

ENZIMAS POLIFUNCIONALES: EL CASO DE LA ACETILCOLINESTERASA*

Gustavo Sánchez-Chávez y Rocío Salceda

RESUMEN

La acetilcolinesterasa (AChE) es la enzima que termina el efecto neurotransmisor de la acetilcolina y junto con la butirilcolinesterasa (BChE) pertenece al grupo de enzimas denominadas colinesterasas (ChEs), codificadas por genes diferentes. Dependiendo de su edición alternativa en el extremo 3' de los transcritos y de modificaciones post-traduccionales se originan tres variantes de AChE: la AChE-R se expresa como monómeros en condiciones de estrés y neuropatológicas; la AChE-E como dímeros anfífilicos que están presentes en eritrocitos y la AChE-T se localiza principalmente en las sinapsis, en formas globulares como asimétricas. Adicionalmente a su función colinérgica convencional, la AChE participa en procesos de desarrollo y su secuencia contiene un dominio que se presenta en proteínas de adhesión celular como la glutactina, la neurotactina, la gliotactina y las neuroliginas. Cambios en su concentración o propiedades se presentan en algunas neuropatologías como el Alzheimer, Parkinson y miastenia gravis, aunque no son su causa.

PALABRAS CLAVE: Sinapsis, acetilcolina, colinesterasas, isoformas, desarrollo, patologías.

INTRODUCCIÓN

Las neuronas se comunican entre sí a través de sitios especializados conocidos como sinapsis, en las cuales la membrana de las terminales axónicas de una neurona presináptica está en aposición con la membrana de la neurona postsináptica. El impulso nervioso, de naturaleza eléctrica, no puede transmitirse directamente a la membrana postsináptica debido a que existe un espacio entre las membranas pre- y postsinápticas, se requiere de la libe-

ración de una sustancia llamada neurotransmisor que llega a la membrana postsináptica y se une a un receptor específico; como resultado de esta interacción, la neurona postsináptica cambia su potencial de membrana.

Existen una gran variedad de neurotransmisores, entre ellos la acetilcolina (ACh), la cual fue descrita en 1914 (1). Este neurotransmisor ejerce su acción en diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC)

así como en ganglios periféricos y en la placa neuromuscular. La neurotransmisión mediada por ACh es fundamental en la función del SNC; su interrupción abrupta es letal y su pérdida gradual, como en múltiples atrofias y en la enfermedad de Alzheimer, está asociada al deterioro cognitivo progresivo, autonómico y a la función neuromuscular. El efecto de la ACh en la sinapsis termina por la actividad de una enzima conocida como acetilcolinesterasa (AChE) (2)

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) is the enzyme that ends the neurotransmitter effect of the acetylcholine and together with butyrylcholinesterase (BChE) belong to a group of enzymes known as cholinesterases (ChEs), which are synthesized from a single gene for each one. Three variants of AChE are originated from alternative splicing at 3' end of the transcripts and post-translational modifications. The AChE-R is expressed as monomers in stress and neuropathological conditions; the AChE-E are amphiphilic dimers that are present in erythrocytes and the AChE-T is localized mainly in synapses, and can be expressed as asymmetric and globular forms. Additional to its classical cholinergic function, AChE participates in developmental processes and contains a domain that is present in cell adhesion proteins as the glutactin, neurotactin, gliotactin and neuroligins. Changes in their levels or properties are present in different neuropathologies as the Alzheimer, Parkinson and miastenia gravis.

KEY WORDS: Synapses, acetylcholine, cholinesterases, isoforms, development, pathologies.

*Recibido: 01 de abril de 2008 Aceptado: 10 junio de 2008 (publicado extemporáneamente)

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-253 04510 México, D.F. Tel. (5255) 5622 5569 Fax (5255) 5622 5607 Correo E: rsalceda@ifc.unam.mx, gsanchez@ifc.unam.mx

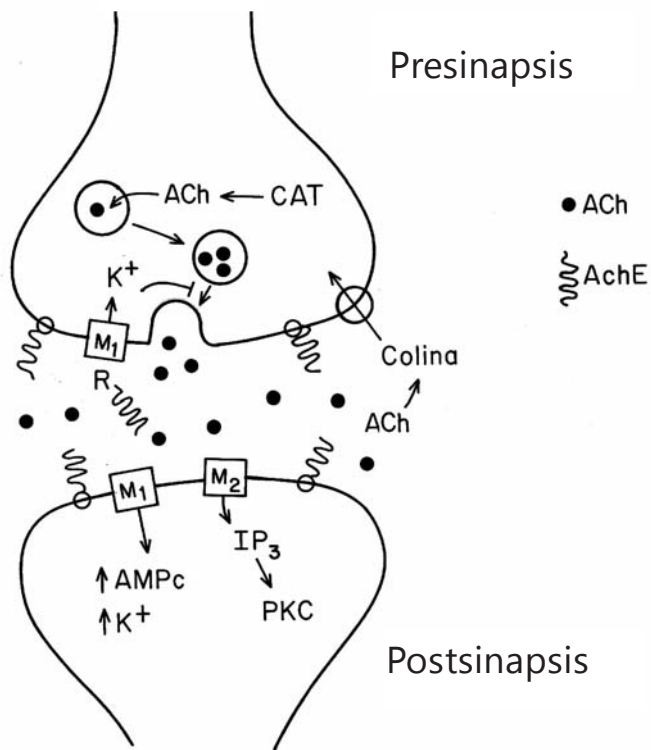


Figura 1. Esquema de una sinapsis colinérgica. En la terminal presináptica la acetilcolina transferasa (CAT) sintetiza a la acetilcolina (ACh) a partir de colina y acetil coenzima A. La ACh se acumula en las vesículas vía un transportador y se libera por la acción de potenciales de acción. La ACh se une con receptores muscarínicos (M1 y M2) en la terminal postsináptica, los que transducen la señal a través de vías que involucran al adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y al inositol trisfosfato (IP₃). La ACh se hidroliza por la acetilcolinesterasa (AChE) soluble o anclada a la membrana pre- y postsináptica. La colina se recaptura por un transporte de alta afinidad presente en la presinapsis.

(Fig. 1). La AChE hidroliza rápidamente a la ACh en acetato y colina, un milisegundo después de que fue liberada, regulando la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis (3).

Desde su descubrimiento en la década de 1920, la AChE ha sido una de las enzimas más estudiadas en cuanto a su efecto fisiológico, mecanismo de acción, naturaleza de su centro activo, así como su distribución y localización en diferentes tejidos (4, 5).

La AChE pertenece a una familia de enzimas conocidas como colinesterasas, las cuales pueden ser definidas como un grupo de esterasas de serina capaces de hidrolizar ésteres de colina, tales como la acetilcolina. Las colinesterasas tienen una distribución muy amplia, se han encontrado desde organismos unicelulares, plantas, inver-

tebrados y en los vertebrados aparece desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario antes de la sinaptogénesis, lo cual sugiere que estas enzimas pueden tener diferentes funciones.

GENERALIDADES

Las colinesterasas de vertebrados se clasifican dependiendo de sus características bioquímicas y fisiológicas en dos grupos principales, que son codificadas por dos genes distintos: la colinesterasa verdadera o acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7, acetilcolina hidrolasa, acetilcolina acetilhidrolasa), hidroliza a la acetilcolina mucho más rápido que a otros ésteres de colina y es mucho menos activa sobre la butirilcolina y la colinesterasa plasmática o sérica, pseudocolinesterasa o butirilcolines-

terasa (BChE, EC 3.1.1.8, acilcolina acetilhidrolasa) hidroliza a la butirilcolina, pero también a la acetilcolina. Ambas familias de enzimas pueden distinguirse por su reactividad con varios inhibidores específicos, tales como el BW284C51 (dibromuro de 1,5-bis-(alildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona) para la AChE; y el iso-OMPA (tetraisopropil pirofosforamida), para la BChE (3, 6).

La AChE y la BChE son familias de glicoproteínas que pueden estar unidas a la membrana o ser liberadas al espacio extracelular y su heterogeneidad está dada por varias formas moleculares de cada enzima que pueden distinguirse por el número de subunidades catalíticas, las características de solubilidad y las propiedades hidrodinámicas, lo que permite separarlas y analizarlas por cromatografía de filtración en gel o por centrifugación diferencial en gradientes continuos de sacarosa (7).

La estructura molecular de ambas enzimas se estableció para el órgano eléctrico de la anguila *Electrophorus electricus*, y es válida para todos los tejidos y especies estudiados. No hay relación alguna entre la distribución de ambas colinesterasas en los tejidos. La AChE es predominante en músculo y sistema nervioso, en donde los niveles de BChE son menores. La BChE está presente en otros tejidos, como el hígado y después de ser sintetizada y es secretada al plasma.

ESTRUCTURA Y POLIMORFISMO

La AChE y la BChE son codificadas por dos genes diferentes que producen todas las formas moleculares de ambas enzimas. La edición alternativa en el extremo 3' de los transcritos y de modificaciones post-traduccionales, origina tres variantes de AChE con diferentes regiones de codificación o secuencias del carboxilo terminal: la R, la H y la T (Fig. 2).

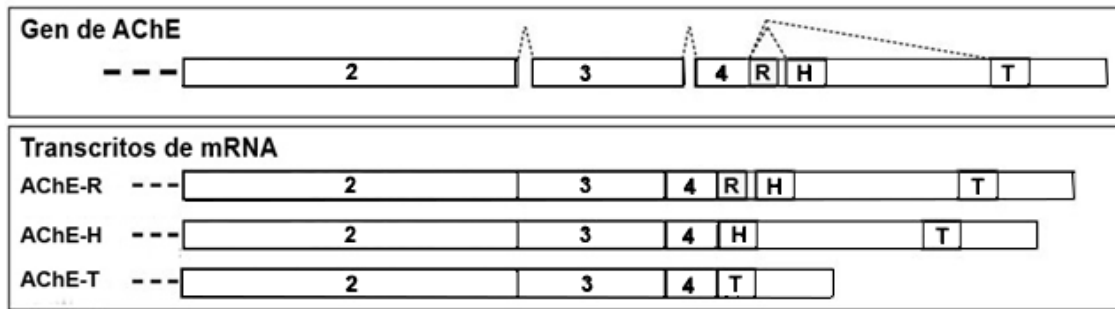


Figura 2. Estructura del gen de AChE y diferentes ediciones del RNAm. El gen de la AChE contiene 4 exones comunes; la edición alternativa en el extremo 3' de los transcritos y modificaciones post-traduccionales, originan tres variantes de la AChE con diferentes secuencias del carboxilo terminal: la AChE-R contiene las regiones 4', 5 y 6 (R, H, y T respectivamente); la AChE-H contiene las regiones 5 y 6 (H y T) y la AChE-T que contiene la región 6 o T.

En mamíferos, el gen de la AChE contiene 4 exones comunes a todas las variantes de AChE y 3 regiones adicionales de codificación. La molécula de AChE que se origina de los transcritos sin editar es un monómero

que se conoce como AChE-R (en inglés AChE "readthrough") o AChE de traducción completa y además de los 4 exones, contiene las tres secuencias adicionales: la secuencia R o 4' que no está presente en las otras variantes, la

H y la T (regiones 5 y 6 respectivamente). Esta isoforma monomérica soluble se expresa predominantemente en ciertas sinapsis durante condiciones asociadas a estrés y algunas neuropatologías (8) (Fig. 2 y Fig. 3).

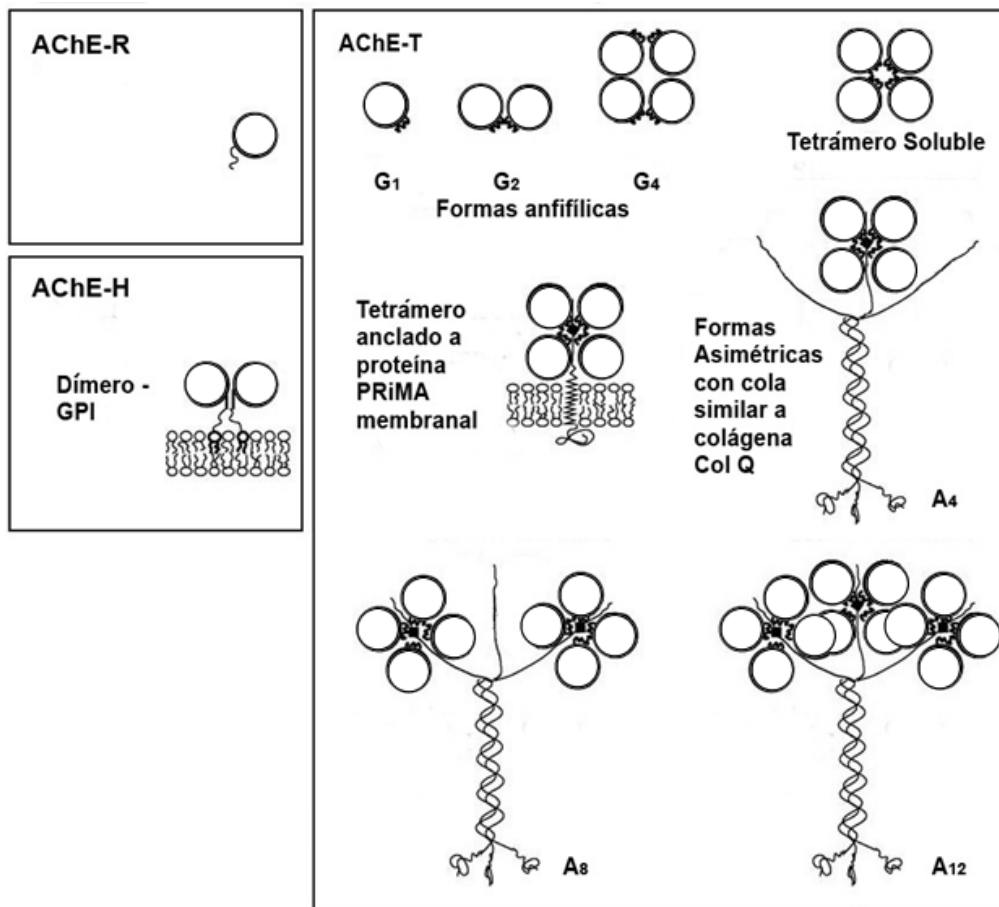


Figura 3. Formas moleculares de AChE originadas por modificaciones post-traduccionales y asociaciones cuaternarias. La AChE-R o AChE de traducción completa, constituida por isoformas monoméricas; la AChE-H o AChE-E (AChE hidrofóbica o de eritrocitos), representada por dímeros anfilílicos; y la AChE-T o AChE-S (AChE con cola o sináptica), que contiene una gran variedad de isoformas globulares y asimétricas.

El transcrito que contiene las regiones 5 y 6 (H y T), se conoce como la variante AChE-H o AChE-E (por AChE hidrofóbica o de eritrocitos) y codifica para dímeros anfifílicos. Estos dímeros están abundantemente distribuidos en las membranas de los eritrocitos de mamífero y su dominio hidrofóbico contiene fosfatidilinositol (cuyos ácidos grasos están contenidos en la membrana), glucosamina y etanolamina la cual está unida por una amida al carboxilo terminal de la subunidad catalítica (9). El anclaje llamado glucosilfosfatidilinositol (GPI), es parcialmente soluble en ausencia de detergente, ya que forma agregados. Se pueden obtener derivados hidrofílicos de esta molécula, utilizando fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) o fosfolipasa D (PLD). Este tipo de isoformas con anclaje GPI no se han observado para la BChE (10) (Fig. 2).

Los transcritos T (de "tailed", cola en inglés) contienen la secuencia 6 y producen la AChE-T también conocida como AChE-S (AChE sináptica). Tanto la AChE como la BChE contienen éste péptido C-terminal que codifica para las múltiples formas moleculares funcionales expresadas en diferentes tejidos (Fig. 1 y Fig. 3). Las formas moleculares de ambas ChEs se presentan como homo- y hetero-oligómeros de la subunidad catalítica. La subunidad catalítica o monómero es una glicoproteína globular de peso molecular de 70 a 80 kDa que puede asociarse en dímeros y tetrámeros por enlaces disulfuro. Con base en su estructura cuaternaria, se distinguen formas asimétricas y formas globulares (6).

Las formas asimétricas (A) se caracterizan por la presencia de una cola de naturaleza similar a la colágena, formada por una triple hélice de 100 kDa de subunidades Q. Cada subunidad Q puede unirse por enlaces disulfuro a un tetrámero catalítico,

de manera que las formas asimétricas que contienen uno, dos o tres tetrámeros catalíticos son llamadas A₄ (410 kDa), A₈ (796 kDa) y A₁₂ (1,150 kDa) respectivamente y se expresan en tejidos muscular y nervioso. Estas formas asimétricas no-anfifílicas se agregan reversiblemente en concentraciones elevadas de sales debido a las colas de colágena, y son sensibles a colagenasa y a heparina. Su anclaje es a través de la cola de colágena con las cadenas de glicosaminoglicanos de los proteoglicanos ricos en heparán sulfato de la matriz extracelular (6) (Fig. 3).

Las formas globulares (G) que carecen de la cola de colágena, constituyen un grupo heterogéneo formado por: monómeros de la subunidad catalítica G₁ (70 kDa), dímeros G₂ (165 kDa) y tetrámeros G₄ (331 kDa); y estos a su vez, pueden ser anfifílicos o no-anfifílicos. Las isoformas anfifílicas se solubilizan con Triton X-100 y contienen un dominio hidrofóbico que las ancla a la membrana, el cual puede ser removido mediante digestión proteolítica.

Otro tipo de isoformas anfifílicas pertenecen al grupo II y son insensibles a la PI-PLC y a la PLD y se solubilizan fácilmente sin formar agregados en ausencia de detergentes. Una forma de BChE de este tipo se ha localizado en las células de la mucosa del intestino de la rata. En general, se ha considerado que todas las formas ligeras de la BChE en mamíferos corresponden a este tipo de isoformas anfifílicas.

El último grupo de formas anfifílicas son tetrámeros G₄ que se anclan a la membrana plasmática a través de un segmento protéico transmembranal hidrofóbico de 20 kDa conocido como subunidad P o Proteína PRiMA (proline-rich membrane anchor, anclaje membranal rico en prolina en inglés), el cual está unido por puentes disulfuro al tetrámero y es sensible a proteinasa

K. Esta G₄ anfifílica se localiza mayormente en el sistema nervioso central (3, 9) (Fig. 3).

El suero sanguíneo contiene formas de BChE completamente solubles no-anfifílicas de G₄. La forma G₄ hidrofílica de AChE es secretada por la glándula adrenal, por células nerviosas al líquido cerebroespinal (3, 6).

Los polipéptidos de la AChE son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, donde son glicosilados probablemente de una manera co-traduccional. Una vez ensambladas las formas oligoméricas, principalmente dímeros y tetrámeros, son estables. Del 70 al 80% de las moléculas de AChE recién sintetizadas, son degradadas rápidamente en una etapa temprana durante su tránsito intracelular. El resto de las moléculas de AChE ensambladas, pasan por el aparato de Golgi, donde adquieren residuos de oligosacáridos adicionales como N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico. Las moléculas destinadas a permanecer unidas a la membrana son modificadas por la adición covalente de glicofosfolípidos o por asociación con otra cadena polipeptídica hidrofóbica. Posteriormente las moléculas de AChE son conducidas a través de los microtúbulos a la superficie celular o son secretadas al medio extracelular. Cada forma molecular se ensambla por separado durante su maduración molecular y una vez ensambladas, son estables y no se interconvierten, de modo que las enzimas unidas a la membrana celular no son precursoras de las secretadas (3, 6, 9).

ACTIVIDAD CATALÍTICA. SITIOS ACTIVOS

La AChE es una hidrolasa de serina, su proceso catalítico implica acilación y desacilación en un residuo de serina de la triada catalítica en el centro activo de la enzima, el cual está localizado dentro de una cavidad estrecha y

con unos 20Å de profundidad o garganta, rodeada por 14 residuos de aminoácidos aromáticos que pueden ser importantes para guiar al sustrato hacia el centro activo. Los aminoácidos componentes de la triada catalítica son una serina (Ser 200), una histidina (His 440) y un glutamato (Glu 327). Pruebas cristalográficas y mutagénesis dirigida demuestran que la triada catalítica de la AChE es similar a otras proteasas de serina como la quimiotripsina y la carboxilesterasa, entre otras (3, 6, 7, 9).

La estructura del sitio activo de la AChE es complementaria a la del sustrato. Así, presenta dos subsitios: un subsitio aniónico que atrae por fuerzas electrostáticas al grupo amonio de la acetilcolina e interacciones hidrofóbicas con los grupos metilo del nitrógeno cuaternario de la colina y dispone al sustrato en una orientación adecuada y el subsitio del éster, responsable de la acción catalítica, que rompe el enlace éster (3, 6, 9).

La reacción es básicamente una sustitución nucleofílica, y desplaza a la colina de la acetilcolina, el grupo hidroxilo de la serina es finalmente acetilado. El mecanismo catalítico es de tipo ácido-base y se basa en la desprotonación del grupo hidroxilo de la serina, que incrementa la nucleofilicidad y de esta manera se acelera la acilación de la enzima. Los ésteres de colina son los mejores sustratos para la AChE, aunque puede hidrolizar otros ésteres aromáticos.

Además de los dos subsitios del sitio catalítico, la AChE presenta uno o más lugares adicionales de unión para acetilcolina u otros compuestos cuaternarios, los cuales son conocidos como sitios aniónicos periféricos que se localizan en la entrada de la cavidad del centro activo. Se ha propuesto que el sitio activo participa en asociaciones con proteínas heterólogas que ocurren durante la sinaptogénesis o en la neurodegeneración.

INHIBIDORES

El empleo de inhibidores de AChE ha sido muy útil para el estudio de la estructura del centro activo de la enzima; existen diferentes compuestos que pueden unirse a cualquiera de los subsitios del centro activo de la AChE o de la BChE e inhibirlos específicamente, tales como el BW284C51 para el subsitio aniónico de la AChE; y el iso-OMPA, etopropazina y bambuterol para la BChE.

Muchos de los inhibidores de las ChEs de tipo organofosforados (que actúan en el subsitio del éster) y carbamatos se utilizan como insecticidas (3, 7), y su toxicidad se puede determinar por los niveles de AChE y BChE en sangre.

OTRAS FUNCIONES DE LA AChE

La función biológica de la AChE no se limita a la hidrólisis de la ACh, acción que se denomina clásica o canónica. En el sistema nervioso, la AChE muestra una amplia distribución y no siempre se relaciona con la actividad de la acetilcolina transferasa, enzima que sintetiza a la ACh y que es marcadora del sistema colinérgico (Fig. 1). La primera evidencia de otras funciones de la AChE fue la observación de su presencia previa a la sinaptogénesis y en neuronas adultas no colinérgicas (2), posteriormente se demostró en tejidos no neurales en desarrollo, así como en tejido hematopoyético, en endotelio de los vasos, en la glia y en células neoplásicas. Adicionalmente, se observó que la AChE promueve el crecimiento de neuritas en células nerviosas de pollo en cultivo, efecto que no se observa con la adición de un inhibidor del sitio periférico (no catalítico) de la enzima (2, 11). La transfección de la AChE o uso de vectores antisentido del cDNA de la enzima causaron la neuritogénesis en distintos tipos neuronales en cultivo

(3), resultados que sugirieron una acción trófica de la AChE.

Se desconoce si todas las variantes de la enzima tienen la capacidad de inducir la extensión de neuritas; no obstante, la transfección con DNA murino causó un aumento en el número de dendritas en células de neuroblastoma en cultivo, lo que es revertido por la adición de un anticuerpo policlonal contra la AChE (12). La microinyección y transfección de la enzima en glioma en cultivo resultaron en diferentes efectos en el desarrollo y la morfología de los astrocitos del sistema nervioso central. La transfección de la isoforma S promovió el crecimiento de procesos dendríticos, mientras que las células se redondearon por la transfección de AChE-R. Asimismo, se demostró que la expresión de una AChE-S incapaz de hidrolizar ACh tiene los mismos efectos que la enzima activa, demostrando que el efecto en el crecimiento neurítico es independiente de la actividad catalítica (2).

Las propiedades no catalíticas de la AChE parecen ser explicadas con base en su semejanza con proteínas relacionadas con la adhesión celular (4). En los últimos 10-15 años se ha identificado una familia de proteínas de membrana que participan en la formación y diferenciación de las uniones celulares. Estas proteínas que carecen de actividad enzimática se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular con una secuencia homóloga a la AChE, secuencia o dominio de colinesterasa (CE) (Fig. 4). El alto grado de homología de la CE en proteínas de superficie membranal de diferentes especies y tipos celulares, sugiere que la AChE puede participar en procesos de adhesión celular durante el desarrollo, así como en interacciones neurona-glia.

El primer homólogo de la AChE que se identificó fue la tiroglobulina, precursor de las hormonas tiroideas

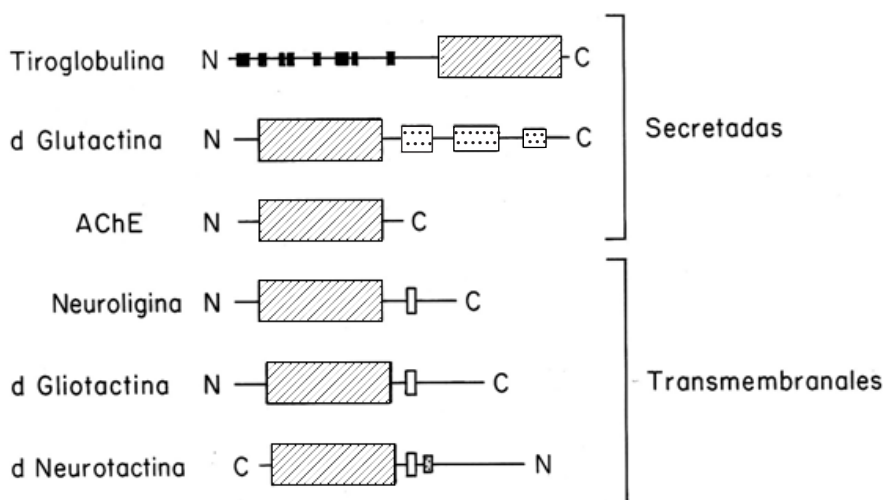


Figura 4. Estructura de proteínas con dominio de colinesterasa (CE). Los miembros de la familia comparten 25%-32% de la secuencia de aminoácidos con la AChE, dominio CE (rayado). La tiroglobulina es una proteína más grande y contiene secuencias repetitivas (negro). La glutactina y neurotactina tienen dominios de superenrollamiento (punteado). Algunas presentan un dominio transmembranal (blanco) (4).

que presenta un 28% de identidad en la secuencia de aminoácidos en la región del C-terminal (5), lo que sugiere que la región homóloga en ambas proteínas adopta una estructura tridimensional similar. En este grupo de proteínas se encuentran la glutactina, la neurotactina, la gliotactina y las neuroliginas (6, 12) (Fig. 4).

La glutactina es una glicoproteína aniónica sulfatada de la matriz extracelular de las membranas basales del embrión de *Drosophila* que se semeja a la tiroglobulina, a la AChE y a otras esterasas de serina. La neurotactina es una glicoproteína transmembranal que se expresa en tejido neuronal y epitelial de embriones y larvas de *Drosophila*; el dominio extracelular está compuesto del amino terminal y el dominio CE, cuya estructura tridimensional es casi idéntica a la de la AChE. En construcciones quiméricas en las que el dominio CE de esta proteína de adhesión, se reemplazó por el homólogo de AChE de *Drosophila* o de *Torpedo*, mantuvieron las propiedades adhesivas, a pesar de que la AChE carezca de un dominio transmembranal. Cuando el

dominio CE en la neurotactina se elimina, la agregación de células en el estadio de gástrula se pierde, no obstante, los niveles de agregación de la cepa silvestre se mantienen con proteínas quiméricas en las que el dominio se reemplaza por secuencias homólogas de glutactina o de AChE. La gliotactina, similar a la neuroligina se expresa en la glia periférica y en células epiteliales, éstas últimas contribuyen a la formación de la barrera hemolinfa-nervio en los insectos. Se han identificado cinco genes de las neuroliginas en el humano que se expresan preferentemente en el cerebro; la más estudiada es la neuroligina-1, concentrada en la membrana postsináptica de las neuronas excitadoras en la neocorteza de la rata (13, 14). Estas proteínas interactúan con una familia de receptores membranales llamados β -neurexinas y su sobreexpresión en neuronas del hipocampo estimula la diferenciación de las terminales pre- y postsinápticas, lo que sugiere que la interrelación neuroligina- β -neurexina promueve la formación y maduración de las sinapsis (15).

Los primeros estudios para determinar cómo estas neuroliginas

interactúan con el dominio de receptores a CE para producir un señalamiento específico provienen de la estructura y función de la neuroligina-1. Análisis de mutagénesis dirigida al dominio CE de la neuroligina permitieron identificar dos elementos que se requieren para que se induzca la formación de la sinapsis: a) la región central del dominio CE para la unión a la β -neurexina y b) dos alfa hélices que forman una interfase de dimerización, interfase que está conservada en las proteínas que forman oligómeros. Los dominios CE median interacciones heterofílicas y la organización de los oligómeros son importantes para su función, por lo que la identificación de ligandos para la AChE en este dominio aportará conocimiento sobre los mecanismos que regulan la diferenciación celular en respuesta a estas interacciones (14, 15).

Con base en las propiedades comunes de varias proteínas con dominio CE, se ha propuesto que éstas y la AChE pueden tener funciones estructurales redundantes que no están restringidas a su secuencia primaria. Aunque parece extraño que una enzima pueda tener otro tipo de funciones, la AChE no es el único ejemplo, la guanilato cinasa asociada a la membrana tiene dominios de moléculas citoplásmicas que interactúan con el citoesqueleto y con proteínas de señalización (16). Tales proteínas semejan homólogos estructurales de la guanilato cinasa pero carecen de la actividad catalítica (7). Se ha demostrado que la función de un tipo de enzima puede variar dependiendo de su localización celular, del tipo celular en que se exprese y la oligomerización que presente.

PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA AChE

Cambios en los niveles de AChE-S y sus propiedades se han reportado en varias enfermedades neurodege-

nerativas (9). Las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y miastenia gravis son las tres neuropatologías más estudiadas en relación con alteraciones en la AChE.

La enfermedad de Alzheimer es un desorden degenerativo del sistema nervioso central que resulta en el deterioro de la función cognoscitiva. El estudio *postmortem* de los cerebros de pacientes con Alzheimer reveló pérdida neuronal y sináptica, así como la presencia de placas que contienen a la proteína β -amiloide y la tau fosforilada formando neurofilamentos. Asociado al complejo β -amiloide se reportó la actividad de AChE que es resistente a bajo pH, que no se inhibe por sustrato y que presenta reducida sensibilidad a agentes anticolinesterásicos (anti-ChEs). Adicionalmente, existe evidencia de que la forma R de la enzima se expresa en esta enfermedad, aunque no hay una relación causa efecto de esta enzima con la enfermedad de Alzheimer.

La mayoría de las drogas contra este padecimiento son anticolinesterásicos para la ChE-S que inhiben su sitio activo; aunque la asociación de la AChE y las placas del β -amiloide es a través del sitio periférico y no propiamente del sitio activo.

Se ha sugerido que las células gliales son la principal fuente de AChE en estas placas y los fármacos anticolinesterásicos son el único tratamiento aprobado para los pacientes, aunque esto es solo paliativo que con el tiempo presenta muchos efectos colaterales. Así, la AChE puede estar asociada no sólo al desarrollo normal de neuronas sino también al control de su capacidad de responder a daño.

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo que afecta el control del movimiento causado por alteraciones en la α -synucleína. Aunque involucra degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* y el estriado; debido a la

elevada actividad de AChE en el estriado, el sistema colinérgico está estrechamente relacionado a esta patología.

En los desordenes de la movilidad conocidos como miastenias, se altera el sistema colinérgico que incluye a varias proteínas como el receptor de ACh, la acetilcolina transferasa y el transportador de colina. La miastenia gravis es un desorden autoinmunitario en el que anticuerpos circulantes contra el receptor de ACh lleva a la alteración funcional de la unión neuromuscular, caracterizada por una disminución progresiva de la amplitud de la respuesta eléctrica y por debilidad muscular.

Adicionalmente se han demostrado alteraciones en la expresión y actividad de AChE en una gama de padecimientos. Las alteraciones asociadas a la ansiedad son comúnmente desordenes psiquiátricos relacionados al estrés y a la estimulación de neuronas colinérgicas, y se conoce que el estrés induce la acumulación de la AChE-R. La actividad de AChE se encontró incrementada en meningiomas, astrocitomas y tumores de glioblastoma y su patrón de isoformas es diferente al del tejido sano. Se han observado alteraciones en la expresión de la AChE en diferentes tumores, amplificación de genes de AChE en leucemias, tumores de ovario y en la agresividad de astrocitomas; evidenciando su participación en la tumorigénesis. Estos estudios sugieren que la AChE está involucrada en la regulación del ciclo celular (17).

Las alteraciones de la AChE en varios estados patológicos que incluyen neuropatologías y síndromes relacionados con el estrés, utilizan a las variantes de la AChE como el principal blanco para el desarrollo de drogas y su correspondiente aplicación en las terapias de estas alteraciones. Los compuestos más frecuentemente empleados en la terapia son los carbamatos, inhibidores de las

colinesterasas, compuestos muy parecidos a los insecticidas y que aún a bajas dosis, presentan efectos colaterales indeseados, por lo que otras estrategias dirigidas para prevenir la sobreexpresión, particularmente de la isoforma R de la AChE, están en desarrollo.

EVOLUCIÓN DE LAS COLINESTERASAS

¿Cómo se desarrollaron en la evolución las funciones no enzimáticas de las subunidades catalíticas de la AChE?. Aunque en el caso de la AChE la mayoría de los estudios se ha enfocado a su actividad en la hidrólisis de la ACh, esta enzima no está restringida al sistema nervioso y parece tener diferentes funciones, debido a que está presente en bacterias y plantas en las que se piensa puede funcionar como un factor trófico. Las proteínas con dominio CE (Fig. 4) parecen ser el resultado de duplicaciones de un gen ancestral de AChE dado que la comparación de la secuencia del dominio catalítico y del no catalítico sugiere que en estos genes la actividad enzimática pudo perderse en varias etapas independientes durante la evolución (8).

Las comparaciones genómicas sugieren que la duplicación del gen de AChE ocurrió en diferentes tiempos durante la evolución y formaron genes nuevos que codifican para el dominio CE. Una duplicación tuvo lugar antes de la divergencia de nemátodos e insectos, subsecuentemente, duplicaciones independientes llevaron a la formación de cuatro genes en nemátodos. Algunas familias o especies pueden haber perdido copias de estos genes, como por ejemplo *Drosophila*, o tener duplicación idiotípica. Otra duplicación parece haber ocurrido en la línea de los tetrápodos, ya que anfibios y reptiles tienen homólogos de BChE, pero no los peces. Los genomas de vertebrados poseen dos genes: el de AChE y el de

BChE; las distintas isoformas de AChE y su localización es variable, nuevas formas de unión a las membranas aparecieron en la evolución de los vertebrados y pueden haber adquirido funciones diferentes. Una posibilidad es que la interacción proteína-proteína mediada por los dominios CE, se desarrollara durante la evolución de los organismos multicelulares permitiendo que la AChE se concentre en sitios celulares específicos, particularmente en las uniones sinápticas.

PERSPECTIVAS

Se requieren una gama de estudios para entender la función de las colinesterasas: profundizar en el conocimiento de su heterogeneidad molecular, que parece estar regulada a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional, lo que produce patrones complejos de expresión; determinar los mecanismos que modulan la concentración de la enzima en un tejido dado, la distribución de sus isoformas, su ensamble oligomérico,

glicosilación y localización sub-celular; precisar la diferencia entre la función enzimática clásica y la no catalítica; determinar si la AChE en algunas patologías podría interactuar con proteínas con las que normalmente no interactúa; estudiar si alteraciones en las propiedades de adhesión pueden llevar a fenotipos patológicos específicos. Para estudiar estas funciones, se requiere de mutaciones en los genes de AChE y estrategias de eliminación de la actividad génica.

REFERENCIAS

- Dale HH (1914) The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* 6: 147-190.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers W, Molinoff PB (1989) *Basic Neurochemistry*. Raven Press Ltd., New York, USA, p 984.
- Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM (1993) Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. *Prog Neurobiol* 41:31-91.
- Brown GL, Dale HH, Feldberg W (1936) Reactions of the normal mammalian muscle to acetylcholine and to eserine. *J Physiol* 87: 394-424.
- Loewi O, Navratil E (1926) Übertragbarkeit der Herznevenwirkung, X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoffes. *Pflugers Arch* 214:678-688.
- Massoulié J, Bon S, Perrier N, Falasca C (2005) The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact* 157-158:3.14.
- Rotundo RL (1983) Acetylcholinesterase biosynthesis and transport in tissue culture. En: *Methods in Enzymology*. Editores: Colowick SP, Kaplan NO. Academic Press, New York. Vol 96, Parte J: 353-367.
- Meshorer E, Soreq H (2006) Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci* 29(4):216-224.
- Silman I, Futerman AH (1987) Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *Eur J Biochem* 170:11-22.
- Chatonnet A, Lockridge O (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 260: 625-634.
- Layer PG, Weikert T, Alber R (1993) Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res* 273: 219-226.
- Koenigsberger C, Chiappa S, Birmijoin S (1997) Neurite differentiation is modulated in neuroblastoma cells engineered for altered acetylcholinesterase expression. *J Neurochem* 69: 1389-1397.
- Grifman M, Galyam N, Seidman S, Soreq H (1998) Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroigin in mammalian neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13935-13940.
- Sternfeld M, Ming G, Song H, Sela K, Timberg R, Poo M, Soreq H (1998) Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contribution of its hydrolytic capacity, core protein and variable C termini. *J Neurosci* 18: 1240-1249.
- Scholl FG, Scheiffele P (2003) Making connections: cholinesterase-domain proteins in the CNS. *Trends Neurosci* 26: 618- 624.
- Olsen O, Bredt DS (2003) Functional analysis of the nucleotide binding domain of membrane -associated guanylate kinases. *J Biol Chem* 278: 6873-6878.
- Vidal CJ (2005) Expression of cholinesterases in brain and non brain tumor. *Chem Biol Interact* 157-158: 227-232.