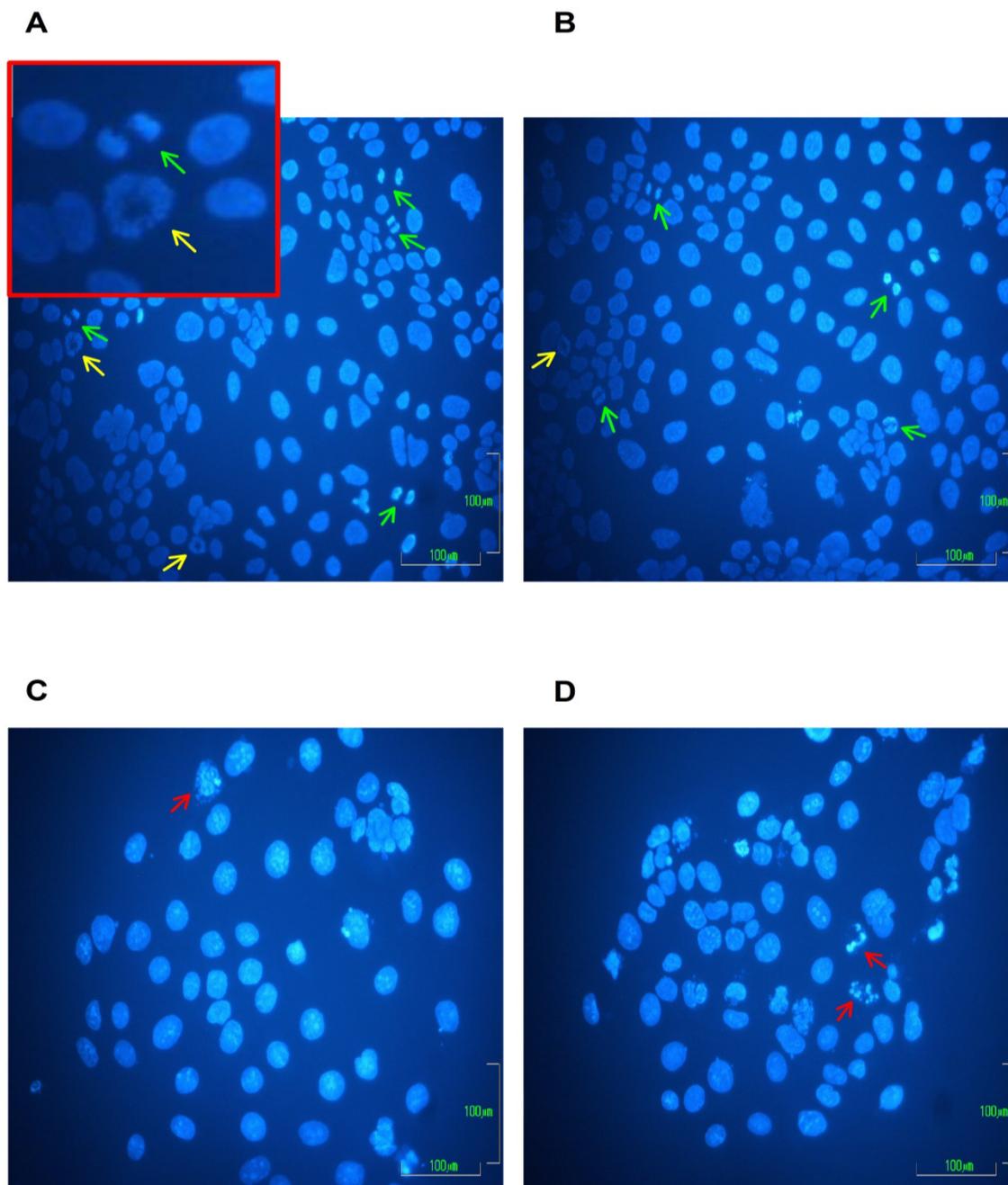


Figura III.15. Tinción de células Caco-2 con el colorante Hoechst. El Hoechst se une a la DNA y emite fluorescencia azul. Las flechas de color verde indican células en mitosis, las flechas en amarillo señalan mitosis en plano transversal y las flechas rojas muestran células en apoptosis avanzada. Imágenes tomadas con el objetivo de 20x. **A)** Células no tratadas con carbaccol ni etopósido (control). En el recuadro rojo, se muestra una sección de dos células en mitosis, una de ellas en plano transversal (flecha amarilla). **B)** Células tratadas con carbaccol 1 mM. **C)** Células tratadas con etopósido 25 µM. **D)** Células tratadas con etopósido 100 µM.

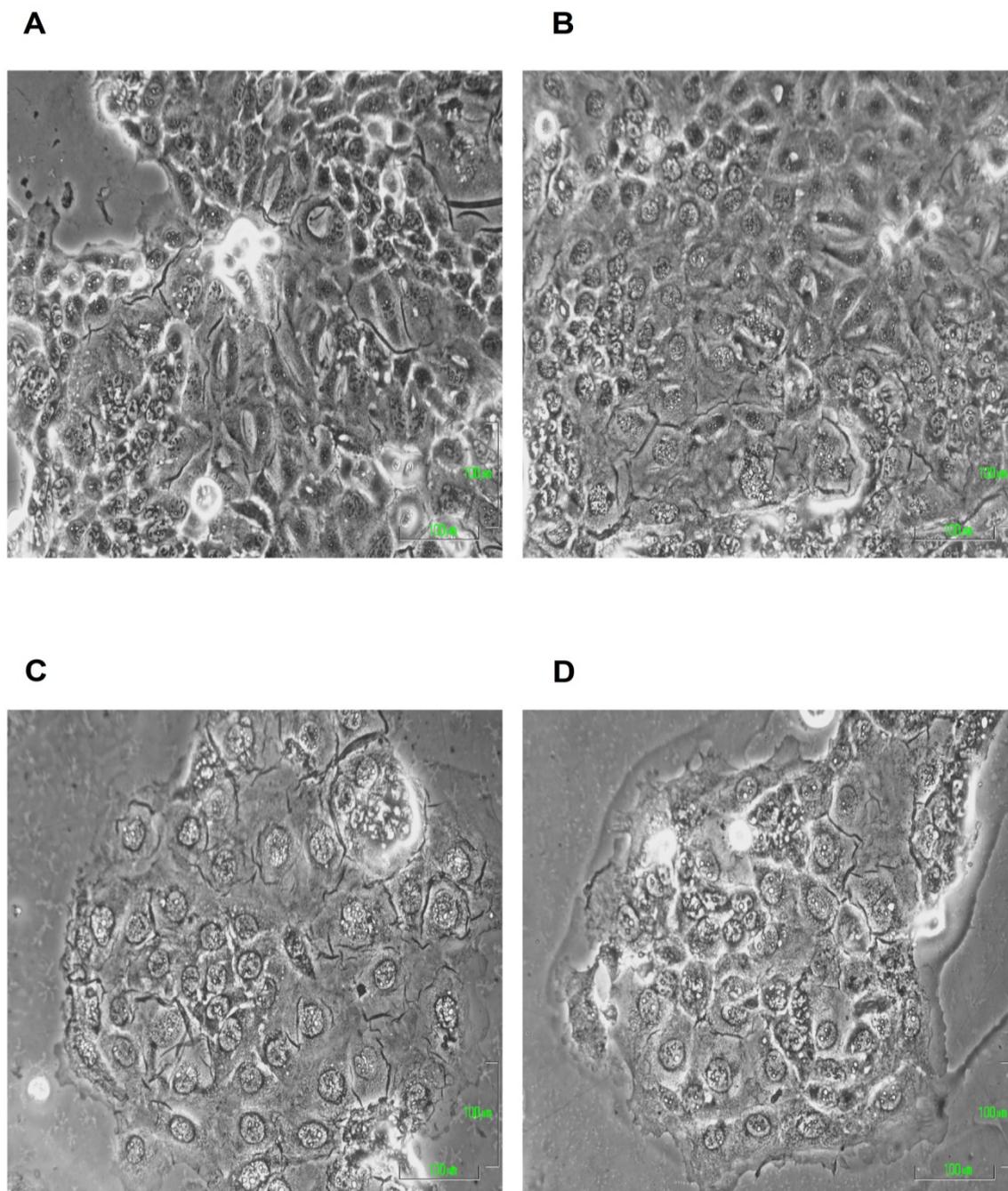


Figura III.16. Fotos de microscopía por contraste de fases de células Caco-2. Imágenes tomadas con el objetivo de 20x. Las fotos corresponden a las mismas células que se muestran para la tinción con Hoechst. **A)** Células control. **B)** Células tratadas con carbaccol 1 mM. **C)** Células tratadas con etopósido 25 µM. **D)** Células tratadas con etopósido 100 µM.

tratadas con carbacol (**Figs. III.17.B y III.18.B**) que en los controles (**Figs. III.17.A y III.18.A**). El precipitado no se formó cuando la disolución de tinte contenía BW (**Figs. III.17.C y D y Figs. III.18.C y D**), demostrando que la señal era específica de AChE.

Se observa que en las células tratadas con carbacol, todas las células tienen alta actividad AChE. Ello es una prueba más de que la mayor actividad AChE no se debe a un número muy pequeño de células en apoptosis (deberían ser muy pocas células para no afectar a la medida de células viables por MTT ni ser observadas por tinción con Hoechst), que expresaran muy alta actividad. Por otra parte, el precipitado marrón está más concentrado en la zona perinuclear, lo que sugiere que hay abundante enzima localizada en el retículo endoplásmico. También hay actividad distribuida por toda la célula, que muy probablemente corresponde a enzima de la membrana plasmática. No debe concluirse que la mayoría de AChE se localiza en el retículo, sino que en el retículo la concentración local de enzima es mayor; además es probable que el ferrocianuro de cobre que se forme extracelularmente tenga más fácil difundir al medio -que queda coloreado- y por ello la actividad de la membrana plasmática dé menos señal.

8. EFECTO DE OTROS AGONISTAS SOBRE LA AChE DE CACO-2

8.1. Acetilcolina

Con el fin de conocer el mecanismo subyacente a la acción sobrerreguladora de AChE que muestran el carbacol y el BW, se hicieron ensayos con diferentes agonistas y antagonistas de los receptores muscarínicos y nicotínicos, para intentar identificar farmacológicamente el receptor o receptores implicados.

En primer lugar quisimos comprobar si el ligando natural común a ambos tipos de receptores, la acetilcolina, tenía también un efecto “inductor”. Para ello las células Caco-2 se expusieron a ACh durante 24 horas, y se midió su actividad AChE. Dado que la ACh iba a ser hidrolizada paulatinamente por la AChE de las células, el tratamiento se hizo en ausencia y en presencia del inhibidor BW, de modo que en las células con BW la concentración de ACh se mantuviera constante. Es habitual usar un inhibidor de AChE cuando se quiere estudiar el efecto de la ACh sobre células en cultivo.

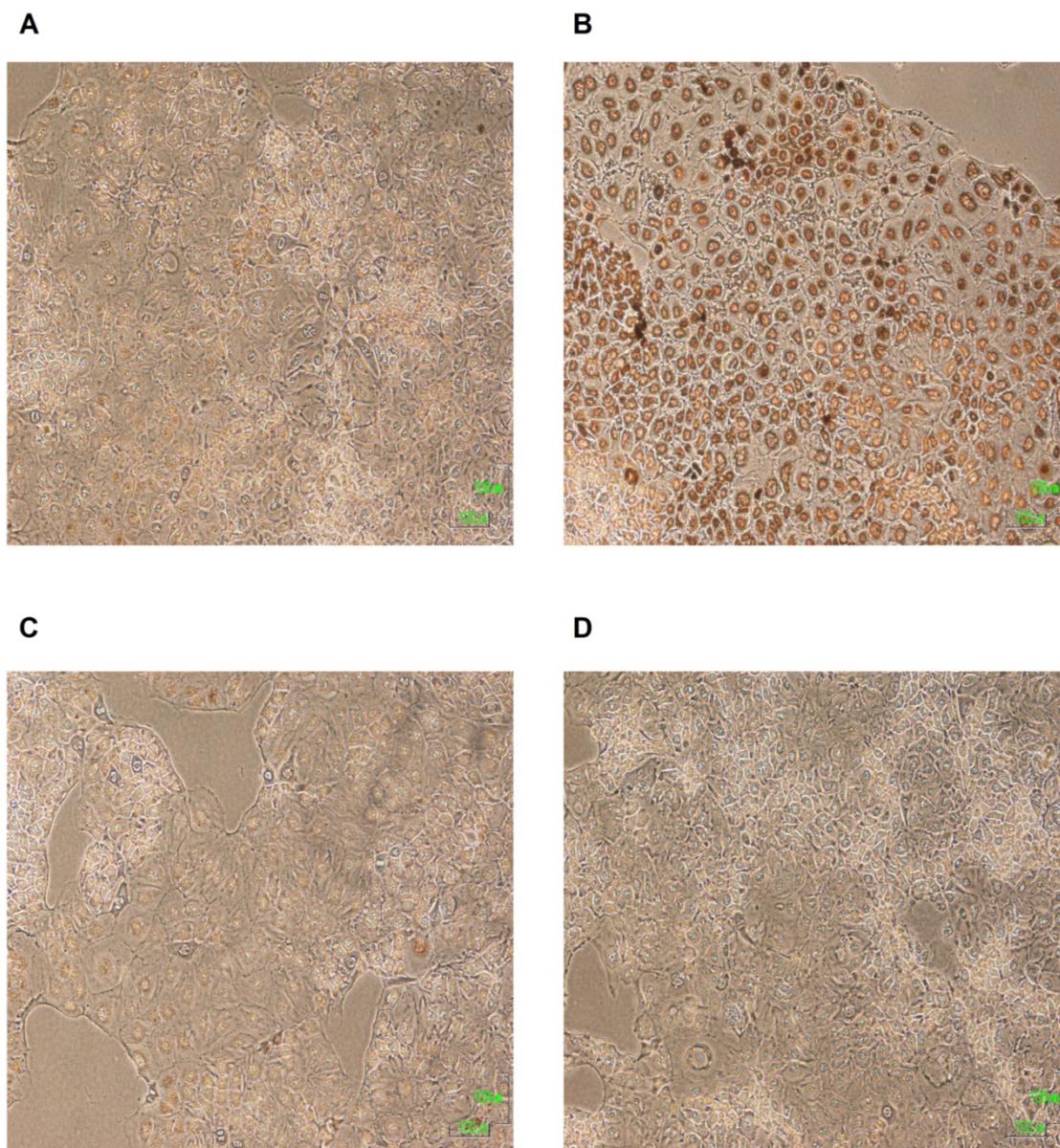


Figura III.17. Tinción histocitoquímica de AChE en células Caco-2. Las células se trataron con carbacol (1 mM) y tras 24 h de tratamiento, se fijaron con formaldehído al 1,5%, y se incubaron 24 h con el reactivo de Karnovsky sin o con BW284c51. Imágenes tomadas con el microscopio óptico invertido con el objetivo de 10x. **A y C)** Células sin tratar con carbacol (control). **B y D)** Células tratadas con carbacol. **A y B)** Incubación con reactivo de Karnovsky sin BW. **C y D)** Incubación con reactivo de Karnovsky con BW.

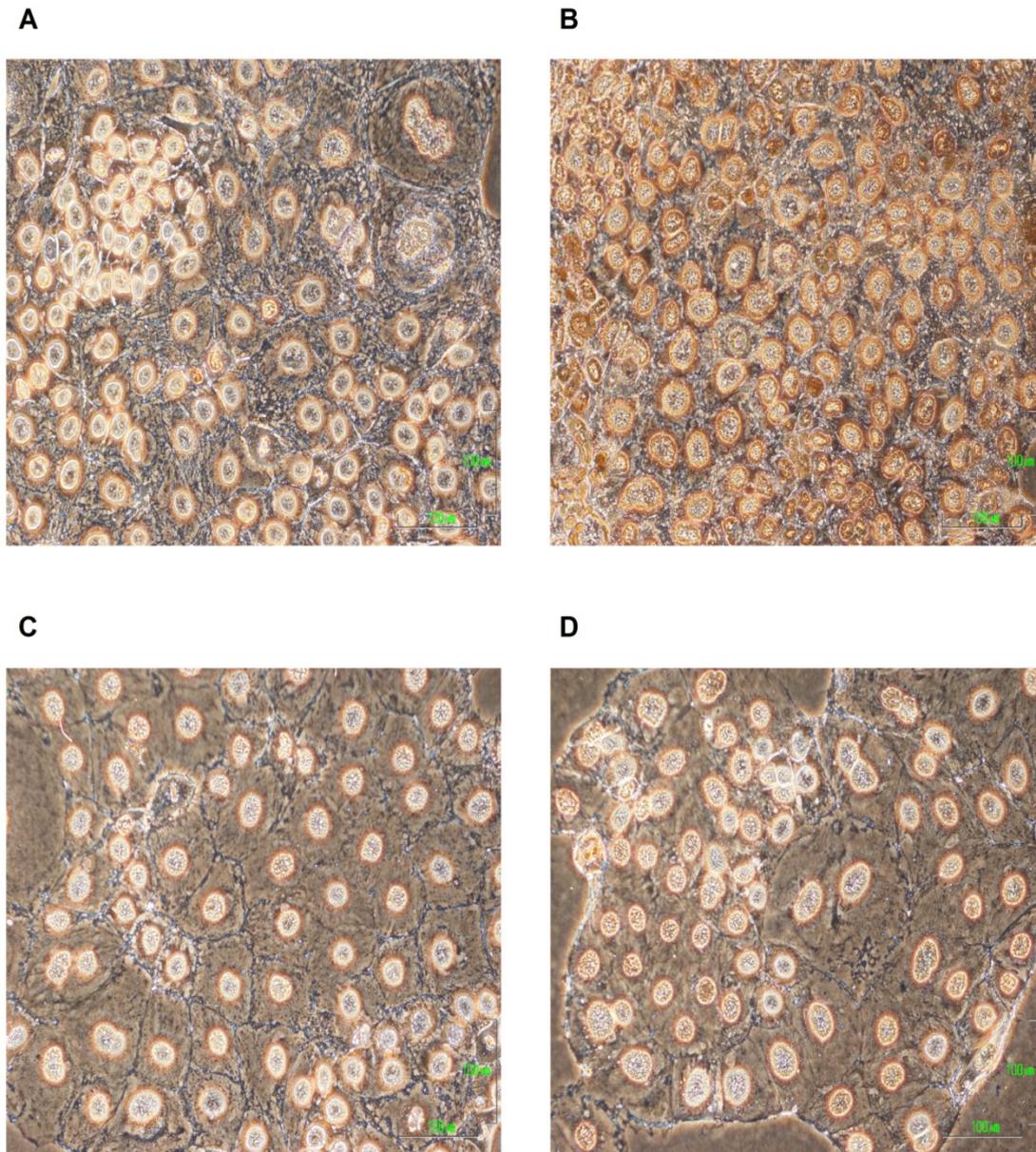


Figura III.18. Tinción histocitoquímica de AChE en células Caco-2. Imágenes tomadas con el microscopio óptico invertido con el objetivo de 20x. **A y C)** Células sin tratar con carbacol (control). **B y D)** Células tratadas con carbacol. **A y B)** Incubación con reactivo de Karnovsky sin BW. **C y D)** Incubación con reactivo de Karnovsky con BW.

En la **Figura III.19** se observa que la ACh produce un importante aumento de la actividad AChE de las células Caco-2, tanto en ausencia como en presencia de BW. El efecto es dependiente de la concentración, ya que la actividad aumentó x3,5 veces

con ACh 0,2 mM, y x6,9 veces con ACh 0,5 mM, en ausencia de BW. En presencia de BW, al efecto inductor de la ACh se suma el gran efecto inductor del BW. Por ello y para facilitar la comparación, en la **Figura III.19.A** se muestran los porcentajes de actividad respecto al control sin ACh ni BW (columna 1), mientras que en la **Figura III.19.B** los porcentajes se calculan respecto a los pocillos sin ACh (columnas 1 y 4), sin o con BW según corresponda. Podemos ver que el efecto de la ACh en términos absolutos de actividad AChE (aumento de unidades) es muy superior en presencia de BW, al no ser el agonista hidrolizado por la enzima (**Fig. III.19.A**). No obstante, con BW el porcentaje de aumento respecto al control sin ACh (columna 4) es menor, por el gran aumento de actividad por el BW (**Fig. III.19.B**). También en presencia de BW el efecto fue mayor a mayor concentración de agonista, por tanto la dependencia de la concentración vista sin BW no se debía simplemente a que a mayor concentración de ACh la enzima tardaba más en hidrolizarla.

En ausencia de BW, al menos parte de la ACh será hidrolizada por la AChE. Que, aún así, se produzca un gran aumento de la actividad AChE podría sugerir que la ACh presente al principio es suficiente para disparar este efecto, aunque luego su concentración disminuya. Cabe pensar también que la ACh se hidrolice rápidamente, y que el efecto se deba no directamente a la ACh sino a la colina liberada, ya que la colina es agonista de los receptores nAChR $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ (Albuquerque y col., 2009). No obstante, aunque eso pueda estar ocurriendo, los pocillos con BW muestran que no es necesario que la ACh se hidrolice para que ejerza su acción.

A la vista del efecto del carbacol, cabía esperar que el ligando natural de los AChR, la acetilcolina, con una estructura parecida, mostrara un alto efecto sobrerregulador de AChE, comparable al del carbacol. Una vez comprobado el efecto de ACh, se refuerza nuestra hipótesis de que existe un mecanismo regulador de los niveles de AChE en respuesta a una exposición prolongada de los AChR a agonistas.

8.2. Un agonista muscarínico: oxotremorina M

A continuación probamos con agonistas que distinguen entre receptores muscarínicos y nicotínicos. La oxotremorina M (OxoM) es un agonista muscarínico, no específico de un subtipo concreto de mAChR (Daigle y Caron, 2012; Liu y col., 2009; Oldfield y col., 2009). El tratamiento de las células Caco-2 con concentraciones crecientes de OxoM demostró que el agonista era capaz de elevar la actividad AChE de un modo concentración-dependiente (**Figura III.20**). Así, el efecto se observa ya con OxoM 0,1 mM (x2,0 veces), alcanzándose para OxoM 1 mM un aumento

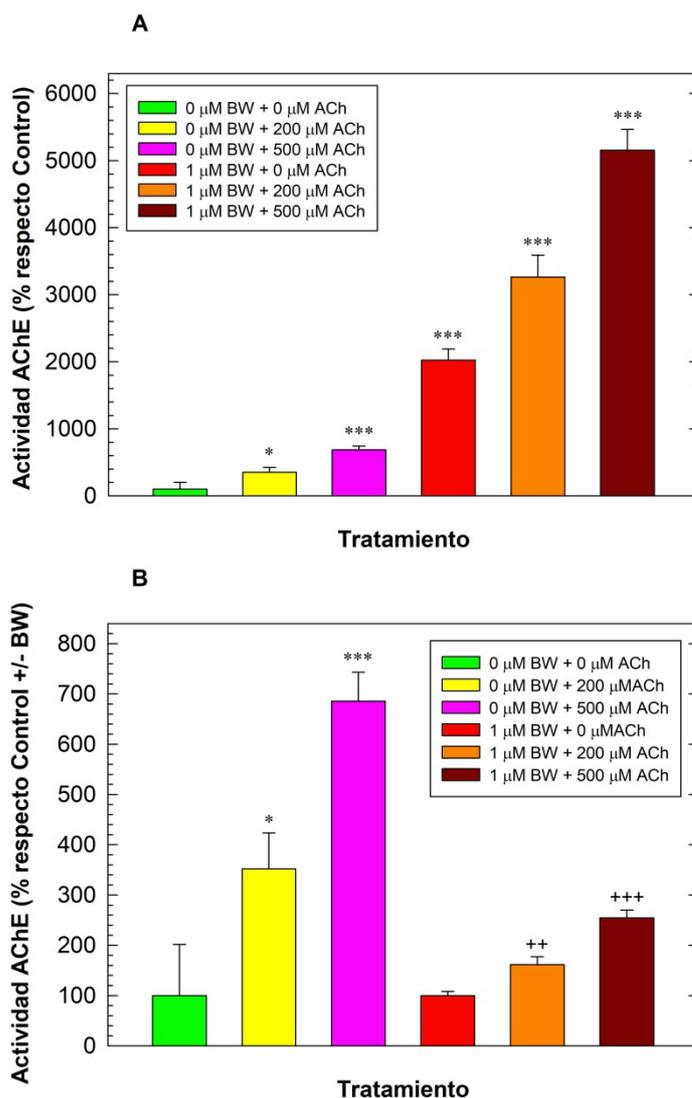


Figura III.19. Efecto de la acetilcolina sobre la actividad AChE de células Caco-2. Las células se trataron con ACh en presencia o ausencia de BW y a las 24 h se lisaron y se midió su actividad AChE. En la figura **A**) se muestra la actividad AChE en % respecto al control (sin ACh y sin BW). En la **B**) se muestra la actividad AChE en % respecto al control sin ACh, pero sin o con BW según corresponda. (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ comparando con el control sin ACh ni BW; ++: $p < 0,005$, +++: $p < 0,001$ comparando con su control sin ACh pero con BW).

de actividad de x5,8 veces en el experimento mostrado (**Figura III.20.B**). No obstante, el efecto máximo de OxoM fue menor al logrado con carbacol en el mismo experimento, lo que podría explicarse porque el carbacol actúe sobre receptores

nicotínicos y muscarínicos. En presencia del antagonista muscarínico atropina, el efecto de la OxoM en alta concentración (1 mM) pareció disminuir aunque muy ligeramente (**Figura III.20.C**). Estos resultados indican la participación de receptores muscarínicos en la sobrerregulación de AChE por agonistas colinérgicos.

8.3. Agonistas nicotínicos: nicotina y colina

La nicotina es el clásico agonista selectivo para los receptores nicotínicos, aunque la afinidad varía mucho con el tipo de receptor, siendo mucho mayor la de los receptores $\alpha 4\beta 2^*$ que la de los $\alpha 7$ o los musculares (Albuquerque y col., 2009; Schuller, 2009). Los ensayos con nicotina revelaron que el agente eleva la actividad AChE de las células Caco-2, observándose un aumento del 35% con nicotina 500 nM, y un menor aumento con una concentración mayor de nicotina (**Fig. III.21**). Por tanto, concluimos que los receptores nicotínicos también están implicados en la sobrerregulación de AChE por agonistas. No obstante, el efecto de la nicotina fue mucho menor que el que produce el carbacol.

Probamos seguidamente otro agonista nicotínico, la colina. Este ligando natural tiene una acción variable sobre distintos tipos de nAChR, de modo que se comporta como agonista completo de los nAChR $\alpha 7$, como agonista parcial de los $\alpha 3\beta 4\beta 2$, y como no agonista de los $\alpha 4\beta 2$ (Albuquerque y col., 2009). La colina 1 mM aumentó un 70% la actividad AChE de las células Caco-2 (**Fig. III.22**), produciendo menores aumentos a concentraciones más bajas. Este dato confirma la participación de los receptores nicotínicos en el efecto sobrerregulador del carbacol. También apunta a los nAChR $\alpha 7$ como uno de los tipos implicados, considerando que la colina actúa como agonista sobre ellos, y la presencia de mRNA para $\alpha 7$ en las células Caco-2 aunque sea en un nivel muy bajo (**apdo. III.10.1**).

Los resultados con agonistas indican que la activación tanto de los mAChR (con OxoM) como de los nAChR (con nicotina o colina) produce un aumento de la actividad AChE, lo que a su vez sugiere que el carbacol produce su acción sobrerreguladora de AChE en Caco-2 actuando simultáneamente sobre ambos tipos de receptores.

También el BW actuaría mediante ambos tipos de receptores, si asumimos que debe su acción al aumento de los niveles de la ACh producida por las propias células. La acción conjunta sobre receptores mAChR y nAChR probablemente contribuye a que el efecto del carbacol y el BW sea superior al observado para OxoM, nicotina o colina.

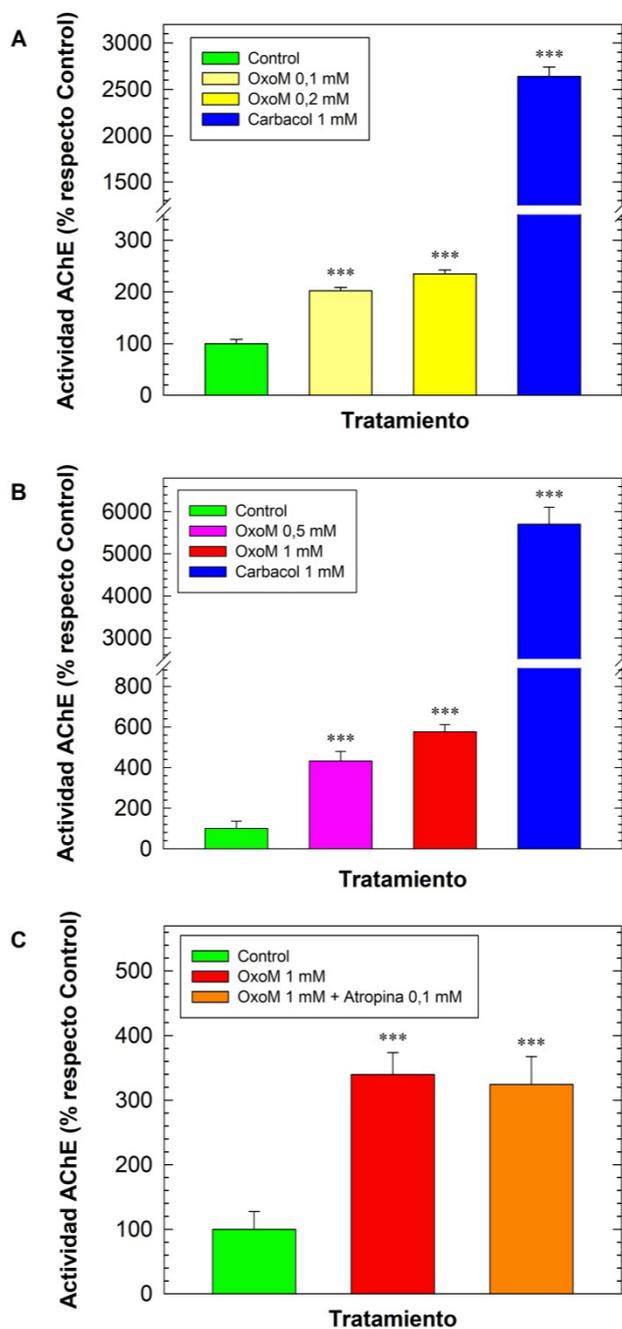


Figura III.20. Efecto de la oxotremorina M sobre la actividad AChE de células Caco-2. Las células se trataron con distintas concentraciones de oxotremorina M (OxoM) o con carbacol. Tras 24 h de incubación se midió la actividad AChE. En las figuras **A)** y **B)** se aprecia el aumento de actividad por la OxoM, mientras que en la figura **C)** se observa el efecto de la atropina sobre la actividad AChE en presencia de oxotremorina. En este caso, las células se preincubaron con atropina 1 h antes de añadir la OxoM. (***: $p < 0,001$ comparando con el control).

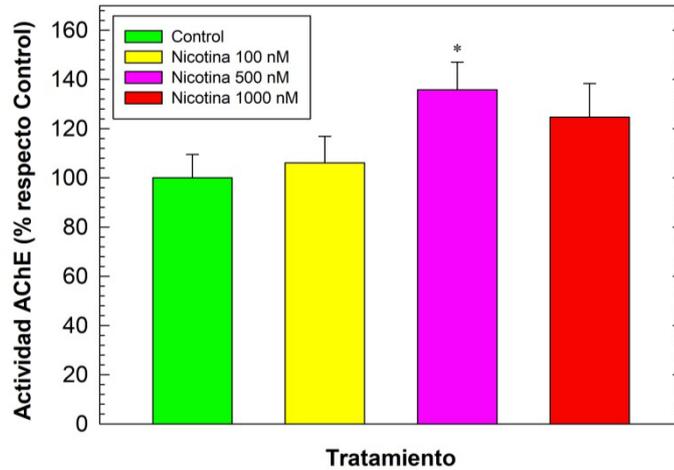


Figura III.21. Efecto de la nicotina sobre la actividad AChE de células Caco-2. Las células se trataron con distintas concentraciones de nicotina y se midió su actividad AChE a las 24 h. En la figura se muestra la actividad AChE en % respecto al control (*: $p < 0,05$ comparando con el control).

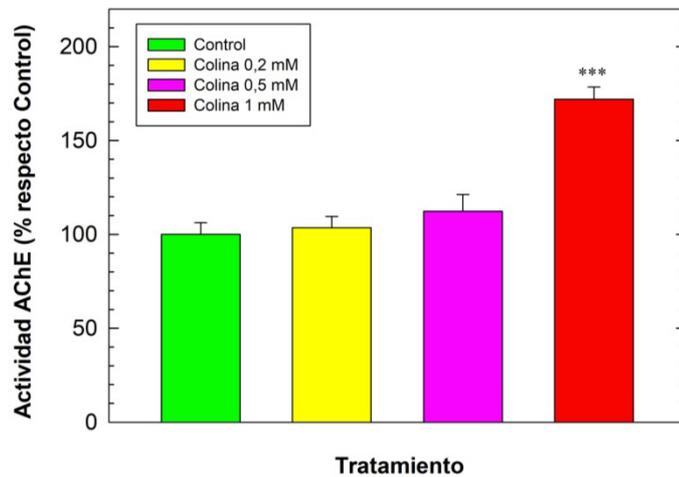


Figura III.22. Efecto de la colina sobre la actividad AChE de células Caco-2. Las células se trataron con colina y se midió su actividad AChE a las 24 h. En la figura se muestra la actividad AChE en % respecto al control, de las células tratadas con colina 0,2, 0,5 y 1 mM (***: $p < 0,001$ comparando con el control).

9. EFECTO DE ANTAGONISTAS SOBRE LA AChE DE CACO-2

9.1. Un antagonista muscarínico: atropina

Siguiendo con el abordaje farmacológico de la identificación de posibles receptores implicados, probamos si distintos antagonistas colinérgicos podían reducir el efecto de carbacol y BW sobre la actividad AChE. Los agentes empleados fueron atropina, como antagonista muscarínico, y hexametonio, mecamilamina y metillicaconitina, como antagonistas nicotínicos.

La atropina es el antagonista clásico de los receptores muscarínicos, y no discrimina los distintos subtipos de mAChR (Kawashima y col., 2012; Pettersson y col., 2009a). Se ha usado a 10 μ M en células de colon en tratamientos de varios días (Cheng y col., 2008). La atropina 10 μ M redujo de modo notable el aumento de actividad AChE producido por el BW 1 μ M, pero no el que produjo el carbacol 1 mM (**Fig. III.23**). El efecto inhibitor de la atropina confirma la participación de los receptores muscarínicos en la sobrerregulación de AChE, como ya nos indicó el efecto de la OxoM. El que la inhibición por atropina se observe para el BW, pero no para el carbacol 1 mM, puede explicarse por el hecho de que la atropina es un antagonista competitivo, y es probable que no sea capaz de impedir suficientemente la unión del carbacol, que está en una concentración mucho mayor, máxime cuando los tiempos de tratamiento son largos como en nuestros ensayos (1 día en este ejemplo). Una explicación alternativa es que el carbacol actúe en las Caco-2 mediante receptores tanto muscarínicos como nicotínicos, de forma que, en presencia de atropina, la activación de los receptores nicotínicos sea suficiente para producir el efecto máximo.

9.2. Antagonistas nicotínicos: hexametonio, mecamilamina y metillicaconitina

A la hora de elegir antagonistas de distintos receptores nicotínicos, nos encontramos con ciertas dificultades. Por una parte, aunque se dispone de agentes con distintas especificidades por subtipos de nAChR, la selectividad normalmente no es total, sino que un antagonista (o agonista) muestra un rango de afinidades por distintos subtipos (Gotti y col., 2006; Albuquerque y col., 2009). Por otro lado, frente a los 5 tipos de mAChR, hay muchos subtipos de nAChR. Tal variedad no sólo depende de los tipos de subunidades que contienen sino también de su estequiometría, lo que afecta a sus propiedades farmacológicas. Por ejemplo, la afinidad por ciertos agonistas es baja para los receptores $\alpha_3\beta_2$ y alta para los $\alpha_4\beta_3$ (Kuryatov y col., 2005; Wu y Lukas, 2011). Obviamente, es difícil saber qué tipo particular de receptor

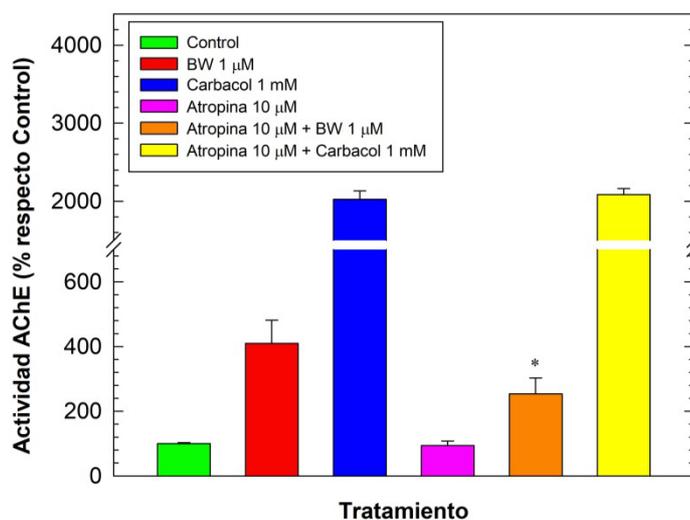


Figura III.23. Efecto de la atropina sobre la actividad AChE de células Caco-2 tratadas con BW284c51 o carbacol. Las células se trataron con atropina y/o BW (1 μ M) o carbacol (1 mM). A las 24 horas las células se lisaron y se midió su actividad AChE. (*: $p < 0,05$ respecto a BW sin atropina).

predomina en una célula. Como consecuencia, los datos de distintos trabajos son a veces contradictorios, en cuanto a la selectividad de los diversos antagonistas (y agonistas) por subtipos concretos de nAChR. Por otra parte, el elevado coste de los agentes sólo nos permitió probar un número limitado de ellos.

Como antagonista general de los nAChR escogimos el hexametonio, un antagonista no competitivo y relativamente no selectivo de los nAChR, que bloquea tanto los receptores de tipo muscular como diversas combinaciones de subunidades de tipo neuronal (Wonnacott, 2014). El hexametonio se usa en concentraciones de hasta 0,1 mM para bloquear los nAChR de tipo neuronal *in vitro*, por ejemplo en células HT-29 de colon (Pettersson y col., 2009a). Tiene dos grupos trimetilamonio con carga positiva que limitan mucho su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que en vivo normalmente sólo bloquea los receptores ganglionares, aunque actúa sobre los cerebrales si se inyecta en el cerebro (Wonnacott, 2014).

La incubación con hexametonio 100 μM no redujo el aumento de actividad AChE provocado por carbacol 1 mM o BW 1 μM (**Fig. III.24**). De hecho, la actividad AChE pareció subir mínimamente en presencia de hexametonio. Aunque este dato no apoya nuestra afirmación –basada en el efecto de nicotina y colina– de que los nAChR median el efecto “inductor” de carbacol y BW, no la descarta. Si bien hexametonio es un antagonista no competitivo, por lo que podría unirse al receptor a pesar de la presencia de carbacol o ACh, es posible que en presencia de hexametonio, la acción de carbacol y BW sobre los mAChR baste para conseguir el efecto “inductor” máximo. Por otra parte, se nos planteó la posibilidad de que el hexametonio, con dos grupos trimetilamonio, pudiera unirse al sitio aniónico de la AChE (como hace el grupo trimetilamonio de la acetilcolina), inhibiendo su actividad y aumentando la concentración de ACh en el medio de cultivo. Ello podría dar lugar a un efecto análogo al del BW. De hecho, hexametonio y BW son agentes bis-amonio cuaternario, y además sabíamos que el decametonio, similar al hexametonio salvo por su cadena central más larga, es un inhibidor de AChE que como el BW se une a la vez al centro aniónico principal y al PAS (Berman y col., 1980). En efecto, comprobamos en la bibliografía que el hexametonio también es un inhibidor reversible de AChE, aunque muy débil, con una K_i para la AChE humana de 0,2 mM, muy superior a las K_i de 6 μM del decametonio y 10 nM del BW (Barak y col., 1994), por lo que no se usa frecuentemente como inhibidor. Al ser más corto que el decametonio, se une sólo al centro activo y no al PAS.

Testamos también el posible efecto de dos antagonistas relativamente específicos de subtipos de nAChR. La mecamilamina (MEC) es un antagonista no competitivo de los nAChR, que bloquea los receptores heteroméricos (como los $\alpha 3\beta 4$) con preferencia sobre los homoméricos $\alpha 7$ (Wonnacott, 2014; Hurst y col., 2013). Concentraciones de MEC entre 10 y 50 μM son habituales para células en cultivo (Steiner y col., 2007; Kuryatov y col., 2005; Mousavi y Hellstrom-Lindahl, 2009). La metillicaconitina (MLA), en cambio, es un antagonista reversible, potente y competitivo de los nAChR $\alpha 7$, al que se une con una K_i de aprox. 1 nM (Wonnacott, 2014; Wong y col., 2007a; Steiner y col., 2007). MLA también bloquea fuertemente receptores $\alpha 9$ and $\alpha 9\alpha 10$, y más débilmente a otros tipos de receptores como los $\alpha 4\beta 2$ (Wonnacott, 2014). Por tanto, la MLA es selectiva, pero no específica, de los receptores $\alpha 7$, aunque se ha usado frecuentemente para atribuir una acción a este subtipo de nAChR (Wong y col., 2007a). Se ha usado MLA a 100 nM en células HT-29 de colon (Wong y col., 2007a) y en neuronas (Steiner y col., 2007; Mousavi y Hellstrom-Lindahl, 2009).

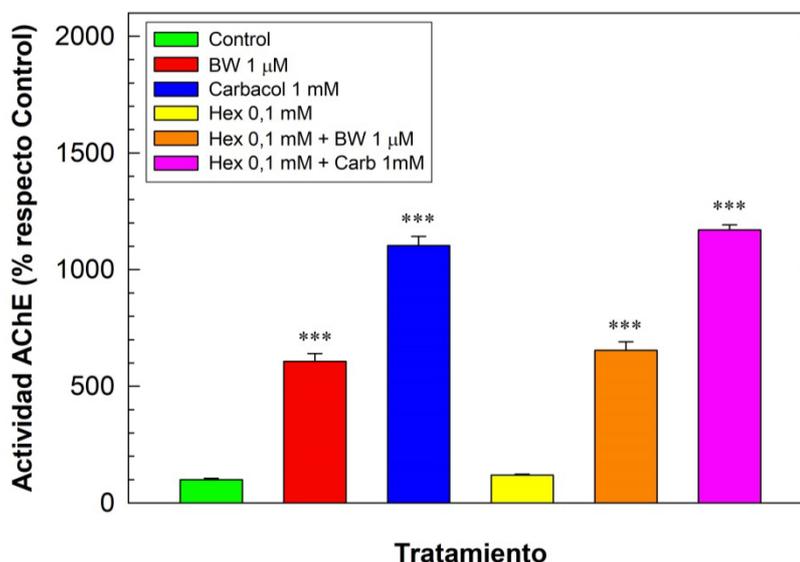


Figura III.24. Efecto del hexametonio sobre la actividad AChE de células Caco-2 tratadas con BW284c51 o carbacol. Las células se incubaron con hexametonio y/o BW284c51 o carbacol, y se midió la actividad AChE a las 24 h. (***: $p < 0,001$ comparando con el control).

Buscando inhibir el efecto del carbacol con antagonistas, en el experimento mostrado en la **Figura III.25** se redujo la concentración de carbacol a 250 μ M, para facilitar la unión de los antagonistas competitivos (atropina y MLA). Además, se probó el efecto de la atropina sola, y en combinación con los tres antagonistas nicotínicos (hexametonio, MEC y MLA), para intentar bloquear simultáneamente la acción del carbacol por receptores muscarínicos y nicotínicos. La atropina sola redujo la acción del carbacol 0,25 mM (**Fig. III.25**), a diferencia de lo que vimos con carbacol 1 mM (**Fig. III.23**), confirmándose así la intervención de receptores mAChR. Sin embargo, la combinación con antagonistas nicotínicos no mejoró el efecto inhibitor, sino al contrario (**Fig. III.25**). Esto fue inesperado, y una posible explicación sería que en las células Caco-2 la activación de diversos AChR tuviera efectos contrarios sobre la actividad AChE. Sería un caso parecido al efecto contrario de la estimulación de los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ sobre los niveles de cAMP en ciertos cánceres (Schuller, 2009). De modo similar, ni MEC ni MLA inhibieron el efecto sobrerregulador del BW (**Fig. III.26**); sólo la atropina redujo el aumento de actividad AChE por el BW.

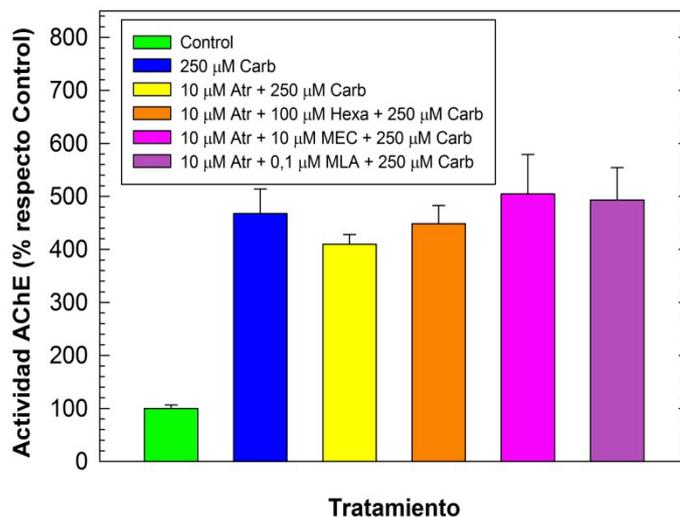


Figura III.25. Efecto de distintos antagonistas colinérgicos sobre la actividad AChE en células Caco-2 tratadas con carbacol. Las células se preincubaron con los antagonistas atropina (Atr), hexametonio (Hexa), mecamilamina (MEC) y metillicaconitina (MLA) durante 90 min antes de añadir el carbacol (250 μ M). A las 24 h se lisaron y se valoró la actividad AChE.

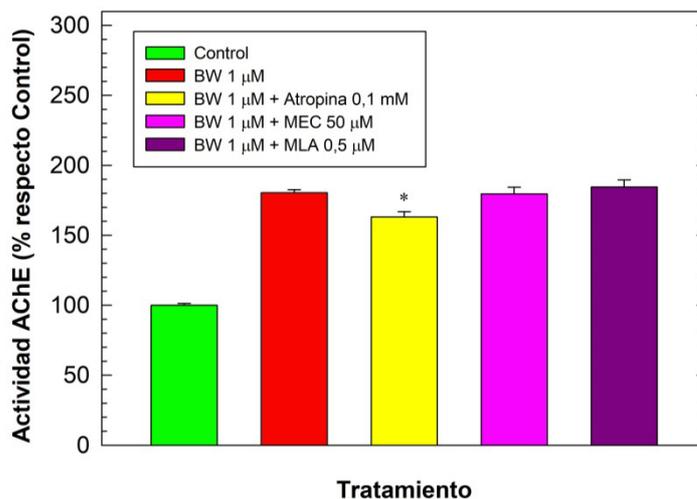


Figura III.26. Efecto de varios antagonistas colinérgicos sobre la actividad AChE de células Caco-2 tratadas con BW284c51. Las células se preincubaron con los antagonistas atropina (Atr), mecamilamina (MEC) y metillicaconitina (MLA) durante 2 h antes de añadir el BW (1 μ M). A las 24 h se lisaron y se midió la actividad AChE. (*: $p < 0,05$ respecto a BW sin atropina).

9.3. Información del estudio farmacológico de los AChR implicados

Vistos en conjunto, el efecto de los diversos agonistas apoya la idea de que la elevación de actividad AChE por el carbacol y el BW se debe a la acción tanto de receptores muscarínicos como nicotínicos, entre los que probablemente se incluyen los $\alpha 7$, sensibles a colina. De los antagonistas empleados, solo el antagonista muscarínico atropina fue capaz de reducir el efecto del carbacol y el BW, y de un modo bastante parcial. La falta de efecto de los antagonistas nicotínicos podría deberse a su variable afinidad por distintos tipos de receptor, a la competencia con el agonista (carbacol o ACh), o a que su unión no es lo bastante estable como para impedir la activación en un momento dado de una fracción de los receptores, y que esa activación sea suficiente para desencadenar el efecto sobrerregulador. Hay que tener en cuenta que los tratamientos son prolongados. A ello se añade que la activación de distintos receptores puede tener distintas consecuencias, todo ello sin olvidar la complejidad que supone la existencia de cuatro estados conformacionales de los receptores nicotínicos (de reposo, activo, y dos estados desensibilizados) (Gotti y Clementi, 2004; Hurst y col., 2013; Wonnacott, 2014; Changeux y Edelstein, 1998).

10. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ACh EN CÉLULAS CACO-2

10.1. AChR-mRNA en células Caco-2 control

Un segundo abordaje experimental para identificar los tipos de AChR implicados en el efecto sobrerregulador del carbacol se basó en caracterizar la dotación de AChR nicotínicos y muscarínicos que expresan las células Caco-2. Con este fin, mediante RT-PCR a tiempo real se cuantificaron los mRNAs para las distintas subunidades de nAChR y para los tipos principales de mAChR. Además, se investigó si su expresión cambiaba por la adición de carbacol.

En la **Figura III.27** se muestran los niveles de los mRNA para receptores de acetilcolina más abundantes de las células Caco-2. Así, vemos como entre las subunidades de tipo α de los AChR nicotínicos, abundan los mRNA de $\alpha 1$ y $\alpha 5$, siendo el mensajero de nAChR $\alpha 5$ el más abundante con diferencia, con unas 740 copias. Respecto a los de tipo β , destacamos el $\beta 4$ con unas 6 copias, siendo el resto de receptores tanto α como β muy poco abundantes (con menos de 2 copias). En el caso de los receptores de tipo muscarínico, sólo encontramos M3 (con unas 2 copias).

Aunque no están representados en la **Figura III.27** por su escaso contenido (inferior a 5 copias), los ensayos de RT-PCR detectaron la presencia en Caco-2 de otras subunidades de nAChR, incluyendo $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 1$ y $\beta 2$. Las correspondientes curvas de fusión mostraron una buena amplificación, con un producto de alta T_m ($>75^\circ\text{C}$). Análisis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR para células Caco-2 demostraron que, al menos para las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y las cuatro subunidades β , se estaba amplificando un producto del tamaño esperado (**Fig. III.7**). Además, en el caso de $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ y M3 se secuenció el producto, confirmándose que correspondía a dichas subunidades. Estos datos demostraron la capacidad de las Caco-2 para expresar estas subunidades minoritarias de nAChR, aunque con un número de copias de mensajero muy bajo.

La observación de que los mRNAs de nAChR más abundantes en las células Caco-2 fueran los de $\alpha 5$ y $\alpha 1$ fue un resultado inesperado. La subunidad $\alpha 1$ es característica del nAChR muscular, que tiene una composición $\alpha 1_2\beta 1\epsilon\delta$ en músculo adulto, y $\alpha 1_2\beta 1\gamma\delta$ en músculo embrionario (Zouridakis y col., 2009). No obstante, subunidades $\alpha 1$ se han observado también en células no musculares. En efecto, tanto la subunidad $\alpha 1$ como las otras tres subunidades del receptor muscular se han detectado en líneas celulares de epitelio bronquial humano y en fibroblastos de vías aéreas (Carlisle y col., 2004). En Caco-2 hemos observado también la presencia de bajos niveles de $\beta 1$ -mRNA, y aunque no hemos explorado la presencia de las otras subunidades del receptor de tipo muscular (δ , ϵ), cabe la posibilidad de que en Caco-2 se formen receptores nAChR de tipo muscular.

En cuanto a la subunidad $\alpha 5$, se trata de una subunidad estructural y no participa en la formación de sitios de unión a acetilcolina, lo mismo que le ocurre a $\beta 3$ (Zouridakis y col., 2009). Por ello, la subunidad $\alpha 5$ debe asociarse con otras subunidades α y con subunidades $\beta 2$ y/o $\beta 4$ para formar un nAChR funcional (Ramirez-Latorre y col., 1996). Receptores nicotínicos con estequiometría $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2(\alpha 5)$ se encuentran en diversas regiones cerebrales (Gotti y col., 2006), siendo abundantes en la corteza cerebral (Mao y col., 2008). Estos nAChRs $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2(\alpha 5)$ son muy permeables al calcio (Tapia y col., 2007). Dado que hemos detectado los mRNA para $\alpha 4$ y $\beta 2$ en las células Caco-2, es muy probable que $\alpha 5$ se encuentre formando este tipo de receptores $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2(\alpha 5)$. Se conocía la presencia de subunidades $\alpha 5$ fuera del sistema nervioso. Así, de entre una serie de tejidos no neuronales, donde se observó la mayor expresión de la subunidad $\alpha 5$ fue en el tracto gastrointestinal, timo y testículo (Flora y col., 2000).

Por otra parte, las Caco-2 expresan el mRNA para AChR α 7, aunque con un nivel muy bajo, por lo que a la vista del efecto sobreelregulador de AChE de la colina (**apdo. III.8.3, Fig. III.22**), es muy probable que en estas células se formen receptores homoméricos α 7.

Al interpretar estos resultados, hay que tener en cuenta que la cantidad de un mRNA puede ser muy baja, y a pesar de ello el correspondiente receptor puede desempeñar un papel importante en la célula. Por una parte, un número muy bajo de AChR puede ser suficiente para ejercer su papel regulador. Además, es probable que la síntesis de gran parte del AChR de las células Caco-2 haya tenido lugar antes de comenzar el ensayo, de modo que el AChR-mRNA puede haber sido degradado antes de la lisis celular; eso es posible ya que la vida media del nAChR puede alcanzar los 13 días (Strack y col., 2011).

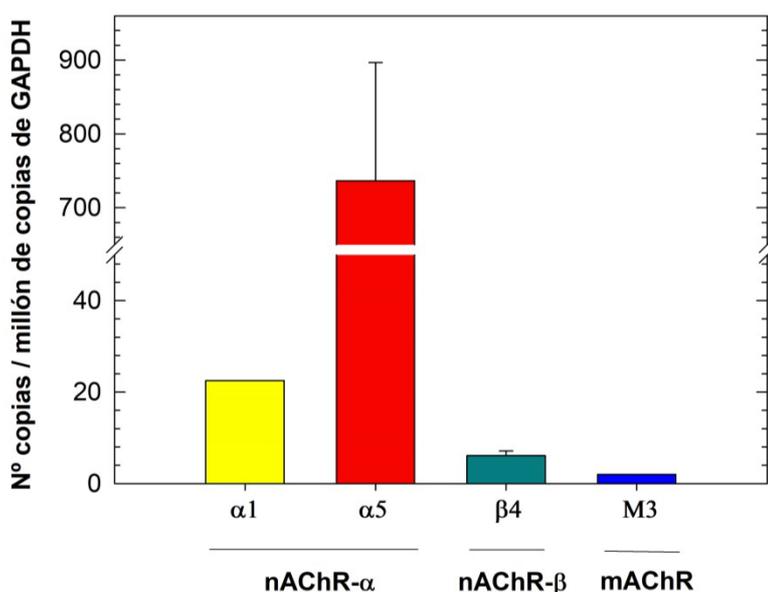


Figura III.27. Cuantificación relativa de los AChRs presentes en las células Caco-2. El histograma muestra el número de copias de las subunidades de nAChR y de M3 presentes en las células Caco-2, expresadas como copias por millón de copias de GAPDH-mRNA. Del resto de transcritos analizados se obtuvieron menos de cinco copias, o no se detectaron, por lo que no se muestran en el histograma.

10.2. Efecto del carbacol sobre los AChR-mRNA de Caco-2

Los receptores nAChR tienen la propiedad inusual de aumentar sus niveles en las células que se exponen crónicamente a su agonista característico, nicotina, fenómeno llamado *sobrerregulación (upregulation)*, y que se observa in vivo y in vitro (Govind y col., 2009). Esta respuesta a la exposición prolongada a nicotina varía para los distintos subtipos, siendo $\alpha 4\beta 2$ el receptor que se sobrerregula con más intensidad haciéndolo en gran medida, el receptor $\alpha 4\beta 4$ se sobrerregula escasamente, y por el contrario, el receptor con $\alpha 6\beta 3$ disminuye su expresión en roedores (Albuquerque y col., 2009). El receptor homomérico $\alpha 7$ también se sobrerregula por nicotina, lo que contribuye a la progresión de los cánceres en fumadores (Schuller, 2009). Aunque persiste el debate sobre los mecanismos implicados, hay acuerdo en que el efecto es postranscripcional, basándose en estudios donde el tratamiento con nicotina no alteró los niveles de nAChR-mRNA en cerebro, y en la observación de sobrerregulación del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en células M10 tratadas con nicotina tras inhibir la síntesis proteica con cicloheximida (Govind y col., 2009). Estos datos apoyaban un posible cambio en el contenido de los AChR por el tratamiento por carbacol, otro agonista, aunque con propiedades farmacológicas distintas a las de nicotina. De hecho, el tratamiento con carbacol o con nicotina durante 5 días aumentó la expresión de varios nAChR expresados en células renales transfectadas (Xiao y Kellar, 2004).

Hay que tener en cuenta que el carbacol es una amina cuaternaria que no atraviesa fácilmente la membrana, mientras que la nicotina es lipofílica, una amina terciaria que en su forma desprotonada puede cruzar rápidamente la membrana (Kuryatov y col., 2005; Xiao y Kellar, 2004). Para producir sobrerregulación, la nicotina puede actuar directamente dentro de la célula, independientemente de la activación del receptor. Así, en células HEK transfectadas con nAChR $\alpha 4$ y $\beta 2$, la sobrerregulación por nicotina y otros agonistas, incluyendo la amina cuaternaria metilcarbamilcolina, no se desencadena por el flujo de iones a través del nAChR. Esta idea se basa en el hecho de que la sobrerregulación se produce también cuando el canal del receptor $\alpha 4\beta 2$ se bloquea con mecamilamina o cuando se usan receptores mutados no funcionales (Kuryatov y col., 2005). Se han descrito varios mecanismos; por ejemplo, la nicotina puede actuar como una chaperona química en el retículo endoplásmico (RE) promoviendo el ensamblado de las subunidades, al inducir una conformación más favorable a la oligomerización (Kuryatov y col., 2005). Además, se ha visto que el número de receptores nAChR $\alpha 7$ aumenta debido a una interacción directa de la nicotina con el proteasoma, lo que inhibe su actividad proteolítica (Rezvani y col., 2007).

El hecho de que el carbacol sea una amina cuaternaria que no atraviesa fácilmente la membrana, llevó a algunos autores a sugerir que la acción del carbacol para aumentar los niveles de nAChR se inicia a nivel de membrana (Xiao y Kellar, 2004). No obstante, durante incubaciones prolongadas, como las necesarias para producir sobrerregulación, los agonistas de naturaleza amina cuaternaria como ACh y tetrametilamonio acceden al interior del retículo endoplásmico donde, con toda probabilidad, pueden fijarse en el sitio de unión a ACh de los receptores nacientes (Kuryatov y col., 2005).

Considerando esos datos, pensamos que tal vez el tratamiento con carbacol podía afectar al contenido de AChR de las células Caco-2. Si se detectara el aumento de algún tipo de receptor, ello podría sugerir su participación en la inducción de la actividad AChE. Por ello decidimos comparar el contenido en AChR-mRNA de las células control y tratadas.

Hay que tener en cuenta que la duración de nuestros tratamientos con carbacol fue menor que la utilizada en muchos estudios de sobrerregulación con nicotina (Xiao y Kellar, 2004; Wang y col., 2001), pero nos interesaba ver sólo los cambios asociados a la sobrerregulación de AChE. Por otra parte, aunque el análisis a nivel de proteína (por Western blotting o inmunocitoquímica), a diferencia de la RT-PCR, serviría para detectar cambios debidos a mecanismos tanto pretraduccionales como en la traducción y postraduccionales, el estudio a nivel de mRNA nos permitía analizar muchos tipos de subunidades sin necesidad de disponer de anticuerpos específicos para cada una de ellas.

El efecto del tratamiento con carbacol sobre el contenido de los mensajeros de AChR más abundantes se refleja en la **Figura III.28**. Se observa una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de prácticamente el 50%. Sin embargo, el número de copias de los mensajeros de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 4$ aumentó ligeramente, mientras que el nivel de mRNA para M3 permaneció inalterado. Ningún mRNA minoritario pasó a ser abundante en las células tratadas. Así que no observamos sobrerregulación de ninguna subunidad de nAChR, para la duración de nuestros tratamientos. La menor expresión de los $\alpha 1$ -mRNA sugiere una regulación de esta subunidad por agonistas, lo que apunta a un papel fisiológico de los receptores con esta subunidad en nuestras células. A su vez, ello puede sugerir que tengan un papel en la sobrerregulación de AChE.

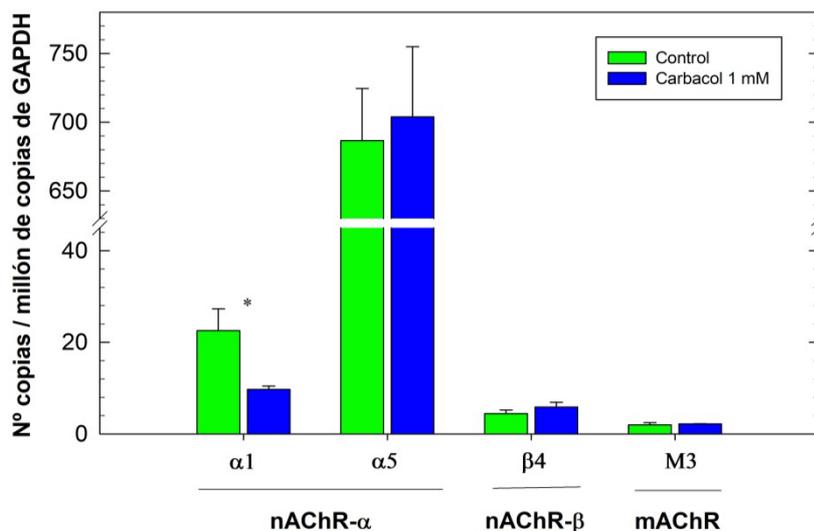


Figura III.28. Efecto del carbacol sobre los principales AChRs expresados en Caco-2. Las células se incubaron con carbacol 1 mM, durante 8 h. En la figura se representa el número de copias de las subunidades de nAChR y de M3 presentes en las células Caco-2, con respecto al número de copias de GAPDH-mRNA. (*: $p < 0,05$ comparando con el control).

11. EXPRESIÓN DE COLINA ACETILTRANSFERASA (ChAT)

En nuestros ensayos de RT-PCR no pudimos cuantificar el mRNA para la colina acetiltransferasa (ChAT), principal enzima responsable de la síntesis de ACh en el sistema nervioso y otros tejidos, a pesar de probar con dos pares de primers dirigidos contra distintas regiones del mensajero (exones E7/E8 y E14/E16). Aunque se detectaba amplificación de DNA, las curvas de fusión hacían dudar de que se estuviera amplificando sólo el producto deseado, y como el resultado no era concluyente, no se muestra en los histogramas. En todo caso la cantidad de ChAT-mRNA sería muy baja (<3 copias).

Este resultado nos resultó muy inesperado, porque otros autores habían observado por RT-PCR una expresión abundante de ChAT-mRNA en Caco-2 y otras líneas de cáncer de colon humano como H508 y WiDr, mientras que el mensajero no se había observado en las líneas SNU-C4, T84 y HT-29 (Cheng y col., 2008). De hecho, Caco-2 fue la línea con mayor contenido en ChAT-mRNA de las seis estudiadas. Además, estos autores detectaron la proteína ChAT por microscopía de inmunofluorescencia en

el citoplasma de Caco-2 y H508. A esto había que sumar el hecho de que en el medio de cultivo aparecía acetilcolina, que alcanzaba niveles de 3 μ M para H508 y 7 μ M para Caco-2 (en presencia de eserina 0,5 mM como inhibidor de la AChE), calculándose que las H508 liberan diariamente unos 2 nanomoles de ACh por millón de células (Cheng y col., 2008).

Una discrepancia similar en el contenido de ChAT se ha descrito para la línea de colon HT-29, ya que según unos autores estas células contienen ChAT (Pettersson y col., 2009a), mientras que según otros carecen de ella y no sintetizan ACh (Cheng y col., 2008). Esa diferencia se atribuyó a variaciones entre las células HT-29 usadas por cada laboratorio (Pettersson y col., 2009a).

Nosotros no hemos explorado la producción de ACh en las células Caco-2 usadas. Es posible que nuestras Caco-2 expresen ChAT, pero no hayamos detectado el mRNA porque los dos pares de primers probados no sean adecuados. No hemos testado la validez de los primers en otras células con una mayor expresión de ChAT. Pero por otra parte, incluso estando ChAT ausente, las Caco-2 podrían sintetizar ACh mediante la carnitina acil-transferasa (CarAT), una enzima mitocondrial capaz de sintetizar ACh fuera del sistema nervioso (Wessler y Kirkpatrick, 2008; Kawashima y Fujii, 2008), presente por ejemplo en urotelio (Lips y col., 2007). También es cierto que algunos anticuerpos policlonales contra ChAT también reconocen la CarAT (Lips y col., 2007).

12. ENSAYOS DE WESTERN BLOTTING PARA AChR

El análisis de los AChR-mRNA nos reveló las subunidades de nAChR y los mAChR posiblemente expresados en las células Caco-2, pero no nos permitió aclarar qué tipo de receptores eran los más abundantes, una información sumamente útil para atribuir el efecto inductor del carbacol a un receptor concreto. El análisis de la expresión de AChR a nivel de proteína podría arrojar luz sobre este aspecto.

Para ello, realizamos ensayos de Western blot con anticuerpos contra el receptor M3 y contra la subunidad α 7 del nAChR. Nos centramos en estos receptores porque de partida no disponíamos de anticuerpos contra los AChR humanos, y estos dos receptores parecían los más prometedores para desempeñar un papel en la regulación de AChE. Por una parte, su mRNA se expresaba en Caco-2, aunque con escasa abundancia (2-5 copias por millón de GAPDH). Por otra, se ha demostrado el papel funcional de estos receptores en células de epitelio de colon.

En efecto, el mRNA del receptor muscarínico M3 se expresa en HT-29 (Frucht y col., 1999). En un estudio se detectó el mRNA para M3 en todas las muestras de colon humano, normal y canceroso, estando aumentada su expresión en la mayoría de muestras tumorales (Yang y Frucht, 2000). En células H508 de cáncer de colon humano (que expresan M3 abundantemente), la estimulación por ACh de este receptor da lugar a la fosforilación dependiente de calcio de varias quinasas (la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p44/42 y la quinasa p90RSK), lo que acelera la proliferación celular (Cheng y col., 2003). Los ratones genéticamente deficientes en M3 presentan muchos menos tumores de colon que los normales tras ser tratados con azoximetano, y en ellos está muy reducida la proliferación de las células epiteliales de colon (Raufman y col., 2008).

En cuanto al receptor nAChR $\alpha 7$, se ha detectado en la superficie de las células Caco-2, y en la línea HCT-8 de cáncer colorrectal humano, usando α -bungarotoxina fluorescente (Alexa Fluor 488 - α -BTX) (Cucina y col., 2012). La α -BTX es una neurotoxina del veneno de *Bungarus multicinctus* que es antagonista del nAChR $\alpha 7$ y del nAChR muscular (así como de los $\alpha 8-10$) (Zouridakis y col., 2009). La nicotina aumenta la proliferación y reduce la apoptosis en estas células, efectos que se inhiben por α -BTX por lo que se atribuyen al receptor $\alpha 7$ (Cucina y col., 2012; Dinicola y col., 2013). Las células HT-29 de cáncer de colon humano expresan los mRNA para las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 1$ del nAChR, aunque se piensa que sólo la subunidad $\alpha 7$ forma un receptor nicotínico funcional en estas células, donde podría actuar en la inhibición por nicotina de la liberación de IL-8 (Summers y col., 2003). La presencia de nAChR $\alpha 7$ en HT-29 se ha confirmado por inmunocitoquímica (Pettersson y col., 2009a). Metillicaconitina, un antagonista del nAChR $\alpha 7$, impide el efecto estimulador de la proliferación que tiene la nicotina sobre estas células HT-29 (Wong y col., 2007a). El homopentámero $\alpha 7$ ejerce efectos antiinflamatorios en la línea HT-29 (Summers y col., 2003) y en otros tipos celulares, como macrófagos (de Jonge y Ulloa, 2007). El contenido de $\alpha 7$ se altera en cáncer de colon (Novotny y col., 2011). Este receptor nAChR $\alpha 7$ es responsable del aumento de la migración de las células HT-29 debido a NNK, un metabolito de la nicotina (Wei y col., 2009).

Estos datos demuestran que M3 y nAChR $\alpha 7$ son dos tipos de AChR con presencia e importancia fisiológica en las células de colon, y los convierte en los receptores potencialmente más interesantes para estudiar su posible implicación en la sobreexpresión de AChE por carbacol. No obstante, hay que tener en cuenta que distintas líneas celulares presentan distinta dotación de receptores, por ejemplo las células SNU-C4 son de cáncer de colon, pero no expresan M3 (Belo y col., 2011).

La **Figura III.29** muestra un Western blot para el receptor M3, con el anticuerpo H-210. En la membrana se observa una banda de unos 70 KDa, que asignamos a este receptor, puesto que el receptor M3 tiene unos 75 KDa (Cabadak y col., 2011). La señal de esta banda no cambia en células incubadas con BW. Por tanto, la presencia del receptor M3 en las células Caco-2 observada a nivel de mRNA (**apdo. III.10.1**) se confirma a nivel de proteína. Ello unido a los efectos de oxotremorina M y atropina señala a este receptor como un probable eslabón en el mecanismo que lleva a la sobrerregulación de AChE por agonistas. Los Western blots realizados para detectar el receptor nAChR $\alpha 7$ no dieron suficiente señal para saber si está presente en las células Caco-2.

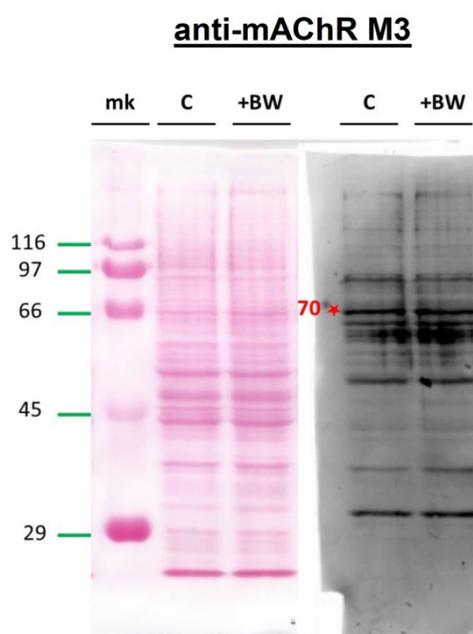


Figura III.29. Efecto del BW284c51 sobre la cantidad del mACHR M3 de las células Caco-2. Las proteínas de células control o tratadas con BW se sometieron a SDS-PAGE y Western blotting. A la izquierda se muestra la membrana teñida para proteínas con Ponceau. A la derecha se muestra la membrana incubada con el anticuerpo anti-mACHR-M3. Tras incubación con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, la membrana se reveló con el reactivo ECL plus. La masa molecular de las proteínas se calculó por referencia a los marcadores (mk): β -galactosidasa (116 KDa), fosforilasa b (97 KDa), albúmina de suero bovino (66 KDa), albúmina de huevo (45 KDa) y anhidrasa carbónica (29 KDa).

13. PAPEL DEL CALCIO EN LA SOBRRREGULACIÓN DE AChE POR CARBACOL

13.1. Calcio, receptores de ACh y regulación de AChE

A continuación quisimos explorar un posible mecanismo de acción de los AChR que condujera al aumento de la actividad AChE. Se ha llegado a decir que la ACh puede modificar prácticamente todas las rutas de señalización actuando mediante los receptores nicotínicos y muscarínicos (Wessler y Kirkpatrick, 2008). Nosotros decidimos investigar la posible implicación del calcio en el aumento de AChE, ya que este ión participa en la acción tanto de los receptores nicotínicos como de los muscarínicos (**apdos. I.6.4.1 y I.6.4.2**), y el calcio regula la expresión de AChE (**apdo. I. 2.2.2**).

De hecho, todos los receptores nicotínicos son permeables a los iones Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, aunque la permeabilidad al calcio depende mucho de la composición de subunidades, siendo los receptores homoméricos $\alpha 7$ y el mucho menos extendido $\alpha 9$ los más permeables (Abreu-Villaca y col., 2011). La señalización por calcio tiene un papel clave en los efectos mediados por nAChR (Abreu-Villaca y col., 2011). Los nAChR $\alpha 7$ destacan por su permeabilidad al calcio, superior a la de los receptores NMDA de glutamato (Albuquerque y col., 2009), pero el papel del calcio se extiende a los demás nAChR.

Cuando se activan los receptores nicotínicos, el calcio puede entrar a las células directamente a través del canal del receptor, o indirectamente por los canales de calcio sensibles al voltaje (VDCC), que se abren tras la despolarización de la membrana (Abreu-Villaca y col., 2011; Shen y Yakel, 2009; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004), (**Fig. I.15**). Además, la cantidad de calcio en el citosol puede aumentar por la liberación de calcio inducida por calcio (CICR) desde las reservas intracelulares (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). La liberación de calcio desde el retículo endoplásmico se debe a los receptores de rianodina (RyR) y a los receptores de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃R) (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). El calcio por sí solo es suficiente para producir la liberación de calcio por los RyR, mientras que los IP₃R se activan por calcio pero en presencia de IP₃ (Endo, 2009). El IP₃ se genera a partir del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato por la fosfolipasa C (PLC), enzima que se activa por calcio. Parece que los nAChR que no contienen subunidades $\alpha 7$ amplifican el nivel de calcio intracelular principalmente activando los canales VDCC de la membrana, mientras que los receptores $\alpha 7$, muy permeables al calcio, activan directamente los receptores de rianodina (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). El aumento de calcio tras

la activación de los nAChR produce efectos que van desde instantáneos (como la liberación de neurotransmisor) hasta efectos a largo plazo (como la neuroprotección por activación de genes) (Shen y Yakel, 2009).

La entrada de calcio por los nAChRs contribuye a regular rutas de señalización como la vía PI3-quinasa / AKT (Kihara y col., 2001; West y col., 2003), la activación de factores de transcripción como CREB (Brunzell y col., 2003), y diversos procesos proteolíticos (Meyer y col., 2002).

Por su parte, los receptores muscarínicos también pueden aumentar el calcio intracelular, especialmente los mAChR de los tipos M1, M3 y M5, que activan a la fosfolipasa C (PLC) acoplándose a proteínas G de la familia Gq/11, y no inhiben la adenilato ciclasa. En cambio, M2 y M4 inhiben la adenilato ciclasa mediante proteínas G de la familia Gi/Go, con lo que reducen los niveles de cAMP, y normalmente no activan la PLC (Russo y col., 2014; von Rosenvinge y Raufman, 2011). La activación de PLC da lugar a la producción de IP₃ y diacilglicerol (DAG); IP₃ activa los IP₃R produciendo liberación de calcio desde el retículo endoplásmico, mientras que DAG activa isoenzimas de la proteína quinasa C (PKC) (Abreu-Villaca y col., 2011; Endo, 2009). La movilización del calcio por mAChR participa, por ejemplo, en el estímulo de la proliferación de las células neurales P19 por activación de M1, M3 y M5 (Resende y col., 2008a).

La activación de los mAChR modula diversos canales iónicos, entre ellos los de calcio, por diversos mecanismos (Nathanson, 2004). Por ejemplo, la inhibición de la adenilato ciclasa disminuye la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP, lo que reduce la actividad de los canales de calcio. No obstante, la activación muscarínica conduce a la apertura de un tipo de canales de calcio, cuya importancia en el cáncer colorrectal y otros cánceres se ha visto recientemente (Villalobos y col., 2017; Jardín y Rosado, 2016). La liberación de calcio desde el retículo endoplásmico (mediada por el IP₃) desencadena la entrada de calcio extracelular al citosol, a través de los “canales de calcio activados por la liberación de calcio” (CRAC, por *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺-channels*), dando lugar a la “entrada de calcio operada por almacenes de calcio” (SOCE, por *store-operated calcium entry*) (Weidinger y col., 2013). Unas proteínas importantes en este proceso de SOCE son las STIM (*stromal interaction molecules*), que se localizan normalmente en la membrana del RE, donde monitorizan la concentración de calcio del lumen. Cuando se libera calcio del RE, las STIM se translocan a la membrana plasmática, donde se unen a Orai1, proteína que forma el poro de los canales CRAC, produciendo la apertura del canal y la

consiguiente entrada de calcio (Villalobos y col., 2017; Tojyo y col., 2014; Weidinger y col., 2013).

Tanto STIM como Orai1 se expresan en el epitelio del colon de rata (Onodera y col., 2013) y en células normales (NCM460) y cancerosas (HT-29) de colon humano (Sobradillo y col., 2014). Esos canales CRAC intervienen en el aumento de calcio citosólico provocado por carbacol en las células HT-29/B6 (Onodera y col., 2013). Así mismo, en linfocitos T la activación de receptores M3 y M5 por oxotremorina M produce un aumento de IP₃ y la consiguiente liberación de calcio desde el RE, que induce la entrada de calcio por los canales CRAC (Mashimo y col., 2017).

A su vez, se sabe que el calcio regula la expresión de AChE, tanto en células musculares y nerviosas como en otros tipos celulares (**apdo. I.2.2.2**). La estabilización del mRNA de AChE por el calcio intracelular es necesaria para el fuerte aumento en el nivel de AChE que ocurre durante la diferenciación de mioblastos a miocitos en células C2C12 (Luo y col., 1994). También en miotubos, el ATP actúa mediante los receptores P2Y1 estimulando la transcripción del gen de AChE, en un proceso donde intervienen la proteína quinasa C y la liberación de calcio intracelular. Este proceso culmina con la activación del factor de transcripción Elk-1, para el que hay dos sitios de unión en el promotor de *ACHE* (Choi y col., 2003). En células P19 de carcinoma embrionario, de tipo neural, el aumento de actividad AChE por péptidos de la proteína β -amiloide ($A\beta$) se ha atribuido a la entrada de calcio por canales de calcio dependientes de voltaje (Sberna y col., 1997). En células HeLa, dos agentes que elevan la cantidad de calcio citosólico (A23187 y tapsigargina) aumentan la actividad del promotor de AChE y la estabilidad del mensajero (Zhu y col., 2007a). Este hecho se debe en parte a la disociación del factor de unión a CCAAT (CBF) del sitio CCAAT distal (Zhu y col., 2007c) y a la acumulación de Smad3 en el núcleo, lo que le permite unirse al sitio Smad en el promotor de AChE (Gao y col., 2009).

13.2. Efecto del calcio extracelular en la sobreexpresión de AChE

Por todo lo anterior, cabía la posibilidad de que un aumento de la concentración de calcio intracelular participara en la inducción de AChE por carbacol. Decidimos explorar esta posibilidad. Para ello, estudiamos si los cambios en la concentración de calcio extracelular o el uso de quelantes del calcio intracelular (BAPTA-AM) y extracelular (EGTA) afectaban al aumento de AChE por el tratamiento con carbacol. Además, probamos si el ionóforo de calcio A23187 era capaz de aumentar la actividad AChE de las células, sustituyendo al carbacol.

En primer lugar probamos si al añadir calcio al medio de cultivo aumentaba el efecto estimulador del carbacol, suponiendo que con una mayor concentración de calcio extracelular la entrada de calcio al citosol podría ser mayor (Ohtani y col., 2009). En algunos experimentos, en lugar de usar el medio de cultivo habitual, EMEM, empleamos el medio de cultivo disponible con la menor concentración de calcio, RPMI. La **Figura III.30** muestra el resultado obtenido con un experimento en cada medio; en ella se indica la concentración de calcio total, incluyendo el aportado por el medio EMEM o RPMI.

En los dos casos se ve que al aumentar la concentración de calcio hasta 1,5 mM el efecto del carbacol sobre la actividad AChE aumenta ligeramente, pero de modo reproducible. Para concentraciones mayores de calcio el efecto del carbacol disminuye, de modo concentración-dependiente. Este resultado apoya la participación de una entrada de calcio extracelular en el modo de acción del carbacol, aunque la concentración de calcio propia del medio de cultivo ya es suficiente para que el efecto se acerque al máximo.

13.3. Efecto de los quelantes de calcio en la sobrerregulación de AChE

El BAPTA (ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) es un quelante de calcio, con una constante de disociación de 107 nM para el complejo con calcio, y muy alta selectividad por calcio frente al magnesio. Tiene cuatro grupos carboxilato, con los que puede unir dos iones calcio. El acetoximetil-BAPTA (BAPTA-AM) es un derivado del BAPTA ampliamente usado para complejar el calcio intracelular, en concentraciones de hasta 50 μ M (Choi y col., 2003; Zhu y col., 2007a; Gao y col., 2009; 2013); por ejemplo, se ha usado a 20 μ M en células Caco-2 (Alrefai y col., 2007) y a 10-25 μ M en otras células de colon (Cheng y col., 2003; Sun y col., 2012). La modificación de los ácidos carboxílicos por enlace éster con grupos acetoximetilo (AM) da lugar a una molécula sin carga que puede atravesar las membranas biológicas. Una vez dentro de la célula, el grupo bloqueante lipofílico es cortado por esterasas inespecíficas, dando lugar a una molécula con carga (el BAPTA) que puede salir de la célula mucho más lentamente que la molécula original. Nosotros usamos BAPTA-AM en su forma dimetilada (5,5'-dimethyl-BAPTA-AM).

La preincubación con BAPTA-AM (45 minutos) no afectó a la actividad AChE de las células control, pero sí redujo mucho el aumento de la actividad AChE por carbacol (**Fig. III.31**). El efecto inhibitor fue concentración-dependiente, de modo que con 20 μ M BAPTA-AM el aumento de AChE por el carbacol se redujo en un 75 % respecto

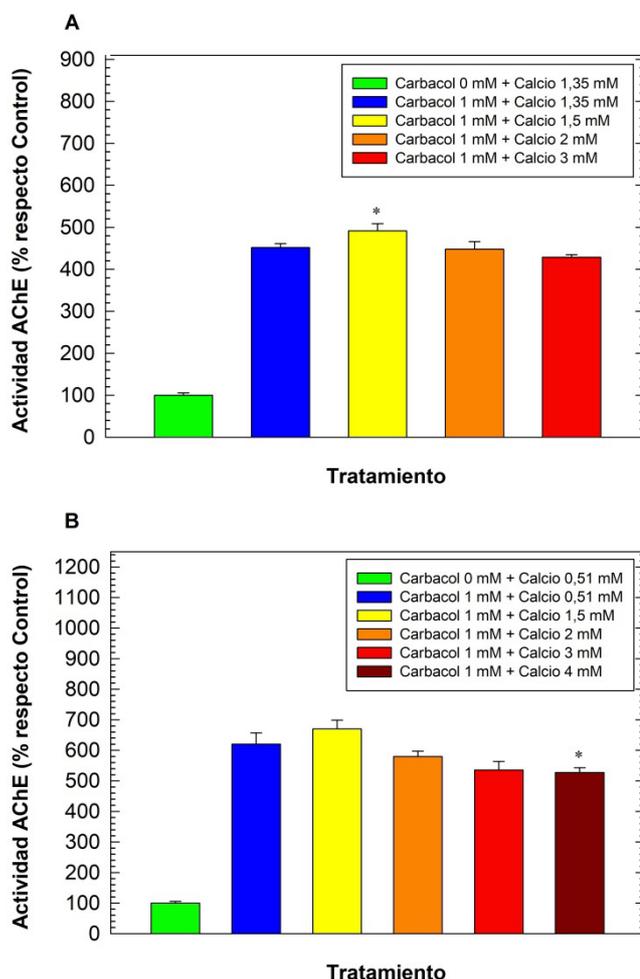


Figura III.30. Efecto del ión calcio sobre la actividad AChE de células Caco-2 tratadas con carbacol. Las células se trataron con carbacol en presencia de concentraciones crecientes de calcio. A las 24 h se midió la actividad AChE. En la figura **A**) se muestra el efecto del calcio empleando el medio de cultivo habitual (EMEM). (*: $p < 0,05$ respecto a carbacol con calcio 1,35 mM). En la figura **B**) se muestra el efecto del calcio empleando un medio de cultivo bajo en calcio (RPMI). (*: $p < 0,05$ respecto a carbacol con calcio 0,51 mM).

al de las células sin quelante. Este resultado demuestra claramente que el calcio intracelular es necesario para que el carbacol ejerza su efecto “inductor” sobre AChE. Este hecho apoya la hipótesis de que durante el proceso tiene lugar un aumento en el calcio citosólico, por la entrada de calcio extracelular y/o por la liberación de calcio desde reservorios intracelulares, como el retículo endoplásmico.

Sería interesante explorar si mediante tapsigargina, que inhibe la Ca²⁺-ATPasa del retículo y así provoca el vaciado del calcio de este orgánulo (Zhu y col., 2007a) es posible lograr el aumento de actividad AChE en las Caco-2 sin tratarlas con carbacol.

A continuación estudiamos el efecto del EGTA sobre la inducción de AChE por carbacol. El EGTA (ácido etilen-glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético) es un quelante de calcio, ión al que se une en relación de uno a uno. Sus usos incluyen el estudio del papel del calcio en células vivas (Cheng y col., 2003). Debido a la carga negativa que le dan sus cuatro grupos carboxilato, no es permeable a las membranas, por lo que lo empleamos para quelar el calcio extracelular. Por ejemplo, 1 mM EGTA se ha usado para complejar el calcio extracelular en estudios sobre el papel de los AChR (Resende y col., 2008b) y en células de colon en cultivo (Hu y col., 2013).

La adición de EGTA 1 mM al medio de cultivo eliminó completamente el aumento de AChE por carbacol (**Fig. III.32**), lo que apoya que la entrada de calcio extracelular interviene en el mecanismo de inducción de AChE del carbacol. Es fácil que esa entrada de calcio tenga lugar directamente por los receptores nicotínicos, ya que todos son permeables al calcio, aunque muy especialmente los receptores homoméricos como el $\alpha 7$ (Abreu-Villaca y col., 2011; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). No obstante, el calcio puede también entrar a través de los canales de calcio sensibles al voltaje (VDCC), que se activan por despolarización de la membrana tras la entrada de cationes por los nAChR.

Otra vía importante de entrada de calcio pueden ser los canales CRAC, que se activan por la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico provocada por el IP₃, generado a su vez por la fosfolipasa C tras la activación de los mAChR. Estos canales CRAC son fisiológicamente relevantes en epitelio de colon (Villalobos y col., 2017; Sobradillo y col., 2014; Sun y col., 2012; Onodera y col., 2013). Por tanto, tanto la activación de los nAChR como la de los mAChR puede conducir a la entrada de calcio extracelular. Así, el efecto del EGTA no ayuda a discriminar qué tipo de receptor está implicado en el aumento de AChE.

El uso de bloqueantes de canales VDCC como el cloruro de cadmio, nifedipina o verapamil, o de canales CRAC como YM-58483, o bien de 2-APB, que es un antagonista del IP₃R (Resende y col., 2008b; Mashimo y col., 2017), podría aclarar si dichos canales participan o no en el efecto del carbacol.

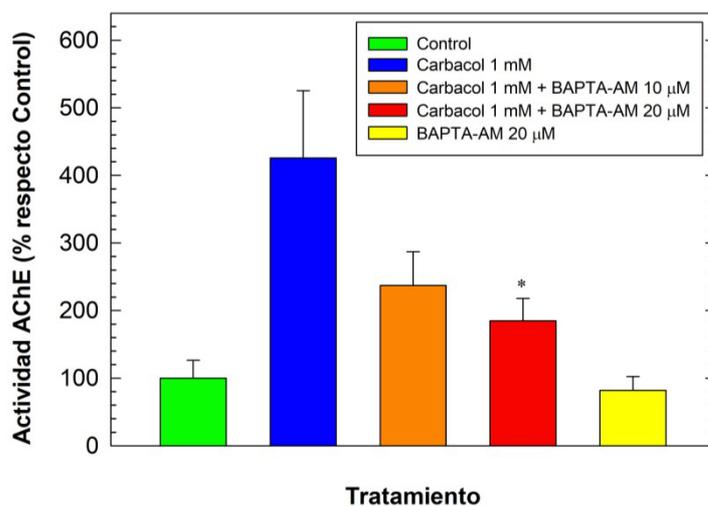


Figura III.31. Efecto del quelante intracelular de calcio BAPTA-AM sobre la actividad AChE en células tratadas con carbacol. Las células se preincubaron 45 min con BAPTA-AM antes de añadir el carbacol. A las 24 h se midió la actividad AChE. En la figura se representa la actividad AChE. (*: $p < 0,05$ comparando con carbacol sin BAPTA-AM).

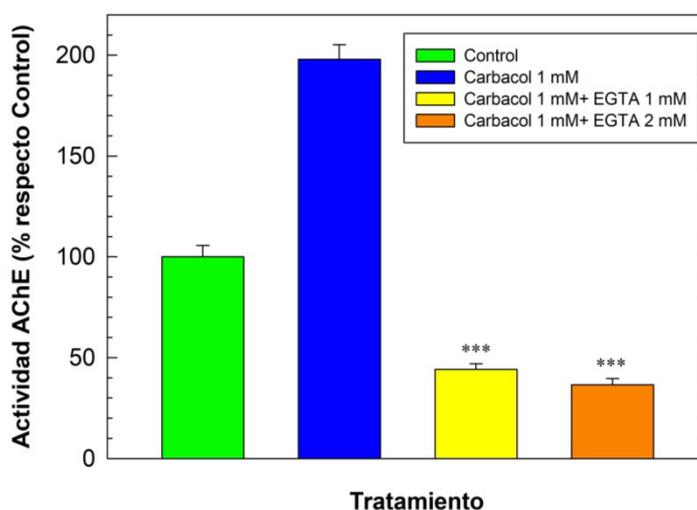


Figura III.32. Efecto del quelante extracelular de calcio EGTA sobre la actividad AChE en células tratadas con carbacol. Las células se trataron con dos concentraciones distintas de EGTA (1 y 2 mM) y con carbacol. El histograma representa la actividad AChE tras 1 día de tratamiento. (***: $p < 0,001$ comparando con carbacol sin EGTA).

13.4. Efecto del ionóforo A23187 sobre la actividad AChE

A23187 (calcimicina) es un ionóforo de calcio, que aumenta la concentración de calcio intracelular al permitir la entrada de calcio externo a través de la membrana. Por ello se usa frecuentemente para estudiar el papel del calcio (Zhu y col., 2007a); por ejemplo a 1 μ M en células SW480 de colon (Sack y col., 2011). Por eso estudiamos el efecto de la adición de A23187 sobre la actividad AChE de las células Caco-2, en ausencia de carbacol, bajo la hipótesis de que, si el efecto del carbacol está mediado por el aumento del calcio intracelular, el ionóforo por sí sólo podría producir también un aumento de la actividad AChE.

Se sabe que A23187 puede producir apoptosis en varios tipos celulares por aumentar el calcio citosólico; por ejemplo, el tratamiento durante 2 días con A23187 a 2 μ M produce apoptosis en células HeLa y MDA-MB-435s (Zhu y col., 2007a). Por ello, realizamos primero pruebas con distintas concentraciones de A23187, para comprobar el rango de concentraciones que no producía una disminución del número de células, medida por ensayos con MTT (**Fig. III.33**). Como ya sabíamos, carbacol 1 mM no afecta al número de células. Observamos que concentraciones de A23187 de hasta 100 nM no disminuían el número de células tras un día de tratamiento; mientras que concentraciones de 250 nM o más producían una caída del número de células que indicaba un daño celular por el ionóforo, y quizá la inducción de apoptosis. Por ello escogimos 100 nM como concentración máxima de agente para ver su efecto sobre AChE. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la **Figura III.34**. Contra lo esperado, A23187 produjo una disminución de la actividad AChE de las células Caco-2, tanto mayor cuanto mayor fue la concentración del agente (50-100 nM) (**Fig. III.34.A**). No obstante, observamos que en este experimento el ionóforo producía también una ligera disminución del número de células, por lo que en la **Figura III.34.B** se muestra la actividad AChE normalizada para el número relativo de células (absorbancia del ensayo con MTT). En la **Figura III.34.B** vemos que la actividad AChE por célula no varió con la concentración menor del agente (50 nM), pero sí disminuyó con A23187 100 nM.

Claramente, el efecto reductor de la actividad AChE que vemos para el A23187 100 nM no apoya un papel del calcio en el mecanismo inductor de AChE del carbacol. No obstante, los resultados con quelantes demostraban ese papel. El resultado inesperado del ionóforo se explica porque, dada la complejidad de las cascadas de

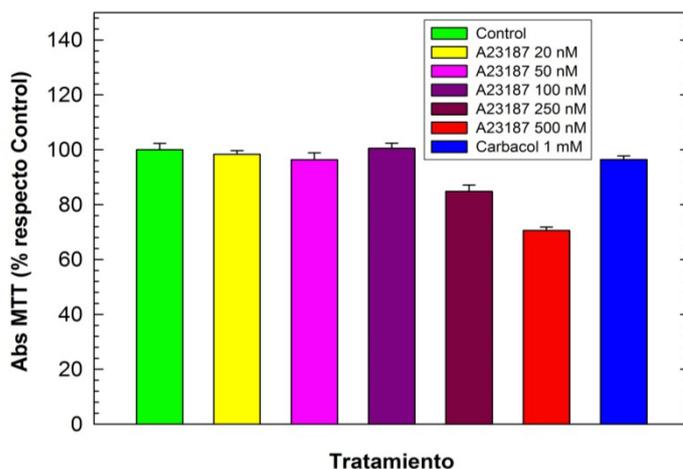


Figura III.33. Efecto del ionóforo A23187 sobre la viabilidad de las células Caco-2. Las células se trataron con cantidades crecientes del ionóforo de calcio A23187. Tras 24 h se determinó el número de células viables. En el histograma se representa el efecto del ionóforo sobre la viabilidad celular, siendo la absorbancia proporcional al número de células viables.

señal en que está implicado el calcio, es muy probable que una entrada masiva de calcio, como probablemente causa el ionóforo, que quizá llegue a equilibrar el gradiente transmembrana de calcio, tenga unos efectos opuestos a los de un aumento mucho menor del calcio citosólico, como será el mediado por los AChR.

Por otra parte, se ha visto que el A23187 y la tapsigargina (que libera el calcio del retículo endoplásmico inhibiendo su Ca²⁺-ATPasa) producen un aumento importante de los niveles de AChE en las células HeLa y MDA-MB-435s, debido a un aumento de la actividad del promotor y a la mayor estabilidad del mensajero (Zhu y col., 2007a; Gao y col., 2009). No obstante, la concentración de ionóforo en esos estudios (2000 nM), fue muy superior a la de nuestros ensayos (100 nM), y suficiente para desencadenar apoptosis, como indicó la condensación de la cromatina en células teñidas con Hoechst 33258 y los ensayos de TUNEL. El carbacol 1 mM no provocó apoptosis en las células Caco-2, como mostraron nuestros ensayos con Hoechst (**Fig. III.15**) y los contajes de células viables con MTT. Eso, además del distinto tipo celular, explican que el efecto de A23187 sobre la AChE sea el contrario en nuestro caso.

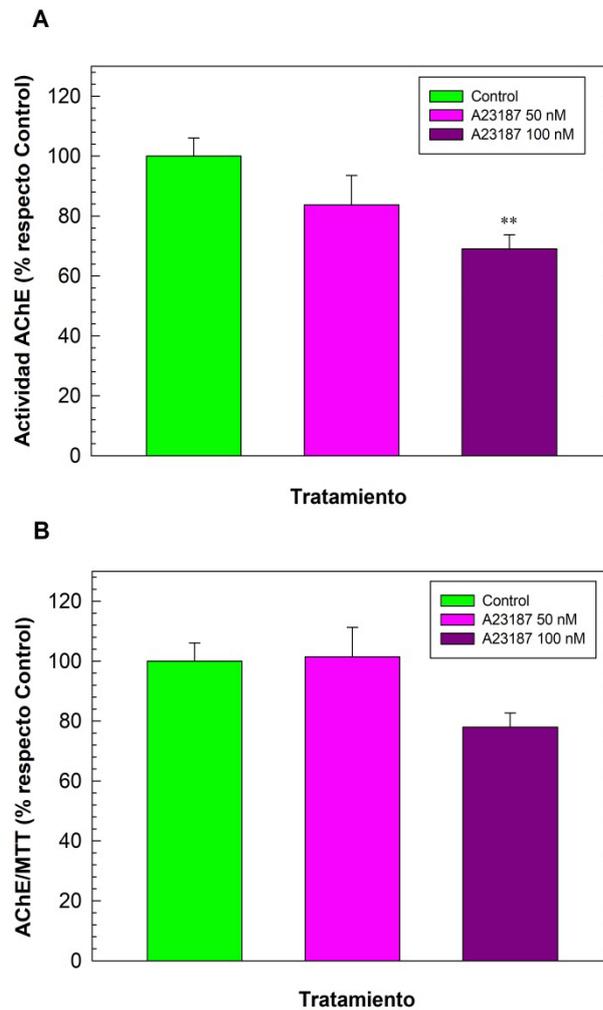


Figura III.34. Efecto del ionóforo A23187 sobre la actividad AChE de células Caco-2. Las células se trataron con concentraciones crecientes del ionóforo de calcio A23187. Tras 24 h se midió su actividad AChE y se determinó el número de células viables. En **A)** se expresa la actividad AChE en % respecto al control y en **B)** se expresa la actividad AChE normalizada respecto al número de células, en % respecto al control. (**: $p < 0,01$ comparando con el control).

14. EFECTO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS SOBRE LA AChE DE CÉLULAS SW480

Con el fin de comprobar si el aumento de actividad AChE provocado por los agonistas colinérgicos en las células Caco-2 era reproducible en otras líneas celulares de colon, realizamos ensayos con carbacol y oxotremorina M (OxoM) en la línea celular SW480, que como Caco-2 es de adenocarcinoma colorrectal humano.

En la **Figura III.35** se muestra uno de estos experimentos, en el que se midió la actividad AChE en los lisados celulares tras 1 y 2 días de tratamiento con los agonistas. Vemos como el carbacol aumentó mucho la actividad AChE de las células SW480. Cabe destacar que el aumento de actividad respecto al control fue proporcionalmente mayor tras un día de tratamiento (con una actividad AChE de aprox. x2 veces la del control) que a los dos días (x1,6), al igual que ocurría con las células Caco-2 (aprox. x11 veces a un día y x4 tras dos días). No obstante, se observa que el aumento de AChE por carbacol es bastante menor en las SW480 que en las Caco-2, para un mismo tiempo de incubación.

Como en las Caco-2, la oxotremorina M también ejerce un efecto inductor de la actividad AChE en las células SW480 (**Fig. III.35**). El porcentaje de actividad AChE respecto al control fue aumentando progresivamente con la concentración de oxotremorina (0,2-1 mM), tanto a uno como a dos días de tratamiento, alcanzándose un aumento del 30-40 % para 1 mM OxoM. Sin embargo, el efecto de OxoM no llegó a alcanzar el del carbacol.

Posteriormente, se empleó la atropina, antagonista muscarínico, para ver si reducía el efecto de la OxoM. Nótese que el carbacol es agonista tanto muscarínico como nicotínico, mientras que OxoM sólo actúa sobre receptores muscarínicos (Ohtani y col., 2009). Ya habíamos observado que la atropina reducía ligeramente la inducción por OxoM en las Caco-2 (**Fig. III.20**). En el caso de las SW480 (**Fig. III.36**), la atropina también parece disminuir ligeramente el aumento de la actividad AChE por OxoM. Los efectos de OxoM y atropina demuestran la participación de receptores muscarínicos en la sobre-regulación de AChE por agonistas colinérgicos, sin que eso descarte la participación de los receptores nicotínicos. De hecho, como vimos para las Caco-2 (**apdo. III.8.2**), que el efecto máximo conseguido con OxoM sea bastante inferior al del carbacol apoya que el carbacol actúa mediante ambos tipos de receptores, lo mismo que ocurre, por ejemplo, en células de insulinooma (Ohtani y col., 2009).

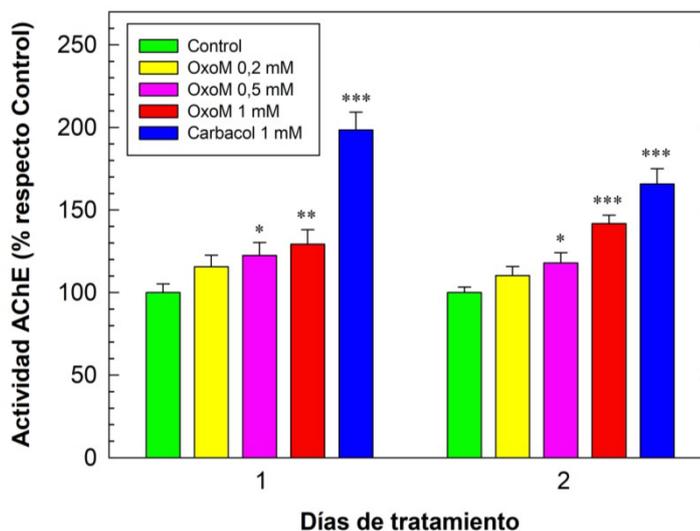


Figura III.35. Efecto de la oxotremorina M sobre la actividad AChE en las células SW480. Las células se incubaron con oxotremorina M en distintas concentraciones o con carbacol. A los 1 y 2 días de tratamiento se midió su actividad AChE. En la figura se indica la actividad AChE obtenida, en % respecto al control para cada día. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ y ***: $p < 0,001$ comparando con el control para su tiempo de tratamiento).

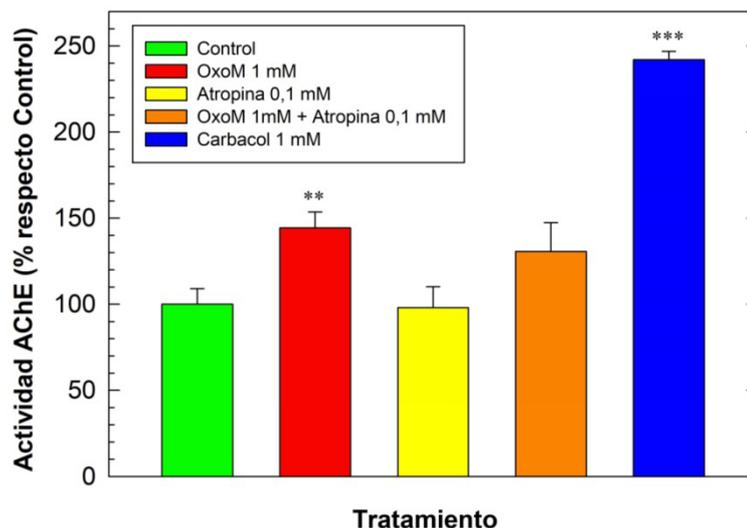


Figura III.36. Efecto de la atropina sobre la actividad AChE en las células SW480 tratadas con oxotremorina M. Las células se preincubaron con atropina 30 min antes de añadir la oxotremorina M. Tras 24 h de tratamiento se midió su actividad AChE. En la figura se indica la actividad AChE obtenida. (**: $p < 0,01$ y ***: $p < 0,001$ comparando con el control).

15. EXPRESIÓN DE LOS DISTINTOS mRNA PARA AChE EN CÉLULAS SW480

Por otro lado, al igual que se investigó en las Caco-2 qué mRNA de AChE y de AChR se expresaban en esas células y si había algún cambio en su abundancia tras el tratamiento con carbacol, se realizó un estudio similar en SW480.

En las SW480, se observó una menor expresión de los distintos mRNA de AChE en comparación con los datos obtenidos para las Caco-2 (**Fig. III.10**). No obstante, el mensajero más abundante, en cuanto a las variantes en 3', seguía siendo el AChE-H, con unas 5 copias por millón de copias de GAPDH, seguido del transcrito AChE-T, con unas 4 copias, y el transcrito AChE-R, con unas 2 copias. Respecto a las variantes en 5', también predominaron los mRNA con el exón E1c, con unas 20 copias, sobre los mensajeros con E1e, con unas 7 copias, de modo parecido a lo que sucedía en Caco-2. En cuanto al contenido total de mRNA de AChE (con cebadores dirigidos hacia la zona común, lo que llamamos AChE-wh), fue de unas 55 copias por millón de copias de GAPDH (**Fig. III.37**).

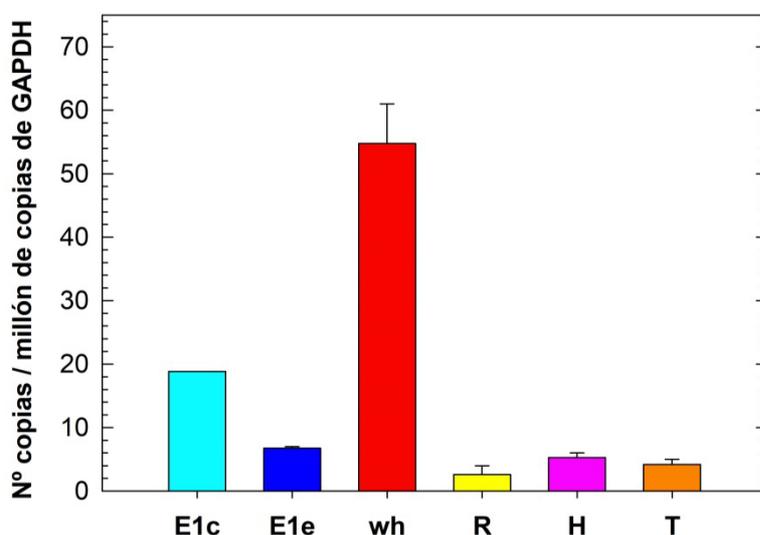


Figura III.37. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE en las células SW480. El histograma muestra el número de copias de cada transcrito de AChE, expresado en número de copias respecto al número de copias de GAPDH-mRNA.

La **Figura III.38** muestra los cambios en la expresión de los mRNA de AChE en las células SW480 en un experimento de tratamiento con carbacol. Se observa un ligero aumento en el contenido de transcritos T (40%) y una tendencia a disminuir en los transcritos con E1c (-15%). Lo más destacable es que el contenido total de mRNA de AChE (AChE-wh) pareció aumentar aunque sólo ligeramente (13%), una subida insuficiente para explicar por sí sola el aumento de actividad AChE. Cambios en otras etapas de la síntesis de AChE activa deben ser responsables del aumento de actividad tanto en las SW480 como en las Caco-2 (**apdo. III.4.1**). Una posibilidad es una modificación en la velocidad de traducción del mRNA, por cambios en el contenido en miRNA reguladores de AChE (Lu y col., 2013).

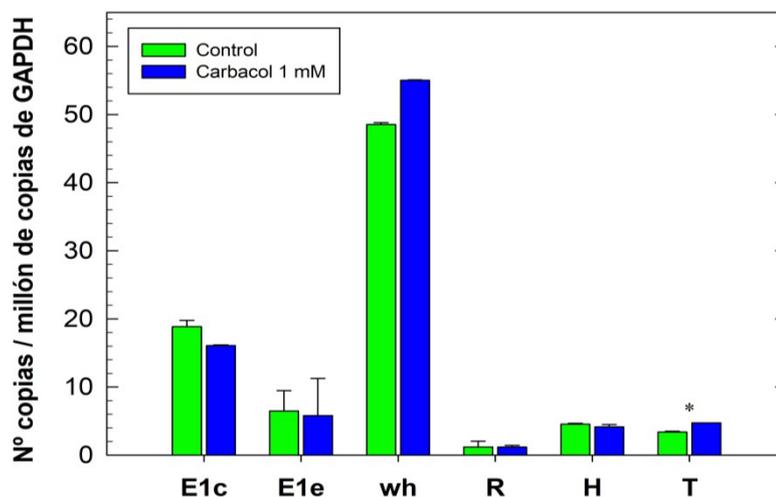


Figura III.38. Efecto del carbacol sobre los transcritos de AChE en SW480. Las células se incubaron con carbacol 1 mM durante 4 h. El histograma representa el número de copias de los distintos mensajeros de AChE que expresan las células SW480, con relación al número de copias del mensajero de GAPDH. (*: $p < 0,05$ comparando con el control).

16. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ACh EN CÉLULAS SW480

16.1. AChR-mRNA en células SW480 control

Investigamos a continuación la dotación de mRNAs para las subunidades de nAChR y para los mAChR en las células SW480, mediante RT-PCR a tiempo real. En

la **Figura III.39** se muestran los resultados, y en la **Tabla III.1** se comparan con los obtenidos para células Caco-2 (**apdo. III.10.1**).

En SW480 encontramos cantidades importantes de los mRNA para varias subunidades del nAChR, destacando muy especialmente la subunidad $\beta 1$, con unas 2.300 copias por millón de copias de GAPDH-mRNA, y la $\alpha 5$, con unas 2.000 copias. También se observó un contenido abundante de los mRNA para las subunidades $\alpha 3$ (380 copias), $\beta 2$ (240), $\beta 4$ (225 copias), $\alpha 7$ (70 copias) y $\alpha 1$ (50 copias por millón). Entre los receptores muscarínicos, encontramos expresión del mRNA para M3, con unas 280 copias, y M1, con ~15. Para el resto de los AChR analizados, se obtuvo un número muy bajo (<5) de copias de mRNA, o no se detectaron.

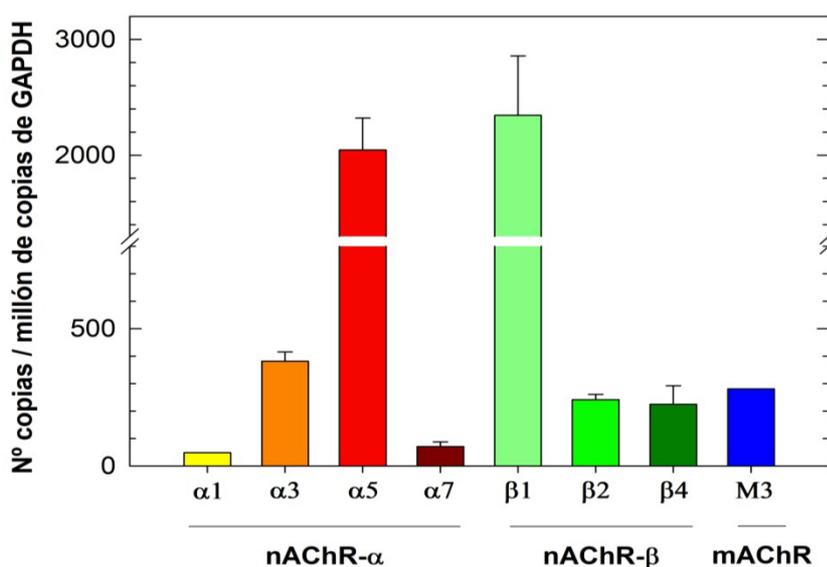


Figura III.39. Cuantificación relativa de los principales mensajeros de AChR expresados en las células SW480. El histograma muestra el número de copias de cada transcrito de AChR expresado respecto al número de copias de GAPDH-mRNA.

En la **Figura III.40** se muestran geles de agarosa de los productos de la RT-PCR de células SW480 (tras 50 ciclos). Previamente ya mostramos geles de productos de RT-PCR de las Caco-2 (**Fig. III.7**). Realmente, para saber si un par de primers amplifica el producto deseado es indiferente que este test se realice con unas células u otras, siempre que contengan el mRNA diana, pero nos sirve como confirmación adicional de la presencia de un mRNA en las SW480.

En la **Figura III.40** se aprecia que algunos pares de primers no dan para las células SW480 un producto del tamaño esperado (caso de los primers para M2) o bien dan además otros productos (como los de $\alpha 2$ y $\alpha 9$). Pero en esos casos la curva de fusión ya advertía de que la reacción no había ido bien, además de que el Ct no era especialmente alto. No se dan valores del número de copias para ellos, pero probablemente son mensajeros que no están presentes en la muestra o lo están en cantidad mínima, lo que facilita los alineamientos inespecíficos de los cebadores.

Comparando la expresión de AChR-mRNA en SW480 con la de Caco-2 (**Tabla III.1; Figs. III.27 y III.39**), se observan diferencias importantes. Las tres subunidades de nAChR con expresión significativa en Caco-2, $\alpha 1$, $\alpha 5$ y $\beta 4$, son mucho más abundantes en las SW480. Además, varias subunidades apenas detectadas en Caco-2 se expresan mucho en SW480, sobre todo $\beta 1$, pero también $\alpha 3$, $\alpha 7$ y $\beta 2$ (**Tabla III.1**). El receptor muscarínico M3 se expresa muy poco en Caco-2, y en cambio su mRNA abunda en SW480; el receptor M1 ni siquiera se detectó en las Caco-2 y no es muy escaso en las SW480. Es frecuente que haya diferencias en la dotación de receptores entre líneas celulares del mismo origen; por ejemplo, M3 se expresa fuertemente en las células H508 y también en las HT-29, pero está ausente de las células SNU-C4, siendo las tres líneas de cáncer de colon (Belo y col., 2011).

A

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha 7$	$\alpha 9$	$\alpha 10$
Caco-2	23	ND	<5	<5	737	ND	<5	ND	ND
SW480	48	ND	381	<5	2.045	<5	71	ND	<5

B

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	M1	M2	M3	ChAT
Caco-2	<5	<5	ND	6	ND	ND	<5	ND
SW480	2.344	242	ND	225	16	ND	281	ND

Tabla III.1. Comparación de los mensajeros de AChR presentes en células SW480 y Caco-2. Los transcritos de los que no se obtuvieron copias se han indicado como “ND” (no detectado), los que dieron un número de copias menor de 5 (por millón de copias de GAPDH-mRNA) se indican como “<5”, y de los que se obtuvieron más de 5 copias, se indica el número de copias. En la tabla **A**) se muestran los mensajeros para subunidades α de nAChR y en la tabla **B**) los mensajeros para subunidades de tipo β , además de para mAChRs y ChAT.

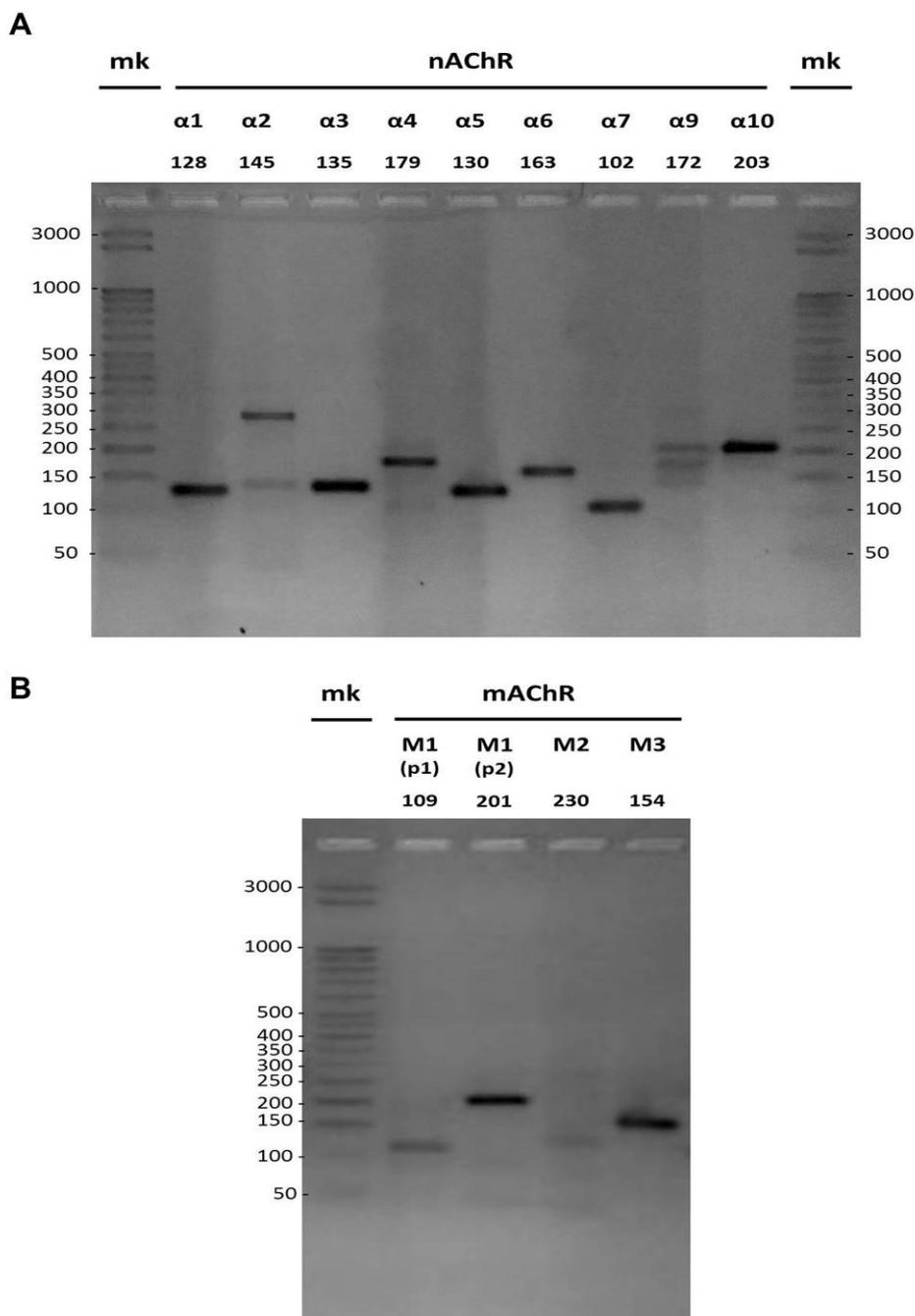


Figura III.40. Tamaño de los productos amplificados mediante RT-PCR, a partir de células SW480. Los productos de RT-PCR obtenidos a partir de células SW480 se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, y se compararon con marcadores de longitud de DNA (mk). Sobre cada calle se indica el mensajero al que se dirigen los cebadores, y la longitud esperada del producto (pb). **A)** Productos obtenidos para las subunidades α de los receptores nicotínicos. **B)** Productos para los receptores muscarínicos. En el caso del receptor M1 se muestran los productos obtenidos con dos pares de primers distintos.

16.2. Receptores de ACh en células SW480

Como comentamos para el caso de $\alpha 5$ en Caco-2, en las células SW480 vuelve a sorprender mucho que las subunidades de nAChR con los mRNAs más abundantes sean precisamente $\alpha 5$ y $\beta 1$, ya que estas subunidades (lo mismo que la $\beta 3$, que no detectamos) se localizan en el pentámero en la llamada quinta posición, y no participan en sitios de unión del agonista (Albuquerque y col., 2009). Además, $\beta 1$ es típica del receptor de tipo muscular. No obstante, ya se conocía la presencia de los mRNA para $\alpha 5$ y $\beta 1$ en la línea de colon HT-29 (Summers y col., 2003). Y hay otras pruebas de que no son exclusivas del músculo. Por ejemplo, las células epiteliales malignas de mama MCF7 expresan los mRNA para las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ y ϵ (y otras), mientras que las no malignas MCF10A no expresan $\alpha 1$ (Kalantari-Dehaghi y col., 2015). Además, las cuatro subunidades del nAChR de tipo muscular $\alpha 1$, $\beta 1$, δ y ϵ se han detectado tanto en el epitelio de las vías aéreas como en melanocitos (Wessler y Kirkpatrick, 2008) y en fibroblastos (Carlisle y col., 2004)

La mayor diversidad de AChR-mRNAs en las células SW480 que en las Caco-2 supone la posibilidad de que se generen más tipos de receptores en las SW480. La gran abundancia de $\beta 1$ -mRNA, junto a la presencia no pequeña de $\alpha 1$ -mRNA, hace probable la formación de AChR de tipo muscular, sea embrionario $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ o adulto $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$.

El segundo mRNA más abundante es el de la subunidad estructural $\alpha 5$. Las subunidades $\alpha 5$ se encuentran, por ejemplo, en receptores $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ y $\alpha 3\beta 4\alpha 5$, que existen de modo natural (Wu y Lukas, 2011). El ganglio ciliar de pollo contiene receptores $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ y $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ (Conroy y Berg, 1995); y las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano expresan receptores $\alpha 3\beta 2\alpha 5^*$, que podrían contener o no $\beta 4$ ($\alpha 3\beta 2\alpha 5$ y/o $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$), y receptores $\alpha 3\beta 4^*$, sin o con $\alpha 5$ ($\alpha 3\beta 4$ y/o $\alpha 3\beta 4\alpha 5$) (Wang y col., 1996). Caso de existir receptores $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ en las SW480, explicarían la presencia de cuatro de los nAChR-mRNA observados en estas células. Eso no excluye que haya otros receptores de composición más sencilla, como los receptores $\alpha 3\beta 4$, que son típicos del sistema nervioso autónomo (Gahring y Rogers, 2006), aunque probablemente se expresan en otros tejidos, como el tejido linfoide (Gotti y Clementi, 2004).

Otro posible receptor es el homopentámero $\alpha 7$, que junto con $\alpha 4\beta 2$ es el tipo de nAChR más abundante en cerebro (Gotti y col., 2006), y cuyo mRNA no es escaso en SW480. Apoyando esta posibilidad, otros autores han descrito la presencia de receptores $\alpha 7$ funcionales en Caco-2 y otras líneas de cáncer de colon (Cucina y col.,

2012; Dinicola y col., 2013), pero conviene señalar que la atribución a $\alpha 7$ se basa en los efectos de α -bungarotoxina, una toxina que es antagonista del receptor $\alpha 7$ pero también del receptor de tipo muscular y del $\alpha 9$ (Zouridakis y col., 2009). Además, se ha visto la presencia del receptor $\alpha 7$ en la línea celular de colon HT-29 por inmunocitoquímica (Pettersson y col., 2009a) y por RT-PCR (Summers y col., 2003; Wong y col., 2007a), así como por inmunohistoquímica en células epiteliales de colon en biopsias humanas (Novotny y col., 2011).

Por otra parte, en SW480 detectamos el mRNA para el receptor muscarínico M3, presente en Caco-2, pero a un nivel mucho menor. Este mAChR ejerce un notable papel regulador en las células epiteliales de colon (von Rosenvinge y Raufman, 2011) y se expresa fuertemente en la línea de colon H508 (Cheng y col., 2003), por lo que es probable su presencia en SW480. Su presencia en Caco-2 la hemos demostrado por Western blotting (**apdo. III.12**).

16.3. Efecto del carbacol sobre los AChR-mRNA de SW480

Tras analizar qué tipo de receptores se expresaban en SW480, se investigó si el carbacol afectaba a su expresión. Como muestra la **Figura III.41**, el carbacol causa una ligera disminución en el número de copias de los mRNA para las subunidades $\alpha 3$ (-14%), $\beta 1$ (-23%), $\beta 2$ (-37%) y $\beta 4$ (-25%). La expresión del resto de subunidades no cambia de forma destacada por el agonista. Los cambios observados bien pueden reflejar mecanismos regulatorios de los nAChR frente a la sobreexposición prolongada a un agonista.

17. DISCUSIÓN GENERAL

Tras describir los distintos experimentos realizados, a continuación se va a discutir la información aportada, y algunos futuros experimentos que se plantean.

17.1. AChE de las células Caco-2

A lo largo de esta memoria hemos mostrado que las células Caco-2 tienen actividad AChE. Durante los primeros ~6 días en cultivo la actividad AChE es muy baja, pero va subiendo mucho según se prolonga el tiempo en cultivo (**Fig. III.3.A**), no ya por el

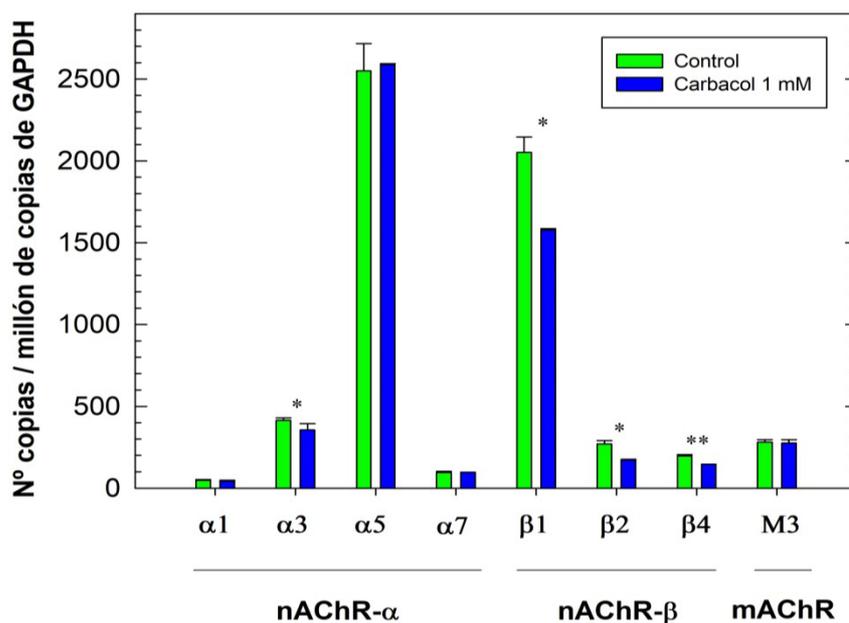


Figura III.41. Diferencias en la expresión de los mensajeros de AChR tras el tratamiento con carbacol de las células SW480. Las células se incubaron con carbacol 1 mM, durante 8,5 h. En la figura se muestra el número de copias de los principales AChR-mRNAs expresados en SW480, respecto al número de copias de GAPDH-mRNA. (*: $p < 0,05$ y **: $p < 0,01$ comparando con el control).

aumento en el número de células sino por el paulatino aumento de la actividad AChE por célula (**Fig. III.3.C**).

Los análisis de sedimentación en gradientes de sacarosa (**Fig. III.12**) revelaron que la AChE de las Caco-2 se compone exclusivamente de formas ligeras, con coeficientes de sedimentación de 3,5S y 5,0S en gradientes con Triton X-100, y de 2,5S y 4,0S en gradientes con Brij 96. El cambio de coeficiente en función del detergente revela que son moléculas de AChE anfifílicas, G_1^A y G_2^A , estando ambas en proporción similar. Sabíamos que estas formas ligeras anfifílicas de AChE suponen la mayoría de la actividad AChE en muestras de colon humano sano, y más aún en muestras cancerosas (Montenegro y col., 2006), siendo probablemente las únicas formas de AChE de origen epitelial. Con todo probabilidad, la AChE de las células Caco-2 tiene glicosilfosfatidilinositol (GPI) como anclaje a la membrana, y por tanto está constituida por subunidades de tipo H, considerando su carácter anfifílico y el hecho de que las formas homólogas G_1^A y G_2^A de colon cambian su coeficiente de sedimentación por el tratamiento con PI-PLC (Montenegro y col., 2006).

Los ensayos de RT-PCR mostraron que las células Caco-2 expresan las tres variantes 3' de mensajeros de AChE: H, T y R (**Fig. III.10**). En principio, a nivel de transcripción, las Caco-2 serían capaces de producir los tres tipos de subunidades. No obstante, la variante 3' más abundante es la AChE-H, lo que concuerda con el hecho de que las formas de AChE en Caco-2 sean moléculas ligeras con GPI. Hemos visto que también en las células SW480 se expresan las variantes H, T y R de AChE-mRNA, y es la AChE-H la variante 3' más abundante (**Fig.III.37**). Y lo mismo ocurre en muestras de colon humano (Montenegro y col., 2006).

En cuanto a las variantes 5' de AChE-mRNA, tanto en las células Caco-2 (**Fig. III.10**) como en las SW480 (**Fig. III.37**) predominaron los mensajeros clásicos, con el exón E1c, pero también se expresan mensajeros con el exón E1e. El exón E1e contiene un sitio de inicio de la traducción AUG que conserva el marco de lectura del AUG clásico del exón 2, por lo que los mRNA con E1e codifican subunidades N-extendidas de AChE, con aminoácidos adicionales que incluyen los 66 codificados por el E1e y los 31 del péptido señal conservado (Meshorer y col., 2004; Meshorer y Soreq, 2006). Ello abre la posibilidad de que Caco-2 y SW480 generen subunidades N-extendidas de AChE, en las que la N-extensión constituya el anclaje a la membrana (Meshorer y col., 2004; Montenegro y col., 2017). Será interesante investigar la presencia de estas subunidades a nivel de proteína, mediante Western blotting con anticuerpos contra la N-extensión de AChE humana, de un modo análogo al empleado para detectar AChE N-extendida en balsas lipídicas (rafts) de hígado de ratón (Montenegro y col., 2017), o por inmunoprecipitación. Aunque la mayor masa molecular de la subunidad N-extendida -con 97 aminoácidos adicionales, unos 10 KDa- podría permitir distinguirla de la subunidad clásica en un Western blot, puede que fuera difícil su identificación a causa de las diferencias de tamaño entre las subunidades de AChE debidas a la glicosilación. Además, habrá que tener en cuenta el elevado pI de la extensión (11,8) (Meshorer y col., 2004), que puede provocar un mayor Pm aparente en una electroforesis con SDS, como ocurre con las histonas.

Por Western blotting con dos anticuerpos contra AChE (31329 y N-19) hemos detectado una banda principal de AChE de 66 KDa, junto con otras de 57-52 KDa, que pueden corresponder al fragmento de AChE de 55 KDa descrito por otros autores (Xie y col., 2011).

17.2. Sobrerregulación de AChE por carbacol o BW

El tratamiento de las células Caco-2 con el agonista colinérgico carbamilcolina (carbacol) o con el inhibidor reversible específico de AChE BW284c51 (BW) durante uno o varios días aumentó mucho la actividad AChE de las células (**Figs. III.3 y III.1**). A este fenómeno lo llamamos sobrerregulación de AChE.

El carbacol es un agonista colinérgico, mixto muscarínico y nicotínico, por lo que su efecto sobrerregulador sugería la participación de los receptores de acetilcolina en la regulación de la AChE de las células Caco-2. El carbacol, al unirse a receptores muscarínicos y/o nicotínicos, desencadenaría directamente su efecto. Pensamos que el BW, en cambio, actúa sobre los AChR de un modo indirecto. Se sabe que las células Caco-2 y otras líneas celulares de colon sintetizan y liberan al medio ACh (Cheng y col., 2008), como ocurre con células de cáncer de pulmón (Song y col., 2008) e hígado (Zhao y col., 2011) y otras células no neuronales (**apdo. III.1**). Para detectar la liberación de ACh por las células de colon se necesitó usar eserina para inhibir la AChE celular (Cheng y col., 2008). De modo que en condiciones normales la ACh liberada por las Caco-2 será hidrolizada por la AChE, de tal forma que su concentración en el medio de cultivo se mantendrá muy baja. En cambio, en las células expuestas a BW la ACh liberada se irá acumulando en el medio de cultivo al no ser hidrolizada por la enzima. Será esta ACh la que, al unirse a los AChR muscarínicos y/o nicotínicos, ponga en marcha el mecanismo sobrerregulador de AChE. Según esta hipótesis, el efecto del BW reflejará el efecto de los agonistas colinérgicos sobre la actividad AChE, lo mismo que en el caso del carbacol. De hecho, el efecto conjunto de carbacol y BW fue el mismo que el de carbacol solo (**Fig. III.2**), lo que apoya que ambos agentes actúan por un mecanismo común. Además, hemos comprobado que la adición de ACh al medio de cultivo (tanto en presencia como en ausencia de BW) produce un aumento muy notable (y concentración-dependiente) de la actividad AChE (**Fig. III.19**). Ello confirma que la preservación de la ACh producida por las propias células al inhibir la AChE por el BW pueda ser la base del efecto sobrerregulador del BW, a la vez que confirma que los receptores de acetilcolina están implicados en la regulación de la AChE de las células de colon.

En efecto, tiene sentido fisiológico que en vivo una exposición continuada a la acetilcolina, con su consiguiente acción sobre los AChR, desencadene un proceso que conduzca a aumentar los niveles de AChE, para que se acelere la hidrólisis de la ACh con el fin de restablecer un estado normal de activación colinérgica. El carbacol, un análogo de la ACh, desencadenaría ese mismo proceso *in vitro*. Considerando las

consecuencias de la activación de los receptores nicotínicos y muscarínicos del colon sobre la proliferación, apoptosis y otros procesos (Cucina y col., 2012; Pettersson y col., 2009a; Raufman y col., 2008; Belo y col., 2011; Novotny y col., 2011), queda clara la importancia del mantenimiento del nivel de ACh dentro de unos límites para una adecuada activación colinérgica pero evitando los efectos indeseables de la sobreactivación. A lo largo de esta memoria hemos investigado este mecanismo regulador de AChE por agonistas colinérgicos.

No obstante, aunque el BW probablemente actúa elevando el nivel de ACh en el medio, cabe pensar como alternativa en una unión directa del BW a los receptores nicotínicos. En este sentido, es bien conocida la unión de ciertos inhibidores de AChE, como fisostigmina (eserina) y galantamina, a los nAChR (Albuquerque y col., 2009; Arias, 2000). Estos agentes pueden actuar como ligandos potenciadores alostéricos (APL) nicotínicos, es decir, facilitando la activación de los nAChR por el agonista endógeno, pero también directamente como agonistas, provocando la apertura del canal, por lo que se les dio el nombre de agonistas no competitivos (NCA). La activación de los nAChR por galantamina o fisostigmina no es sensible al bloqueo por antagonistas competitivos de los nAChR (como metillicaconitina, mecamilamina, o bungarotoxina), y se detecta aunque los receptores estén desensibilizados por una alta concentración de agonista. Esta acción como NCA se debe a su unión a un sitio cercano al sitio de unión de ACh a las subunidades alfa, pero distinto de él. Piridostigmina, neostigmina y edrofonio son otros inhibidores de AChE que pueden activar los nAChR. Los ALP nicotínicos tienen un nitrógeno que es catiónico a pH fisiológico (Albuquerque y col., 2009). Estos datos nos hicieron pensar que el BW pudiera unirse al nAChR. Efectivamente, se ha descrito recientemente la interacción del BW con el nAChR muscular expresado en células de meduloblastoma/rabdomiosarcoma (Sepsova y col., 2014). No obstante, el BW se comportaba como antagonista, disminuyendo la amplitud de la respuesta a ACh en ensayos de *patch-clamp*, con una IC₅₀ para nAChR muy superior a la que se obtuvo para AChE (5,6 μM y 30 nM, respectivamente). Aunque el resultado de este estudio apoya la posibilidad de que el efecto sobrerregulador de AChE del BW se deba a su unión directa a los nAChR, esta acción directa se debería a provocar una menor apertura del canal, una acción similar a la de la desensibilización por exposición prolongada a un agonista.

17.2.1. Estudio farmacológico de los AChRs implicados en la sobreregulación de AChE

Un primer paso para aclarar el mecanismo de regulación de AChE por agonistas colinérgicos es identificar los AChRs que inician el proceso. Abordamos este aspecto probando distintos agonistas y antagonistas de los receptores, y determinando la expresión a nivel de mensajero de una serie de receptores muscarínicos y de subunidades de receptores nicotínicos.

Los tratamientos con el agonista muscarínico oxotremorina M aumentaron la actividad AChE tanto de las células Caco-2 (**Fig. III.20**) como de las SW480 (**Fig. III.35**) de un modo dependiente de la concentración, aunque el efecto fue menor que el del carbacol. Además, el antagonista muscarínico atropina redujo el efecto sobreregulador del BW (**Fig. III.23**), del carbacol (**Fig. III.25**) y de la OxoM (**Fig. III.36**). Estos datos demuestran la participación de los receptores muscarínicos en la sobreregulación, siendo el mAChR M3 el candidato más probable, dada su expresión en ambas líneas (**Figs. III.28 y 39**) y la importancia fisiológica de M3 en células de colon (Cheng y col., 2008; Nathanson, 2008). Se podrá confirmar si el mAChR implicado es M3 si se dispone de agentes específicos de subtipo, como los antagonistas pirenzepina (M1), metoctramina (M2), 4-DAMP (M3), tropicamida (M4) y ML381 (M5) (Cheng y col., 2008; Yang y col., 2014; Gentry y col., 2014), o mediante siRNA contra M3-mRNA.

La nicotina es un agonista general de los nAChR, mientras que la colina es agonista especialmente de los nAChR $\alpha 7$. Tanto la nicotina como la colina aumentaron la actividad AChE de las células Caco-2 (**Figs. III.21 y 22**), lo cual demostró que los receptores nicotínicos también intervienen en la regulación de los niveles de AChE. Pensamos que entre los subtipos implicados figuran los receptores homoméricos nAChR $\alpha 7$, dado el efecto de colina y el hecho de que la subunidad $\alpha 7$ se exprese en Caco-2 y más aún en las SW480. Pero probablemente otros subtipos de nAChR también participan en la sobreregulación de AChE (citados en **apdo. III.17.2.2**).

Los antagonistas nicotínicos empleados no fueron capaces de bloquear el efecto sobreregulador de carbacol o BW (**Figs. III.25 y 26**). Por una parte, considerando el largo periodo de tratamiento pensamos que la competencia con el agonista, unida a los equilibrios de asociación-disociación, pueden permitir que el agonista se una al receptor y lo active, a pesar de la presencia del antagonista. Además, la extremada variación de afinidad por antagonistas que los distintos nAChRs presentan hace probable que algunos subtipos escapen al efecto del antagonista. A esto hay que

añadir la desensibilización del nAChR que ocurrirá durante estos tratamientos prolongados, que puede complicar la situación; más aún considerando la diferente propensión a la desensibilización de los distintos subtipos de nAChR (Gahring y Rogers, 2006; Albuquerque y col., 2009).

17.2.2. Dotación de receptores de ACh en las células Caco-2 y SW480

Para intentar conocer los posibles receptores candidatos a intervenir en la sobreexpresión de AChE, estudiamos la expresión de las distintas subunidades de nAChRs, así como de los mAChRs M1-M3, en las células Caco-2 y SW480 mediante RT-PCR (**apdos. III.10.1 y 16.1**). El abordaje por RT-PCR nos facilitaba el estudio sin necesidad de adquirir anticuerpos contra las 16 proteínas investigadas.

El contenido de los diversos mRNA se resume en la **Tabla III.1 (apdo. III.16.1)**. Vemos que la subunidad $\alpha 1$ se expresa de modo apreciable (20-50 copias) en ambos tipos celulares, mientras que la subunidad $\beta 1$ se detecta en niveles muy bajos en las Caco-2, pero es muy abundante (>2.000 copias) en las células SW480. Por ello, pensamos que ambas células pueden formar receptores de tipo muscular. Recordemos que las cuatro subunidades del nAChR muscular se expresan también en células no musculares, como células de mama, epitelio aéreo y melanocitos (Kalantari-Dehaghi y col., 2015; Wessler y Kirkpatrick, 2008; Carlisle y col., 2004). En el futuro exploraremos la expresión de las subunidades δ , ϵ y γ .

El mRNA para la subunidad $\alpha 7$ se expresa en células Caco-2 y a mayor nivel en las SW480, lo que, unido al efecto sobreexpresor de colina en las células Caco-2 (**Fig. III.22**), sugiere fuertemente la presencia de receptores homoméricos $\alpha 7$ en estas células. No obstante, conviene recordar que la colina es agonista de los nAChR $\alpha 7$ pero también de los $\alpha 3\beta 4\beta 2$ (Albuquerque y col., 2009).

Es mucho más difícil proponer tipos de receptor para las otras subunidades de nAChR expresadas en Caco-2 y SW480 (**Tabla III.1**). Los mRNA para la subunidad $\alpha 5$ son los más abundantes en Caco-2, y su cantidad es aún mayor en las SW480 (700-2000 copias). No obstante, las subunidades $\alpha 5$ carecen de sitios de unión a ACh, de modo que el receptor debe tener otros tipos de subunidades α y β . Las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\beta 4$ se expresan con baja abundancia en las Caco-2, pero en cantidad apreciable (>200 copias) en las SW480. Por su parte, las subunidades $\alpha 4$ se expresan a bajo nivel en las dos líneas.

Los mRNA para $\alpha 3$ y $\beta 4$ son abundantes en el sistema nervioso autónomo, mientras que los mensajeros para $\alpha 4$ y $\beta 2$ destacan en el SNC (Albuquerque y col.,

2009). Varios receptores pueden formarse con estas subunidades. Por ejemplo, tanto $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ como $\alpha 4\beta 2$ se presentan en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado, $\alpha 3\beta 4$ aparece en hipocampo y glándula pineal (Gotti y col., 2006), y receptores $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ y $\alpha 3\beta 4\beta 2$ existen en ganglio cervical superior (David y col., 2010). Hay receptores $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ en ganglio ciliar de pollo (Conroy y Berg, 1995). La presencia de receptores $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ y $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ en las células Caco-2 y SW480, a los que se podrían unir los $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$, explicaría la expresión de todos estos mensajeros, y la abundancia de $\alpha 5$ -mRNA.

En cuanto a los receptores muscarínicos, el M3-mRNA se expresa en Caco-2 y más intensamente (280 copias) en SW480. Sólo en las SW480 se detecta el M1-mRNA. Los receptores M3 juegan un importante papel en el control de la proliferación de las células de colon (Yang y Frucht, 2000; Cheng y col., 2003; Raufman y col., 2008), aunque su expresión depende de la línea celular (Frucht y col., 1999; Belo y col., 2011). La interacción de carbacol con los receptores M3 eleva el calcio citosólico en células de colon H508 (Frucht y col., 1999). Pensamos que estos receptores M3 producen el aumento de AChE en células Caco-2 y SW480 tratadas con oxotremorina M (**Figs. III.20 y 35**), y contribuyen al efecto del carbacol.

En nuestro estudio, sólo la presencia de receptores de tipo M3 ha sido confirmada a nivel de proteína en las células Caco-2 (**Fig. III.29**). La producción de otros tipos de receptores, al menos de aquéllos cuyo mRNA es más abundante en las células empleadas, debe ser objeto de futuros estudios, pero eso requerirá disponer de los anticuerpos adecuados.

17.2.3. Traducción de AChE y sobreexpresión por agonistas

Una cuestión importante es el mecanismo que lleva desde la interacción del agonista con los AChR hasta el aumento de actividad AChE. Y a este respecto nos preguntamos: ¿qué etapa del proceso de producción de AChE catalíticamente activa se ve afectada por los agonistas? Entre otros procesos, los agonistas podrían aumentar la tasa de transcripción del mRNA o de síntesis de la cadena polipeptídica, o bien favorecer la adquisición de la conformación activa de la proteína (**apdo. III.2**) (Zhu y col., 2007a; Marrero y col., 2011; Rotundo, 1988).

La inhibición de la traducción con cicloheximida (CHX) impidió la mayor parte del aumento de actividad AChE por el carbacol (**Fig. III.4**). Este resultado demostraba que la sobreexpresión de la AChE por agonistas requiere la síntesis de proteína. Con mucha probabilidad, se necesita la síntesis de nueva proteína AChE, aunque otra

explicación para el bloqueo de la sobrerregulación sería que la CHX impidiera la síntesis de un factor proteico, como una chaperona, que actuara a nivel postraduccional afectando a la cantidad de AChE activa (Ruiz y Rotundo, 2009).

Ensayos de Western blotting con anticuerpos contra AChE mostraron que el tratamiento de las células con BW producía un aumento en la cantidad de AChE (**Fig. III.5**). Estos datos indican que los agonistas (como la ACh) actúan aumentando la síntesis de proteína AChE.

La sobrerregulación de AChE podría deberse a una mayor expresión del gen *ACHE*. Sin embargo, la cuantificación relativa de los mRNA para AChE en células control y tratadas con carbacol o BW (**Fig. III.11**) reveló sólo pequeñas diferencias en la cantidad del mensajero AChE-wh, que no se correspondían con el fuerte aumento de la actividad por los agentes. Se podría pensar que si los agentes causaran una mayor tasa de transcripción, ésta se podría adelantar bastante en el tiempo al aumento de actividad AChE. No obstante, cuando se cuantificaron los mRNA a tiempos más cortos de tratamiento (desde 2,5 horas; figuras no mostradas) tampoco se vio una elevación suficiente del contenido en AChE-mRNA.

¿Cómo actúan entonces los agentes para aumentar la síntesis de proteína AChE, si no es acelerando la transcripción? La falta de correspondencia entre la cantidad de enzima y la cantidad de mRNA es una observación habitual (Lu y col., 2013; Djuranovic y col., 2011), y son posibles diversas causas. Por ejemplo, se conocen proteínas que regulan la traducción de AChE. Pumilio2 (PUM2) es una proteína presente en la unión neuromuscular y en neuronas, que pertenece a una familia de proteínas de unión a RNA, la familia PUF (Rotundo y col., 2008; Marrero y col., 2011). Estas proteínas se unen a una secuencia octamérica, el elemento de respuesta a Nanos (NRE), presente en la región no traducida 3' (3'UTR) de ciertos mRNAs, como el de AChE. Pumilio2 se une al AChE-mRNA, su sobreexpresión en células musculares reprime la traducción de AChE, y su silenciamiento con siRNAs aumenta la expresión de AChE (Rotundo y col., 2008; Marrero y col., 2011). Estos estudios mostraron que PUM2 regula la traducción de AChE en la unión neuromuscular. Esa inhibición de la traducción de AChE por PUM2 podría cesar tras una apropiada señal sináptica (Rotundo y col., 2008). De hecho, tanto AChE como PUM2 están sometidas a regulación por el nervio motor, de modo que tras la desnervación del músculo aumenta el contenido de PUM2 (Marrero y col., 2011), y baja el de AChE. Cabe pensar que en las células de colon opere un mecanismo similar, de modo que la unión de agonistas a los AChR reduzca los niveles de PUM2 (u otra proteína de esta

familia), y así se desreprima la traducción de AChE. Sería interesante explorar la presencia de PUM2 o PUM1 en las células Caco-2 o SW480.

Otra alternativa es que la traducción de AChE esté inhibida por microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son RNA no codificantes, de unos 20 nucleótidos, que regulan la expresión génica uniéndose a la región 3' no traducida (3'UTR) de su gen diana, lo que conduce a la inhibición de la traducción, seguida de la degradación del mRNA (Shao y col., 2015; Djuranovic y col., 2011; 2012). Al parecer, los miRNA interfieren con el paso de iniciación de la traducción (Djuranovic y col., 2012).

Se conocen varios miRNA reguladores de AChE, tales como miRNA-212 y miRNA-132 (Lu y col., 2013; Shaltiel y col., 2013; Shao y col., 2015; Hanin y Soreq, 2011; Nadorp y Soreq, 2014) (**apdo. I.4.4.**). Por ejemplo, miRNA-212 reduce los niveles de AChE en células de cáncer de pulmón (Lu y col., 2013). Cuando se inhibe el miRNA-134 en células de retina, aumenta la expresión de miRNA-132, y éste disminuye la expresión de AChE (Shao y col., 2015). En biopsias de intestino de ratón expuesto a estrés se han visto cambios en los niveles de miRNA-186 y de AChE-R, que es una de sus posibles dianas (Nadorp y Soreq, 2014). Es posible que la estimulación colinérgica de las células de colon disminuya el nivel de algún miRNA inhibidor de la traducción de AChE, y eso conduzca al aumento de la actividad AChE sin un cambio paralelo en la cantidad de mensajero.

17.2.4. Mecanismo intracelular de la sobrerregulación de AChE por agonistas colinérgicos

¿Qué ocurre en la célula desde la unión del agonista al AChR hasta los cambios en la producción de AChE?

Un gran número de trabajos, especialmente de Zhang y colaboradores, han establecido que la apoptosis suele llevar asociado un aumento de los niveles de AChE (Zhang y col., 2002; Zhang y Greenberg, 2012). Desde el principio de nuestro estudio sabíamos que carbacol y BW no causaban un aumento notable de la apoptosis, ya que no afectaban a la viabilidad celular (**Figs. III.1.B y III.3.B**). Pero además, pudimos descartar que carbacol y BW causaran apoptosis en un número muy pequeño de células, de modo que éstas expresaran muy alta actividad AChE y esas células en apoptosis fueran responsables del aumento de actividad que observamos. Primero, los ensayos de tinción con Hoechst (**Fig. III.15**) demostraron que en las células tratadas con carbacol aparecían frecuentes mitosis, y no se veían células con el núcleo fragmentado como ocurría en las células expuestas a etopósido, un agente inductor de

apoptosis. Además, la tinción histocitoquímica de Karnovsky (**Fig. III.17**) confirmó que el carbacol producía un aumento de actividad AChE generalizado, y no limitado a unas pocas células. De modo que el aumento de AChE no se debe a la inducción de apoptosis.

El calcio es un mensajero intracelular clave para la función de los receptores nicotínicos y muscarínicos, y un importante regulador de la expresión de AChE (**apdos. I.6.4, I.4.4 y III.13.1**). Por ello investigamos el papel del calcio en la sobreexpresión de AChE. Vimos que la preincubación con BAPTA-AM, un quelante de calcio intracelular, redujo mucho el aumento de actividad AChE por el carbacol (**Fig. III.31**). Un efecto parecido de bloqueo tuvo la adición de EGTA, un quelante extracelular (**Fig. III.32**). Esos resultados demostraron que la entrada de calcio extracelular al citosol es necesaria para el efecto sobreexpresor del carbacol. A ese calcio extracelular se le podría unir el calcio liberado desde el retículo endoplásmico.

Hemos visto que agonistas de receptores nicotínicos y muscarínicos provocan sobreexpresión de AChE. Del mismo modo, tanto nAChR como mAChR producen un aumento del calcio citosólico (**apdo. I.6.4 y III.13.1**). Los nAChR al activarse dejan pasar directamente calcio y sodio. El aumento del calcio citosólico puede llevar a la liberación de calcio inducida por calcio (CICR) desde los depósitos intracelulares del retículo endoplásmico. Los mAChR de subtipos M1, M3 y M5 activan la fosfolipasa C, que genera IP₃, el cual se une a sus receptores del RE desencadenando la liberación de calcio. El vaciado de los depósitos de calcio del retículo conduce a la entrada de más calcio extracelular, a través de los canales CRAC. Se ha descrito que en células HT-29/B6 de colon el carbacol provoca la salida de calcio desde el retículo por los receptores de IP₃ y la entrada de calcio extracelular a través de los canales CRAC (Onodera y col., 2013). En Caco-2 y en SW480 hemos detectado los mRNA para M3 y para $\alpha 7$ (**Figs. III.27 y III.39**), el receptor $\alpha 7$ es un nAChR homomérico especialmente permeable al calcio y para el que colina es agonista (**Fig. III.22**), pero cualquier nAChR permite la entrada de calcio. Nuestros resultados con BAPTA-AM y EGTA han revelado que el aumento del calcio citosólico es un paso en la ruta que lleva desde los AChR al aumento de AChE.

Para definir el flujo de calcio en nuestras células, podría probarse si los agentes bloqueantes de los receptores de IP₃ (como 2-APB) o los de rianodina (rojo de rutenio) impiden la sobreexpresión de AChE. También se podría estudiar si inhibidores de la Ca²⁺-ATPasa del retículo como tapsigargina o ácido ciclopiazónico producen aumentos

de AChE sin necesidad de agonistas, al facilitar la liberación del calcio desde el retículo (Onodera y col., 2013).

Está bien establecido el papel regulador del calcio sobre la expresión de AChE en células musculares y nerviosas (Luo y col., 1994; 1999; Choi y col., 2003; Cohen y col., 2004; Sberna y col., 1997) (**apdo. I.4.4.1**). También se ha demostrado este papel en otros tipos de células, como células HeLa (Zhu y col., 2007a; 2007b; Gao y col., 2009). En esta regulación participan diversos factores que se unen al promotor de AChE, como Elk-1, CBF, Smad3 y NFAT, y otras proteínas como la proteasa calpaína y la fosfatasa calcineurina. Estos factores pueden ser objeto de estudio en posteriores trabajos, por ejemplo, probando si inhibidores de calpaína (calpeptina) o de calcineurina (FK506 y ciclosporina A) son capaces de suprimir o atenuar el efecto del carbacol (Zhu y col., 2007b).

Además del calcio, cabe pensar en diversos componentes de cascadas de señalización como candidatos potenciales a participar en la regulación de AChE por los AChR. Por ejemplo, los nAChR activan cascadas de proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK) como Ras/Raf/MEK/ERK, así como la cascada PI3K/Akt, que conducen a la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP1 (c-Jun/c-Fos) (Schaal y Chellappan, 2014; Improgo y col., 2011; Schuller, 2009). A su vez, la cascada de las MAP quinasas y la cascada PI3K/Akt aumentan la expresión de AChE en ciertos modelos celulares (Xie y col., 2009b; Liu y col., 2016). El promotor de AChE tiene sitios de unión para NF- κ B (**Fig. I.5**), y AP-1, y tanto c-Jun como JNK (quinasa N-terminal de c-Jun, una MAPK) son necesarias para la inducción de AChE durante la apoptosis de células de colon SW620 (Deng y col., 2006; Zhang y col., 2008). Actuando experimentalmente sobre elementos de estas cascadas, por ejemplo con inhibidores, esperamos ir descubriendo más pasos del mecanismo regulador de AChE.

Los resultados recogidos en esta memoria han revelado que en células de colon opera un mecanismo de regulación de los niveles de AChE mediado por los receptores de acetilcolina. Más estudios serán necesarios para caracterizar los distintos componentes y etapas del mecanismo, desde los receptores concretos implicados hasta el modo en que se modifica la síntesis de AChE, pasando por la cascada de señalización intracelular que conduce de un momento al otro. Además, interesa conocer si un mecanismo similar actúa en otros tipos celulares.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Tanto el inhibidor de acetilcolinesterasa BW284c51, como el agonista colinérgico carbamilcolina (carbacol), producen un gran aumento de la actividad AChE en las células Caco-2 tras un día de exposición, que se mantiene durante varios días. Es probable que el efecto del BW se deba al aumento de los niveles de acetilcolina por la inhibición de la AChE. Además, la acetilcolina muestra un efecto sobrerregulador de AChE comparable al del carbacol. Estos datos revelan la existencia de un mecanismo regulador de la actividad AChE de las células de colon, que se pone en marcha en respuesta a una exposición prolongada de los receptores de acetilcolina a agonistas.
2. El bloqueo de la sobrerregulación de AChE por un inhibidor de la traducción, cicloheximida, sugiere que la sobrerregulación requiere la síntesis de nueva proteína AChE.
3. Los resultados de Western blot indican que la cantidad de proteína AChE aumenta en células Caco-2 tratadas con BW, lo que confirma que la sobrerregulación de AChE por BW conlleva la síntesis de nueva enzima.
4. En las células Caco-2, la variante 3' de mensajero de AChE más abundante es la de tipo H, la que genera formas con glicosilfosfatidilinositol. Además de variantes 5' con el exón E1c, se expresan mensajeros con E1e, los que codifican AChE N-extendida. Los cambios que producen carbacol y BW en la expresión del gen *ACHE* no explican el aumento observado en la actividad AChE.
5. Los análisis de sedimentación en gradientes de sacarosa revelan que las células Caco-2 sólo contienen formas ligeras anfifílicas de AChE, G₁^A y G₂^A, muy probablemente moléculas con GPI. Los tratamientos con carbacol o con BW no modificaron el patrón de formas moleculares.
6. La tinción con Hoechst muestra que el carbacol no induce apoptosis en las células Caco-2. Además, el teñido histocitoquímico indica que el aumento de actividad AChE por carbacol se produce de forma similar en todas las células tratadas. Esto descarta que la sobrerregulación de AChE por el carbacol se deba a la inducción de apoptosis.

7. Los estudios con agonistas indican que la activación tanto de los mAChRs (con oxotremorina M) como de los nAChRs (con nicotina o colina) produce un aumento de la actividad AChE. Esto sugiere que el carbacol ejerce su acción sobrerreguladora de AChE en Caco-2 actuando sobre ambos tipos de receptores. El efecto de la colina apoya la participación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$.
8. Los tratamientos con quelantes de calcio demuestran un papel del calcio intracelular en el mecanismo de acción del carbacol sobre los niveles de actividad AChE.
9. Los agonistas colinérgicos provocan un aumento de actividad AChE también en la línea de adenocarcinoma colorrectal SW480, aunque de menor intensidad que en las células Caco-2. Esto apoya la idea de que el mecanismo regulador de AChE sea general en las células de colon. La expresión de los mRNA de AChE fue menor en SW480 que en Caco-2, aunque el patrón de las distintas variantes 3' y 5' fue semejante.
10. Los ensayos por RT-PCR indican que las células Caco-2 expresan gran cantidad del mensajero para $\alpha 5$, menor de $\alpha 1$ y $\beta 4$, y baja de M3, $\alpha 7$, $\beta 1$, y otras subunidades nicotínicas. Las células SW480 expresan niveles altos de $\alpha 5$ y $\beta 1$, moderados de $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ y M3, y bajos de otras subunidades. Estos datos, junto con los obtenidos con agonistas, nos llevan a proponer que ambas líneas producen receptores muscarínicos M3 y receptores nicotínicos de los tipos homomérico $\alpha 7$ y muscular, junto a posibles heterómeros $\alpha 3\beta 4\alpha 5$, $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ y $\alpha 4\beta 2\alpha 5$.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abicht, A., Muller, J. S. y Lochmuller, H. (2003). Congenital Myasthenic Syndromes. *Gene Reviews*.
- Abreu-Villaca, Y., Filgueiras, C. C. y Manhaes, A. C. (2011). Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav. Brain Res.* **221**: 367-378.
- Absalom, N. L., Quek, G., Lewis, T. M., Qudah, T., von, A., I, Ambrus, J. I., Harpsøe, K. y otros (2013). Covalent trapping of methyllycaconitine at the alpha4-alpha4 interface of the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor: antagonist binding site and mode of receptor inhibition revealed. *J. Biol. Chem.* **288**: 26521-26532.
- Ackerman, M. S., Roeske, W. R., Heck, R. J. y Korc, M. (1989). Identification and characterization of muscarinic receptors in cultured human pancreatic carcinoma cells. *Pancreas.* **4**: 363-370.
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M. y Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **89**: 73-120.
- Aldridge, W. N. y Reiner, E. (1972). Enzyme inhibitors as substrates. Interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. *Front. Biol.* **26**: 1-328.
- Arefai, W. A., Saksena, S., Tyagi, S., Gill, R. K., Ramaswamy, K. y Dudeja, P. K. (2007). Taurodeoxycholate modulates apical Cl⁻/OH⁻ exchange activity in Caco2 cells. *Dig. Dis. Sci.* **52**: 1270-1278.
- Amenta, F. y Tayebati, S. K. (2008). Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Curr. Med. Chem.* **15**: 488-498.
- Anderson, D. J., Malysz, J., Gronlien, J. H., El, K. R., Hakerud, M., Wetterstrand, C., Briggs, C. A. y Gopalakrishnan, M. (2009). Stimulation of dopamine release by nicotinic acetylcholine receptor ligands in rat brain slices correlates with the profile of high, but not low, sensitivity alpha4beta2 subunit combination. *Biochem. Pharmacol.* **78**: 844-851.
- Anglister, L., Rogozinski, S. y 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. y Silman, I. (1979). Immunological cross reactivity between electric-eel acetylcholinesterase and rat-tail-tendon collagen. *Eur. J. Biochem.* **94**: 25-29.
- Arias, H. R. (2000). Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem. Int.* **36**: 595-645.
- Arias, H. R., Rosenberg, A., Targowska-Duda, K. M., Feuerbach, D., Jozwiak, K., Moaddel, R. y Wainer, I. W. (2010). Tricyclic antidepressants and mecamylamine bind to different sites in the human alpha4beta2 nicotinic receptor ion channel. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**: 1007-1018.
- Arpagaus, M., Kott, M., Vatsis, K. P., Bartels, C. F., La Du, B. N. y Lockridge, O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* **29**: 124-131.
- Arpagaus, M., Combes, D., Culetto, E., Grauso, M., Fedon, Y., Romani, R. y Toutant, J. P. (1998). Four acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Physiol. Paris* **92**: 363-367.

- Aslanian, D., Grof, P., Négrerie, M., Balkanski, M. y Taylor, P. (1987). Raman spectroscopy study on the conformation of 11 S form acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *FEBS Lett.* **219**: 202-206.
- Aslanian, D., Grof, P., Bon, S., Masson, P., Négrerie, M., Chatel, J. M., Balkanski, M., Taylor, P. y Massoulié, J. (1991). A comparative Raman spectroscopic study of cholinesterases. *Biochimie* **73**: 1375-1386.
- Auld, V. J., Fetter, R. D., Broadie, K. y Goodman, C. S. (1995). Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*. *Cell* **81**: 757-767.
- Austin, L. y Berry, W. K. (1953). Two selective inhibitors of cholinesterase. *Biochem. J.* **54**: 695-700.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P. y Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**: 64-71.
- Balasubramanian, A. S. y Bhanumathy, C. D. (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. y Shafferman, A. (1994). Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J. Biol. Chem.* **264**: 6296-6305.
- Barreau, C., Paillard, L. y Osborne, H. B. (2006). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* **33**: 7138-7150.
- Batra, S., Christensson, P. I. y Hartley-Asp, B. (1990). Characterization of muscarinic cholinergic receptors in membrane preparations from rat prostatic adenocarcinoma. *Prostate* **17**: 261-268.
- Batshake, B., Nilsson, C. y Sundelin, J. (1999). Structure and expression of the murine thromboxane A2 receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**: 391-397.
- Belo, A., Cheng, K., Chahdi, A., Shant, J., Xie, G., Khurana, S. y Raufman, J. P. (2011). Muscarinic receptor agonists stimulate human colon cancer cell migration and invasion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**: G749-G760.
- Ben Aziz-Aloya, R., Seidman, S., Timberg, R., Sternfeld, M., Zakut, H. y Soreq, H. (1993a). Expression of a human acetylcholinesterase promoter-reporter construct in developing neuromuscular junctions of *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2471-2475.
- Ben Aziz-Aloya, R., Sternfeld, M. y Soreq, H. (1993b). Promoter elements and alternative splicing in the human *ACHE* gene. *Prog. Brain Res.* **98**: 147-153.
- Berman, H. A.; Nowak, M. W. (1992). Influence of ionic composition of the medium on acetylcholinesterase. En: *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*. pp. 149-156. Shafferman, A. and Velan, B. (Eds.) Plenum Press. New York.
- Berman, H. A., Yguerabide, J. y Taylor, P. (1980). Fluorescence energy transfer on acetylcholinesterase: spatial relationship between peripheral site and active centre. *Biochemistry* **19**: 2226-2235.
- Bernardi, C. C., Ribeiro, E. S., Cavalli, I. J., Chautard-Freire-Maia, E. A. y Souza, R. L. (2010). Amplification and deletion of the *ACHE* and *BCHE* cholinesterase genes in sporadic breast cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* **197**: 158-165.
- Bertrand, D. y Gopalakrishnan, M. (2007). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **74**: 1155-1163.

- Bigbee JW, Sharma KV, Chan EL y Bogler O. (2000). Evidence for the direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* **861**: 354-362.
- Bigbee, J. W. y Sharma, K. V. (2004). The adhesive role of acetylcholinesterase (AChE): detection of AChE binding proteins in developing rat spinal cord. *Neurochem. Res.* **29**: 2043-2050.
- Birdsall, N. J. y Lazareno, S. (2005). Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. *Mini. Rev. Med. Chem.* **5**: 523-543.
- Birikh, K. R., Sklan, E. H., Shoham, S. y Soreq, H. (2003). Interaction of "readthrough" acetylcholinesterase with RACK1 and PKC β II correlates with intensified fear-induced conflict behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 283-288.
- Blount, P. y Merlie, J. P. (1989). Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **3**: 349-357.
- Bon, S. y Massoulié, J. (1997). Quaternary associations of acetylcholinesterase. I Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail. *J. Biol. Chem.* **272**: 3007-3015.
- Bon, S., Cartaud, J. y Massoulié, J. (1978). The dependence of acetylcholinesterase aggregation at low ionic strength upon a polyanionic component. *Eur. J. Biochem.* **85**: 1-14.
- Bon, S., Vigny, M. y Massoulié, J. (1979). Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 2546-2550.
- Bon, S., Toutant, J. P., Meflah, K. y Massoulié, J. (1988). Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* acetylcholinesterase: II. Existence of electrophoretic variants and of phosphatidylinositol phospholipase C-sensitive and -insensitive forms. *J. Neurochem.* **51**: 786-794.
- Bon, S., Rosenberry, T. L. y Massoulié, J. (1991). Amphiphilic, glycoposphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC)-insensitive monomers and dimers of acetylcholinesterase. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**: 157-172.
- Bonner, T. I., Buckley, N. J., Young, A. C. y Brann, M. R. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* **237**: 527-532.
- Boopathy, R., Rajesh, R. V., Darvesh, S. y Layer, P. G. (2007). Human serum cholinesterase from liver pathological samples exhibit highly elevated aryl acylamidase activity. *Clin. Chim. Acta* **380**: 151-156.
- Boschetti, N. y Brodbeck, U. (1996). The membrane anchor of mammalian brain acetylcholinesterase consists of a single glycosylated protein of 22 kDa. *FEBS Lett.* **380**: 133-136.
- Bourne, Y., Taylor, P. y Marchot, P. (1995). Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell* **83**: 503-512.
- Bourne, Y., Taylor, P., Bougis, P. E. y Marchot, P. (1999). Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. A peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly. *J. Biol. Chem.* **274**: 2963-2970.
- Bourne, Y., Taylor, P., Radic, Z. y Marchot, P. (2003). Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J.* **22**: 1-12.
- Bourne, Y., Radic, Z., Sulzenbacher, G., Kim, E., Taylor, P. y Marchot, P. (2006). Substrate and product trafficking through the active center gorge of acetylcholinesterase analyzed by crystallography and equilibrium binding. *J. Biol. Chem.* **281**: 29256-29267.

- Bouzat, C. (2012). New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *J. Physiol. Paris*. **106**: 23-33.
- Brass, N., Racz, A., Heckel, D., Remberger, K., Sybrecht, G. W. y Meese, E. U. (1997). Amplification of the genes BCHE and SLC2A2 in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res*. **57**: 2290-2294.
- Brejč, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der, O. J., Smit, A. B. y Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**: 269-276.
- Brimijoin, S. y Rakonczay, Z. (1986). Immunology and molecular biology of the cholinesterases: Current results and prospects. *Int. Rev. Neurobiol.* **28**: 363-410.
- Brimijoin, S. y Koenigsberger, C. (1999). Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. *Environ. Health Perspect.* **107**: 59-64.
- Brimijoin, S., Balm, H., Hammond, P. y Lennon, V. A. (1990). Selective complexing of acetylcholinesterase in brain by intravenously administered monoclonal antibody. *J. Neurochem.* **54**: 236-241.
- Brodbeck, U. (1998). Signalling properties of glycosylphosphatidylinositols and their regulated release from membranes in the turnover of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biol. Chem.* **379**: 1041-1044.
- Brunzell, D. H., Russell, D. S. y Picciotto, M. R. (2003). In vivo nicotine treatment regulates mesocorticolimbic CREB and ERK signaling in C57Bl/6J mice. *J. Neurochem.* **84**: 1431-1441.
- Byers, D. M., Irwin, L. N., Moss, D. E., Sumaya, I. C. y Hohmann, C. F. (2005). Prenatal exposure to the acetylcholinesterase inhibitor methanesulfonyl fluoride alters forebrain morphology and gene expression. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **158**: 13-22.
- Cabadak, H., Aydin, B. y Kan, B. (2011). Regulation of M2, M3, and M4 muscarinic receptor expression in K562 chronic myelogenous leukemic cells by carbachol. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **31**: 26-32.
- Cabello, G., Valenzuela, M., Vilaxa, A., Durán, V., Rudolph, I., Hrepic, N. y Calaf, G. (2001). A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environ. Health Perspect.* **109**: 471-479.
- Cabezas-Herrera, J., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (1993). Molecular forms of acetylcholinesterase in microsomal membranes of normal and dystrophic muscle. *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 1085
- Cabezas-Herrera, J., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (1994a). Amphiphilic properties of molecular forms of acetylcholinesterase in normal and dystrophic muscle. *J. Neurosci. Res.* **38**: 505-514.
- Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M. T., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (1994b). 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, M. T., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (1997). Glycosylation of acetylcholinesterase forms in microsomal membranes from normal and dystrophic *Lama2dy* mouse muscle. *J. Neurochem.* **69**: 1964-1974.
- Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M. T., Nieto-Cerón, S., Gómez, J. L., Sánchez del Campo, L. F., Montenegro, M. F., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C. J. (2012). Changes in the expression and structure of cholinesterases in excitable and non-excitable tissues of the merosin-deficient *Lama2dy* mouse, a model of congenital muscular dystrophy. En: *Cholinesterase: Production, Uses and Health Effects*. Nova Science Publisher.

- Campanari, M. L., Garcia-Ayllon, M. S., Belbin, O., Galceran, J., Lleo, A. y Saez-Valero, J. (2014). Acetylcholinesterase modulates presenilin-1 levels and gamma-secretase activity. *J. Alzheimers. Dis.* **41**: 911-924.
- Campoy, F. J. (1992). Formas moleculares de acetilcolinesterasa de fracciones microsomales de músculo esquelético. Diferencias en su glicosilación e interacción con anticuerpos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, Murcia.
- Campoy, F. J., Cabezas-Herrera, J. y Vidal, C. J. (1992). Interaction of AChE with *Lens culinaris* agglutinin reveals differences in glycosylation of molecular forms in sarcoplasmic reticulum membrane subfractions. *J. Neurosci. Res.* **33**: 568-578.
- Campoy, F. J., Vidal, C. J., Muñoz-Delgado, E., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J. y Nieto-Ceron, S. (2016). Cholinergic system and cell proliferation. *Chem. Biol. Interact.*
- Cánovas-Muñoz, M. D., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. (1990). Amphiphilic and hydrophilic molecular forms of acetylcholinesterase in membranes derived from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1039**: 323-330.
- Carbone, A. L., Moroni, M., Groot-Kormelink, P. J. y Bermudez, I. (2009). Pentameric concatenated (alpha4)(2)(beta2)(3) and (alpha4)(3)(beta2)(2) nicotinic acetylcholine receptors: subunit arrangement determines functional expression. *Br. J. Pharmacol.* **156**: 970-981.
- Carlisle, D. L., Hopkins, T. M., Gaither-Davis, A., Silhanek, M. J., Luketich, J. D., Christie, N. A. y Siegfried, J. M. (2004). Nicotine signals through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in both human bronchial epithelial cells and airway fibroblasts. *Respir. Res.* **5**:27.: 27
- Castillo-González, A. C., Nieto-Ceron, S., Pelegrin-Hernandez, J. P., Montenegro, M. F., Noguera, J. A., Lopez-Moreno, M. F., Rodriguez-Lopez, J. N. y otros (2015). Dysregulated cholinergic network as a novel biomarker of poor prognostic in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC. Cancer* **15**: 385
- Caussé, E., Vaysse, P., Fabre, J., Valdiguié, P. y Thouvenot, J. P. (1987). The diagnostic value of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase ratio in Hirschsprung's disease. *Am. J. Clin. Pathol.* **88**: 477-480.
- Celie, P. H., van Rossum-Fikkert, S. E., van Dijk, W. J., Brejc, K., Smit, A. B. y Sixma, T. K. (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* **41**: 907-914.
- Chan, R. Y., Boudreau-Lariviere, C., Angus, L. M., Mankal, F. A. y Jasmin, B. J. (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. USA* **96**: 4627-4632.
- Changeux, J. P. y Edelstein, S. J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron.* **21**: 959-980.
- Changeux, J. P., Devillers-Thiery, A. y Chemouilli, P. (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science.* **225**: 1335-1345.
- Chatonnet, A. y Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **260**: 625-634.
- Chatonnet, A., Jbilo, O. (1991). Rabbit butyrylcholinesterase gene: an evolutionary perspective. En: *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology.* pp. 157-161. Massoulié, J., Bacou, F., Barnard, E.A., Chatonnet, A., Doctor, B.P., and Quinn, D.M. (Eds.) American Chemical Society. Washington.
- Chatonnet, A., Lorca, T., Barakat, A., Aron, E. y Jbilo, O. (1991). Structure of rabbit butyrylcholinesterase gene deduced from genomic clones and from a cDNA with introns. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**: 119-130.

- Chen, R. J., Ho, Y. S., Guo, H. R. y Wang, Y. J. (2008). Rapid activation of Stat3 and ERK1/2 by nicotine modulates cell proliferation in human bladder cancer cells. *Toxicol. Sci.* **104**: 283-293.
- Chen, V. P., Luk, W. K., Chan, W. K., Leung, K. W., Guo, A. J., Chan, G. K., Xu, S. L., Choi, R. C. y Tsim, K. W. (2011). Molecular assembly and biosynthesis of acetylcholinesterase in brain and muscle: the roles of t-peptide, FHB domain, and N-linked glycosylation. *Front. Mol. Neurosci.* **4**: 36
- Cheng, K., Zimniak, P. y Raufman, J. P. (2003). Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates cholinergic agonist-induced proliferation of H508 human colon cancer cells. *Cancer Res.* **63**: 6744-6750.
- Cheng, K., Xie, G. y Raufman, J. P. (2007). Matrix metalloproteinase-7-catalyzed release of HB-EGF mediates deoxycholytaurine-induced proliferation of a human colon cancer cell line. *Biochem. Pharmacol.* **73**: 1001-1012.
- Cheng, K., Samimi, R., Xie, G., Shant, J., Drachenberg, C., Wade, M., Davis, R. J., Nomikos, G. y Raufman, J. P. (2008). Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**: G591-597.
- Cheng, X. D., Hou, C. H., Zhang, X. J., Xie, H. Y., Zhou, W. Y., Yang, L., Zhang, S. B. y Qian, R. L. (2004). Effects of Huangqi (Hex) on inducing cell differentiation and cell death in K562 and HEL cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **36**: 211-217.
- Chida, D., Wakao, H., Yoshimura, A. y Miyajima, A. (1998). Transcriptional regulation of the beta-casein gene by cytokines: cross-talk between STAT5 and other signaling molecules. *Mol. Endocrinol.* **12**: 1792-1806.
- Chikova, A., Bernard, H. U., Shchepotin, I. B. y Grando, S. A. (2012). New associations of the genetic polymorphisms in nicotinic receptor genes with the risk of lung cancer. *Life Sci.* **91**: 1103-1108.
- Choi, R. C., Siow, N. L., Zhu, S. Q., Wan, D. C., Wong, Y. H. y Tsim, K. W. (2001). The cyclic AMP-mediated expression of acetylcholinesterase in myotubes shows contrasting activation and repression between avian and mammalian enzymes. *Mol. Cell Neurosci.* **17**: 732-745.
- Choi, R. C., Siow, N. L., Cheng, A. W., Ling, K. K., Tung, E. K., Simon, J., Barnard, E. A. y Tsim, K. W. (2003). ATP acts via P2Y1 receptors to stimulate acetylcholinesterase and acetylcholine receptor expression: transduction and transcription control. *J. Neurosci.* **23**: 4445-4456.
- Choi, R. C., Chu, G. K., Siow, N. L., Yung, A. W., Yung, L. Y., Lee, P. S., Lo, C. C. y otros (2013). Activation of UTP-sensitive P2Y2 receptor induces the expression of cholinergic genes in cultured cortical neurons: a signaling cascade triggered by Ca²⁺ mobilization and extracellular regulated kinase phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* **84**: 50-61.
- Chow, F. L., Telen, M. J. y Rosse, W. F. (1985). The acetylcholinesterase deficit in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Evidence that the enzyme is absent from the cell membrane. *Blood* **66**: 940-945.
- Christopoulos, A., Lanzafame, A. y Mitchelson, F. (1998). Allosteric interactions at muscarinic cholinceptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**: 185-194.
- Cohen, O., Erb, C., Ginzberg, D., Pollak, Y., Seidman, S., Shoham, S., Yirmiya, R. y Soreq, H. (2002). Neuronal overexpression of 'readthrough' acetylcholinesterase is associated with antisense-suppressible behavioral impairments. *Mol. Psychiatry* **7**: 874-885.
- Cohen, T. V. y Randall, W. R. (2004). NFATc1 activates the acetylcholinesterase promoter in rat muscle. *J. Neurochem.* **90**: 1059-1067.

- Cohen, O., Kronman, C., Velan, B. y Shafferman, A. (2004). Amino acid domains control the circulatory residence time of primate acetylcholinesterases in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Biochem. J.* **378**: 117-128.
- Coleman, B. A. y Taylor, P. (1996). Regulation of acetylcholinesterase expression during neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* **271**: 4410-4416.
- Combes, D., Fedon, Y., Toutant, J. P. y Arpagaus, M. (2001). Acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int. Rev. Cytol.* **209**: 207-239.
- Conroy, W. G. y Berg, D. K. (1995). Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J. Biol. Chem.* **270**: 4424-4431.
- Cooke, J. P. (2007). Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci.* **80**: 2347-2351.
- Cooke, J. P. y Bitterman, H. (2004). Nicotine and angiogenesis: a new paradigm for tobacco-related diseases. *Ann. Med.* **36**: 33-40.
- Corriveau, R. A. y Berg, D. K. (1993). Coexpression of multiple acetylcholine receptor genes in neurons: quantification of transcripts during development. *J. Neurosci.* **13**: 2662-2671.
- Cousin, X. y Bon, C. (1997). L'acétylcholinestérase des venins de serpents. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **191**: 381-400.
- Cousin, X., Bon, S., Massoulié, J. y Bon, C. (1998). Identification of a novel type of alternatively spliced exon from the acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. Molecular forms of acetylcholinesterase in the snake liver and muscle. *J. Biol. Chem.* **273**: 9812-9820.
- Cousin, X., Créminon, C., Grassi, J., Meflah, K., Cornu, G., Saliou, B., Bon, S., Massoulié, J. y Bon, C. (1996). Acetylcholinesterase from *Bungarus* venom: a monomeric species. *FEBS Lett.* **387**: 196-200.
- Cucina, A., Dinicola, S., Coluccia, P., Proietti, S., D'Anselmi, F., Pasqualato, A. y Bizzarri, M. (2012). Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation of survival pathways. *J. Surg. Res.* **178**: 233-241.
- Cuddy, L. K., Winick-Ng, W. y Rylett, R. J. (2014). Regulation of the high-affinity choline transporter activity and trafficking by its association with cholesterol-rich lipid rafts. *J. Neurochem* **128**: 725-740.
- Cui, J. D., Xu, M. L., Liu, E. Y., Dong, T. T., Lin, H. Q., Tsim, K. W. y Bi, C. W. (2016). Expression of globular form acetylcholinesterase is not altered in P2Y1R knock-out mouse brain. *Chem. Biol. Interact.* **259**: 291-294.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I. y Doctor, B. P. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* **2**: 366-382.
- Daigle, T. L. y Caron, M. G. (2012). Elimination of GRK2 from cholinergic neurons reduces behavioral sensitivity to muscarinic receptor activation. *J. Neurosci.* **32**: 11461-11466.
- Dajas-Bailador, F. y Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**: 317-324.
- Dajas-Bailador, F. A., Mogg, A. J. y Wonnacott, S. (2002). Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores. *J. Neurochem.* **81**: 606-614.
- Dally, J. J. y Greenfield, S. (1994). The release of acetylcholinesterase *in vivo* is regulated by dopaminergic systems in the guinea-pig substantia nigra. *Neurochem. Int.* **25**: 339-344.

- Darreh-Shori, T., Hellström-Lindahl, E., Flores-Flores, C., Guan, Z. Z., Soreq, H. y Nordberg, A. (2004). Long-lasting acetylcholinesterase splice variations in anticholinesterase-treated Alzheimer's disease patients. *J. Neurochem.* **88**: 1102-1113.
- David, R., Ciuraszkiewicz, A., Simeone, X., Orr-Urtreger, A., Papke, R. L., McIntosh, J. M., Huck, S. y Scholze, P. (2010). Biochemical and functional properties of distinct nicotinic acetylcholine receptors in the superior cervical ganglion of mice with targeted deletions of nAChR subunit genes. *Eur. J. Neurosci.* **31**: 978-993.
- Davis, C. N., Bradley, S. R., Schiffer, H. H., Friberg, M., Koch, K., Tolf, B. R., Bonhaus, D. W. y Lameh, J. (2009). Differential regulation of muscarinic M1 receptors by orthosteric and allosteric ligands. *BMC. Pharmacol.* **9**: 14-19.
- Day, T. y Greenfield, S. A. (2004). Bioactivity of a peptide derived from acetylcholinesterase in hippocampal organotypic cultures. *Exp. Brain Res.* **155**: 500-508.
- de Jonge, W. J. y Ulloa, L. (2007). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **151**: 915-929.
- De, V. C., Gregoire, F., Lema-Kisoka, R., Waelbroeck, M., Robberecht, P. y Delporte, C. (2004). Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* **145**: 4997-5005.
- Deng, R., Li, W., Guan, Z., Zhou, J. M., Wang, Y., Mei, Y. P., Li, M. T. y otros (2006). Acetylcholinesterase expression mediated by c-Jun-NH2-terminal kinase pathway during anti-cancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* **25**: 7070-7077.
- Deprez, P., Doss-Pepe, E., Brodsky, B. y Inestrosa, N. C. (2000). Interaction of the collagen-like tail of asymmetric acetylcholinesterase with heparin depends on triple-helical conformation, sequence and stability. *Biochem. J.* **350 Pt 1**: 283-290.
- Deprez, P. N. y Inestrosa, N. C. (1995). Two heparin-binding domains are present on the collagenic tail of asymmetric acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **270**: 11043-11046.
- Deschenes-Furry, J., Belanger, G., Perrone-Bizzozero, N. y Jasmin, B. J. (2003). Post-transcriptional regulation of acetylcholinesterase mRNAs in nerve growth factor-treated PC12 cells by the RNA-binding protein HuD. *J. Biol. Chem.* **278**: 5710-5717.
- Deutsch, V. R., Pick, M., Perry, C., Grisaru, D., Hemo, Y., Golan-Hadari, D., Grant, A., Eldor, A. y 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.
- Dinicola, S., Morini, V., Coluccia, P., Proietti, S., D'Anselmi, F., Pasqualato, A., Masiello, M. G. y otros (2013). Nicotine increases survival in human colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. *Toxicol. In Vitro* **27**: 2256-2263.
- Djuranovic, S., Nahvi, A. y Green, R. (2011). A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science* **331**: 550-553.
- Djuranovic, S., Nahvi, A. y Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* **336**: 237-240.
- Dori, A., Cohen, J., Silverman, W. F., Pollack, Y. y Soreq, H. (2005). Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cereb. Cort.* **15**: 419-430.
- Drews, U. (1975). Cholinesterase in embryonic development. *Prog. Histochem. Cytochem.* **7**: 1-53.

- Dreyfus, P., Zevin-Sonkin, D., Seidman, S., Prody, C., Zisling, R., Zakut, H. y Soreq, H. (1988). Cross-homologies and structural differences between human cholinesterases revealed by antibodies against c-DNA-produced human butyrylcholinesterase peptides. *J. Neurochem.* **51**: 1858-1867.
- Dreyfus, P. A., Seidman, S., Pinçon-Raimond, M., Murawski, M., Rieger, F., Schejter, E., Zakut, H. y Soreq, H. (1989). Tissue-specific processing and polarized compartmentalization of clone-produced cholinesterases in microinjected xenopus oocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* **9**: 323-341.
- Du, A., Xie, J., Guo, K., Yang, L., Wang, Y., Yang, Q. O., Zhang, X. y otros (2015). A novel role for synaptic acetylcholinesterase as an apoptotic deoxyribonuclease. *Cell Discovery* **1**: 15002.
- Dupuis, J. P., Gauthier, M. y Raymond-Delpech, V. (2011). Expression patterns of nicotinic subunits alpha2, alpha7, alpha8, and beta1 affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in adult bee olfactory neuropiles. *J. Neurophysiol.* **106**: 1604-1613.
- Duysen, E. G. y Lockridge, O. (2011). Induction of plasma acetylcholinesterase activity in mice challenged with organophosphorus poisons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **255**: 214-220.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L. y Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* **187**: 10-22.
- Eaton, J. B., Peng, J. H., Schroeder, K. M., George, A. A., Fryer, J. D., Krishnan, C., Buhlman, L. y otros (2003). Characterization of human alpha 4 beta 2-nicotinic acetylcholine receptors stably and heterologously expressed in native nicotinic receptor-null SH-EP1 human epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* **64**: 1283-1294.
- Edwards, J. A. y Brimijoin, S. (1982). Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat. *J. Neurochem.* **38**: 1393-1403.
- Egleton, R. D., Brown, K. C. y Dasgupta, P. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**: 151-158.
- Ehrlich, G., Viegas-Pequignot, E., Ginzberg, D., Sindel, L., Soreq, H. y 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.
- Elliott, J., Blanchard, S. G., Wu, W., Miller, J., Strader, C. D., Hartig, P., Moore, H. P., Racs, J. y Raftery, M. A. (1980). Purification of *Torpedo californica* post-synaptic membranes and fractionation of their constituent proteins. *Biochem. J.* **185**: 667-677.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J. y Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
- Emmerling, M. R., Johnson, C. D., Mosher, D. F., Lipton, B. H. y Lilien, J. E. (1981). Cross-linking and binding of fibronectin with asymmetric acetylcholinesterase. *Biochemistry* **20**: 3242-3247.
- Endo, M. (2009). Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* **89**: 1153-1176.
- Engel, A. G., Ohno, K. y Sine, S. M. (2003). Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 339-352.
- Erickson, J. D., Varoqui, H., Schafer, M. K. H., Modi, W., Diebler, M.-F., Weihe, E., Rand, J. y otros (1994). Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J. Biol. Chem.* **269**: 21929-21932.

- Farchi, N., Ofek, K., Podoly, E., Dong, H., Xiang, Y. Y., Diamant, S., Livnah, O. y otros (2007). Peripheral site acetylcholinesterase blockade induces RACK1-associated neuronal remodeling. *Neurodegener. Dis.* **4**: 171-184.
- Felder, C. E., Harel, M., Silman, I. y Sussman, J. L. (2002). Structure of a complex of the potent and specific inhibitor BW284C51 with *Torpedo californica* acetylcholinesterase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58**: 1765-1771.
- Fenster, C. P., Rains, M. F., Noerager, B., Quick, M. W. y Lester, R. A. (1997). Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J. Neurosci.* **17**: 5747-5759.
- Ferguson, M. A. J. (1991). Lipid anchors of membrane proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1**: 522-529.
- Filogamo, G. y Marchisio, P. C. (1971). Acetylcholine system and neural development. *Neurosci. Res. (N. Y.)* **4**: 29-64.
- Flora, A., Schulz, R., Benfante, R., Battaglioli, E., Terzano, S., Clementi, F. y Fornasari, D. (2000). Neuronal and extraneuronal expression and regulation of the human alpha5 nicotinic receptor subunit gene. *J. Neurochem.* **75**: 18-27.
- Fournier, D., Mutero, A. y Rungger, D. (1992). Drosophila acetylcholinesterase. Expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.* **203**: 513-519.
- Free, R. B., von Fischer, N. D., Boyd, R. T. y McKay, D. B. (2003). Pharmacological characterization of recombinant bovine alpha3beta4 neuronal nicotinic receptors stably expressed in HEK 293 cells. *Neurosci. Lett.* **343**: 180-184.
- Frucht, H., Jensen, R. T., Dexter, D., Yang, W. L. y Xiao, Y. (1999). Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clin. Cancer Res.* **5**: 2532-2539.
- Fucile, S. (2004). Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* **35**: 1-8.
- Fujii, T. y Kawashima, K. (2001). An independent non-neuronal cholinergic system in lymphocytes. *Jpn. J. Pharmacol.* **85**: 11-15.
- Fuller, G. M. y Zhang, Z. (2001). Transcriptional control mechanism of fibrinogen gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**: 469-479.
- Furtado-Alle, L., Andrade, F. A., Nunes, K., Mikami, L. R., Souza, R. L. y Chautard-Freire-Maia, E. A. (2008). Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chem. Biol. Interact.* **175**: 115-118.
- Futerman, A. H., Low, M. G. y Silman, I. (1983). A hydrophobic dimer of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* electric organ is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Neurosci. Lett.* **40**: 85-89.
- Gahring, L. C. y Rogers, S. W. (2006). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J.* **7**: E885-E894.
- Gao, W., Zhu, H., Zhang, J. Y. y Zhang, X. J. (2009). Calcium signaling-induced Smad3 nuclear accumulation induces acetylcholinesterase transcription in apoptotic HeLa cells. *Cell Mol. Life Sci.* **66**: 2181-2193.
- García, L., Verdère-Sahuqué, M., Dreyfus, P. A., Nicolet, M. y Rieger, F. (1988). A dimeric form of acetylcholinesterase anchored through a glycolipid in mouse skeletal muscle. *Neurochem. Int.* **13**: 327-332.
- García-Ayllón, M. S., Gómez, J. L. y Vidal, C. J. (1999). Amphiphilic properties of acetylcholinesterase monomers in mouse plasma. *Neurosci. Lett.* **265**: 211-214.

- García-Ayllón, M. S., Sáez-Valero, J., Piqueras-Pérez, C. y Vidal, C. J. (1999). Characterization of molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human acoustic neurinomas. *Neurosci. Lett.* **274**: 56-60.
- García-Ayllón, M. S., Sáez-Valero, J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. (2001). Identification of hybrid cholinesterase forms consisting of acetyl- and butyrylcholinesterase subunits in human glioma. *Neuroscience* **107**: 199-208.
- García-Ayllón, M. S., Seguí, D., Perales, M., López-Hurtado, E., Prieto, J. J. y Sáez-Valero, J. (2003). Acetylcholinesterase level and molecular isoforms are altered in brain of Reelin Orleans mutant mice. *J. Neurochem.* **87**: 773-779.
- García-Ayllón, M. S., Millán, C., Serra-Basante, C., Bataller, R. y Saez-Valero, J. (2012). Readthrough acetylcholinesterase is increased in human liver cirrhosis. *PLoS One* **7**: e44598.
- García-Ayllón, M. S., Campanari, M. L., Montenegro, M. F., Cuchillo-Ibañez, I., Belbin, O., Lleo, A., Tsim, K., Vidal, C. J. y Saez-Valero, J. (2014). Presenilin-1 influences processing of the acetylcholinesterase membrane anchor PRiMA. *Neurobiol. Aging* **35**: 1526-1536.
- Gennari, K., Brunner, J. y Brodbeck, U. (1987). Tetrameric detergent-soluble acetylcholinesterase from human caudate nucleus: subunit composition and number of active sites. *J. Neurochem.* **49**: 12-18.
- Gentry, P. R., Kokubo, M., Bridges, T. M., Cho, H. P., Smith, E., Chase, P., Hodder, P. S. y otros (2014). Discovery, synthesis and characterization of a highly muscarinic acetylcholine receptor (mAChR)-selective M5-orthosteric antagonist, VU0488130 (ML381): a novel molecular probe. *ChemMedChem* **9**: 1677-1682.
- Getman, D. K., Eubanks, J. H., Camp, S., Evans, G. A. y Taylor, P. (1992). The human gene encoding AChE is located on the long arm of chromosome 7. *Am. J. Hum. Genet.* **51**: 170-177.
- Getman, D. K., Mutero, A., Inoue, K. y Taylor, P. (1995). Transcription factor repression and activation of the human acetylcholinesterase gene. *J. Biol. Chem.* **270**: 23511-23519.
- Giacobini, E. (1997). From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn. J. Pharmacol.* **74**: 225-241.
- Gibney, G., Camp, S., Dionne, M., MacPhee-Quigley, K. y Taylor, P. (1990). Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7546-7550.
- Gill, J. K., Savolainen, M., Young, G. T., Zwart, R., Sher, E. y Millar, N. S. (2011). Agonist activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 5867-5872.
- Gilman, A. G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* **36**: 577-579.
- Gilson, M. K., Straatsma, T. P., McCammon, J. A., Ripoll, D. R., Faerman, C. H., Axelsen, P. H., Silman, I. y Sussman, J. L. (1994). Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholine. *Science* **263**: 1276-1278.
- Girard, E., Bernard, V., Camp, S., Taylor, P., Krejci, E. y Molgo, J. (2006). Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase. *J. Mol. Neurosci.* **30**: 99-100.
- Gisiger, V. y Stephens, H. R. (1984). Decreased G₄ (10S) acetylcholinesterase content in motor nerves to fast muscles of dystrophic 129/ReJ mice: lack of a specific compartment of nerve acetylcholinesterase? *J. Neurochem.* **43**: 174-183.

- Gisiger, V. y Stephens, H. R. (1988). Localization of the pool of G₄ acetylcholinesterase characterizing fast muscles and its alteration in murine muscular dystrophy. *J. Neurosci. Res.* **19**: 62-78.
- Gisiger, V., Vigny, M., Gautron, J. y Rieger, F. (1978). Acetylcholinesterase of rat sympathetic ganglion: molecular forms, localization and effects of denervation. *J. Neurochem.* **30**: 501-516.
- Glidewell-Kenney, C., Weiss, J., Lee, E. J., Pillai, S., Ishikawa, T., Ariazi, E. A. y Jameson, J. L. (2005). ERE-independent ERalpha target genes differentially expressed in human breast tumors. *Mol. Cell Endocrinol.* **245**: 53-59.
- Gnatt, A., Ginzberg, D., Lieman-Hurwitz, J., Zamir, R., Zakut, H. y Soreq, H. (1991). Human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are encoded by two distinct genes. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**: 91-104.
- Gómez, J. L., Moral-Naranjo, M. T., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (1999). Characterization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase forms in normal and dystrophic Lama2dy mouse heart. *J. Neurosci. Res.* **56**: 295-306.
- Gómez, J. L., García-Ayllón, M. S., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (2000). Muscular dystrophy alters the processing of light acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase forms in liver of Lama2dy mice. *J. Neurosci. Res.* **62**: 134-145.
- Gómez, J. L., Nieto-Cerón, S., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. (2003). Purification and properties of hydrophilic dimers of acetylcholinesterase from mouse erythrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 1109-1118.
- Gotti, C. y Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.* **74**: 363-396.
- Gotti, C., Zoli, M. y Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**: 482-491.
- Govind, A. P., Vezina, P. y Green, W. N. (2009). Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem. Pharmacol.* **78**: 756-765.
- Grassi, J., Vigny, M. y Massoulié, J. (1982). Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character. *J. Neurochem.* **38**: 457-469.
- Grauso, M., Culetto, E., Combes, D., Fedon, Y., Toutant, J. P. y Arpagaus, M. (1998). Existence of four acetylcholinesterase genes in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *FEBS Lett.* **424**: 279-284.
- Greenfield, S. (1996). Critique. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **28**: 485-490.
- Greenfield, S. A. (1985). The significance of dendritic release of transmitter and protein in the substantia nigra. *Neurochem. Int.* **7**: 887-901.
- Greenfield, S. A. (1991). A noncholinergic action of acetylcholinesterase (AChE) in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**: 55-77.
- Greer, J. (1990). Comparative modeling methods: application to the family of the mammalian serine proteases. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **7**: 317-334.
- Grifman, M., Galyam, N., Seidman, S. y Soreq, H. (1998). Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroigin in mammalian neuritogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13935-13940.

- Grisaru, D., Lev-Lehman, E., Shapira, M., Chaikin, E., Lessing, J. B., Eldor, A., Eckstein, F. y Soreq, H. (1999a). Human osteogenesis involves differentiation-dependent increases in the morphogenetically active 3' alternative splicing variant of acetylcholinesterase. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 788-95.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D. y Soreq, H. (1999b). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* **264**: 672-686.
- Grisaru, D., Deutsch, S. I., Shapira, J., Pick, M., Sternfeld, M., Melamed-Book, N., Kaufer, D. y otros (2001). ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities. *Mol. Med.* **7**: 93-105.
- Grisaru, D., Pick, M., Perry, C., Sklan, E. H., Almog, R., Goldberg, I., Naparstek, E. y otros (2006). Hydrolytic and nonenzymatic functions of acetylcholinesterase comodulate hemopoietic stress responses. *J. Immunol.* **176**: 27-35.
- Grutter, T., Le Novère, N. y Changeux, J. P. (2004). Rational understanding of nicotinic receptors drug binding. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**: 645-650.
- Guraya, S. S., Sharma, J. y Dhanju, C. K. (1995). Correlative histochemical and biochemical studies on acetylcholinesterase activity during ovulation in the rat. *Eur. J. Morphol.* **33**: 31-38.
- Hall, L. M. C. y Spierer, P. (1986). Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.* **5**: 2949-2954.
- Hall, Z. W. y Kelly, R. B. (1971). Enzymatic detachment of endplate acetylcholinesterase from muscle. *Nature* **232**: 62-63.
- Hammer, R., Berrie, C. P., Birdsall, N. J., Burgen, A. S. y Hulme, E. C. (1980). Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* **283**: 90-92.
- Hanin, G. y Soreq, H. (2011). Cholinesterase-Targeting microRNAs Identified in silico Affect Specific Biological Processes. *Front. Mol. Neurosci.* **4**: 28
- Hansen, S. B. y Taylor, P. (2007). Galanthamine and non-competitive inhibitor binding to ACh-binding protein: evidence for a binding site on non-alpha-subunit interfaces of heteromeric neuronal nicotinic receptors. *J. Mol. Biol.* **369**: 895-901.
- Hansen, S. B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P. y Bourne, Y. (2005). Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J.* **24**: 3635-3646.
- Harel, M., Sussman, J. L., Krejci, E., Bon, S., Chanal, P., Massoulié, J. y Silman, I. (1992). Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10827-10831.
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T. L., Mallender, W. D., Lewis, T., Fletcher, R. J., Guss, J. M., Silman, I. y Sussman, J. L. (2000). Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci.* **9**: 1063-1072.
- Hasan, F. B., Cohen, S. G. y Cohen, J. B. (1980). Hydrolysis by acetylcholinesterase. Apparent molar volumes and trimethyl and methyl subsites. *J. Biol. Chem.* **255**: 3898-3904.
- Hasinoff, B. B. (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.
- Hicks, D., John, D., Makova, M. Z., Nalivaeva, N. N. y Turner, A. J. (2011). Membrane targeting, shedding and protein interactions of brain acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* **116**: 742-746.

- Ho, Y. S., Chen, C. H., Wang, Y. J., Pestell, R. G., Albanese, C., Chen, R. J., Chang, M. C. y otros (2005). Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NFkappaB activation and cyclin D1 up-regulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **205**: 133-148.
- Hu, W., Gray, N. W. y Brimijoin, S. (2003). Amyloid-beta increases acetylcholinesterase expression in neuroblastoma cells by reducing enzyme degradation. *J. Neurochem.* **86**: 470-478.
- Hu, L., Xia, L., Zhou, H., Wu, B., Mu, Y., Wu, Y. y Yan, J. (2013). TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via PKCalpha and ERK-dependent c-Jun/AP-1 pathway in colon cancer cell line SW620. *Tumour. Biol.* **34**: 2573-2581.
- Hulme, E. C., Lu, Z. L., Saldanha, J. W. y Bee, M. S. (2003). Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 29-34.
- Hurst, R., Rollema, H. y Bertrand, D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **137**: 22-54.
- Ibanez-Tallon, I., Miwa, J. M., Wang, H. L., Adams, N. C., Crabtree, G. W., Sine, S. M. y Heintz, N. (2002). Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1. *Neuron.* **33**: 893-903.
- Improgo, M. R., Tapper, A. R. y Gardner, P. D. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer. *Biochem. Pharmacol.* **82**: 1015-1021.
- Inestrosa, N. C., Roberts, W. L., Marshall, T. y Rosenberry, T. L. (1987). Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterase in other tissues. *J. Biol. Chem.* **262**: 4441-4444.
- Inestrosa, N. C., Fuentes, M. E., Anglister, L., Futerman, A. H. y Silman, I. (1988). A membrane-associated dimer of acetylcholinesterase from *Xenopus* skeletal muscle is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Neurosci. Lett.* **90**: 186-190.
- Inestrosa, N. C., Dinamarca, M. C. y Alvarez, A. (2008). Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *FEBS J.* **275**: 625-632.
- Jain, R. K., Finn, A. V., Kolodgie, F. D., Gold, H. K. y Virmani, R. (2007). Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque stabilization. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4**: 491-502.
- Jardin, I. y Rosado, J. A. (2016). STIM and calcium channel complexes in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**: 1418-1426.
- Jensen, F. S., Schwarz, M. y Viby-Mogensen, J. (1995). Identification of human plasma cholinesterase variants using molecular biological techniques. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **39**: 142-149.
- Jiang, H. y Zhang, X. J. (2008). Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme. *FEBS J.* **275**: 612-617.
- Jiang, J. X., Choi, R. C., Siow, N. L., Lee, H. H., Wan, D. C. y Tsim, K. W. (2003). Muscle induces neuronal expression of acetylcholinesterase in neuron-muscle co-culture: transcriptional regulation mediated by cAMP-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* **278**: 45435-45444.
- Jin, Q. H., Shi, Y. F., He, H. Y., Ng, K. K., Jiang, H., Yang, L., Jiang, Z. Q. y Zhang, X. J. (2002). Isolation of acetylcholinesterase from apoptotic human lung fibroblast cells by antibody affinity chromatography. *Biotechniques Suppl.* **92-4**: 96-97.

- Jin, Q. H., He, H. Y., Shi, Y. F., Lu, H. y Zhang, X. J. (2004). Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK. *Acta Pharmacol. Sin.* **25**: 1013-1021.
- Jing, P., Jin-Q, Wu, J. y Zhang, X. J. (2008). GSK3beta mediates the induced expression of synaptic acetylcholinesterase during apoptosis. *J. Neurochem.* **104**: 409-419.
- Johnson, C. D. y Russell, R. L. (1975). A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Anal. Biochem.* **64**: 229-238.
- Johnson, G. y Moore, S. W. (1999). The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**: 758-762.
- Johnson, G. y Moore, S. W. (2000). 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. y Moore, S. W. (2003). Human acetylcholinesterase binds to mouse laminin-1 and human collagen IV by an electrostatic mechanism at the peripheral anionic site. *Neurosci. Lett.* **337**: 37-40.
- Johnson, G., Swart, C. y Moore, S. W. (2008). Non-enzymatic developmental functions of acetylcholinesterase - the question of redundancy. *FEBS J.* **275**: 5129-5138.
- Jones, C. K., Byun, N. y Bubser, M. (2012). Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* **37**: 16-42.
- Kalantari-Dehaghi, M., Parnell, E. A., Armand, T., Bernard, H. U. y Grando, S. A. (2015). The nicotinic acetylcholine receptor-mediated reciprocal effects of the tobacco nitrosamine NNK and SLURP-1 on human mammary epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* **29**: 99-104.
- Karnovsky, M. J. y Roots, L. (1964). A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**: 219-232.
- Karpel, R., Ben Aziz-Aloya, R., Sternfeld, M., Ehrlich, G., Ginzberg, D., Tarroni, P., Clementi, F., Zakut, H. y Soreq, H. (1994). Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. *Exp. Cell Res.* **210**: 268-277.
- Karpel, R., Sternfeld, M., Ginzberg, D., Guhl, E., Graessmann, A. y Soreq, H. (1996). Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells. *J. Neurochem.* **66**: 114-123.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S. y Soreq, H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* **393**: 373-377.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S. y Soreq, H. (1999). Anticholinesterases induce multigenic transcriptional feedback response suppressing cholinergic neurotransmission. *Chem. Biol. Interact.* **119-120**: 349-360.
- Kawashima, K. y Fujii, T. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol. Ther.* **86**: 29-48.
- Kawashima, K. y 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., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H. y Horiguchi, K. (2012). Reconciling neuronally and nonneuronally derived acetylcholine in the regulation of immune function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1261**: 7-17.

- Keller, M., Robitzki, A. y Layer, P. G. (2001). Anticholinesterase treatment of chicken retinal cells increases acetylcholinesterase protein independently of protein kinase C. *Neurosci. Lett.* **309**: 21-24.
- Keov, P., Sexton, P. M. y Christopoulos, A. (2011). Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: a pharmacological perspective. *Neuropharmacology.* **60**: 24-35.
- Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Honda, K., Nakamizo, T., Shibasaki, H., Kume, T. y Akaike, A. (2001). alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **276**: 13541-13546.
- Kimbell, L. M., Ohno, K., Engel, A. G. y Rotundo, R. L. (2004). C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J. Biol. Chem.* **279**: 10997-11005.
- Kodaira, M., Kajimura, M., Takeuchi, K., Lin, S., Hanai, H. y Kaneko, E. (1999). Functional muscarinic m3 receptor expressed in gastric cancer cells stimulates tyrosine phosphorylation and MAP kinase. *J. Gastroenterol.* **34**: 163-171.
- Koelle, G. B. y Friedenwald, J. S. (1949). A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **70**: 617-622.
- Koepsell, H., Lips, K. y Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* **24**: 1227-1251.
- Krejci, E., Coussen, F., Duval, N., Chatel, J.-M., Legay, C., Puype, M., Vanderkerckhove, J. y otros (1991a). Primary structure of a collagenic tail peptide of *Torpedo* acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells. *EMBO J.* **10**: 1285-1293.
- Krejci, E., Duval, N., Chatonnet, A., Vincens, P. y Massoulié, J. (1991b). Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6647-6651.
- Krejci, E., Thomine, S., Boschetti, N., Legay, C., Sketelj, J. y Massoulié, J. (1997). The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J. Biol. Chem.* **272**: 22840-22847.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P. y otros (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**: 495-500.
- Kronman, C., Ordentlich, A., Barak, D., Velan, B. y Shafferman, A. (1994). The "back door" hypothesis for product clearance challenged by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 27819-27822.
- Kruse, A. C., Kobilka, B. K., Gautam, D., Sexton, P. M., Christopoulos, A. y Wess, J. (2014). Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**: 549-560.
- Kummer, W., Lips, K. S. y Pfeil, U. (2008). The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem. Cell Biol.* **130**: 219-234.
- Kunzelmann, K. (2005). Ion channels and cancer. *J. Membr. Biol.* **205**: 159-173.
- Kuryatov, A., Luo, J., Cooper, J. y Lindstrom, J. (2005). Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha4beta2 acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **68**: 1839-1851.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lapidot-Lifson, Y., Prody, C. A., Ginzberg, D., Meytes, D., Zakut, H. y Soreq, H. (1989). 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.
- Lau, K. M., Gong, A. G., Xu, M. L., Lam, C. T., Zhang, L. M., Bi, C. W., Cui, D. y otros (2016). Transcriptional activity of acetylcholinesterase gene is regulated by DNA methylation during C2C12 myogenesis. *Brain Res.* **1642**: 114-123.
- Layer, P. G. (1983). Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chick brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 6413-6417.
- Layer, P. G. (1990). Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *Bioessays* **12**: 415-420.
- Layer, P. G. (1995). Nonclassical roles of cholinesterases in the embryonic brain and possible links to Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **9**: 29-36.
- Layer, P. G. y Willbold, E. (1994). Cholinesterases in avian neurogenesis. *Int. Rev. Cytol.* **151**: 139-181.
- Layer, P. G. y Willbold, E. (1995). Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog. Histochem. Cytochem.* **29**: 1-94.
- Lazar, M., Salmeron, E., Vigny, M. y Massoulié, J. (1984). Heavy isotope-labeling study of the metabolism of monomeric and tetrameric acetylcholinesterase forms in the murine neuronal-like T28 hybrid cell line. *J. Biol. Chem.* **259**: 3703-3713.
- Le Novère, N. y Changeux, J. P. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evol.* **40**: 155-172.
- Le Novère, N., Grutter, T. y Changeux, J. P. (2002). Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca²⁺-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 3210-3215.
- Lee, C. H., Huang, C. S., Chen, C. S., Tu, S. H., Wang, Y. J., Chang, Y. J., Tam, K. W. y otros (2010). Overexpression and activation of the alpha9-nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**: 1322-1335.
- Legay, C. (2000). Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microsc. Res. Tech.* **49**: 56-72.
- Legay, C., Bon, S. y Massoulié, J. (1993a). Expression of a cDNA encoding the glycolipid-anchored form of rat acetylcholinesterase. *FEBS Lett.* **315**: 163-166.
- Legay, C., Bon, S., Vernier, P., Coussen, F. y Massoulié, J. (1993b). Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: Generation of multiple molecular forms and complementarity with a *Torpedo* collagenic subunit. *J. Neurochem.* **60**: 337-346.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., III, McCoy, C. E., Mazur, K. C. y Mabry, N. D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* **36**: 4562-4569.
- Lev-Lehman, E., Deutsch, V., Eldor, A. y Soreq, H. (1997). Immature human megakaryocytes produce nuclear-associated acetylcholinesterase. *Blood* **89**: 3644-3653.
- Lewis, W. G., Green, L. G., Grynszpan, F., Radic, Z., Carlier, P. R., Taylor, P., Finn, M. G. y Sharpless, K. B. (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, J. A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L. M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinrichs, S. H. y Lockridge, O. (2000a). Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Neurochem.* **75**: 1320-1331.
- Li, W. F., Costa, L. G., Richter, R. J., Hagen, T., Shih, D. M., Tward, A., Lulis, A. J. y Furlong, C. E. (2000b). Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics* **10**: 767-779.
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E. G., Masson, P. y Lockridge, O. (2005). Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.* **70**: 1673-1684.
- Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T. L., Getman, D. y Taylor, P. (1991). Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* **266**: 23083-23090.
- Li, Y., Camp, S. y Taylor, P. (1993). Tissue-specific expression and alternative mRNA processing of the mammalian acetylcholinesterase gene. *J. Biol. Chem.* **268**: 5790-5797.
- Liang, D., Blouet, J. P., Borrega, F., Bon, S. y 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., Heider, H., Sun, M. C. y Brodbeck, U. (1992). Different glycosylation in acetylcholinesterases from mammalian brain and erythrocytes. *J. Neurochem.* **58**: 1230-1238.
- Liao, J., Boschetti, N., Mortensen, V., Jensen, S. P., Koch, C., Norgaard-Pedersen, B. y Brodbeck, U. (1994). Characterization of salt-soluble forms of acetylcholinesterase from bovine brain. *J. Neurochem.* **63**: 1446-1453.
- Lindstrom, J. (2000). The structures of neuronal nicotinic receptors. En: *Neuronal Nicotinic Receptors*. pp. 101-162. Clementi, F., Fornasari, D., and Gotti, C. (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lindstrom, J., Anand, R., Gerzanich, V., Peng, X., Wang, F. y Wells, G. (1996). Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog. Brain Res.* **109**: 125-137.
- Lips, K. S., Bruggmann, D., Pfeil, U., Vollerthun, R., Grando, S. A. y Kummer, W. (2005a). Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta* **26**: 735-746.
- Lips, K. S., Volk, C., Schmitt, B. M., Pfeil, U., Arndt, P., Miska, D., Ermert, L., Kummer, W. y Koepsell, H. (2005b). Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**: 79-88.
- Lips, K. S., Wunsch, J., Zarghooni, S., Bschleipfer, T., Schukowski, K., Weidner, W., Wessler, I. y otros (2007). Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur. Urol.* **51**: 1042-1053.
- Liu, J., Rasul, I., Sun, Y., Wu, G., Li, L., Premont, R. T. y Suo, W. Z. (2009). GRK5 deficiency leads to reduced hippocampal acetylcholine level via impaired presynaptic M2/M4 autoreceptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **284**: 19564-19571.
- Liu, Y. W., Zhang, L., Li, Y., Cheng, Y. Q., Zhu, X., Zhang, F. y Yin, X. X. (2016). Activation of mTOR signaling mediates the increased expression of AChE in high glucose condition: in vitro and in vivo evidences. *Mol. Neurobiol.* **53**: 4972-4980.
- Livneh, U., Dori, A., Katzav, A. y Kofman, O. (2010). Strain and regional dependence of alternate splicing of acetylcholinesterase in the murine brain following stress or treatment with diisopropylfluorophosphate. *Behav. Brain Res.* **210**: 107-115.

- Lockridge, O. (1990). Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol. Ther.* **47**: 35-60.
- Lockridge, O. y 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, H. W. y La Du, B. N. (1980). Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by serum cholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **215**: 1-8.
- Lockridge, O., Bartels, C. G., Vaughan, T. A., Wong, C. K., Norton, S. E. y Johnson, L. L. (1987). Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **262**: 549-557.
- Low, M. G. y Finean, J. B. (1977). Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *FEBS Lett.* **82**: 143-146.
- Low, M. G., Ferguson, M. A., Futerman, A. H. y Silman, I. (1986). Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 212-215XX.
- Lu, L., Zhang, X., Zhang, B., Wu, J. y Zhang, X. (2013). Synaptic acetylcholinesterase targeted by microRNA-212 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**: 2530-2540.
- Luk, W. K., Chen, V. P., Choi, R. C. y Tsim, K. W. (2012). N-linked glycosylation of dimeric acetylcholinesterase in erythrocytes is essential for enzyme maturation and membrane targeting. *FEBS J.* **279**: 3229-3239.
- Luo, Z., Fuentes, M. E. y Taylor, P. (1994). Regulation of acetylcholinesterase mRNA stability by calcium during differentiation from myoblasts to myotubes. *J. Biol. Chem.* **269**: 27216-27223.
- Luo, Z. D., Wang, Y., Werlen, G., Camp, S., Chien, K. R. y Taylor, P. (1999). Calcineurin enhances acetylcholinesterase mRNA stability during C2-C12 muscle differentiation. *Mol. Pharmacol.* **56**: 886-894.
- Lushchekina, S., Nemukhin, A., Varfolomeev, S. y Masson, P. (2016). Understanding the non-catalytic behavior of human butyrylcholinesterase silent variants: Comparison of wild-type enzyme, catalytically active Ala328Cys mutant, and silent Ala328Asp variant. *Chem. Biol. Interact.* **259**: 223-232.
- Luthin, G. R., Wang, P., Zhou, H., Dhanasekaran, D. y Ruggieri, M. R. (1997). Role of m1 receptor-G protein coupling in cell proliferation in the prostate. *Life Sci.* **60**: 963-968.
- Lwebuga-Mukasa, J. S., Lappi, S. y Taylor, P. (1976). Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: their relationship to synaptic membranes. *Biochemistry* **15**: 1425-1434.
- Lykhmus, O., Gergalova, G., Koval, L., Zhmak, M., Komisarenko, S. y Skok, M. (2014). Mitochondria express several nicotinic acetylcholine receptor subtypes to control various pathways of apoptosis induction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **53**: 246-252.
- Lynagh, T. y Lynch, J. W. (2012). Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**: 432-441.
- Mack, A. y Robitzki, A. (2000). The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog. Neurobiol.* **60**: 607-628.
- MacPhee-Quigley, K., Taylor, P. y Taylor, S. (1985). Primary structures of the catalytic subunits from two molecular forms of acetylcholinesterase. A comparison of NH₂-terminal and active center sequences. *J. Biol. Chem.* **260**: 12185-12189.

- Madhavan, S., Sarath, G., Lee, B. H. y Pegden, R. S. (1995). Guard cell protoplasts contain acetylcholinesterase activity. *Plant Sci.* **109**: 119-127.
- Main, A. R. (1979). Mode of action of anticholinesterases. *Pharmacol. Ther.* **6**: 579-628.
- Malbon, C. C. (2005). G proteins in development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 689-701.
- Manavalan, P., Taylor, P. y Johnson, W. C. J. (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, D., Perry, D. C., Yasuda, R. P., Wolfe, B. B. y Kellar, K. J. (2008). The alpha4beta2alpha5 nicotinic cholinergic receptor in rat brain is resistant to up-regulation by nicotine in vivo. *J. Neurochem.* **104**: 446-456.
- Marchot, P., Ravelli, R. B. G., Raves, M., Bourne, Y., Vellom, D. C., Kanter, J., Camp, S., Sussman, J. L. y Taylor, P. (1996). Soluble monomeric acetylcholinesterase from mouse: expression, purification, and crystallization in complex with fasciculin. *Protein Sci.* **5**: 672-679.
- Marcos, M. R., Sánchez-Yagüe, J., Hernández-Hernández, A. y Llanillo, M. (1998). Amphiphilic and hydrophilic forms of acetylcholinesterase from sheep platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**: 163-173.
- Marks, M. J., Whiteaker, P., Calcaterra, J., Stitzel, J. A., Bullock, A. E., Grady, S. R., Picciotto, M. R., Changeux, J. P. y Collins, A. C. (1999). Two pharmacologically distinct components of nicotinic receptor-mediated rubidium efflux in mouse brain require the beta2 subunit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**: 1090-1103.
- Marnay, A. y Nachmansohn, D. (1937). Cholinesterase dans le muscle estrié. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **124**: 942-944.
- Marnay, A. y Nachmansohn, D. (1938). Cholinesterase in voluntary muscle. *J. Physiol.* **92**: 37-47.
- Marquis, J. K. y Fishman, E. B. (1985). Presynaptic acetylcholinesterase. *Trends Pharmacol. Sci.* **6**: 387-388.
- Marrero, E., Rossi, S. G., Darr, A., Tsoulfas, P. y Rotundo, R. L. (2011). Translational regulation of acetylcholinesterase by the RNA-binding protein Pumilio-2 at the neuromuscular synapse. *J. Biol. Chem.* **286**: 36492-36499.
- Martin, R. G. y Ames, B. N. (1961). A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes. Applications to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* **236**: 1372-1379.
- Martínez-López de Castro, A., Nieto-Cerón, S., Pons-Castillo, A., Galvis-Martínez, L., Latour-Pérez, J., Torres-Lanzas, J., Tovar-Zapata, I., Martínez-Hernández, P., Rodríguez-López, J. N., Cabezas-Herrera, J. (2008). Cancer-associated differences in acetylcholinesterase activity in bronchial aspirates from patients with lung cancer. *Clin. Sci.* **115**: 245-253.
- Martínez-Moreno, P., Nieto-Cerón, S., Torres-Lanzas, J., Ruiz-Espejo, F., Tovar-Zapata, I., Martínez-Hernández, P., Rodríguez-López, J. N., Vidal, C. J. y Cabezas-Herrera, J. (2006). Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. *Carcinogenesis* **27**: 429-436.
- Mashimo, M., Iwasaki, Y., Inoue, S., Saito, S., Kawashima, K. y Fujii, T. (2017). Acetylcholine released from T cells regulates intracellular Ca²⁺, IL-2 secretion and T cell proliferation through nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci.* **172**: 13-18.
- Masson, P., Froment, M. T., Fortier, P. L., Visicchio, J. E., Bartels, C. F. y Lockridge, O. (1998). Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. *Biochim. Biophys. Acta* **1387**: 41-52.

- Massoulié, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* **11**: 130-143.
- Massoulié, J. y 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. y Vallette, F. M. (1993a). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **41**: 31-91.
- Massoulié, J., Sussman, J., Bon, S. y Silman, I. (1993b). Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog. Brain Res.* **98**: 139-146.
- Massoulié, J., Bon, S., Perrier, N. y Falasca, C. (2005). The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem. Biol. Interact.* **157-158**: 3-14.
- Massoulié, J., Perrier, N., Noureddine, H., Liang, D. y Bon, S. (2008). Old and new questions about cholinesterases. *Chem. Biol. Interact.* **175**: 30-44.
- Maulet, Y., Camp, S., Gibney, G., Rachinsky, T. L., Ekström, T. J. y Taylor, P. (1990). Single gene encodes glycopospholipid-anchored and asymmetric acetylcholinesterase forms: alternative coding exons contain inverted repeat sequences. *Neuron* **4**: 289-301.
- McMahan, U. J., Sanes, J. R. y Marshall, L. M. (1978). Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature* **271**: 172-174.
- Mehndiratta, M. M., Pandey, S. y Kuntzer, T. (2014). Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD006986
- Melo, J. B., Agostinho, P. y Oliveira, C. R. (2003). Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci. Res.* **45**: 117-127.
- Meneely, G. A. y Wyttenbach, C. R. (1989). Effects of the organophosphate insecticides Diazinon and Parathion on Bob-white quail embryos: skeletal defects and acetylcholinesterase activity. *J. Exp. Biol.* **252**: 60-70.
- Meshorer, E. y Soreq, H. (2006). Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci.* **29**: 216-224.
- Meshorer, E., Erb, C., Gazit, R., Pavlovsky, L., Kaufer, D., Friedman, A., Glick, D., Ben Arie, N. y Soreq, H. (2002). Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science* **295**: 508-512.
- Meshorer, E., Toiber, D., Zurel, D., Sahly, I., Dori, A., Cagnano, E., Schreiber, L. y otros (2004). Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products. *J. Biol. Chem.* **279**: 29740-29751.
- Meyer, E. L., Gahring, L. C. y Rogers, S. W. (2002). Nicotine preconditioning antagonizes activity-dependent caspase proteolysis of a glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* **277**: 10869-10875.
- Mihaylova, V., Muller, J. S., Vilchez, J. J., Salih, M. A., Kabiraj, M. M., D'Amico, A., Bertini, E. y otros (2008). Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain* **131**: 747-759.
- Misawa, M., Doull, J., Kitos, P. A. y Kyeki, E. M. (1981). Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. I. Diazinon treatment on acetylcholinesterase and acetyltransferase activities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **57**: 20-29.
- Mok, M. K., Leung, K. W., Xie, H. Q., Guo, A. J., Chen, V. P., Zhu, J. T., Choi, R. C. y Tsim, K. W. (2009). A new variant of proline-rich membrane anchor (PRiMA) of acetylcholinesterase in chicken: expression in different muscle fiber types. *Neurosci. Lett.* **461**: 202-206.

- Momonoki, Y. S. (1997). Asymmetric distribution of acetylcholinesterase in gravistimulated maize seedlings. *Plant Physiol.* **114**: 47-53.
- Montenegro, M. F., Ruiz-Espejo, F., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E., Páez de la Cadena, M., Rodríguez-Berrocal, F. J. y Vidal, C. J. (2006). Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 2175-2182.
- Montenegro, M. F., Moral-Naranjo, M. T., Páez de la Cadena, M., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. (2008). Human butyrylcholinesterase components differ in aryl acylamidase activity. *Biol. Chem.* **389**: 425-432.
- Montenegro, M. F., Moral-Naranjo, M. T., Muñoz-Delgado, E., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (2009). Hydrolysis of acetylthiocholine, o-nitroacetanilide and o-nitrofluoroacetanilide by fetal bovine serum acetylcholinesterase. *FEBS J.* **276**: 2074-2083.
- Montenegro, M. F., Nieto-Ceron, S., Cabezas-Herrera, J., Muñoz-Delgado, E., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (2014). Most acetylcholinesterase activity of non-nervous tissues and cells arises from the AChE-H transcript. *J. Mol. Neurosci.* **53**: 429-435.
- Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. (2017). Lipid rafts of mouse liver contain nonextended and extended acetylcholinesterase variants along with M3 muscarinic receptors. *FASEB J.* **31**: 544-555.
- Mor, I., Grisaru, D., Titelbaum, L., Evron, T., Richler, C., Wahrman, J., Sternfeld, M. y otros (2001). Modified testicular expression of stress-associated "readthrough" acetylcholinesterase predicts male infertility. *FASEB J.* **15**: 2039-2041.
- Moral-Naranjo, M. T., Cabezas-Herrera, J. y Vidal, C. J. (1996). Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **43**: 224-234.
- Moral-Naranjo, M. T., Campoy, F. J., Cabezas-Herrera, J. y Vidal, C. J. (1999). Increased butyrylcholinesterase levels in microsomal membranes of dystrophic *Lama2dy* mouse muscle. *J. Neurochem.* **73**: 1138-1144.
- Moral-Naranjo, M. T., Cabezas-Herrera, J., Vidal, C. J. y Campoy, F. J. (2002). Muscular dystrophy with laminin deficiency decreases the content of butyrylcholinesterase tetramers in sciatic nerves of *Lama2dy* mice. *Neurosci. Lett.* **331**: 155-158.
- Moral-Naranjo, M. T., Montenegro, M. F., Muñoz-Delgado, E., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (2008). Targeting of acetylcholinesterase to lipid rafts of muscle. *Chem. Biol. Interact.* **175**: 312-317.
- Moral-Naranjo, M. T., Montenegro, M. F., Muñoz-Delgado, E., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (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.
- Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M. y Hibbs, R. E. (2016). X-ray structure of the human alpha4beta2 nicotinic receptor. *Nature* **538**: 411-415.
- Morel, N., Bon, S., Greenblatt, H. M., van Belle, D., Wodak, S. J., Sussman, J. L., Massoulié, J. y Silman, I. (1999). Effects of mutations within the peripheral anionic site on the stability of acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* **55**: 982-992.
- Morel, N., Leroy, J., Ayon, A., Massoulié, J. y 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. *J. Biol. Chem.* **276**: 37379-37389.
- Mousavi, M. y Hellstrom-Lindahl, E. (2009). Nicotinic receptor agonists and antagonists increase sAPPalpha secretion and decrease Abeta levels in vitro. *Neurochem. Int.* **54**: 237-244.

- Moya-Quiles, M. R., Villalba-Sánchez, J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. (1992). Alkaline treatment of muscle microsomes releases amphiphilic and hydrophilic forms of acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* **1121**: 88-96.
- Muñoz, F. J., Aldunate, R. y Inestrosa, N. C. (1999). Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase. *Neuroreport* **10**: 3621-3625.
- Muñoz-Delgado, E., Montenegro, M. F., Campoy, F. J., Moral-Naranjo, M. T., Cabezas-Herrera, J., Kovacs, G. y Vidal, C. J. (2010). Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types. *FEBS J.* **277**: 4519-4529.
- Mutero, A., Camp, S. y Taylor, P. (1995). Promoter elements of the mouse acetylcholinesterase gene. Transcriptional regulation during muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **270**: 1866-1872.
- Nachon, F., Nicolet, Y., Viguie, N., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C. y Lockridge, O. (2002). Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization. *Eur. J. Biochem.* **269**: 630-637.
- Nadorp, B. y Soreq, H. (2014). Predicted overlapping microRNA regulators of acetylcholine packaging and degradation in neuroinflammation-related disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **7**: 9
- Nathanson, N. M. (2004). Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Encyclopedia of Biological Chemistry* **2**: 775-777.
- Nathanson, N. M. (2008). Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Ther.* **119**: 33-43.
- Navaranjan, G., Hohenadel, K., Blair, A., Demers, P. A., Spinelli, J. J., Pahwa, P., McLaughlin, J. R. y otros (2013). Exposures to multiple pesticides and the risk of Hodgkin lymphoma in Canadian men. *Cancer Causes Control.* **24**: 1661-1673.
- Ng, V., Koh, D., Wee, A. y Chia, S. E. (2009). Salivary acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposure. *Occup. Med. (Lond).* **59**: 120-122.
- Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C. y Nachon, F. (2003). Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.* **278**: 41141-41147.
- Nieto-Cerón, S. (2004). Distrofia muscular por deficiencia de merosina: actividad, propiedades moleculares y ARN mensajeros de acetilcolinesterasa en bazo y timo de ratón distrófico *Lama2dy*. Murcia.
- Nieto-Cerón, S., Moral-Naranjo, M. T., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C. J. y Campoy, F. J. (2004). Molecular properties of acetylcholinesterase in mouse spleen. *Neurochem. Int.* **45**: 129-139.
- Nieto-Cerón, S., Sánchez del Campo, L. F., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C. J. y Campoy, F. J. (2005). Muscular dystrophy by merosin deficiency decreases acetylcholinesterase activity in thymus of *Lama2dy* mice. *J. Neurochem.* **95**: 1035-1046.
- Nigg, H. N., Ramos, L. E., Graham, E. M., Sterling, J., Brown, S. y Cornell, J. A. (1996). Inhibition of human plasma and serum butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) by alpha-chaconine and alpha-solanine. *Fundam. Appl. Toxicol.* **33**: 272-281.
- Nijholt, I., Farchi, N., Kye, M., Sklan, E. H., Shoham, S., Verbeure, B., Owen, D. y otros (2003). Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. *Mol. Psychiatry* **9**: 174-83.
- Niu, X. M. y Lu, S. (2014). Acetylcholine receptor pathway in lung cancer: New twists to an old story. *World J. Clin. Oncol.* **5**: 667-676.

- Novotny, A., Ryberg, K., Heiman, U. J., Nilsson, L., Khorram-Manesh, A., Nordgren, S., Delbro, D. S. y Nylund, G. (2011). Is acetylcholine a signaling molecule for human colon cancer progression? *Scand. J. Gastroenterol.* **46**: 446-455.
- O'Malley, K. E., Farrell, C. B., O'Boyle, K. M. y Baird, A. W. (1995). Cholinergic activation of Cl⁻ secretion in rat colonic epithelia. *Eur. J. Pharmacol.* **275**: 83-89.
- Ohno, K., Ito, M., Kawakami, Y. y Ohtsuka, K. (2014). Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J. Mol. Neurosci.* **53**: 359-361.
- Ohtani, M., Daly, J. W. y Oka, T. (2009). Co-existence of muscarinic and nicotinic receptors and their functional interaction in mouse Beta-TC6 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **604**: 150-157.
- Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T. y Katsura, I. (2000). Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat. Neurosci.* **3**: 120-125.
- Oldfield, S., Hancock, J., Mason, A., Hobson, S. A., Wynick, D., Kelly, E., Randall, A. D. y Marrion, N. V. (2009). Receptor-mediated suppression of potassium currents requires colocalization within lipid rafts. *Mol. Pharmacol.* **76**: 1279-1289.
- Ollis, D. L., Chean, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M. y otros (1992). The a/b hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**: 197-211.
- Onodera, K., Pouokam, E. y Diener, M. (2013). STIM1-regulated Ca²⁺ influx across the apical and the basolateral membrane in colonic epithelium. *J. Membr. Biol.* **246**: 271-285.
- Oppitz, M., Mobus, V., Brock, S. y Drews, U. (2002). Muscarinic receptors in cell lines from ovarian carcinoma: negative correlation with survival of patients. *Gynecol. Oncol.* **85**: 159-164.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner M., Segall Y., Cohen S., Velan B. y 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. *J. Biol. Chem.* **268**: 17083-17095.
- Padilla, S. (1995). The neurotoxicity of cholinesterase-inhibiting insecticides: past and present evidence demonstrating persistent effects. *Inhal. Toxicol.* **7**: 903-907.
- Paliwal, A., Vaissiere, T., Kraiss, A., Cuenin, C., Cros, M. P., Zaridze, D., Moukeria, A. y otros (2010). Aberrant DNA methylation links cancer susceptibility locus 15q25.1 to apoptotic regulation and lung cancer. *Cancer Res.* **70**: 2779-2788.
- Palma, E., Bertrand, S., Binzoni, T. y Bertrand, D. (1996). Neuronal nicotinic alpha 7 receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *J. Physiol.* **491**: 151-161.
- Paoletti, F., Mocali, A. y Vannucchi, A. M. (1992). Acetylcholinesterase in murine erythroleukemia (Friend) cells: evidence for megakaryocyte-like expression and potential growth-regulatory role of enzyme activity. *Blood* **79**: 2873-2879.
- Papke, R. L., Sanberg, P. R. y Shytle, R. D. (2001). Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**: 646-656.
- Paraoanu, L. E., Steinert, G., Koehler, A., Wessler, I. y Layer, P. G. (2007). Expression and possible functions of the cholinergic system in a murine embryonic stem cell line. *Life Sci.* **80**: 2375-2379.
- Park, J. G., Frucht, H., LaRocca, R. V., Bliss, D. P., Jr., Kurita, Y., Chen, T. R., Henslee, J. G. y otros (1990). Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res.* **50**: 2773-2780.

- Park, S. E., Kim, N. D. y Yoo, Y. H. (2004). Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res.* **64**: 2652-2655.
- Park, S. E., Jeong, S. H., Yee, S. B., Kim, T. H., Soung, Y. H., Ha, N. C., Kim, N. D. y otros (2008). Interactions of acetylcholinesterase with caveolin-1 and subsequently with cytochrome c are required for apoptosome formation. *Carcinogenesis* **29**: 729-737.
- Parmo-Folloni, F., Nunes, K., Lepienski, L. M., Mikami, L. R., Souza, R. L., Tsuneto, L. T., Petzl-Erler, M. L. y Chautard-Freire-Maia, E. A. (2008). Two new mutations of the human BCHE gene (IVS3-14T>C and L574fsX576). *Chem. Biol. Interact.* **175**: 135-137.
- Patinkin, D., Seidman, S., Eckstein, F., Benseler, F., Zakut, H. y Soreq, H. (1990). Manipulations of cholinesterase gene expression modulate murine megakaryocytopoiesis in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6046-6050.
- Peng, C., Kimbrell, M. R., Tian, C., Pack, T. F., Crooks, P. A., Fifer, E. K. y Papke, R. L. (2013). Multiple modes of alpha7 nAChR noncompetitive antagonism of control agonist-evoked and allosterically enhanced currents. *Mol. Pharmacol.* **84**: 459-475.
- Perez, M. J., Rodriguez, L. A., Fernandez-Briera, A. y Nieto, T. P. (2002). A 45-kDa acetylcholinesterase protoxin of *Aeromonas hydrophila*: purification and immunogenicity in fish. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**: 23-27.
- Perrier, A. L., Massoulié, J. y Krejci, E. (2002). PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* **33**: 275-285.
- Perrier, N. A., Kherif, S., Perrier, A. L., Dumas, S., Mallet, J. y Massoulié, J. (2003). Expression of PRiMA in the mouse brain: membrane anchoring and accumulation of 'tailed' acetylcholinesterase. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 1837-1847.
- Perrier, N. L., Salani, M., Falasca, C., Bon, S., Augusti-Tocco, G. y Massoulié, J. (2005). The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and *in vivo*. *J. Neurochem.* **94**: 629-638.
- Perry, C., Sklan, E. H., Birikh, K., Shapira, M., Trejo, L., Eldor, A. y Soreq, H. (2002). Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors. *Oncogene* **21**: 8428-8441.
- Perry, C., Sklan, E. H. y Soreq, H. (2004). CREB regulates AChE-R-induced proliferation of human glioblastoma cells. *Neoplasia* **6**: 279-286.
- Perry, C., Pick, M., Podoly, E., Gilboa-Geffen, A., Zimmerman, G., Sklan, E. H., Ben-Shaul, Y., Diamant, S. y Soreq, H. (2007). Acetylcholinesterase/C terminal binding protein interactions modify Ikaros functions, causing T lymphopenia. *Leukemia* **21**: 1472-1480.
- Pettersson, A., Nordlander, S., Nylund, G., Khorram-Manesh, A., Nordgren, S. y Delbro, D. S. (2008). Expression of the endogenous, nicotinic acetylcholine receptor ligand, SLURP-1, in human colon cancer. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* **28**: 109-116.
- Pettersson, A., Nilsson, L., Nylund, G., Khorram-Manesh, A., Nordgren, S. y Delbro, D. S. (2009a). 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.
- Pettersson, A., Nylund, G., Khorram-Manesh, A., Nordgren, S. y Delbro, D. S. (2009b). Nicotine induced modulation of SLURP-1 expression in human colon cancer cells. *Auton. Neurosci.* **148**: 97-100.
- Pezzementi, L. y Chatonnet, A. (2010). Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. *Chem. Biol. Interact.* **187**: 27-33.
- Pezzementi, L., Nachon, F. y Chatonnet, A. (2011). Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*. *PLoS One* **6**: e17396.

- Pezzementi, L., Reinheimer, E. J. y Pezzenenti, M. L. (1987). Acetylcholinesterase from skeletal muscle of the lamprey *Petromyzon marinus* exists in globular and asymmetric forms. *J. Neurochem.* **48**: 1753-1760.
- Pfifzner, E., Jahne, R., Wissler, M., Stoecklin, E. y Groner, B. (1998). p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol. Endocrinol.* **12**: 1582-1593.
- Plageman, L. R., Pauletti, G. M. y Skau, K. A. (2002). Characterization of acetylcholinesterase in Caco-2 cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* **227**: 480-486.
- Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. *Chem. Rev.* **87**: 955-979.
- Rachinsky, T. L., Camp, S., Li, Y., Ekström, T. J., Newton, M. y Taylor, P. (1990). Molecular cloning of mouse acetylcholinesterase: tissue distribution of alternatively spliced mRNA species. *Neuron* **5**: 317-327.
- Racke, K., Juergens, U. R. y Matthiesen, S. (2006). Control by cholinergic mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* **533**: 57-68.
- Radic, Z., Duran, R., Vellom, D. C., Li, Y., Cervenansky, C. y Taylor, P. (1994). Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **269**: 11233-11239.
- Rama Sastry, B. V. (1997). Human placental cholinergic system. *Biochem. Pharmacol.* **53**: 1557-1586.
- Ramirez-Latorre, J., Yu, C. R., Qu, X., Perin, F., Karlin, A. y Role, L. (1996). Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* **380**: 347-351.
- Randall, W. R., Rimer, M. y Gough, N. R. (1994). Cloning and analysis of chicken acetylcholinesterase transcripts from muscle and brain. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**: 453-456.
- Rao, J. S., Hantai, D. y Festoff, B. W. (1993). Thrombospondin, a platelet alpha-granule and matrix glycoprotein is increased in muscle basement membrane of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **113**: 99-107
- Raufman, J. P., Samimi, R., Shah, N., Khurana, S., Shant, J., Drachenberg, C., Xie, G., Wess, J. y Cheng, K. (2008). Genetic ablation of M3 muscarinic receptors attenuates murine colon epithelial cell proliferation and neoplasia. *Cancer Res.* **68**: 3573-3578.
- Raufman, J. P., Cheng, K., Saxena, N., Chahdi, A., Belo, A., Khurana, S. y Xie, G. (2011). Muscarinic receptor agonists stimulate matrix metalloproteinase 1-dependent invasion of human colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**: 319-324.
- Raves, M. L., Harel, M., Pang, Y. P., Silman, I., Kozikowski, A. P. y Sussman, J. L. (1997). Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 57-63.
- Rayford, W., Noble, M. J., Austenfeld, M. A., Weigel, J., Mebust, W. K. y Shah, G. V. (1997). Muscarinic cholinergic receptors promote growth of human prostate cancer cells. *Prostate* **30**: 160-166.
- Reddy, M. S., Jayaprada, P. y Rao, K. V. (1990). Impact of methylparathion and malathion on cholinergic and non-cholinergic enzyme systems of penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros*. *Biochem. Int.* **22**: 769-779.
- Resende, R. R., Alves, A. S., Britto, L. R. y Ulrich, H. (2008a). Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **314**: 1429-1443.

- Resende, R. R., Gomes, K. N., Adhikari, A., Britto, L. R. y Ulrich, H. (2008b). Mechanism of acetylcholine-induced calcium signaling during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells in vitro. *Cell Calcium*. **43**: 107-121.
- Rezvani, K., Teng, Y., Shim, D. y De, B. M. (2007). Nicotine regulates multiple synaptic proteins by inhibiting proteasomal activity. *J. Neurosci*. **27**: 10508-10519.
- Roberts, W. L. y Rosenberry, T. L. (1985). Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **133**: 621-627.
- Roberts, W. L., Santikarn, S., Reinhold, V. N. y Rosenberry, T. L. (1988). Structural characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase by fast bombardment mass spectrometry. *J. Biol. Chem*. **263**: 18776-18784.
- Roderick, H. L. y Cook, S. J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 361-375.
- Rosenberry, T. L. (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, T. L. y Richardson, J. M. (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.
- Rosenberry, T. L., Barnett, P. y Mays, C. (1980). The collagen-like subunits of acetylcholinesterase from the eel *Electrophorus electricus*. *Neurochem. Int.* **2**: 135-148.
- Rossi, A., Vicini, E., Scarsella, G. y Biagioni, S. (1991). Acetylcholinesterase distribution in subpopulations of murine thymocyte. *J. Neurosci. Res.* **29**: 201-206.
- Rotundo, R. L. (1984a). Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 479-483.
- Rotundo, R. L. (1984b). Purification and properties of the membrane-bound form of acetylcholinesterase from chicken brain. Evidence for two distinct polypeptide chains. *J. Biol. Chem.* **259**: 13186-13194.
- Rotundo, R. L. (1984c). Synthesis, assembly, and processing of acetylcholinesterase in tissue cultured muscle. En: *Cholinesterases: Fundamental and Applied Aspects*. Brzin, M., Barnard, E.A., and Sket, D. (Eds.) Walter de Gruyter. Berlin.
- Rotundo, R. L. (1987). Biogenesis and regulation of acetylcholinesterase. En: *The Vertebrate Neuromuscular Junction*. pp. 247-284. Salpeter, M.M. (Ed.) Liss, A.R. New York.
- Rotundo, R. L. (1988). Biogenesis of acetylcholinesterase molecular forms in muscle: evidence for a rapidly turning over, catalytically inactive precursor pool. *J. Biol. Chem.* **263**: 19398-19406.
- Rotundo, R. L. y Carbonetto, S. T. (1987). Neurons segregate clusters of membrane-bound acetylcholinesterase along their neurites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2063-2067.
- Rotundo, R. L., Ruiz, C. A., Marrero, E., Kimbell, L. M., Rossi, S. G., Rosenberry, T., Darr, A. y Tsoulfas, P. (2008). Assembly and regulation of acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction. *Chem. Biol. Interact.* **175**: 26-29.
- Rucktooa, P., Smit, A. B. y Sixma, T. K. (2009). Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures. *Biochem. Pharmacol.* **78**: 777-787.

- Ruiz, C. A. y Rotundo, R. L. (2009). Limiting role of protein disulfide isomerase in the expression of collagen-tailed acetylcholinesterase forms in muscle. *J. Biol. Chem.* **284**: 31753-31763.
- Ruiz-Espejo, F., Cabezas-Herrera, J., Illana, J., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (2002). Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **72**: 11-22.
- Ruiz-Espejo, F., Cabezas-Herrera, J., Illana, J., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. (2003). Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. *Breast Cancer Res. Treat.* **80**: 105-114.
- Russo, P., Del, B. A., Milic, M., Salinaro, G., Fini, M. y Cesario, A. (2014). Cholinergic receptors as target for cancer therapy in a systems medicine perspective. *Curr. Mol. Med.* **14**: 1126-1138.
- Sack, U., Walther, W., Scudiero, D., Selby, M., Aumann, J., Lemos, C., Fichtner, I. y otros (2011). S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/beta-catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol. Biol. Cell.* **22**: 3344-3354.
- Sáez-Valero, J. y Vidal, C. J. (1995). Monomers and dimers of acetylcholinesterase in human meningioma are anchored to the membrane by glycosylphosphatidylinositol. *Neurosci. Lett.* **195**: 101-104.
- Sáez-Valero, J. y Vidal, C. J. (1996). Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma. *Biochim. Biophys. Acta* **1317**: 210-218.
- Sáez-Valero, J., Tornel, P. L., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. (1993). Amphiphilic and hydrophilic forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human brain. *J. Neurosci. Res.* **35**: 678-689.
- Sáez-Valero, J., Poza-Cisneros, G. y Vidal, C. J. (1996). Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human glioma. *Neurosci. Lett.* **206**: 173-176.
- Sáez-Valero, J., Sberna, G., McLean, C. A., Masters, C. L. y Small, D. H. (1997). Glycosylation of acetylcholinesterase as diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Lancet* **350**: 929
- Sáez-Valero, J., Sberna, G., McLean, C. A. y Small, D. H. (1999). Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **72**: 1600-1608.
- Sáez-Valero, J., Barquero, M. S., Marcos, A., McLean, C. A. y Small, D. H. (2000). Altered glycosylation of acetylcholinesterase in lumbar cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **69**: 664-667.
- Sáez-Valero, J., Fodero, L. R., Sjogren, M., Andreasen, N., Amici, S., Gallai, V., Vanderstichele, H. y otros (2003). Glycosylation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase changes as a function of the duration of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **72**: 520-526.
- Sagane, Y., Nakagawa, T., Yamamoto, K., Michikawa, S., Oguri, S. y Momonoki, Y. S. (2005). Molecular characterization of maize acetylcholinesterase: a novel enzyme family in the plant kingdom. *Plant Physiol.* **138**: 1359-1371.
- Sailaja, B. S., Cohen-Carmon, D., Zimmerman, G., Soreq, H. y Meshorer, E. (2012). Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: E3687-E3695.
- Sayer, R., Law, E., Connelly, P. J. y Breen, K. C. (2004). Association of a salivary acetylcholinesterase with Alzheimer's disease and response to cholinesterase inhibitors. *Clin. Biochem.* **37**: 98-104.

- Sberna, G., Sáez-Valero, J., Beyreuther, K., Masters, C. L. y Small, D. H. (1997). The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease increases acetylcholinesterase expression by increasing intracellular calcium in embryonal carcinoma P19 cells. *J. Neurochem.* **69**: 1177-1184.
- Schaal, C. y Chellappan, S. P. (2014). Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Mol. Cancer Res.* **12**: 14-23.
- Schuller, H. M. (2009). Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat. Rev. Cancer* **9**: 195-205.
- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S. S., Friedmann, T. y Taylor, P. (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* **319**: 407-409.
- Schwarz, M., Glick, D., Loewenstein, Y. y Soreq, H. (1995). Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacol. Ther.* **67**: 283-322.
- Schwenke, K., Peterson, H. P., Wangenheim, K. H. y Feinendegen, L. E. (1995). Induction of differentiation in erythroleukemic K562 cells by gamma- irradiation. *Leuk. Res.* **19**: 955-961.
- Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A. y Patrick, J. W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* **13**: 596-604.
- Seo, S., Henry, J. T., Lewis, A. H., Wang, N. y Levandoski, M. M. (2009). The positive allosteric modulator morantel binds at noncanonical subunit interfaces of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* **29**: 8734-8742.
- Sepsova, V., Krusek, J., Zdarova, K. J., Zemek, F., Musilek, K., Kuca, K. y Soukup, O. (2014). The interaction of quaternary reversible acetylcholinesterase inhibitors with the nicotinic receptor. *Physiol. Res.* **63**: 771-777.
- Serrano-Sánchez, M. I. (2012). Papel de la acetilcolinesterasa en la diferenciación de células Caco-2 de adenocarcinoma colorrectal humano. Universidad de Murcia. Trabajo Fin de Máster.
- Shafferman, A., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M. y Grosfeld, H. (1992a). Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J. Biol. Chem.* **267**: 17640-17648.
- Shafferman, A., Velan, B., Ordentlich, A., Kronman, C., Grosfeld, H., Leitner, M., Flashner, Y. y otros (1992b). Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues involved in signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J.* **11**: 3561-3568.
- Shah, N., Khurana, S., Cheng, K. y Raufman, J. P. (2009). Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**: C221-C232.
- Shaked, I., Meerson, A., Wolf, Y., Avni, R., Greenberg, D., Gilboa-Geffen, A. y Soreq, H. (2009). MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity* **31**: 965-973.
- Shaltiel, G., Hanan, M., Wolf, Y., Barbash, S., Kovalev, E., Shoham, S. y Soreq, H. (2013). Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain Struct. Funct.* **218**: 59-72.
- Shao, Y., Yu, Y., Zhou, Q., Li, C., Yang, L. y Pei, C. G. (2015). Inhibition of miR-134 Protects Against Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in Retinal Ganglion Cells. *J. Mol. Neurosci.* **56**: 461-471.

- Shapira, M., Tur-Kaspa, I., Bosgraaf, L., Livni, N., Grant, A. D., Grisaru, D., Korner, M., Ebstein, R. P. y Soreq, H. (2000). A transcription-activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 1273-1281.
- Sharma, G. y Vijayaraghavan, S. (2001). Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**: 4148-4153.
- Sharma, K. V., Koenigsberger, C., Brimijoin, S. y Bigbee, J. W. (2001). Direct evidence for an adhesive function in the noncholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* **63**: 165-175.
- Shen, J. X. y Yakel, J. L. (2009). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**: 673-680.
- Shih, Y. L., Liu, H. C., Chen, C. S., Hsu, C. H., Pan, M. H., Chang, H. W., Chang, C. H. y otros (2010). Combination treatment with luteolin and quercetin enhances antiproliferative effects in nicotine-treated MDA-MB-231 cells by down-regulating nicotinic acetylcholine receptors. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 235-241.
- Sikorav, J. L., Krejci, E. y Massoulié, 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.
- Sikorav, J. L., Duval, N., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Osterlund, M., Reimund, B. y Massoulié, 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.
- Silman, I. y Futerman, A. H. (1987). Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *Eur. J. Biochem.* **170**: 11-22.
- Silver, A. (1974). *The Biology of Cholinesterases*. North-Holland Pub. Co.
- Silveyra, M. X., Cuadrado-Corrales, N., Marcos, A., Barquero, M. S., Rabano, A., Calero, M. y Saez-Valero, J. (2006). Altered glycosylation of acetylcholinesterase in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurochem.* **96**: 97-104.
- Simon, S., Le Goff, A., Frobert, Y., Grassi, J. y Massoulié, J. (1999). The binding sites of inhibitory monoclonal antibodies on acetylcholinesterase. Identification of a novel regulatory site at the putative "back door". *J. Biol. Chem.* **274**: 27740-27746.
- Sine, J. P., Ferrand, R., Cloarec, D., Lehur, P. A. y Colas, P. (1991). Human intestine epithelial cell acetyl- and butyrylcholinesterase. *Mol. Cell. Biochem.* **108**: 145-149.
- Siow, N. L., Choi, R. C., Cheng, A. W., Jiang, J. X., Wan, D. C., Zhu, S. Q. y Tsim, K. W. (2002). A Cyclic AMP-dependent Pathway Regulates the Expression of Acetylcholinesterase during Myogenic Differentiation of C2C12 Cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 36129-36136.
- Siow, N. L., Choi, R. C., Xie, H. Q., Kong, L. W., Chu, G. K., Chan, G. K., Simon, J., Barnard, E. A. y Tsim, K. W. (2010). ATP induces synaptic gene expressions in cortical neurons: transduction and transcription control via P2Y1 receptors. *Mol. Pharmacol.* **78**: 1059-1071.
- Skau, K. A. (1990). On the specificity of the acetylcholinesterase defect in dystrophic mice. *Muscle Nerve* **13**: 321-325.
- Skau, K. A. y Brimijoin, S. (1978). Release of acetylcholinesterase from rat hemidiaphragm preparations stimulated through the phrenic nerve. *Nature* **275**: 224-226.
- Skau, K. A. y Brimijoin, S. (1980). Multiple molecular forms of acetylcholinesterase in rat vagus nerve, smooth muscle and heart. *J. Neurochem.* **35**: 1151-1154.

- Sobradillo, D., Hernandez-Morales, M., Ubierna, D., Moyer, M. P., Nunez, L. y Villalobos, C. (2014). A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **289**: 28765-28782.
- Song, P., Sekhon, H. S., Jia, Y., Keller, J. A., Blusztajn, J. K., Mark, G. P. y Spindel, E. R. (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, H. S., Proskocil, B., Blusztajn, J. K., Mark, G. P. y Spindel, E. R. (2003b). Synthesis of acetylcholine by lung cancer. *Life Sci.* **72**: 2159-2168.
- Song, P., Sekhon, H. S., Fu, X. W., Maier, M., Jia, Y., Duan, J., Proskocil, B. J. y otros (2008). Activated cholinergic signaling provides a target in squamous cell lung carcinoma. *Cancer Res.* **68**: 4693-4700.
- Song, P., Rekow, S. S., Singleton, C. A., Sekhon, H. S., Dissen, G. A., Zhou, M., Campling, B., Lindstrom, J. y Spindel, E. R. (2013). Choline transporter-like protein 4 (CTL4) links to non-neuronal acetylcholine synthesis. *J. Neurochem.* **126**: 451-461.
- Soreq, H. y Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase: new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**: 294-302.
- Soreq, H. y 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. y Zakut, H. (1990b). Cholinesterase genes: Multileveled regulation; Monographs in Human Genetic. Karger. Bazel.
- Soreq, H. y Zakut, H. (1993). Human cholinesterases and anticholinesterases. Academic Press. San Diego, CA300.
- Soreq, H., Seidman, S., Dreyfus, P., Zevin-Sonkin, D. y Zakut, H. (1989). Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholine esterase in microinjected xenopus laevis oocytes. *J. Biol. Chem.* **264**: 10608-10613.
- Soreq, H., Ben-Aziz, R., Prody, C. A., Seidman, S., Gnatt, A., Neville, L., Lieman-Hurwitz, J. y otros (1990). Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9688-9692.
- Soreq, H., Lapidot-Lifson, Y. y Zakut, H. (1991). A role for cholinesterases in tumorigenesis?. *Cancer Cells* **3**: 511-516.
- Spuler, S. y Engel, A. G. (1997). SMI-31 immunoreactivity in inclusion body myositis. *Ann. Neurol.* **42**: 815
- Spurny, R., Debaveye, S., Farinha, A., Veys, K., Vos, A. M., Gossas, T., Atack, J. y otros (2015). Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**: E2543-E2552.
- Steiner, R. C., Heath, C. J. y Picciotto, M. R. (2007). Nicotine-induced phosphorylation of ERK in mouse primary cortical neurons: evidence for involvement of glutamatergic signaling and CaMKII. *J. Neurochem.* **103**: 666-678.
- Sternfeld, M., Ming, G. L., Song, H. J., Sela, K., Timberg, R., Poo, M. M. y Soreq, H. (1998). 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.
- Stetzkowski-Marden, F., Recouvreur, M., Camus, G., Cartaud, A. y Marchand, S. (2006). Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. *J. Mol. Neurosci.* **30**: 37-38.

- Stieger, S., Gentinetta, R. y Brodbeck, U. (1989). Cholinesterases from flounder muscle. Purification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored and collagen-tailed forms differing in substrate specificity. *Eur. J. Biochem.* **181**: 633-642.
- Strack, S., Petersen, Y., Wagner, A., Roder, I. V., Albrizio, M., Reischl, M., Wacker, I. U., Wilhelm, C. y Rudolf, R. (2011). A novel labeling approach identifies three stability levels of acetylcholine receptors in the mouse neuromuscular junction in vivo. *PLoS. One.* **6**: e20524.
- Summers, A. E., Whelan, C. J. y Parsons, M. E. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor subunits and receptor activity in the epithelial cell line HT29. *Life Sci.* **72**: 2091-2094.
- Sun, S., Li, W., Zhang, H., Zha, L., Xue, Y., Wu, X. y Zou, F. (2012). Requirement for store-operated calcium entry in sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Biosci. Rep.* **32**: 83-90.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Varon, L., Toker, L., Futerman, A. H. y 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, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. y Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**: 872-879.
- Sutherland, D., McClellan, J. S., Milner, D., Soong, W., Axon, N., Sanders, M., Hester, A. y otros (1997). Two cholinesterase activities and genes are present in amphioxus. *J. Exp. Zool.* **277**: 213-229.
- Swillens, S., Ludgate, M., Mercken, L., Dumont, J. E. y Vassart, G. (1986). Analysis of sequence and structure homologies between thyroglobulin and acetylcholinesterase: possible functional and clinical significance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**: 142-148.
- Taisne, C., Norel, X., Walch, L., Labat, C., Verriest, C., Mazmanian, G. M. y Brink, C. (1997). Cholinesterase activity in pig airways and epithelial cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **11**: 201-205.
- Talavera-Gutiérrez A. (2010). Efecto del silenciamiento de la acetilcolinesterasa sobre la apoptosis en células de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2). Universidad de Murcia. Trabajo Fin de Máster.
- Talesa, V. N. (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* **122**: 1961-1969.
- Taly, A., Corringier, P. J., Guedin, D., Lestage, P. y Changeux, J. P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**: 733-750.
- Taly, A., Colas, C., Malliavin, T., Blondel, A., Nilges, M., Corringier, P. J. y Joseph, D. (2011). Discrimination of agonists versus antagonists of nicotinic ligands based on docking onto AChBP structures. *J. Mol. Graph. Model.* **30**: 100-109.
- Tapia, L., Kuryatov, A. y Lindstrom, J. (2007). Ca²⁺ permeability of the (alpha4)3(beta2)2 stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)2(beta2)3 human acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **71**: 769-776.
- Taylor, P. (1991). The cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **266**: 4025-4028.
- Taylor, P. y Lappi, S. (1975). Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* **14**: 1989-1997.
- Thomas, R. L., Langmead, C. J., Wood, M. D. y Challiss, R. A. (2009). Contrasting effects of allosteric and orthosteric agonists on m1 muscarinic acetylcholine receptor internalization and down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**: 1086-1095.

- Toiber, D. y Soreq, H. (2005). Cellular stress reactions as putative cholinergic links in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **30**: 909-919.
- Toiber, D., Berson, A., Greenberg, D., Melamed-Book, N., Diamant, S. y Soreq, H. (2008). N-acetylcholinesterase-induced apoptosis in Alzheimer's disease. *PLoS One* **3**: e3108.
- Tojyo, Y., Morita, T., Nezu, A. y Tanimura, A. (2014). Key components of store-operated Ca²⁺ entry in non-excitabile cells. *J. Pharmacol. Sci.* **125**: 340-346.
- Tornel, P. L. (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, P. L., Sáez-Valero, J. y Vidal, C. J. (1992). *Ricinus communis* agglutinin I reacting and non-reacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid. *Neurosci. Lett.* **145**: 59-62.
- Tornel, P. L., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (1993). Cholinesterases in cerebrospinal fluid in patients with meningitis and hydrocephaly. *Clin. Chim. Acta* **214**: 219-225.
- Toutant, J. P., Arpagaus, M. (1990). Quaternary structure and hydrophobic interactions of *Drosophila* acetylcholinesterase in wild type flies and in mutants of the *Ace* locus. En: *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. pp. 239-242. Borkovec, A.B. and Masler, E.P. (Eds.) The Humana Press Inc. Clifton, N.J.
- Toutant, J. P., Massoulié, J. (1987). Acetylcholinesterase. En: *Mammalian Ectoenzymes*. pp. 289-328. Kenny, A.J. and Turner, A.J. (Eds.) Elsevier. Amsterdam.
- Toutant, J. P. y Massoulié, J. (1988). Cholinesterases: tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. *Hand. Exp. Pharmacol.* **86**: 225-265.
- Toutant, J. P., Massoulié, J. y Bon, S. (1985). Polymorphism of pseudocholinesterase in *Torpedo marmorata* tissues: comparative study of the catalytic and molecular properties of this enzyme with acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* **44**: 580-592.
- Toutant, J. P., Arpagaus, M. y Fournier, D. (1988). Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*. Quaternary structure and hydrophobic character. *J. Neurochem.* **50**: 209-218.
- Toutant, J. P., Richards, M. K., Krall, J. A. y Rosenberry, T. L. (1990). Molecular forms of acetylcholinesterase in two sublines of human erythroleukemia K562 cells. Sensitivity or resistance to phosphatidylinositol specific phospholipase C and biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **187**: 31-38.
- Toutant, J. P., Krall, J. A., Richards, M. K. y Rosenberry, T. L. (1991). Rapid analysis of glycolipid anchors in amphiphilic dimers of acetylcholinesterase. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**: 219-230.
- Treskatis, S., Ebert, C. y Layer, P. G. (1992). Butyrylcholinesterase from chicken brain is smaller than that from serum: its purification, glycosylation and membrane association. *J. Neurochem.* **58**: 2236-2247.
- Treviño, J. G., Pillai, S., Kunigal, S., Singh, S., Fulp, W. J., Centeno, B. A. y Chellappan, S. P. (2012). Nicotine induces inhibitor of differentiation-1 in a Src-dependent pathway promoting metastasis and chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasia.* **14**: 1102-1114.
- Tsim, K. W. K., Randall, W. R. y Barnard, E. A. (1988a). An asymmetric form of muscle acetylcholinesterase contains three subunit types and two enzymic activities in one molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1262-1266.
- Tsim, K. W. K., Randall, W. R. y Barnard, E. A. (1988b). Identification of a 17 S asymmetric butyrylcholinesterase in chick muscle by monoclonal antibodies. *Neurosci. Lett.* **86**: 245-249.

- Tsim, K. W. K., Randall, W. R. y Barnard, E. A. (1988c). Synaptic acetylcholinesterase of chicken muscle changes during development from a hybrid to a homogeneous enzyme. *EMBO J.* **7**: 2451-2456.
- Tsim, K. W., Choi, R. C., Xie, H. Q., Zhu, J. T., Leung, K. W., Lau, F. T., Chu, G. K. y otros (2008). Transcriptional control of different subunits of AChE in muscles: signals triggered by the motor nerve-derived factors. *Chem. Biol. Interact.* **175**: 58-63.
- Tsuneki, H., Klink, R., Lena, C., Korn, H. y Changeux, J. P. (2000). Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur. J. Neurosci.* **12**: 2475-2485.
- Tunek, A., Levin, E. y Svensson, L. A. (1988). Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 3867-3876.
- Turner, A. J. (1994). PIG-tailed membrane proteins. *Essays Biochem.* **28**: 113-127.
- Ummenhofer, W. C., Brown, S.M. y Bernards, C. M. (1998). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are expressed in the spinal meninges of monkeys and pigs. *Anesthesiology* **88**: 1259-1265.
- Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J. Mol. Biol.* **346**: 967-989.
- Unwin, N. y Fujiyoshi, Y. (2012). Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. *J. Mol. Biol.* **422**: 617-634.
- Valentino, R. J., Lockridge, O., Eckerson, H. W. y LaDu, B. N. (1981). Prediction of drug sensitivity in individuals with atypical serum cholinesterase based on in vitro biochemical studies. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 1643-1649.
- Valette, F. M., De La Porte, S., Massoulié, J. (1991). Regulation and distribution of acetylcholinesterase molecular forms *in vivo* and *in vitro*. En: *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*. pp. 98-102. Massoulié, J., Bacou, F., Barnard, E.A., Chatonnet, A., Doctor, B.P., and Quinn, D.M. (Eds.) Washington.
- Varela-Nieto, I., León, Y. y Caro, H. N. (1996). Cell signalling by inositol phosphoglycans from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* **115**: 223-241.
- Velan, B., Kronman, C., Ordentlich, A., Flashner, Y., Leitner, M., Cohen, S. y Shafferman, A. (1993). N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochem. J.* **296**: 649-656.
- Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Katz, E. y Elgoyhen, A. B. (2000). Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology.* **39**: 2515-2524.
- Vidal, C. J. (1996). Glycosylation of cholinesterases and its alteration in some pathological processes. *Recent Res. Devel. Neurochem.* **1**: 37-54.
- Vidal, C. J. (2005). Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. *Chem. Biol. Interact.* **157-158**: 227-232.
- Vidal, C. J., Montenegro, M. F., Muñoz-Delgado, E., Campoy, F. J., Cabezas-Herrera, J. y Moral-Naranjo, M. T. (2013). The AChE membrane-binding tail PRiMA is down-regulated in muscle and nerve of mice with muscular dystrophy by merosin deficiency. *Chem. Biol. Interact.* **203**: 330-334.
- Vigny, M., Gisiger, V. y Massoulié, J. (1978). "Nonspecific" cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties and significance of the two enzyme systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 2588-2592.
- Villalobos, C., Sobradillo, D., Hernandez-Morales, M. y Nunez, L. (2017). Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1864**: 843-849.

- Viratelle, O. M. y Bernhard, S. A. (1980). Major component of acetylcholinesterase in *Torpedo* electroplax is not basal lamina associated. *Biochemistry* **19**: 4999-5007.
- von Rosenvinge, E. C. y Raufman, J. P. (2011). Muscarinic receptor signaling in colon cancer. *Cancers (Basel)* **3**: 971-981.
- Wang, F., Gerzanich, V., Wells, G. B., Anand, R., Peng, X., Keyser, K. y Lindstrom, J. (1996). Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J. Biol. Chem.* **271**: 17656-17665.
- Wang, Y., Pereira, E. F., Maus, A. D., Ostlie, N. S., Navaneetham, D., Lei, S., Albuquerque, E. X. y Conti-Fine, B. M. (2001). Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **60**: 1201-1209.
- Ward, J. M., Cockcroft, V. B., Lunt, G. G., Smillie, F. S. y Wonnacott, S. (1990). Methyllcaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS Lett.* **270**: 45-48.
- Wei, P. L., Chang, Y. J., Ho, Y. S., Lee, C. H., Yang, Y. Y., An, J. y Lin, S. Y. (2009). Tobacco-specific carcinogen enhances colon cancer cell migration through alpha7-nicotinic acetylcholine receptor. *Ann. Surg.* **249**: 978-985.
- Weidinger, C., Shaw, P. J. y Feske, S. (2013). STIM1 and STIM2-mediated Ca(2+) influx regulates antitumour immunity by CD8(+) T cells. *EMBO Mol. Med.* **5**: 1311-1321.
- Weikert, T. y Layer, P. G. (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.
- Wess, J. (1996). Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**: 69-99.
- Wessler, I. K. y Kirkpatrick, C. J. (2001). The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **14**: 423-434.
- Wessler, I. y Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Brit. J. Pharmacol.* **154**: 1558-1571.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. y 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.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F. y Kirkpatrick, C. J. (2001). The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn. J. Pharmacol.* **85**: 2-10.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R. y Kirkpatrick, C. J. (2003). The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sci.* **72**: 2055-2061.
- West, K. A., Brognard, J., Clark, A. S., Linnoila, I. R., Yang, X., Swain, S. M., Harris, C., Belinsky, S. y Dennis, P. A. (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.
- Williams, C. L. (2003). Muscarinic signaling in carcinoma cells. *Life Sci.* **72**: 2173-2182.
- Williams, C. L. y Lennon, V. A. (1990). Activation of M3 muscarinic acetylcholine receptors inhibits voltage-dependent calcium influx in small cell lung carcinoma. *J. Biol. Chem.* **265**: 1443-1447.
- Williams, C. L. y Lennon, V. A. (1991). Activation of muscarinic acetylcholine receptors inhibits cell cycle progression of small cell lung carcinoma. *Cell Regul.* **2**: 373-381.

- Williams, C. L., Hayes, V. Y., Hummel, A. M., Tarara, J. E. y Halsey, T. J. (1993). Regulation of E-cadherin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors in small cell lung carcinoma. *J. Cell Biol.* **121**: 643-654.
- Wilson, I. B. y Bergmann, F. (1950). Studies on cholinesterase. VII. The active surface of acetylcholinesterase derived from effect of pH on inhibitors. *J. Biol. Chem.* **185**: 479-489.
- Wong, H. P., Yu, L., Lam, E. K., Tai, E. K., Wu, W. K. y Cho, C. H. (2007a). Nicotine promotes cell proliferation via alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **221**: 261-267.
- Wong, H. P., Yu, L., Lam, E. K., Tai, E. K., Wu, W. K. y Cho, C. H. (2007b). Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation. *Toxicol. Sci.* **97**: 279-287.
- Wonnacott, S. (2014). Nicotinic ACh Receptors Scientific Review. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*.
- Wu, J. y Lukas, R. J. (2011). Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* **82**: 800-807.
- Xiang, A. C., Xie, J. y Zhang, X. J. (2008). Acetylcholinesterase in intestinal cell differentiation involves G2/M cell cycle arrest. *Cell Mol. Life Sci.* **65**: 1768-1779.
- Xiao, Y. y Kellar, K. J. (2004). The comparative pharmacology and up-regulation of rat neuronal nicotinic receptor subtype binding sites stably expressed in transfected mammalian cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**: 98-107.
- Xie, H. Q., Choi, R. C., Leung, K. W., Siow, N. L., Kong, L. W., Lau, F. T., Peng, H. B. y Tsim, K. W. (2007). Regulation of a transcript encoding the proline-rich membrane anchor of globular muscle acetylcholinesterase. The suppressive roles of myogenesis and innervating nerves. *J. Biol. Chem.* **282**: 11765-11775.
- Xie, G., Cheng, K., Shant, J. y Raufman, J. P. (2009a). Acetylcholine-induced activation of M3 muscarinic receptors stimulates robust matrix metalloproteinase gene expression in human colon cancer cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* **296**: G755-G763.
- Xie, H. Q., Choi, R. C. Y., Leung, K. W., Chen, V. P., Chu, G. K. Y. y Tsim, K. W. K. (2009b). Transcriptional regulation of proline-rich membrane anchor (PRiMA) of globular form acetylcholinesterase in neuron: an inductive effect of neuron differentiation. *Brain Res.* **1265**: 13-23.
- Xie, H. Q., Leung, K. W., Chen, V. P., Chan, G. K. L., Xu, S. L., Guo, A. J. Y., Zhu, K. Y. y otros (2010a). PRiMA directs a restricted localization of tetrameric AChE at synapses. *Chem. Biol. Interact.* **187**: 78-83.
- Xie, H. Q., Liang, D., Leung, K. W., Chen, V. P., Zhu, K. Y., Chan, W. K., Choi, R. C., Massoulié, J. y Tsim, K. (2010b). Targeting acetylcholinesterase to membrane rafts: a function mediated by the proline membrane anchor (PRiMA) in neurons. *J. Biol. Chem.* **285**: 11537-11546.
- Xie, J., Jiang, H., Wan, Y. H., Du, A. Y., Guo, K. J., Liu, T., Ye, W. Y. y otros (2011). Induction of a 55 kDa acetylcholinesterase protein during apoptosis and its negative regulation by the Akt pathway. *J. Mol. Cell Biol.* **3**: 250-259.
- Xie, H. Q., Xu, H. M., Fu, H. L., Hu, Q., Tian, W. J., Pei, X. H. y Zhao, B. (2013). AhR-mediated effects of dioxin on neuronal acetylcholinesterase expression in vitro. *Environ. Health Perspect.* **121**: 613-618.
- Xie, H. Q., Xu, T., Chen, Y., Li, Y., Xia, Y., Xu, S. L., Wang, L., Tsim, K. W. y Zhao, B. (2016). New perspectives for multi-level regulations of neuronal acetylcholinesterase by dioxins. *Chem. Biol. Interact.* **259**: 286-290.

- Xu, M. L., Luk, W. K., Lau, K. M., Bi, C. W., Cheng, A. W., Gong, A. G., Lin, H. y Tsim, K. W. (2015). Three N-Glycosylation Sites of Human Acetylcholinesterase Shares Similar Glycan Composition. *J. Mol. Neurosci.* **57**: 486-491.
- Yamada, T., Inazu, M., Tajima, H. y Matsumiya, T. (2011). Functional expression of choline transporter-like protein 1 (CTL1) in human neuroblastoma cells and its link to acetylcholine synthesis. *Neurochem. Int.* **58**: 354-365.
- Yang, L., He, H. Y. y Zhang, X. J. (2002). Increased expression of intranuclear AChE involved in apoptosis of SK-N-SH cells. *Neurosci. Res.* **42**: 261-268.
- Yang, W. L. y Frucht, H. (2000). Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **21**: 1789-1793.
- Yang, K., Song, Y., Tang, Y. B., Xu, Z. P., Zhou, W., Hou, L. N., Zhu, L. y otros (2014). mAChRs activation induces epithelial-mesenchymal transition on lung epithelial cells. *BMC. Pulm. Med.* **14**: 53.
- Yu, J., Huang, N. F., Wilson, K. D., Velotta, J. B., Huang, M., Li, Z., Lee, A. y otros (2009). nAChRs mediate human embryonic stem cell-derived endothelial cells: proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *PLoS. One.* **4**: e7040.
- Zakut, H., Ehrlich, G., Ayalon, A., Prody, C. A., Malinger, G., Seidman, S., Ginzberg, D., Kehlenbach, R. y Soreq, H. (1990). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. *J. Clin. Invest.* **86**: 900-908.
- Zhang, X. J. y Greenberg, D. S. (2012). Acetylcholinesterase involvement in apoptosis. *Front. Mol. Neurosci.* **5**: 40.
- Zhang, X. J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J. P., He, H. Y., Jin, Q. H., Guo, L. H. y otros (2002). Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ.* **9**: 790-800.
- Zhang, J. Y., Jiang, H., Gao, W., Wu, J., Peng, K., Shi, Y. F. y Zhang, X. J. (2008). The JNK/AP1/ATF2 pathway is involved in H₂O₂-induced acetylcholinesterase expression during apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.* **65**: 1435-1445.
- Zhao, Y., Wang, X., Wang, T., Hu, X., Hui, X., Yan, M., Gao, Q. y otros (2011). Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization. *Hepatology* **53**: 493-503.
- Zhu, H., Gao, W., Jiang, H., Jin, Q. H., Shi, Y. F., Tsim, K. W. y Zhang, X. J. (2007a). Regulation of acetylcholinesterase expression by calcium signaling during calcium ionophore A23187- and thapsigargin-induced apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 93-108.
- Zhu, H., Gao, W., Jiang, H., Wu, J., Shi, Y. F. y Zhang, X. J. (2007b). Calcineurin mediates acetylcholinesterase expression during calcium ionophore A23187-induced HeLa cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**: 593-602.
- Zhu, H., Gao, W., Shi, Y. F. y Zhang, X. J. (2007c). The CCAAT-binding factor CBF/NF-Y regulates the human acetylcholinesterase promoter activity during calcium ionophore A23187-induced cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**: 1475-1482.
- Zouridakis, M., Zisimopoulou, P., Poulas, K. y Tzartos, S. J. (2009). Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life.* **61**: 407-423.