

LAS COLINESTERASAS DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO  
EN SUJETOS NORMALES, CON MENINGITIS E HIDROCEFALIA.  
SU RELACION CON LAS ENZIMAS DEL ENCEFALO Y DEL PLASMA.

Memoria para aspirar al  
Grado de Doctor en Farmacia.

PEDRO LUIS TORNEL OSORIO

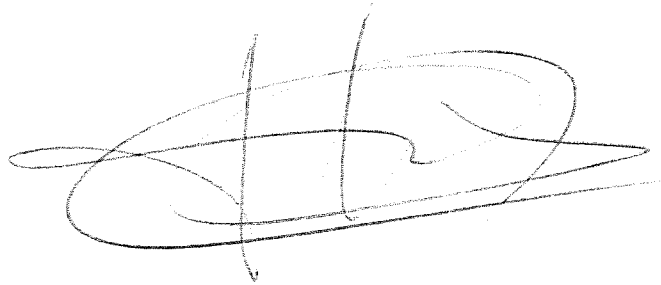
1992



FRANCISCO GARCIA CARMONA, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia

CERTIFICO: Que la Memoria titulada: "LAS COLINESTERASAS DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO EN SUJETOS NORMALES, CON MENINGITIS E HIDROCEFALIA. SU RELACION CON LAS ENZIMAS DEL ENCEFALO Y DEL PLASMA" presentada por D. Pedro Luis Tornel Osorio, para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada, ha sido realizada en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección del Dr. D. Cecilio Vidal Moreno.

Y para que conste donde convenga firmo la presente Memoria Científica en Murcia, a veintiuno de Marzo de mil novecientos noventa y dos.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom, identifying the signatory as Francisco García Carmona.

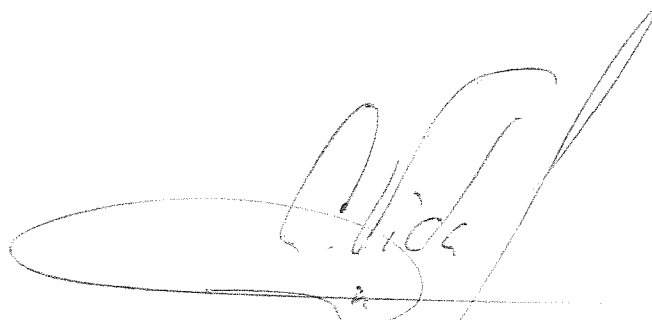
Fdo. Francisco García Carmona  
Catedrático y Director del Departamento  
de Bioquímica y Biología Molecular A.

CECILIO JESUS VIDAL MORENO, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Murcia,

CERTIFICO: Que los resultados experimentales recogidos en la Memoria titulada: "LAS COLINESTERASAS DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO EN SUJETOS NORMALES, CON MENINGITIS E HIDROCEFALIA. SU RELACION CON LAS ENZIMAS DEL ENCEFALO Y DEL PLASMA" presentada por D. Pedro Luis Tornel Osorio, para optar al Grado de Doctor en Farmacia, han sido obtenidos bajo mi inmediata dirección en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia.

Revisado el texto, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por la Comisión correspondiente.

Murcia, a seis de Marzo de mil novecientos noventa y dos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Vidal', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat cursive.

Fdo. Cecilio Jesús Vidal Moreno.

Prof. Titular del Departamento de

Bioquímica y Biología Molecular A.

FERMIN SANCHEZ DE MEDINA, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

Hace constar que la Memoria titulada: "LAS COLINESTERASAS DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO EN SUJETOS NORMALES, CON MENINGITIS E HIDROCEFALIA. SU RELACION CON LAS ENZIMAS DEL ENCEFALO Y DEL PLASMA" presentada por D. Pedro Luis Tornel Osorio, para optar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia, bajo la dirección de D. Cecilio Jesús Vidal Moreno, y que una vez examinada dicha Memoria acepta la Tutoría y actuación como Ponente para la presentación de la misma en esta Universidad.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada a seis de Mayo de mil novecientos noventa y dos.

Fdo. Fermín Sánchez de Medina  
Catedrático del Departamento de  
Bioquímica y Biología Molecular  
de la Facultad de Farmacia de la  
Universidad de Granada.

*A mi familia*

Quisiera mostrar mi agradecimiento al Profesor Dr. D. Cecilio Jesús Vidal Moreno, director de esta Tesis Doctoral, por sus consejos, estímulo y enseñanzas que me ha proporcionado.

A la Profesora Dra. Dña. Encarnación Muñoz Delgado, por su opinión crítica a la hora de juzgar los resultados de este trabajo.

A María Dolores Cánovas, Javier Campoy, José Villalba, Juan Cabezas, Rosa Moya y Javier Sáez, por la amistad e inestimable ayuda que me han brindado en cada momento.

Al resto de miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Murcia, que tan amablemente se han portado respecto a mi trabajo.

A la Dra. Dña. Rocío Alvarez, por las facilidades que me ha ofrecido en la gestión de esta Tesis.

A mis compañeros del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, por la ayuda e interés mostrado para la obtención del material biológico.

A los Profesores Dres. Dña. María Dolores Suárez Ortega, D. Fermín Sánchez de Medina y demás miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por haber hecho posible la lectura de esta Tesis Doctoral en dicha Universidad.

## ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa (Acetilcolina, acetil hidrolasa, E.C. 3.1.1.7.)
AE1-AE5	Anticuerpos monoclonales contra AChE
ATCh	Ioduro de acetiltiocolina
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
BuChE	Butirilcolinesterasa (acilcolina, acilhidrolasa, E.C. 3.1.1.8.)
BW 284c51	Dibromuro de 1,5-bis-(alildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona
C	Catalasa (E.C. 1.11.1.6)
ChE	Colinesterasa, acetil y butirilcolinesterasas
Con A	Concanavalina A
DE	Desviación estándar
DTNB	Acido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(aminoetiléter)-N-N'-tetraacético
F	Fosfatasa alcalina (E.C. 3.1.3.1)
Formas A	Formas moleculares asimétricas de ChE
Formas G	Formas moleculares globulares de ChE
G	$\beta$ -Galactosidasa (E.C. 3.2.1.23)
Gal	Galactosa
Glc	D-Glucosa
H	Líquido lumbar de sujetos con hidrocefalia
IgG	Inmunoglobulina G
Iso-OMPA	Tetraisopropilpirofosforamida



kD	Kilodaltones
LCA	Aglutinina de <i>Lens culinaris</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Man	Manosa
MB	Líquido lumbar de pacientes con meningitis bacteriana
NacGal	N-acetil-galactosamina
NacGlc	N-acetil-glucosamina
PBS	Tampón isotónico salino
p/v	Relación peso/volumen
RCA	Aglutinina de <i>Ricinus communis</i>
SNC	Sistema nervioso central
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
v/v	Relación volumen/volumen
VH	Líquido ventricular de sujetos con hidrocefalia
VVH	Líquido ventricular de sujetos con hidrocefalia y ventriculitis
WGA	Aglutinina de <i>Triticum vulgare</i>

## INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS.....	1
1. PROPIEDADES GENERALES DE LAS COLINESTERASAS.....	2
1.1. Descubrimiento.....	2
1.2. Definición y Especificidad.....	3
1.3. Catálisis.....	8
1.3.1. Mecanismo catalítico de hidrólisis de la acetilcolina.....	8
1.3.2. Inhibición.....	10
1.3.2.1. Inhibidores del sitio aniónico.....	10
1.3.2.2. Inhibidores del centro del éster.....	11
2. POLIMORFISMO DE LAS COLINESTERASAS.....	14
2.1. Componentes Moleculares Múltiples e Isoenzimas.....	14
2.2. Formas Asimétricas y Globulares.....	16
2.3. Interacciones Hidrofóbicas de las Formas Globulares....	22
3. LA ACETILCOLINESTERASA EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	25
3.1. Localización a Nivel Neuromuscular.....	25
3.2. Localización en el Sistema Nervioso Autónomo.....	28
3.3. Localización en el Sistema Nervioso Central.....	32
3.4. Colínesterasas en el Sistema Nervioso Central en Relación con Estados Patológicos.....	37
3.4.1. Demencias y desórdenes relacionados.....	37
3.4.2. Síndrome de Down.....	42
3.4.3. Párkinson.....	42
3.4.4. Manías, depresiones y esquizofrenias.....	43

4. AISLAMIENTO Y EXPRESION DE LOS GENES CODIFICANTES DE LAS COLINESTERASAS.....	46
5. GENESIS, COMPOSICION Y REABSORCION DEL LCR.....	50
5.1. Anatomía.....	50
5.2. Formación y Composición.....	51
5.3. Reabsorción.....	55
5.4. Barrera Hematoencefálica.....	56
6. OBJETIVOS.....	60
CAPITULO II. LAS COLINESTERASAS EN EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO EN RELACION CON LA EDAD DEL SUJETO. CAMBIOS DE ACTIVIDAD EN PACIENTES CON MENINGITIS BACTERIANA E HIDROCEFALIA.....	63
1. INTRODUCCION.....	64
2. MATERIAL Y METODOS.....	68
2.1. Toma de Muestras.....	68
2.2. Valoración de Actividad AChE y BuChE en el LCR Humano.....	68
2.2.1. Método espectrofotométrico.....	68
2.2.2. Valoración en microplacas.....	70
2.2.3. Valoración de la actividad AChE por inmunoensayo.....	71
2.3. Medida de Proteínas.....	73
2.3.1. Método de biuret.....	73
2.3.2. Método de Lowry.....	74

3.RESULTADOS.....	75
3.1.Actividad AChE y BuChE en el LCR de Individuos Normales, en Relación con la Edad.....	75
3.2.Interacción de la AChE del LCR con Anticuerpos Monoclonales.....	82
3.3.Actividad AChE y BuChE en el LCR de Pacientes con Meningitis e Hidrocefalia.....	86
4.DISCUSION.....	96

**CAPITULO III. FORMAS MOLECULARES DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA EN EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO, PLASMA Y CEREBRO HUMANO.....100**

1.INTRODUCCION.....	101
2.MATERIAL Y METODOS.....	103
2.1.Extracción de AChE y BuChE de Cerebro Humano.....	103
2.2.Medida de Actividad AChE y BuChE de Cerebro Humano..	104
2.3.Centrifugación en Gradientes de Densidad y Cálculo de los Coeficientes de Sedimentación de las Formas Moleculares Separadas.....	105
2.3.1.Preparación de los Gradientes.....	105
2.3.2.Medida de Actividades de los Marcadores Estándares.....	107
2.3.3.Cálculo del Coeficiente de Sedimentación de las Formas Moleculares de las ChE.....	107
3.RESULTADOS.....	110
3.1.Formas Moleculares de AChE y BuChE en el LCR....	110
3.2.Formas Moleculares de AChE y BuChE en el LCR de	

Pacientes con Meningitis e Hidrocefalia.....	115
3.3. Formas Moleculares de BuChE en el Plasma de Sujetos Normales.....	119
3.4. Formas Moleculares de AChE y BuChE en el Cerebro Humano.....	121
3.4.1. Extracción de la AChE y BuChE con tampón salino y antiproteasas.....	121
3.4.2. Extracción de la AChE y BuChE con tampón salino, antiproteasas y Triton X-100.....	123
3.4.3. Perfiles de sedimentación de las Formas Moleculares de AChE extraídas del córtex cerebral con tampón salino.....	129
3.4.4. Especies moleculares de BuChE solubilizadas con tampón salino.....	136
3.4.5. Formas moleculares de AChE solubilizadas con Triton X-100.....	141
3.4.6. Formas moleculares de BuChE extraídas de la membrana con detergente.....	147
4. DISCUSION.....	152
4.1. Formas Moleculares de AChE y BuChE en el LCR.....	152
4.2. Extracción de las ChE de Cerebro Humano.....	155
4.3. Formas Moleculares de AChE en el Cerebro Humano.....	159
4.4. Formas Enzimáticas de BuChE en el Cerebro Humano.....	162
4.5. Efecto del Almacenamiento Sobre los Perfiles de Sedimentación de las Formas Enzimáticas.....	163

CAPITULO IV. INTERACCION DE LAS COLINESTERASAS DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO CON LECTINAS Y COMPARACION CON LA DE LAS ENZIMAS DEL PLASMA Y CEREBRO HUMANO.....	166
1. INTRODUCCION.....	167
1.1. Las Colínesterasas son Glicoproteínas.....	167
1.2. Sitios de Glicosilación de las Colínesterasas.....	168
2. MATERIAL Y METODOS.....	173
2.1. Materiales.....	173
2.2. Muestras Investigadas.....	173
2.3. Tratamiento de las Muestras con Lectinas Solubles...	174
2.4. Incubación de las Muestras con Lectinas Inmovilizadas.....	175
3. RESULTADOS.....	177
3.1. Interacción de las Colínesterasas del LCR, Plasma y Cerebro con Lectinas Solubles.....	177
3.2. Interacción de las Colinesterasas del LCR Plasma y Cerebro con Lectinas Inmovilizadas.....	186
4. DISCUSION.....	189
CONCLUSIONES.....	195
BIBLIOGRAFIA.....	199

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS

## 1. PROPIEDADES GENERALES DE LAS COLINESTERASAS.

### 1.1. Descubrimiento.

A principios de siglo, Abderhalden y Paffrath (1925) demostraron la existencia de una enzima en el intestino delgado del caballo y cerdo que era capaz de hidrolizar una sustancia neurohumoral llamada acetilcolina. Desde entonces, esta enzima ha sido objeto de una investigación muy amplia, hasta el punto que se puede decir que ha sido una de las enzimas mas estudiadas en los últimos 65 años, desde puntos de vista tales como los de su distribución y localización en diferentes tejidos, función fisiológica, mecanismo de acción y naturaleza del centro activo.

Dale (1914) comprobó el drástico, aunque efímero, efecto hipotensor de un extracto de cornezuelo de centeno cuando lo inyectaba en gatos, por vía intravenosa. Poco después, Dale descubrió que la sustancia responsable de dicho efecto era la acetilcolina.

La rápida inactivación del neurotransmisor acetilcolina, observada por Dale, así como el descubrimiento de su acción biológica, constituyen el inicio del conocimiento actual sobre su modo de acción y función fisiológica.

En 1915, Dale pudo comprobar cómo una pequeña dosis de fisostigmina mimetizaba los efectos de la acetilcolina en su acción a nivel cardiovascular. Posteriormente, Fünher (1918) explicó este hecho sugiriendo que la fisostigmina prolongaba



la bradicardia vagal inactivando una enzima responsable de la hidrólisis de una sustancia neurohumoral.

Después del descubrimiento de la enzima, logrado por Abderhalden y Paffrath en 1925 en intestino delgado de caballo y cerdo, Loewi y Navratil (1926) demostraron las propiedades inhibitorias de la fisostigmina sobre la colinesterasa de músculo cardíaco. De esta manera, se aportaron numerosos datos experimentales que demostraban la existencia de una enzima capaz de hidrolizar la acetilcolina.

### 1.2. Definición y Especificidad.

La constatación de la distinta capacidad de las colinesterasas de sangre completa o del suero para hidrolizar diferentes sustratos (Galehr y Plattner, 1927) dió origen a la clasificación de las colinesterasas en dos variedades: colinesterasa verdadera (AChE) y colinesterasa plasmática, también llamada colinesterasa sérica, pseudocolinesterasa o butirilcolinesterasa (BuChE). El grupo de Stedman (1932) encontró que una preparación enzimática de suero de caballo, específica para hidrolizar ésteres de colina, era capaz de hidrolizar a la butirilcolina más rápidamente que a la acetilcolina.

Vahlquist (1935) demostró que los colinésteres no eran los únicos ésteres hidrolizados por el plasma humano, si bien los ésteres no colínicos se hidrolizaban más lentamente que los colínicos. Entre 1938 y 1941 Glick, estudiando la enzima de suero humano y su especificidad hacia el sustrato, comprobó

que la actividad aumentaba a medida que lo hacía la longitud de la cadena acilo en la dirección C2-C4 y disminuía al superar la cadena acilo la longitud de cuatro carbonos.

Fué en 1940 cuando Alles y Hawes, investigando el comportamiento enzimático de la colinésterasa de eritrocito y suero humano, observaron claras diferencias entre una y otra, ya que la colinésterasa de eritrocito presentaba inhibición por exceso de sustrato, cuando éste era acetilcolina, y además era capaz de catalizar la hidrólisis de la acetil- $\beta$ -metilcolina. Por el contrario, la colinésterasa de suero no se inhibía por exceso de acetilcolina, ni catalizaba la hidrólisis del sustrato sintético acetil- $\beta$ -metilcolina.

Mendel y Rudney (1943) analizaron con más detalle las diferencias entre las colinésterasas al estudiar su comportamiento cinético en presencia de inhibidores. En virtud de todos estos hechos, las colinésterasas se desglosaron en dos tipos a los que se les dió nombre propio. Por una parte, colinésterasa real a la presente en eritrocito y por otra, pseudocolinésterasa para la enzima sérica.

La clasificación de las colinésterasas, atendiendo a la especificidad del sustrato, se mantiene hasta nuestros días ya que hablamos de acetilcolinésterasa y butirilcolinésterasa para referirnos a la enzima de eritrocito y de suero, respectivamente. Esta clasificación es bastante limitada, ya que la butirilcolina es sustrato preferente de la colinésterasa sérica en algunas especies como el caballo, perro, hombre, etc, mientras que en la rana, conejo y pollo lo es la propionilcolina.

El criterio de la especificidad del sustrato como base de la clasificación de colinesterasas se hace más inconsistente al estudiar las propiedades de la enzima de suero de elasmobranquios y teleósteos, en donde el sustrato preferente es la acetilcolina y además no sufre inhibición por exceso de sustrato.

La observación de todos estos datos experimentales llevó a Augustinsson (1963) a definir las colinesterasas como "un grupo de esterasas que hidrolizan los ésteres de colina a mayor velocidad que a otros ésteres, cuando las velocidades de hidrólisis se comparan en condiciones óptimas de concentración de sustrato, pH y fuerza iónica, usando preparaciones que no contengan otro tipo de esterasas. Todas las esterasas que presentan esta especificidad se inhiben por eserina  $10^{-5}M$ ".

Si nos basamos en la definición anterior, en el hombre existen dos tipos de enzimas que cumplen los preceptos de dicha definición. Estas dos esterasas son Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BuChE).

Según las recomendaciones de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (1964) deben llamarse colinesterasa (acilcolina-acilhidrolasa E.C:3.1.1.8) a las enzimas del suero y otros tejidos que hidrolizan más rápidamente la butirilcolina o propionilcolina o sus tioanálogos, y acetilcolinesterasa (acetilcolina-acetilhidrolasa E.C: 3.1.1.7) a la enzima capaz de desdoblar a mayor velocidad la acetilcolina y sus tioanálogos.

Las propiedades generales de ambos tipos de colinesterasas quedan resumidas en la Tabla I-1.

TABLA I-1

PROPIEDADES Y NOMENCLATURA DE LAS COLINESTERASAS

	<u>Acetilcolinesterasa</u>	<u>Butirilcolinesterasa</u>
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
Acetil- $\beta$ -metilcolina	Sustrato	No sustrato
pH óptimo	7.5-8.0	8.5
Inhibición por BW-62c47 o BW 284c51	Inhibición fuerte	Inhibición débil
Inhibición por Etopropazina	Inhibición débil	Inhibición fuerte
Tejidos con alta actividad	Hematíes, tejido nervioso, tmo.	Suero sanguíneo, páncreas, hígado.

Debido a la capacidad para hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina, resulta evidente que la función principal de la AChE en el organismo es la terminación de la transmisión del impulso eléctrico, a nivel sináptico, en las neuronas donde se libere y haya receptores para dicho neurotransmisor (Katz, 1966; Nachmansohn y Newman, 1975).

El proceso completo de la transmisión en las sinapsis colinérgicas (liberación de la acetilcolina desde la célula presináptica, difusión a través del espacio sináptico, interacción reversible con el receptor e hidrólisis por la AChE) transcurre en un milisegundo (Katz, 1966).

La AChE presenta una gran actividad para esta función ya que muestra un tiempo de recambio de unos 100 microsegundos (Silman y Karlin, 1967; Hasinoff, 1982) y su velocidad es próxima a la del control de difusión.

Por su parte, la BuChE se encuentra junto a la AChE en las sinapsis donde está presente el neurotransmisor acetilcolina -sinapsis colinérgicas- (Barnard, 1974; Davis y Koelle, 1978), aunque la razón de este hecho aún es desconocida.

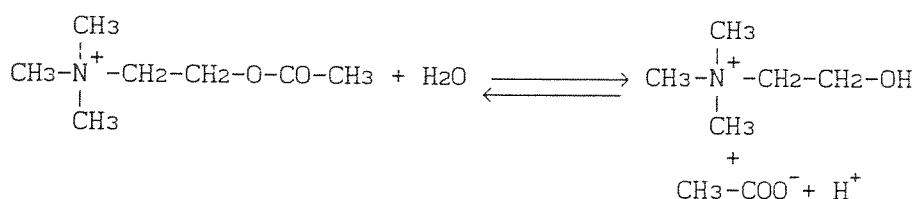
La AChE y BuChE son abundantes en numerosos tejidos en los que todavía no se ha podido clarificar su función. Así, por ejemplo, la BuChE es muy abundante en suero (Augustinsson, 1963), en músculo cardíaco (Karnovsky, 1963; Lyles y col, 1982) y en tejido glial del cerebro (Razon y col, 1984). La AChE por su parte se puede encontrar fuera de las uniones neuromusculares (Hall, 1971), en la superficie de la membrana del eritrocito (Ott, 1985) y en neuronas cerebrales no

colinérgicas carentes de receptores para la acetilcolina (Greenfield, 1984). Incluso se ha sugerido que algunas formas de AChE pueden actuar como proteasas regulando los procesos de crecimiento y desarrollo celular (Small, 1990).

### 1.3. Catálisis.

#### 1.3.1. Mecanismo catalítico de hidrólisis de la acetilcolina.

La AChE es una enzima que cataliza la hidrólisis de acetilcolina y otros ésteres de colina según la ecuación:



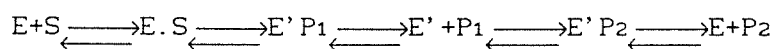
La AChE pertenece al grupo de las serín-hidrolasas, compartiendo, además, con el resto de esterasas y peptidasas, la característica de ser inhibida por fosforilación irreversible de su centro activo (Cohen y Oosterbaan, 1963; Rosenberry, 1975).

Dada la especificidad de la AChE hacia la acetilcolina parece lógico pensar que el sustrato y el centro activo de la enzima sean complementarios. En efecto, la estructura de la acetilcolina consta de un nitrógeno cuaternario (por tanto cargado positivamente) y un grupo éster, mientras que el centro activo tiene un "sitio aniónico" y un "sitio

esterásico" responsables de la fijación de la cabeza de amonio cuaternario y del grupo éster del sustrato, respectivamente. Se ha comprobado que el "sitio esterásico" es el que está implicado directamente en el proceso hidrolítico (Wilson y Bergmann, 1950; Krupka, 1964).

La hidrólisis del sustrato tiene lugar en dos etapas. En primer lugar se produce la unión enzima-sustrato formando un complejo Michaelis-Menten y, posteriormente, se produce la hidrólisis.

El mecanismo de la reacción fué explicado por Froede y Wilson (1970) y tiene lugar de la siguiente manera



Donde

S = Sustrato.

E.S = Complejo de Michaelis.

E'P<sub>1</sub> = Complejo de Michaelis acetilenzima-colina.

P<sub>1</sub> = Colina.

E' = Acetilenzima.

E'P<sub>2</sub> = Complejo de Michaelis ácido acético-enzima.

P<sub>2</sub> = Acido acético.

Cuando las concentraciones de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> son suficientemente bajas, la disociación de los complejos es muy rápida.

La BuChE posee un mecanismo catalítico muy parecido, si no idéntico, al descrito para AChE.

El mecanismo catalítico podría representar un sistema "relé de carga" (Blow y col, 1969) constituido por los enlaces de hidrógeno que comprende el hidroxilo de la serina del

centro activo, el grupo carboxilo del aspartato que se encuentra en la estructura del centro activo y el resto imidazol de la histidina. Además, el grupo imidazol retira protones del hidroxilo de la serina mientras el sustrato acila la enzima. Por tanto, la acilación y desacilación de la enzima por el sustrato representa un ejemplo de catálisis básica por el imidazol (Bender y col, 1964).

### 1.3.2. Inhibición.

#### 1.3.2.1. Inhibidores del sitio anionico.

Wilson y Bergmann (1950) comprobaron que la fisostigmina y la prostigmina inhibían de forma competitiva a la AChE, aún cuando ambos inhibidores tenían estructuras químicas distintas ya que la prostigmina posee un amonio cuaternario y la fisostigmina un amonio terciario. Por tanto, la prostigmina se encuentra cargada a cualquier pH mientras que la fisostigmina es un catión hasta pH 10, a partir del cual pasa a ser una molécula neutra.

Wilson y Bergmann observaron que mientras la inhibición competitiva de la prostigmina no variaba con el pH, la efectividad de la inhibición para la fisostigmina iba disminuyendo al aumentar el pH y por tanto al disminuir su carga positiva y su capacidad para ligarse a la molécula de AChE.

De este modo pudieron demostrar la existencia de un sitio aniónico en la enzima, relacionado con el centro activo.



### 1.3.2.2. Inhibidores del centro del éster.

En el curso del mecanismo hidrolítico de la acetilcolina se produce una forma acetilada de la enzima por la unión covalente del oxígeno de la serina del centro esterásico con el grupo carbonilo de la acetilcolina. La enzima acetilada pierde rápidamente el resto acetilo por hidrólisis.

La inhibición por organofosforados se debe a que el átomo de fósforo electrofílico, que tienen estos inhibidores, forma una unión covalente con el hidroxilo de la serina del centro esterásico de la AChE (Wilson y Bergmann, 1950), pero a diferencia de la enzima acetilada, la hidrólisis de la enzima fosforilada es muy lenta (Aldridge y Reiner, 1972).

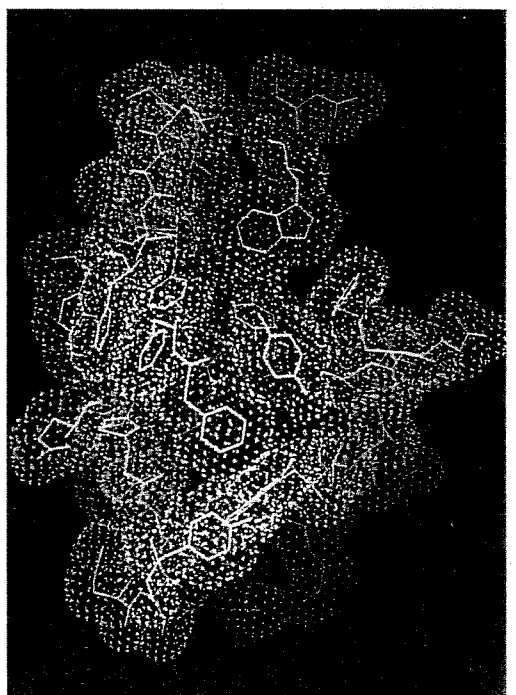
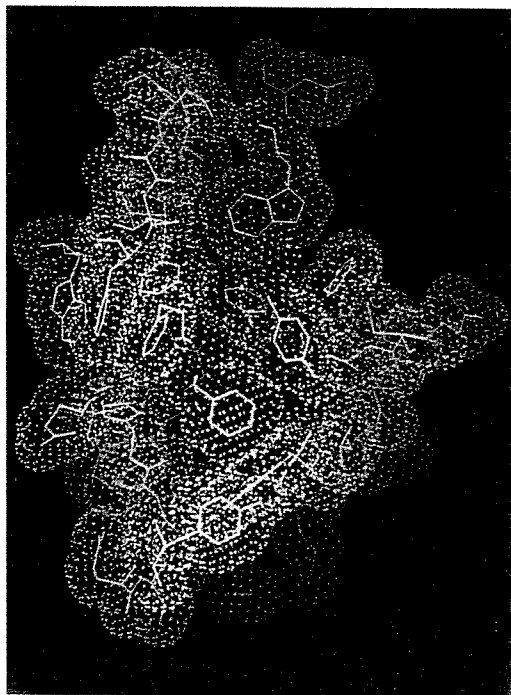
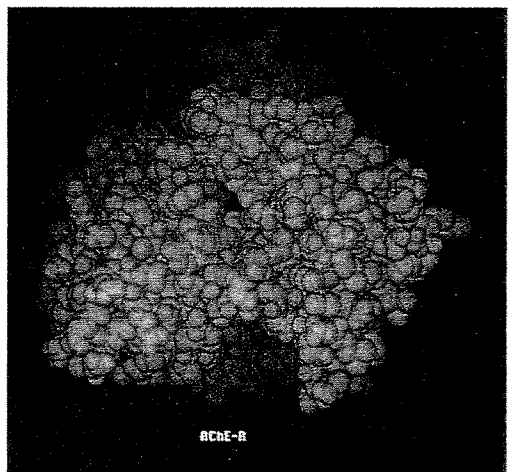
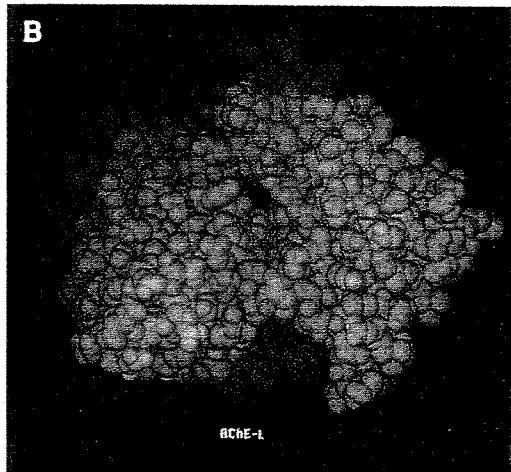
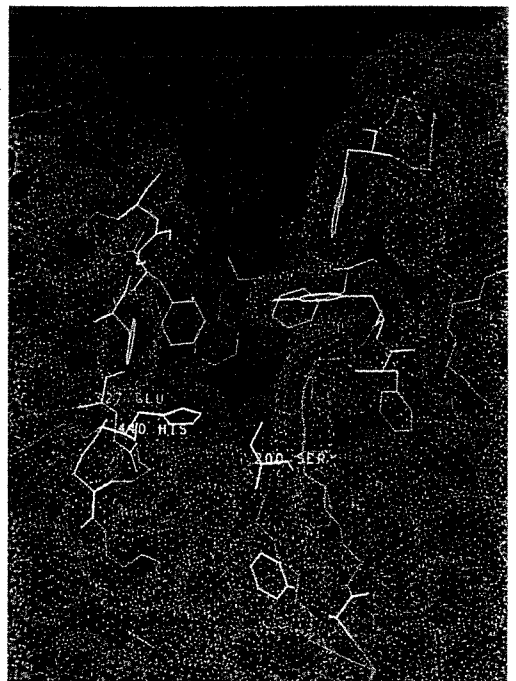
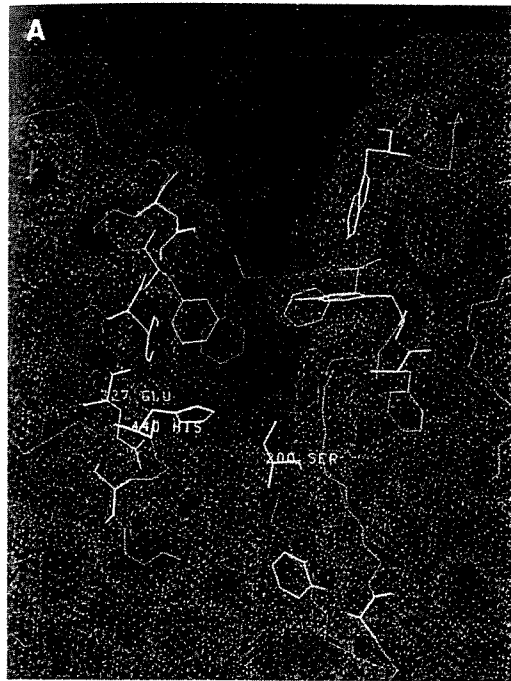
Usando diferentes inhibidores organofosforados se ha podido aumentar el conocimiento del sitio esterásico, y con ello, el desarrollo de gases nerviosos e insecticidas así como sus antídotos.

Otros compuestos tales como sulfonatos y carbamatos son capaces de unirse al centro esterásico de la AChE y por tanto de actuar como potentes inhibidores aunque, tal y como demostró Pavlic (1970), la vida media de la enzima sulfonilada o carbamilada es inferior a la fosforilada y por tanto, es menor la potencia inhibidora de estos agentes, en comparación con la de los organofosforados.

Recientemente, la cristalización de la AChE del órgano eléctrico de *Torpedo* ha permitido establecer la estructura de

las subunidades de la enzima, mediante la aplicación de técnicas de difracción de rayos X (Sussman y col, 1991). La estructura de la AChE es similar a la de otras serín-hidrolasas. Se ha comprobado que la subunidad es del tipo  $\alpha/\beta$ , conteniendo 12 segmentos en hoja  $\beta$  rodeados por 14 hélices  $\alpha$ . El centro activo contiene la triada Glu- Ser- His, en lugar de la propuesta hasta este momento Asp- Ser- His. Se ha descubierto que el centro activo reside en el fondo de una cavidad estrecha y profunda que penetra hasta casi la mitad del volumen de la proteína (Fig I-1). Ha sido sorprendente el comprobar que la cabeza de amonio cuaternario de la colina no interacciona con el centro cargado negativamente, el centro "aniónico", sino que tal sitio aniónico está constituido por catorce restos aromáticos de los aminoácidos que tapizan el hueco donde reside el centro activo (Sussman y col, 1991).

Fig. I-1. Vista estereoscópica de la subunidad de AChE. En A, la nube azul delimita el hueco estrecho y profundo, en el fondo del cual se aloja la triada Glu<sup>327</sup>-Ser<sup>200</sup>-His<sup>440</sup> que constituye el centro catalítico. En B se muestra un modelo de la estructura terciaria de la subunidad. Los aminoácidos aromáticos se han dibujado en verde, los demás en gris. La estructura en rojo, Ser<sup>200</sup>, se ve al fondo del hueco del centro activo y en azul quedan restos de Glu implicados en el mecanismo catalítico. En C se muestra una vista estereoscópica en la que los anillos aromáticos se han dibujado en amarillo y los demás restos en azul. La triada catalítica está dibujada en rosa (según Sussman y col, 1991).



## 2. POLIMORFISMO DE LAS COLINESTERASAS.

### 2.1. Componentes Moleculares Múltiples e Isoenzimas.

Según la IUPAC-IUB (1971) la denominación "forma molecular múltiple" se aplica a proteínas que poseen la misma actividad enzimática y que existen de modo natural en una especie determinada.

El término "isoenzima" se refiere a aquellas formas de las enzimas que derivan de diferencias determinadas genéticamente en su estructura primaria y no se refiere a aquéllas otras derivadas de modificaciones postransduccionales de la misma secuencia primaria.

En relación con las distintas moléculas de AChE, es preferible el término "forma molecular" al de "isoenzima", ya que las moléculas de AChE proceden de diferentes estadios del procesamiento de una estructura original compleja.

Inicialmente, la AChE se localizó en membranas tales como las del eritrocito, tejido muscular y nervioso, siendo difícil su solubilización, mientras que la BuChE se descubrió en suero sanguíneo. Por ello, se consideró que ambas enzimas existían en dos formas distintas, una soluble (BuChE) y otra ligada a membranas (AChE).

En la actualidad está establecido que tanto la AChE como la BuChE son enzimas polimorfas encontrándose ambas en forma soluble y ligada a las membranas de distintos tejidos.

Para Massoulié y Bon (1982) el término "forma molecular múltiple" se refiere a moléculas estables, no intercon-

vertibles espontáneamente, que difieren en su tamaño molecular o en su disposición espacial, punto corroborado por sus distintas propiedades hidrodinámicas. El estado molecular de la enzima, esto es, su estructura cuaternaria, constituye el factor determinante de su localización celular.

Las formas moleculares de las colinésterasas pueden ser separadas y analizadas por cromatografía de filtración en gel, en gradientes de densidad de sacarosa y por electroforesis en geles de poliacrilamida.

La existencia de diversos componentes moleculares en las colinésterasas permite diversificar de modo extraordinario la forma de asociación de la enzima con las membranas de distintos tejidos. De esta manera, hay formas moleculares que se encuentran asociadas a la cara externa de la membrana plasmática de las células, a través de interacciones hidrofóbicas. Otras se ligan a la lámina basal extracelular por asociaciones electrostáticas. Finalmente, existen otras moléculas enzimáticas que se comportan como proteínas solubles que se vierten al medio extracelular.

El estudio del polimorfismo estructural de las colinésterasas es muy importante para establecer la composición de las subunidades que componen los oligómeros de cada forma, así como para analizar el modo de anclaje a la membrana y las fuerzas responsables de la interacción de las subunidades proteicas con componentes de las membranas o con elementos de la lámina basal.

La heterogeneidad estructural de AChE y BuChE es similar, ya que para cada forma molecular de AChE existe su

correspondiente de BuChE, que difiere de aquélla en un valor ligeramente superior del coeficiente de sedimentación (Vigny y col, 1978; Silman y col, 1979; Chatonnet y Lockridge, 1989).

## 2.2. Formas Asimétricas y Globulares.

Las moléculas de AChE se presentan en seis diferentes tipos de asociaciones cuaternarias, como se muestra en la Tabla I-2.

Las formas globulares se representan por G y las asimétricas por A. En todos los casos el subíndice señala el número de subunidades catalíticas que constituyen cada forma molecular.

Las formas G son monómeros, dímeros o tetrameros de la subunidad catalítica, y son por tanto G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y G<sub>4</sub>. Por su parte, las formas asimétricas (A) presentan uno, dos o tres tetrameros (A<sub>4</sub>, A<sub>8</sub>, A<sub>12</sub>) unidos a un tallo, de unos 500 nm, de naturaleza similar a la del colágeno (Bon y col, 1982; Toutant y Massoulié, 1987).

En aquellas formas con más de una subunidad catalítica (formas poliméricas), la unión entre las subunidades para formar dímeros, así como la unión al tallo, es covalente, quedando las subunidades trabadas por enlace disulfuro. Los dímeros formados se asocian por interacciones no covalentes con las subunidades ligadas al tallo, formando así las cabezas tetraméricas de las formas asimétricas (Fig. I-2).

Las propiedades hidrodinámicas de las diferentes formas, en distintos tejidos de cada especie, son prácticamente

Tabla I-2. Características hidrodinámicas de las formas encontradas en el órgano eléctrico de *Electrophorus electricus* (EE) y en el ganglio cervical superior bovino (GCS). Datos tomados de Bon y col. (1976, 1979).

	<u>Coefficientes de</u>		<u>Radio de</u>		<u>Pesos</u>	
	<u>Sedimentación (S)</u>		<u>Stokes (nm)</u>		<u>Moleculares (kD)</u>	
	EE	GCS	EE	GCS	EE	GCS
G1	5.3	4.8	3.6	3.7	70	71
G2	7.7	7.8	5.9	6.1	165	191
G4	11.8	10.5	8.7	8.1	331	341
A4	9.1	8.7	12.4	13.0	410	453
A8	14.2	13.0	14.4	14.4	796	747
A12	18.4	17.1	15.6	15.5	1150	1062



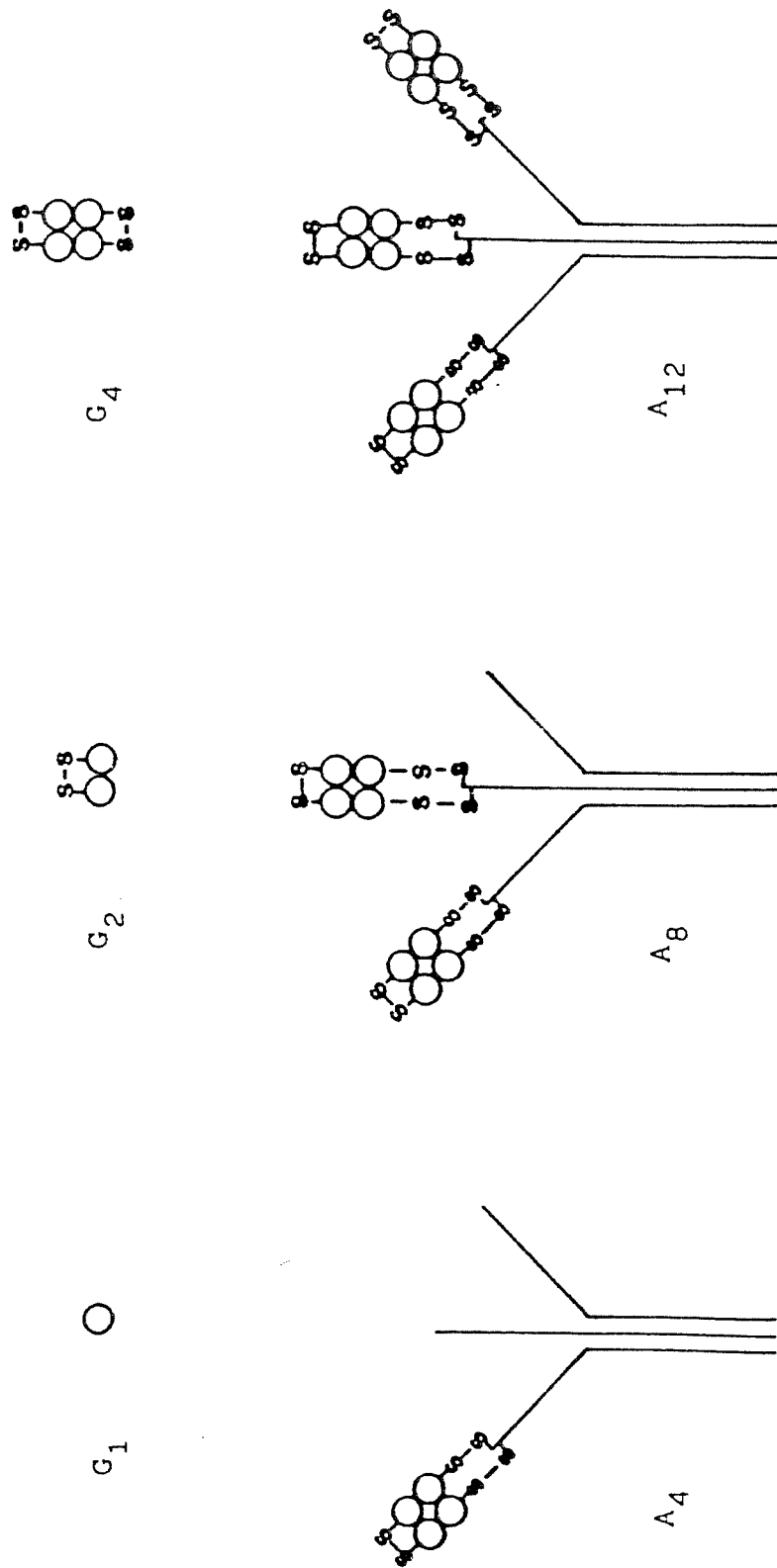


Fig. I-2. Esquema de la estructura cuaternaria de la formas moleculares más importantes de AChE. Las formas globulares se representan por "G" y las asimétricas por "A". Se ha dibujado el modelo de Anglister y Silman (1978) para dibujar la situación de los puentes disulfuro y el modo de unión de la AChE a los "tallos" tipo colágeno.

constantes, hecho que resulta más evidente cuando se comparan los coeficientes de sedimentación de las formas homólogas de AChE en distintas especies de vertebrados (Tabla I-2).

Las formas asimétricas de *Torpedo* contienen subunidades no catalíticas de 100 kD sustituyendo o añadidas a las subunidades catalíticas de 68 kD (Lee y col, 1982; Lee y Taylor, 1982).

La forma G<sub>4</sub> del núcleo caudal bovino posee una subunidad de 20 kD que es de carácter hidrofóbico. Este polipéptido tiene una función de anclaje de la enzima a la membrana plasmática (Inestrosa y col, 1987; Fuentes y col, 1988). Conviene destacar que hay formas moleculares que no encajan en el modelo general de AChE. Así, en fracciones solubles del órgano eléctrico de *Torpedo* existen dímeros anfifílicos que están unidos a proteínas no catalíticas mediante enlaces no covalentes. Por otra parte Muller y col (1985) observaron cómo en extractos de cerebro humano inmaduro y en cerebro de embriones de rata había formas 15 S no asimétricas, ya que no eran sensibles a la colagenasa y no se podían disociar por detergentes o por tratamiento con agentes reductores. Se cree que pueden ser formas análogas a los agregados estables que se forman al eliminar el Triton X-100 de los extractos enzimáticos de cerebro humano solubilizado con este detergente (Landauer y col, 1984). También conviene apuntar que el modelo general de estructuras cuaternarias de AChE expuesto no tiene en cuenta las diferencias que puedan existir entre subunidades catalíticas. Dichas diferencias son consecuencia de modificaciones postransduccionales como la glicosilación,

adición de un segmento hidrofóbico o de un glicolípido. Otra diferencia importante es el número de aminoácidos de las subunidades A y G de *Torpedo*, lo que induce a pensar que sus estructuras primarias derivan de distintos ARNm ya que se han llegado a identificar diferentes ARNm implicados en la síntesis de los precursores de las subunidades (Sikorav y col, 1984).

Aunque, según lo expuesto, el modelo general de estructuras cuaternarias de AChE presenta múltiples excepciones, se puede considerar como un modelo aceptable, dada la sencillez con que permite describir la estructura de las colinesterasas, ajustándose a situaciones reales, así como un medio útil para identificar formas moleculares similares encontradas bajo diferentes situaciones.

El polimorfismo de las colinesterasas parece tener un fin estructural, cual es el de anclar de forma muy eficiente la enzima en su sitio funcional. No parece que la organización estructural represente una ventaja cinética, ya que el número y organización de las subunidades catalíticas no inducen cambios importantes en la actividad catalítica de los centros activos. También se ha comprobado que las subunidades oligoméricas no muestran fenómenos de cooperatividad (Vigny y col, 1978; Viratelle y Bernhard, 1980).

La distribución de formas moleculares de AChE difieren mucho de un tejido a otro, para un mismo animal, y ello refleja requerimientos funcionales para cada tejido.

En músculo de contracción rápida de pollo, la AChE se encuentra principalmente como forma A<sub>12</sub>, mientras que en el de

contracción lenta el componente más abundante es G<sub>2</sub> (Silman y col, 1978). De forma similar, en músculo de mamífero, parece existir una correlación entre las formas moleculares de AChE y el tipo de músculo (Barnard y col, 1984). En todo caso, el músculo esquelético de todos los vertebrados es rico en formas asimétricas (Bon y col, 1979; Younkin y col, 1982; Rotundo, 1987). No existe, sin embargo, esta correlación de formas entre el órgano eléctrico de *Electrophorus* y *Torpedo*, ya que el primero contiene casi exclusivamente formas A y el segundo mezcla de formas A y G (Massoulié y Bon, 1982).

Las formas asimétricas de músculo esquelético se localizan sobre todo en la placa motora. Ello supone una pequeña fracción de la AChE total del músculo, ya que la mayoría de la enzima del tejido se encuentra como formas globulares (Bacou y col, 1982; Lai y col, 1986).

En eritrocitos y en suero de mamíferos las únicas formas existentes son las globulares. En el caso del eritrocito bovino y humano la forma más abundante es G<sub>2</sub> (Ott, 1985). La BuChE de suero humano, rata y caballo es G<sub>4</sub>, mientras que la de ratón es G<sub>1</sub> (Skau, 1985).

Las formas asimétricas no sólo se encuentran en el músculo esquelético, sino también en otros tejidos. Skau y Brimijoin (1980) detectaron dichas formas en músculo cardíaco y en el nervio vago de rata; Gisiger y col (1978) en ganglio periférico cervical superior de mamífero y Di Giamberardino y Couraud (1978) y Fernández y col (1979a y b) detectaron su presencia en los nervios motores de mamíferos y aves.

Los niveles de las formas moleculares asimétricas en

nervios no superan el 1% de la actividad total de la enzima, y lo mismo ocurre en el cerebro de mamíferos y aves. Esta proporción aumenta ligeramente en el encéfalo de peces, reptiles y anfibios.

Las formas asimétricas de músculo de mamífero y de órgano eléctrico de peces se solubilizan casi en su totalidad en medios de alta fuerza iónica, ya que su interacción con la superficie celular es a través de interacciones electrostáticas (Dudai y Silman, 1974; Silman y Futerman, 1987). Se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en el establecimiento de las conexiones entre los elementos del tallo de las formas asimétricas y las estructuras de las membranas, ya que el EDTA facilita notablemente la extracción de dichas formas enzimáticas (Ramírez y col, 1984; Brandan e Inestrosa, 1987).

### 2.3. Interacciones Hidrofóbicas de las Formas Globulares.

Una de las características más significativas de las formas globulares es su capacidad parcial de solubilizarse en medios de baja fuerza iónica con detergentes. Aún en ausencia de tensioactivos se puede extraer una parte significativa del total de la actividad.

Las formas moleculares globulares suelen dividirse en dos grupos según su comportamiento al interactuar con detergentes no desnaturizantes (como Triton X-100) y con liposomas. Las moléculas anfipáticas o anfifílicas interactúan con Triton X-100 y se asocian a liposomas (Römer-Lüthi y col, 1980), mientras que las formas

hidrofílicas no se asocian ni a detergentes ni a liposomas. Las propiedades hidrodinámicas y electroforéticas de las formas hidrofóbicas se modifican si los experimentos se realizan sin y con detergente e incluso el coeficiente de sedimentación y la movilidad electroforética dependen de la naturaleza del detergente que se emplee en los experimentos (Futerman y col, 1985a; Toutant, 1986).

Se ha llevado a cabo la purificación de las formas hidrofóbicas de AChE de cerebro de distintas especies de vertebrados superiores tales como bóvido (Ruess y col, 1976), rata (Rakonczay y col, 1981; Vidal y col, 1981b), hombre (Sorensen y col, 1982) y pollo (Rotundo, 1984a). En todos los casos la enzima purificada es una forma G4.

El modelo de interacción de la AChE cerebral con la membrana supone el anclaje de las formas hidrofóbicas G4 por un fragmento peptídico hidrofóbico de 20 kD. Dicho fragmento se une a dos de las subunidades catalíticas por puentes disulfuro (Inestrosa y col, 1987), siendo un subfragmento de 13 kD el que está directamente implicado en la asociación de la enzima con la membrana (Fuentes y col, 1988). Al fragmento polipeptídico de 20 kD se le atribuye un papel similar al que desempeña el tallo en las formas asimétricas (Heider y Brodbeck, 1992).

Por otra parte, la AChE de eritrocito de mamífero- formas G2- queda anclada a la membrana vía fosfatidilinositol. Dicho fosfolípido se une al extremo carboxilo terminal de la subunidad catalítica de la AChE. Al final del polipéptido hay His-Gly-etanolamina-oligoglucano-glucosamina-inositolfosfato-

1,2-diacilglicerol (Roberts y Rosenberry, 1985; Low y col, 1986; Bron y Fasel, 1991). La forma G2 de *Torpedo* contiene un mol de inositol por monómero (Futerman y col, 1985b; Low y col, 1989). Estos resultados están de acuerdo con la acción solubilizante que ejerce la fosfolipasa C, específica para los fosfolípidos del inositol, sobre la AChE de diferentes tejidos (Majumdar y Balasubramanian, 1982; Taguchi y col, 1984; Bütikofer y col, 1990; Espinoza y col, 1991).

Las formas hidrofóbicas se convierten en hidrofílicas por tratamientos con proteasas. De esta manera, la enzima de eritrocito humano y de otras fuentes pierde su carácter hidrofóbico por proteólisis y separación de un fragmento de peso molecular 3.000 (Weitz y col, 1984; Dutta-Choudhury y Rosenberry, 1984; Ott y Brodbeck, 1984; Campoy y col, 1989).

### 3. LA ACETILCOLINESTERASA EN EL SISTEMA NERVIOSO.

#### 3.1. Localización a Nivel Neuromuscular.

Ya en los inicios del estudio de la AChE se observó una actividad seis veces mayor de la enzima en la región inervada del músculo sartorio de sapo que en la zona del mismo músculo no inervada (Marnay y Nachmansohn, 1938). También se pudo observar que el área superficial entre el nervio y el músculo era mucho mayor que la esperada, debido a que la hendidura sináptica poseía muchas invaginaciones, lo que propocionaba una gran concentración de AChE en la sinapsis neuromuscular.

Karnovsky y Hug (1963) comprobaron la presencia de AChE en la superficie sarcoplásmica de las fibras del músculo de rata, demostrando que la enzima se localizaba en la membrana postsináptica, llegando incluso a sugerir que se sintetizaba localmente. Por métodos histoquímicos Bloom y Barrnett (1966) observaron cómo la enzima se asociaba con la mayoría de membranas inervadas. La idea de que la AChE se localizaba sólo en la placa terminal de la unión neuromuscular fué rebatida por Salpeter (1967) al demostrar que la enzima se distribuía a lo largo de toda la fibra muscular.

En 1971, Hall y Kelly demostraron la desaparición de la actividad AChE, cuando las uniones neuromusculares eran tratadas con colagenasa. Estos investigadores propusieron que la enzima no formaba parte de la fibra muscular, sino que se originaba en el nervio y de ahí se trasladaba hacia la



sinapsis nervio-músculo. El tratamiento con colagenasa supondría la liberación de las moléculas asimétricas, ligadas a las membranas a través de un tallo de naturaleza parecida a la del colágeno.

La pregunta clave y de gran trascendencia fisiológica es ¿Cuál es el verdadero origen de la AChE de la unión neuromuscular?, ¿Procede del nervio o del músculo?. En un excelente trabajo llevado a cabo por De la Porte y col (1986) en cultivos de motoneuronas y miotubos de pollo y de rata quedó demostrado que son los miotubos los responsables de la biogénesis de las formas asimétricas de AChE que se localizan en el lado postsináptico de la unión neuromuscular. Sin embargo, la motoneurona tal vez contribuya al ensamblado de los diferentes componentes de la matriz extracelular. También es posible que algunos componentes sintetizados en el nervio se asocien con las moléculas de AChE, localizada en el lado postsináptico, y ello induzca un proceso de concentración en regiones sinápticas especializadas.

Vallette y col (1990) cultivando miotubos de rata y neuronas de la médula espinal observaron la formación de agrupamientos de AChE en las zonas de contacto neuromusculares. De esta manera, se piensa que las neuronas, factores tróficos liberados por ellas, o ambos agentes están implicados en la localización de la AChE en la superficie de los miotubos (Sanes y col, 1984). Se ha encontrado una situación parecida para los receptores de acetilcolina (Kalcheim y col, 1982), pero mientras que las agrupaciones de estos receptores no se corresponden inequívocamente con los

contactos nervio-músculo, las de AChE aparecen en estas regiones exclusivamente. Por lo tanto, las zonas ricas en AChE se consideran como los verdaderos marcadores de esos contactos.

En relación con la síntesis, transporte y metabolismo de la AChE en el músculo esquelético, se sabe que un tercio de la enzima, en células de embrión de pollo, se localiza en la membrana plasmática, siendo el resto interna, esto es, asociada a orgánulos intracelulares (Rotundo, 1987; Fambrough, 1980). En diafragma de rata, el 74% de la enzima reside fuera de las placas terminales y el resto es propia de las uniones neuromusculares. En las regiones alejadas de las placas terminales predominan las formas globulares, pero en las placas terminales las formas encontradas son casi exclusivamente asimétricas (Younkin y col, 1982). Aproximadamente, el 73% de las formas G<sub>1</sub>, 34% de las G<sub>4</sub> y 38% de las asimétricas son intracelulares en las regiones del músculo pobres en uniones neuromusculares (Younkin y col, 1982). Ello supone que en todo momento existe enzima intracelular-asociada a las membranas del retículo endoplásmico, Golgi y retículo sarcoplásmico-y extracelular- asociada al sarcolema y a la lámina basal del músculo. La AChE se localiza en fracciones microsomales ricas en retículo sarcoplásmico y túbulos T (Vidal y col, 1987b; Cánovas-Muñoz y col, 1990a, 1991) antes de ser degradada por un mecanismo no lisosomal (Rotundo y col, 1989). La función fisiológica de la enzima intracelular se desconoce.

### 3.2. Localización en el Sistema Nervioso Autónomo.

Debido a que el nivel de AChE en estos tejidos es muy bajo respecto a otras esterasas (Koelle, 1969) no ha sido posible establecer su exacta localización. Se piensa que la enzima se localiza, preferentemente, en las terminales presinápticas, teniendo en cuenta que por denervación pregangliónica los niveles de AChE en el ganglio superior de gato descienden de modo brusco (Koelle y Koelle, 1959).

Fué también Koelle (1963) quien propuso que la AChE que se libera por las terminaciones pregangliónicas podía actuar como un mecanismo de retroalimentación positiva amplificando la liberación de AChE. El mismo investigador sugirió posteriormente que la AChE podría facilitar la liberación de otros neurotransmisores en terminales axónicas no colinérgicas (Koelle, 1969). Por aplicación de procedimientos citoquímicos se ha podido visualizar la AChE en el ganglio cervical superior de gato. Se ha demostrado que la AChE se ubica en las membranas presinápticas y en las postsinápticas (Koelle, 1975). La desaparición de AChE por denervación preganglionar afecta a los niveles de la enzima pre y postganglionar, pudiendo explicarse esto último por la pérdida de factores tróficos que contribuyen positivamente al mantenimiento de la AChE a nivel postsináptico.

Mediante el empleo de inhibidores reversibles e irreversibles de la AChE que presentan diferente solubilidad en lípidos, y por tanto distintas capacidades de atravesar membranas, se puede estudiar la inhibición enzimática de la

AChE localizada en estructuras fisiológicas. Goudou y col (1985), utilizando este método, establecieron que la enzima de las neuronas de ganglio cervical superior de rata se encuentra distribuida por igual entre la parte interna y externa de la membrana.

La AChE se ha encontrado en la médula adrenal formando parte de las células del tejido cromafín. En este tejido, la enzima presenta una actividad distinta según el procedimiento empleado para su extracción. Cuando se utilizan condiciones isotónicas, la AChE se encuentra casi en su totalidad en forma latente, siendo necesario el empleo de detergente para la expresión de su actividad (Burgun y col, 1985). Al disminuir la osmolaridad del medio de medida, se produce un incremento de actividad AChE de hasta un 75% si se compara con la actividad que presenta en el medio con detergente. Estos datos inducen a pensar en que la enzima se encuentra en los gránulos del tejido cromafín en dos formas diferentes. Por una parte estaría soluble, destinada a la secreción, y por otra asociada a las membranas intracelulares para incorporarse a la membrana plasmática durante el proceso de exocitosis (Gratz y col, 1981). Por otro lado Mizobe e Iwamoto (1983), utilizando cultivos de células cromafines, encontraron que el 65% de la AChE se asociaba a las membranas plasmáticas, y el 35% restante era intracelular, ligada a retículo endoplásmico y a gránulos cromafines, donde la enzima se encuentra con otros productos celulares. Las formas que se encuentran en el tejido cromafín son 6.1 S, moléculas asociadas a las membranas, y 10.5 S que es la forma segregada (Livett y col, 1983).

El tejido cromafín representa la última etapa de diferenciación de una neurona simpático-periférica especializada en la síntesis, almacenamiento y secreción de catecolaminas (Kirshner y Viveros, 1972; Phillips y Apps, 1979). Un tumor de las células cromafines que produce hipersecreción de catecolaminas es el feocromocitoma, el cual, a diferencia del tejido cromafín, contiene AChE en el retículo endoplásmico, pero no en la membrana plasmática (Lucas y col, 1980).

Se ha demostrado que la estimulación nicotínica produce la liberación de AChE por un mecanismo dependiente de calcio en las células cromafines (Mizobe y Livett, 1983). Estos autores sugirieron que la hidrólisis de la acetilcolina podría producirse no sólo por la AChE ligada a la membrana plasmática sino también por la enzima soluble liberada por estimulación nicotínica.

Es probable que este mecanismo pueda impedir o retardar la fatiga o depleción de las células cromafines durante prolongados periodos de estrés. Livett y col (1983) sugieren que este fenómeno representa un claro mecanismo homeostático por el cual la acetilcolina podría ser hidrolizada no sólo por la AChE de las membranas plasmáticas sino por una forma soluble de la enzima secretada al espacio sináptico en respuesta al agonista acetilcolina.

El mecanismo de secreción de la AChE se ha estudiado con detalle en paraneuronas adrenales, las células cromafines. En los medios de perfusión de glándula adrenal se libera AChE (Chubb y Smith, 1975), así como en los medios de cultivo de

las células cromafines (Livett y col, 1983). La secreción se estimula por agonistas nicotínicos, o por altas concentraciones de  $K^+$  y la liberación es dependiente de la concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular (Mizobe y Livett, 1983). Las células cromafines de la médula adrenal segregan catecolaminas (noradrenalina y adrenalina), nucleótidos, AChE, dopamina- $\beta$ -hidroxilasa y cromogranina A, todo ello en respuesta a la estimulación colinérgica. Del análisis de la secreción inducida al estimular las células cromafines con veratridina y un ionóforo de  $Ca^{2+}$ , Mizobe y col (1984) concluyeron que la AChE y las catecolaminas se liberaban desde distintos compartimentos celulares. La veratridina inducía la secreción del doble de la AChE que se liberaba por el ionóforo, para una secreción fija de catecolaminas.

En las células cromafines, la AChE está asociada a la membrana plasmática, Golgi y retículo endoplásmico (Somogyi y col, 1975). Un 35% de la enzima total es intracelular (Mizobe e Iwamoto, 1983). En experimentos de fraccionamiento subcelular se encontró que la AChE no sólo se localizaba en la membrana plasmática, sino también en la fracción de los gránulos cromafines, donde la enzima estaba, en parte soluble y el resto particulada (Burgun y col, 1985).

En las células cromafines hay tres formas anfifílicas de AChE ( $G_1^a$ ,  $G_2^a$  y  $G_4^a$ ) y una forma no anfifílica ( $G_4^{na}$ ) (Bon y col, 1990). Todas las formas son equivalentes, en cuanto a propiedades hidrodinámicas e interacción con lectinas, cuando se comparan las isoformas extraídas de diferentes fracciones subcelulares. Todas están glicosiladas con restos

oligosacáridos ligados a Asn y Ser-Thr (Bon y col, 1990). Las formas G<sup>2</sup> se transforman en hidrofílicas por tratamiento con fosfolipasa C específica para los fosfolípidos del inositol, pero ello no ocurre con las otras formas. La forma G<sup>4na</sup> se concentra en la fracción rica en gránulos cromafines y ésta podría ser la enzima que se libera en respuesta a la estimulación de las células cromafines (Bon y col, 1990).

### 3.3. Localización en el Sistema Nervioso Central.

La posibilidad de que en el funcionamiento del sistema nervioso central estuviesen implicados mecanismos colinérgicos fué planteada por Sjostrand (1938) al comprobar como la perfusión del córtex de cerebro de rata con acetilcolina provocaba un cambio notable en los encéfalogramas.

Más tarde, se estudió la distribución y niveles de colinesterasa en el SNC de perro (Burgen y Chipman, 1952), observando regiones de alta actividad frente a regiones de baja actividad. La relación núcleo caudal/sustancia blanca subcortical era de 400/1 para AChE, mientras que la colínacetilasa- enzima responsable de la síntesis de acetilcolina a partir de acetyl-CoA y colina- presentaba una relación de 540/1, situaciones que se correlacionaban bien. Pero no todas las partes del sistema nervioso central presentan esa clara correlación entre los niveles AChE/colínacetilasa. El cerebelo presenta niveles de AChE relativamente altos, pero manifiesta baja actividad colín-

acetilasa y bajo contenido de acetilcolina (Silver, 1967).

Los estudios sobre las vías colinérgicas en cerebro han revelado que existe una inervación colinérgica intensa en el cerebro anterior (Lewis y Shute, 1966; Lewis y col, 1967; Shute y Lewis, 1963; 1966). Los resultados de estos estudios mostraron que numerosas fibras colinérgicas constituyen una red ascendente desde las células del cerebro medio, que son idénticas a las del sistema reticular activador, hasta las células colinoceptivas en el striatum y córtex cerebral, de tal forma que en esta última región se localizan más de la mitad de las terminales colinérgicas de cerebro anterior (Silver, 1967).

Por aplicación de procedimientos histoquímicos se ha comprobado que la AChE se asocia a membranas excitables conductoras y postsinápticas (Nachmansohn, 1971). También se ha demostrado que la enzima se localiza en la membrana axonal de las fibras desmielinizadas (Schlaepfer y Torack, 1966). Brzin (1966) comprobó la presencia de AChE en axones de fibras mielinizadas del nervio ciático, tras incubarlas con Triton X-100. Se ha puesto de manifiesto que la enzima se distribuye en los axones en forma discontinua, no uniforme, resultado que coincide con el que se había comprobado en el axón gigante de calamar (Brzin y col, 1965).

Se ha demostrado la presencia de AChE en cultivos de células neurales de mamíferos y aves (Kim, 1970; Tischner y Thomas, 1973), y en cultivos de células del sistema nervioso central de humanos (Hösly 1974).

El estudio de la distribución de AChE en cinco regiones



cerebrales de cerdo (córtex cerebral, córtex cerebelar, núcleo caudado, tálamo y colículo superior) lo llevó a cabo Knutsen y col (1975). Encontraron que la actividad específica de la enzima disminuía en el sentido núcleo caudado, colículo superior, tálamo, córtex cerebelar y córtex cerebral. En análisis realizados en trece regiones cerebrales de gato se encontró que el tubérculo olfatorio y el núcleo caudal son las áreas más ricas en AChE, mientras que el cerebelo, córtex cerebral frontal y posterior muestran un 3-4% de la enzima medida en las regiones de alto contenido en enzima (Kerkut, 1984). En cerebro humano, el núcleo caudado y el de Meynert figuran entre las áreas ricas en AChE y el córtex temporal, el parietal y fórnix se cuentan entre las regiones de baja actividad (Atack y col, 1986). Los niveles de BuChE en el cerebro humano son mucho más bajos que los de actividad AChE, entre un 40 y 2%, dependiendo de la zona que se considere (Atack y col, 1986). El estudio de la distribución de AChE en tres áreas de la médula espinal (cervical, torácica y lumbar) reveló que la enzima se distribuye por igual en las tres regiones consideradas (Nistri y col, 1975).

La forma molecular predominante en cerebro de mamífero es G4 (80-90%) mientras que el resto es G1. Sin embargo, el cerebelo de rata contiene cantidades parecida de las formas G1 y G4 (Clark y Lenz, 1983). En cerebro humano, aunque siempre predomina la especie G4, las proporciones relativas de G1 y G4 varían según el área cerebral que se investigue (Atack y col, 1986).

A nivel celular, la AChE se encuentra asociada a la

membrana pre y postsináptica, pero está ausente en las vesículas sinápticas y mitocondrias (Lewis y Shute, 1966). En neuronas de la médula espinal de rata, la enzima se localiza, preferentemente, en las cisternas del retículo endoplásmico. En las células colinérgicas de cerebro de rata, se aprecia teñido histoquímico intenso en el retículo endoplásmico (Lewis, 1965). La membrana plasmática no muestra teñido citoquímico uniforme, encontrándose la enzima concentrada en la membrana axonal (Navaratnam y Lewis, 1970).

Se considera que en el sistema nervioso central, la AChE se sintetiza en ribosomas asociados al retículo endoplásmico, encontrándose así en el lumen del orgánulo y de ahí se transporta al axón, donde se fija a la membrana axonal (Whittaker, 1969). Aproximadamente un 15% de la AChE de los axones se encuentra libre, esto es, no asociada a las membranas. De esta enzima libre, dos tercios se transporta hacia la terminal por el flujo axonal anterógrado, y el resto hacia el soma celular, por el retrógrado (Lubinska y Nimierko, 1971). La mayor parte de la enzima que se transporta es G4 (Di Giamberardino y Couraud, 1978; Brimijoin, 1979).

En la última década, el estudio de la localización de AChE y colínacetilasa en las distintas regiones cerebrales se lleva a cabo por técnicas bioquímicas e inmunológicas utilizando anticuerpos monoclonales o marcadores fluorescentes. Estos procedimientos de análisis han permitido elaborar mapas topoquímicos muy precisos de rutas colinérgicas de cerebro de rata (Armstrong y col, 1983; Bigl y col, 1982; Houser y col, 1983; Levey y col, 1983), ratón (Gordon y Finch, 1984), mono

(Mesulam y col, 1983) y cerebro humano (Nagai y col, 1983).

La AChE se puede encontrar distribuida en tejidos no colinérgicos. En neuronas de la sustancia nigra, abunda junto a dopamina, (Butcher y Wolf, 1982) y en el locus coeruleus, junto a noradrenalina (Albanese y Butcher, 1979). La AChE no sólo se ha encontrado en tejidos junto a noradrenalina, sino asociada a diversos neurotransmisores como la sustancia P en médula espinal (Chubb y col, 1980), somatostatina y GABA (Bolam y col, 1984) y en neuronas de la retina (Salipan y col, 1983).

Esta asociación a diversos neurotransmisores ha inducido a pensar que la AChE puede actuar en el sistema nervioso con otras funciones, además de la ya conocida hidrolítica sobre la acetilcolina.

Se ha comprobado que esta enzima es capaz de tener actividad aminopeptidasa e hidrolizar diferentes péptidos, sustancia P y metionín- y leucín-encefalinas. Por tanto, la enzima podría provocar la activación de los opiáceos a partir de sus precursores péptidicos, o bien, su inactivación por hidrólisis. Quizás, una vez que se consigan clarificar estas otras funciones fisiológicas de la enzima, se pueda dar una explicación a la presencia de AChE en tejidos no neurales como las membranas de eritrocitos y plaquetas.

### 3.4. Colinesterasas en el Sistema Nervioso Central en Relación con Estados Patológicos.

#### 3.4.1. Demencias y desórdenes relacionados.

La demencia senil tiene un tremendo impacto en la calidad de vida de los ancianos. Los fenómenos clínicos asociados con la enfermedad se conocían desde hace tiempo, pero sólo recientemente ha sido reconocida la enfermedad como tal y no como un efecto inespecífico que acompaña al envejecimiento. Más allá de los 80 años, la prevalencia de todas las formas de demencia, pero principalmente las causadas por la enfermedad de Alzheimer, es aproximadamente del 20%. Otros datos indican que la enfermedad puede afectar al 5% de las personas mayores de 65 años.

Los individuos con trisomía 21 también muestran los síntomas de la demencia tipo Alzheimer. Desarrollan una patología cerebral idéntica a la enfermedad de Alzheimer, pero a la edad de 40 años. Esta observación es de gran interés puesto que son los mismos polipéptidos los que se depositan en los cerebros de los pacientes con trisomía 21 y los que se presentan en la enfermedad de Alzheimer (Kang y col, 1987; Goldgaber y col, 1987).

La enfermedad de Alzheimer se asocia con la pérdida progresiva de la memoria y de la función cognoscitiva a lo largo de un periodo de meses o años. Este desorden representa el porcentaje mayor de la actuales demencias incurables.

Desgraciadamente, no se ha encontrado aún un método suficientemente sensible para la detección de la demencia tipo Alzheimer en estado prematuro. Tampoco existen pruebas que diferencien a esta enfermedad de otros tipos de demencias. Un diagnóstico definitivo requiere confirmación histopatológica en autopsias o biopsias del tejido cerebral. Incluso una biopsia cerebral no permite distinguir entre pacientes con enfermedad de Alzheimer o con demencia multiinfarto.

Histológicamente, el cerebro de los pacientes con Alzheimer se caracteriza por la aparición de los "nudos neurofibrilares" (compuestos por hileras de filamentos helicoidales fuertemente unidas) y placas seniles (placas neuríticas formadas por terminales anormales de los axones asociadas a un núcleo de amiloide extracelular). La frecuencia de las placas neuríticas en el córtex cerebral se correlaciona linealmente con la severidad de la demencia. Sin embargo, las personas ancianas que no padecen la enfermedad también pueden tener un número limitado de placas, particularmente, en neuronas del hipocampo.

Se desconoce qué relación existe entre la inervación colinérgica cortical y la patogénesis de las placas. Lo que sí se ha comprobado es que en monos de 4 a 31 años, tanto las placas neuríticas en fase de crecimiento, como las placas maduras son muy ricas en AChE. Conforme las placas maduran, la cantidad de sustancia amiloide aumenta, mientras que el número de neuritas y la actividad AChE disminuyen. Las placas en el estadio final están desprovistas de AChE (Struble y col, 1982).

Debe tenerse en cuenta que casi todas las anomalías morfológicas y bioquímicas observadas en la enfermedad de Alzheimer también se pueden apreciar, aunque en menor medida, en cerebro de personas ancianas que no manifiestan tipo alguno de demencia.

Aunque por la enfermedad quedan afectados los niveles de distintos neurotransmisores y neuropéptidos, el neurotransmisor que parece estar más directamente implicado en la demencia tipo Alzheimer es la acetilcolina (hipótesis colinérgica de la demencia). Parece que la degeneración de las proyecciones colinérgicas que ascienden al córtex cerebral e hipocampo está directamente implicada en la etiología de la enfermedad. En el córtex cerebral humano, muchas de las terminales nerviosas colinérgicas son proyecciones de grandes neuronas colinérgicas situadas en el cerebro anterior (Coyle y col, 1983). El componente más importante de este sistema es el núcleo basal de Meynert, cuyo número de neuronas colinérgicas está sensiblemente disminuido en la enfermedad de Alzheimer (Arendt y col, 1985). Lesiones de los cuerpos celulares de las neuronas de esta región conduce a un déficit colinérgico importante en el córtex e hipocampo de los enfermos que fallecen por Alzheimer. Estos cambios se reflejan en una caída del 30-70% en el nivel normal de colínacetilasa (enzima de la síntesis de acetilcolina) y del 10-60% en el contenido de AChE. Este hecho se ha demostrado en 10 regiones cerebrales de autopsias de pacientes que fallecieron con Alzheimer (Perry y col, 1977). Además, existe una correlación entre la pérdida de la actividad colínacetilasa del córtex frontal y temporal,

la aparición de placas seniles y el deterioro de la función cognoscitiva medida por test mental en pacientes, 6 meses antes de su fallecimiento (Perry y col, 1978). Estos mismos investigadores encontraron que, aunque la actividad AChE cerebral había disminuido en los cerebros, en análisis practicados postmortem, la BuChE había aumentado significativamente (40-80%) en los pacientes con Alzheimer.

En 1983, Atack descubrió la pérdida selectiva de formas G<sub>4</sub> de AChE en el córtex parietal (área de Brodman, 40), junto a la caída de actividad en el material de autopsia. Los resultados anteriores se han confirmado y extendido a otras áreas cerebrales (Fishman y col, 1986). Estos investigadores hallaron una disminución de la relación G<sub>4</sub>/G<sub>1</sub> en las áreas de Brodman números 9, 10, 11, 21, 22 y 40, y en la amígdala, no apreciando cambios en las áreas 17 y 20, hipocampo o cerebelo. Consecuentemente, propusieron la pérdida de las formas G<sub>4</sub> como el origen de la degeneración de elementos presinápticos, manteniéndose la forma G<sub>1</sub> que se supone asociada con estructuras postsinápticas que no quedan afectadas por la enfermedad.

Por procedimientos de inmunoensayo, diversos grupos de investigación han intentado determinar si en las demencias tipo Alzheimer o Huntington se producía un acúmulo de enzima catalíticamente inactiva (Hammond y Brimijoin, 1988). En este sentido, se ha comprobado que el cerebro de pacientes con Huntington tenía un contenido normal de AChE, pero en el de pacientes con Alzheimer había una disminución significativa, tanto de actividad enzimática como de inmunorreactividad, en

siete regiones corticales y en dos de las ocho subcorticales analizadas.

El diagnóstico antemorten de la enfermedad de Alzheimer se vería enormemente facilitado por el hallazgo de un marcador biológico de la enfermedad y hacia esa meta se dirigen los esfuerzos de numerosos investigadores.

El origen primario de la enfermedad de Alzheimer se desconoce, pero probablemente han de considerarse factores genéticos y ambientales como causas de la enfermedad. Parece muy probable que un defecto genético en el cromosoma 21 esté relacionado con la enfermedad (St George-Hyslop y col, 1987). Ello explica la aparición de una patología similar a la de Alzheimer en los individuos con trisomía 21.

No existe, de momento, una terapia eficaz para detener el progreso de la enfermedad. Aunque se han hecho numerosos intentos para abordar el problema de la degeneración colinérgica con inhibidores generales de colinesterasas, los resultados han sido poco alentadores. En los últimos años, sin embargo, se han venido utilizando 1,2,3,4-tetrahidro-9-amino-acridina (Tacrina, THA) (Summer y col, 1981, 1986; Dolezal y Tucek, 1991) y fisostigmina (Becker y Giacobini, 1988; Ashford y col, 1989), potentes inhibidores de las colinesterasas, y los resultados iniciales permiten abrigar esperanzas de un detenimiento del deterioro del sujeto, e incluso mejoría del estado general de los pacientes de Alzheimer. Estos datos confirman la hipótesis colinérgica de la demencia y suponen una llamada a los investigadores para encontrar agentes que sean más efectivos para el tratamiento de la enfermedad.



### 3.4.2. Síndrome de Down.

Se mencionó anteriormente la relación existente en la histopatología de los pacientes con trisomía 21 y Alzheimer. Por otra parte, Heyman y col (1983) encontraron que en las familias de pacientes con Alzheimer hay una incidencia de mongolismo 3 veces superior a lo normal. La proteína amiloide cerebrovascular del encéfalo de mongólicos es homóloga al núcleo de la proteína correspondiente en pacientes de Alzheimer. Las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas son casi idénticas (Masters y col, 1985). Los datos neuroquímicos confirman la relación entre ambas enfermedades. Se ha encontrado que la actividad colínacetilasa queda reducida en siete regiones cerebrales de pacientes con trisomía 21 y en siete de las ocho áreas analizadas, en los de Alzheimer. Algo parecido ocurre cuando se valora la actividad AChE (Yates y col, 1980).

### 3.4.3. Párkinson.

Después de la enfermedad de Alzheimer, la de Párkinson es el trastorno neurodegenerativo más importante del sistema nervioso central. La bradiquinesia y rigidez del Párkinson se asocian con lesiones del tronco cerebral, en particular del sistema dopaminérgico del nigrostriatum. La incidencia de demencia en los pacientes de Párkinson es de alrededor del 30% (Lieberman y col, 1979). Sin embargo, se desconoce si el

estado demente es intrínseco a la patología de la enfermedad.

La demencia en los pacientes con Párkinson se acompaña de datos bioquímicos similares a los que aparecen en Alzheimer. En los aquejados con Párkinson, disminuye la actividad colínacetilasa, incluso en los pacientes no dementes, pero tal disminución es mucho más acusada en los que manifiestan deterioro intelectual.

La actividad AChE de córtex frontal y parietal es notablemente inferior tanto en los parkinsonianos dementes como en los no dementes. También se aprecia una disminución importante del contenido relativo de la forma G4 cerebral (Ruberg y col, 1986).

Tanto en los pacientes con Alzheimer, como con Párkinson, la anormalidad colinérgica cortical más importante es la pérdida de neuronas de núcleo subcortical de Meynert (Perry y col, 1985). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que el hecho citopatológico más importante en el Párkinson es la aparición de los cuerpos de Lewy (inclusiones neurofilamentosas intracitoplasmáticas en neuronas pigmentadas del tronco cerebral) (Goldman y col, 1983). Tales anomalías son radicalmente distintas de las observadas en los pacientes de Alzheimer. Además, la demencia de los enfermos con Párkinson es menos severa que la de los de Alzheimer y carecen de la agnosia, apraxia y afasia típicas de esta última enfermedad.

#### 3.4.4. Manías, depresiones y esquizofrenia.

Se han hecho numerosos intentos para identificar

marcadores biológicos que soportaran la hipótesis del deterioro de la transmisión colinérgica como base molecular de los trastornos afectivos que se manifiestan en las manías y depresiones (Deutsch y Campbell, 1984; Dilsaver, 1986). En 1972, Janowsky y colaboradores fueron los primeros en proponer que las depresiones y manías se corresponden con estados hiper e hipocolinérgicos, respectivamente. Se ha valorado la actividad AChE en fluidos biológicos como sangre y plasma de pacientes con depresiones reactivas, depresiones endógenas y con anomalías neuropsiquiátricas (Perry y col, 1982).

La actividad BuChE fué similar en todos los grupos, pero la AChE de eritrocito fué notablemente inferior en los enfermos con Alzheimer y con depresión endógena que la que se mide en los pacientes con depresión neurótica (Perry y col, 1982). También es mas baja la actividad AChE eritrocitaria en los pacientes con depresión que en los sujetos normales (Mathew y col, 1982). Sin embargo, la considerable variación de la actividad AChE en eritrocitos de pacientes controles y enfermos limita mucho la utilidad de la valoración de esta enzima como medio diagnóstico, o como elemento diferenciador de diversos tipos de neurosis.

En relación con la esquizofrenia, Domino y Krause (1972) midieron la actividad BuChE plasmática en 27 pacientes enfermos y otros 27 controles. El valor de la BuChE de los pacientes fué un 20% inferior a los controles, pero la actividad AChE de los eritrocitos fué normal. Otros investigadores no han encontrado diferencias en la actividad BuChE plasmática de los individuos enfermos y controles (Lucas

y col, 1971). Estos resultados no son indicativos de alteraciones colinérgicas en la esquizofrenia, pero con todo, la hipótesis de un desequilibrio dopaminérgico-colinérgico como agente causal de la esquizofrenia todavía no se ha abandonado (Dilsaver, 1986).

#### 4. AISLAMIENTO Y EXPRESION DE LOS GENES CODIFICANTES DE LAS COLINESTERASAS.

El establecimiento de la expresión de los genes que codifican las colinesterasas es un paso esencial para comprender la regulación de la biogénesis de estas enzimas.

Los responsables de las variantes fenotípicas para la AChE de eritrocito humano son dos alelos codominantes en un único locus (Coates y Simpson, 1972). Las alteraciones de la BuChE que tienen lugar en suero humano, sin embargo, están producidas por los loci E1 y E2, que son genéticamente independientes. La localización de E1 es el brazo largo del cromosoma 3 (Arias y col, 1985). Las formas atípicas y silentes están producidas por mutaciones de este gen. La localización de E2 es el cromosoma 16 (Simmers y col, 1986) siendo su expresión la responsable de la variante C5 de la BuChE (Pérez-Guillermo, 1988, 1990). Dicha variante se expresa en un 8% de la población del Caúcaso.

Utilizando la degradación de Edman (Lockridge y col, 1987a y b) y analizando ADNc (Mac Tiernan y col, 1987; Prody y col, 1987) se ha logrado establecer la secuencia completa de la subunidad de BuChE de suero. Esta subunidad tiene un peso molecular de 85.534, siendo de 65.092 la contribución de los aminoácidos y 20.442 la de los carbohidratos. El monómero está constituido por 574 aminoácidos y 9 restos de oligosacáridos.

De los aminoácidos que constituyen el centro activo o que están implicados en el mecanismo catalítico sólo se conoce con absoluta certeza la Ser 198 (Lockridge, 1988).

Por análisis de ADNc también se ha establecido la secuencia de aminoácidos de la AChE del órgano eléctrico de *Torpedo* (Schumacher y col, 1986; Sikorav y col, 1987). A diferencia de la BuChE de suero humano (que tiene 574 aminoácidos) la AChE de órgano eléctrico de *Torpedo* tiene 575 aminoácidos, presentando las dos 309 restos aminoacídicos idénticos y con la misma localización. Existe una identidad de secuencias del 53.8% entre las subunidades de las formas asimétricas de la AChE y las de las formas G4 de la BuChE.

La Ser del centro activo de la AChE del órgano eléctrico de *Torpedo* queda en la posición 200 y en la BuChE de plasma humano en la 198. Además, la enzima de *Torpedo* tiene cuatro restos de oligosacáridos ligados a asparragina, mientras que la enzima de suero tiene nueve. Existen anticuerpos que se unen específicamente a la AChE de órgano eléctrico de *Torpedo* y no a la BuChE de plasma humano.

La subunidad de la AChE de *Torpedo* presenta tres enlaces disulfuro intracatenarios (Taylor y col, 1987). Al comparar las secuencias carboxilo terminales de las formas 5.6 S (forma G2 ligada a través de fosfatidilinositol) y 11 S (derivada de las formas asimétricas) aparece una diferencia en un sitio anterior a la glicosilación (Gibney y col, 1988) que es el resto 535.

Para la unión de la forma G2 al glicofosfolípido que se ancla en la membrana plasmática se necesita la eliminación de un segmento de 40 aminoácidos.

La AChE de *Drosophila* y *Torpedo* se encuentran codificadas por un gen único (Hall y Spierer, 1986; Sikorav y col, 1987).

La identidad de AChE de *Drosophila* y ChE plasmática humana es del 38% (Hall y Spierer, 1986).

Se piensa que el procesamiento (splicing) del ARN nuclear transcrito produce formas que se diferencian entre sí en los restos carboxilo terminal y que permite la localización preferente en un determinado tejido además del polimorfismo de AChE (Gibney y col, 1988; Sikorav y col, 1988). Todavía se desconoce cual es el factor que determina que el ARN se procese en el sentido de la producción de formas asimétricas (hidrofílicas) o globulares (hidrofóbicas o hidrofílicas).

Recientemente se han secuenciado el gen codificante de la BuChE de conejo, encontrando que los exones codificadores de dicho gen presentan una estructura idéntica a los de la BuChE humana y AChE de Torpedo. En todos los casos, la serina del centro activo se sitúa en una región muy conservada y lo mismo Asp-91 y Asp-170 que, probablemente, forman parte de la triada implicada en el mecanismo catalítico. El Asp 70, que participa en el centro aniónico, también se conserva en las BuChEs analizadas (Chatonnet y col, 1991). Es precisamente la mutación Asp-70 por Gly la que da origen a la variante dibucaín-resistente de la BuChE (La Du y col, 1990). Las variantes fluoruro-resistentes resultan de mutaciones 243 Thr por Met y 390 Gly por Val. El tipo K procede de la mutación de Ala 539 por Thr y la variante silente se produce por un desplazamiento del marco de lectura que comienza en Gly 117, porque el codón 117 cambia GGT por GGAG (La Du y col, 1990).

Se conocen ya las secuencias completas o parciales de la BuChE humana, mono, perro, cerdo, conejo, cabra y ratón, y

estudiando la homología secuencial de aminoácidos y nucleótidos se ha podido trazar un esquema evolutivo (Arpagaus y col, 1991).

También se ha comprobado que existen proteínas con secuencias homólogas a las colínesterasas. Algunas de ellas son esterasas (carboxilesterasa, lisofosfolipasa, esterasas de *Drosophila*), pero otras son proteínas de adhesión a la membrana basal (glutactina), precursoras de hormonas tiroideas (tiroglobulina) o proteínas integrales de membrana (neurotactina) (Taylor, 1991).



## 5. GENESIS, COMPOSICION Y REABSORCION DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.

### 5.1. Anatomía.

El líquido cefalorraquídeo (LCR) circula por los ventrículos y espacio subaracnoideo, dos estructuras que circundan el cerebro y médula espinal.

Los cuatro ventrículos se comunican entre sí de tal manera que el LCR fluye desde los ventrículos laterales al tercer ventrículo por la foramina de Monro y de aquí al cuarto ventrículo por el acueducto de Silvio. De éste ventrículo llega a la cisterna basal y al espacio subaracnoideo de la médula espinal. La proporción y dirección del flujo del LCR ha sido estudiada por isotopoventriculografía y cisternografía (Di Chiro, 1964).

Desde las cisternas basales, el LCR fluye hacia los senos cerebrales. El plexo coroideo deriva embriológicamente de las capas primarias del epitelio neural y constituye las paredes del ventrículo lateral y los techos del tercer y cuarto ventrículo, entre el fórnix y el tálamo, y la fimbria y el tallo caudal.

En un adulto normal los plexos coroideos de los ventrículos laterales pesan unos 1.8 g (Millen y Woollah, 1962). Están formados por dos capas: la piamadre y el epéndimo.

El epéndimo es una capa epitelial que tapiza al ventrículo y que muestra proyecciones vellosas y cilios en su superficie. Voetman (1949) calculó una superficie de  $200 \text{ cm}^2$

para dichas proyecciones.

El epitelio coroidal se pliega en microvellosidades formando una superficie similar a la de un borde de cepillo no muy distinta de las que se observa en las microvellosidades intestinales.

Los plexos coroideos están constituidos por el epitelio coroidal, los vasos sanguíneos y el tejido conectivo intersticial. El suministro sanguíneo que reciben los plexos coroideos de los ventrículos depende de las arterias coroidales: en el tercer ventrículo de la arteria cerebral posterior y en el cuarto ventrículo de la arteria cerebelar posteroinferior.

#### 5.2. Formación y Composición.

Los plexos coroideos son el lugar más importante de formación de LCR por encima del espacio subaracnoideo, como fué comprobado en cerebro de perro (Bering y Sato, 1963) y en humanos (Carpenter, 1978; Fishman, 1980; Rowland, 1981; Wood, 1983; Davson, 1987).

Globalmente, el 85% del LCR está producido por los plexos coroideos de los ventrículos laterales, tercero y cuarto. El resto se forma por difusión a través de las meninges (Fishman, 1980).

El mecanismo propuesto para la secreción del LCR por los plexos coroideos se basa en la entrada de agua y solutos, de forma regulada, por la membrana basal de la célula, seguido del desplazamiento de solutos al extremo apical de la misma.

El LCR fluye en el espacio subaracnoideo perivascular en el mismo sentido que los vasos sanguíneos. Su concentración iónica depende de las fuerzas hidrostáticas, fuerzas osmóticas y mecanismos de transporte. Numerosos investigadores han determinado que tanto la secreción como la absorción iónica se produce en los plexos coroideos (Cutler y col, 1968; Tripathi, 1974; Butler, 1977; Lindvall y col, 1978). Los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  son secretados, mientras que algunos aminoácidos, bases orgánicas y otros compuestos son absorbidos. El  $\text{Na}^+$  es el catión que más contribuye a la osmolaridad. El transporte activo y la fuerza osmótica son los mecanismos que operan en su distribución en el LCR. La concentración de  $\text{Na}^+$  es semejante a la del suero. En cambio, la concentración de  $\text{K}^+$  es aproximadamente 2/3 de la del suero. La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  está estrechamente controlada, siendo su concentración la mitad de la sérica, y es independiente de la concentración de proteínas plasmáticas. Además, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  no se afectan por la administración de  $\text{Ca}^{2+}$  intravenoso, EDTA, hormona paratiroidea o paratiroidectomía total. El mecanismo de entrada parece que está mediado por un transportador, ya que resulta fuertemente inhibido por la ouabaína, pero no por la acetazolamina. Es posible, por tanto, que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pueda estar ligado a la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa.

La concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  es más alta en el LCR que en el suero, fluctuando mínimamente con la variación de éste. El mecanismo propuesto para explicar el movimiento de  $\text{Mg}^{2+}$  consiste en un transporte activo a través de los plexos coroideos y células gliales.

La concentración de  $\text{Cl}^-$  es también más alta en el LCR que en el suero, siendo en el líquido cisternal mayor que en el coroidal.

La pequeña cantidad de proteínas que hay en el LCR (260 veces menos que en el suero) y el efecto Donnan son en parte responsables de la mayor concentración de  $\text{Cl}^-$  en el LCR que en el suero. En efecto, la carga negativa de las proteínas en el suero favorece el transporte de aniones difusibles (como el  $\text{Cl}^-$ ) al LCR. Dicho transporte está ligado al del  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Na}^+$  por un mecanismo activo.

La glucosa es transportada al LCR por difusión facilitada, por un transportador proteolipídico presente en los plexos coroideos, capilares, sinaptosomas y células gliales. La concentración de glucosa en el LCR es 60% la del suero y su valor fluctúa con la concentración sérica.

Algunos autores han investigado la cinética de transporte de glucosa sérica al LCR al administrar por vía endovenosa una disolución de glucosa y seguir el tiempo necesario para la aparición de un máximo de concentración en suero. En el LCR se observa también dicho máximo pero con un retraso de 90 a 120 minutos, respecto al tiempo medido en suero. La vuelta a la normalidad se produce después de 4-6 horas (Fishman, 1980).

Como las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son mayores en el LCR que en el suero y las de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y glucosa son inferiores, se supone que el LCR es un producto secretado en donde intervienen fenómenos de transporte activo a través del plexo. Sin embargo, la difusión simple también juega un papel importante en el transporte de  $\text{HCO}_3^-$ , lactato,  $\text{H}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ .

En diversos estudios se han observado diferencias regionales en las concentraciones de solutos específicos. Se ha visto que los iones tienden a entrar en el LCR ventricular antes que en el cisternal o lumbar, mientras que el agua tiende a entrar en el cisternal, quizás por la mayor superficie de las regiones cerebelar y cortical (Fishman, 1980; Davson y col, 1987).

La más alta concentración de albúmina en la zona lumbar sugiere que para grandes moléculas, la barrera endotelial puede ser menos efectiva en los vasos lumbares que en los del cerebro.

Se ha estimado de forma variable la cantidad de LCR formado en el hombre, según el método utilizado para valorar dicha producción. Así, Masserman (1934) calculó una producción de 100-250 ml/día. Para ello, utilizó un método consistente en quitar un volumen determinado de LCR a la vez que medía la presión. Cronometrando el tiempo que tardaba en alcanzar la presión original pudo calcular la velocidad de producción del LCR. También se ha valorado perfundiendo LCR artificial con una sustancia exógena de concentración conocida y midiendo, después, la concentración de dicha sustancia a un tiempo determinado y calculando así el volumen de LCR eliminado en un tiempo determinado, que es proporcional al LCR formado.

Diferentes autores obtuvieron valores muy similares de formación de LCR, siendo éste de 0.35 ml/min aún utilizando distintas sustancias exógenas marcadoras, como en el caso de la inulina (Pappenheimer y col, 1962) o agentes quimioterápicos (Cutler y col, 1968; Rubin y col, 1966).

### 5.3.Reabsorción.

Se considera una función primaria de las vellosidades aracnoideas y granulaciones que se proyectan en los senos duros.

Las vellosidades aracnoideas son herniaciones de la membrana aracnoidea en el lumen de los senos y se localizan, por tanto, en la interfase LCR y sangre. Estas vellosidades han sido también identificadas a lo largo de las raíces nerviosas espinales, en donde puede haber absorción.

Las granulaciones son grandes agrupaciones de vellosidades.

En todas las membranas se observan intercambios rápidos de agua entre la sangre y LCR, sin embargo, no se alcanza la salida neta de agua del LCR hasta que éste alcanza las vellosidades aracnoideas.

Se ha observado parecida absorción de líquido en las paredes endociliares en experimentos realizados con perros con hidrocefalia (Bering y Sato, 1963).

Las vellosidades aracnoideas son una red de estructuras tubulares de unos 4 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro que se abren en los canales venosos de tal manera que pueden escapar del LCR grandes moléculas e incluso células sanguíneas (Welch y Friedman, 1960; Pollay y Welch, 1962) Los tubos actúan como válvulas de una dirección que se colapsan cuando la presión venosa aumenta por encima de la del LCR. Otros autores no están de acuerdo con que haya continuidad anatómica entre la sangre y el LCR por las vellosidades, sino que sugieren que ha

de existir algún tipo de membrana celular interpuesta (Alksne y White, 1965; Turner, 1961). La cantidad de LCR que puede ser absorbido es considerablemente mayor que la que se produce. En el hombre, se ha perfundido 0.75 ml/min en el espacio subaracnoideo a una presión de 400 mm de agua (Foldes y Arrowood, 1984).

#### 5.4. Barrera Hematoencefálica.

En 1885, Erlich demostró que la anilina inyectada por vía endovenosa no teñía al tejido cerebral y sí a otros tejidos corporales. Stern y Gautier propusieron el término "barrera hematoencefálica" (BHE) para describir esta entidad fisiológica. Morfológicamente, el epitelio coroidal, la membrana aracnoidea y las células del endotelio capilar tienen uniones estrechas (tight junctions). Este tipo de unión está ausente en ciertas áreas especializadas del cerebro como el hipotálamo, área postrema y subfornical y órganos subcomisurales. Por el contrario, las células ependimales (excepto los tanicitos de la eminencia media) no tienen uniones estrechas pero sí regiones con discontinuidades (gap junctions).

Existen diversos factores anatómicos que afectan a la capacidad de ciertos solutos para pasar la BHE.

Las células endoteliales de los capilares cerebrales son diferentes de las de la circulación sistémica. En las primeras, no existen poros fenestrados, uniones en hendidura y vesículas pinocíticas. Además, el número de mitocondrias y uniones

fuerzas es mayor en las células endoteliales de los capilares cerebrales. Estas células disponen de un sistema de transporte específico bidireccional para la glucosa, iones y aminoácidos. Estos hechos sugieren que en estos capilares se produce más un transporte específico de solutos que un efecto inespecífico de filtrado.

Los plexos coroideos tienen mecanismos de transporte específico y son los responsables primarios de la "acción sumidero" del LCR. Los solutos polares pasan de los capilares al cerebro y mediante un proceso lento alcanzan el estado de equilibrio. Después pasan libremente del cerebro al LCR para ser eliminados de forma más rápida por el flujo-reabsorción en masa, un término que se refiere al movimiento del LCR y sus constituyentes. De esta manera, el sistema para eliminar solutos del cerebro por transporte en el LCR constituye una rápida transferencia al flujo venoso. Las características bioquímicas de los solutos están también implicadas en la permeabilidad.

La entrada de un soluto en el cerebro es inversamente proporcional a su peso molecular. Además, los compuestos que se ligan a proteínas también tienen mayor dificultad para su entrada en el SNC. A mayor liposolubilidad del compuesto, más facilidad para entrar en el SNC.

Los compuestos polares como el  $\text{HCO}_3^-$  penetran más lentamente, e igual sucede con los solutos hidrosolubles.

La concentración de un compuesto en el LCR no siempre es una indicación exacta de su concentración en el cerebro. Por ejemplo, la fenitoína, un compuesto muy liposoluble, está en



mayor concentración en el cerebro que en el plasma, pero su concentración en el LCR se aproxima a la fracción no proteica del plasma.

Las diferencias osmóticas en el plasma, cerebro y LCR son sólo transitorias porque la osmolaridad varía directamente con los cambios en la osmolaridad del plasma.

El pH del LCR es generalmente más bajo que el de la sangre. La relación de concentración de un soluto en el LCR respecto del plasma depende de su pKa, así como del pH del plasma (Rapoport, 1976).

En determinadas situaciones se produce la rotura de la BHE y ello supone, naturalmente, cambios en el paso de solutos y se refleja en alteraciones de la composición del LCR respecto a la que se observa en la situación normal.

Se cree que existen cuatro grandes mecanismos implicados en el aumento de la permeabilidad vascular en estados patológicos, como son el paso interendotelial a través de las uniones estrechas, flujo transendotelial, transporte vesicular y neovascularización.

Rapoport describió las "aperturas osmóticas" como un fenómeno que se presentaba cuando inyectaba pequeños volúmenes de disoluciones hiperosmóticas en la arteria carótida y encontraba la peroxidasa utilizada como marcador, entre las células endoteliales y no dentro de ellas. Explicó este fenómeno sugiriendo que las uniones estrechas (tight junctions) podían haberse dilatado debido a un encogimiento de las células. La penicilina es un ejemplo de este proceso. Un ácido orgánico, con pobre liposolubilidad y parcialmente unido

a albúmina, la penicilina, es transportada del cerebro al LCR a través de los plexos coroideos. En pacientes con meningitis, la BHE es menos efectiva y el antibiótico penetra más fácilmente en el LCR (Fishman, 1980).

## 6. OBJETIVOS.

El trabajo experimental recogido en la presente Memoria intenta una aproximación al conocimiento de los niveles de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en el líquido cefalorraquídeo de sujetos normales y de pacientes afectados por enfermedades neurológicas.

Aunque se han recogido muestras de líquidos lumbares de sujetos controles y de pacientes con meningitis, hidrocefalia, demencia senil, tumores cerebrales, trombosis y alcoholismo, en este primer estudio, se analizan los líquidos de los sujetos normales y de enfermos con meningitis e hidrocefalia. Al interés de la evolución de las actividades enzimáticas del líquido lumbar de estos individuos se unía la cuestión del número de muestras disponibles.

Se abordará pues este trabajo intentando establecer si los valores de las actividades AChE y BuChE de los sujetos normales evolucionan con la edad. Sólo así será posible conocer si, como consecuencia de una enfermedad, se alteran los niveles de las enzimas.

Se estudiará cómo se afectan los valores de la actividad AChE y BuChE del líquido lumbar de los sujetos con meningitis e hidrocefalia. También analizaremos los niveles de las enzimas de los líquidos ventriculares, tomados del shunt ventriculoperitoneal, de los sujetos con hidrocefalia y de los

que además presentan ventriculitis.

Se investigará si, como consecuencia de una enfermedad, se modifica en alguna medida la naturaleza de la AChE, vía alteración de los procesos de síntesis o de degradación.

Se estudiará si hay reacción inmunológica entre la AChE del líquido cefalorraquídeo y anticuerpos monoclonales generados contra la enzima del eritrocito humano. Dependiendo de la capacidad de interacción de la enzima con los anticuerpos se podrían utilizar procedimientos de inmunoensayo para la valoración de AChE del líquido lumbar.

Se separarán los componentes moleculares de la AChE y BuChE del líquido lumbar y ventricular, en casos de hidrocefalia. Se investigará si las proporciones de las formas moleculares de estas enzimas se modifica como resultado de una enfermedad neurológica. Se estudiará también la interacción de las formas enzimáticas individuales con anticuerpos monoclonales.

Se investigará el comportamiento hidrodinámico de las formas moleculares de la AChE y BuChE del córtex cerebral humano. Se procederá a comparar las propiedades de las enzimas del LCR y del cerebro para intentar establecer si hay alguna relación entre las enzimas de las dos fuentes.

Aprovechando el carácter glicoproteico de la AChE y BuChE, se analizará la interacción de cada una de estas enzimas con

diferentes lectinas, cada una con determinada especificidad frente a los restos de oligosacáridos. Después se procederá a estudiar si las enzimas de los líquidos lumbares de los enfermos interaccionan con las lectinas de manera diferente.

También se analizará la interacción de la AChE y BuChE del córtex cerebral con lectinas, así como la BuChE del plasma. Con la información recogida sobre la reacción de las enzimas del LCR, plasma y córtex cerebral con lectinas, se intentará proponer una teoría que explique el origen de la AChE y BuChE del LCR.

Todos estos estudios representan la primera etapa de un proyecto que pretende conocer los cambios de las actividades AChE y BuChE del LCR y córtex cerebral que se puedan producir bajo determinadas situaciones patológicas. Es nuestro propósito proseguir este trabajo analizando las enzimas del LCR y encéfalo de sujetos aquejados de distintos tipos de demencias, con enfermedades neurodegenerativas o cerebrovasculares, y en particular en tejidos y LCR de individuos con tumores cerebrales con vistas a la posible consecución de un diagnóstico precoz de estas enfermedades.

CAPITULO II

LAS COLINESTERASAS EN EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO  
EN RELACION CON LA EDAD DEL SUJETO. CAMBIOS  
DE ACTIVIDAD EN PACIENTES CON MENINGITIS  
BACTERIANA E HIDROCEFALIA.

## 1. INTRODUCCION.

Tanto la AChE como la BuChE son componentes del plasma sanguíneo y del líquido cefalorraquídeo (LCR). Diversos investigadores han intentado utilizar los niveles enzimáticos en dichos medios biológicos como un procedimiento de diagnóstico para la detección y posterior seguimiento de la progresión de un desorden neurológico dado. En este sentido, se ha puesto de manifiesto que la actividad AChE en el plasma es superior (Atack y col, 1985) o igual a la normal, en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (St. Clair y col, 1986), elevada en la esclerosis lateral amiotrófica (Festoff y Fernández, 1981) y normal en sujetos con distrofia muscular (Sketelj y col, 1983). En el LCR se ha encontrado que los niveles de actividad AChE son normales en los pacientes con Alzheimer o con demencia senil (Johnson y Domino, 1971; Davies, 1979; Lal, 1984; Direnfield y col, 1984; Manyam y col, 1990) o mas bajos que los procedentes de sujetos normales (Soininen y col, 1981; Appleyard y col, 1983; Arendt y col, 1984; Tune y col, 1985; Atack y col, 1987a). También se han encontrado valores normales de actividad AChE en la enfermedad de Huntington, en los estados depresivos, en sujetos con esquizofrenia (Davis y col, 1979), en pacientes con síndrome de Gilles de la Tourette (Singer y col, 1984), enfermedad de Párkinson (Direnfield y col, 1984) y sicosis de Korsakoff (Lal y col, 1984).

Por lo que se refiere a la BuChE, se ha analizado con más frecuencia su actividad en plasma que en LCR. Diversas

publicaciones sugieren que la actividad BuChE plasmática aumenta en sujetos con la enfermedad de Alzheimer (Smith y col, 1982), pero otros investigadores indican que los niveles enzimáticos en este tipo de pacientes no se diferencian significativamente de los hallados en individuos controles (Atack, 1985). También se ha puesto de manifiesto que la actividad BuChE plasmática aumenta en las depresiones (Mathew y col, 1982) y en los estados de ansiedad (Mathew y col, 1980) pero no en los sujetos con crisis maniaco-depresivas (Milstoc y col, 1975). Se han descrito modificaciones de la actividad BuChE plasmática en casos de esquizofrenia y epilepsia (Domino y Krause, 1972; Davis y Goodnick, 1983).

Existen pocos estudios sobre la actividad BuChE en LCR. Cabe destacar el aumento de esta actividad enzimática en sujetos con la enfermedad de Alzheimer (Arendt y col, 1984) y en casos de meningitis y de síndrome de Guillain-Barré (Johnson y Domino, 1971). La actividad no aumenta en los sujetos con el síndrome de Gilles de la Tourette (Singer y col, 1984).

Los resultados sobre los cambios de las actividades de AChE y BuChE en líquido cefalorraquídeo de sujetos con meningitis son discrepantes. Por una parte, algunos investigadores han aportado pruebas que indican que los valores promedio de actividad AChE en el líquido cefalorraquídeo y suero de los sujetos meningíticos era significativamente inferior que en los individuos normales (Dickmann y col, 1989). Estos resultados se contraponen con los proporcionados por Johnson y Domino (1971) que señalaban



aumentos de la actividad BuChE en el LCR lumbar de pacientes con meningitis o con el síndrome de Guillain-Barré. A la vista de estos resultados decidimos reinvestigar cómo se modificaban las actividades AChE y BuChE del LCR en diferentes desórdenes neurológicos, pero antes consideramos la posibilidad del estudio de la evolución de los niveles de actividad AChE y BuChE del líquido cefalorraquídeo según la edad de los sujetos. Sólo así sería posible demostrar hasta qué punto los aumentos o disminución de las actividades enzimáticas podían ser relacionadas con el desorden neurológico estudiado.

Los resultados que se presentan a continuación indican que las actividades AChE y BuChE de líquido cefalorraquídeo de los individuos normales aumentan con la edad del sujeto en el intervalo entre 8 y 78 años. Para estudiar los LCR procedentes de sujetos con meningitis o hidrocefalia, las muestras se distribuyeron en tres grupos según la edad de los pacientes: menores de 1 año, entre 1 y 8 años y de 8 a 60 años. Se observa un aumento considerable de las actividades AChE y BuChE promedio en los dos primeros grupos, en relación con la actividad de los sujetos controles, pero cuando se considera el tercer grupo de pacientes, los valores de ambas actividades quedan solapados con los de los individuos normales. En este caso, por tanto, no se puede afirmar que los niveles de actividad AChE y BuChE queden fuertemente afectados por la meningitis.

Cuando se analizan los líquidos lumbares de sujetos con hidrocefalia y se comparan con los procedentes de sujetos de la misma edad se comprueba que los valores de AChE y BuChE y

el contenido de proteína no difieren de forma notable. Se aprecian, diferencias importantes, en los datos de actividades enzimáticas y niveles proteicos procedentes de los líquidos ventriculares de sujetos con hidrocefalia congénitas y los recogidos de estos individuos si padecen, además, ventriculitis.

Las determinaciones de las actividades AChE y BuChE se han realizado haciendo uso de sustratos e inhibidores selectivos de cada una de las enzimas y, en el caso de la AChE, por inmunoensayo con diferentes anticuerpos monoclonales, todos ellos generados contra la enzima del eritrocito humano.

## 2. MATERIALES Y METODOS.

### 2.1. Toma de Muestras.

La recogida del LCR lumbar fué mediante punción lumbar. La colocación de los enfermos fué decúbito lateral (postura genupectoral), desinfectándose la zona con yodo. Se introdujo una aguja del calibre 21 con trocar en la línea media, a nivel del espacio L III-L IV, entre las apófisis espinosas hasta el saco dural, retirándose a continuación el trocar para recoger el LCR en tres alícuotas de igual volumen, las cuales se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Las muestras de líquido ventricular se recogieron del final del shunt de la derivación ventrículo-peritoneal o directamente del reservorio.

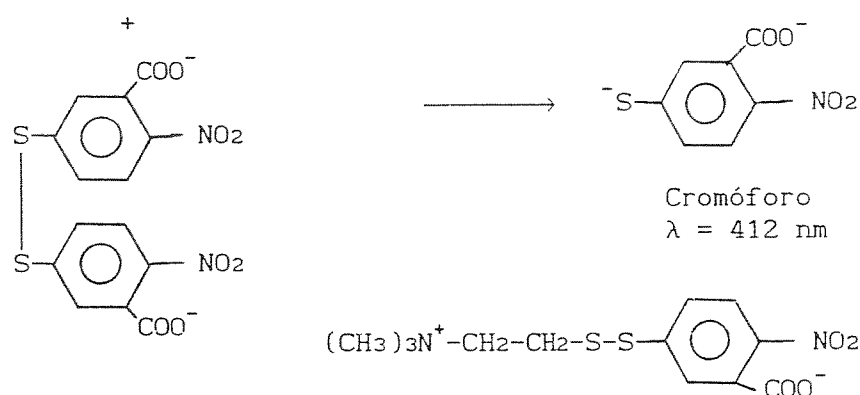
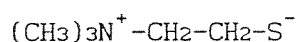
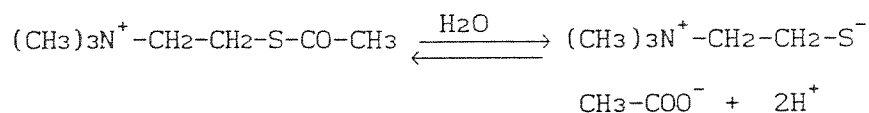
Las muestras utilizadas fueron aquéllas que no estaban contaminadas con sangre, desechándose las que tuviesen más de diez hematíes por  $\text{mm}^3$  de LCR.

### 2.2. Valoración de Actividad Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa en Líquido Cefalorraquídeo Humano.

#### 2.2.1. Método espectrofotométrico.

La medida de actividad colinesterasa se realizó aplicando el método de Ellman y col (1961). Por este método, el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) se desdobra en presencia de restos tioles libres para dar un derivado del ácido

2-nitrobenzoico, intensamente coloreado, que absorbe a 412 nm. Los sustratos utilizados fueron la acetiltiocolina y la butiriltiocolina. Estos ésteres son hidrolizados por la AChE y BuChE para rendir tiocolina, que reacciona rápidamente con el DTNB produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato que presenta un intenso color amarillo.



En los ensayos enzimáticos se empleó DTNB 0.30 mM y yoduro de acetiltiocolina o de butiriltiocolina 1 mM en tampón fosfato 0.1 M, pH 8.0. Para la medida de las actividades enzimáticas en LCR se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de muestra a una cubeta de 1.5 ml que contenía tampón fosfato y DTNB, incubándose la mezcla 5 minutos a 37°C, antes de adicionar el sustrato. Como el LCR contiene AChE y BuChE, la valoración de la AChE se llevó a cabo añadiendo al tampón fosfato Iso-OMPA, un inhibidor selectivo de la BuChE, de modo que la concentración final fuera 50  $\mu\text{M}$ , utilizando como sustrato acetiltiocolina 1 mM. Cuando lo que se pretendía medir era la actividad BuChE, al medio de incubación se añadía BW 284c51, 10  $\mu\text{M}$ , inhibidor

selectivo de la AChE (Austin y Berry, 1953; Vigny y col, 1978), empleando butiriltiocolina, 1 mM, como sustrato. El cambio de absorbancia se seguía a 412 nm. Una unidad de actividad representa la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de sustrato por minuto, en las condiciones de medida.

### 2.2.2. Valoración en microplacas.

La medida de actividad AChE y BuChE también se llevó a efecto por aplicación del método de Ellman comentado anteriormente, pero adaptado para su aplicación en microplacas (Cabezas-Herreras y col, 1992). En este caso, la mezcla de reacción contenía 390  $\mu\text{M}$  de DTNB en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.5.

Se depositan 25  $\mu\text{l}$  de LCR, o de tampón fosfato para valorar la hidrólisis espontánea, en el pocillo de la microplaca. A continuación, se añaden 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción preparada sin inhibidores y 25  $\mu\text{l}$  de 0.6 mM Iso-OMPA (concentración final 50  $\mu\text{M}$ ) para medida de actividad AChE, o 25  $\mu\text{l}$  de 0.12 mM BW 284c51 (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ) para determinar la actividad BuChE. Las muestras se incuban 10 min, a temperatura ambiente, hasta que la absorbancia a 405 nm se mantiene constante. De esta manera, los grupos tioles libres de las proteínas que hayan en el medio reaccionan con el DTNB antes de poner el sustrato. La reacción enzimática comienza al añadir 50  $\mu\text{l}$  de acetiltiocolina o butiriltiocolina 6 mM, según se deseara valorar la actividad AChE o BuChE. La concentración de sustrato en el ensayo fué siempre 1 mM. A continuación, se

leen las placas en un EIA 400 FW SLT Reader, empleando el sistema dual del lector que permite leer absorbancia a 405 nm restando la correspondiente a 620 nm, a intervalos de tiempo 10, 20 y 30 min. La absorbancia a tiempo 0 se descuenta de las lecturas tomadas a los intervalos de tiempo señalados. El incremento de absorbancia es lineal, normalmente hasta más allá de los 120 min. La absorbancia debida a la hidrólisis espontánea del sustrato se descuenta de la lectura procedente de la muestra para obtener el dato de la hidrólisis enzimática. La actividad AChE y BuChE se puede expresar en unidades arbitrarias que representan el incremento de 0.001 unidad de absorbancia por minuto. El factor de conversión de unidades arbitrarias en unidades enzimáticas en nmoles de sustrato hidrolizado por min es 1.60 y 2.14 para AChE y BuChE, respectivamente.

Para el tratamiento estadístico de los datos procedentes de las actividades enzimáticas de LCR se realizó el cálculo de las diferencias de medias mediante la prueba t (Davies y Goldsmith, 1972).

### 2.2.3. Valoración de la actividad AChE por inmunoensayo.

Los anticuerpos monoclonales AE1, AE2 y AE3 fueron enviados generosamente por Douglas Fambrough (Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD, USA). Posteriormente, los hibridomas ATTC HB72 y HB73, secretores de los anticuerpos AE1 y AE2 fueron obtenidos de la American Type Culture Collection y cultivados en el Servicio General de Cultivos Celulares de

la Universidad de Murcia. Para estudiar la interacción de los anticuerpos con la AChE se utilizaron los anticuerpos convenientemente purificados. El anticuerpo 4F19 fué suministrado por Novo Biolabs (Bagsvaerd, Dinamarca). Las inmunoglobulinas de cabra anti-ratón procedían de Tago Inc. (Burlingame, CA, USA).

Para la medida de la actividad AChE se depositaron 100  $\mu$ l de la disolución de IgG de cabra anti-ratón en PBS (10  $\mu$ g/ml) en los pocillos activados de fondo plano de Nunc, Intermed (Dinamarca). La mezcla se incubó toda la noche a 4<sup>0</sup>C y después de ello, los pocillos se lavaron cuatro veces con Tween 20 (0.1% v/v) en PBS. El tampón de lavado se retiró por succión. A continuación, se añadieron a los pocillos 170  $\mu$ l de albúmina de suero bovino (BSA, 2%) en PBS, incubándose el conjunto 3 h a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces como antes, se añadieron a los pocillos 50  $\mu$ l de BSA al 1%, 0.05% Tween 20 y cantidades variables de anticuerpo (0.3-3000 ng) de AE1, AE3 y 4F19 en PBS. Después de incubar toda la noche a 4<sup>0</sup>C, los pocillos se lavaron con PBS-Tween 20. Finalmente, se depositaron sobre los mismos 50  $\mu$ l de líquido cefalorraquídeo o de la disolución de enzima de eritrocito (la actividad enzimática de la muestra a depositar debía tener alrededor de 0.8 U/ml), y el conjunto se incubó toda la noche a 4<sup>0</sup>C. Después de lavar con PBS-Tween 20, se añadieron a los pocillos 100  $\mu$ l de una disolución que contenía 300  $\mu$ M DTNB y 1 mM acetiltiocolina en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.5. A continuación, se midió el cambio de absorbancia en el lector de placas como se indicó en el epígrafe anterior. En

ocasiones, se incluyó en la mezcla de reacción 50  $\mu\text{M}$  Iso-OMPA para saber si éste, a esa concentración, inhibía a la AChE.

### 2.3. Medida de Proteínas.

#### 2.3.1. Método de biuret.

Cuando las muestras contenían una concentración elevada de proteína, 5-20 mg/ml, se utilizó el método de biuret modificado por Plummer (1977). Para preparar la recta patrón se utilizó una disolución de albúmina de suero bovino (10 mg/ml) y en sendos tubos se pusieron 0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 ml de la disolución estándar de albúmina completando el volumen a 1 ml con agua. En otra serie de tubos se añadieron 0.2 ml de muestra y 0.8 ml de agua. A todos los tubos se añadieron 2 ml del reactivo de biuret. Este reactivo se preparó disolviendo 150 mg de sulfato de cobre -  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - y 600 mg de tartrato sódico en 10 ml de agua. A continuación, se añadieron 30 ml de NaOH 2.5 M, llevando el volumen hasta los 90 ml con agua. Finalmente, se disolvieron en el medio 100 mg de KI y 1.5 g de desoxicolato sódico completando el volumen hasta 100 ml con agua. Una vez añadido el reactivo de biuret a los tubos que contenían la muestra, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min para que la reacción se completara y después se leyó la absorbancia de las disoluciones a 540 nm.

Dado que el contenido de proteína del LCR es inferior al límite de detección del método de biuret, este procedimiento se empleó para la medida de proteínas de las preparaciones



enzimáticas procedentes de cerebro humano o de plasma, mientras que para la valoración de proteínas del LCR se recurrió a un método más sensible.

### 2.3.2. Método de Lowry.

Se utilizó si la concentración de proteína de las muestras era del orden de microgramos. El procedimiento empleado fué el descrito por Bensadoun y Weinstein (1976). Se preparó una recta patrón con 0, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g}$  de albúmina de suero bovino, llevando el volumen a 0.2 ml con agua. La muestra a analizar fué convenientemente diluida para que contuviera entre 40-50  $\mu\text{g}$  de proteína en 0.2 ml de disolución. A todos los tubos se añadió 1.5 ml de reactivo de biuret (2% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 0.1 N de Na OH, 0.005%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 0.01% tartrato de sodio y potasio), agitando la mezcla vigorosamente. A continuación, se adicionó a los tubos 0.15 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (disolución de tungstato de sodio y molibdato de sodio en ácido fosfórico y ácido clorhídrico) diluído 1:1 en agua antes de usarse. Después de agitar bien los tubos, se dejaron reposar 45 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 620 nm.

El detergente Triton X-100 interfiere con este procedimiento porque forma complejos insolubles con el reactivo. Para evitar esto se añadió SDS al 0.5% al reactivo alcalino del biuret. Se puede añadir SDS hasta el 3% si la concentración de Triton X-100 en el medio fuese muy elevada (Dulley y Grieve, 1975).

### 3.RESULTADOS.

#### 3.1.Actividades AChE y BuChE en Líquido Cefalorraquídeo de Individuos Normales, en Relación con la Edad.

Se determinaron las actividades AChE y BuChE en el LCR de 126 sujetos normales, con edades comprendidas entre pocos días y 78 años. De las muestras analizadas, 28 procedían de niños menores de un año, 30 de niños entre 1 y 8 años y 68 de individuos entre 8 y 78 años. Los valores promedio de actividad AChE en los dos primeros grupos de edad no diferían significativamente, pero sí que aumentaban de forma notable en el tercer grupo (Fig. II-1). Cuando se analizaron los datos procedentes de la medida de actividad BuChE se comprobó que el promedio de actividad disminuía ligeramente en el segundo grupo, en relación con los promedios conseguidos en el primero, para aumentar de nuevo en el tercer grupo de sujetos (Fig. II-2).

Los datos individuales de actividad AChE y BuChE de los sujetos incluidos en el tercer grupo se representaron en función de la edad obteniéndose las rectas de regresión que se muestran en las Figs. II-3 y II-4. Se comprueba que la actividad AChE en el líquido cefalorraquídeo aumenta con la edad en el intervalo considerado (8-78 años) según la expresión  $y = 0.127 x + 9.1$ , con un coeficiente de regresión 0.68. Si se considera la evolución de la actividad BuChE, se aprecia que también aumenta con la edad del sujeto, pero de forma menos acusada que la actividad AChE. Para la BuChE la

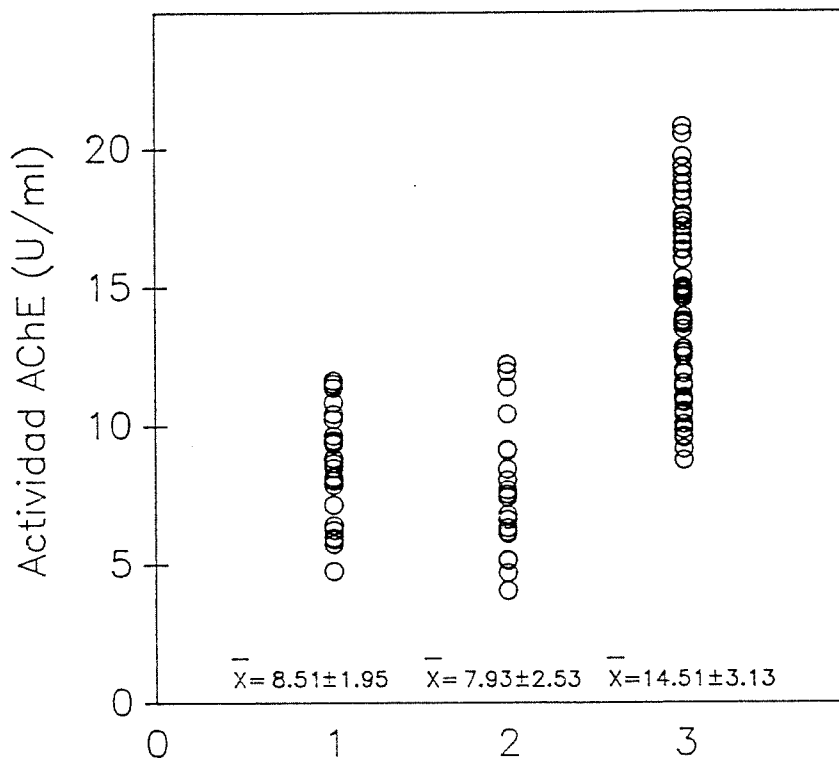


Fig. II-1. Valores de actividad AChE en líquido cefalorraquídeo de sujetos normales con edad inferior a 1 año (1), entre 1-8 años (2) y 8-60 años (3). Los datos de actividad se expresan en nmoles de acetiltiocolina hidrolizada por min y ml de LCR, en ensayos realizados en presencia de acetiltiocolina, 1 mM, e Iso-OMPA, 50  $\mu$ M.

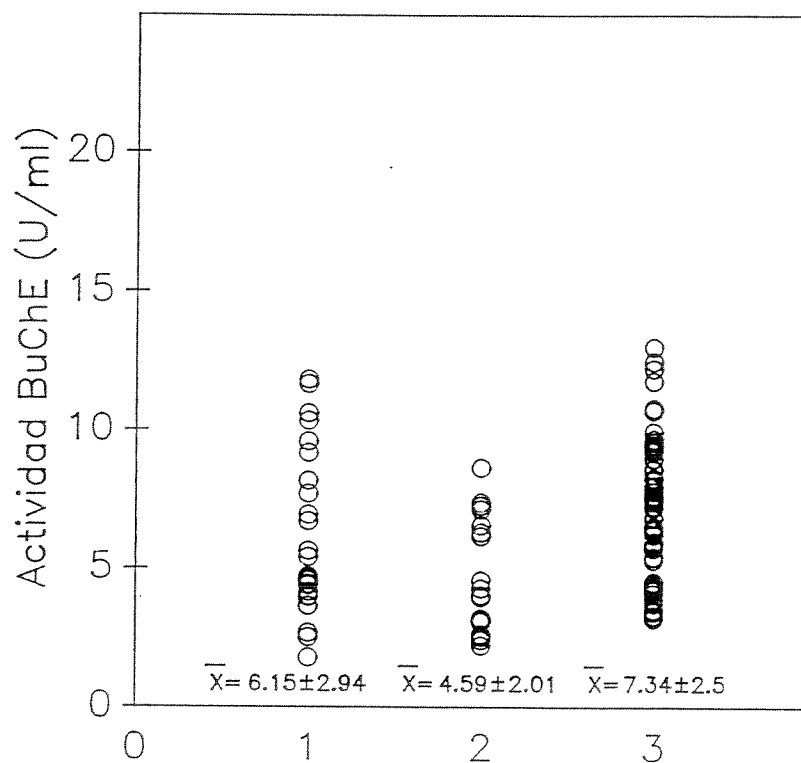


Fig. II-2. Actividad BuChE en líquido cefalorraquídeo de individuos normales con edades menores de 1 año (1), entre 1-8 años (2) y de 8 a 60 años (3). Los valores de actividad se refieren a nmoles de butiriltiocolina hidrolizada por min y ml de LCR, en determinaciones realizadas en presencia de 1 mM butiriltiocolina y 10  $\mu$ M BW 284c51.

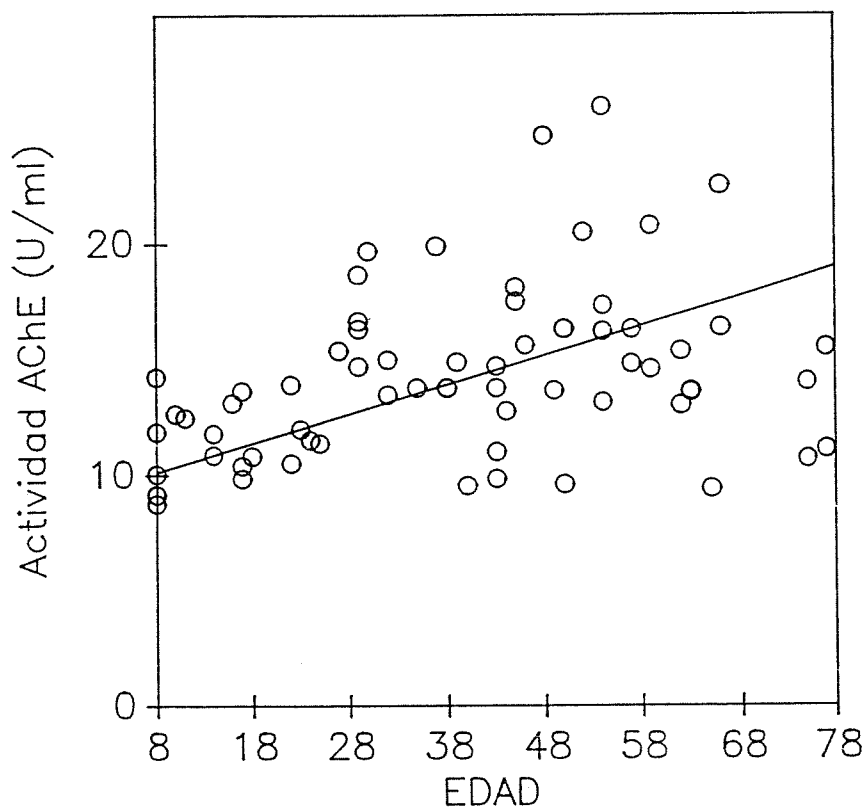


Fig. II-3. Cambios de actividad AChE con la edad en líquido cefalorraquídeo. Se midió la actividad AChE de 64 muestras de líquido cefalorraquídeo de sujetos normales (rango de edad, 8 a 78 años). La actividad enzimática se expresa en nmol de acetiltiocolina hidrolizada/min/ml. La recta que se ajusta mejor a los datos experimentales es  $y = 0.127x + 9.1$  ( $r = 0.68$ ).

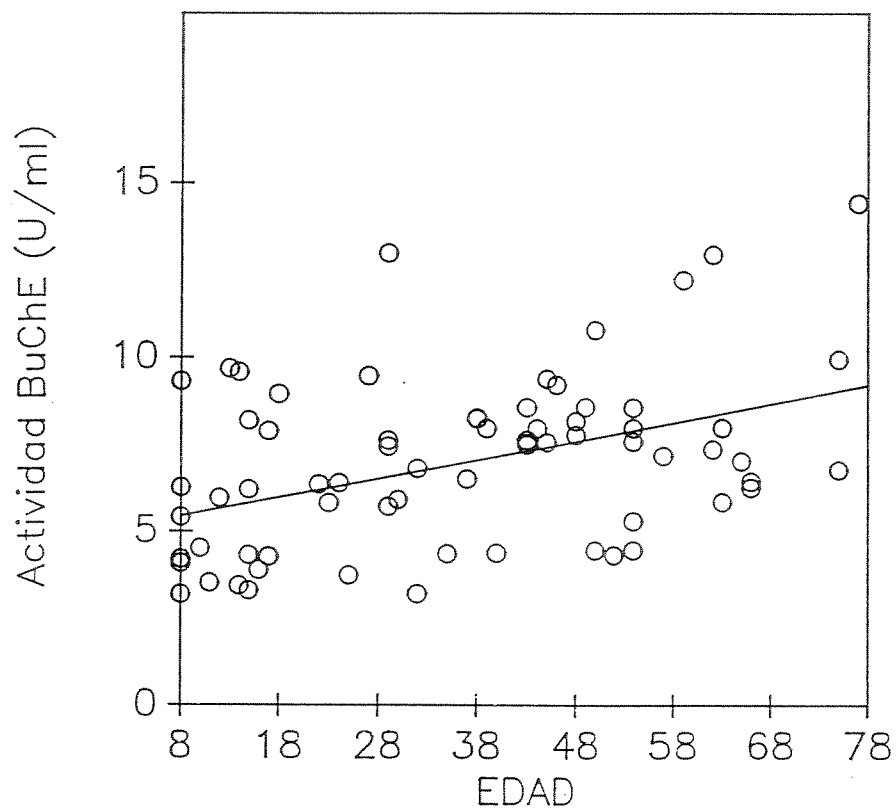


Fig. II-4. Actividad BuChE en líquido cefalorraquídeo en función de la edad. Se midió la actividad BuChE de líquido cefalorraquídeo de 64 sujetos normales (rango de edad, 8 a 78 años). La actividad enzimática se expresa en nmol de butiriltiocolina hidrolizada/min/ml de LCR. La ecuación que mejor se ajusta a los datos experimentales es  $y = 0.054x + 5.01$  ( $r = 0.505$ ).

ecuación que más se ajusta a los datos experimentales es  $y = 0.054 x + 5.01$  ( $r=0.50$ ).

Otros investigadores también han puesto de manifiesto el aumento de la actividad AChE en el LCR con la edad. Así, Tune y col (1985) encuentran que la actividad AChE progresa con la edad según la ecuación  $y = 0.192 x + 3.65$ , cuando se analiza el líquido de sujetos entre 20 y 85 años. Por otra parte, Manyam y col (1990) al estudiar sujetos entre 25 y 85 años obtuvieron una recta que se ajusta a la ecuación  $y = 0.097 x + 10.57$ . La ecuación deducida por nosotros,  $y = 0.127 x + 9.1$ , es muy parecida a la que se ajusta a los datos experimentales aportados por los otros investigadores. En todos los casos,  $x$  representa la edad del sujeto,  $e$  y la actividad AChE expresada en nmoles de sustrato hidrolizado por minuto y ml de líquido cefalorraquídeo. Los datos suministrados por Manyam han sido transformados en las unidades de actividad que se han mencionado antes para permitir su comparación con las otras expresiones.

Los datos de la Tabla II-1 reflejan los valores de actividad AChE si se aplican las tres ecuaciones a sujetos de 30 y 60 años. Se observa que la ecuación de Tune, y los datos experimentales aportados por éste, coinciden con los obtenidos por Manyam y por nosotros, si los individuos tienen alrededor de 60 años o superiores, pero en sujetos jóvenes, los valores suministrados por Tune son significativamente inferiores a los proporcionados por Manyam y por nosotros. Por tanto, la afirmación de Tune del aumento de más del doble de la actividad AChE en el LCR de sujetos de 84 años, en comparación

Tabla II-1. Ecuaciones que expresan el cambio de actividad AChE con la edad.

Expresión	Actividad AChE (U/ml)		Referencia
	30 años	60 años	
$y = 0.192 x + 3.65$	9.41	15.17	Tune y col, 1985
$y = 0.097 x + 10.57$	13.48	16.39	Manyam y col. 1990
$y = 0.127 x + 9.1$	12.91	16.72	Este trabajo

En las ecuaciones  $x$  representa la edad del sujeto e  $y$  el valor de actividad AChE expresada en nmoles de acetiltiocolina hidrolizada por min y por ml (U/ml).



con la de los de 20 años, parece exagerada. En todo caso, queda patente, a través de esta serie de experimentos, un aumento del contenido de AChE en el LCR a medida que el individuo envejece. Ello va a ser importante cuando se consideren los datos de actividad AChE en casos de demencia senil y enfermedad de Alzheimer.

Los datos de actividad BuChE de los diferentes individuos sugieren que el contenido de la enzima en el líquido cefalorraquídeo va aumentando también a lo largo de la edad. Sin embargo, dado que la ecuación que gobierna la evolución de la actividad BuChE tiene menor pendiente que la correspondiente a la actividad AChE cabe pensar que la actividad BuChE se mantenga casi constante a lo largo de la edad del individuo, al menos en el intervalo considerado.

### **3.2. Interacción de la AChE del Líquido Cefalorraquídeo con Anticuerpos Monoclonales.**

Los anticuerpos AE1, AE3 y 4F19, producidos por inmunización de ratones con AChE purificada de eritrocito humano, reconocieron a la enzima del líquido cefalorraquídeo (Fig. II-5). Los datos de la Fig. II-5 se expresan de modo que la absorbancia de la muestra de LCR depositada en los pocillos, sin anticuerpo fijado, representa el 100% de la actividad. Los porcentajes de enzima ligada se calculan midiendo la absorbancia de los pocillos con enzima y anticuerpo, refiriendo dicha absorbancia al total de la actividad depositada en los pocillos. Las gráficas de la Fig.

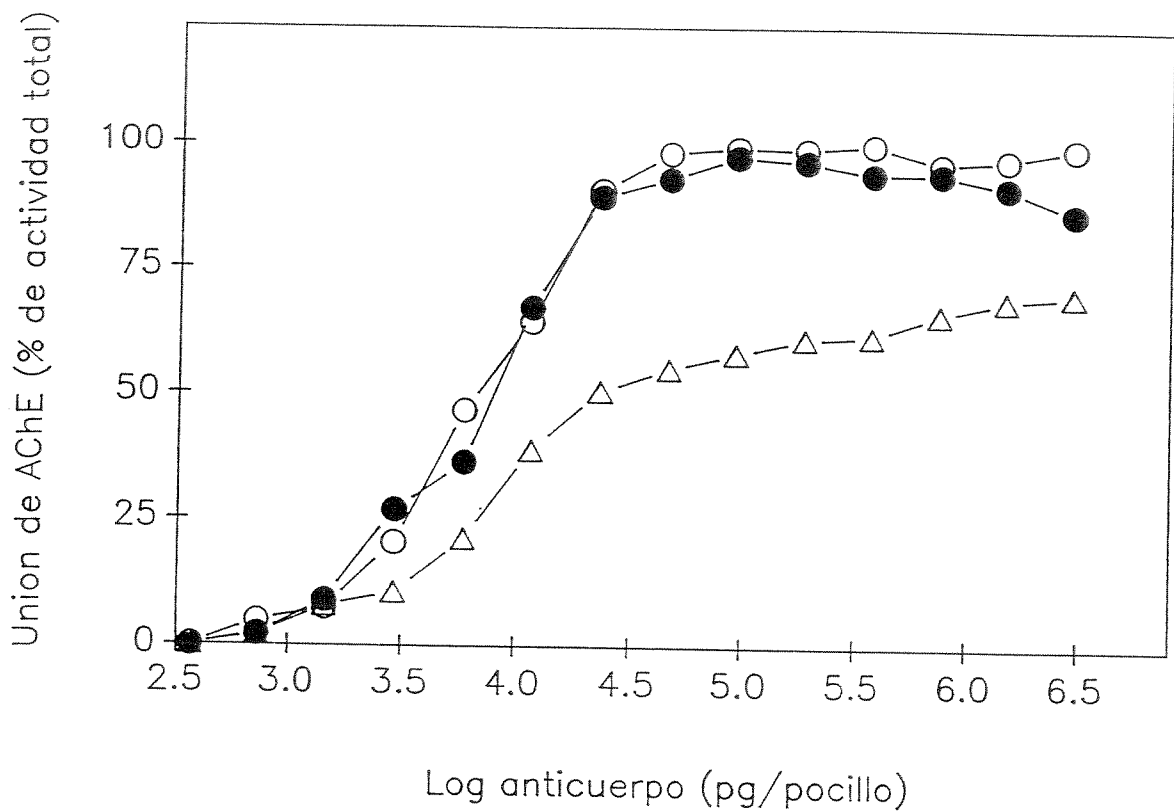


Fig II-5. Interacción de AChE de LCR con anticuerpos monoclonales. Se fijaron cantidades crecientes de anticuerpos AE1 (o), AE3 (●) y 4F19 (Δ) a los pocillos de poliestireno activados. A continuación se adicionó a los pocillos, para la inmunoabsorción, 50  $\mu$ l de LCR con una actividad AChE de 0.8 U/ml aproximadamente. Después se añadió un volumen de la mezcla del ensayo de Ellman, que contenía DTNB y acetiltiocolina. El valor de la absorbancia debido a la actividad AChE de la muestra de LCR se tomó como el 100%, y la cantidad de enzima unida al anticuerpo se refiere a este valor.

II-5 muestran que la AChE contenida en 50  $\mu$ l (0.8 U/ml) se fija completamente a los pocillos cuando se añaden a éstos 50-100 ng de AE1 o AE3. Para fijar completamente a la enzima se requiere una cantidad mayor de 4F19 (Fig. II-5). Los experimentos control realizados con enzima soluble de eritrocito humano, obtenida por extracción de las membranas con Triton X-100, mostraron que para fijar una cantidad similar de actividad AChE de eritrocito y LCR se necesitaba añadir a los pocillos la misma cantidad de AE1, AE3 o 4F19. La adición de Iso-OMPA al inmunoensayo no modificó el cambio de absorbancia de las medidas y ello quiere decir que el Iso-OMPA, inhibidor de la BuChE, no afecta a las determinaciones de la actividad AChE en el líquido cefalorraquídeo.

Los datos de los inmunoensayos practicados con AE2 son de difícil interpretación, dado que este anticuerpo inhibe, lógicamente de manera reversible, a la AChE de diversas fuentes (Sorensen y col, 1987; Wolfe, 1989). Con todo, las medidas de la actividad AChE no retenida sobre los pocillos que contenían cantidades crecientes de AE2, indican que la AChE del LCR interacciona de forma efectiva con dicho anticuerpo.

La inmunorreacción de la AChE del LCR con AE1, AE3 y 4F19 fué la misma tanto si los líquidos procedían de sujetos normales, niños o adultos, o de individuos aquejados de meningitis o hidrocefalia. La Tabla II-2 muestra los datos de cambio de absorbancia/min en los pocillos cubiertos con 60 ng de AE3 y 25  $\mu$ l de LCR de sujetos normales o con meningitis, comparando las lecturas con las que se obtienen al aplicar el

Tabla II-2. Inmunoensayo de AChE en LCR de sujetos normales (LCR-N) y con meningitis (LCR-M). Medidas practicadas sin anticuerpos (-AE3), esto es por el método convencional con acetiltiocolina e Iso-OMPA, y con 60 ng de AE3 en los pocillos (+AE3).

	Número muestra	$\Delta A \times 1000/\text{min}$		% Asociación de la AChE al anticuerpo	
		-AE3	+AE3		
LCR-N	187	9.30	9.36	100.0	$\bar{X} = 95.30$ $\sigma = 6.21$
	261	9.07	9.58	100.0	
	266	4.83	3.87	80.1	
	307	10.30	10.80	100.0	
	417	4.24	4.00	94.3	
	438	8.08	7.87	97.4	
	465	5.78	5.41	93.6	
	486	4.65	4.51	97.0	
LCR-M	188	15.49	17.80	100.0	$\bar{X} = 91.16$ $\sigma = 7.02$
	205	23.11	21.92	94.8	
	368	24.42	21.50	88.0	
	455	22.34	22.42	100.0	
	461	9.73	7.77	79.8	
	467	9.65	8.23	85.2	
	490	13.15	11.88	90.3	

método convencional en microplacas con acetiltiocolina e Iso-OMPA. Los resultados indican que entre el 90-95% de la enzima medida por el método colorimétrico se fija al anticuerpo. Dado que el anticuerpo fija completamente a su antígeno, la enzima del eritrocito, de todo ello se desprende que las medidas de actividad AChE con inhibidor selectivo de la BuChE, Iso-OMPA, son correctas. Lo mismo se puede decir de las determinaciones de actividad BuChE con butiriltiocolina y BW 284c51, un inhibidor específico de la AChE. Todo ello permite asegurar que las determinaciones de actividad AChE y BuChE que se presentan en este Capítulo han sido efectuadas adecuadamente.

### 3.3. Actividades AChE y BuChE en el Líquido Cefalorraquídeo de Pacientes con Meningitis e Hidrocefalia.

Se valoraron las actividades AChE y BuChE en el LCR lumbar de 75 enfermos con meningitis bacteriana y de 68 con hidrocefalia congénita y los datos se compararon con los procedentes de sujetos normales. Los pacientes tenían edades comprendidas entre meses y 60 años, aunque, no fué posible recoger muestras de líquidos lumbares de sujetos con hidrocefalia de edad superior a los 10 años. Las muestras se distribuyeron en tres grupos, las que pertenecían a sujetos menores de 1 año, las procedentes de enfermos entre 1 y 8 años y las de pacientes entre 8 y 60 años.

En la Fig. II-6 se comparan los datos de actividad AChE y BuChE de los líquidos lumbares de sujetos normales,

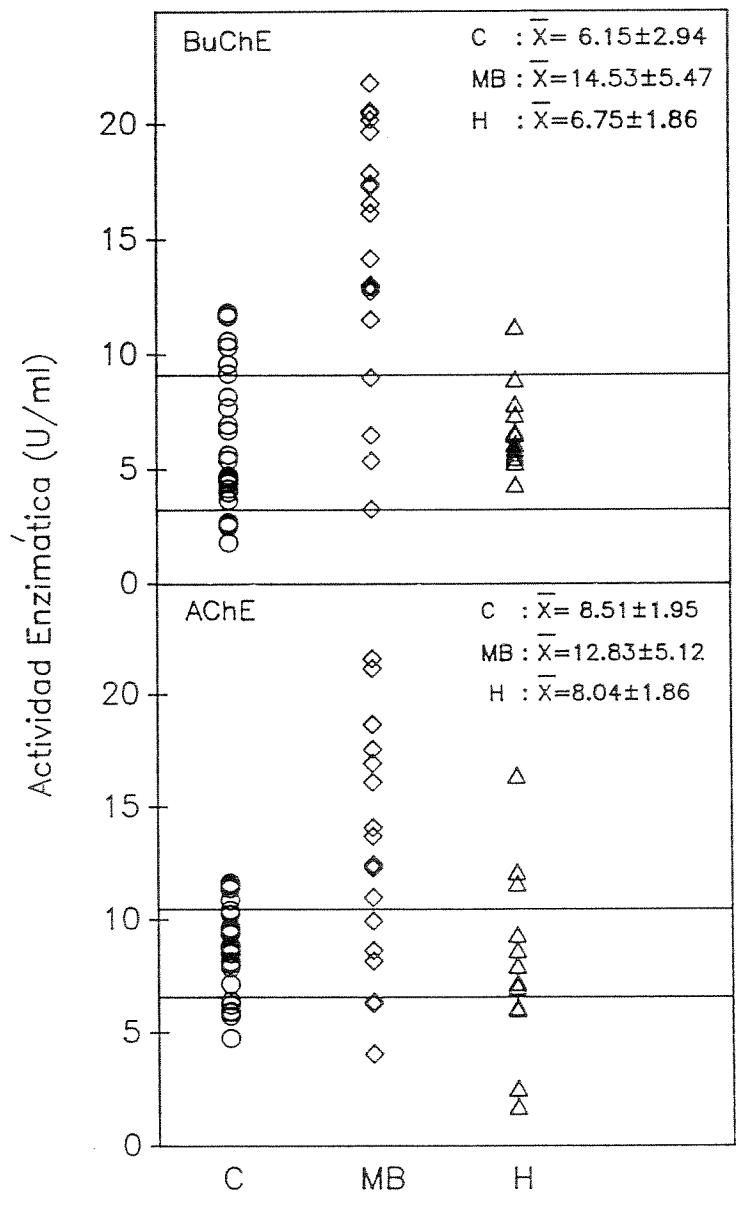


Tabla II-3. Actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa y contenido proteico del líquido cefalorraquídeo lumbar de sujetos con meningitis bacteriana (MB), hidrocefalia (H) y controles (C).

Grupo		AChE	BuChE	Proteína	
Individuos		(U/ml)	(U/ml)	(mg/ml)	(n)
MB	1	12.83 ± 5.12*	14.53 ± 5.47*	1.17 ± 0.73*	(19)
	2	11.08 ± 3.63	8.12 ± 3.53	0.73 ± 0.29*	(30)
	3	13.35 ± 3.80	8.64 ± 4.17	1.33 ± 0.71	(26)
H	1	8.04 ± 1.86	6.75 ± 1.86	0.46 ± 0.14	(12)
	2	8.57 ± 3.98	5.96 ± 2.59	0.36 ± 0.05	(9)
	3	—	—	—	—
C	1	8.51 ± 1.95	6.15 ± 2.94	0.49 ± 0.08	(28)
	2	7.93 ± 2.53	4.59 ± 2.01	0.25 ± 0.10	(23)
	3	14.51 ± 3.13	7.34 ± 2.50	0.37 ± 0.07	(68)

Los grupos 1, 2 y 3 se refieren a los líquidos procedentes de sujetos con edad menor de 1 año, entre 1 y 8 años y entre 8 y 60 años, respectivamente. Los datos de AChE y BuChE se expresan en nmoles de sustrato transformado, acetiltiocolina o butiriltiocolina, por min y ml de líquido. Entre paréntesis (n) se indica el número de muestras analizadas en cada caso y el asterisco marca los valores con  $p < 0.001$ . Los datos muestran las medias y desviaciones estándares de los líquidos analizados, tomando para cada muestra el valor promedio de tres determinaciones diferentes.

meningíticos e hidrocefálicos incluidos en el primer grupo. Se comprueba que el promedio de las actividades AChE y BuChE de los líquidos de sujetos meningíticos son notablemente superiores al obtenido de líquidos procedentes de sujetos normales. En cambio, los sujetos hidrocefálicos muestran valores promedio de actividades AChE y BuChE próximas a las de los sujetos normales. El contenido de proteínas del LCR de los sujetos con meningitis era significativamente mayor que en los individuos normales (Tabla II-3).

En la Fig. II-7 se presentan los datos procedentes de los sujetos pertenecientes al segundo grupo. De nuevo, en los individuos aquejados con meningitis hay aumento de los valores medios de actividad AChE y BuChE y del contenido de proteína en el líquido lumbar (Tabla II-3) en comparación con los controles. Los líquidos de individuos con hidrocefalia muestran actividades enzimáticas y niveles de proteínas semejantes a los de los líquidos de individuos normales.

Finalmente, cuando se comparan los datos de los sujetos pertenecientes al tercer grupo, se concluye que los valores de actividad AChE y BuChE de los pacientes con meningitis no son diferentes de los obtenidos de sujetos normales (Fig. II-8), aún cuando el contenido proteico del líquido de los pacientes con meningitis es notablemente superior al que se obtiene en los sujetos controles de la misma edad (Tabla II-3).

La disponibilidad de muestras de líquidos ventriculares de sujetos con hidrocefalia aquejados de ventriculitis nos permitió estudiar en qué medida se afectaba la actividad AChE y BuChE por la infección. Para este estudio distribuimos las



muestras en dos grupos, las de sujetos menores y las de los mayores de un año. La comparación de los datos de los sujetos hidrocefálicos y de los aquejados de ventriculitis, de cualquier grupo de edad, supuso la comprobación del extraordinario aumento de las actividades AChE y BuChE en los pacientes con ventriculitis (Figs. II-9 y II-10). Dicho aumento fué particularmente patente para el caso de la BuChE, y corrió paralelo al del contenido promedio de proteína en el líquido ventricular de estos pacientes (Tabla II-4).

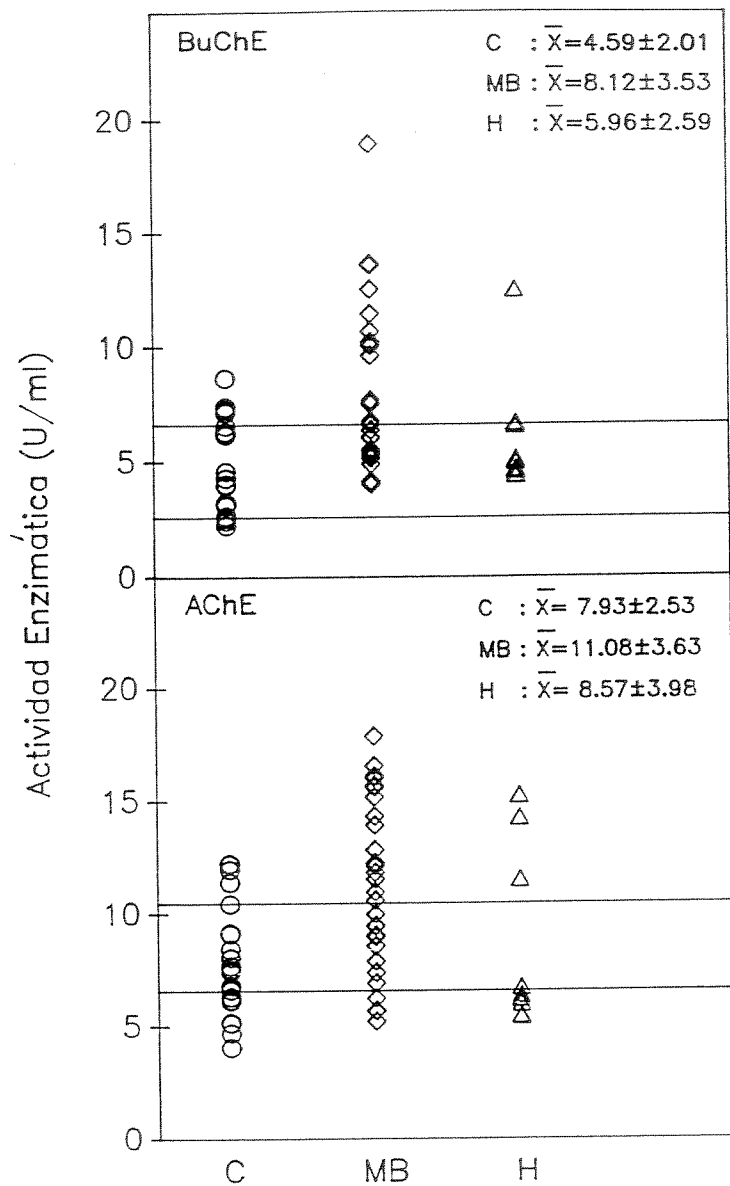


Fig. II-7. Actividades AChE y BuChE en líquido cefalorraquídeo de niños entre 1 y 8 años. Se midió la actividad AChE y BuChE y proteínas a muestras de LCR lumbares de niños, de 1 a 8 años, sanos y enfermos. La concentración media de proteína en LCR de sujetos con MB, H y controles fué de  $0.73 \pm 0.29$ ,  $0.36 \pm 0.05$  y  $0.25 \pm 0.10$  mg/ml, respectivamente. Se midieron 30 muestras de MB, 9 de H y 23 de C. Las líneas marcan la media  $\pm$  la desviación estándar de los datos control. Las abreviaturas como en la Fig. II-2.

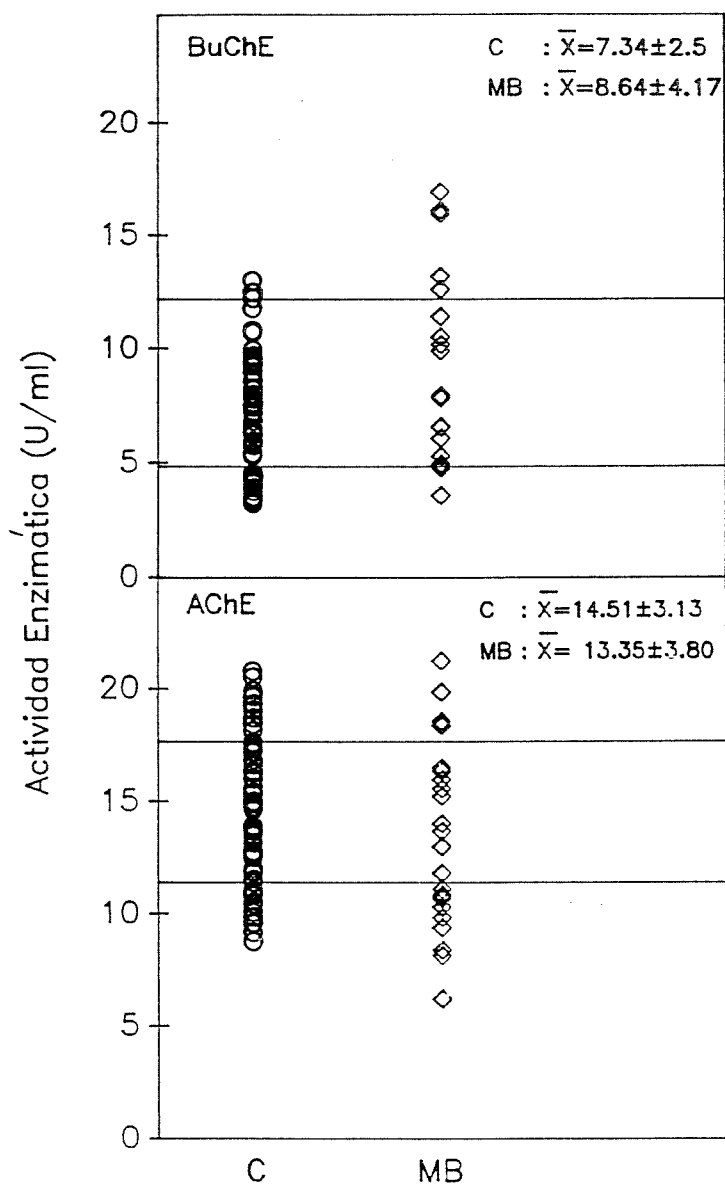


Fig. II-8. Actividad AChE y BuChE de LCR lumbar de adultos. Se midieron 68 muestras de sujetos normales de edades entre 8 y 60 años y 26 de enfermos con MB de igual grupo de edad. No pudimos comparar los datos con los procedentes de adultos con hidrocefalia congénita por no disponer de un número suficiente de muestras. El contenido de proteínas de las muestras de MB y C fueron de  $1.33 \pm 0.71$  y  $0.37 \pm 0.07$  mg/ml, respectivamente. Las abreviaturas como en la Fig. II-2.

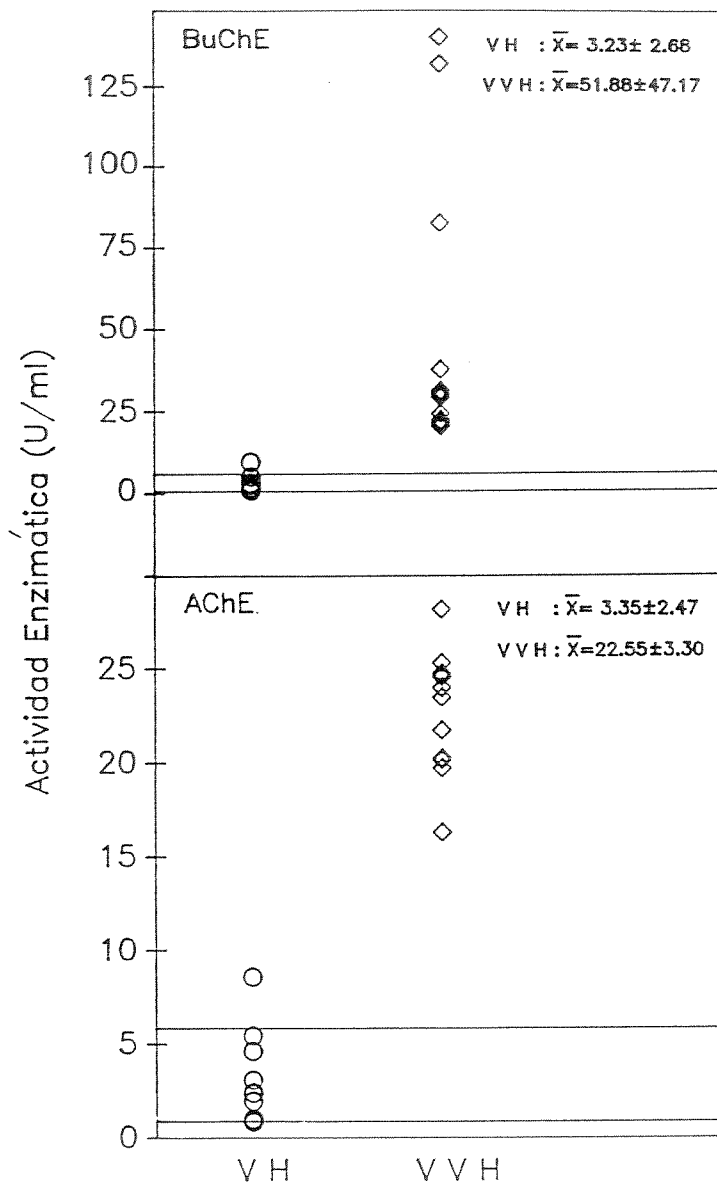


Fig. II-9. Actividad AChE y BuChE en LCR ventricular de niños menores de 1 año con hidrocefalia y ventriculitis. Se recogieron 9 líquidos ventriculares de niños menores de un año con hidrocefalia (VH) y 11 con ventriculitis (VVH). Se determinaron actividades AChE y BuChE y contenido de proteínas. La concentración de proteínas en las muestras VH y VVH fué  $0.27 \pm 0.15$  y  $4.90 \pm 3.37$  mg/ml, respectivamente. Abreviaturas como en la Fig. II-2.

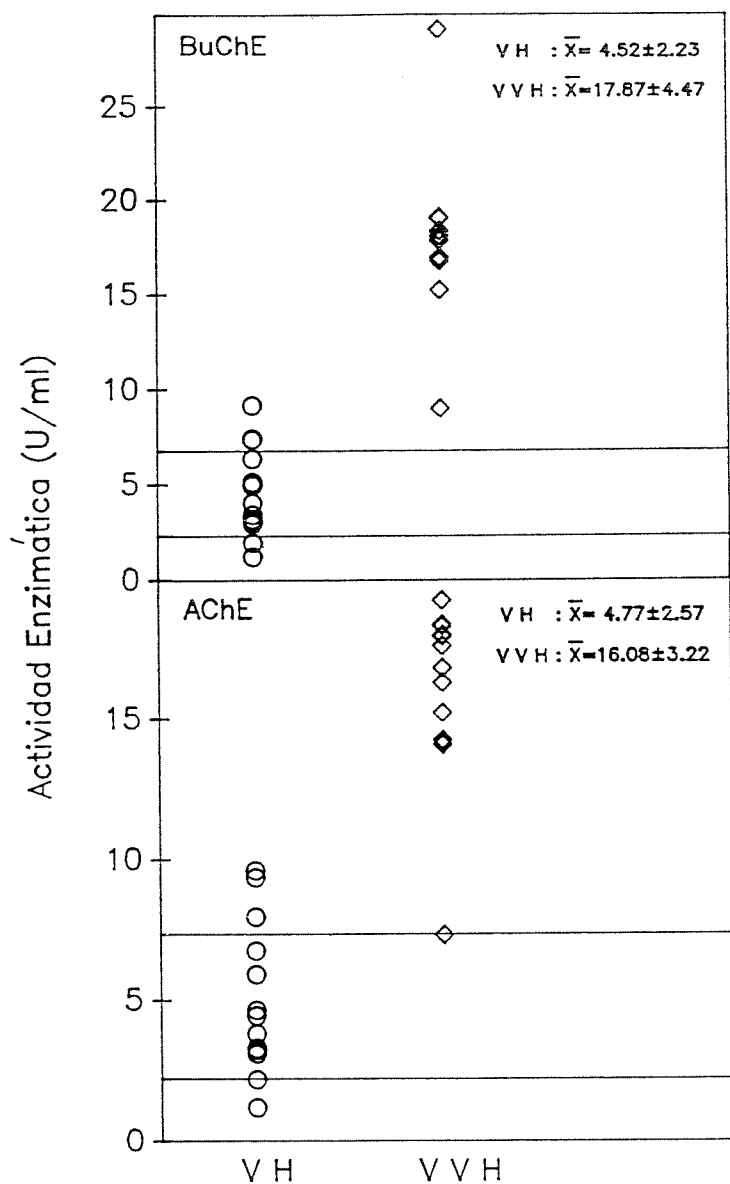


Fig. II-10. Actividades colinesterasas en adultos con hidrocefalia. Se valoraron las actividades AChE y BuChE y el contenido proteico de LCR ventricular de 15 pacientes adultos con hidrocefalia (VH) y 12 con ventriculitis (VVH). Los niveles de proteínas fueron de  $0.28 \pm 0.16$  y  $2.94 \pm 2.11$  mg/ml en las muestras VH y VVH respectivamente.

Tabla II-4. Actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa y contenido proteico del liquido cefalorraquideo ventricular de sujetos con hidrocefalia (VH) y de los aquejados de ventriculitis (VVH). Las muestras proceden de sujetos menores (grupo 1) y mayores de un año (grupo 2).

Grupo	VVH				VH			
	AChE (U/ml)	BuChE (U/ml)	Proteína (mg/ml)	(n)	AChE (U/ml)	BuChE (U/ml)	Proteína (mg/ml)	(n)
1	22.55±3.30	51.88±47.17	4.90±3.37	(11)	3.35±2.47	3.23±2.68	0.27±0.15	(9)
2	16.08±3.22	17.87± 4.47	2.94±2.11	(12)	4.77±2.57	4.52±2.23	0.28±0.16	(15)

#### 4. DISCUSION.

Las actividades AChE y BuChE, así como el contenido de proteína, del líquido cefalorraquídeo de los niños con meningitis son superiores a las de las muestras de individuos control. En adultos, sin embargo, el rango en que oscilan los actividades enzimáticas no es muy diferente del que se obtiene del análisis de las muestras de sujetos sanos. El contenido de proteína del líquido de los adultos con meningitis es superior al de los individuos normales. Ello sugiere que todos los sujetos con meningitis muestran mayor actividad AChE, BuChE y proteína que los individuos normales, con independencia de la edad del sujeto. Sin embargo, como las actividades AChE y BuChE aumentan con la edad del individuo (Figs. II-3, II-4) llega un momento en que las oscilaciones de los datos de los sujetos adultos normales y meningíticos, quedan solapados. En cambio, en los líquidos lumbares de los pacientes hidrocefálicos no hay aumento claro de la actividad AChE, BuChE o de la concentración de proteína.

Las determinaciones de la actividad AChE del LCR por inmunoensayo con AE1 y AE3 revelan que la proteína es reconocida por estos anticuerpos generados contra la enzima del eritrocito humano. La serie de anticuerpos AE1-AE5 fué obtenida por el grupo de Fambrough (1982), todos ellos utilizando la AChE eritrocitaria como antígeno. Posteriormente se han coseguido anticuerpos monoclonales contra la enzima de órgano eléctrico de *Torpedo* (Doctor y col, 1983), cerebro de conejo (Mintz y Brimijoin, 1985), cerebro de rata (Rakonczay y

Brimijoin, 1986), cerebro de pollo (Rotundo, 1984 a y b).

Se ha comprobado que ninguno de los anticuerpos monoclonales obtenidos contra AChE de ave reacciona con la enzima de mamífero, o del órgano eléctrico de *Torpedo*. Por otra parte, los anticuerpos obtenidos contra la AChE de eritrocito humano (Fambrough y col, 1982; Brimijoin y col, 1983a), de cerebro de conejo (Mintz y Brimijoin, 1985) o de cerebro de rata (Rakonczay y Brimijoin, 1986) tampoco reconocieron a la enzima de ave. Todo ello supone que la enzima de ave y de mamífero difieren en la secuencia y/o estructura.

Los anticuerpos de la serie AE1-AE5 se ligaron en mayor o menor medida con la enzima de la unión neuromuscular de mono, conejo y humanos, mostrando la existencia de epítomos comunes en la enzima de eritrocito, músculo y, posteriormente, cerebro (Rasmussen, 1987).

Nuestros datos indican que la enzima de cerebro humano y del líquido cefalorraquídeo contiene epítomos donde se ligan AE1 y AE3, pero ello no quiere decir que la enzima de las dos fuentes sean idénticas porque podrían diferir en alguna otra característica (glicosilación, carácter hidrofílico o hidrofóbico, o distribución de formas moleculares).

Es importante señalar que el plasma de los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica contiene anticuerpos capaces de reaccionar con la AChE de los eritrocitos e inducir hemólisis al inyectarlos en sujetos normales (Sindhuphak y col, 1988).

Volviendo a los resultados de los análisis del contenido de actividad AChE y BuChE en el LCR de sujetos con



ventriculitis y meningitis hemos comprobado que en ambas situaciones se produce un aumento de la concentración de proteína en relación con los valores obtenidos en sujetos normales. Ello indica que, como consecuencia de la infección se produce una modificación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, se favorece el tránsito de material desde el encéfalo al líquido cefalorraquídeo o de la sangre al líquido cefalorraquídeo. Este cambio de permeabilidad puede conducir a un aumento de transferencia de proteínas desde el plasma al medio ventricular.

No es conocido el origen de la BuChE del LCR, pero hay quien sugiere que procede del plasma y de las células gliales (Giacobini y col, 1986; Rao y col, 1990). El aumento simultáneo de la actividad BuChE y de la proteína en el LCR de pacientes que han sufrido una trombosis aguda supone que la lesión cerebral favorece la permeabilidad y el tránsito de proteínas desde el plasma al líquido cefalorraquídeo. Este flujo de proteínas plasmáticas puede ser responsable también del aumento de la actividad BuChE y de la concentración de proteína de los pacientes con meningitis y ventriculitis.

Se desconoce cual es la fuente de la AChE del LCR. Se ha demostrado que el tejido nervioso es capaz de secretar AChE tras someterlo a diferentes estímulos (Chubb y col, 1976; Greenfield y Smith, 1979). El aumento de la actividad AChE en el LCR de los sujetos con meningitis o ventriculitis podría indicar que los mecanismos de secreción de la enzima desde el tejido neural se afectarían por la infección. Podría ocurrir que el aumento de la actividad AChE fuera un efecto secundario

de la infección, pero es posible que la liberación de AChE en esta situación no sea accidental, sino que constituya una forma de paliar los efectos indeseables de la invasión viral o bacteriana sobre el sistema nervioso. La AChE parece desempeñar papeles diferentes del de la hidrólisis de la acetilcolina. Ello se observa al aplicar AChE a neuronas de la sustancia negra donde la enzima induce hiperpolarizaciones. Estos efectos se producen tanto con la AChE activa, como inhibida por Soman, y las acciones son mediadas por la AChE, por la proteína enzimática y no por el transmisor acetilcolina, ni por la BuChE (Greenfield y col, 1989).

Parece que la secreción de AChE, por las dendritas de las células del nigrostriatum no representa solamente un proceso de liberación de un producto soluble, sino que tal liberación responde a un propósito concreto. Es probable que la enzima sirva para reforzar la respuesta de la célula a la información recibida, que a su vez fortalece e incrementa la disponibilidad de dopamina en el estriato (Greenfield, 1991). Seguramente, la AChE liberada de la mencionada región cerebral pase a formar parte del LCR, pero también la liberada en el hipotálamo, cerebelo y locus coeruleus. Los niveles de AChE secretados desde el cerebro al líquido cefalorraquídeo se reducen casi por completo tras la lesión electrolítica de la sustancia negra (Greenfield y Smith, 1979).

Los próximos años serán decisivos para aclarar las funciones no colinérgicas de la AChE, las razones de la liberación de la AChE al líquido ventricular y las posibles acciones de la enzima soluble en ese medio.

CAPITULO III

FORMAS MOLECULARES DE ACETILCOLINESTERASA  
Y BUTIRILCOLINESTERASA EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO,  
PLASMA Y CEREBRO HUMANO.

## 1. INTRODUCCION.

Dado que tanto la AChE como la BuChE forman parte del LCR, surge el problema del origen de estas enzimas en dicho fluido. Hay quien piensa que la BuChE procede como tal del plasma (Rao y col, 1989). Estos autores se basan en la movilidad electroforética de ambas enzimas, y en la capacidad que poseen los anticuerpos generados contra la BuChE plasmática, para inmunoprecipitar a la enzima del líquido lumbar. Sin embargo, dado que los anticuerpos generados son policlonales es posible que diferentes anticuerpos inmunoprecipiten a la enzima de las dos fuentes. Incluso, el hecho de un epítipo común no garantiza en modo alguno que las dos formas de BuChE, en plasma y en LCR sean idénticas.

Sobre el origen de la AChE recaen muchas dudas. El contenido de esta enzima en el plasma humano es muy bajo, alrededor del 1-2%, o incluso menor dependiendo de los individuos (Mäder y col, 1990). En el LCR, en cambio, la actividad AChE es superior a la BuChE, en términos generales. Es difícil imaginar que la AChE de LCR proceda del plasma, transportándose selectivamente para que no penetre de modo simultáneo la BuChE, mucho más abundante que la AChE, en el espacio ventricular.

El tejido cerebral de mamífero contiene elevadas proporciones de AChE pero la mayor parte de la enzima está ligada a estructuras celulares y es, por consiguiente, muy hidrofóbica (Vidal y col, 1981a y b; Chai y col, 1981; Fuentes

y col, 1988; Inestrosa y Perelman, 1989). La enzima del LCR es, sin embargo, eminentemente hidrofílica y soluble en el líquido lumbar.

En este capítulo se procedió a la separación de los componentes moleculares de la AChE y BuChE del líquido lumbar de sujetos normales, haciendo uso de la centrifugación en gradientes continuos de densidad de sacarosa. También se analizaron muestras de sujetos, afectados con meningitis, hidrocefalia o ventriculitis, para examinar si en estas patologías se modificaba el modelo de sedimentación de formas.

Se investigaron también las formas moleculares de AChE y BuChE en el plasma y en el cerebro humano de sujetos normales.

En el capítulo posterior, las formas moleculares aisladas se incuban con lectinas de distinta naturaleza. Mediante el análisis de la interacción de la AChE y BuChE del LCR, plasma y cerebro, con lectinas se intentará una aproximación al origen de las enzimas del líquido lumbar.

## 2. MATERIALES Y METODOS.

### 2.1. Extracción de Acetilcolinesterasa y Buririlcolinesterasa de Cerebro Humano.

Las muestras se tomaron de autopsias de sujetos que habían fallecido por accidente con politraumatismo o por infarto cardiovascular y siempre antes de las 24 horas del fallecimiento. Se separaron fragmentos de córtex temporal o frontal de unos 30-40 g, e inmediatamente se introdujeron en nitrógeno líquido hasta el momento de su homogeneización. Una vez descongeladas, las muestras se pesaron y homogeneizaron al 10% p/v en tampón Tris, 10 mM, pH 7.0 que contenía 1M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> y las antiproteasas: inhibidor de tripsina, 0.1 mg/ml; 1mM EGTA; benzamidina, 2 mM; bacitracina, 1 mg/ml; pepstatina, 10 µg/ml; leupeptina, 20 µg/ml; aprotinina, 20 U/ml, añadiendo todos los reactivos al tampón inmediatamente antes de la homogeneización del tejido. Dicha homogeneización se realizó en un Potter manual de vidrio con el émbolo de teflón y en frío hasta conseguir una suspensión homogénea. Se retiró una alícuota para la medida de actividad y proteína en el homogenado de partida y el resto se centrifugó a 100.000 x g, durante 1 h, a 4°C, para separar las actividades AChE y BuChE solubles, esto es, no ligadas a las membranas. Las centrifugaciones se realizaron utilizando un rotor TFT 65.38 Kontron y centrífuga Centrikon T1055. Alternativamente, las muestras se homogeneizaron en el tampón anterior al que se

añadió Triton X-100 para que quedara a la concentración final de 1% p/v. Después de centrifugar como antes, se obtuvieron juntas tanto la fracción de enzima soluble de forma natural como la que estaba asociada a las membranas, por el efecto emulsionante del detergente Triton X-100. En todos los casos, después de separar la fracción soluble, el precipitado se resuspendió en el tampón de la primera homogeneización para valorar la actividad enzimática y la proteína que había quedado unida a las membranas tras los tratamiento anteriores.

Para separar las fracciones de la enzima soluble y ligada a las membranas se procedió como antes, homogeneizando el tejido en tampón sin Triton X-100 y, una vez separada la fracción soluble, resuspendiendo el precipitado en el tampón que contenía Triton X-100 al 1% p/v. Tras esta segunda homogeneización, se recogió la fracción de la enzima solubilizada con detergente por centrifugación a 100.000 x g.

## 2.2. Medida de Actividad AChE y BuChE.

La medida de las actividades enzimáticas se realizó haciendo uso del método de Ellman y col (1961) tal y como se describe en el Capítulo II, epígrafe 2.2.1. Así se midieron las muestras de LCR, plasma, homogeneizados de cerebro y fracciones solubles del mismo. En todos los casos, los análisis se practicaron a 37°C y en presencia de acetiltiocolina e Iso-OMPA si se deseaba valorar la AChE o con butiriltiocolina y BW 284c51 si interesaba medir la actividad BuChE.

Para la determinación de las actividades AChE y BuChE en las diferentes fracciones recogidas de los gradientes de densidad de sacarosa se utilizó el procedimiento en microplaca que se describió en el Capítulo II, epígrafe 2.2.2.

La concentración de proteína de las muestras se determinó aplicando el método de biuret modificado que se explicó anteriormente.

### 2.3. Centrifugación en Gradiente de Densidad y Cálculo de los Coeficientes de Sedimentación de las Formas Moleculares Separadas.

#### 2.3.1. Preparación de los gradientes.

La determinación de los coeficientes de sedimentación se llevó a cabo aplicando el procedimiento de Martin y Ames (1961), por comparación de la distancia recorrida por la proteína, cuyo coeficiente de sedimentación se desea establecer cuando se somete a ultracentrifugación, con la de una proteína estándar de coeficiente de sedimentación conocido.

Las disoluciones de sacarosa empleadas en la confección de los gradientes se prepararon en tampón Tris 10 mM, NaCl 1M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 7.0 (tampón Tris-salino) con Triton X-100 (0.5% p/v), Brij 96 (0.5% p/v) o sin detergente. El gradiente continuo, 5-20% p/v, se preparó haciendo uso de un formador de gradiente Kika- Werk de Janke & Kunkel, poniendo en uno de los depósitos la disolución de sacarosa al 20% p/v y en el otro al



5% p/v. La salida del gradiente del depósito se reguló mediante una bomba peristáltica Gilson Minipuls 2 para que el flujo fuera de 0.78 ml/min. Los tubos de centrifuga eran de polialómero, de 12.5 ml de capacidad y, una vez preparados, los gradientes se enfriaron, manteniéndolos a 4<sup>0</sup>C, antes de depositar sobre ellos las muestras que se iban a analizar.

Como marcadores de coeficiente de sedimentación fueron utilizados  $\beta$ -galactosidasa de E. coli (16.0 S<sub>20,w</sub>) (G), catalasa de hígado bovino (11.4 S<sub>20,w</sub>) (C) y fosfatasa alcalina de intestino bovino (6.1 S<sub>20,w</sub>) (F).

Las enzimas marcadoras se añadieron a la muestra antes de poner ésta en el gradiente. Se depositaron 0.3-0.5 ml de muestras de LCR o extractos de cerebro sobre el gradiente, y los tubos se colgaron de un rotor SW 41Ti de Beckman y se centrifugaron en centrifuga Centrikon T1055 de Kontron durante 18 h a 150.000 x g, y a 4<sup>0</sup>C. Terminada la centrifugación, los tubos se perforaron con un sistema Fraction Recovery System de Beckman y se recogieron fracciones de unos 260  $\mu$ l, regulando el flujo de salida con una bomba peristáltica Gilson Minipuls 2. Se utilizó también un colector de fracciones Frac-100 de Pharmacia. Se obtenían entre 35 y 40 fracciones y en cada una de ellas se determinaron las actividades AChE, BuChE y las de las enzimas marcadoras. La comprobación de la continuidad del gradiente se realizó, ocasionalmente, midiendo el índice de refracción de cada una de las fracciones recogidas. Los resultados mostraron que había una relación lineal entre la densidad de sacarosa y el número de la fracción en la que ésta se medía.

### 2.3.2. Medida de actividades de los marcadores estándares.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se valoró por medida del incremento de absorbancia a 405 nm de una mezcla que contenía 1.5 ml de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, 2 mM, en Tris-acetato, 0.01 M, pH 7.5 y 20  $\mu$ l de muestra (Craven y col, 1965).

La actividad catalasa se determinó por medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm de una mezcla que contenía 3 ml de tampón fosfato 10 mM, pH 7.5, 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.9 M y 10  $\mu$ l de muestra (Chance y Herbert, 1950).

La actividad fosfatasa alcalina fué determinada siguiendo el incremento de absorbancia a 405 nm de una mezcla de reacción preparada con 1.5 ml de p-nitrofenilfosfato, 0.75 mM, en tampón dietanolamina, 0.1 M, pH 9.8 y 10-15  $\mu$ l de muestra (Garen y Levinthal, 1960).

### 2.3.3. Cálculo del coeficiente de sedimentación de las formas moleculares de las ChE.

Se determinó experimentalmente la relación (R) de movillidades entre la proteína de coeficiente de sedimentación desconocido (X) y la estándar, de coeficiente conocido (E)

$$R = \frac{dX}{dE}$$

Siendo dX la distancia recorrida desde el menisco por la

proteína X y dE la distancia recorrida desde el menisco por la proteína E.

Dado que las moléculas se mueven a una velocidad casi constante se puede establecer que:

$$R = \frac{S_{20,w}^{0.725} \text{ proteína X}}{S_{20,w}^{0.725} \text{ proteína E}}$$

donde  $S_{20,w}$  es la constante de sedimentación extrapolada al estado estándar del agua y suponiendo un volumen específico parcial de  $0.725 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  para la proteína. La mayoría de las proteínas presentan un volumen específico parcial de  $0.70-0.75 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

Para las moléculas que muestren el mismo volumen específico parcial se cumple que

$$R = \frac{S_{20,w} \text{ proteína X}}{S_{20,w} \text{ proteína E}} = \frac{N_t - N_x}{N_t - N_e}$$

de donde  $S_{20,w} \text{ proteína X} = \frac{N_t - N_x}{N_t - N_e} \cdot S_{20,w} \text{ proteína E}$

siendo  $N_t$  número total de fracciones recogidas del gradiente,  $N_x$  la fracción que contiene el máximo de la proteína desconocida y  $N_e$  la fracción en la que la actividad de la proteína estándar es máxima.

Por aplicación del procedimiento descrito se han analizado las formas moleculares de AChE y BuChE que hay en los líquidos cefalorraquídeos lumbares de sujetos normales, con meningitis y con hidrocefalia, así como en los líquidos

ventriculares de sujetos con hidrocefalia y con ventriculitis. La separación de las formas moleculares se ha hecho en gradientes desprovistos de detergentes, con Triton X-100 (0.5% p/v) y con Brij 96 (0.5% p/v).

También se han separado las formas moleculares de BuChE del plasma humano.

Las moléculas de AChE y BuChE en cerebro humano se han analizado en gradientes sin detergente o conteniendo Triton X-100 y Brij 96.

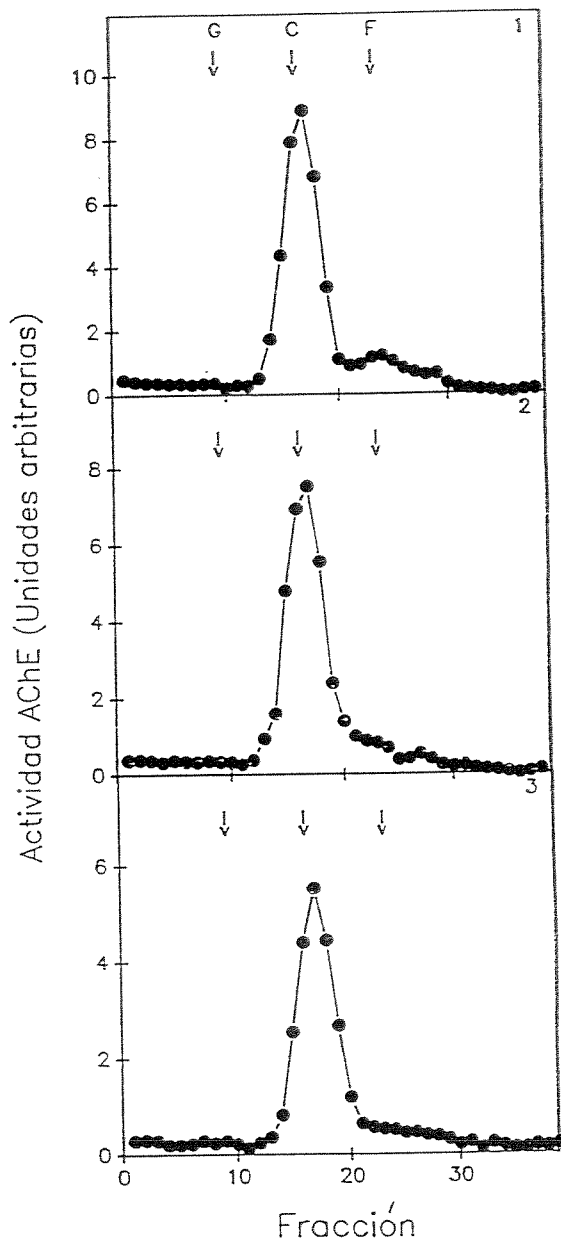
### 3.RESULTADOS.

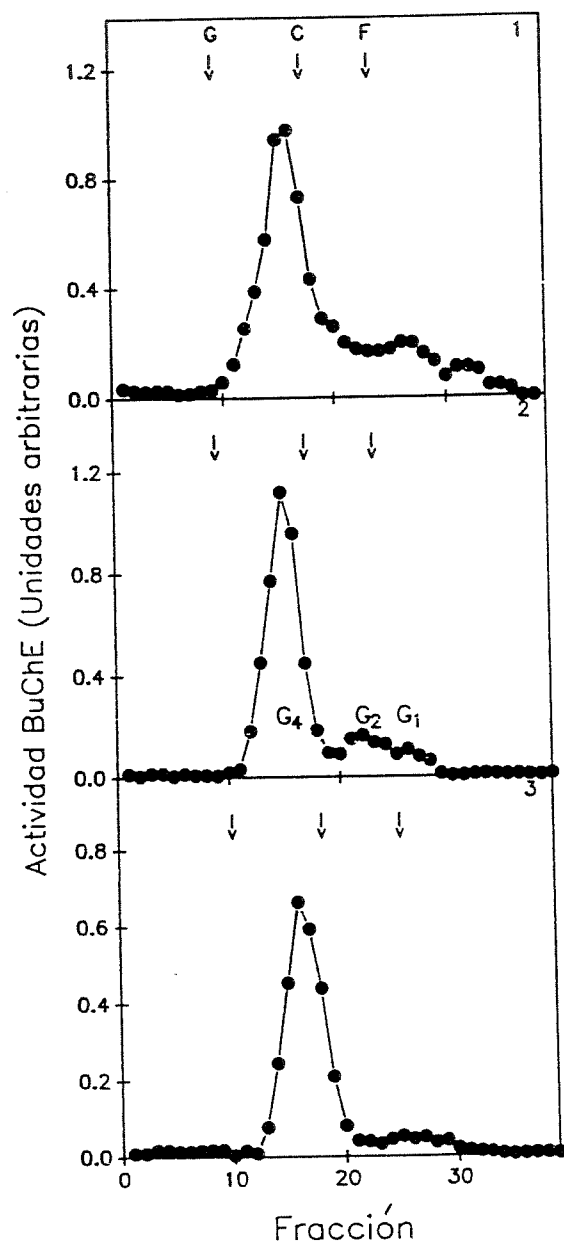
#### 3.1. Formas Moleculares de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa en el Líquido Cefalorraquídeo.

La distribución de las formas moleculares de AChE y BuChE en el líquido lumbar de sujetos normales se muestra en las Figs. III-1 y III-2.

La actividad total medida en el conjunto de las fracciones recogidas del gradiente fué siempre del 80-90% de la depositada en los tubos, tanto si se valoraba la actividad AChE como si se medía BuChE. Cuando se analizó la distribución de formas moleculares de AChE sólo aparecía claramente una forma con coeficiente de sedimentación de 10.5-11.0 S, representando ésta alrededor del 70-80% del total de la actividad recogida en las fracciones del gradiente. Ocasionalmente, aparecían formas minoritarias de alrededor de 6.5 S y 4.5 S, aunque la determinación exacta del coeficiente de sedimentación de estas formas es casi imposible, dada su mínima contribución al total de la actividad AChE (Fig. III-1). Seguramente la forma de 10.5-11 S corresponde a un tetrámero hidrofílico (G<sub>4</sub>) mientras que las formas mas ligeras deben ser formas G<sub>2</sub> y G<sub>1</sub>, dímeros y monómeros globulares, respectivamente.

Se encontró una situación parecida al valorar la actividad BuChE, sólo que ahora el coeficiente de sedimentación de la forma molecular más abundante era de 11.5-12.0 S (Fig. III-2). Esta forma representaba un 80-90%





del total de la actividad BuChE medida en las fracciones del gradiente. También en este caso, a veces aparecían formas ligeras, poco abundantes, con coeficientes de sedimentación de 6.5 y 5.0 S. La forma principal de BuChE en el LCR es también un tetramero globular hidrofílico (G4) que, como es sabido, presenta un coeficiente de sedimentación ligeramente superior al de su homóloga de AChE (Vigny y col, 1978).

No se apreciaron diferencias entre los perfiles de sedimentación de la AChE y BuChE del líquido cefalorraquídeo de sujetos normales con edades inferiores a un año, entre uno y ocho años y adultos. Incluso, los líquidos cefalorraquídeos de sujetos con edades superiores a los setenta años presentaban un modelo de formas moleculares de AChE y BuChE idéntico al que mostraban los líquidos de niños o jóvenes. En las Figs. III-1 a III-6 se presentan los análisis de sedimentación de las formas de AChE y BuChE de líquidos lumbares de sujetos normales y aquejados de distintas patologías.

El carácter típicamente hidrofílico de la AChE y BuChE del líquido cefalorraquídeo queda de manifiesto en la Fig. III-3. En ella se comprueba que cuando el líquido se centrifuga en gradientes que no contienen detergentes o que están preparados con Triton X-100 o Brij 96, la migración de las formas enzimáticas es la misma, con independencia de la naturaleza del medio. Ello supone que las moléculas enzimáticas, AChE y BuChE, son hidrofílicas e incapaces de interaccionar con tensioactivos.



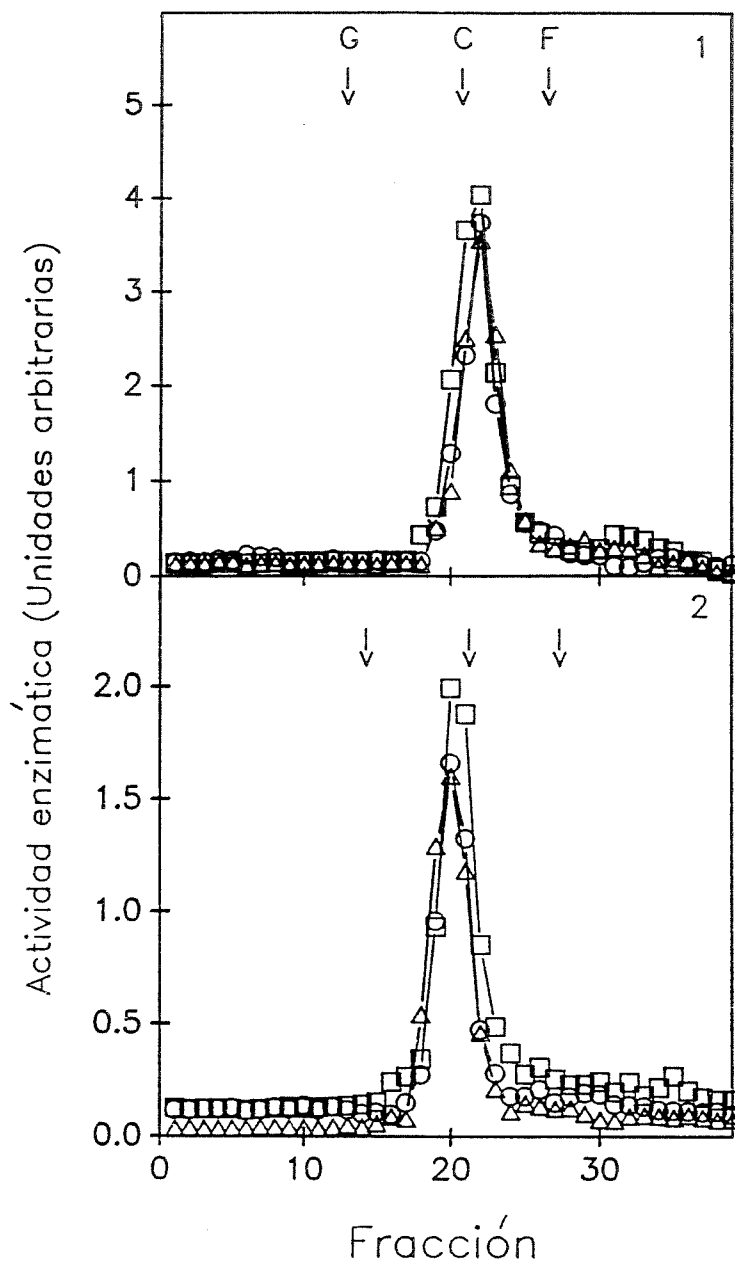


Fig. III-3. Análisis de sedimentación de las colinesterasas del líquido cefalorraquídeo en gradientes de sacarosa preparado sin y con detergentes. Los líquidos lumbares se centrifugaron en gradientes desprovistos de detergentes (○) o conteniendo Triton X-100, 0.5% p/v (Δ) o Brij 96, 0.5% (□). Se valoró la actividad AChE (1) y BuChE (2). Los marcadores utilizados fueron β-galactosidasa (G), catalasa (C) y fosfatasa alcalina (F).

### 3.2. Formas Moleculares de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa en Líquido Cefalorraquídeo de Pacientes con Meningitis e Hidrocefalia.

Cuando las muestras de líquido cefalorraquídeo sometidas al análisis por centrifugación para separar los componentes moleculares de AChE y BuChE procedían de sujetos con meningitis bacteriana se comprobó que los perfiles de sedimentación eran idénticos a los obtenidos con las muestras de los individuos controles, tanto en lo referente a la actividad total recuperada del gradiente, como a la distribución de formas y porcentaje de la forma principal con relación al total de actividad (Figs. III-1 y III-4). Ello indica que como consecuencia de la infección no se modifica de forma apreciable el modelo de distribución de componentes moleculares de AChE. Tampoco se encontraron diferencias al comparar los perfiles de sedimentación de las formas de BuChE procedentes de individuos normales y con meningitis (Figs. III-2 y III-5).

Los líquidos ventriculares de pacientes con hidrocefalia de etiología diversa también fueron sometidos a centrifugación en gradientes de densidad (Fig. III-6). En este caso, se comprobó que no había diferencias entre los perfiles de sedimentación de formas de AChE y BuChE de líquidos lumbares y ventriculares, entre sí, ni tampoco entre los procedentes de sujetos con hidrocefalia o ventriculitis (Fig. III-6).

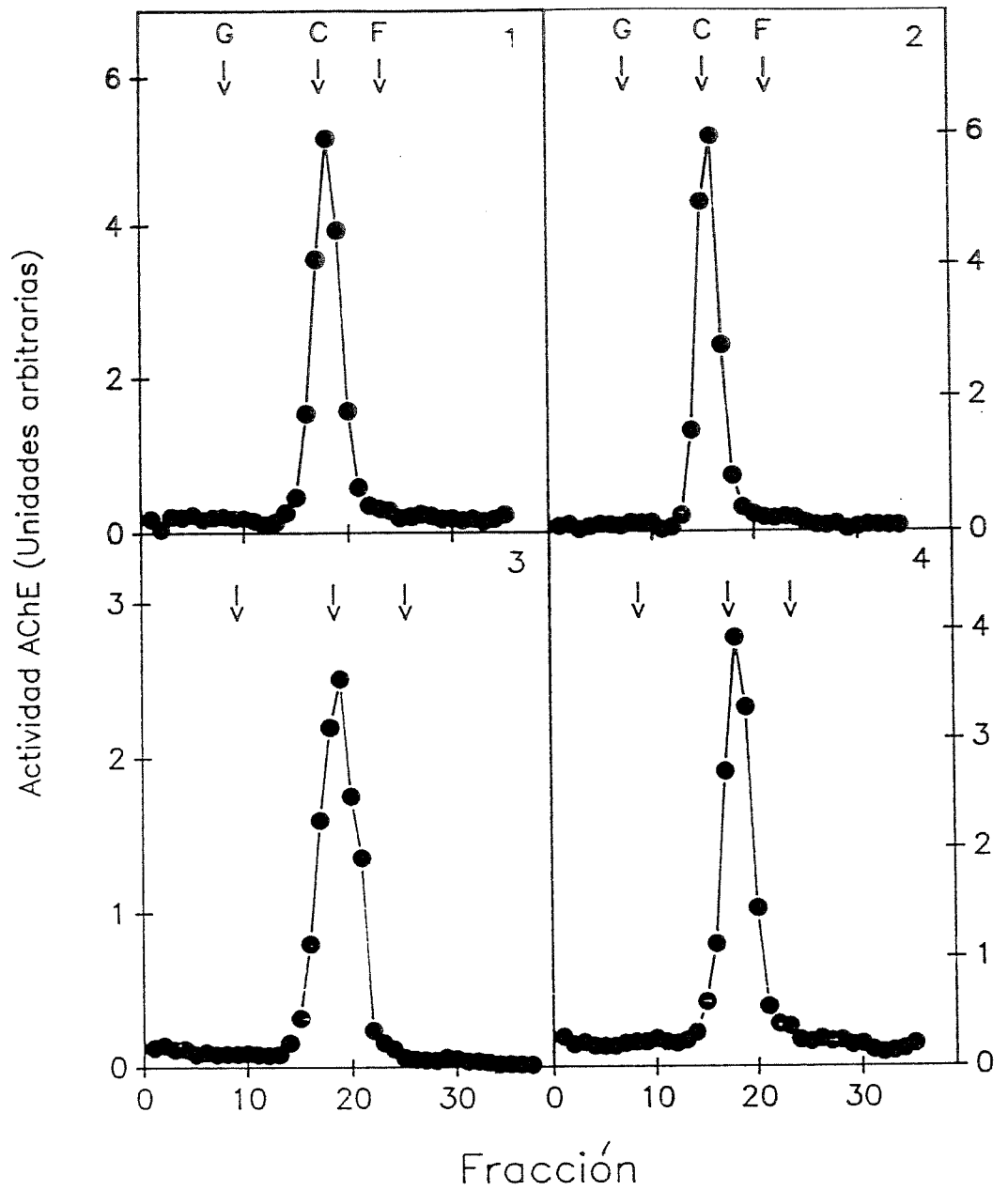


Fig. III-4. Comparación de los perfiles de las formas enzimáticas de AChE en líquido cefalorraquídeo de individuos normales y de pacientes con atrofia cerebral, hidrocefalia o meningitis. Se analizaron líquidos lumbares de un sujeto normal de 9 meses (1), paciente de 67 años con atrofia cerebral (2), sujeto de 7 meses con hidrocefalia (3) y paciente de 12 años con meningitis (4). Medida de actividad AChE y proteínas estándares (G, C y F) como en la Fig. III-1.

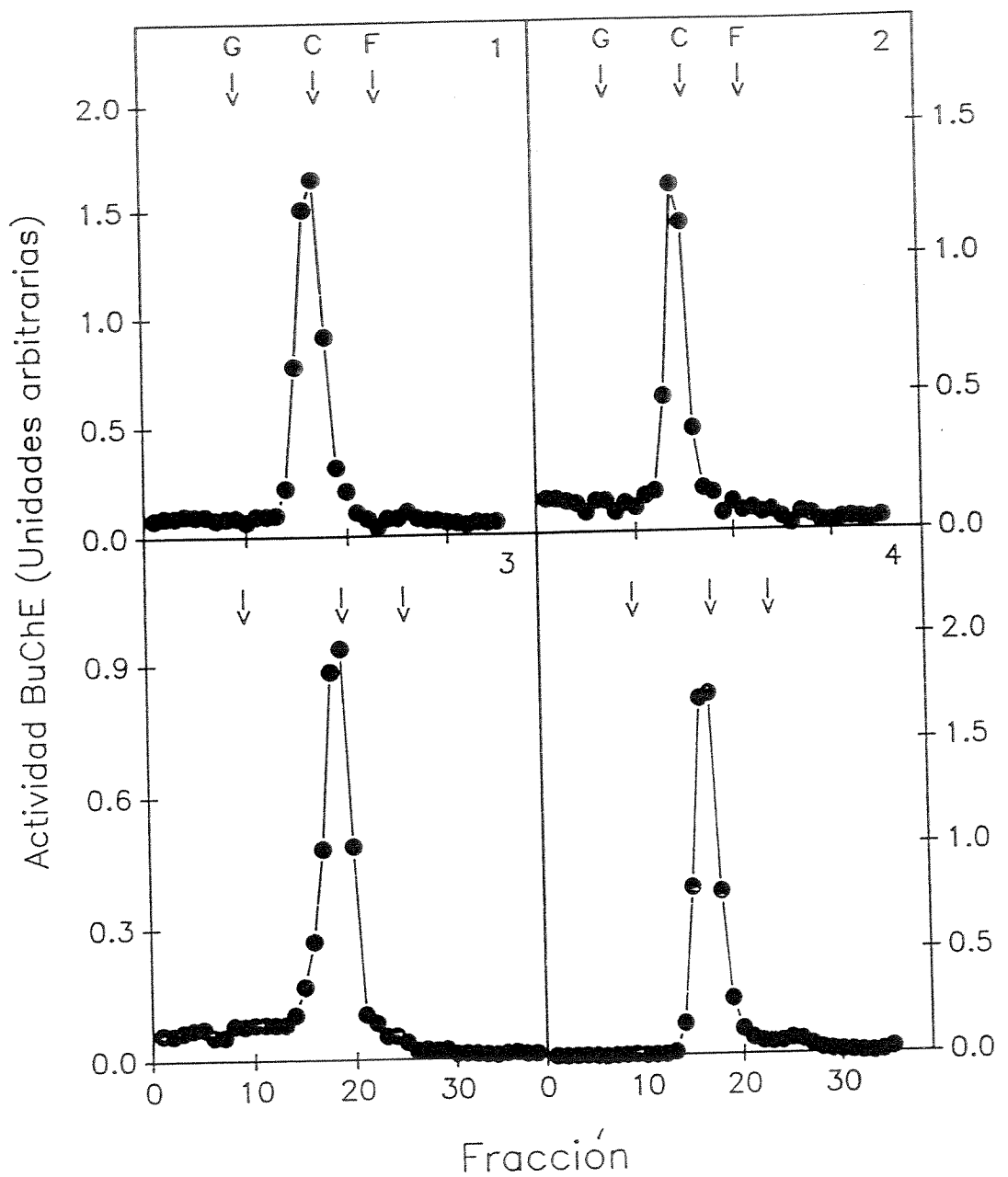


Fig. III-5. Análisis de las formas enzimáticas de BuChE de los líquidos lumbares de los sujetos señalados en la Fig. III-3. Se investigan los líquidos lumbares de un niño de 9 meses (1), sujeto de 67 años con atrofia cerebral (2), niño de 7 meses con hidrocefalia (3) y paciente de 12 años con meningitis (4).

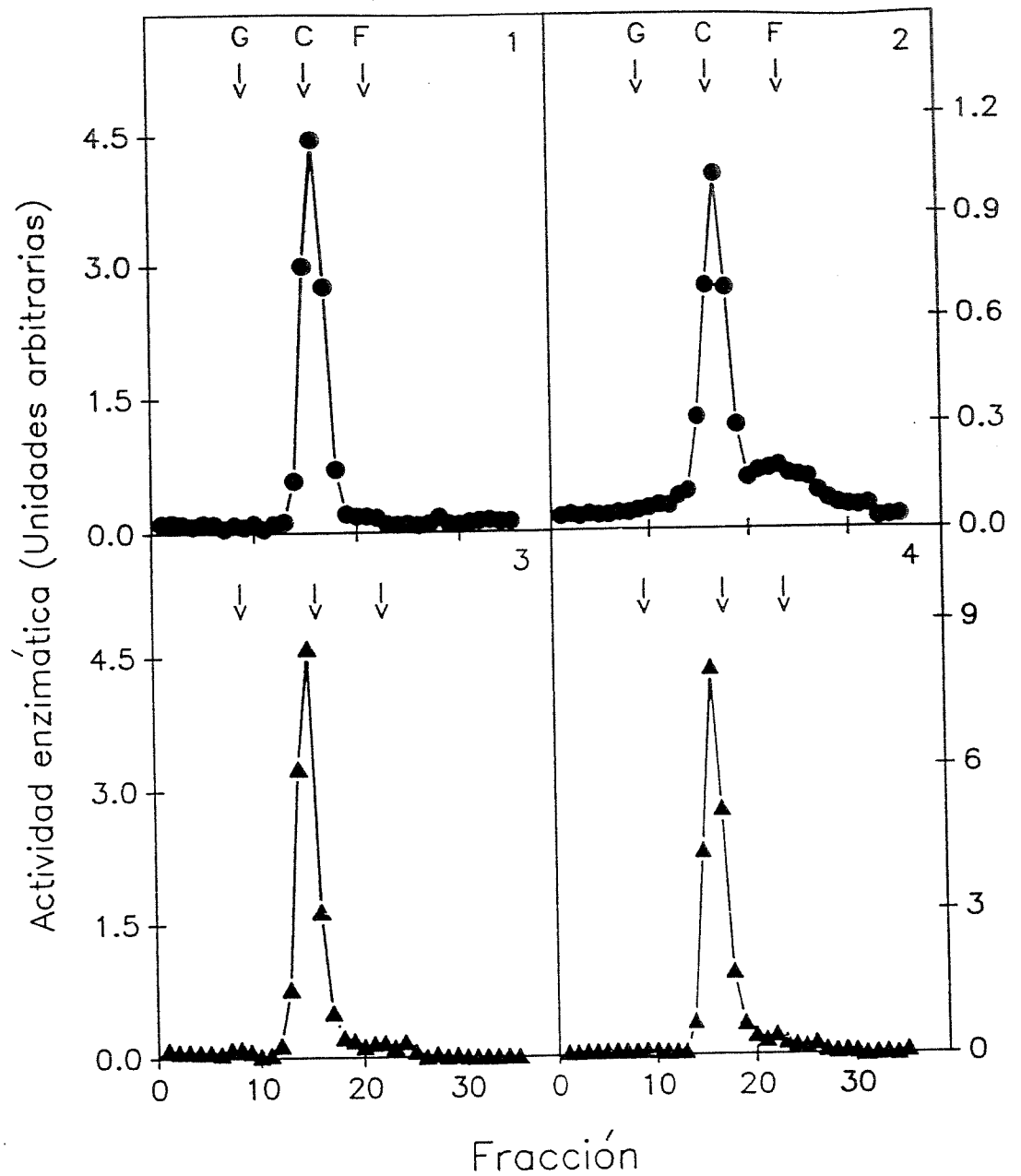


Fig. III-6. Formas moleculares de AChE y BuChE en líquidos ventriculares. Líquidos procedentes de sujetos con hidrocefalia (1,3) o ventriculitis (2,4). Se analiza la actividad AChE (1,2) y BuChE (3,4). Los líquidos proceden de un niño hidrocefálico de 15 días y otro de 2 meses con ventriculitis.

### 3.3. Formas Moleculares de Butirilcolinesterasa en Plasma de Sujetos Normales.

El plasma humano contiene casi exclusivamente butirilcolinesterasa, y en eso se diferencia del plasma de otros mamíferos que muestran cantidades significativas de AChE- perro, ratón y cerdo- y de otros, en los que el componente fundamental es la AChE, siendo la BuChE minoritaria- conejo, rata, vaca y cabra- (Arpagaus y col, 1991). De hecho, es muy difícil determinar la actividad AChE del plasma humano por el procedimiento habitual, método de Ellman (1961) en presencia de inhibidores selectivos de la BuChE, porque es tan alta la actividad de esta última enzima que, aún con inhibidores, se solapan los datos de AChE y BuChE, falseándose los resultados.

En el plasma humano hay una forma molecular predominante de actividad BuChE (Fig. III-7), aunque, aparentemente también se pueden encontrar formas más pesadas. El coeficiente de sedimentación calculado para la forma principal es de 12-12.5 S y el de la especie más pesada es de 14-15 S. También es posible que en el plasma hayan formas ligeras, G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub>, aunque como se observa en las Fig. III-7, su contribución al total de la actividad BuChE es despreciable.

Para establecer si en realidad habían formas intrínsecas de BuChE 14-15 S en el plasma, las fracciones del gradiente en la zona del hombro y las de la zona del pico, se dializaron y volvieron a depositar en un gradiente. Los resultados de la

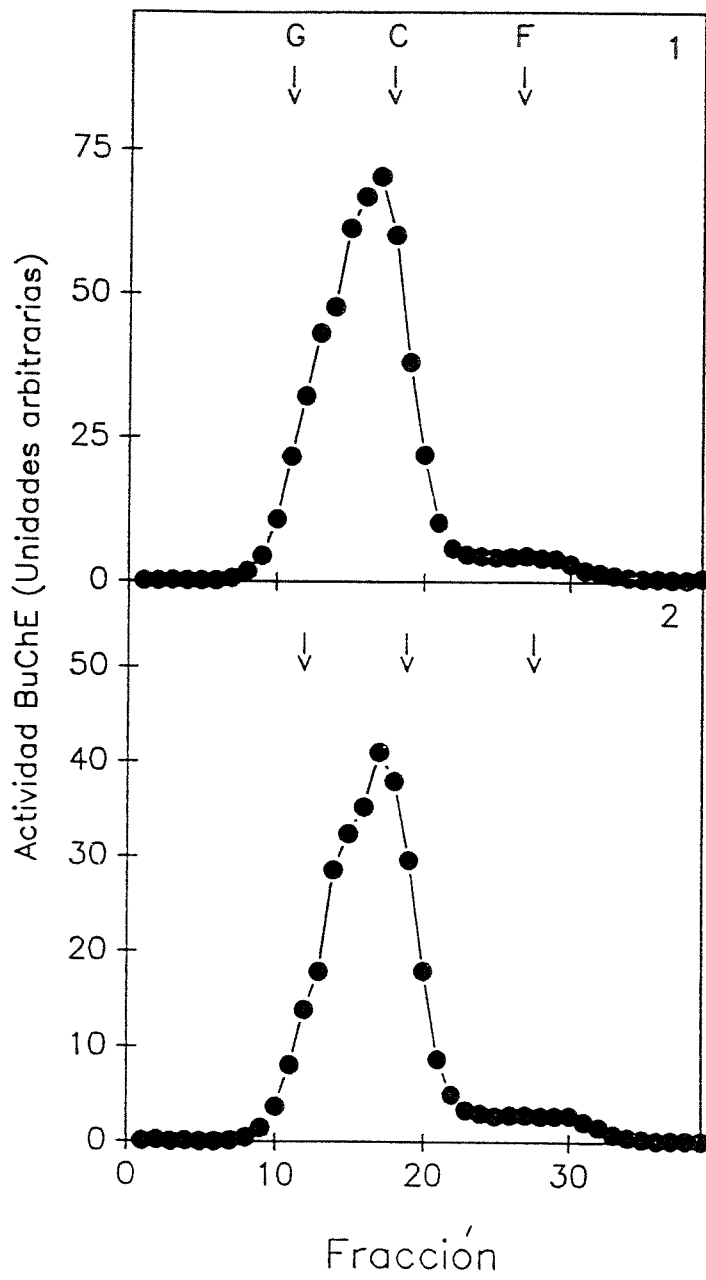


Fig. III-8 muestran claramente, que en ambos casos se obtiene el mismo perfil de formas. Ello hace pensar que las formas pesadas proceden de fenómenos de autoagregación de las moléculas individuales de BuChE. El coeficiente de sedimentación determinado se corresponde con el calculado por otros autores (Chatonnet y Lockridge, 1989) demostrándose que la forma predominante de BuChE en plasma es un tetrámero G<sub>4</sub> (Lockridge, 1988). Una vez reconocido el hecho de la existencia de una única especie de BuChE en el plasma se procedió al análisis de la interacción de la enzima con lectinas de distinta naturaleza como se explica en el Capítulo IV de esta Memoria.

Los intentos para determinar la actividad AChE en las fracciones recogidas de los gradientes por el método de Ellman, en presencia del inhibidor de la BuChE, Iso-OMPA, o por inmunoensayo con AE1 fueron infructuosos ya que la actividad AChE que contiene el plasma humano es extremadamente baja.

### 3.4. Formas Moleculares de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa en Cerebro Humano.

#### 3.4.1. Extracción de AChE y BuChE con tampón salino y antiproteasas.

La proporción de enzima soluble respecto del total de la actividad medida en el homogenado inicial se calcula teniendo en cuenta que se considera enzima soluble aquella que



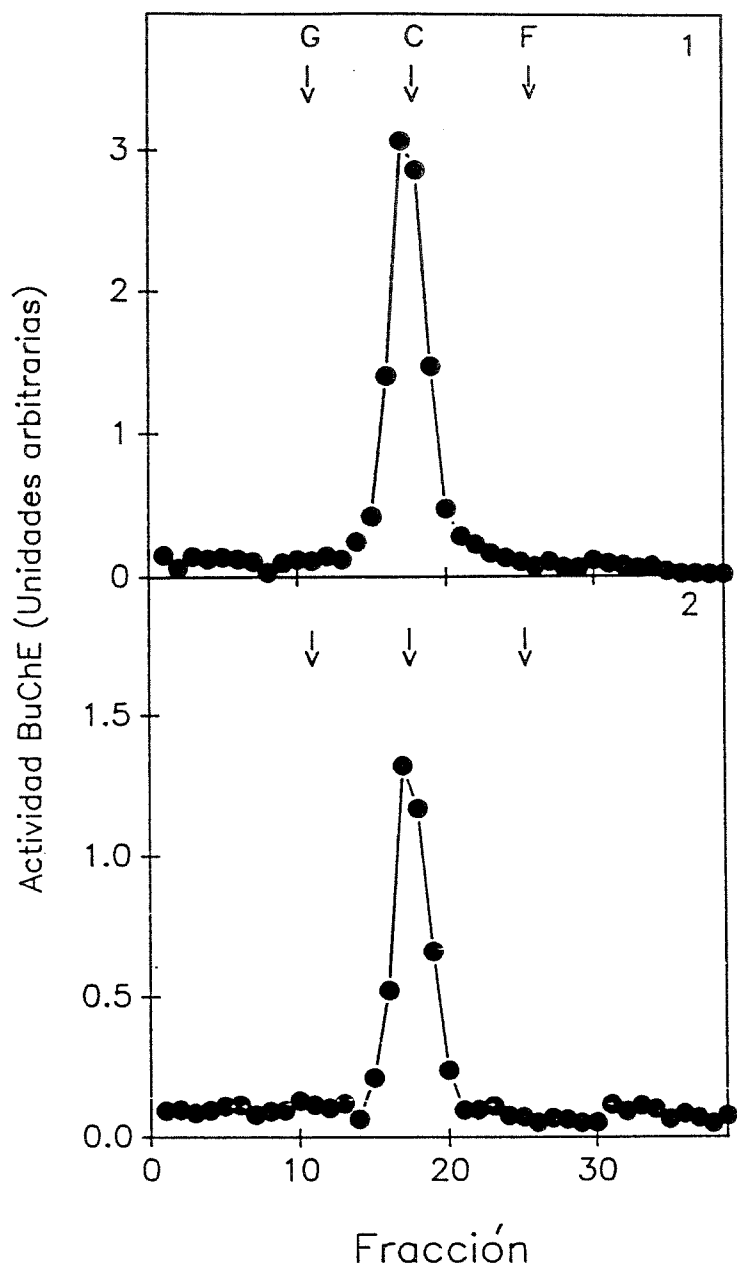


Fig. III-8. Formas moleculares de BuChE en el plasma humano. Las muestras proceden de las fracciones separadas según se indica en el pie de la Fig. III-7. El resultado del análisis del pico principal corresponde a la gráfica 1 y el del hombro se muestra en la gráfica 2. Los marcadores internos son los señalados en la Fig. III-1.

permanece en disolución después de centrifugar el homogenado de partida a 100.000 x g durante una hora.

La homogeneización del cerebro al 10% (p/v) en tampón salino y antiproteasas supuso la extracción del 30%, aproximadamente, de la actividad AChE total. La actividad específica de la preparación soluble fué de 0.085  $\mu$ moles de sustrato hidrolizado/hora/mg proteína. El resto de la enzima quedó asociada a las membranas, siendo necesario el empleo de detergentes para conseguir su solubilización. En la Tabla III-1 se muestran los datos relativos a la actividad AChE/g de tejido y el porcentaje de proteína extraída por este procedimiento.

La valoración de la actividad BuChE en la fracción soluble obtenida por extracción con sales y antiproteasas permitió establecer que alrededor del 30% de la BuChE total del cerebro humano también había sido solubilizada (Tabla III-2). Ello indicaba que, como le ocurría a la AChE, la mayor parte de la BuChE se encontraba particulada, esto es asociada a elementos membranosos de las células componentes del tejido.

El dato de actividad específica 0.046  $\mu$ moles de butiriltiocolina hidrolizada por hora y mg de proteína indica claramente que la actividad medida es aproximadamente la mitad de la que se obtiene con acetiltiocolina e Iso-OMPA.

#### 3.4.2.Extracción de la AChE y BuChE con tampón salino, antiproteasas y Triton X-100.

La homogeneización del cerebro en 10 mM Tris, pH 7,

sales, antiproteasas y Triton X-100 (1% p/v), proporcionó una suspensión con una actividad AChE de 2.75 U/ml, mucho mayor que la obtenida si el tejido se homogeneizaba en medios desprovistos de Triton X-100 (1.80 U/ml). Ello es indicativo de que buena parte de la enzima se encuentra ocluida, esto es con los centros activos inaccesibles al sustrato, ya embutidos en la membrana o modificados por interacciones con iones o proteínas de membranas. También es probable que buena parte de la enzima esté asociada a orgánulos intracelulares y, aún después de la homogeneización del tejido, los centros activos queden fuera del alcance del sustrato. Conviene señalar que el dato de actividad BuChE en preparaciones obtenidas por homogeneización del cerebro sin Triton X-100 y con detergente se diferencian muy poco, 0.82 y 0.92 U/ml (Tablas III-2 y III-4). Ello indica que el fenómeno de aumento de la actividad AChE es propio de esa enzima y no de la BuChE.

La centrifugación de la suspensión obtenida con detergentes proporcionó una preparación que contenía alrededor del 80% de la actividad AChE de partida, el resto de la enzima debió de desnaturalizarse durante la extracción ya que apenas quedaba actividad AChE en el precipitado obtenido al separar la fracción soluble (Tabla III-3).

La medida de la actividad BuChE en el sobrenadante de la suspensión del tejido en medios con detergentes puso de manifiesto que, en presencia de Triton X-100, toda la enzima se había liberado, como había ocurrido con la AChE (Tabla III-4).

Por lo que se refiere a la valoración de las proteínas en

Tabla III-1. Solubilización de AChE de Cerebro Humano con tampón salino y antiproteasas.

Fracción	Actividad AChE (U/ml)	Porcentaje de Actividad	Proteína (mg/ml)	Porcentaje de Proteína	Actividad Específica (U/mg)	Actividad por g Tejido Fresco
Homogenado (10% p/v)	1.80 ± 0.65	100	16.9 ± 3.1	100	0.106	19.4
Sobrenadante tras centrifugar 100.000 x g 1 hora.	0.53 ± 0.30	27.8 ± 1.8	6.2 ± 0.4	37.8 ± 6.7	0.085	5.4
Precipitado remanente	1.25 ± 0.19	76.7 ± 12.9	15.2 ± 1.5	93.7 ± 3.8	0.082	15.7

La homogeneización del tejido se realizó al 10% p/v en tampón Tris, 10 mM, pH 7.0 conteniendo 1 M NaCl y 50 mM MgCl<sub>2</sub> y una mezcla de antiproteasas constituida por 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina, 2 mM benzamidina, 1 mg/ml bacitracina, 10 µg/ml pepstatina, 20 µg/ml leupeptina y 20 U/ml aprotinina. La actividad AChE se expresa en µmoles de sustrato hidrolizado / h / ml (U/ml). Los resultados son promedio y desviación estándar de, al menos, nueve extracciones de tejido procedentes de diferentes individuos, realizando cada medida por triplicado.

Tabla III-2.Extracción de la BuChE de Cerebro Humano con Tampón Tris, sales y antiproteasas.

Fracción	Actividad BuChE (U/ml)	Porcentaje de Actividad	Proteína (mg/ml)	Porcentaje de Proteína	Actividad Especifica (U/mg)	Actividad por g Tejido Fresco
Homogenado (10% p/v)	0.82 ± 0.40	100	16.9 ± 3.1	100	0.048	8.9
Sobrenadante tras centrifugar 100.000 x g 1 hora.	0.29 ± 0.16	27.6 ± 12.9	6.2 ± 0.4	37.8 ± 6.7	0.046	3.0
Precipitado remanente	0.71 ± 0.24	86.1 ± 15.4	15.2 ± 1.5	93.7 ± 3.8	0.046	8.9

La homogeneización del tejido se llevó a cabo como se indica en la Tabla IV-1. Téngase en cuenta que las muestras analizadas para confeccionar las Tablas IV-1 y IV-2 son las mismas, sólo que en un caso se valora la actividad AChE y en el otro la actividad BuChE. Los datos de actividad se expresan en  $\mu$ moles de butirilcolina hidrolizada por hora y mg de proteína. Valores promedio y desviaciones estándar de, por lo menos, nueve muestras tomadas a distintos sujetos.

Tabla III-3. Solubilización de la AChE del Córtex Cerebral con medios tamponados conteniendo Triton X-100.

Fracción	Actividad AChE (U/ml)	Porcentaje de Actividad	Proteína (mg/ml)	Porcentaje de Proteína	Actividad Específica (U/mg)	Actividad por g Tejido Fresco
Homogenado (10% p/v)	2.75 ± 1.00	100	20.0 ± 3.9	100	0.137	29.7
Sobrenadante tras centrifugar 100.000 x g 1 hora.	2.17 ± 0.96	76.8 ± 9.6	9.6 ± 0.8	50.0 ± 11.4	0.226	20.5
Precipitado remanente	0.06 ± 0.02	2.3 ± 1.7	17.7 ± 1.6	89.5 ± 4.5	0.004	0.8

La homogeneización del tejido se llevó a efecto como se indica en la Tabla IV-1, pero en este caso se incorporó Triton X-100 al medio para que quedase a la concentración de 1% p/v. El medio contenía entonces, sales, antiproteasas y Triton X-100, todo ello en tampón Tris 10 mM, ajustado a pH 7.0. Los resultados mostrados representan la media y desviación estándar de, al menos, nueve extracciones realizadas con material procedente de individuos distintos. Cada medida se efectuó por triplicado.

Tabla III-4. Extracción de la BuChE del Córtex Cerebral con medios tamponados, sales, antiproteasas y Triton X-100.

Fracción	Actividad AChE (U/ml)	Porcentaje de Actividad	Proteína (mg/ml)	Porcentaje de Proteína	Actividad Específica (U/mg)	Actividad por g Tejido Fresco
Homogenado (10% p/v)	0.92 ± 0.42	100	20.0 ± 3.9	100	0.046	9.9
Sobrenadante tras centrifugar 100.000 x g 1 hora.	0.84 ± 0.32	91.1 ± 9.4	9.6 ± 0.8	50.0 ± 11.4	0.087	7.9
Precipitado remanente	0.00	0.0	17.7 ± 1.6	89.5 ± 4.5	0.000	0.0

Las muestras analizadas son las mismas que las utilizadas en la elaboración de la Tabla III-3. Los resultados representan la media y la desviación estándar de, al menos, nueve preparaciones diferentes.

las preparaciones, interesa destacar que el total de la proteína medida en los sobrenadantes y en los precipitados resuspendidos es siempre mayor que la que se determina en los homogenados de partida (Tablas III-1 y III-4). No creemos que ello sea el resultado de imprecisiones en las medidas, sino más bien de la mejor digestión de elementos de las membranas por el desoxicolato presente en el reactivo del biuret, una vez que el material ha sido centrifugado y resuspendido en el medio apropiado por segunda vez. Una mejor disgregación del material facilitará el ataque del desoxicolato, la liberación de las proteínas de la membrana y la reacción de las proteínas solubles con el biuret.

De todo lo expuesto queda patente que alrededor del 30% del total de la actividad AChE y BuChE se encuentra libre, o débilmente ligada a estructuras de las membranas, mientras que el resto está fuertemente asociado a fosfolípidos y sólo se conseguirá su solubilización por aplicación de detergentes. En todas las preparaciones analizadas la actividad AChE fué superior a la BuChE.

3.4.3. Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de Acetilcolinesterasa extraídas del córtex cerebral con tampón salino.

Una vez separada la fracción de la enzima solubilizada del cerebro con tampón Tris-salino conteniendo antiproteasas se procedió al análisis de la distribución de formas moleculares de AChE y BuChE.



En la Fig. III-9 se muestran los perfiles de sedimentación de las especies de AChE. Se comprueba que en las preparaciones siempre hay una forma principal de alrededor de 10.5 S y otra forma menos importante de 3.5-4.0 S. Los valores promedio de las formas pesadas y ligeras que hemos calculado son  $10.26 \pm 0.52$  ( $n = 11$ ) y  $3.76 \pm 0.33$  ( $n = 11$ ). La forma predominante representa el 50-60% del total de la actividad y algo menor es la contribución de la forma ligera (Fig. III-9). Sin embargo, las proporciones de las dos formas puede variar considerablemente de unos individuos a otros, e incluso entre distintas regiones cerebrales de un mismo sujeto (Atack y col, 1986). Las moléculas de AChE con coeficiente de sedimentación de 10-11 S son tetrámeros globulares, formas G<sub>4</sub>, mientras que las de alrededor de 4 S corresponden a la enzima monomérica G<sub>1</sub> (Vigny y col, 1978; Brimijoin, 1983b).

En principio, cabía pensar que la enzima extraída del cerebro sin detergentes fuera una molécula típicamente hidrofílica, esto es incapaz de interaccionar con detergentes y, por ello, que mostrase el mismo coeficiente de sedimentación con independencia de que el gradiente de sacarosa se preparase con o sin detergentes.

Sin embargo, la Fig. III-10 muestra claramente que el valor del coeficiente de sedimentación depende de la presencia de detergente, así como de la naturaleza del mismo. Los coeficientes de sedimentación de la forma más abundante fueron 11.5 S, 10.0 S y 9 S según los gradientes se prepararan sin detergente, con Triton X-100 o con Brij 96, respectivamente. De modo parecido, el coeficiente de sedimentación de la forma

G<sub>1</sub> quedó afectado según los gradientes de sacarosa contuvieran o no detergentes (Fig. III-10).

Estas son las propiedades que caracterizan a las moléculas anfifílicas de AChE (Cánovas-Muñoz y col, 1990a; Bon y col, 1990). Por lo tanto, pensamos que, al menos, la forma pesada es anfifílica, G<sub>4</sub><sup>A</sup>. Dada la escasa contribución de la forma G<sub>1</sub> al total de la actividad no es posible asegurar plenamente que los monómeros del tejido cerebral extraídos con tampones diluidos interaccionen de forma eficiente con detergentes, aunque a la vista de los datos de la Fig. III-10 los monómeros parecen ser anfifílicos.

En la Fig. III-11 se observa el cambio que se produce en la distribución de formas por almacenamiento en congelador (-20<sup>o</sup>C) aún cuando las muestras contengan antiproteasas. Se puede comprobar que a las 48 horas de almacenamiento aparecen formas agregadas en regiones del gradiente con alta densidad de sacarosa, disminuye ligeramente la altura del pico de la forma G<sub>4</sub> y aumenta la proporción de la forma G<sub>1</sub>, lo que sugiere la aparición de formas G'<sub>1</sub> líticas, no naturales, procedentes de la degradación de G<sub>4</sub>. La confirmación de estos datos se ofrece en la Fig. III-12. En ella se muestra el perfil de las formas de AChE extraídas del cerebro sin detergente y centrifugado en gradientes de densidad con Brij 96, introduciendo una muestra reciente o almacenada 48 horas o 9 días en congelador.

En la muestra obtenida recientemente, sin congelar, aparecen la forma principal de 9.5 S, y la minoritaria de 2.5 S. Cuando el extracto se mantuvo 48 horas congelado se produjo

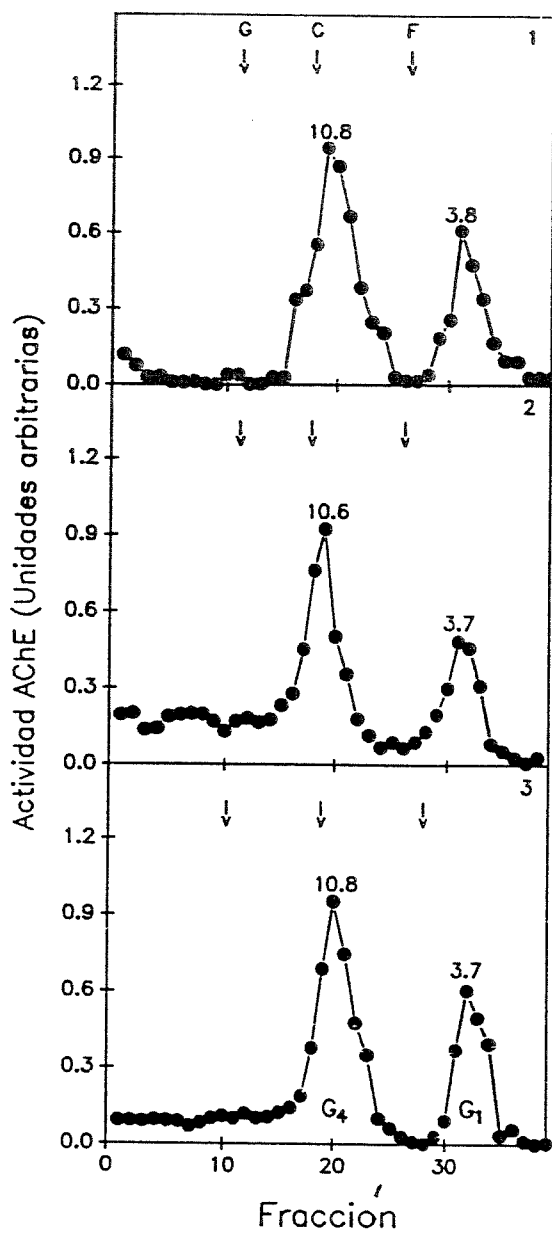


Fig. III-9. Formas moleculares de AChE de cerebro humano. Extractos obtenidos por homogeneización del córtex cerebral en tampón salino sin detergentes. Los gradientes de densidad contenían Triton X-100 (0.5% p/v). Los perfiles mostrados proceden de extractos solubles de material de tres sujetos distintos. La actividad AChE se determinó en microplacas con acetiltiocolina e Iso-OMPA. Marcadores internos, G, C, F, como en la Fig. III-1.

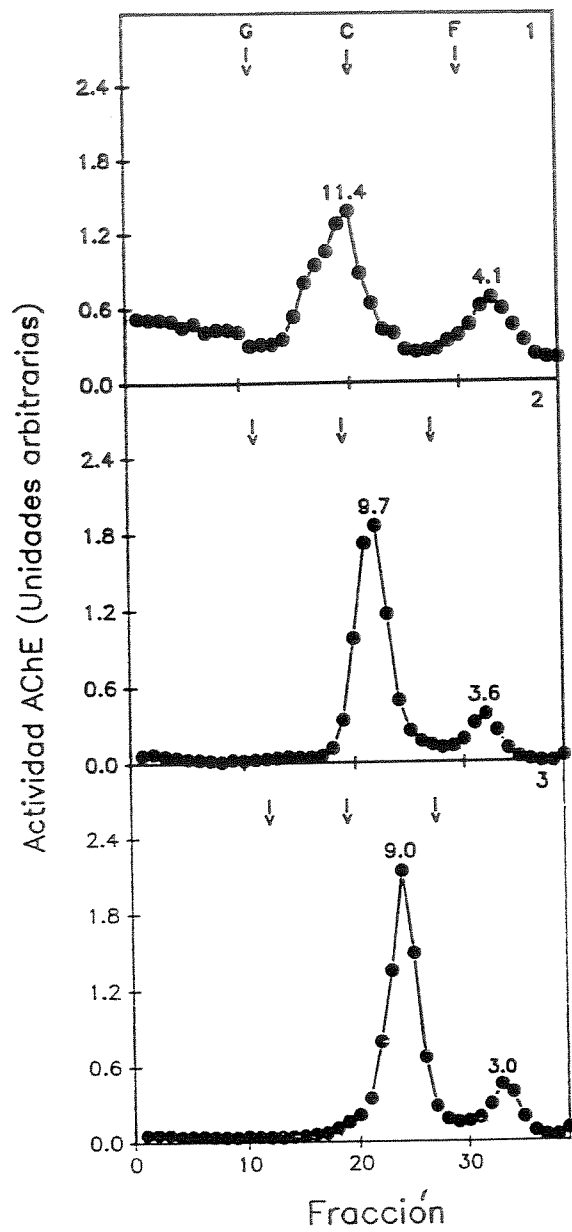


Fig. III-10. Efecto de la naturaleza del detergente sobre el valor del coeficiente de sedimentación de las moléculas de AChE extraídas del cerebro sin detergentes. Las muestras se depositan en gradientes preparados sin detergentes (1) o conteniendo Triton X-100 (2) o Brij 96 (3). Obsérvese el notable desplazamiento a zonas de menor densidad de sacarosa de las formas enzimáticas cuando los gradientes contienen detergentes.

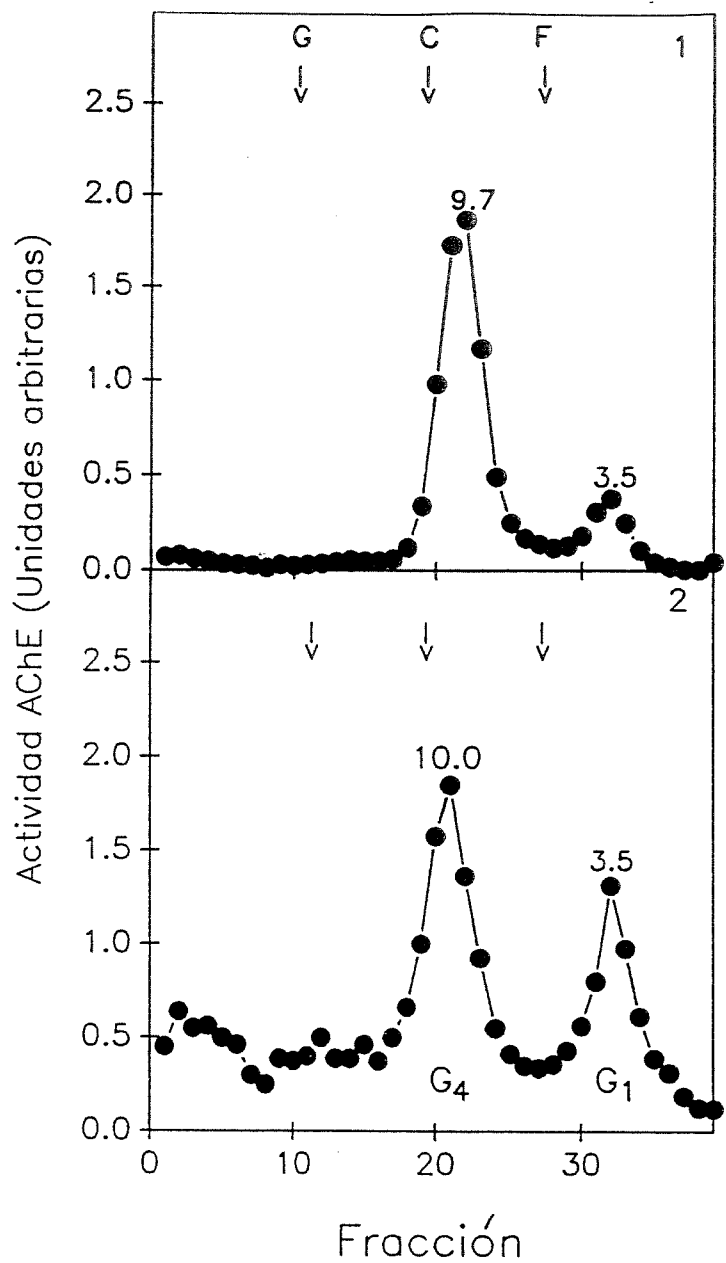


Fig. III-11. Efecto del almacenamiento sobre la distribución de las formas moleculares de AChE en extractos de cerebro obtenidos por homogeneización del tejido en medios tamponados desprovistos de detergentes. Las muestras recientemente obtenidas se sometieron a centrifugación en los gradientes (1) o se almacenaron en congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante 2 días, antes de la centrifugación (2). Los gradientes contenían Triton X-100.

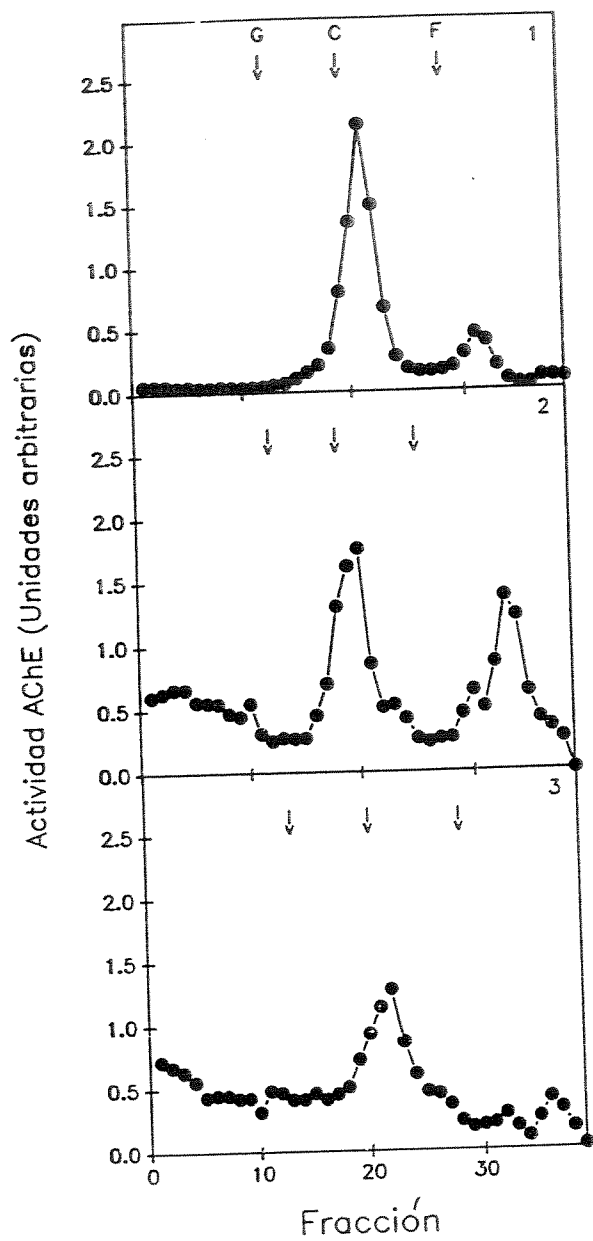


Fig. III-12. Efecto de la congelación sobre la distribución de las formas moleculares de AChE. Las muestras de la enzima solubilizada sin detergente se centrifugaron inmediatamente después de su obtención (1) o después de 2 días (2) o 9 días (3) de mantenerlas en congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Los gradientes se han preparado en esta ocasión con Brij 96 (0.5% p/v). Nótese la disminución de la altura del pico principal de AChE en los análisis de la muestra sin almacenar y mantenida en congelador.

un cambio importante en los perfiles de sedimentación. Se puede apreciar claramente cómo aumenta la proporción de las formas G<sub>1</sub>, por degradación de la forma principal. Los fenómenos de agregación de las moléculas enzimáticas se producirán siempre que la muestra se congele, aún cuando los gradientes se preparen con detergentes. Dicho fenómeno de agregación es tanto más intenso cuanto mayor sea el tiempo de almacenamiento (Fig. III-12) y las formas G<sub>1</sub>, se van progresivamente inactivando. No se sabe si sólo se inactivan los productos líticos o si se inactivan tanto las formas degradativas como los monómeros naturales intrínsecos del tejido.

#### 3.4.4. Especies moleculares de BuChE solubilizadas con tampón salino.

Mediante el análisis por sedimentación de las moléculas de BuChE extraídas del tejido con Tris-salino se comprueba que, como en el caso de la AChE, en los extractos sólo hay dos formas principales con coeficientes de sedimentación de 11.5-12 S y 4-4.5 S, supuesto que los gradientes se preparen con Triton X-100 (Fig. III-13). La forma principal y la minoritaria representan el 70-80% y 5-10% de la actividad total. Como era de esperar, los coeficientes de sedimentación (S) de las formas G<sub>4</sub> y G<sub>1</sub> de la BuChE,  $11.76 \pm 0.42$  (n = 11) y  $4.25 \pm 0.24$  (n = 11) son ligeramente superiores a los determinados para las formas homólogas de AChE, (Vigny y col., 1978).

La Fig. III-14 indica que la forma principal de la BuChE

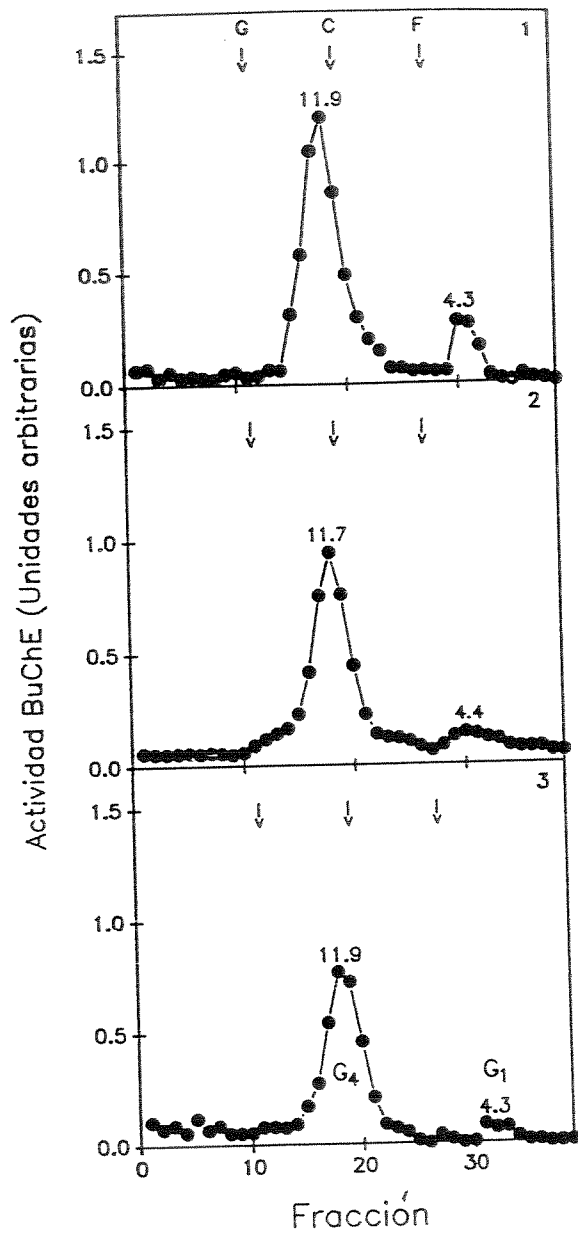


Fig. III-13. Análisis de sedimentación de las moléculas de BuChE de cerebro humano. Las muestras analizadas son las mismas de la Fig. III-9. Los ensayos de actividad BuChE se realizaron en microplacas con butirilticolina y BW 284c51. Los marcadores utilizados son los indicados en la Fig. III-1.



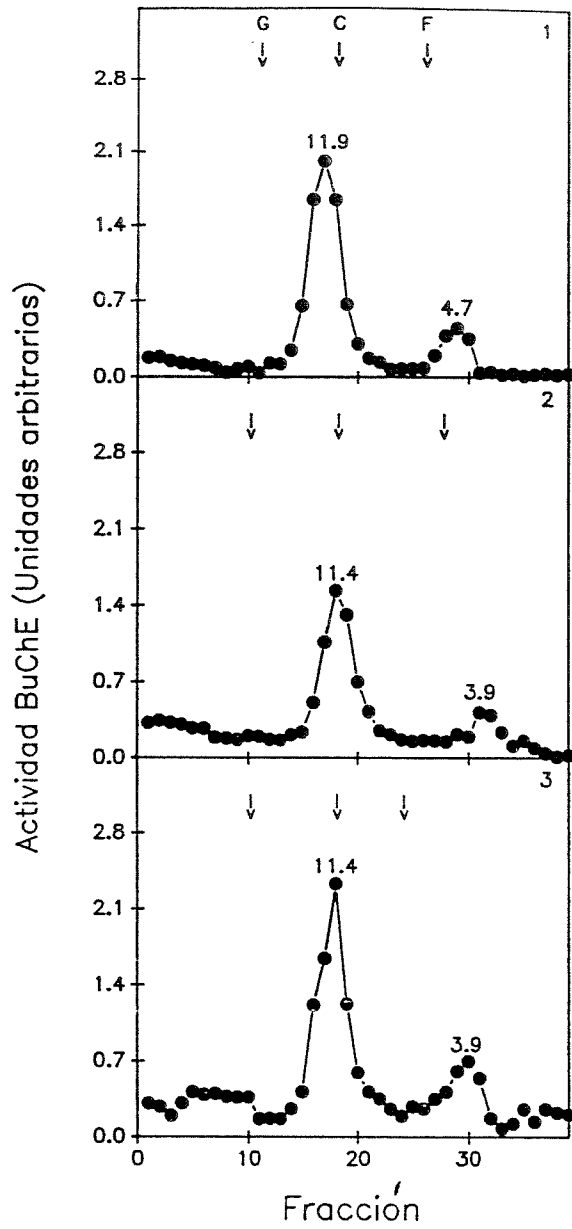


Fig. III-14. Análisis de la posible interacción de la BuChE con detergentes de distinta naturaleza. La enzima solubilizada del córtex cerebral en medios que no contenían detergentes se analizó en gradientes de densidad de sacarosa preparados sin detergente (1) o con Triton X-100 (2) o con Brij 96 (3).

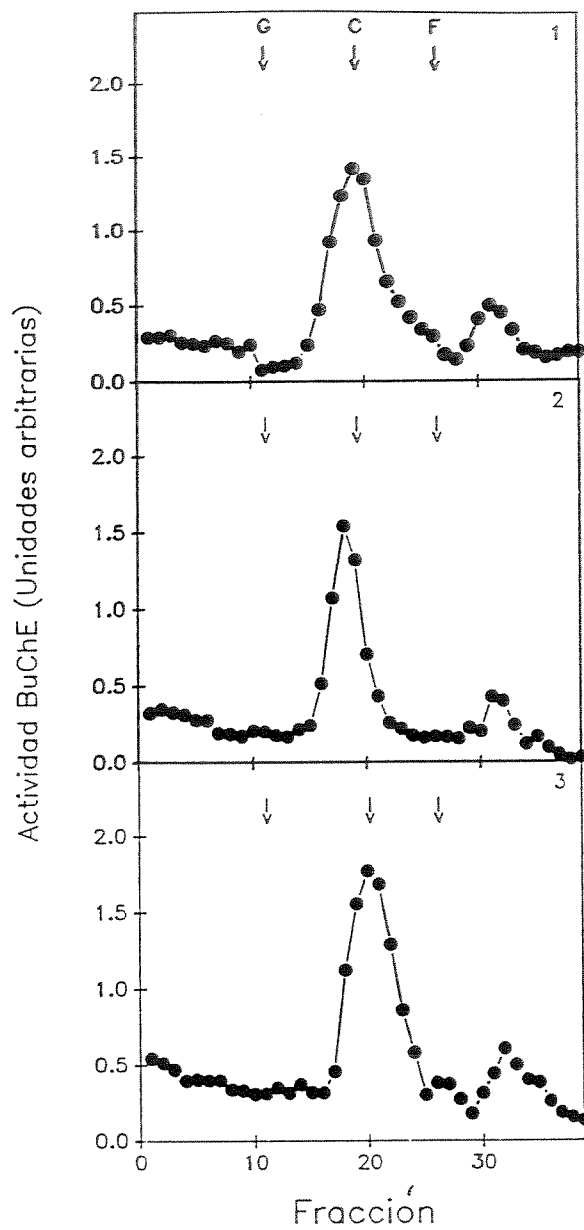


Fig. III-15. Comportamiento de la BUCHE solubilizada sin detergentes durante la conservación en congelador. Alicuotas de los extractos se centrifugaron tras su preparación (1) o después de almacenarlos durante dos (2) o 9 días (3) en el congelador, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se puede comprobar que la altura relativa de los picos apenas sufre variación. Los gradientes contenían Triton X-100 (0.5% p/v).

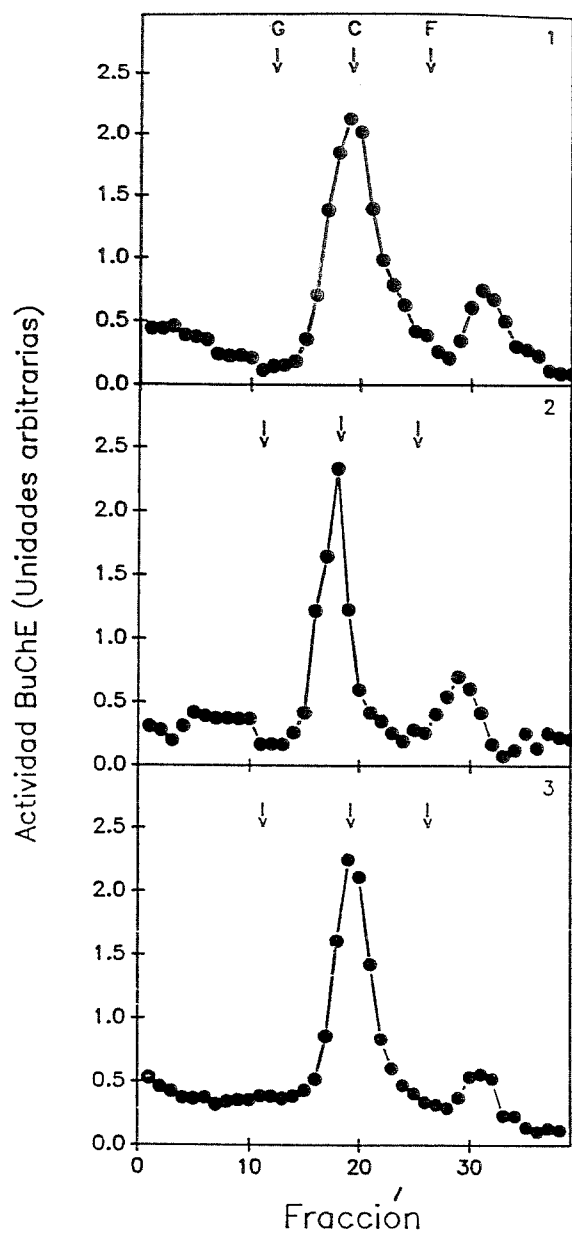


Fig. III-16. Efecto de la congelación sobre la distribución de las formas moleculares de BuChE. Las muestras se centrifugaron inmediatamente después de su preparación (1) o tras almacenarlas en congelador durante 2 (2) o 9 días (3). Los gradientes de sacarosa contenían Brij 96 (0.5% p/v).

migra hacia la misma zona del gradiente con independencia de que en la sacarosa haya o no detergentes. Ello prueba el carácter hidrofílico de estas moléculas. Además, a lo largo del tiempo de almacenamiento el perfil de formas moleculares apenas se modifica tanto si los gradientes contienen Triton X-100 o Brij 96 (Fig. III-15 y III-16). Ello demuestra que las formas G<sub>4</sub> y, probablemente también, las G<sub>1</sub> de la AChE extraída del cerebro sin detergentes son anfifílicas (G<sub>4</sub><sup>A</sup> y G<sub>1</sub><sup>A</sup>), mientras que las formas homólogas de BuChE son hidrofílicas (G<sub>4</sub><sup>H</sup> y G<sub>1</sub><sup>H</sup>).

Después del análisis de formas moleculares, los contenidos de los tubos donde se localizaban las formas G<sub>4</sub> de AChE y BuChE se dializaron ampliamente para eliminar la sacarosa y posteriormente los dializados sirvieron para estudiar la interacción de estas formas enzimáticas con lectinas. Todo el procedimiento se describe con detalle en el Capítulo IV.

#### 3.4.5. Formas moleculares de AChE solubilizadas con Triton X-100.

Los perfiles de sedimentación de las formas moleculares obtenidos del análisis de AChE extraídas del tejido, con detergente y de las que se solubilizan con tampón salino, son muy parecidos, siempre y cuando los gradientes contengan Triton X-100. En cambio, si las disoluciones de sacarosa se preparan sin detergente la situación es completamente distinta (Fig. III-17). Ello quiere decir que las moléculas G<sub>4</sub> de AChE

solubilizadas sin detergente son anfifílicas pero presentan mucha menos tendencia a la agregación que las que se solubilizan con Triton X-100.

Las formas G<sub>4</sub> extraídas sin y con Triton X-100 se diferencian ligeramente en el coeficiente de sedimentación (Fig. III-17) y ello tal vez se relacione con la distinta ordenación tridimensional de los dos tipos de conjuntos tetraméricos. Puede que el tallo hidrofóbico sea diferente o que el tallo se asocie, en cada caso, con distinto número de moléculas de detergente.

Como sucedía con las moléculas anfifílicas de AChE separadas con tampón salino, el coeficiente de sedimentación de las moléculas enzimáticas extraídas con Triton X-100 modifican notablemente su coeficiente de sedimentación según sea el detergente del gradiente (Fig. III-18).

A lo largo del tiempo de almacenamiento en congelador, se comprueba que la forma más abundante, con coeficiente de sedimentación de 10.0 S, se va inactivando paulatinamente, mientras que la proporción relativa de la forma monomérica de 3.5-4.0 S va aumentando (Figs. III-19 y III-20). Nótese que durante el almacenamiento, el coeficiente de sedimentación de la forma mayoritaria no se modifica, lo que seguramente indica que las propiedades anfifílicas de estas moléculas se conservan durante el almacenamiento en congelador.

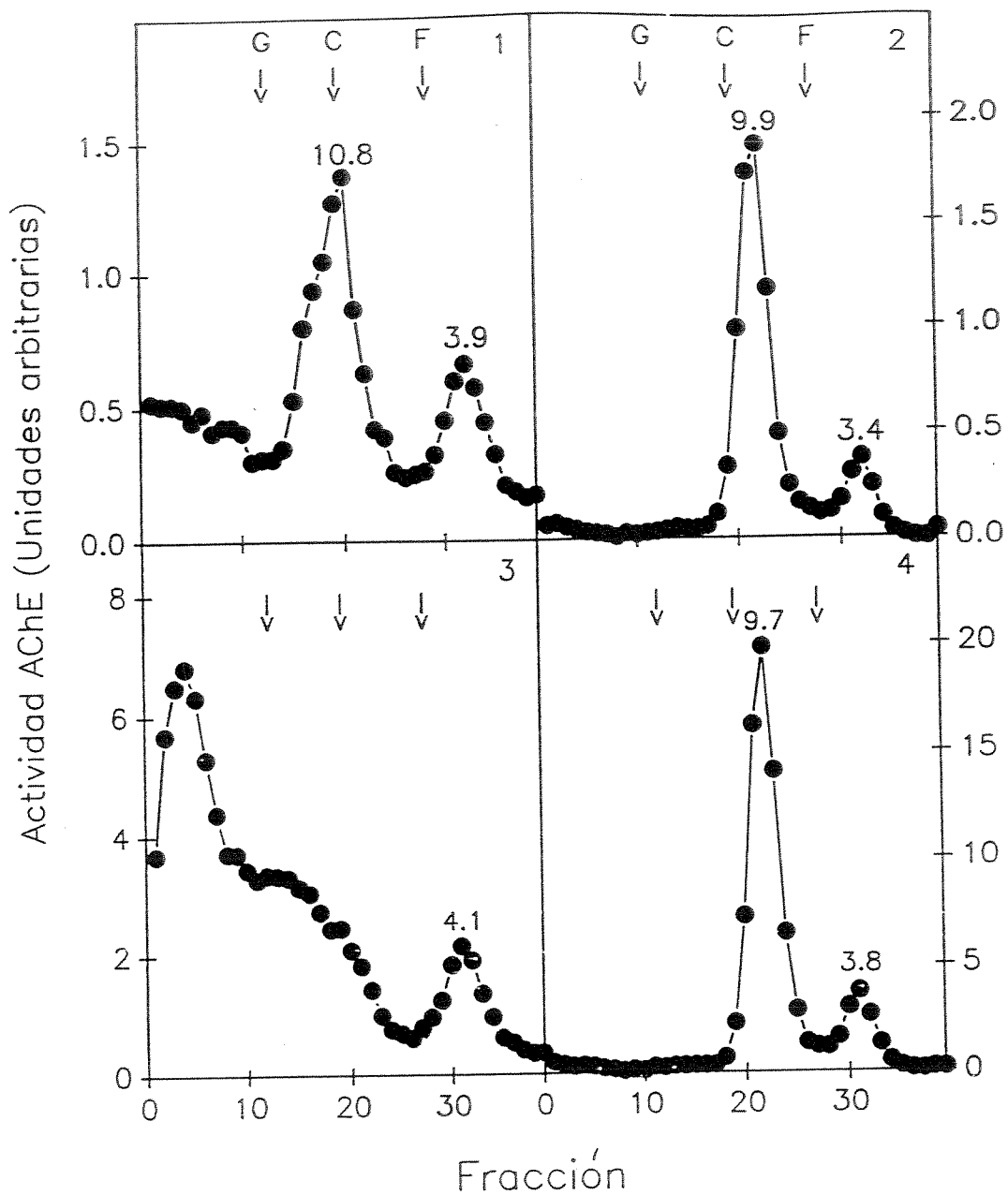


Fig. III-17. Análisis por sedimentación de las especies moleculares de AChE en los extractos obtenidos por homogeneización del cerebro en tampón Tris, 10mM, pH 7, NaCl 1M, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, sin detergente (1,2) o con 0.5% p/v Triton X-100 (3,4). Las muestras se centrifugan en gradientes desprovistos de detergentes (1,3) o con Triton X-100 (0.5% p/v) (2,4).

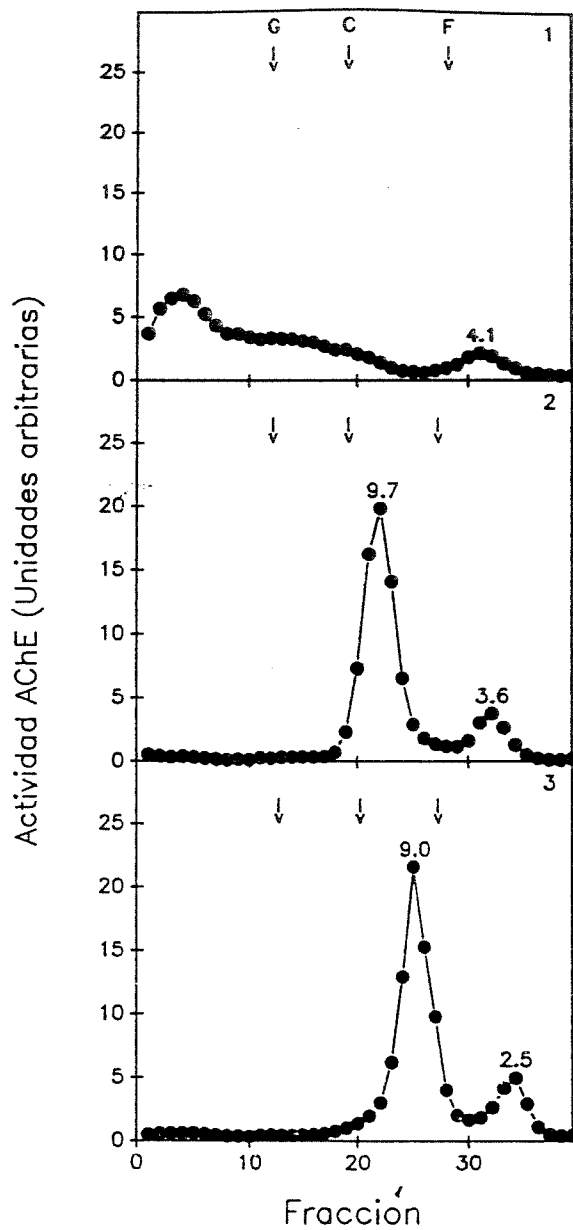


Fig. III-18. Efecto de la naturaleza del tensioactivo sobre la migración de la AChE extraída con Triton X-100. Gradientes preparadados sin detergente (1), con Triton X-100 (2) o con Brij 96 (3). Se puede comprobar fácilmente el desplazamiento del pico principal de AChE y la autoagregación de la enzima si la centrifugación se realiza sin detergentes en el gradiente.

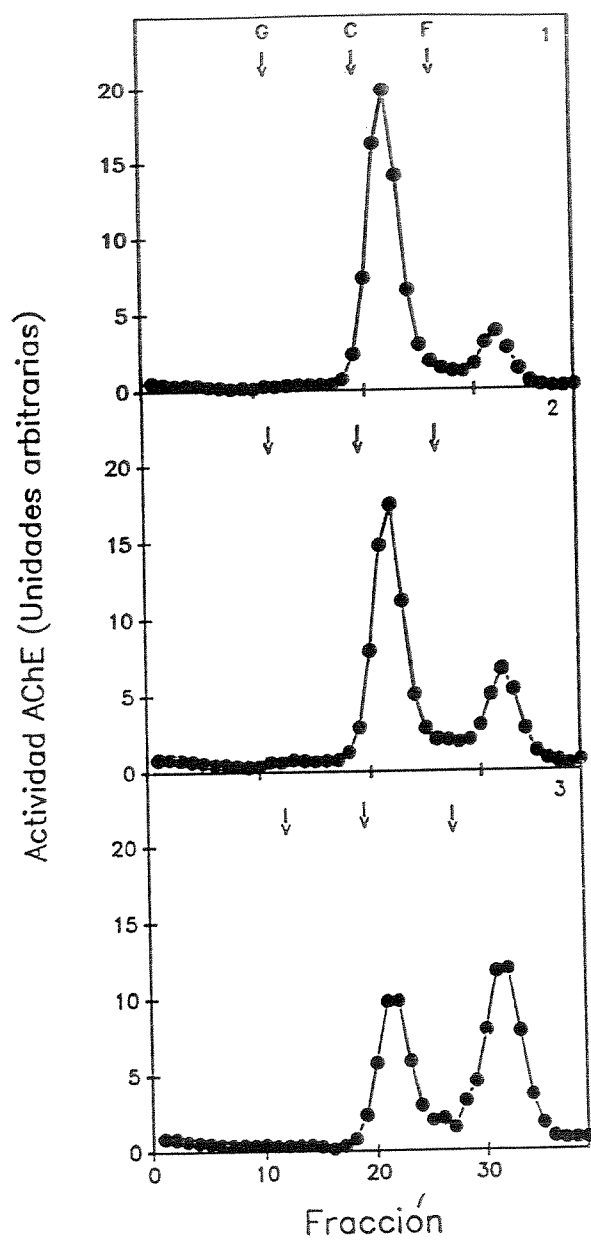


Fig. III-19. Efecto del almacenamiento sobre la actividad AChE. Muestras de la enzima solubilizada con Triton X-100 se sometieron a centrifugación sin congelación previa (1) o después de mantenerlas en congelador por 2 (2) o 9 días (3).



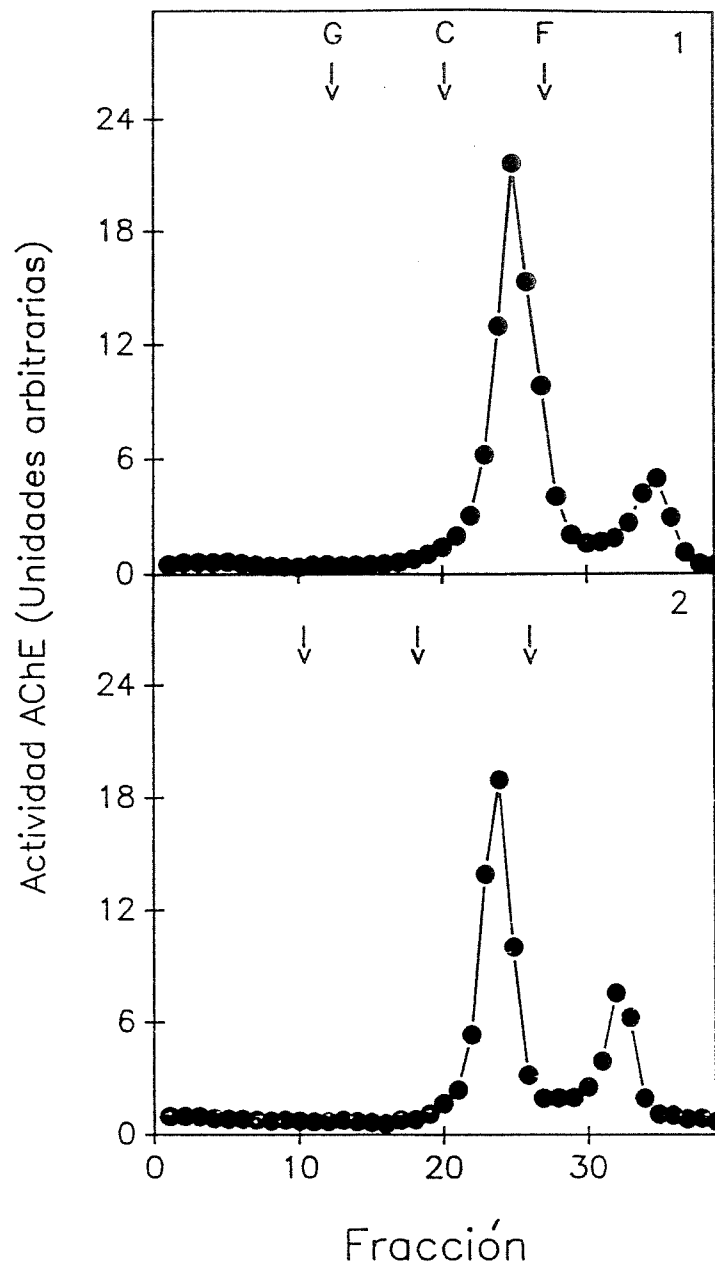


Fig. III-20. Modificación de los perfiles de sedimentación de las formas de AChE por conservación en congelador. Las muestras de la enzima solubilizada con Triton X-100 se centrifugaron en gradientes de densidad conteniendo Brij 96. Sin almacenamiento (1) y tras conservación en congelador 2 días a  $-20^{\circ}\text{C}$  (2).

### 3.4.6. Formas moleculares de BuChE extraídas de la membrana con detergente.

La centrifugación de la porción de BuChE solubilizada de la membrana con Triton X-100 mostró la presencia en los extractos de una forma molecular principal de coeficiente de sedimentación de 12-10.5 S, un hombro en la región de 7-8 S, y una forma poco abundante de 4.2 S, aproximadamente (Figs. III-21 y III-22). En cambio, si los gradientes no contenían detergentes, se apreciaron fenómenos de agregación propios de moléculas hidrofóbicas, aún cuando la mayor parte de la enzima se mantuvo como un pico discreto (Fig. III-21). Cuando los gradientes se preparaban con Brij 96, la situación fué completamente distinta, ahora aparecen 3 picos importantes, con coeficientes de sedimentación de 12.0 S, 9.0 S y 4-4.5 S aproximadamente. Ello nos induce a pensar en la existencia de dos tipos distintos de formas G<sub>4</sub> de BuChE, las moléculas hidrofílicas, cuyo coeficiente de sedimentación no se modificaría en gradientes preparados sin detergentes, con Triton X-100 o con Brij 96, y las que son sensibles a la naturaleza del detergente. Las formas G<sub>1</sub> de 4.5 S parecen manifestar propiedades hidrofílicas.

Los perfiles de las formas moleculares de BuChE apenas si se modifican a lo largo del tiempo de incubación (Figs. III-22 a III-24), siendo ésta una característica diferencial del comportamiento de las formas moleculares de AChE y BuChE.

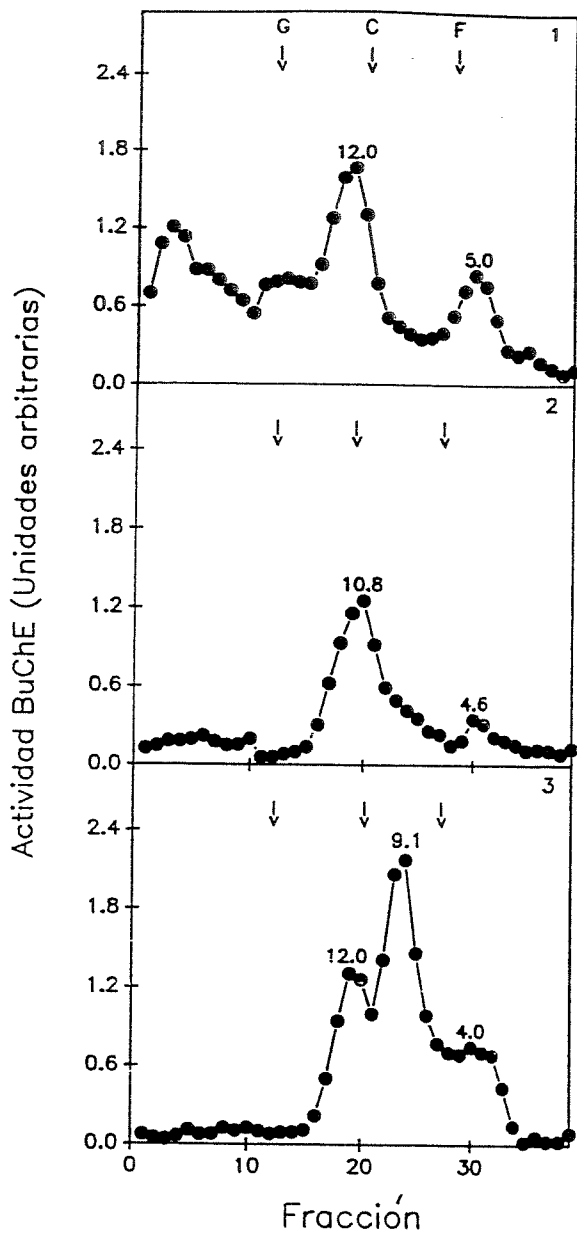


Fig. III-21. Formas moleculares de BuChE extraídas con Triton X-100 y su interacción con detergentes durante la centrifugación. Los extractos recientes fueron centrifugados en gradientes preparados sin detergentes (1), con Triton X-100 (2) o con Brij 96 (3).

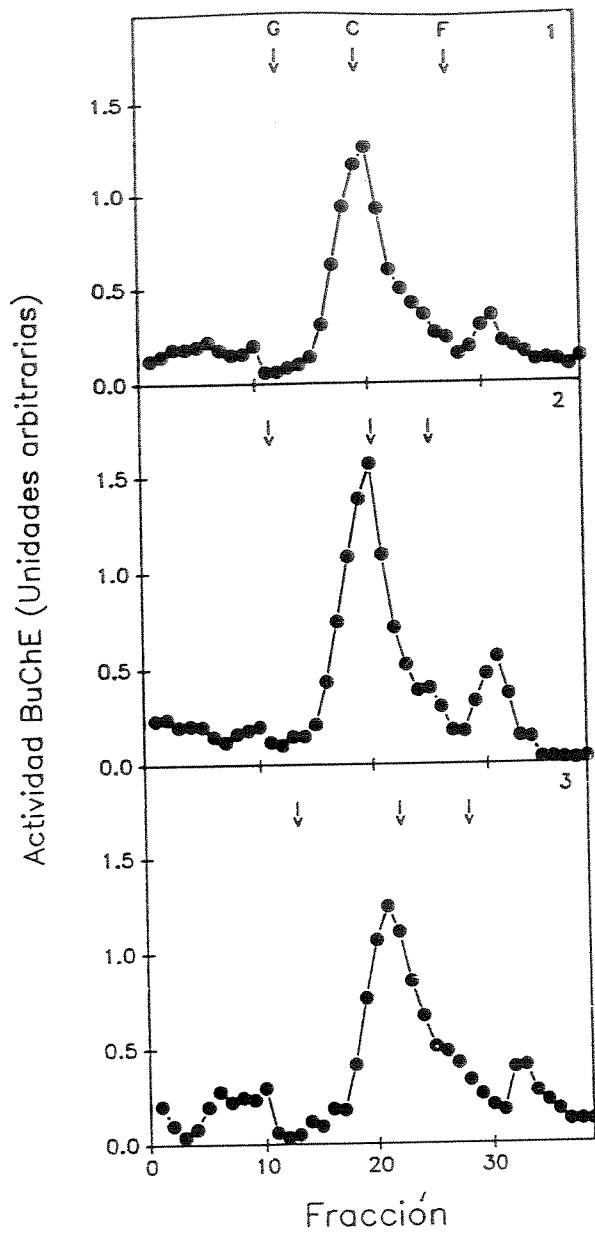


Fig. III-22. Efecto del almacenamiento de los extractos obtenidos por homogeneización del cerebro en medios conteniendo Triton X-100. Formas moleculares del cerebro en muestras recientes (1) o conservadas en congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante 2 (2) o 9 días (3). Los gradientes contenían Triton X-100 (0.5% p/v).

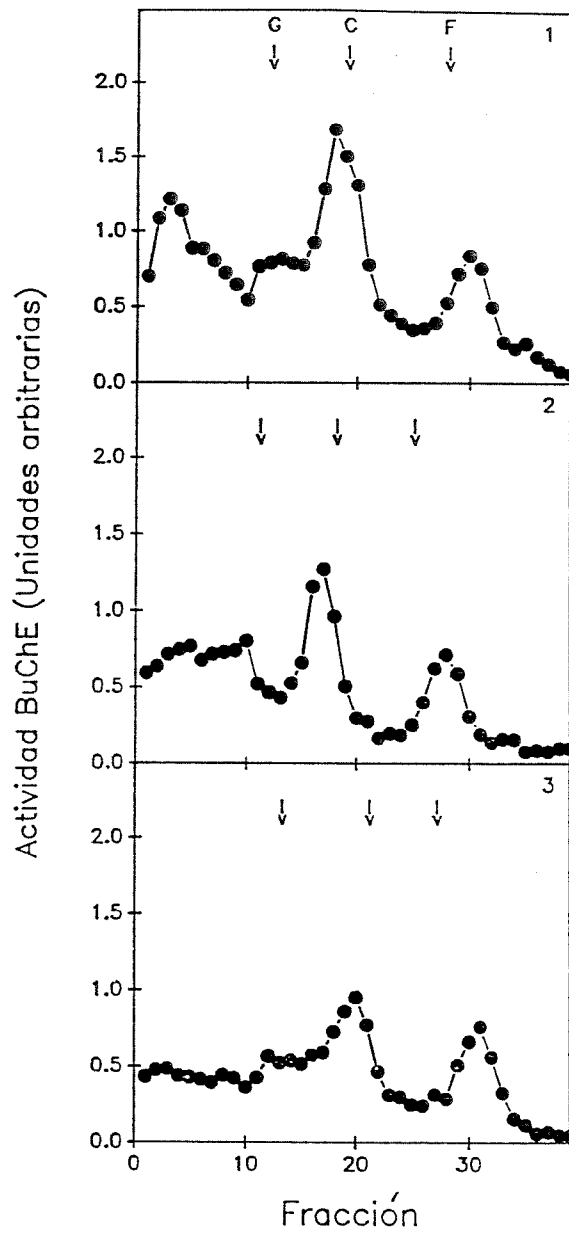


Fig. III-23. Estudio de la posible interconversión de formas moleculares de BuChE. La enzima solubilizada del tejido cerebral con Triton X-100 se sometió a centrifugación en gradientes desprovistos de detergentes sin congelar (1) o después de mantenerlos congelados 2 (2) o 9 días (3).

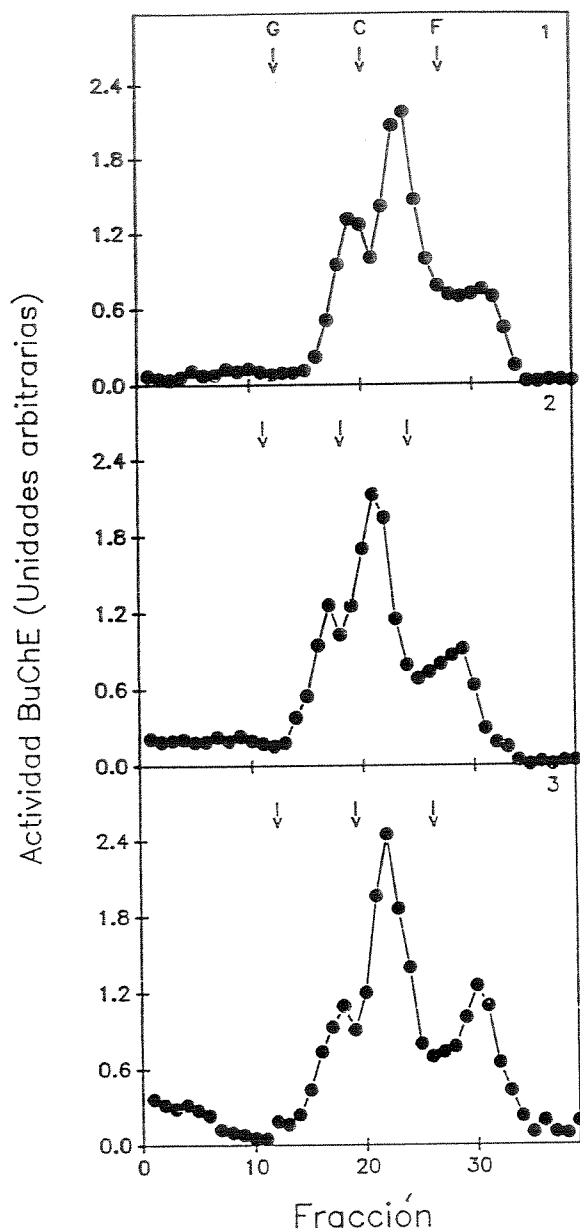


Fig. III-24. Efecto del almacenamiento sobre los perfiles de las formas moleculares de BuChE. Muestras obtenidas tras extraer el tejido con Triton X-100 se centrifugaron en gradientes de densidad de sacarosa conteniendo Brij 96. En los gradientes se depositaron alícuotas de extractos recientes (1) o mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 (2) o 9 días (3).

#### 4. DISCUSION.

##### 4.1. Formas Moleculares de AChE y BuChE en el Líquido Cefalorraquídeo.

De todo lo expuesto anteriormente, queda establecido que los líquidos cefalorraquídeos de sujetos normales con edades menores de 1 año, entre 1 y 8 años y de 8 a 70 años muestran siempre el mismo perfil de moléculas de AChE y BuChE. En todos los casos se aprecia una forma principal de AChE y otra de BuChE, ambas comportándose como tetrámeros hidrofílicos ya que son incapaces de interaccionar con detergentes. El perfil de formas no se alteró si el líquido lumbar procedía de sujetos con meningitis, hidrocefalia o atrofia cerebral, ni tampoco si se analizaba el fluido ventricular de individuos con hidrocefalia o ventriculitis. Ello significa que cualquiera que sean los procesos implicados en la liberación de las colinesterasas desde las neuronas, glías o desde el torrente circulatorio, dichos procesos no se alteran como consecuencia de estas enfermedades, aún cuando se afecten los niveles de actividad AChE y BuChE (Capítulo II de esta Memoria). La distribución de formas no se modifica tras el almacenamiento de las muestras en congelador durante 1 año y después de este tiempo, las actividades AChE y BuChE disminuyen ligeramente, alrededor del 20-30% de la actividad de partida.

Tanto la AChE como la BuChE del líquido cefalorraquídeo son moléculas tetraméricas hidrofílicas, del mismo tipo que

las que se encuentran en plasma, sólo que en este último medio la BuChE representa más del 95% de la actividad ChE total. Los dímeros y monómeros de la AChE y BuChE encontrados en plasma parece que proceden de la degradación de las moléculas tetraméricas (Lockridge y La Du, 1982). Es posible que las formas minoritarias dimeras y monómeras de AChE y BuChE encontradas en el líquido cefalorraquídeo tengan también este origen. Las formas G<sub>4</sub> hidrofílicas se encuentran en la glándula adrenal (Chubb y Smith, 1975), cultivos de células neurales (Lazar y Vigny, 1980) y cultivos de células musculares (Wilson y col, 1973). La AChE se libera de las células neurales al líquido cefalorraquídeo (Chubb y col, 1976) desde donde se vierte al líquido amniótico en fetos con graves defectos del tubo neural (Chubb y col, 1979). Sin embargo, se desconoce si las formas G<sub>4</sub> hidrofílicas de la AChE proceden directamente de las hidrofóbicas, por ruptura proteolítica, o si por el contrario representan un depósito diferenciado de formas enzimáticas, sintetizadas y vertidas al medio extracelular de manera distinta a como se transporta la enzima hidrofóbica. El hecho de que la concentración de AChE en el líquido cefalorraquídeo aumente por estimulación del nervio ciático (Chubb y Smith, 1975) apoya esta última alternativa. La AChE es secretada en células del cerebelo, donde la enzima no juega papel alguno en la neurotransmisión, al ser escaso el nivel de acetilcolina y de colinacetilasa. Ello ha abierto el camino para encontrar la función fisiológica que desempeña la enzima en aquellos tejidos donde su papel no se relaciona con la neurotransmisión (Appleyard y



col, 1988; Greenfield y col, 1991). El equipo de Susan Greenfield ha encontrado que en nigrostriatum la AChE induce hiperpolarizaciones de la membrana, vía apertura de canales de  $K^+$ , y potencia la sensibilidad de las neuronas a los impulsos eléctricos que, eventualmente, producirán la liberación de dopamina (Greenfield, 1991). La inyección de AChE en el nigrostriatum produce un comportamiento típico en ratas que es propio de las que sufren un desequilibrio en la transmisión de este área cerebral. Al hilo de estos hallazgos, conviene tener presente que la bradiquinesia y rigidez típica de los pacientes aquejados de Parkinson se relacionan con lesiones del tronco cerebral, particularmente del sistema dopaminérgico del nigrostriatum. Los niveles de AChE y BuChE en el líquido cefalorraquídeo son superiores en los parkinsonianos dementes que en los no dementes. Los perfiles de sedimentación de las formas moleculares de AChE y BuChE en sujetos control y parkinsonianos fueron muy parecidos (Ruberg y col, 1986).

Las propiedades de la BuChE del líquido cefalorraquídeo y del plasma son idénticas (Rao y col, 1989) pero ello no quiere decir que la enzima del LCR proceda del plasma. Tal vez la BuChE del tejido cerebral reúna unas características semejantes a aquellas de modo que la enzima del líquido cefalorraquídeo se podría originar de estructuras cerebrales.

En lo referente a la AChE, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Atack y col (1987a), por cuanto en los líquidos lumbares y ventriculares encontramos una forma principal de 10.0 S y mínimas proporciones de especies moleculares más ligeras. Sin embargo, cuando esos

investigadores analizan el fluido ventricular encuentran recuperaciones del 123% (en dos muestras, 138 y 264% de las cinco analizadas) de la actividad BuChE introducida en el gradiente. Ellos achacan este fenómeno a un supuesto inhibidor endógeno de la BuChE que se disocia de la misma mediante centrifugación. En ninguno de los líquidos lumbares o ventriculares analizados hemos apreciado dicho fenómeno.

En la actualidad, disponemos de datos sobre niveles de AChE y BuChE en el líquido cefalorraquídeo lumbar de sujetos que han sufrido sucesos cerebrovasculares (ataque isquémico, trombosis cerebral) y de individuos que padecen desórdenes neurodegenerativos o neuropatías metabólicas, pero la información es todavía insuficiente por haber sido analizados hasta ahora un número limitado de muestras. En un futuro próximo podremos completar los resultados para establecer, si fuera posible, una correlación entre un tipo particular de enfermedad y los cambios de los niveles de colinesterasas en el líquido cefalorraquídeo.

#### 4.2.Extracción de Colinesterasas de Cerebro Humano.

Operacionalmente, siempre se ha supuesto que la extracción del tejido cerebral en medios desprovistos de detergente servía para liberar las formas hidrofílicas de las colinesterasas, mientras que los medios con detergentes eran eficaces para solubilizar la enzima hidrofóbica, esto es la que estaba asociada a las membranas a través de un anclaje inserto en la bicapa lipídica (Vidal y col, 1981a y b; Chai y

col, 1981; Plummer y col, 1984; Vidal y col, 1987a y b; Campoy y col, 1989).

Sin embargo, la mayor parte de los investigadores extraen la enzima del tejido con medios desprovistos de antiproteasas, sólo con EGTA, conteniendo Triton X-100, con lo que obtienen la enzima soluble y la hidrofóbica conjuntamente (Ruberg, 1986). De esta manera pierden la posibilidad de analizar las anomalías que se observen en la AChE y BuChE soluble en cerebro de sujetos aquejados de algún desorden neurológico.

Existen pocos datos bibliográficos sobre los niveles de actividad AChE extraíble sin y con detergentes. El grupo de Sirviö (Sirviö y col, 1989) ha comunicado que la actividad AChE en preparaciones de cerebro extraído sin detergente es de 1.08 nmol/min/mg, equivalente a 0.065  $\mu$ mol/h/mg, valor muy próximo al obtenido por nosotros, 0.085  $\mu$ mol/h/mg (Tabla III-1). Para la enzima solubilizada con detergentes se encuentran valores de 4.61 nmol/min/mg, equivalente a 0.276  $\mu$ mol/h/mg, y nosotros hemos determinado una actividad AChE de 0.226  $\mu$ mol/h/mg (Tabla III-3). En este trabajo, Sirviö y col (1989) demuestran que en el córtex temporal, la actividad AChE está significativamente reducida respecto a los controles, tanto en parkinsonianos dementes como en los no dementes.

Conviene, sin embargo, tener presente que la actividad AChE depende mucho de la región cerebral que se considere, siendo el núcleo caudal y el de Meynert los que presentan la máxima actividad AChE y el fórnix, córtex temporal y parietal las áreas con menos actividad enzimática (Atack y col, 1986). De hecho, los datos de actividad colinesterasa del córtex

parietal homogeneizado con Triton X-100 (0.5% v/v) son de 30  $\mu\text{mol/h/g}$  tejido para AChE y 14  $\mu\text{mol/h/g}$  tejido para BuChE, valores próximos a los encontrados por nosotros, 29.7 y 9.9  $\mu\text{mol/h/g}$  de tejido para AChE y BuChE, supuesto que en los medios se ponga Triton X-100 (Tablas III-2 y III-4). Los datos de actividad AChE de sujetos controles en núcleo basal de Meynert, septum, hipocampo y área 40 son 4.8, 1.0, 0.7 y 0.17  $\mu\text{mol/h/mg}$  en medios desprovistos de Triton X-100 (Schegg y col, 1989).

En relación con la actividad BuChE, conviene señalar que a lo largo del desarrollo fetal, dicha actividad se mantiene prácticamente constante (entre las 8 y 22 semanas), con valores máximos y mínimos de 0.27  $\mu\text{mol/h/mg}$  proteína, a la semana 14, y 0.14  $\mu\text{mol/h/mg}$ , a la semana 16, siendo estas diferencias poco significativas estadísticamente (Atack y col, 1987b).

En sujetos adultos, la actividad BuChE de cerebro fué 15  $\mu\text{mol/h/g}$  de tejido fresco, encontrándose este valor, en el rango de los determinados por nosotros.

Antes de terminar este apartado, conviene señalar que una cantidad significativa (30%) de la AChE y BuChE del tejido cerebral se extrae del tejido con medios desprovistos de detergentes. Esta es la fracción de la enzima "naturalmente soluble", término acuñado por el Prof. Plummer para definir la fracción de enzima supuestamente hidrofílica (Vidal y col, 1981a y b; Chai y col, 1981). En cerebro de mamífero, siempre se encuentra una porción de enzima "naturalmente soluble", que alcanza el 15% en cerebro de rata (Vidal y col, 1981a y b) y

un porcentaje similar se obtiene de la sustancia blanca o gris de cerebro de cerdo (Chai y col, 1981).

Es posible extraer cantidades variables de AChE, sin recurrir a detergentes, a partir del cerebro bovino (Hollunger y Niklasson, 1973) y de cerebro de insectos (Devonshire, 1975). Se encuentran también proporciones variables de AChE y BuChE, en forma libre y ligada, en diferentes tejidos como útero, músculo cardíaco, intestino, nervio y músculo esquelético (Varela y Mandel, 1976).

En relación con el carácter hidrofílico o anfifílico de las formas globulares de AChE es importante dejar claro que no hay una correlación directa entre el carácter hidrofóbico o anfifílico de una molécula de AChE determinada y la necesidad de detergente para su solubilización. En ocasiones, un tejido extraído sin detergentes libera una cierta cantidad de enzima que es capaz de interaccionar con detergentes y fosfolípidos comportándose como una proteína anfifílica o hidrofóbica (Toutant y Massoulié, 1987; Moya-Quiles y col, 1992). Es importante establecer si las formas G4 de AChE y BuChE extraíbles del cerebro sin detergentes son hidrofílicas o anfifílicas, ya que en este último caso, es evidente que no serán las mismas que se encuentran en el líquido cefalorraquídeo, por ser aquellas moléculas típicamente hidrofílicas.

#### 4.3. Formas Moleculares de AChE en Cerebro Humano.

Los análisis de sedimentación de los extractos obtenidos en ausencia de detergente o con Triton X-100 son muy parecidos. En ambos casos hay una forma principal de alrededor de 10 S y otra de unos 4 S, que corresponden a las formas G4 y G1 de AChE (Atack y col, 1986). Otra cosa distinta es establecer si las formas G4 extraídas de la membrana con o sin detergentes pertenecen al mismo tipo de moléculas.

El término hidrofóbico se reserva a las proteínas que mantienen sus propiedades sólo en presencia de lípidos o detergentes, mientras que para aquéllas que muestran una zona limitada hidrofóbica y el resto de la molécula es hidrofílico es preferible el término anfotérico o anfifílico (Toutant, 1986).

Las proteínas anfifílicas se caracterizan porque interaccionan con detergentes, lo que hace que según sea la naturaleza del tensioactivo se modifiquen las propiedades hidrodinámicas del conjunto proteína-detergente y por ende cambie el coeficiente de sedimentación de la proteína (Dutta-Choudhury y Rosenberry, 1984; Weitz y col, 1984). De esta manera, con la ayuda del Brij 96, un tensioactivo no desnaturizante, se puede descubrir si la proteína es hidrofílica o anfifílica. Las micelas de AChE y Brij 96 tienen menor densidad que las de Triton X-100, de modo que una forma de AChE anfifílica, que tenga un coeficiente de sedimentación de 5 S en gradientes de densidad preparados con Triton X-100, cambia a 3 S en medios conteniendo Brij 96 (Toutant, 1986).

Los perfiles mostrados en la Fig. III-3 demuestran claramente que tanto la AChE como la BuChE del líquido cefalorraquídeo son proteínas hidrofílicas ( $G_4^H$ ). En cambio, la forma  $G_4$  solubilizada del cerebro sin detergente cambia su coeficiente de sedimentación según los gradientes se preparen sin detergente, con Triton X-100 o con Brij 96 (Fig. III-10). Ello claramente nos indica que se trata de una forma anfifílica ( $G_4^A$ ). Además, también resulta evidente que, en gradientes preparados sin Triton X-100 la enzima no se agrega, las moléculas se mantienen como entidades discretas con un coeficiente de sedimentación próximo al de las moléculas centrifugadas en presencia de Triton X-100 (Fig. III-10). Ello nos lleva a la conclusión de que las moléculas extraídas del tejido sin detergentes pertenecen al tipo  $G_4^A-NA$  ( $G_4$  anfifílicas, no agregantes). En cambio, las moléculas  $G_4$  extraídas de las membranas con Triton X-100 son autoagregantes. Esto se demuestra por el desplazamiento de la actividad a las zonas densas del gradiente de sacarosa en las centrifugaciones realizadas con disoluciones preparadas sin Triton X-100 (Fig. III-18). Ello significa que con toda probabilidad las formas  $G_4$  de AChE extraídas del tejido con Triton X-100 pertenecen al tipo  $G_4^A-A$  ( $G_4$  anfifílicas-agregantes).

De todo lo expuesto se desprende que en el tejido cerebral deben coexistir formas  $G_4^H$ , considerando como tales las formas hidrofílicas secretadas por el tejido al LCR, y moléculas  $G_4^A-NA$  y  $G_4^A-A$ , asociadas a la membrana neural.

Aparte de las diferencias en los gradientes sin

detergentes, los perfiles obtenidos de los extractos preparados sin Triton X-100 y con detergentes son idénticos y superponibles (Figs. III-10 y III-18). Esta es la situación que se presenta, también, en músculo de embrión de pollo (Toutant, 1986) y en extractos de médula espinal, nervios y lóbulos eléctricos de Torpedo (Bon y col, 1988).

Otra posibilidad de comprobar el comportamiento hidrofílico o hidrofóbico de una proteína es analizar si se incorpora o no a liposomas, vesículas lipídicas sintéticas que mimetizan las propiedades de las membranas. En este sentido, la AChE G<sub>4</sub> solubilizada de cerebro de rata, sin detergentes, interacciona con liposomas y además, la actividad de las preparaciones de AChE solubilizada, sin y con Triton X-100, a partir del cerebro de rata dependen de las concentraciones de detergente (Andrés y col, 1990).

También se ha establecido que algunos anticuerpos monoclonales reconocen mejor a la enzima solubilizada del cerebro de rata sin detergentes que a la extraída con Triton X-100 (Rakonczay y Brimijoin, 1986).

Todo ello no hace sino avalar las conclusiones sobre la naturaleza anfifílica diferente de las formas G<sub>4</sub> de AChE liberadas de la membrana sin y con detergentes. Es posible, entonces, que las moléculas G<sub>4</sub><sup>H</sup> del líquido cefalorraquídeo no se relacionen con las G<sub>4</sub><sup>A</sup> o que procedan de ellas por proteólisis. En el Capítulo IV de esta Memoria analizaremos si las tres formas G<sub>4</sub><sup>H</sup>, G<sub>4</sub><sup>A</sup> no agregante y G<sub>4</sub><sup>A</sup> agregante difieren o no, en la dotación de oligosacáridos.



#### 4.4. Formas Enzimáticas de BuChE en Cerebro Humano.

Los resultados obtenidos por análisis de la sedimentación de las formas de BuChE obtenida en medios tamponados sin detergentes muestran que en el tejido hay dos formas principales de 12 y 4.5 S. De acuerdo con Atack (1986, 1987b), dichas formas corresponden a moléculas G<sub>4</sub> y G<sub>1</sub> de BuChE.

Las formas moleculares de BuChE son ligeramente más pesadas que sus homólogas de AChE (Vigny y col, 1978; Razon y col, 1984). Sin embargo, nuestros resultados difieren de los de Atack (1986) por cuanto siempre obtenemos una forma mayoritaria G<sub>4</sub>, tanto si la extracción se realiza sin (Fig. III-13) o con detergente (Fig. III-23) y aquél obtiene proporciones de G<sub>1</sub> mucho más altas, hasta el punto que en córtex parietal ambas formas se distribuyen por igual (Atack y col, 1986).

Al contrario de lo que ocurre con la AChE extraída del tejido sin detergentes, la BuChE solubilizada en las mismas condiciones muestra carácter hidrofílico, ya que su coeficiente de sedimentación no se modifica según la composición del medio (Fig. III-14). Ello implica que estas formas de BuChE son moléculas tipo G<sub>4</sub><sup>H</sup>, similares a las encontradas en plasma humano y líquido cefalorraquídeo.

En lo referente a las moléculas de BuChE obtenidas por extracción del tejido con Triton X-100, conviene señalar que, aparentemente, se obtienen casi los mismos perfiles y son superponibles, si se comparan los procedentes de los extractos obtenidos sin y con detergentes (Figs. III-14 y III-21). Sin

embargo, las formas enzimáticas más abundantes obtenidas con detergentes tienen tendencia a la autoagregación y lo más importante, se desdoblán en dos si los gradientes se preparan con Brij 96 (Fig. III-24).

Estos resultados nos llevan a concluir que en los extractos obtenidos por homogeneización del cerebro en medios con detergentes se liberan dos tipos de formas G4:  $G4^H$  y  $G4^A$  de la BuChE, las primeras siendo, tal vez, formas residuales de las separadas tras el primer tratamiento con tampón salino.

#### 4.5. Efecto del Almacenamiento sobre los Perfiles de Sedimentación de las Formas Enzimáticas.

Este aspecto de nuestra investigación es de capital importancia, si se tiene en cuenta que la relación de formas G4/G1 de AChE va aumentando durante el desarrollo del cerebro humano (Muller y col, 1985; Zakut y col, 1985; Perry y col, 1986).

El nivel de formas G4 de AChE se incrementa en la sinaptogénesis y lo contrario también parece que ocurre. En diversas situaciones patológicas, demencias tipo Alzheimer y en parkinsonianos, se produce pérdida de sinapsis colinérgicas del córtex, estando ello asociado con la degeneración de los axones de las células del núcleo subcortical de Meynert. En estos casos disminuyen los niveles de formas G4, pero se mantienen los de las moléculas G1, disminuyendo entonces la relación G4/G1 (Atack y col, 1983; Perry y col, 1985; Schegg y col, 1990). Se sugiere que los dos tipos de moléculas de AChE

no se localizan en los mismos elementos estructurales, estando las formas G4 concentradas en las terminales colinérgicas presinápticas. Por esto, las áreas ricas en terminales nerviosas presinápticas contienen elevada proporción de formas G4. Ello ocurre en el núcleo caudado donde, aparentemente, la proporción G4/G1 es mayor que en cualquier otra área cerebral (Atack y col, 1986).

Para poder utilizar la relación de las formas G4/G1 como un índice de la degeneración cerebral, conviene conocer en qué medida se produce la alteración de esta relación si las muestras se mantienen almacenadas.

Se comprueba que bastan 48 horas de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  para que las formas G4 obtenidas del cerebro sin detergentes, se inactiven parcialmente y aumente la proporción de formas G1 por degradación de las moléculas tetraméricas (Figs. III-11, III-12, III-19, III-20). Es importante reseñar que estas inactivaciones e interconversiones se producen en muestras obtenidas con una mezcla de compuestos que reducen las acciones de proteasas intracelulares. Con todo, queda bien claro que estas acciones proteolíticas se producen incluso en presencia de los agentes inhibidores de proteasas. Parece, en cambio, que las formas G4 de la BuChE solubilizada sin detergentes es menos sensible a la acción proteolítica que las moléculas de AChE (Figs. III-15 y III-16).

Además, se ha comprobado que los procesos de interconversiones de formas enzimáticas no se logran evitar incluso por almacenamiento de cerebros de rata intactos o de las suspensiones de membranas en nitrógeno líquido (Payner y

col, 1987). Ello supone que se han de extremar las precauciones a la hora del almacenamiento de las muestras de tejido cerebral, y en todo caso conviene realizar las extracciones de la enzima lo antes posible, como máximo a las 24-48 horas de la obtención de las muestras de los pacientes. A efectos de diagnóstico, siempre habrá que utilizar muestras de cerebro de sujetos normales almacenadas en las mismas condiciones que las procedentes de los pacientes con posibles defectos neurodegenerativos.

CAPITULO IV

INTERACCION DE LAS COLINESTERASAS DEL  
LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO CON LECTINAS  
Y COMPARACION CON LA DE LAS ENZIMAS  
DEL PLASMA Y CEREBRO HUMANO.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Las Colínesterasas son Glicoproteínas.

Es un hecho comprobado que la AChE de diferentes tejidos de una misma especie animal y del mismo tejido en animales distintos es una glicoproteína. La enzima del órgano eléctrico de peces y la de la membrana del eritrocito contiene un 15% de carbohidratos (Bon y Massoulié, 1976; Niday y col, 1977). La unión de la enzima a la concanavalina A (Con A) inmovilizada se ha empleado con éxito para conseguir un cierto grado de purificación de la enzima (Rakonczay y col, 1981; Zanetta y col, 1981; Randall y col, 1987). Mediante lectinas se ha podido estudiar el procesamiento y tránsito de las formas moleculares desde el retículo endoplásmico, al sistema Golgi y a la membrana plasmática de las células musculares de ave (Rotundo, 1984b).

La importancia del análisis de la estructura de las cadenas de carbohidrato unidas a las proteínas, radica en la participación de los oligosacáridos en los procesos de reconocimiento, entre los que cabe señalar la adhesión entre células, de células a la matriz extracelular y los procesos de reconocimiento celular. Está plenamente aceptado el importante papel que juegan los carbohidratos como marcadores de diferenciación y como determinantes antigénicos (Kean, 1982; Rosner y col, 1982).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune con capacidad de aglutinar células y de precipitar

carbohidratos complejos. Poseen una especificidad definida para unirse a glicanos de composición variable sin modificarlos (Liener y col, 1986). En la Tabla IV-1 se muestra la especificidad de algunas lectinas hacia determinados oligosacáridos. Las lectinas juegan un papel muy importante en los procesos de reconocimiento celular, adhesión y movilidad (Liener y col, 1986; Brandley y Schanaar, 1986) y constituyen un medio muy eficaz para investigar la naturaleza y el significado biológico de los carbohidratos en las glicoproteínas.

### 1.2. Sitios de Glicosilación de las Colinesterasas.

En las glicoproteínas, los restos de carbohidrato se encuentran unidos covalentemente a las cadenas polipeptídicas a través de dos tipos de enlaces: O-glicosídicos y N-glicosídicos. En el primer caso, se establece el enlace covalente entre el oxígeno del hidroxilo de la serina o treonina y la N-acetil-D-galactosamina (NAcGal) de la cadena lateral. Esta es la situación que se presenta, por ejemplo, en la mucoproteína submaxilar. En el enlace N-glicosídico, se une covalentemente un resto N-acetil-D-glucosamina (NAcGlc) del resto del oligosacárido con el nitrógeno amídico de un resto de asparagina de la cadena polipeptídica (Lis y Sharon, 1986). Esto es lo que ocurre en la ovoalbúmina y en las inmunoglobulinas.

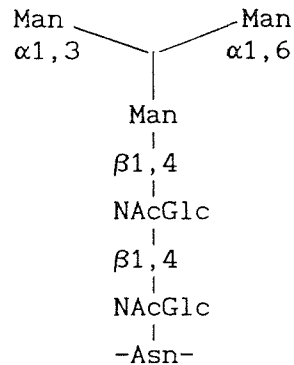
Los oligosacáridos unidos al polipéptido a través de uniones N-glicosídicas contienen un "núcleo pentasacarídico"

TABLA IV-1

Fuente lectina	Especificidad	
	Monosacárido	Oligosacárido
<i>Canavalia ensiformis</i> (Con A)	$\alpha$ -D-Manosa $\alpha$ -D-Glucosa	
<i>Lens culinaris</i> (LCA)	$\alpha$ -D-Manosa	Fuc( $\alpha$ 1,6)-NacGlc-( $\beta$ 1,4)NacGlc-Man <sub>3</sub>
<i>Ulex europaeus</i> I (UEA)	$\alpha$ -L-Fucosa terminal	
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	Galactosa penúltima o terminal	Gal-( $\beta$ 1,3)-NacGal
<i>Vicia villosa</i> (VVA-B4)	NacGal terminal	NH <sub>2</sub> -Ser-(Pro) <sub>2</sub> -Gly-(Aa) <sub>2</sub> -ThrCOOH     NacGal $\alpha$ NacGal $\alpha$
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	NacGal terminal	NacGal $\alpha$ 3NacGal
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	NacGlc interna o terminal Ac.Siálico terminal	NacGlc $\beta$ 4NacGlc $\beta$ 4Glc
<i>Limulus polyphemus</i> (LL)	Ac. Siálico	
<i>Ricinus communis</i> I (RCA-I)	Galactosa penúltima o terminal	D-Gal-( $\beta$ 1,4)-NacGlc



común, formado por tres manosas y dos restos de NAc-Glc. Los azúcares restantes se ligan a este núcleo común de diversas maneras, dando paso a una enorme variedad de estructuras polisacarídicas encontradas en las glicoproteínas (Kornfeld y Kornfeld, 1985).



#### Núcleo pentasacarídico común

Los oligosacáridos preformados se incorporan a restos de asparragina de determinadas secuencias polipeptídicas. La transferencia se produce en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y los sitios potenciales o actuales de glicosilación siempre se encuentran en una secuencia consenso característica, Asn-X-Ser/Thr. Esta secuencia es común en todas las proteínas N-glicosiladas, donde X indica cualquier aminoácido que no sea la prolina.

En la Fig IV-1 se muestra un esquema del procesamiento enzimático de las cadenas oligosacarídicas unidas a las glicoproteínas vía asparragina y la localización intracelular de las reacciones. El proceso empieza con la transferencia del oligoglucano precursor ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ ) desde el lípido

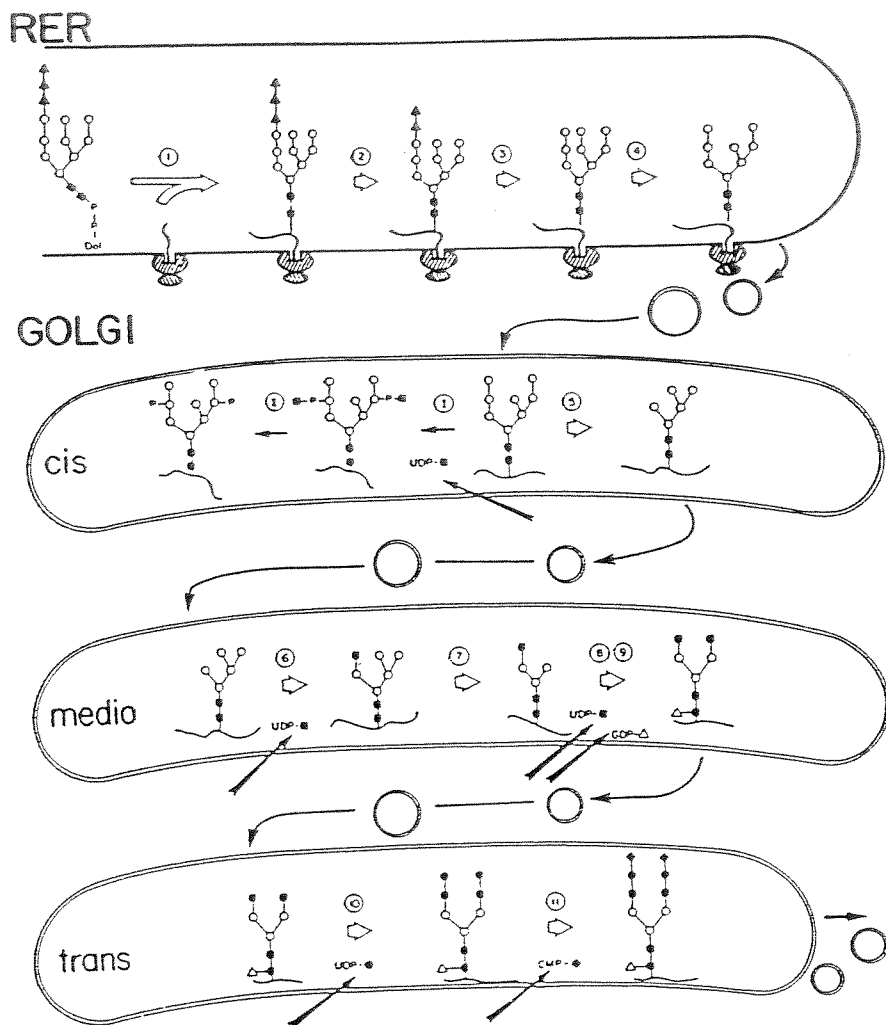


Fig IV-1. Ruta de procesamiento de los oligosacáridos de la glicoproteínas N-glicosiladas.

Los símbolos representan: ■, NAcGlc; o, manosa; Δ, Glc; Δ, fucosa; ●, Gal; ◆, ac. siálico. Las reacciones son catalizadas por los siguientes enzimas: (1) oligosacaridiltransferasa, (2) α-glucosidasa I, (3) α-glucosidasa II, (4) α 1,2-manosidasa del RE, (I) N-acetilglucosaminidilfosfo-transferasa, (II) N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster-α-N-acetilglucosaminidasa, (5) α-manosidasa I del Golgi, (6) N-acetilglucosaminidiltransferasa I, (7) α-manosidasa II del Golgi, (8) N-acetilglucosaminidiltransferasa II, (9) fucosiltransferasa, (10) galactosiltransferasa, (11) sialiltransferasa.

donador (dolicol) a la asparragina de un polipéptido en crecimiento, el cual se incorpora al lumen del retículo por el transporte vectorial del péptido en crecimiento a través de la membrana del orgánulo (Kornfeld y Kornfeld, 1985).

Se ha establecido que la subunidad catalítica de la AChE de *Torpedo* contiene 4 sitios con las secuencias consenso de glicosilación (Schumacher y col, 1986; Sikorav y col, 1987) pero se desconoce si todos los sitios se encuentran realmente glicosilados. La ChE sérica humana contiene nueve sitios de N-glicosilación y la de ratón contiene siete. De estos sitios, algunos coinciden con los de glicosilación de la AChE, posición 59 de la AChE de *Torpedo*, de bóvido, ratón y *Drosophila* y de la BuChE humana y bovina; otros sitios son exclusivos de la BuChE, o de la AChE (Rachinsky y col, 1990). Las cadenas de carbohidratos representan el 24% del peso de la ChE de suero humano (Lockridge y La Du, 1986).

El propósito de este trabajo fué explorar los azúcares terminales de las cadenas de oligosacáridos de la AChE y BuChE del líquido cefalorraquídeo, plasma y cerebro humano para intentar establecer el verdadero origen de las enzimas del líquido cefalorraquídeo.

## 2. MATERIALES Y METODOS.

### 2.1. Materiales.

En los experimentos que se describen a continuación se han utilizado las siguientes lectinas: Concanavalina A (Con A) y aglutininas de *Lens culinaris* (LCA), *Triticum vulgare* (WGA) y *Ricinus communis* (RCA-I). Estas lectinas se utilizaron en forma libre e inmobilizadas como ConA-Sepharosa, LCA-Sepharosa, WGA-Agarosa y RCAI-Agarosa. Tanto las lectinas libres como las inmobilizadas fueron suministradas por Sigma.

### 2.2. Muestras Investigadas.

Como se comentó en el Capítulo III de la Memoria, en el líquido cefalorraquídeo hay una forma mayoritaria de AChE ( $G_4^H$ ) y la contribución de otras formas es despreciable. Por lo tanto, se decidió utilizar el líquido cefalorraquídeo y considerar la interacción de la AChE y BuChE del LCR con lectinas, como el índice de la asociación de sendas formas  $G_4$  con estas aglutininas. Las muestras de LCR de sujetos normales y de pacientes con meningitis o hidrocefalia se dializaron con tampón Tris, 10 mM, pH 7, 1M NaCl, 50 mM  $MgCl_2$  durante una noche, para eliminar las trazas de azúcares que pudieran contener los LCR y se procedió al análisis de la interacción de las enzimas con lectinas.

Para analizar la interacción de la BuChE plasmática se siguió el mismo procedimiento.

No se separó la forma G<sub>4</sub> de BuChE del plasma humano, sino que tras dializar y diluir de forma adecuada las muestras, se midió la proteína y se les añadió la lectina.

Se procedió también a extraer el córtex cerebral con tampones salinos sin detergente y con medios a los que se había añadido Triton X-100 como se describe en el Capítulo III, epígrafe 2.1 de esta Memoria. Después se separaron las formas moleculares de AChE y BuChE por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, según se comentó anteriormente. Una vez medidas todas las fracciones se juntaron y mezclaron aquéllas que contenían cada forma molecular. Las muestras se dializaron convenientemente frente a tampón Tris-salino, con o sin detergentes, según la procedencia de la muestra. Es absolutamente necesario eliminar la sacarosa de las muestras porque los azúcares previenen la interacción de las lectinas con los restos oligosacarídicos de las glicoproteínas.

### 2.3. Tratamiento de las Muestras con Lectinas Solubles.

En todos los casos, una vez medidas las actividades AChE y BuChE y la proteína de las muestras, por los procedimientos descritos en el Capítulo II, se añadió a las mismas cantidades crecientes de cada lectina (0.01-1 mg/mg de proteína) y se mantuvieron en agitación suave durante 16 h, a 4<sup>0</sup>C incluyendo blancos sin lectina. Después se centrifugaron a 100.000 x g por 30 min, midiendo la actividad colinesterasa en el sobrenadante. Siempre se midió la actividad enzimática, antes de sedimentar los complejos enzima-lectina, para establecer si

la lectina tenía efecto inhibitor sobre las colinesterasas. Las actividades AChE y BuChE, al final del periodo de incubación, representaron 80-90% de la actividad inicial y del valor del control, por lo que no se apreció efecto inhibitor alguno de las lectinas sobre las colinesterasas. Con ello, también se comprobó que las enzimas apenas si se desnaturalizaban durante el periodo de incubación.

Finalmente, se dedujo la capacidad de interacción de las enzimas con las lectinas calculando el porcentaje de actividad enzimática que había sido precipitada con la lectina. Los datos se presentan como porcentajes de la actividad que permanece en disolución, una vez sedimentados los complejos de enzima-aglutinina. El valor 100 se tomó el del control incubado sin lectina.

#### **2.4. Incubación de las Muestras con Lectinas Inmovilizadas.**

Después de dializar las muestras de LCR o de plasma sanguíneo, las últimas se diluyeron alrededor de 200 veces y después se mezclaron con las lectinas inmovilizadas y resuspendidas en 200 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub> y 10 mM Tris, pH 7.0. También se incubaron con lectinas los sobrenadantes obtenidos tras extraer las enzimas de cerebro humano con tampones salinos preparados sin y con detergentes. En este caso, después de medir las actividades AChE y BuChE y la proteína de las muestras se les añadió la lectina sin dializar previamente los extractos de cerebro.

Se añadieron 0.5 ml de resina a 0.5 ml de muestra y las suspensiones se incubaron durante 16 h a 4<sup>0</sup>C, con agitación suave. Las muestras se centrifugaron, a continuación, a 1000 x g en centrífuga clínica y se midió el volumen y las actividades AChE y BuChE en los sobrenadantes.

Los datos se expresan como porcentaje de actividad AChE o BuChE no retenida por las lectinas, respecto a la actividad total del sobrenadante del experimento control, en el que las muestras se incubaron con Sepharosa-4B desprovista de lectina.

### 3. RESULTADOS.

#### 3.1. Interacción de las Colinesterasas del LCR, Plasma y Cerebro con Lectinas Solubles.

La capacidad de las diferentes lectinas para inmunoprecipitar a las colinesterasas del LCR se muestra en las Figs. IV-2 y 3.

En el caso de la AChE, se comprueba que todas las lectinas analizadas son capaces de formar inmunocomplejos con la enzima (Fig. IV-2). Sin embargo, mientras que WGA y LCA son capaces de precipitar casi completamente a la AChE a concentraciones de 1 mg lectina/mg proteína, Con A y RCA muestran menor eficiencia para formar complejos. Es posible, sin embargo, que si se aumentara considerablemente la concentración de lectinas se consiguiera la precipitación completa de la AChE por estas dos últimas lectinas.

Si se analiza la interacción de la BuChE del LCR con las lectinas se comprueba que aunque todas son capaces de precipitar a la enzima, el orden de eficiencia parece ser WGA > Con A > LCA > RCA (Fig. IV-3) La notable afinidad de la WGA por la BuChE probablemente se relaciona con la elevada proporción de restos de ácido siálico que contiene la enzima. Aunque, parece que la RCA es capaz de precipitar parcialmente a la enzima del LCR es posible que se consiga la inmunosedimentación completa si se aumenta más la concentración de lectina.

Del estudio de la interacción de la BuChE plasmática con



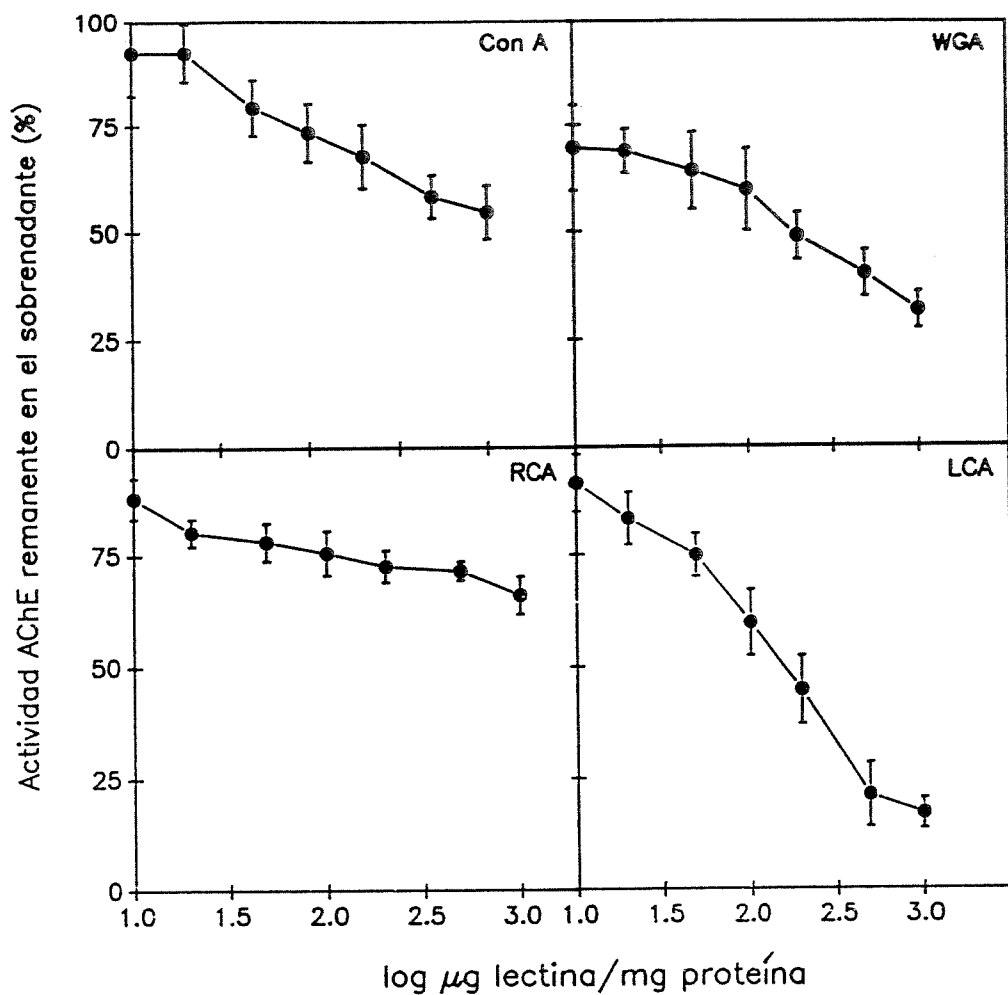


Fig. IV-2. Precipitación de la AChE del LCR con lectinas solubles. Se determinó la actividad y proteína de las muestras dializadas y se les añadió cantidades crecientes de lectinas. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad AChE que permaneció en el sobrenadante después de incubar las muestras durante 16 h y centrifugar los complejos enzima-lectina, respecto a la actividad del control. Los datos son valores promedio de, al menos, cinco experimentos independientes.

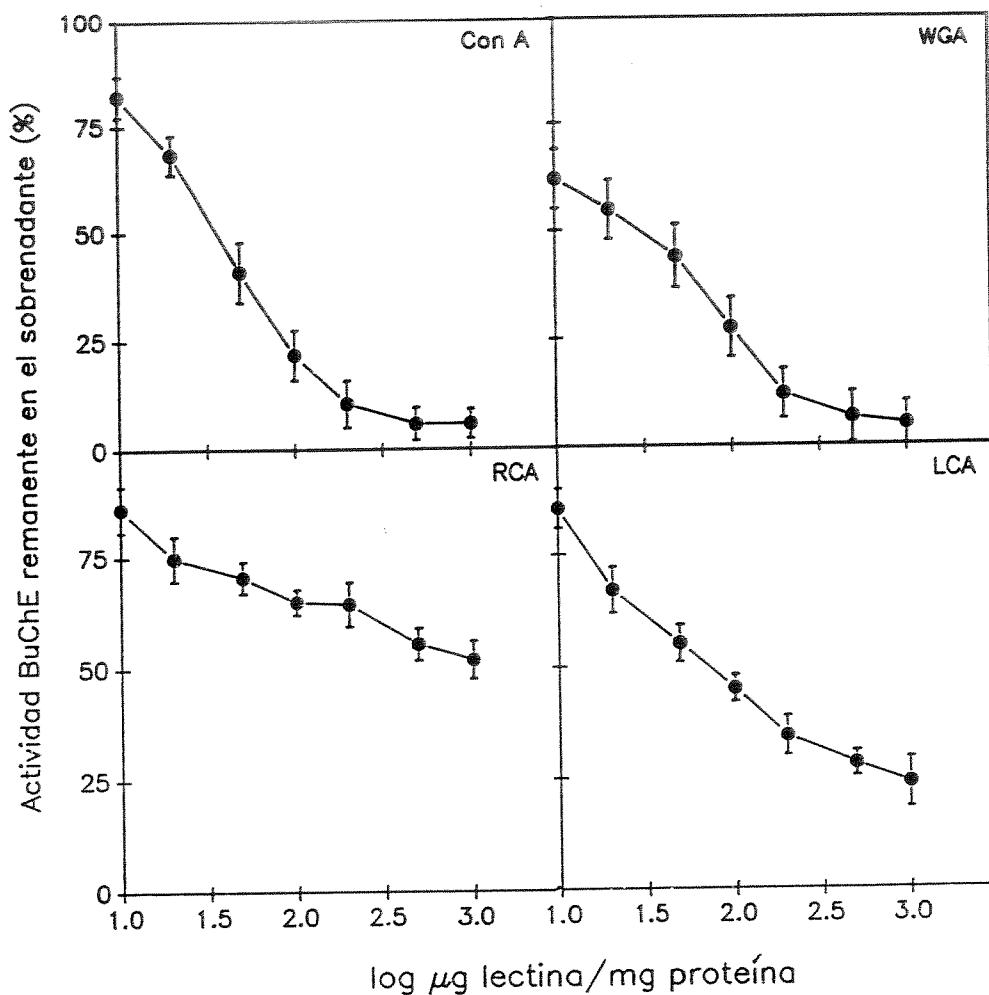


Fig. IV-3. Aglutinación de la BuChE del LCR con lectinas. Las muestras del LCR se dializaron y, después de medir actividad y proteína, se les añadió una cantidad creciente de lectina. Después de incubar las muestras se sedimentaron los complejos formados. Los datos se expresan como en la Fig. IV-2. Los puntos representados son la media y la desviación estándar de, al menos, cinco experimentos separados.

lectinas se desprende que la enzima interacciona fuertemente con WGA, RCA y Con A, mientras que la asociación con LCA comienza a concentraciones de 1 mg de lectina/mg de proteína (Fig. IV-4). Ello querría decir que la afinidad de la lectina por los restos oligosacarídicos de la BuChE es débil, o que otras proteínas del plasma compiten con la enzima para fijar a la LCA.

También se investigó en qué medida las lectinas eran capaces de formar complejos con las enzimas de cerebro. Las Figs. IV-5 y IV-6 muestran la interacción de las formas G4 de cerebro extraídas en medios salinos sin y con detergentes. Con las dos enzimas la situación fué muy parecida. La AChE fué parcialmente precipitada por Con A, LCA y WGA, y muy poco por RCA.

Las formas G4 de BuChE cerebral, extraídas sin y con detergentes tampoco mostraron grandes diferencias en cuanto a su interacción con las lectinas (Figs. IV-7 y IV-8). En este caso, la BuChE fué precipitada casi completamente por WGA, LCA, y Con A, pero, aparentemente, muy poco por RCA.

A la vista de todos los resultados, nos parecía que la AChE del LCR y de cerebro diferían muy poco, en cuanto a la interacción con Con A y LCA, ya que la AChE de las dos fuentes era precipitada por las lectinas en proporciones parecidas. Tampoco eran muy distintas en cuanto a la interacción con RCA, pues en todos los casos, aparentemente, la enzima o no era precipitada o lo hacía en débil medida por la lectina. Parecía, sin embargo que la WGA podía diferenciar la enzima procedente del LCR de la que se obtenía del cerebro.

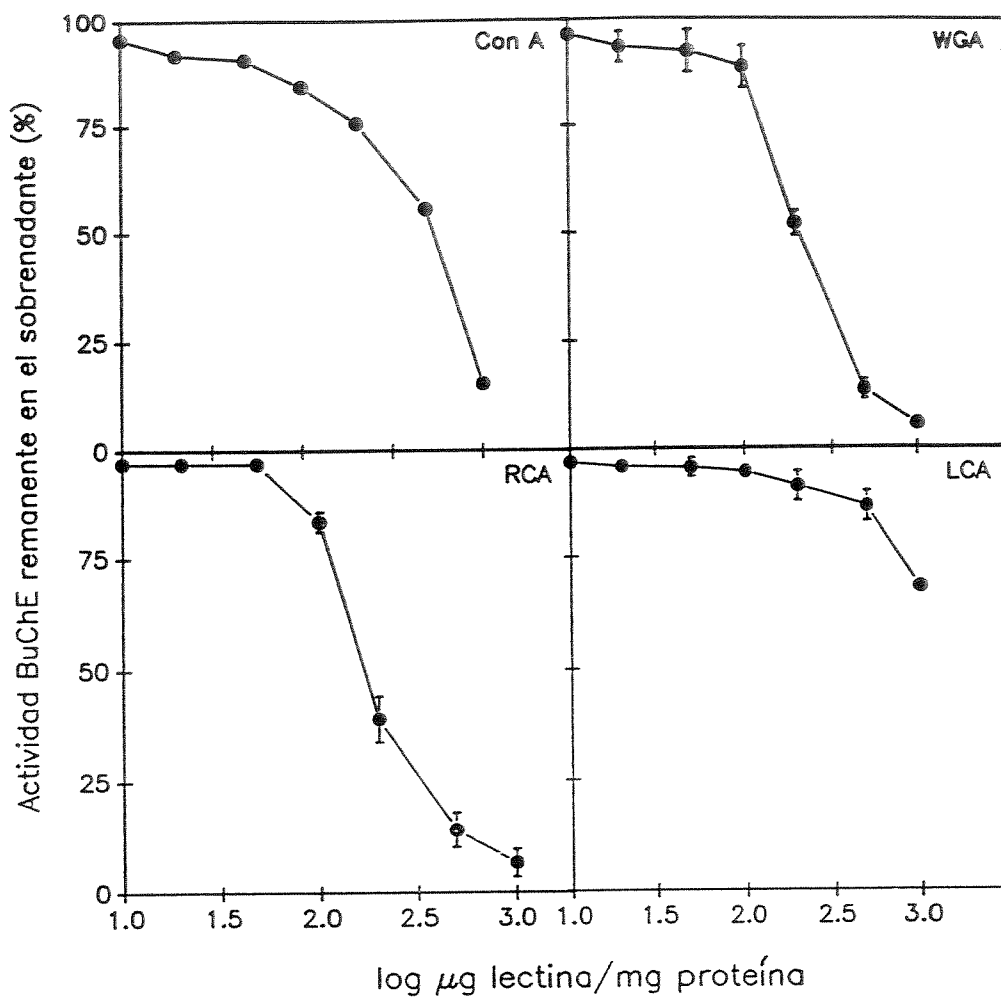


Fig IV-4. Interacción de la BuChE plasmática con lectinas. Muestras de plasma diluidas convenientemente, se mezclaron con lectinas y se incubaron para permitir la formación de complejos enzima-lectina. Después se separaron los complejos y se midió la actividad enzimática en los sobrenadantes. Los datos se expresan como en la Fig. IV-2. Valores promedio de tres experimentos distintos.

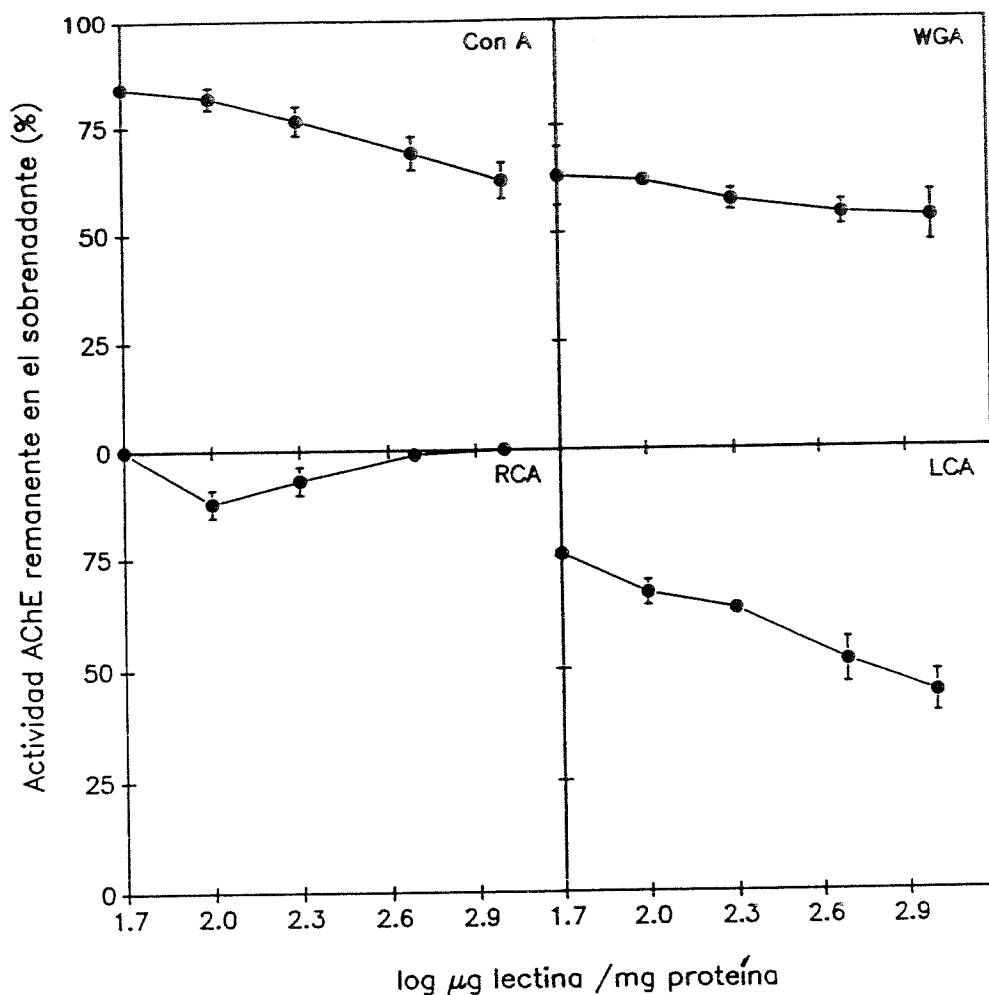


Fig. IV-5. Reacción entre la AChE del encéfalo y lectinas. La enzima del cerebro se extrajo con tampones salinos desprovistos de detergente. Se separó la forma G4 por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa y después se incubaron con lectinas como en los casos precedentes. Los datos se expresan como el porcentaje de actividad AChE que se mide en el sobrenadante respecto a la actividad del control al que no se le añadió lectina. Los puntos son valores medios de tres experimentos.

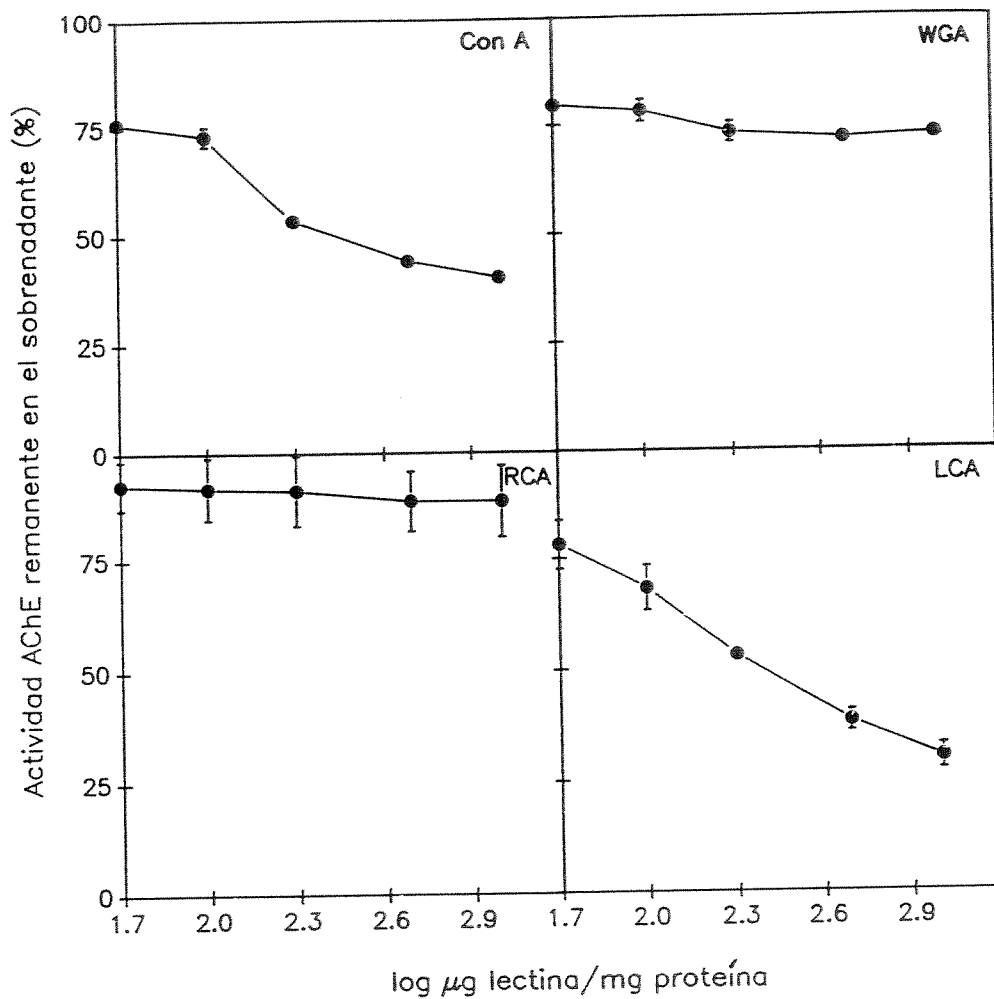


Fig. IV-6. Interacción de la AChE de cerebro humano con lectinas. Muestras de la enzima extraída con Triton X-100 se sometieron a centrifugación con gradientes de densidad. Una vez aisladas las formas G<sub>4</sub>, se dializaron e incubaron con concentraciones crecientes de cada lectina. Los datos se expresan en las figuras anteriores.

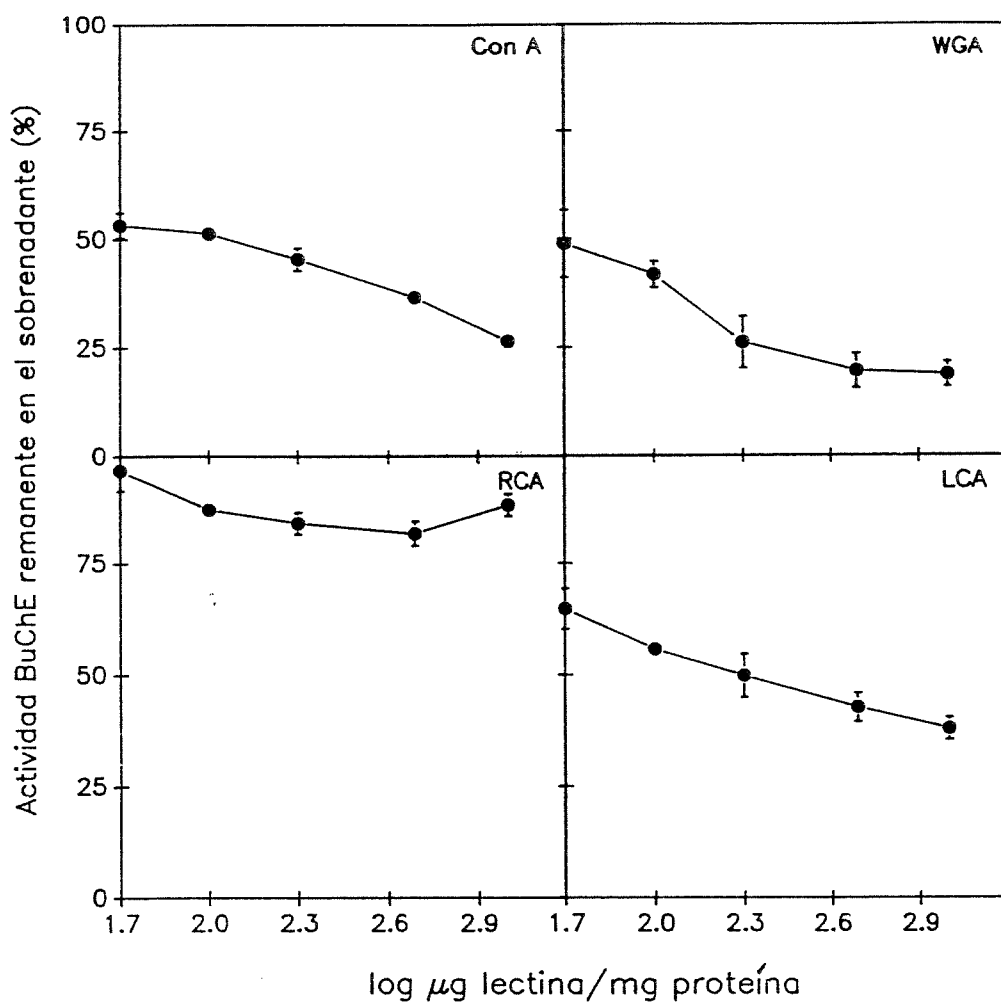


Fig. IV-7. Precipitación de la BuChE de cerebro con lectinas. La enzima solubilizada sin detergentes se centrifugó en gradientes de densidad. La forma G4 aislada y dializada se incubó con concentraciones crecientes de lectinas. Los datos son valores promedio de tres experimentos independientes.

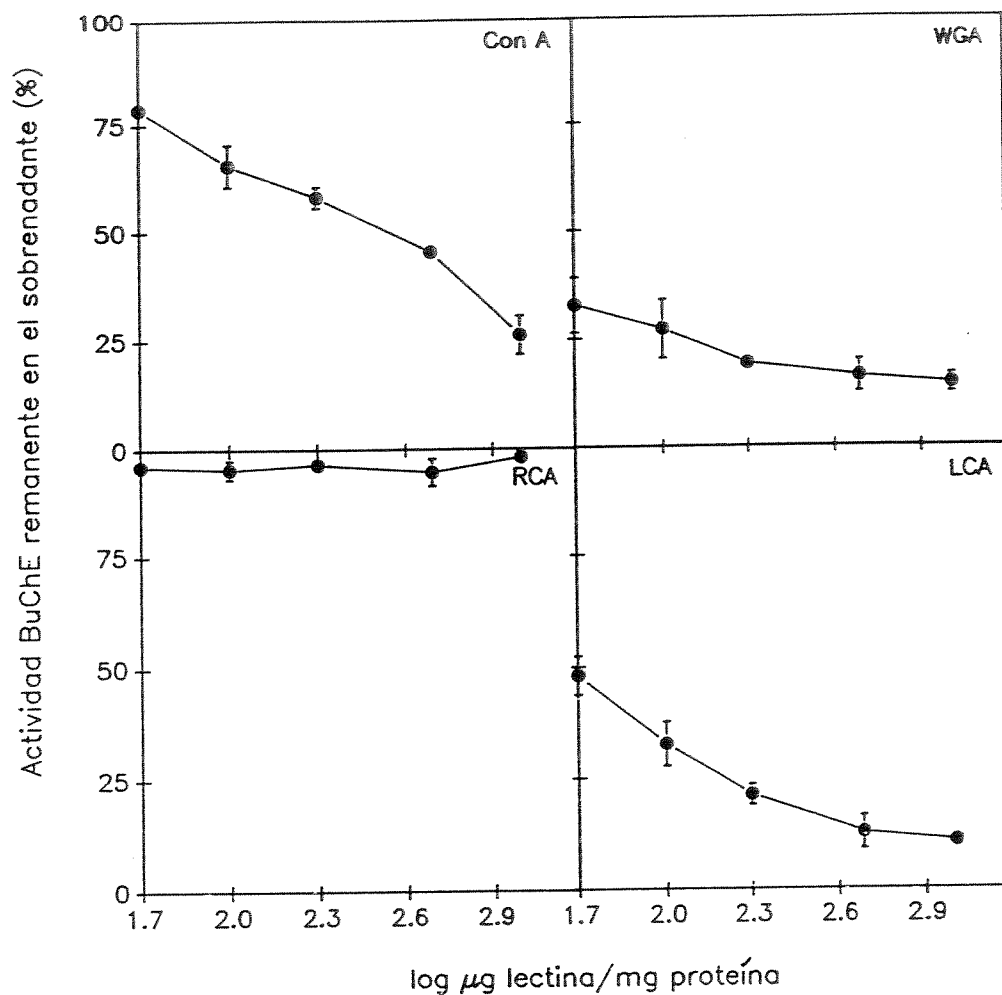


Fig. IV-8. Interacción de la BuChE de cerebro con lectinas. La enzima solubilizada con tampones conteniendo Triton X-100 se centrifugó en gradientes de densidad de sacarosa. Una vez separada la forma G4 se dializó e incubó con las lectinas. Los datos se expresan como en las Figs. IV-1 y 2. Los valores mostrados son promedios de tres experimentos distintos.



Teníamos pues una pista para profundizar en el origen real de la AChE del LCR.

Por lo que se refiere a la BuChE de los diferentes medios investigados, vimos que en todos los casos la enzima era reconocida por WGA, Con A y LCA, pero parecía probable que RCA pudiera distinguir entre la BuChE del plasma, con la que interaccionaba fuertemente, y la del LCR, a la que precipitaba parcialmente, o del cerebro con la que, aparentemente, no interaccionaba. De esta manera podíamos probar que la BuChE del plasma y del cerebro eran diferentes en cuanto a su dotación de oligosacáridos.

Ello nos hizo repetir los experimentos, pero esta vez con enzimas inmovilizadas y a saturación en el medio ya que la concentración de ligandos en las Agarosas empleadas es muy elevada (2-14 mg lectina/ml gel).

### **3.2. Interacción de las Colínerasas del LCR, Plasma y Cerebro con Lectinas Inmovilizadas.**

Los resultados de la incubación de las muestras de LCR, plasma y de los extractos enzimáticos de cerebro obtenidos con tampones salinos sin y con detergentes se presentan en la Tabla IV-2. En ella queda patente que la AChE del líquido cefalorraquídeo y la de cerebro difieren en cuanto a la interacción con las cuatro lectinas utilizadas, aunque las diferencias no permiten asegurar que la enzima del LCR, hidrofílica, es glicosilada de manera distinta de la del cerebro, mayoritariamente hidrofóbica.

Tabla IV-2. Interacción de las Colinesterasas Humanas de Distintas Fuentes con Lectinas Inmovilizadas.

Fuente	ChE Cerebro soluble sin Triton		ChE Cerebro soluble con Triton		Plasma		LCR (1)		LCR (2)		
	AChE	BuChE	AChE	BuChE	BuChE	AChE	BuChE	AChE	BuChE	AChE	BuChE
Lectina											
ConA	25	30	10	15	0	0	0	0	0	0	0
LCA	35	30	15	15	0	0	0	0	0	0	0
WGA	35	20	25	20	0	0	5	0	0	0	0
RCA	90	80	75	100	5	5	90	55	90	10	10

Los datos representan los porcentajes de actividad AChE y BuChE que permanecen en el sobrenadante después de retirar los complejos enzima-lectina. El valor 100% de actividad AChE y BuChE se considera el valor de las actividades encontradas en los sobrenadantes tras incubar las muestras con Sepharose 4 B. LCR (1) y (2) proceden de sujetos normales y de niños con meningitis bacteriana, respectivamente. Los resultados son la media de cuatro experimentos separados con LCR distintos y con determinaciones enzimáticas efectuadas por triplicado. Las desviaciones estándares se sitúan en torno al 5-10% en todos los casos.

Las diferencias entre la BuChE del LCR, de plasma y cerebro, en cuanto a la capacidad de ser fijadas por las lectinas es diferente, siendo la RCA la que mejor permite diferenciar entre la enzima del LCR, con la que RCA interacciona parcialmente (BuChE-RCA<sup>±</sup>), la de plasma, que es completamente retenida por RCA (BuChE-RCA<sup>+</sup>) y la de cerebro que apenas si se asocia a la lectina (BuChE-RCA<sup>-</sup>).

Según lo expuesto, cabría pensar que en aquellas situaciones patológicas donde se debilita la barrera hematoencefálica y por ende se incrementa el tránsito de componentes plasmáticos al LCR, aumentará también la proporción de BuChE-RCA<sup>+</sup> en el LCR en relación con las proporciones encontradas en el medio procedente de individuos normales. En la Tabla IV-2 se muestran los datos de la interacción con lectinas del líquido cefalorraquídeo de niños aquejados con meningitis.

Los resultados indican que el grado de interacción de la BuChE del LCR de los enfermos, con RCA es muy parecido al obtenido con la BuChE plasmática y diferente de los datos sobre la interacción de la lectina con la enzima del cerebro.

En la actualidad estamos investigando las proporciones relativas de la BuChE-RCA<sup>+</sup> en el LCR de sujetos con otros trastornos neurológicos para ver si en estas situaciones también aumenta el paso de componentes del plasma al líquido cefalorraquídeo.

#### 4. DISCUSSION.

Como era previsible, tanto la AChE como la BuChE del LCR, plasma humano y cerebro están fuertemente glicosiladas, siendo ello un rasgo característico de todas las colinesterasas investigadas. Sin embargo, la dotación de oligosacáridos que posea la AChE será distinta de la que contenga la BuChE. Además, cada una de las formas moleculares de AChE interacciona de manera diferente con determinadas lectinas. Así, mediante experimentos de pulso y captura realizados en cultivos de células de músculo de ave, se comprueba que inmediatamente después de la síntesis todas las moléculas de AChE interaccionan con Con A. A los 60 min, alrededor del 40% de las moléculas se ligan a WGA, y a los 120 min, un 10% de las moléculas se fijan sobre RCA (Rotundo, 1984b; Rotundo, 1989). Ello se interpreta por el autor en el sentido de que todas las moléculas de AChE pasan por el retículo endoplásmico donde experimentan glicosilación con manosas, algunos monómeros se convierten en tetrámeros y pasan por el Golgi donde adquieren oligosacáridos complejos. Los tetrámeros se convierten en formas asimétricas que se glicosilan más ampliamente y por ello interaccionan con RCA.

En los microsomas musculares de conejo, la AChE se asocia fuertemente a la membrana, siendo necesario el empleo de detergentes para su solubilización (Cánovas-Muñoz y col, 1990a). En los extractos hay formas globulares, G<sub>1</sub> y G<sub>4</sub>, y formas asimétricas de AChE, pero mientras que las formas G<sub>1</sub> no son reconocidas por LCA, las G<sub>4</sub> precipitan parcialmente con la

lectina y las asimétricas son sedimentadas completamente por LCA (Cánovas-Muñoz y col, 1990b).

La AChE de eritrocito de *Torpedo* (G2) interacciona un 20% con WGA y alrededor del 10% con LCA. La misma forma del nervio motor de *Torpedo* reacciona un 10% con WGA y 90% con LCA (Bon y col, 1988). Las formas asimétricas de *Torpedo* interaccionan un 100% con WGA y un 30% con LCA, pero las del lóbulo eléctrico no reaccionan con WGA y alrededor del 30% con LCA (Bon y col, 1988). Ello quiere decir que dos isoformas, moléculas G2 de AChE por ejemplo, de dos tejidos diferentes, dentro de un mismo animal, interaccionan de modo distinto con lectinas. Todo ello sucede a pesar de que el gen que codifica a la AChE de vertebrados es único.

Evidentemente, en cada tejido el procesamiento de los restos oligosacarídicos puede ser distinto y de ahí se deriva tal vez una estructura terciaria específica para cada forma en el tejido. Pequeñas modificaciones en los restos de los oligosacáridos pueden producir cambios de la estructura de la subunidad enzimática que faciliten o dificulten el acceso de las lectinas a los huecos internos o proyecciones externas donde se alojen los oligosacáridos. Un ejemplo de cuanto decimos lo constituye la AChE G2 del eritrocito bovino y la G4 del núcleo caudal del mismo animal. En el primer caso, alrededor de tres cadenas oligosacarídicas están ligadas al polipéptido de la subunidad, a través de enlaces N-glicosídicos. En el segundo caso no se conoce el número de cadenas unidas. La enzima de eritrocito se puede desglicosilar por endoglicosidasas muy fácilmente perdiendo 19 kD, sin

perdida aparente de actividad. En cambio, la enzima de cerebro pierde sólo 8 kD por tratamientos con endoglicosidasas, pero la desglicosilación sólo es posible una vez que las subunidades se han desplegado por tratamientos con agentes reductores y dodecilsulfato sódico (Heiden y col, 1991).

En esta misma línea, el anticuerpo monoclonal 2G8 es específico para un oligosacárido de la subunidad catalítica de la AChE de *Torpedo*, pero reacciona inmunológicamente con la enzima de cerebro de rata, cerebro bovino y humano (Liao y col, 1991). Ello indica que el epítipo contra el que se dirige el anticuerpo se ha conservado muy bien a lo largo de la evolución. El anticuerpo no reacciona, sin embargo, con la AChE de eritrocito bovino o humano.

La secuencia de aminoácidos de la AChE humana tiene tres sitios potenciales de N-glicosilación (Soreq y col, 1990), también la de ratón tiene tres, la de buey cuatro y la de *Torpedo* cinco (Rachinsky y col, 1990), pero la composición de carbohidratos de las formas moleculares de la enzima humana todavía se desconoce.

La AChE del tejido cerebral y la del LCR, se parecen mucho en cuanto a la interacción con las cuatro lectinas analizadas. La mayor interacción de la AChE del LCR con Con A, LCA y WGA, en comparación con la enzima de cerebro, sugiere que la accesibilidad de las lectinas a los restos carbohidrato de la enzima se ve más favorecido en el primer caso. Ello apoyaría la idea de que la AChE del LCR no procede de la del cerebro por proteólisis sino que sigue una vía de secreción regulada o constitutiva, específica. Las propiedades

anfifílicas de la AChE de tejido cerebral frente a las hidrofílicas de la del LCR también favorecen esta alternativa.

El origen de la AChE del LCR puede ser muy diverso. Parte de la enzima podría proceder de los ganglios basales entre los que se incluyen el núcleo caudado, putamen, globus pallidus, núcleo subtalámico y sustancia negra (Taylor y col, 1988; Greenfield, 1991) donde se localizan neuronas colinérgicas intrínsecas. Otra parte de la AChE podría ser secretada de los núcleos colinérgicos del cerebro anterior y del cerebelo (Appleyard y col, 1988). Posiblemente también, parte de la enzima se libere desde neuronas de la médula espinal (Oh y col, 1977). De hecho, la médula espinal contiene 1.5-4 veces más AChE que las áreas corticales (Atack y col, 1986).

Por tanto el LCR contiene más AChE en las fracciones de la región caudal que en las de la rostral, lo que confirma que en los sujetos jóvenes la enzima liberada por la médula espinal contribuye de manera importante al total de la actividad AChE del LCR lumbar. Igual ocurre con el contenido de BuChE y proteína ya que su concentración sigue un gradiente siendo más abundantes en las porciones rostrales que en las caudales del LCR (Atack y col, 1990). El gradiente de AChE se disipa en el LCR de ancianos, pero no el de BuChE y proteína. Ello tal vez se deba al aumento del flujo de AChE desde las regiones cerebrales como consecuencia de la dilatación del área de la superficie ventricular del tejido cerebral parcialmente atrofiado en los ancianos (Atack y col, 1990).

Parece seguro que cualquiera que sea el origen de la AChE de LCR, ésta habrá de ser distinta de la contenida en el

tejido cerebral, ya que la enzima extraída de este tejido manifiesta propiedades anfifílicas, mientras que la del LCR es hidrofílica.

La AChE y la BuChE están codificadas por dos genes diferentes (Gnatt y col, 1991). La BuChE humana del plasma contiene nueve sitios de N-glicosilación. Los 574 aminoácidos de la secuencia proporcionan un peso molecular de 65.094 (Lockridge y col, 1987a). Las nueve cadenas de carbohidrato contribuyen con un peso adicional del 24%, con lo que el peso de la subunidad completa es de 85.534. El peso molecular del tetramero G<sub>4</sub> es de 348.000, aproximadamente. Cada tetramero enzimático contiene alrededor de dos restos de ácido siálico terminal, aún cuando las cadenas pueden ser bi, tri o tetraantenarias. Ello supone que la forma G<sub>4</sub> de BuChE tiene en su periferia 72 cargas negativas. De la abundancia de restos de ácido siálico se deduce la fuerte interacción que muestran las moléculas con WGA. Alrededor del 10% en peso de cada subunidad es galactosa + manosa, 84% acetil-hexosaminas, 6% acetil-neuramínico y 0.2% fucosa. Ello supone alrededor de 50 restos de galactosa+manosa por subunidad, 35 acetil-hexosaminas, 18 restos de ácido siálico y 1.2 restos de fucosa por cada subunidad (Lockridge, 1990).

No se conoce cómo es la glicosilación de la BuChE de cerebro y sólo se sabe que la enzima se localiza en regiones cerebrales no relacionadas con la AChE, células del endotelio de los capilares, células gliales y neuronas (Graybiel y Ragsdale, 1982).

Como ocurre en el caso de la AChE de distintos tejidos,



es posible que el procesamiento de la subunidad de BuChE en hígado, donde parece que se sintetiza la enzima plasmática (Svensmark, 1963), sea diferente del de la subunidad de la enzima del cerebro, sea cual sea su verdadero origen, glía o neurona. La menor interacción de la BuChE cerebral con RCA, en comparación con la enzima plasmática, indica que o bien la enzima de cerebro está desprovista de galactosa terminal en el extremo de las cadenas de oligosacáridos o si contienen dicho azúcar terminal, el acceso de la lectina a las galactosas terminales es más difícil que en la enzima plasmática. En todo caso, al líquido cefalorraquídeo parece que llegarían los dos tipos de BuChE, la que interacciona fuertemente con RCA (BuChE-RCA<sup>+</sup>), que probablemente procede del plasma y la que no interacciona con RCA (BuChE-RCA<sup>-</sup>) que se libera desde el tejido cerebral. En la medida en que se produzca un aumento de la permeabilidad vascular se incrementará la proporción de BuChE que interacciona con RCA. Por ello, en los sujetos con meningitis se produce la completa interacción de la BuChE con la lectina, ya que durante la enfermedad es posible que la BuChE plasmática que ha penetrado en los ventrículos cerebrales supere a la actividad liberada por el tejido nervioso.

Es posible que también se haga patente un aumento de la BuChE-RCA<sup>+</sup> en el LCR como consecuencia de una trombosis, o en casos de encefalitis o por la aparición de tumores cerebrales. Todo ello está siendo estudiado actualmente por el equipo de investigación de la Universidad de Murcia.

## CONCLUSIONES

1. El líquido cefalorraquídeo de los sujetos normales contiene actividad AChE y BuChE. La expresión de la actividad de estas enzimas depende de la edad del sujeto, de modo que la actividad AChE aumenta con la edad en el intervalo entre 8 y 78 años, según la ecuación  $y = 0.127 x + 9.10$ . También la actividad BuChE del LCR aumenta según la edad del sujeto, de acuerdo con la ecuación  $y = 0.054 x + 5.01$ . Ello habrá de tenerse en cuenta antes de referirse a un cambio de la actividad AChE o BuChE del LCR como consecuencia de una situación fisiológica o patológica concreta.

2. Los datos de actividad AChE obtenidos por aplicación de los métodos convencionales y de inmunoensayo son prácticamente iguales. Ello garantiza la validez de los datos obtenidos, al tiempo que pone de manifiesto la existencia de epítomos comunes en la AChE de eritrocitos, utilizada para generar los anticuerpos, y la enzima de LCR.

3. En el líquido cefalorraquídeo humano hay una forma principal de AChE con un coeficiente de sedimentación de 10.5-11.0 S. La actividad BuChE se debe a la presencia en el LCR de una forma predominante de 11.5-12.0 S. Dichos coeficientes corresponden a formas globulares tetraméricas, moléculas G<sub>4</sub>, tanto de AChE como de BuChE. Ambas enzimas muestran el comportamiento típico de las moléculas hidrofílicas y lo mismo le sucede a la forma G<sub>4</sub> de la BuChE del plasma humano.

4. El córtex cerebral humano contiene la AChE distribuida en

dos fracciones: la que se extrae de la membrana sólo con medios salinos, 20-25% del total de la actividad, y la que requiere detergentes para su solubilización, 55-60%. Igual le ocurre a la BuChE del cerebro.

5. La AChE extraída del cerebro sin detergentes se distribuye en dos formas principales de coeficientes de sedimentación 10-11 S y 4-4.5 S, que corresponden a formas G<sub>4</sub> y G<sub>1</sub>, respectivamente. Ambas moléculas son anfifílicas ya que sus propiedades hidrodinámicas varían según el detergente con el que interaccionen.

La enzima fuertemente ligada a la membrana se solubiliza con detergentes y se distribuye en dos formas principales G<sub>4</sub> y G<sub>1</sub>. Las moléculas G<sub>4</sub> extraídas con detergentes, a diferencia de las moléculas G<sub>4</sub> liberadas con tampones salinos, muestran fuerte tendencia a la autoagregación.

6. La BuChE, extraída del cerebro sin tensioactivos consiste en una mezcla de moléculas G<sub>4</sub> y G<sub>1</sub>, eminentemente hidrofílicas. En cambio, la BuChE solubilizada con detergentes se presenta en dos formas principales, G<sub>4</sub> y G<sub>1</sub>. Los tetrámeros se redistribuyen en dos tipos si la centrifugación se lleva a cabo en gradientes con Brij 96. Ello supone que han de coexistir tetrámeros hidrofílicos y anfifílicos en la BuChE extraída del encéfalo con detergentes.

7. La AChE y BuChE del líquido cefalorraquídeo, plasma y córtex cerebral son glicoproteínas que interaccionan en buena

medida con Con A, LCA y WGA. Parte de la AChE del córtex cerebral y del líquido cefalorraquídeo habrán de proceder de proteínas glicosiladas en el retículo endoplásmico y Golgi de modo distinto pues difieren en su interacción con lectinas, además de mostrar diferencias importantes en el carácter anfifílico.

8. La BuChE plasmática reacciona con RCA-I, pero la de cerebro no es reconocida por la lectina. Ello refleja el distinto procesamiento de los dos tipos de formas G4. Sólo la mitad de las moléculas de BuChE del líquido cefalorraquídeo reacciona con RCA-I, lo que tal vez indique que una parte de la enzima procede del tejido cerebral y otra parte del plasma. En sujetos con meningitis, situación en la que aumenta la permeabilidad vascular a proteínas plasmáticas, casi la totalidad de la BuChE del líquido cefalorraquídeo reacciona con RCA-I. Ello confirma el origen de la BuChE del LCR y permite proponer a la relación  $\text{BuChE-RCA}^+ / \text{BuChE-RCA}^-$  como un índice de la integridad de la barrera hematoencefálica.

BIBLIOGRAFIA

Abderhalden, E. y Paffrath, H. (1925) *Ferment Forschung* 8, 112-113.

Aitken, D.A, Morrison, N.M. y Ferguson-Smith, M.A. (1984) Predictive value of amniotic acetylcholinesterase analysis in the diagnosis of fetal abnormality in 3.700 pregnancies. *Prenat. Diagn.* 4, 329-340.

Albanese, A., y Butcher, L.L. (1979) Locus coeruleus somata contain both acetylcholinesterase and norepinephrine: direct histochemical demonstration on the same tissue section. *Neurosci. Lett.* 14, 101-104.

Aldridge, W.N. y Reiner, E. (1972) En: Enzyme inhibitors as substrates. Vol. 26. Eds. Neuberger, A. y Tatum, E.L. North Holland, Amsterdam.

Alksne, J.F. y White, L.E. (1965) Electron-microscope study of the effect of increased intracranial pressure of the arachnoid villus. *J. Neurosurg.* 22, 481.

Alles, G.A. y Hawes, R.C. (1940) Cholinesterases in the blood of man. *J. Biol. Chem.* 133, 375-390.

Andrés, C., El Mourabit, M., Stutz, C., Mark, J y Waksman, A. (1990) Are soluble and membrane-bound rat brain acetylcholinesterase different?. *Neurochem. Res.* 15, 1065-1072.

Anglister, L. y Silman, I. (1978) Molecular structure of elongated forms of electric eel. *J. Mol. Biol.* 125. 293-311.

Appleyard, M.E., Smith, A.D., Wicock, G.K. y Esiri, M.M. (1983) Decreased CSF activity in Alzheimer's disease. *Lancet.* ii, 452.

Appleyard, M.E., Smith, A.D., Berman, P., Wilcock, G.K., Esiri, M.M., Neary, D. y Bowen, D.M. (1987) Cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer type. *Brain*. **110**, 1309-1322.

Appleyard, M.E., Vercher, J.L. y Greenfield, S.A. (1988) Release of acetylcholinesterase from the guinea-pig cerebellum in vivo. *Neuroscience*. **25**, 133-138.

Arendt, T., Bigl, V., Walther, F. y Sonntag, M. (1984) Decreased ratio of CSF acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase activity in Alzheimer's disease. *Lancet*. **i**, 173.

Arendt, T., Bigl, V., Tennstedt, A. y Arendt, A. (1985) Neural loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. **14**, 1-14.

Arias, S., Rolo, M. y González, N. (1985) Gene dosage effect present in trisomy 3q25.2.Ter for serum cholinesterase (CHE 1) and absent for transferrin (TF) and ceruloplasmin (CP). *Cytogenet. Genet.* **40**, 571-579.

Armstrong, D.M., Saper, C.B., Levey, A.I., Wainer, B.H. y Terry, R.D. (1983) Distribution of cholinergic neurons in rat brain demonstrated by immunochemical localization of acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* **216**, 53-68.

Arpagaus, M., Chatonnet, A., Masson, P., Newton, M., Vaughan, T.A. Bartels, C.F., Nogueira, C.P., La Du, B.N. y Lockridge, O. (1991) Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. *J. Biol. Chem.* **266**, 6966-6974.



Ashford, J.W., Sherman, K.A. y Kumar, V. (1989) Advances in Alzheimer therapy: cholinesterase inhibitors. Meeting report. *Neurobiol. Aging*. **10**, 99-105.

Atack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Perry, R.H., Tomlinson, B.E., Blessed, G. y Fairbairn, A. (1983) Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form. *Neurosci. Lett.* **40**, 199-204.

Atack, J.R., Perry, J.R., Perry, R.H., Wilson, I.D., Bober, M.J., Blessed, G. y Tomlinson, B.E. (1985) Blood acetyl and butyrylcholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *J. Neurol. Sci.* **70**, 1-16.

Atack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Candy, J.M. y Perry, R.H. (1986) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J. Neurochem.* **47**, 263-277.

Atack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Candy, J.M. y Perry, R.M. (1987a) Molecular forms of butyrylcholinesterase in the human neocortex during development and degeneration of the cortical cholinergic system. *J. Neurochem.* **48**, 1687-1692.

Atack, P., Perry, E.K., Bonham, J.R. y Perry, R.H. (1987b) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* **48**, 1845-1850.

Atack, J.R., May, C., Kaye, J.A. y Rapoport, S.I. (1990) Cerebrospinal fluid gradients of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in healthy aging. *Neurochem. Int.* **16**, 533-538.

Augustinsson, K.B. (1963) En: Cholinesterases and Anticholinesterases Agents. Ed. Koelle, G.B. Handb. Exp. Pharmacol., Ergw 15, pp. 89-128. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg.

Austin, L. y Berry, W.K. (1953) Two selective inhibitors of cholinesterase. *Biochem. J.* 54, 695-700.

Bacou, F., Vigneron, P. y Massoulié, J. (1982) Acetylcholinesterase forms in fast and slow rabbit muscle. *Nature*, 296, 661-664.

Barnard, E.A. (1974) En: The peripheral Nervous System. Ed. Hubbard, J.I. pp. 201-224, Plenum Press, New York.

Barnard, E.A., Barnard, P.J., Jarvis, J., Jedrzejczyk, J., Lai, J., Pizzey, J.A., Randall, W.R. y Silman, I. (1984) Proc. 2nd. Int. Meet on Cholinesterases: Fundamental and applied aspects, pp. 49-71, Walter de Gruyter, Berlín.

Becker, R.E. y Giacobini, E. (1988) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of acetylcholinesterase inhibition: can acetylcholine levels in the brain be improved in Alzheimer's disease? *Drug. Develop. Res.* 14, 235-246.

Bender, M.L., Clement, G.E., Kezdy, F.S. y D'Aheck, H. (1964) The correlation of the pH (pD) dependence and the stepwise mechanism of  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed reactions. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 3680-3690.

Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976) Assay of protein in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70, 241-250.

Bering, E.Z. y Sato, O. (1963) Hydrocephalus: changes in formation and absorption of cerebrospinal fluid within the cerebral ventricles. *J. Neurosurg.* 20, 1050.

Bigl, V., Wolf, N.J., Butcher, L.L. (1982) Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res.* 8, 727-749.

Bloom, F.E. y Barnett, R.J. (1966) Fine structural localization of acetylcholinesterase in electroplaques of the electric eel. *J. Cell Biol.* 29, 475-495.

Blow, D.M., Birktoft, J.J. y Hartley, B.S. (1969) Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature.* 221, 337-340.

Bolam, J.P., Ingham, C.A. y Smith, A.D. (1984) The section Golgi-impregnation procedure-3. Combination of Golgi-impregnation with enzyme histochemistry and electron microscopy to characterize acetylcholinesterase containing neurons in the rat neostriatum. *Neurosci.* 12, 687-709.

Bon, S. y Massoulié, J. (1976) Molecular forms of *Electrophorus* AChE; the catalytic subunits: fragmentation, intra and inter-subunit disulfide bonds. *Febs Lett.* 71, 273-278.

Bon, S., Vigny, M. y Massoulié, J. (1979) Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2546-2550.

Bon, S. (1982) Molecular forms of acetylcholinesterase in developing *Torpedo* embryos. *Neurochem. Int.* 4, 577-585.

Bon, S., Toutant, J.P., Meflah, K. y Massoulié, J. (1988a) Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: I. Solubility and aggregation properties. *J. Neurochem.* 51, 776-785.

Bon, S., Toutant, J.P., Meflah, K. y Massoulié, J. (1988b) Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: II. Electrophoretic variants and phosphatidylinositol phospholipase C-sensitive and-insensitive forms. *J. Neurochem.* 51, 786-794.

Bon, S., Bader, M.F., Aunis, D., Massoulié, J., Henry, J.P. (1990) Subcellular distribution of acetylcholinesterase forms in chromaffin cells. Do chromaffin granules contain a specific secretory acetylcholinesterase? *Eur. J. Biochem.* 190, 221-232.

Bonadio, W.A. y Smith, D. (1990) Cerebrospinal fluid changes after 48 hours of effective therapy for *Haemophilus influenzae* Type B meningitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 94, 426-428.

Bradbury, M. (1979) The concept of blood-brain barrier. John Wiley & Sons, Chichester.

Brandan, E. e Inestrosa, N.C. (1987) Co-solubilization of asymmetric acetylcholinesterase and dermatan sulfate proteoglycan from the extracellular matrix of rat skeletal muscles. *FEBS Lett.* 213, 159-163.

Brandley, B.K. y Schnaar, R.L. (1986) Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response. *J. Leukocyte Biol.* 40, 97-111.

Brimijoin, S. (1979). Axonal transport and subcellular

distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in rabbit sciatic nerve. *Molec. Pharmac.* 15, 641-648.

Brimijoin, S., Mintz, K.P. y Alley, M.C. (1983a) Production and characterization of separate monoclonal antibodies to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* 24, 513-520.

Brimijoin, S. (1983b) Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Prog. Neurobiol.* 21, 291-322.

Brimijoin, S. y Lennon, V.A. (1990) Autoimmune preganglionic sympathectomy induced by acetylcholinesterase antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 87, 9630-9634.

Bron, C. y Fasel, C. (1991) Glycolipid-anchored membrane proteins. *Bull. Inst. Pasteur.* 89, 59-69.

Brzin, M., Dettbarn, W. D., Rosenberg, P. y Nachmansohn, D. (1965) Cholinesterase activity per unit surface area of conducting membranes. *J. Cell Biol.* 26, 353-364.

Brzin, M. (1966) The localization of acetylcholinesterase in axonal membranes of frog nerve fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 56, 1560-1563.

Brzin, M., Sketelj, J. y Klinar, B. (1982) Cholinesterases. En: *Handbook of Neurochemistry*, pp. 251-292. Ed. A. Lajtha. Plenum Press. New York.

Burgen, A.S.V. y Chipman, L.M. (1952) The location of cholinesterase in the central nervous system. *Quart. H. Exptl. Physiol.* 37, 61-74.

Burgun, C., Martínez de Muñoz, D. y Aunis, D. (1985) Osmotic fragility of chromaffin granules prepared under isoosmotic or hyperosmotic conditions and localization of acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 839, 219-227.

Butcher, L.L. y Wolf, N.J. (1982) Monoaminergic-cholinergic relationships in the chemical communication matrix of the substantia nigra and neostriatum. *Brain Res Bull.* 9, 475-492.

Bütikofer, P., Kuypers, F.A., Shackleton, C., Brodbeck, U. y Stieger, S. (1990) Molecular species analysis of glycosylphosphatidylinositol anchor of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 265, 18983-18987.

Butler, A.B. (1979). CSF transport mechanism in the arachnoid villus. *Surg. Forum.* 28, 475-476.

Cabezas-Herrera, J., Campoy, F.J. y Vidal, C.J. (1992) Differential effects of ethanol on membrane-bound and soluble acetylcholinesterase from sarcoplasmic reticulum membranes. *Neurochem. Res.* 17, 717-722.

Campoy, F.J., Cánovas-Muñoz, M.D., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1989) Proteolytic stimulation and solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase from sarcotubular system. *Neurochem. Res.* 14, 197-204.

Cánovas-Muñoz, M.D., Campoy F.J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1990a) Amphiphilic and hydrophilic molecular forms of acetylcholinesterase in membranes derived from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1039, 323-330.

Cánovas-Muñoz M.D. y Vidal C.J. (1990b) Interactions between lectins and acetylcholinesterase from the sarcotubular

system of skeletal muscle. *Neurochem. Int.* 17, 35-42.

Cánovas-Muñoz, M.D., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1991) Acetylcholinesterase is orientated facing the cytoplasmic side in membranes derived from sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1076, 259-265.

Carpenter, M.B. (1978) En: Core text of neuroanatomy. 2nd edition. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.

Chai, M.S.Y., Reavill, C.A., Vidal, C.J. y Plummer, D.T. (1981) Molecular forms of acetylcholinesterase present in the white and grey matter of pig brain. *Neurochem. Int.* 3, 311-321.

Chance, B. y Herbert, D. (1950) Catalases and peroxidases. XIV. Enzyme-substrate compounds of bacterial catalase and peroxides. *Biochem. J.* 46, 402-414.

Chatonnet, A. y Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260, 625-634.

Chatonnet, A., Lorca, T., Barakat, A., Aron, E., e Ibilo, O. (1991) Structure of rabbit butyrylcholinesterase gene deduced from genomic clones and from cDNA with introns. *Cell. Molec. Neurobiol.* 11, 119-130.

Chubb, I.W. y Smith, A.D. (1975) Release of acetylcholinesterase into the perfusate from the ox adrenal gland. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 191 B, 263-269.

Chubb, I.W., Goodman, S. y Smith A.D. (1976) Is acetylcholinesterase secreted from central neurons into the cerebrospinal fluid? *Neuroscience.* 1, 57-62.

Chubb, I.W., Pilowski, P.M., Springell, H. J. y Pollard, A. C. (1979) Acetylcholinesterase in human amniotic fluid: An index of fetal neural development? *Lancet*. i, 688-690.

Chubb, I.W., Hodgson, A.J. y White, G.H. (1980) Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. *Neuroscience*. 5, 2065-2072.

Chubb, I.W. y Hodgson, A.J. (1982) Release of non-transmitter substances: specially acetylcholinesterase. *Trends Auton. Pharmacol.* 2, 61-81.

Clark, D.F. y Lenz, D.E. (1983) Characterization of the molecular forms of acetylcholinesterase in discrete areas of the rat brain. *Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biol.* 42, 2024-2028.

Coates, P.M. y Simpson, N.E. (1972) Genetic variation in human erythrocyte acetylcholinesterase. *Science* 175, 1466-1467.

Cohen, J.A. y Oosterbaan, R.A. (1963) En: Cholinesterases and anticholinesterases agents. pp. 299-373. *Hand. Exp. Pharmakol.* Ed. Koelle, G.B. Springer-Verlang. Berlin. Heidelberg.

Coyle, J.T., Price, D.L. y DeLong, M.R. (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. 219, 1184-1190.

Craven, G.R., Steers, E. Jr. y Anfinsen, C.B. (1965) Purification, composition, and molecular weight of the  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 240, 2468-2477.

Cutler, R.W.P., Page, L., Galicich, J. y Water, S. (1968)



Formation and absorption of cerebrospinal fluid in man. *Brain*. 91, 707-720.

Dale, H.H. (1914) The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 6, 147-190.

Davies, P. (1979) Neurotransmitter-related enzymes in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res.* 171, 319-327.

Davies, O.L. y Goldsmith, P.L. (1972) En: Statistical methods in research and production. Ed. 4. Hafner Press. New York.

Davis, K.L., Hollister, L.E., Livesey, J. y Berger, P.A. (1979) Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase in neuropsychiatric disorders. *Psychopharmacology.* 63, 155-159.

Davis, K.L. y Goodnick, P.J. (1983) Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase in neuropsychiatric disorders. En: Neurobiology of cerebrospinal fluid. pp 197-203. Vol. 2. Ed. Wood, J.H. Plenum Press. New York.

Davis, R., y Koelle, G.B. (1978) Electron microscope localization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the superior cervical ganglion of the cat. I. Normal ganglion. *J. Cell Biol.* 78, 785-809.

Davson, H., Welch, K. y Segal, M.B. (1987) En: Physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid. Ed. Churchill Livingstone. Edinburgh.

De la Porte, S., Vallette, F.M., Grassi, J., Vigny, M. y Koenig, J. (1986) Pre-synaptic or post-synaptic origin of acetylcholinesterase at neuromuscular junctions? An immunological study in heterologous nerve-muscle cultures. *Develop.*

Deutsch, S.I. y Campbell, M. (1984) Status of cholinesterase activities in blood in neuropsychiatric disorders. *Neurochem. Res.* 9, 863-869.

Devonshire, A.J. (1975) Studies of the acetylcholinesterase from house flies (*Musca domestica* L.) resistant and susceptible to organophosphorous insecticides. *Biochem. J.* 149, 463-469.

Di Chiro, G. (1964) Movement of cerebrospinal fluid in human beings. *Nature.* 204, 290.

Di Giamberardino, L. y Couraud, J.Y. (1978) Rapid accumulation of high molecular weight acetylcholinesterase in transected sciatic nerve. *Nature (London).* 271, 170-172.

Dickmann, U., Soerensen, K., Wiedmann, T., Mäder, M. y Felgenhauer, K. (1989) Neural acetylcholinesterase in serum and CSF: a prototypic marker for the brain-blood transfer of protein? *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27, 835-838.

Dilsaver, S.C. (1986) Cholinergic mechanism in depression. *Brain Res. Rev.* 11, 285-316.

Direnfield, L.K., Albert, M.L., Volicer, L., Langlais, P.J., Marquis, J. y Kaplan, E. (1984) The possible relationship of laterality to dementia and neurochemical findings. *Arch. Neurol.* 41, 935-941.

Doctor, B.P., Camp, S., Gentry, M.K., Taylor, S.S. y Taylor, P. (1983) Antigenic and structural differences in the catalytic subunits of the molecular forms of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 5767-5771.

Doctor, B.P., Smyth, K.K., Gentry, K.M., Ashni, Y., Christner, C.E., De la Hoz, D.M., Ogert, R.A. y Smith, S.W. (1989) Structural and immunochemical properties of fetal bovine serum acetylcholinesterase. En: Computer-assisted modeling of receptor-ligand interactions: Theoretical aspects and applications to drug design. Alan R. Liss, pp 305-316.

Dolezal, V. y Tucek, S. (1991) Positive and negative effects of Tacrine (tetrahydroaminoacridine) and Methoxytacrine on the metabolism of acetylcholine in brain cortical prisms incubated under "resting" conditions. *J. Neurochem.* 56, 1207-1215.

Domino, E.F. y Krause, R.R. (1972) Reexamination of red cell and plasma cholinesterase activity in drug-free chronic schizophrenic patients and normal. *Biol. Psychiat.* 4, 17-31.

Dudai, I. y Silman, I. (1974) The molecular weight and subunit structure of acetylcholinesterase preparations from the electric organ of the electric eel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 117-124.

Dulley, J.R. y Grieve, P.A. (1975) Simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* 64, 136-141.

Dutta-Choudhury, T.A. y Rosenberry, T.L. (1984) Human erythrocyte acetylcholinesterase is an amphiphilic protein whose short membrane binding domain is removed by papain digestion. *J. Biol. Chem.* 259, 5653-5660.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andrés, V. Jr. y Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.* 7, 88-95.

Espinoza, B., Silman, I., Arnon, R., Tarrab-Hazdai, R. (1991) Phosphatidylinositol-specific phospholipase-C induces biosynthesis of acetylcholinesterase via diacylglycerol in *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Biochem.* **195**, 863-870.

Fambrough, D.M., Linden, D.C., Devreotes, P.N., Gardner, J.M., Rotundo, R.L. (1980) On the regulation of the number and distribution of acetylcholine receptors in the skeletal muscle. *Pontif. Acad. Sci. Scr. Varia.* **45**, 485-516.

Fambrough, D.M., Engel, A.G. y Rosenberry, T.L. (1982) Acetylcholinesterase of human erythrocytes and neuromuscular junctions: homologies revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 1078-1082.

Fernández, H.L., Duell, M.J. y Festoff, B.W. (1979a) Cellular distribution of 16S acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* **32**, 581-585.

Fernández, H.L., Duell, M.J. y Festoff, B.W. (1979b) Neurotrophic control of 16S acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction. *J. Neurobiol.* **10**, 441-454.

Festoff, B.W. y Fernández, H.L. (1981) Plasma and red blood cell acetylcholinesterase in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve.* **4**, 41-47.

Fishman, E.B., Siek, G.C., Mac Callum, R.D., Bird, E.D., Volicer, L. y Marquis, J.K. (1986) Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of Alzheimer type. *Ann. Neurol.* **19**, 246-252.

Fishman, R.A. (1980) En: Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system. Ed. Saunders, W.D. Philadelphia.

Foldes, F.F. y Arrowood, J.G. (1984) Changes in cerebrospinal fluid pressure under the influence of continuous subarachnoid infusion of normal saline. *J. Clin. Invest.* 27, 346.

Fremont-Smith, F. (1927) The nature of the cerebrospinal fluid. *Arch. Neurol. Psychiatry.* 17, 317-331.

Friedenberg, R.M. y Seligman, A.M. (1972) Acetylcholinesterase at the myoneural junction cytochemical ultrastructure and some biochemical considerations. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 771-792.

Froede, H.C. y Wilson, I.B. (1970) En: The enzymes. Ed. Boyer, P.D. Vol. 5. 3 Ed. Academic. Press. New York.

Fuentes, M.E., Rosenberry, T.L. e Inestrosa, N.C. (1988) A 13 kDa fragment is responsible for the hydrophobic aggregation of brain G4 acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 256, 1047-1050.

Fühner, H. (1918) *Arch. Pathol. Pharmacol.* 83, 51-85.

Futerman, A.H., Fiorini, R.M., Roth, E., Low, M.G. y Silman, I. (1985a) Physicochemical behaviour and structural characteristics of membrane-bound acetylcholinesterase from *Torpedo* electric organ. *Biochem. J.* 226, 369-377.

Futerman, A.H., Low, M.G., Ackermann, K.E., Sherman, W.R. y Silman, I. (1985b) Identification of covalently bound inositol in the hydrophobic membrane-anchoring domain of *Torpedo* acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 312-317.

Galehr, O. y Plattner, F. (1927) *Arch. Gen. Physiol.* 218, 488-505.

Garen, A. y Levinthal, C. (1960) Fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 38, 470-483.

Giacobini, E.R., Becker, R., Elble, R., Mattio, T. y Mac Ilhany, M. (1986) Acetylcholinesterase metabolism in brain: Is it reflected by CSF changes? En: Alzheimer's and Parkinson's diseases. Strategies for research and development. Ed. Fisher, A., Hanin, I. y Lachman, C., pp. 309-316. Plenum Press. New York.

Gibney, G., MacPhee-Quigley, K., Thompson, B., Vedvick, T., Low, M.G., Taylor, S.S. y Taylor, P. (1988) Divergence in primary structure between the molecular forms of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 263, 1140-1145.

Gisiger, V. y Vigny, M. (1977) A specific form of acetylcholinesterase is secreted by rat sympathetic ganglia. *FEBS Lett.* 84, 253-256.

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.

Glick, D. (1941) Some additional observations on the specificity of cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 137, 456-460.

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. Molec. Neurobiol.* 11, 91-104.

Goldgaber, D., Lerman, M.I., Mac Bride, O.W., Saffiotti, U. y Gajdusek, D.C. (1987) Characterization and chromosomal localization of cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*. 235, 877-880.

Goldman, J.E., Yen, S.H., Chin, F.C. y Peres, N.S. (1983) Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science*. 221, 1082-1084.

Gordon, M.N. y Finch, C.E. (1984) Topochemical localization of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in mouse brain. *Brain Res*. 84, 364-368.

Goudou, D., Verdier-Sahuque, M. y Rieger, F. (1985) External and internal AChE in rat sympathetic neurons in vivo and in vitro. *FEBS Lett*. 186, 54-58.

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.

Gratzl, M., Krieger-Brauer, H. y Ekerdt, R. (1981) Latent acetylcholinesterase in secretory vesicles isolated from adrenal medulla. *Biochim. Biophys. Acta*. 649, 355-366.

Graybiel, A.M. y Ragsdale, C.W. Jr. (1982) Pseudo-cholinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey. *Nature*. 299, 439-442.

Greenfield, S.A. y Smith, A.D. (1979) The influence of the electrical stimulation of certain brain regions on the concentration of acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid. *Brain Res*. 177, 445-449.

Greenfield, S.A. (1984) Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. *Trends Neurosci.* 7, 364-368.

Greenfield, S.A., Nedergaard, S., Webb, C. y French, M. (1989) Pressure ejection of acetylcholinesterase within the guinea pig substantia nigra has non-classical actions on pars compacta cells independent of selective receptor and ion channel blockade. *Neuroscience.* 29, 21-25.

Greenfield, S.A. (1991) A noncholinergic action of AChE in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. *Cell. Molec. Neurobiol.* 11, 55-77.

Hall, L.M.C. y Spierer, P. (1986) The 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.

Hammond, P. y Brimijoin, S. (1988) Acetylcholinesterase in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 50, 1111-1116.

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.

Heider, H., Litynski, P., Stieger, S. y Brodbeck, U. (1991) Comparative studies on the primary structure of acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus and bovine erythrocytes. *Cell. Molec. Neurobiol.* 11, 105-118.

Heider, H. y Brodbeck, U. (1992) Monomerization of



tetrameric bovine caudate nucleus acetylcholinesterase.  
*Biochem J.* 281, 279-284.

Heyman, A., Wilkinson, W., Hurwitz, B., Schmechel, D.,  
Sigmon, A., Weinberg, M., Helms, M. y Swift, M. (1983)  
Alzheimer's disease: genetic aspects and associated clinical  
disorders. *Ann. Neurol.* 14, 507-515.

Hollunger, E.G. y Niklasson, B.H. (1973) The release and  
molecular state of mammalian brain acetylcholinesterase. *J.*  
*Neurochem.* 20, 821-836.

Hösly, L. (1974) Die nervengewebekultur. Ein modell zur  
untersuchung synaptischer mechanismen in zentralnervensystem.  
*Bull. Schiweiz Akad. Med. Wiss.* 30, 21-38.

Houser, C.R., Crawford, G.D., Barber, R.P., Salvatierra,  
P.M. y Vaugh, J.E. (1983) Organization and morphological  
characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical  
study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase.  
*Brain Res.* 266, 97-119.

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 acetylcholinesterases in other tissues. *J. Biol.*  
*Chem.* 262, 4441-4444.

Inestrosa, N.C. y Perelman, A. (1989) Distribution and  
anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase. *Trends*  
*Pharmacol. Sci.* 10, 325-329.

Janowsky D.S., El-Yousef, H.K., Davis, J.M. y Sekerke,  
H.J. (1972) A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and  
depression. *Lancet.* ii, 632-635.

Jonhson, S. y Domino, E.F. (1971) Cholinergic enzymatic activity of cerebrospinal fluid of patients with various neurologic diseases. *Clin. Chim. Acta.* 35, 421-428.

Kalcheim, C., Duksin, D. y Vogel, Z. (1982) Aggregation of acetylcholine receptors in nerve-muscle cocultures is decreased by inhibitors of collagen production. *Neurosci. Lett.* 31, 265-270.

Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H. Mulhaup, G., Beyreuther, K. y Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325, 735-736.

Karnovsky, M.J. y Hug, K. (1963) Nature of the M band enzyme in rat ventricular muscle. *J. Cell. Biol.* 19, 255-260.

Katz, B. (1966) *En: Nerve, muscle and synapse.* MacGraw Hill. New York.

Kean, E.L. (1982) Activation by dolichol phosphate-mannose of the biosynthesis of N-acetylglucosaminylpyrophosphoryl polyprenols by the retina. *J. Biol. Chem.* 257, 7952-7954.

Kerkut, G.A. (1984) Acetylcholinesterase (AChE) *Gen. Pharmac.* 15, 375-378.

Kim, S.U. (1970) Cytochemical demonstration of marker enzymes in nerve cells cultured in vitro. *Experientia.* 26, 292-293.

Kirshner, N. y Viveros, O.H. (1972) Secretory cycle in

the adrenal medulla. *Pharmacol. Rev.* **24**, 385-398.

Knutsen, P., Stanton, H.C. y Shirachi, D.Y. (1975) Regional study of acetylcholinesterase in pig brain. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **18**, 78-80.

Koelle, G.B. (1954) The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* **100**, 211-235.

Koelle G.B. (1963) Cytological distribution and physiological functions of cholinesterases. En: *Handbuch der experimentellen pharmakologie*. Ed. Springer-Verlag. pp. 1-187. Berlín.

Koelle, G.B. (1969) Significance of acetylcholinesterase in central synaptic transmission. *Fed. Proc.* **28**, 95-100.

Koelle, G.B., Davis, R., Koelle, W.A., Smyrl, E.G. y Fine, A.V. (1975) En: *Cholinergic mechanisms*. Ed. Waser, P.G. Raven Press, New York.

Koelle, W.A., Koelle, G.B. y Miller, P.S. (1959) Comparison of the effects of inhibition of external, internal and total acetylcholinesterase on ganglionic transmission. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **126**, 9-20.

Kornfeld, R. y Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.

Kreutzberg, G.W. y Schubert, P. (1975) The cellular dynamics of intraneuronal transport. En: *The use of axonal transport for studies of neural connectivity*. Ed. Cowan, W.M. y Cuenod, M., pp. 85-112. Elsevier. Amsterdam.

Krieg, A.F. (1979) Cerebrospinal fluid and other body fluids. En: Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 16th ed. Ed. Saunders, W.D., pp. 635-637. Philadelphia.

Krupka, R.M (1964) Symposium on the relation of protein structure to function. Acetylcholinesterase. *Can. J. Biochem.* 42, 677-693.

La Du, B.N., Bartels, C.F., Nogueira, C.P., Hajra, A., Lightstone, H., Van Der Spek, A. y Lockridge, O. (1990) Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin. Biochem.* 23, 423-431.

Lai, L., Jedrzejezyk, J., Pizzey, J.A., Green, A. y Barnard, E.A. (1986) Neural control of the forms of acetylcholinesterase in slow mammalian muscles. *Nature*, 321, 72-74.

Lal, S., Wood, P.L., Kiely, M.E., Etienne, P., Gauthier, S., Stratford, J., Ford, R.M., Dastoor, D., Nair, N.P. (1984) CSF acetylcholinesterase in dementia and in sequential samples of lumbar CSF. *Neurobiol. Aging.* 5, 269-274.

Landauer, P., Ruess, K.P. y Lieflander, M. (1984) Bovine nucleus caudatus acetylcholinesterase: active site determination and investigation of a dimeric form obtained by selective proteolysis. *J. Neurochem.* 43, 799-805.

Lazar, M. y Vigny, M. (1980) Modulation of the distribution of acetylcholinesterase molecular forms in a murine neuroblastoma x sympathetic ganglion cell hybrid cell line. *J. Neurochem.* 35, 1067-1079.

Lee, S.L. y Taylor, P. (1982) Structural characterization

of the asymmetric (17+13)S species of acetylcholinesterase from *Torpedo*. II. Component peptides obtained by selective proteolysis and disulfide bond reduction. *J. Biol. Chem.* 257, 12292-12301.

Lee, S.L., Camp, S.J. y Taylor, P. (1982) Characterization of a hydrophobic, dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo*. *J. Biol. Chem.* 257, 12302-12309.

Levey, A.I., Wainer, B.H., Mufson, E.I. y Mesulam, M.M. (1983) Colocalization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat cerebrum. *Neuroscience.* 9, 9-22.

Lewis, P.R. (1965) Histochemical location of cholinesterase. *J. Physiol.* 181, 23-24.

Lewis, P.R. y Shute, C.C.D. (1966) The distribution of cholinesterase in cholinergic neurons demonstrated with the electron microscope. *J. Cell. Sci.* 1, 381-390.

Lewis, P.R. y Shute, C.C.D. (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and the supraoptic crest. *Brain,* 90, 521-542.

Liao, J., Heider, H., Sun, M.C. Stieger, S. y Brodbeck, U. (1991) The monoclonal antibody 2G8 is carbohydrate-specific and distinguishes between different forms of vertebrate cholinesterases. *Eur. J. Biochem.* 198, 59-65.

Lieberman, A., Dziatolwski, M., Kupersmith, M., Serby, M., Goodgold, A., Korein, J y Goldstein, M. (1979). Dementia in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 6, 355-359.

Liener, I.E., Sharon, N. y Goldstein, I.J. (1986) En: The

lectins: properties, functions and applications in Biology and Medicine. Academic Press. London.

Lindvall, M., Edvinsson, L. y Owman, C. (1978) Histochemical, ultrastructural and functional evidence for a neurogenic control of CSF production from the choroid plexus. *Adv. Neurol.* 20, 111-120.

Lis, H. y Sharon, N. (1986) Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 35-67.

Livett, B.G., Boksa, P., Dean, D.M., Mizobe, F. y Lindenbaum, M.H. (1983) Use of isolated chromaffin cells to study basic release mechanisms. *J. Auton. Nerv. Syst.* 7, 59-86.

Lockridge, O. y La Du, B.N. (1982) Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 257, 12012-12018.

Lockridge, O. y La Du, B.N. (1986) Amino acid sequence of the active site of human serum cholinesterase from usual atypical, and atypical-silent genotypes. *Biochem. Genet.* 24, 485-498.

Lockridge, O., Adkins, S. y La Du (1987a) Location of disulfure bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 262, 12945-12952.

Lockridge, O., Bartels, C.F., Vaughan, T.A., Wong, C.K., Norton, S.E. y Jonhson, L.L. (1987b) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 262, 549-557.

Lockridge, O. (1988) Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*. 9, 125-128.

Lockridge, O. (1990) Genetics variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmac. Ther.* 47, 35-60.

Loewi, O. y Navratil, E. (1926) Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. XI. Über den mechanismus der vaguswirkung von physostigmin und ergotamin. *Pflüger. Arch. Ges. Physiol.* 214, 689-696.

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, 212-215.

Low, M.G. (1989) The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 988, 427-454.

Lubinska, L. y Nimierko, S. (1971) Velocity and intensity of bidirectional migration of acetylcholinesterase in transected nerves. *Brain Res.* 27, 329-342.

Lucas, A., Krause, R. y Domino, E.F. (1971). Biological studies in childhood schizophrenia: plasma and RBC cholinesterase activity. *J. Autism. Child. Schiz.* 1, 72-81.

Lucas, C.A., Czlonkowska, A. y Kreutzberg, G.W. (1980) Regulation of acetylcholinesterase by nerve growth factor in the pheochromocytoma P 12 cell line. *Neurosci. Lett.* 18, 333-337.

Lyles, J.M., Silman, I., Di Giamberardino, L., Couraud, J.Y. y Barnard, E.A. (1982). Comparison of the molecular forms of cholinesterases in tissues of normal and dystrophic

chickens. *J. Neurochem.* 38, 1007-1021.

MacMahan, U.J., Sanes, J.R. y Marshall, L.M. (1978) Cholinesterase is associated with the basal lamina at neuromuscular junction. *Nature* 271, 172-174.

MacTiernan, C., Adkins, S., Chatonnet, A., Vaughan, T.A., Barteks, C.F., Kott, M., Rosenberry, T.L., La Du, B.N. y Lockridge, O. (1987) Brain cDNA clone for human cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6682-6686.

Mäder, M., Sorensen, K., Wiedmann, T.H., Dickmann, U. y Felgenhauer, K. (1991). Neuronal acetylcholinesterase levels in cerebrospinal fluid and serum determined by specific and sensitive immunoassay. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 29, 51-55.

Majumdar, R. y Balasubramanian, A.S. (1982) Essential and non-essential phosphatidylinositol residues in acetylcholinesterase and arylacylamidase of sheep basal ganglia. *FEBS Lett.* 146, 335-338.

Manyam, B.W., Giacobini, E. y Colliver, J.A. (1990). Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase and choline measurements in Huntington's disease. *J. Neurol.* 237, 281-284.

Marnay, A. y Nachmansohn, D. (1938) Cholinesterase in voluntary muscle. *J. Physiol. (London)* 92, 37-47.

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.

Masserman, J.H. (1934) Cerebrospinal hydrodynamics, clinical experimental studies. *Arch. Neurol. Psychiat.* 32,



Massoulié, J. y Bon, S. (1982). The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.* 5, 57-106.

Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Mulhaup, G., MacDonald, B.L. y Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4245-4249.

Mathew, R.J., Ho, B.T., Kralik, P., Taylor, D., Semchuk, K. y Weinman, M. (1980) Catechol-O-methyltransferase and catecholamines in anxiety and relaxation. *Psychiatry Res.* 3, 85-91.

Mathew, R.J., Ho, B.T., Khan, M.M., Perales, C., Weinan, M.L. y Claghorn, J.L. (1982) True and pseudo cholinesterases in depression. *Am. J. Psychiat.* 139, 125-127.

Mendel, B. y Rudney, H. (1943) Studies on cholinesterase. 1. Cholinesterase and pseudocholinesterase. *Biochem. J.* 37, 59-63.

Mesulam, M.M., Mufson, E.F., Wainer, B.H. y Levey, A.I. (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature Ch1-Ch6. *Neurosci.* 10, 1185-1203.

Millen, J.W. y Woolah, D.H.M. (1962) *En: The anatomy of the cerebrospinal fluid.* Oxford University Press. London.

Milstoc, M., Teodoru, C.V., Fieve, R.R. y Kumbaraci, T. (1975) Cholinesterase activity and the manic depressive patients. *Dis Nerv. Syst.* 36, 197-199.

Mintz, K.P. y Brimijoin, S. (1985) Monoclonal antibodies to rabbit brain acetylcholinesterase. Selective enzyme inhibition, differential affinity for enzyme forms, and cross-reactivity with other mammalian cholinesterases. *J. Neurochem.* 45, 284-292.

Mizobe, F. e Iwamoto, M. (1983) Multiple localization of cellular acetylcholinesterase in cultured adrenal chromaffin cells. *Biomed. Res.* 4, 543-548.

Mizobe, F. y Livett, B.G. (1983) Nicotine stimulates secretion of both catecholamines and acetylcholinesterase from cultured adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 3, 871-876.

Mizobe, F., Iwamoto, M. y Livett, B.G. (1984) Parallel but separate release of catecholamines and acetylcholinesterase from stimulated adrenal chromaffin cells in culture. *J. Neurochem.* 42, 1433-1438.

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.* En prensa.

Muller, F., Dumez, Y. y Massoulié, J. (1985) Molecular forms and solubility of acetylcholinesterase during the embryonic development of rat and human brain. *Brain Res.* 331, 295-302.

Nachmansohn, D. y Newmann, E. (1975) En: Chemical and molecular basis of nerve activity. Academic. Press. New York.

Nagai, T., MacGeer, P.L., Peng, J.H., MacGeer, E.G. y Dolman, C.E. (1983) Cholineacetyltransferase immuno-

histochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and control. *Neurosci. Lett.* 36, 195-199.

Nakamura, S., Kawashima, S., Nakano, S., Tsuji T. y Araki, W. (1990) Subcellular distribution of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: abnormal localization and solubilization. *J. Neural. Transm.* 30, 13-23.

Navaratnam, V. y Lewis, P.R. (1970) Cholinesterase-containing neurons in the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 18, 411-425.

Niday, E., Wang, C.S. y Alaupovic, P. (1977) Studies on the characterization of human erythrocyte acetylcholinesterase and its interaction with antibodies. *Biochim. Biophys. Acta.* 469, 180-193.

Nistry, A., De Bellis, A.M. y Cammelli, E. (1975) Acetylcholine and acetylcholinesterase in six regions of the frog central nervous system. *Neuropharmacol.* 14, 427-430.

Oh, T.H., Chyu, J.Y. y Max, S.R. (1977) Release of acetylcholinesterase by cultured spinal cord cells. *J. Neurobiol.* 8, 469-476.

Olson, C.E., Chajlani, V., August, J.T. y Schmall, E.D. (1990) Novel allosteric sites on human erythrocyte acetylcholinesterase identified by two monoclonal antibodies. *Arch. Biochim. Biophys.* 277, 361-367.

Ott, P. y Brodbeck, U. (1984) Amphiphile dependency of the monomeric and dimeric forms of acetylcholinesterase from human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 775, 71-76.

Ott, P. (1985) Membrane acetylcholinesterases: purification, molecular properties and interactions with amphiphilic environments. *Biochim. Biophys. Acta.* 822, 375-392.

Pappenheimer, J.R., Heisey, S.R., Jordan, E.F. y Downer, J. (1962) Perfusion of the cerebral ventricular system in unanesthetized goats. *Amer. J. Physiol.* 203, 763.

Pavlic, M. (1970) Inhibition of butyrylcholinesterase by methanesulfonyl fluoride. *Biochem. Biophys. Acta.* 198, 389-391.

Pérez Guillermo, F., Martínez Petrel, C.M., Tarín, F., Peña, M.J., Alvarez Ossorio, R., Alvarez Gómez, J.A., Vidal, C.J. (1988) Prolonged suxamethonium-induced neuromuscular blockade associated with organophosphate poisoning. *Br. J. Anaesth.* 61, 233-236.

Pérez-Guillermo, F y Vidal, C.J. (1990) Patología molecular de las colinesterasas. En: Aspectos moleculares en las patologías metabólico-genéticas. Ed. Centro de estudios Ramón Areces, Madrid. pp 327-348.

Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. y Tomlinson, B.E. (1977) Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet.* i, 189.

Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P.H. y Perry, R.H. (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* 2, 1457-1459.

Perry, E.K., Curtis, M., Dick, D.J., Candy, J.M., Atack, J.R., Bloxham, C.A., Blessed, G., Fairbairn, A., Tomlinson, B.E. y Perry, R.H. (1985) Cholinergic correlates of cognitive

impairment in Parkinson's disease: comparisons with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 48, 413-421.

Perry, E.K., Smith, C.J., Atack, J.R., Candi, J.M., Johnson, M. y Perry, R.H. (1986) Neocortical cholinergic enzyme and receptor activities in the human fetal brain. *J. Neurochem.* 47, 1262-1269.

Perry, R.H., Wilson, I.D., Bober, M.J., Atack, J.R., Blessed, G., Tomlinson, B.E. y Perry, E.K. (1982) Plasma and erythrocyte acetylcholinesterase in senile demencia of Alzheimer type. *Lancet.* i, 174-175.

Phillips, J.H. y Apps, D.V. (1979) Storage and secretion of catecholamines: the adrenal medulla. *Int. Rev. Biochem.* 26, 121-178.

Plummer, D.T. (1977) En: An introduction to practical biochemistry. p. 114. Ed. MacGraw-Hill book company. U.K.

Plummer, D.T., Chai, M.S. y Vidal, C.J. (1984) Studies on membrane-bound and solubilized acetylcholinesterase. En: Cholinesterases. pp. 173-186. Eds. Brzin, M., Barnard, E.A. y Sket, D. Walter de Gruyter Co. Berlin- New York.

Pollay, M. y Welch, K. (1962) The function and structure of canine arachnoid villi. *J. Surg. Res.* 2, 307.

Prody, C.A., Zevin-Sonkin, D., Gnatt, A., Goldberg, O. y Soreq, H. (1987) Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3555-3559.

Rachinsky, T.L., Camp, S., Li, Y., Ehström, T.J., Newton, M. y Taylor, P. (1990) Molecular cloning of mouse acetyl-

cholinesterase: tissue distribution of alternatively spliced mRNA species. *Neuron*. 5, 317-327.

Rakonczay, Z., Mallol, J., Schenk, H., Vincendon, G. y Zanetta, J.P. (1981) Purification and properties of the membrane-bound acetylcholinesterase form adult rat brain.

*Biochim. Biophys. Acta.* 657, 243-256.

Rakonczay, Z. y Brimijoin, S. (1985) Immunochemical differences among molecular forms of acetylcholinesterase in brain and blood. *Biochim. Biophys. Acta.* 832, 127-134.

Rakonczay, Z. y Brimijoin, S. (1986) Monoclonal antibodies to rat brain acetylcholinesterase: comparative affinity for soluble and membrane-associated enzyme from different vertebrate species. *J. Neurochem.* 46, 280-287.

Ramírez, G., Gómez-Barriocanal, J., Barat, A. y Rodríguez-Borrajo, C. (1984) En: Cholinesterases: Fundamental and applied aspects. pp 115-128. Eds. Brzin, M., Barnard, E.A. y Sket, D. Walter de Gruyter Co. Berlin-New York.

Randall, W.R., Tsim, K.W., Lai, J. y Barnard, E.A. (1987) Monoclonal antibodies against chicken brain acetylcholinesterase. Their use in immunopurification and immunochemistry to demonstrate allelic variants of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 164, 95-102.

Rao, R.V., Gnanamuthu, C. y Balasubramanian, A.S. (1989) Human cerebrospinal fluid acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Evidence for identity between the serum and cerebrospinal fluid butyrylcholinesterase. *Clin. Chim. Acta.* 183, 135-146.

Rao, R.V. y Balasubramaniam, A.S. (1990) Localization of the peptidase activity of human serum butyrylcholinesterase in

a 50 kDa fragment obtained by limited  $\alpha$ -chymotrypsin digestion. *Eur. J. Biochem.* 188, 637-643.

Rapoport, S.I. (1976) En: Blood-barrier in physiology and medicine. pp 46-86. Raven Press. New York.

Rasmussen, A.G., Sorensen, K., Selmer, J., Zeuther, J., Bjerrum, O.J., Brodbeck, U. y Norgaard-Pedersen, B. (1987) Immunochemical determination of acetylcholinesterase in amniotic fluid. An evaluation of eleven monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta.* 166, 17-25.

Razon, N., Soreq, H., Roth, E., Bartal, A. y Silman, I. (1984) Characterization of activities and forms of cholinesterases in human primary brain tumors. *Expl. Neurol.* 84, 681-695.

Rieger, F., Chételat, R., Nicolet, M., Kamla, L. y Pouillet, M. (1980) Presence of tailed, asymmetric forms of acetylcholinesterase in the central nervous system of vertebrates. *FEBS Lett*, 121, 169-174.

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.

Römer-Lüthi, C.R., Ott, P. y Brodbeck, U. (1980) Reconstitution of human erythrocyte membrane acetylcholinesterase in phospholipid vesicles. Analysis of the molecular forms by cross-linking studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 601, 13-133.

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. U.S.A.* 72, 3834-3838.

Rosenberry, T.L. y Richardson, J.M. (1977) Structure of 18 S and 14 S acetylcholinesterase. Identification of collagen-like subunits that are linked to disulfide bonds to catalytic subunits. *Biochemistry*. 16, 3550-3558.

Rosner, M.R., Hubbard, C.S., Ivatt, R.J. y Robbins, P.W. (1982) En: *Methods in Enzymology*. Ed. Ginsburg. Vol. 83, pp. 399-408. Academic Press. San Diego.

Rotundo, R.L. (1984a) Purification and properties of the membrane-bound forms of acetylcholinesterase from chicken brain. *J. Biol. Chem.* 259, 13186-13194.

Rotundo, R.L. (1984b) Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc. Acad. Sci. USA*. 81, 479-483.

Rotundo, R.L. (1987). En: *The Vertebrate Neuromuscular Junction*. Ed. Salpenter, M.M., pp. 247-284. Alan R. Liss. 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., Thomas, K., Porter-Jordan, K., Benson, R.J., Fernández-Valle, C. y Fine, R.E. (1989) Intracellular transport, sorting and turnover of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 264, 3146-3152.

Rowland, L.P. (1981) Blood-brain barrier, cerebrospinal fluid, brain edema and hydrocephalus. En: *Principles of neural science*, pp. 651-659. Ed. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. New York. Elsevier. North Holland.



Ruberg, M.M., Rieger, F., Villageois, A., Bonnet, A.M. y Agid, Y. (1986) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in frontal cortex and cerebrospinal fluid of demented and non-demented patients with Parkinson's disease. *Brain Res.* 362, 83-91.

Rubin, R.C. Henderson, E.S., Ommaya, A.K., Walker, M.D. y Rall, D.P. (1966) The production of cerebrospinal fluid in man and its modification by acetazolamide. *J. Neurosurg.* 25, 430.

Ruess, K.P., Weinert, M. y Lieflander, M. (1976) Large scale affinity chromatographic purification of acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 783-793.

Salipan, T.J., Morgan, I.G. y Chubb, I.W. (1983) The development of amacrine cells containing somatostatin-like immunoreactivity in chicken retina. *Neurosci. Lett.* 11, 573-574.

Salpeter, M. (1967) Electron microscope radioautography as a quantitative tool in enzyme cytochemistry. I. The distribution of acetylcholinesterase at motor end plates of a vertebrate twitch muscle. *J. Cell. Biol.* 32, 379-389.

Sanes, J.R., Feldman, D.H., Cheney, J.M. y Lawrence, Jr. J.R. (1984) Brain extract induces synaptic characteristics in the basal lamina of cultured myotubes. *J. Neurosci.* 4, 464-473.

Schegg, K.M., Nielsen, S., Zweig, R.M. y Peacock, J.H. (1989) Decrease in membrane-bound G4 from of acetylcholinesterase in postmortem Alzheimer brain. En: Alzheimer's disease and related disorders. pp. 437-452. Alan R. Liss, Inc.

Schlaepfer, W.W. y Torack, R.M. (1966) Ultrastructural localization of cholinesterase activity in the sciatic nerve of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 14, 368-378.

Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., Mac Phee-Quigley, K., Taylor, S.S., Fiedmann, T. y Taylor, P. (1986) Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, 319, 407-409.

Shute, C.C.D. y Lewis, P.R. (1963) Cholinesterase-containing systems of the brain of the rat. *Nature*. 199, 1160-1164.

Shute, C.C.D. y Lewis, P.R. (1966) Cholinergic and monoaminergic systems of the brain. *Nature*. 212, 710-711.

Siek, G.C. Katz, L.S., Fishman, E.B., Korosi, T.S. y Marquis, J.K. (1990) Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biol. Psychiatry*. 27, 573-580.

Sikorav, J.L., Grassi, J. y Bon, S. (1984) Synthesis in vitro of precursors of the catalytic subunits of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* and *Electrophorus electricus*. *Eur. J. Biochem.* 145, 519-524.

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., Legai, 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, H.I. y Karlin, A. (1967) Effect of local pH changes caused by substrate hydrolysis on the activity of membrane-bound acetylcholinesterase. *Prot. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 1664-1668.

Silman, I. y Dudai, Y. (1977) Acetylcholinesterase: structure and activity of a membrane-bound enzyme. *Adv. Biol. Med. Phys.* 16, 223-234.

Silman, I., Lyles, J.M. y Barnard, E.A. (1978) Intrinsic forms of acetylcholinesterase in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 94, 166-170.

Silman, I., Di Giamberardino, L., Lyles, J., Couraud, J.Y. y Barnard, E.A. (1979) Parallel regulation of acetylcholinesterase and pseudocolinesterase in normal, denervated and dystrophic chicken skeletal muscle. *Nature (London)*. 280, 160-162.

Silman, I. y Futerman, A.H. (1987) Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *Eur. J. Biochem.* 170, 11-22.

Silver, A. (1967) Cholinesterase of central nervous system with special reference to the cerebellum. *Int. Rev. Neurobiol.* 10, 57-109.

Simmers, R.N., Stupans, I. y Sutherland, G.R. (1986) Localization of the human haptoglobin genes distal to the fragile site at 16q22 using in situ hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.* 41, 838-841.

Sindhuphak, R., Karlsson, E., Conradi, S., y Ronnevi, L.O. (1988) Immunoglobulins from patients with amyotrophic lateral sclerosis affect human erythrocyte acetylcholinesterase. *J. Neurol. Sci.* **86**, 195-202.

Singer, H.S., Oshida, L. y Coyle, J.T. (1984) CSF cholinesterase activity in Gilles de la Tourette's syndrome. *Arch. Neurol.* **41**, 756-757.

Sirviö, J., Soininen, H.S., Kutvonen, R., Hyttinen, J.M., Helkala, E.L., Riekkinen, P.J. (1987) Acetyl and butyrylcholinesterase activity in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **81**, 273-279.

Sirviö, J., Rinne, J.O., Valjakka, A., Rinne, U.K., Riekkinen, P.J. y Paljärvi, L. (1989) Different forms of brain acetylcholinesterase and muscarinic binding in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **90**, 23-32.

Sjöstrand, T. (1938) *J. Physiol.* **90**, 418-438.

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.

Skau, K.A. (1985) Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocytes of laboratory animals. *Comp. Biochem. Physiol.* **80c**, 207-210.

Sketelj, J., Sasel, B., Zupancic, N., Brzin, M. (1983) Plasma acetylcholinesterase in Duchenne muscular dystrophy. *Exp. Neurol.* **30**, 329-336.

Small, D.H. (1990) Non-cholinergic actions of acetyl-

cholinesterases: proteases regulating cell growth and development? *TIBS*. 15, 213-216.

Smith, R.C., Ho, B.T., Hsu, L., Vroulis, G., Claghorn, J. y Schoolar, J. (1982) Cholinesterase enzymes in the blood of patients with Alzheimer's disease. *Life Sci*. 30, 543-546.

Soininen, H., Halonen, T. y Riekkinen, P.J. (1981) Acetylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer type. *Acta Neurol. Scand*. 64, 217-224.

Somogyi, P., Chubb, I.W. y Smith, A.D. (1975) A possible structural basis for the extracellular release of acetylcholinesterase. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci*. 191, 271-283.

Sorensen, K., Gentinetta, R. y Brodbeck, U. (1982) An amphiphile-dependent form of human brain caudate nucleus acetylcholinesterase: Purification and properties. *J. Neurochem*. 39, 1050-1060.

Sorensen, K., Brodbeck, U., Rassmussen, A.G. y Norgaard-Pedersen, B. An inhibitory monoclonal antibody to human acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Acta*. 912, 56-62.

Soreq, H., Ben-Aziz, R., Prody, C.A., Seidman, S., Gnatt, A., Neville, L., Lieman-Lifson, Y. y Zakut, H. (1990) Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 87, 9688-9692.

St. Clair, D.M., Brock, D.J.M. y Barron, L. (1986) A monoclonal antibody assay technique for plasma and red cell acetylcholinesterase activity in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci*. 73, 169-176.

St. George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., Watkins, P.C., Myers, R.H., Feldman, R.G., Pollen, D., Drachman, D., Growdon, J., Bruni, A., Focin, J.F., Salmon, D., Frommelt, P., Amaducci, L., Sorbi, S., Piacentini, S., Stewart, G.D., Hobbs, W.J., Conneally, P.M. y Gusella, J.P. (1987) The genetic defect causing familiar Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*. 235, 885-890.

Stedman, E., Stedman, E. y Eason, L.H. (1932) Cholinesterase. An enzyme present in the blood serum of the horse. *Biochem. J.* 26, 2056-2066.

Struble, R.L., Cork, L.C., Whittehouse, P.J. y Price, D.L. (1982) Cholinergic innervation in neuritic plaques. *Science*. 216, 413-415.

Summers, W.K., Viesselman, J.O., Marsh, G.M. y Candelora, K. (1981) Use of THA in treatment of Alzheimer-like dementia: pilot study of twelve patients. *Biol. Psychiat.* 16, 145-153.

Summers, W.K., Majousky, I.V., Marsh, G.M., Tachiki, K. y Kling, A. (1986) Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia. *N. Eng. J. Med.* 315, 1241-1245.

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.

Svensmark, O. (1963) Enzymatic and molecular properties of cholinesterases in human liver. *Acta Physiol. Scand.* 59, 378-389.

Taguchi, R., Suzuki, K., Nakabayashi, T. e Ikezawa, H.

(1984) Acetylcholinesterase release from mammalian erythrocytes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* and characterization of the release enzyme. *J. Biochem.* **96**, 437-446.

Taylor, P., Schumacher, M., Mac Phee-Quigley, K., Friedman, T. y Taylor, S. (1987) The structure of acetylcholinesterase: relationship to its function and cellular disposition. *Trend. Pharm. Sci.* **10**, 93-95.

Taylor, P. (1991) The cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **266**, 4025-4028.

Taylor, S.J., Bartlett, M.J. y Greenfield, S.A. (1988) Release of acetylcholinesterase within the guinea-pig substantia nigra: effects of 5-hydroxytryptamina and anfetamine. *Neuropharmacol.* **27**, 507-514.

Tischner, K. y Thomas, E. (1973) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anal.* **144**, 339-351.

Tornel, P.L. y Vidal, C.J. (1991) Increased acetyl and butyrylcholinesterase activities in children with bacterial meningitis. *Lancet.* **i**, 440.

Toutant, J.P. (1986) An evaluation of the hydrophobic interactions of chick muscle acetylcholinesterase by charge shift electrophoresis and gradient centrifugation. *Neurochem. Int.* **9**, 111-119.

Toutant, J.P. y Massoulié, P. (1987) En: Mammalian Ectoenzymes. Eds. Kenny, A.J. y Turner, A.J., pp. 289-328. Elsevier. Amsterdam.

Tripathi, R. (1974) Tracing the bulk outflow route of

cerebrospinal fluid by transmission and scanning electron microscopy. *Brain Res.* 80, 503-506.

Tsim, K.W.K., Randall, W.R. y Barnard, E.A. (1988) Monoclonal antibodies specific for the different subunits of asymmetric acetylcholinesterase from chick muscle. *J. Neurochem.* 51, 95-104.

Tune, L., Gucker, S., Folstein, M., Oshida, L. y Coile, J.T. (1985) Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase activity in senile dementia of Alzheimer's type. *Ann. Neurol.* 17, 46-48.

Turner L. (1961) The structure of arachnoid granulations with observations on their physiological significance. *Ann. Roy. Surg. Eng.* 29, 237.

Vahlquist, B. (1935) *Skand. Arch. Physiol.* 72, 133-160.

Vallette, F.M., De la Porte, S., Koenig, J., Massoulié, J. y Vigny, M. (1990) Acetylcholinesterase in cocultures of rat myotubes and spinal cord neurons: effects of collagenase and cis-hydroxyproline on molecular forms, intra- and extracellular distribution, and formation of patches at neuromuscular contacts. *J. Neurochem.* 54, 915-923.

Varela, J.M. y Mandel, P. (1976) The relative distribution of soluble and insoluble cholinesterases in rat excitable tissues. *Experientia.* 32, 977-978.

Vidal, C.J., Chai, M.S.Y. y Plummer, D.T. (1981a) The effect of solubilization on the properties and molecular forms of rat brain acetylcholinesterase. *Neurochem. Int.* 3, 229-238.

Vidal, C.J., Elmi-Akhounie, E., Chai, M.S.Y. y Plummer, D.T. (1981b) Affinity chromatography of acetylcholinesterase.



The use of Amberlite CG-120 for dissociating the enzyme-inhibitor complex. *J. Chrom.* 219, 71-79.

Vidal, C.J., Chai, M.S.Y. y Plummer, D.T. (1987a) The effect of temperature on the activity of acetylcholinesterase preparations from rat brain. *Neurochem. Int.* 11, 135-141.

Vidal, C.J., Muñoz-Delgado, E. y Yagüe-Guirao, A. (1987b) Acetylcholinesterase in membrane fractions derived from sarcotubular system of skeletal muscle; presence of monomeric acetylcholinesterase in sarcoplasmic reticulum and transverse tubule membranes. *Neurochem. Int.* 10, 329-338.

Vigny, M., Gisiger, V. y Massoulié, J. (1978) "Non specific" cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties and significance of the two enzyme systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2588-2592.

Viratelle, D.M. y Bernhard, S.A. (1980) Major component of acetylcholinesterase in *Torpedo electroplax* is not basal lamina associated. *Biochemistry.* 19, 4999-5007.

Voetmann, E. (1949) En: On the structure and surface area of the human choroid plexures: a quantitative anatomical study. *Acta Anat. Suppl.* 10, pp. 1-116. Basel.

Weitz, M., Bjerrum, O.J. y Brodbeck, U. (1984) Characterization of an active hydrophilic erythrocyte membrane acetylcholinesterase obtained by limited proteolysis of the purified enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 776, 65-74.

Welch, K. y Friedman V. (1960) The cerebrospinal fluid values. *Brain.* 83, 454.

Wester, P., Pun, G., Reiz, S., Winbland B. y Wester P.O. (1987) Increased monoamine metabolite concentrations and cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with acute stroke. *Acta Neurol. Scand.* 76, 473-479.

Whittaker, M. (1980) Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia.* 35, 174-197.

Whittaker, V.P. (1969) Significance of bound acetylcholine in nerve tissue: comparative aspects. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 5, 129-139.

Wilson, B.W., Nieberg, P.S., Walker, C.R., Linkhart, T.A. y Fry, D.M. (1973) Production and release of acetylcholinesterase by cultured chick embryo muscle. *Dev. Biol.* 33, 285-299.

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.

Wolfe, A.D. (1989) The monoclonal antibody AE2 modulates fetal bovine serum acetylcholine hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 997, 232-235.

Wood, J.E. (1983) *En: Neurobiology of cerebrospinal fluid* 2. Plenum Press. New York.

Yates, C.M., Simpson, J., Maloney, A.F.J. y Gordon, A. (1980) Neurochemical observations in the case of Pick's disease. *J. Neurol. Sci.* 48, 257-263.

Younkin, S.G., Rosenstein, C., Collins, P.L. y Rosenberry, T.L. (1982) Cellular localization of the molecular

forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. *J. Biol. Chem.* 257, 13630-13637.

Zakut, H., Matzel, A., Schejter, E., Auni, A. y Soreq, H. (1985) Polymorphism of acetylcholinesterase in discrete regions of the developing human fetal brain. *J. Neurochem.* 45, 382-389.

Zanetta, J.P., Rakonczay, Z., Reeber, A., Kása, P. y Vincendon, G. (1981) Antibodies against the membrane-bound acetylcholinesterase from adult rat brain. *FEBS Lett.* 129, 293-296.