

74621 E1

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

SEMINARIO DE LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

"ACTIVIDAD DE ACETILCOLINESTERASA Y COLINESTERASA  
INESPECIFICA EN HIGADO DE RATA: Estabilidad Térmica,  
Localización Subcelular, Formas Moleculares y algunas  
Propiedades de Extracción"

ELEONORA KATZ

DIRECTOR: Dr. JULIO M. AZCURRA

CO-DIRECTOR: Lic. PATRICIA M. BERNINSONE

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Biología Celular; FCE Y N;  
UBA

- Marzo 1990 -

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Julio M. Azcurra, director de este Seminario, por haberme permitido iniciar mi formación en la investigación científica en su equipo de trabajo y por su estímulo y confianza desde que comencé a trabajar bajo su dirección.

A la Lic. Patricia Berninsone, co-directora de este Seminario, no tengo palabras para agradecer su apoyo constante, su permanente interés en mi formación y sobre todo, la generosidad con que me brindó su experiencia y su tiempo.

A Gustavo Ibarra, quiero agradecerle haber participado, junto con la Lic. Patricia Berninsone y conmigo, en la realización de varios de los experimentos de este trabajo.

Quisiera también agradecer el apoyo y el interés constante a lo largo de estos años de la Lic. Mónica Napp y del Dr. Juan L. Brusés, así como el de mis otros compañeros y ex-compañeros del laboratorio de Biología Celular.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Eduardo Cánepa por la lectura crítica de este manuscrito y al Lic. Ricardo Olivera por su colaboración en la realización de los gráficos de este trabajo.

Al Lic. Daniel Olivera, a Matías Rodgers y a Leda B. de Olivera quiero expresarles mi más profundo reconocimiento por su apoyo incondicional, su estímulo constante y sobre todo por su inagotable paciencia a lo largo de toda mi carrera.

## ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina  
AchE: acetilcolinesterasa  
A.E.: actividad específica  
5'AMPasa: 5' nucleotidasa  
ATC: ioduro de acetiltiocolina  
BuCh: butirilcolina  
BTC: ioduro de butiriltiocolina  
°C: grados centígrados  
Ci: Curie  
ChE: colinesterasa inespecífica  
ChEs: colinesterasas  
cm: centímetros  
DFP: difluorofosfato  
D.O.: densidad óptica  
DS: desvío estándar  
EDTA: ácido Etilen-diamino tetra-acético  
g: fuerza de gravedad  
GA: Aparato de Golgi  
Glu-6-Pasa: glucosa-6-fosfatasa  
gr: gramos  
h: horas  
Hto.: homogenato  
l: litros  
M: molar  
MIC: fracción microsomal  
min: minutos

ml: mililitros

mM: milimolar

MM: materiales y métodos

NeuNac-transferasa: Ácido N-acetilneuramínico transferasa

nM: nanomolar

nmoles: nanomoles

P/V: peso en volumen

PM: membrana plasmática

Prots.: proteínas

RE: retículo endoplasmático

REL: retículo endoplasmático liso

RER: retículo endoplasmático rugoso

Sac: sacarosa

Sn: sobrenadante

TCA: ácido tricloro acético

TX-100: Tritón-X-100

uCi: microcurie

ul: microlitros

uM: micromolar

umoles: micromoles

V/V: volumen en volumen

## INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1 Animales	17
3.2 Extracción de actividad de colinesterasas a partir de tejido hepático	17
3.3 Fraccionamiento de Formas Moleculares por velocidad de sedimentación	18
3.4 Fraccionamiento Subcelular	19
3.5 Lavados	20
3.6 Integridad de las vesículas del Reticulo endoplasmático (RE)	21
3.7 Estabilidad térmica de AchE y ChE	22
3.8 Ensayos con inhibidores específicos de AchE y ChE	23
3.9 Determinaciones bioquímicas	24
3.10 Drogas utilizadas	30
4. RESULTADOS: Discusión y Consideraciones Metodológicas	
4.1 Ensayos con inhibidores específicos de AchE y ChE	36
4.2 Estabilidad térmica de AchE y ChE	43
4.3 Extracciones	49
4.4 Formas Moleculares	56
4.5 Fraccionamiento subcelular	60
4.6 Distribución de actividades de AchE y ChE en distintas fracciones subcelulares	64
4.7 Orientación	69
4.8 Grado de Asociación a membranas	72
5. DISCUSION FINAL Y CONCLUSIONES	75
6. BIBLIOGRAFIA	82

## 1.- INTRODUCCION

Las colinesterasas (ChEs) son enzimas que, en contraste con otras esterasas (alilesterasas, esterasas aromáticas), presentan una marcada preferencia por la hidrólisis de ésteres de colina. En los vertebrados existen dos tipos de colinesterasas capaces de hidrolizar rápida y específicamente el neurotransmisor acetilcolina, la **acetilcolinesterasa** (AchE; acetil colina acilhidrolasa; E.C. 3.1.1.7) y la butirilicolinesterasa o "**colinesterasa inespecífica**" (ChE; acil colina acilhidrolasa; E.C. 3.1.1.8). Ambas enzimas presentan un alto polimorfismo estructural y se hallan ampliamente distribuidas en tejidos nerviosos y no nerviosos (Massoulie y Bon, 1982).

El rol de la AchE en la terminación de la transmisión colinérgica ha sido bien establecido (Koelle, 1969; Silver, 1974), sin embargo se desconoce aún la función que cumple la ChE en ese contexto. Asimismo, la presencia de ambas enzimas en tejidos no nerviosos y nerviosos no-colinérgicos ha sugerido varias hipótesis con respecto al rol fisiológico de las ChEs, a saber : morfogénético (Layer, 1983; Falugi y Rainieri, 1985; Layer y col., 1985, 1987, 1988; Robertson y Mostamand, 1988), neuromodulador (Chubb y col., 1980, 1983 ;

Lockridge, 1982; Chubb y Millar, 1984; Millar y Chubb, 1984), control de la permeabilidad de membrana en eritrocito y barrera hematoencefálica; motilidad en espermatozoide; metabolismo lipoproteico (Revisión de Toutant y Massoulie, 1988). Sin embargo aún es poco claro el significado de la amplia distribución tisular de las ChEs.

Sin bien ambas enzimas presentan un gran paralelismo en cuanto a estructura, mecanismo de acción, naturaleza de los sitios activos, asociaciones cuaternarias y distribución tisular , lo cual llevó a plantear la hipótesis de que la ChE podría ser un precursor biosintético de la AchE (Koelle, 1977), numerosos estudios demuestran que son entidades diferentes y que provienen de genes distintos (Vigny y col., 1978; Edwards y Brimijoin, 1982; Brimijoin y col., 1983; Mintz y Brimijoin, 1985). En la figura A, se detallan las características comunes que presentan ambas enzimas así como aquellas características más utilizadas para discriminar ambas familias de ChEs.

## FIGURA A

## Características Generales de AChE y ChE

3

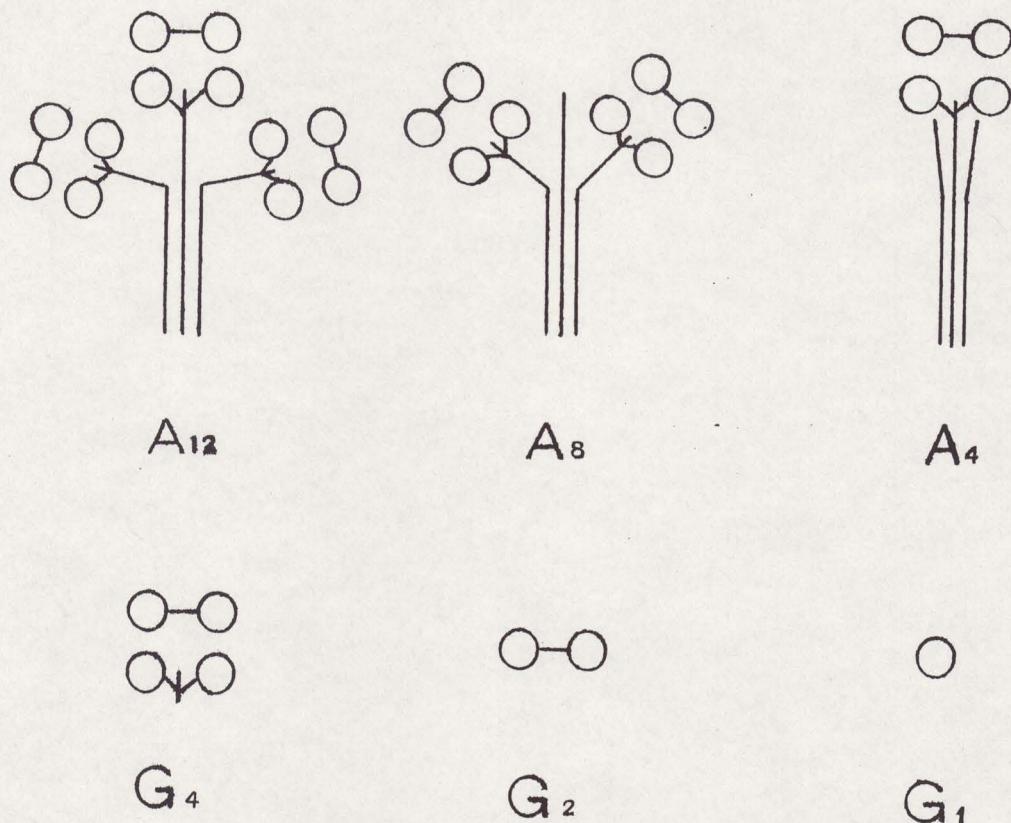
	AChE	ChE
Composición		GLICOPROTEINAS
Sitio activo (1 sitio por subunidad catalítica)		subsitio aniónico mas subsitio esterásico de serina.
Mecanismo de hidrolisis		ACILACION-DESACILACION
PM. subunidad catalítica		aproximadamente 80.000 DALTONS
Asociaciones cuaternarias (ver Figura B)		SI PRESENTAN
Sustratos preferenciales	ACh	ACh, BuCh y esterés superiores de colina.
Inhibición por sustrato	> 10 <sup>-3</sup> M	no presenta
Inactivación térmica	> 45 °C	> 55 °C
Inmunoreactividad cruzada		no se ha detectado aun reactividad cruzada entre ambas enzimas*
Inhibidores selectivos	BW 62C47	Ethopropazine
Inhibidores comunes a ambas		Eserina DFP**

\* los antisueros policlonales utilizados fueron de: Torpedo (Toutant y col., 1985); rata (Vigny y col., 1978), ave (Rotundo, 1984b); los anticuerpos monoclonales de: Torpedo (Musset y col., 1987); rata (Rackonczay, 1986), conejo (Mintz y Brimijoin, 1985), ave (Rotundo, 1984b).

\*\* la velocidad de inactivación de la ChE en presencia de DFP es considerablemente mayor (Lockridge y col., 1987)

FIGURA B

DIAGRAMA DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LAS FORMAS ASIMETRICAS Y DE LAS FORMAS GLOBULARES DE LAS COLINESTERASAS



La linea triple representa la estructura no-catalitica tipo colágeno; los círculos representan las subunidades catalíticas y las barras que unen las subunidades catalíticas entre si o con la subunidad no-catalítica representan puentes disulfuro. Diagrama sacado de Massoulie y Bon (1982).

El polimorfismo estructural de las ChEs se manifiesta a través de diferencias en: grado de ensamblaje de subunidades catalíticas, asociaciones con subunidades estructurales no catalíticas de distinta composición, patrón de glicosilación e inmunoreactividad. La heterogeneidad y complejidad de estas variantes moleculares llevó a varios autores (Bon y col., 1979; Rosenberry y Richardson, 1977; Anglister y Silman, 1978; Massoulie y Bon, 1982; Massoulie y Toutant, 1988) a definir criterios operativos para su estudio; en general se las clasifica de acuerdo a: propiedades hidrodinámicas, solubilidad, hidrofobicidad, grado de unión a lectinas y a anticuerpos específicos, sensibilidad a la digestión por proteasas y lipasas.

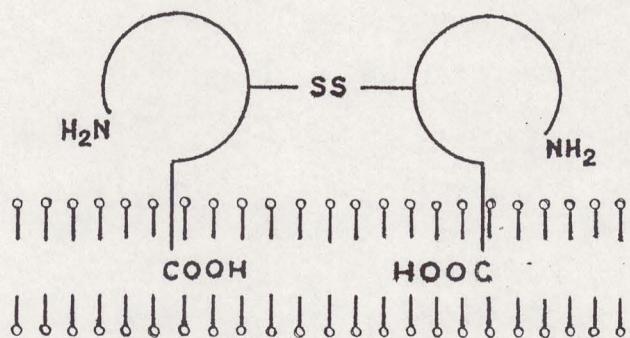
Las distintas formas moleculares (ver figura B), las cuales se definen por sus propiedades hidrodinámicas -coeficiente de sedimentación y radio de Stokes- han sido clasificadas en dos grandes tipos, en base a la presencia o no de una estructura tipo colágeno no catalítica (PM aparente:100 KD): **formas globulares (G)**-sin "cola tipo colágeno"- las cuales se encuentran en forma de monómeros, dímeros y tetrámeros de subunidades catalíticas ( $G_1$ ,  $G_2$  y  $G_4$ , respectivamente) y **formas asimétricas (A)** -"moléculas con cola tipo colágeno" las cuales se presentan en asociaciones de 4, 8 y 12 subunidades catalíticas unidas covalentemente

a una estructura peptídica tri-helicoidal ( $A_4$ ,  $A_6$  y  $A_{12}$ , respectivamente). Las formas globulares se las subdivide a su vez en, **solubles y unidas a membrana**, de acuerdo a si se requiere o no el uso de detergentes para su solubilización, y a su vez estos dos últimos subtipos se los clasifica en **moléculas anfifílicas y no-anfifílicas** de acuerdo a su grado de interacción con detergentes no iónicos. Asimismo, se observa que dentro de cada subtipo existen subpoblaciones con patrones de glicosilación e inmunoreactividad diferente (Massoulie y Bon, 1982; Rotundo, 1984, 1989; Meflah y col., 1984; Ralston y col., 1985; Massoulie y Toutant, 1988).

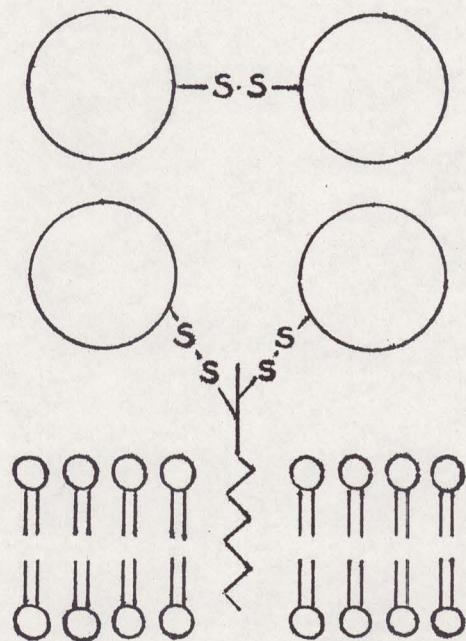
**FIGURA C**

MODELOS DE ASOCIACION A MEMBRANAS DE LAS FORMAS ANFIFILICAS DE ACHE

Representación esquemática de la estructura de la forma G<sub>2</sub> de eritrocito humano. (sacado de Massoulie y Toutant, 1988)



Representación esquemática de la estructura de la forma G<sub>4</sub> de cerebro de buey. (sacado de Massoulie y Toutant, 1988)



Esta clasificación fue establecida principalmente en base a estudios realizados en el órgano eléctrico de la raya marina *Torpedo* y del teleosteo de agua dulce *Electrophorus*. Este tejido, que filogenéticamente corresponde a músculos modificados, ha sido el más utilizado para el estudio de la AchE por presentar una elevada concentración de sinapsis colinérgicas (Massoulie y Rieger, 1969; Bon y col., 1973; Massoulie y Bonn, 1982). No obstante, se ha extendido esta clasificación a todos los tejidos de vertebrados ya que, a pesar de las variaciones individuales, existe una clara correspondencia entre los tipos hallados en las distintas especies estudiadas (Massoulie y Toutant, 1988).

La heterogeneidad que presentan las ChEs, plantea un interesante interrogante acerca del significado fisiológico de este elevado polimorfismo, dado que se observa que las distintas variantes moleculares de AchE y ChE presentan patrones de distribución diferentes y definidos en cada tejido de cada especie estudiada (Massoulie y Bon ,1982; Birmijoin, 1983) y que además estos patrones de distribución sufren cambios durante el desarrollo ( Zakut y col., 1985 Layer y col., 1987; Martelli y Gautron, 1988). Asimismo, la diversidad estructural de estas enzimas podría ser crítica para la regulación de su distribución subcelular puesto que el grado de ensamblaje parece no modificar su actividad.

catalitica (Taylor, 1987). Sin embargo el grado de ensamblaje no es probablemente el único factor que determina la localización subcelular ya que se ha descripto que una misma forma molecular puede distribuirse entre especies "solubles" y "unidas a membrana" (Massoulie y Bon, 1982; Atack y col., 1986).

Teniendo en cuenta esta heterogeneidad en la distribución subcelular y dado que los estudios moleculares y genéticos realizados hasta el momento indican que las distintas variantes moleculares no son productos de genes diferentes sino que surgirían como consecuencia de mecanismos de splicing diferenciales (Soreq y col., 1982, 1983, 1984; Schumacher y col., 1986a, 1986b; Sikorav y col., 1987) y/o de modificaciones post-traduccionales (Rotundo, 1984, 1988, 1989; Schumacher y col., 1986b; Toutant y Massoulie, 1988), las ChEs resultan modelos apropiados para el estudio de las modificaciones post-traduccionales en relación a la señalización que determina el tránsito intracelular de proteínas y su localización subcelular final.

Como ya mencionamos, en cada tejido se observa un patrón definido de formas moleculares de AchE y ChE. Las formas globulares se encuentran en tejidos colinérgicos y no-colinérgicos. Por ejemplo, los eritrocitos (*Torpedo*, pollo,

rata, buey, humano) contienen dímeros de AchE unidos a membrana (ver Figura C); en el plasma de todos los vertebrados existen formas globulares de ChE (principalmente G<sub>4</sub>), en hígado se encuentran formas globulares de ChE (G<sub>1</sub> en rata y G<sub>1</sub> y G<sub>4</sub> en pollo) y de AchE (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y G<sub>4</sub> en rata y G<sub>1</sub> y G<sub>4</sub> en pollo), también en tejidos como placenta y líquido céfalo-raquídeo, se encuentran formas globulares de AchE y ChE (revisiones de Massoulie y Bon, 1982; Toutant y Massoulie, 1988). En cambio las formas asimétricas solo han sido descriptas en el contexto de la transmisión colinérgica; se hallan presentes en músculo, sistema nervioso central y en nervios periféricos (Vigny y col., 1976; Di Giambernardino y Couraud, 1978; Bon y Massoulie 1980; Massoulie y Bon, 1982; Couraud, 1985; entre otros).

Con respecto a la distribución subcelular de las ChEs, los estudios que se han realizado hasta el momento se refieren principalmente a la AchE. Estudios histoquímicos indican que, en neuronas colinérgicas, la AchE se localiza en membrana plasmática, retículo endoplásmico rugoso y membrana perinuclear (Silver, 1963; Rosenberry 1977; Gautron, 1982). Existen sin embargo, algunos estudios histoquímicos que indican que la ChE se distribuye, en algunos casos, junto con la AchE. Por ejemplo, en las células post-ganglionares del ganglio cervical superior de gato, la ChE y la AchE se

localizan en la membrana plasmática y en el citoplasma del pericarion neuronal; encontrándose las también en el citoplasma de las células de Schwann (Davis y Koelle, 1982).

La distribución subcelular de las distintas formas moleculares ha sido exclusivamente estudiada para la AchE. Las formas asimétricas (A) parecen ser las formas sinápticas de la AchE en la placa neuromuscular, sin embargo coexisten con cantidades variables de formas globulares (G). En *Torpedo* por ejemplo, las formas A se localizan en la membrana basal post-sináptica, pero una cantidad considerable de la actividad de AchE corresponde a dímeros ( $G_2$ ) unidos a la membrana pre-sináptica; los sitios activos de ambos tipos están expuestos hacia la hendidura sináptica por lo cual se postula que ambas formas estarían involucradas en la hidrólisis del neurotransmisor (Randall, 1985; Miledi, 1984; Li y Bon ,1983). En las sinapsis colinérgicas del sistema nervioso autónomo las formas moleculares descriptas para la AchE, en ganglio cervical superior de rata y de buey, son  $G_1$  y  $G_4$  y en menor proporción  $G_2$  y  $A_{12}$  (Gisiger y col., 1978; Grassi y col., 1982). En este caso no hay evidencias de una localización preferencial de las formas A en sitios sinápticos.

La biosintesis, tránsito intracelular y localización final de las formas moleculares de la AchE ha comenzado a ser estudiada en los últimos años por medio de metodologías inmunológicas, de marcaje radioactivo y cromatografía de afinidad (lectinas) para detectar restos glicosídicos específicos. Estos estudios fueron realizados en cultivos celulares primarios de músculo de mamíferos y aves y en líneas celulares neuronales de mamífero (Rotundo y Farmbrough, 1980a, 1980b, 1982; Lazar y col., 1984; Rotundo, 1984, 1988; Brockman, 1982, 1986; Rotundo y col., 1988; 1989). De estos estudios surge que, las cadenas peptídicas nacientes de AchE pasan al lumen del RER donde cotraduccionalmente se les adicionan residuos de manosa, luego parte de estas moléculas en forma de monómeros, dímeros y tetrameros catalíticamente activos, son transportadas vía el sistema de endomembranas hacia el aparato de Golgi donde los residuos glicosídicos son procesados a azúcares más complejos (adición de N-acetilglucosamina y galactosa terminal), para luego ser externalizados a la membrana plasmática o secretados o ensamblados en formas más complejas previo a su exportación. Se observa asimismo, una degradación intracelular preferencial de monómeros y dímeros inactivos cuyos restos glicosídicos aún no han sido procesados. En resumen, estos estudios indican que el metabolismo de la AchE comienza con

la síntesis de diferentes poblaciones de monómeros ( $G_1$ ) (Lazar y col., 1984; Massoulie y col., 1985) y que la mayor parte (80%) de las moléculas sintetizadas son degradadas intracelularmente, siendo solo un fracción pequeña la que se secreta o se ensambla en formas globulares superiores y formas asimétricas. La vía de secreción de la AchE en células musculares en cultivo, parece seguir la ruta común RE-GA(cis)-GA(trans)-vesículas exocíticas; sin embargo la vía de degradación no seguiría la ruta lisosomal, sino que las moléculas serían transportadas desde el GA(cis) o previo a entrar en el mismo, a otro compartimento diferente, probablemente el retículo sarcoplásmico (Rotundo y col., 1989). Asimismo, estos estudios muestran que las formas  $G_1$  y  $G_2$  son mayoritarias en el compartimento intracelular, mientras que las formas  $G_4$  y las asimétricas se encuentran principalmente en el compartimento ectocelular (Lazar y Vigny, 1980; Rotundo, 1984).

Si bien estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en diversos aspectos, aún no se tiene un panorama claro acerca del significado fisiológico del polimorfismo estructural y la heterogeneidad de la distribución celular y subcelular de las ChEs. Además, la ChE representa una incógnita aún mucho mayor, pues hasta ahora no se le ha podido asignar ningún rol fisiológico determinado en los distintos tejidos.

estudiados, excepto en suero humano en el cual la ChE está implicada en la rápida degradación del relajante muscular suxamethonium (succinilcolina) (Hodgkin y col., 1965).

Esta escasez de información acerca de la ChE, se debe en parte a que la mayoría de los estudios se realizaron en tejidos colinérgicos donde existe una gran concentración de AchE pero en los cuales la actividad de ChE es muy baja o está ausente (órgano eléctrico de peces, músculo y cerebro de aves y mamíferos). Por otro lado la ChE ha sido en general estudiada en plasma donde la actividad de esta enzima es muy elevada, aunque no resulta una opción válida para el estudio del polimorfismo estructural en relación a la distribución subcelular por ser el plasma la fracción acelular del tejido sanguíneo.

Teniendo en cuenta que la ChE del plasma se sintetiza en el hígado (Hodgkin y col., 1965; Silver, 1974) y que ya ha sido reportada la presencia de diferentes formas moleculares de AchE y ChE en este tejido (Massoulie y Bon., 1982), decidimos encarar el estudio de las ChEs en hígado de rata. El tejido hepático presenta además las siguientes ventajas: a) posee más de un 90% de un mismo tipo celular, lo que permite realizar el fraccionamiento subcelular sin aislar previamente el tipo celular deseado y b) se pueden obtener

fracciones subcelulares con alto grado de pureza y rendimiento, las cuales han sido bien caracterizadas previamente (Fleisher y Kervina, 1974; Carey Hirshberg, 1980; Dallner, 1974).

## 2.- OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue iniciar un estudio sistemático de las colinesterasas hepáticas en relación a su distribución subcelular y su forma de asociación a membranas. Siendo esta una primera etapa de nuestro estudio, nos interesó investigar:

-la hidrólisis de ACh en tejido hepático; posibilidad de cuantificación por métodos colorimétricos y discriminación de la actividad de AchE, ChE y esterasas inespecíficas.

-la susceptibilidad a inhibidores selectivos y la estabilidad térmica de las actividades de la AchE y ChE hepáticas.

-algunas características de solubilidad de las distintas formas moleculares de AchE y ChE presentes en este tejido.

-la factibilidad de obtener organelas subcelulares enriquecidas en actividad de AchE y ChE y que dichas fracciones fuesen adecuadas para estudiar, por métodos bioquímicos, la orientación y el grado de asociación a membranas que presentan las ChEs.

### 3.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Animales

Se utilizaron ratas adultas (200-250 gr. de peso) de la cepa Sprague-Dawley. Las mismas fuerondeprivadas de alimento durante 14 horas previo a ser sacrificadas por decapitación. El hígado fue perfundido ex-vivo a través de la vena porta con 100-150 ml de solución fisiológica fría (cuando el tejido se utilizó para fraccionamiento subcelular, la perfusión se realizó con sacarosa 0.25 M) y empleado inmediatamente.

#### 3.2 Extracción de actividad de colinesterasas a partir de tejido hepático

##### Extracción con alta fuerza iónica y detergente: "actividad total" (Esquema I)

El hígado perfundido fue homogeneizado en medio de alta fuerza iónica en presencia de detergente (NaCl 1 M; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7; TX-100 1%) con el objeto de desestabilizar interacciones iónicas e hidrofóbicas; luego se procedió como se muestra en el esquema I. En los ensayos de estabilidad térmica (ver ítem 3.7) también se utilizó un extracto obtenido mediante este procedimiento

pero se eliminó el ión  $Mg^{2+}$  del medio de homogeneización (NaCl 1M; Tris-HCl 50 mM, pH 7; EDTA 5 mM; TX-100 1%).

**Extracción con alta fuerza iónica: "actividad soluble"**  
(Esquema II)

El hígado perfundido fue homogeneizado en un medio de alta fuerza iónica (NaCl 1 M;  $MgCl_2$  50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7) con el objeto de desestabilizar sólo las interacciones iónicas. Se realizó una extracción y luego una re-extracción en el mismo medio como se indica en el esquema II. El sedimento final fue sometido al tratamiento que se describe a continuación.

**Extracción con detergente: "actividad unida a membranas"**  
(Esquema II)

El sedimento obtenido luego de la segunda extracción con alta fuerza iónica fue resuspendido en el mismo medio pero con el agregado de Triton-X-100 al 1% con el objeto de desestabilizar las interacciones hidrofóbicas y solubilizar la actividad remanente. Los pasos seguidos se detallan en el esquema II.

**3.3 Fraccionamiento de formas moleculares por velocidad de sedimentación**

Se cargaron aliquotas de 400  $\mu$ l de los extractos obtenidos mediante el empleo de alta fuerza iónica (HS) y mediante

detergente (HST) sobre gradientes continuos 5-20% de sacarosa en buffer con detergente (Tris-HCl 10 mM, pH 7; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; TX-100 1%). La centrifugación se realizó en un rotor Sorvall AH-627 a 27.000 rpm (135.000 x g<sub>max</sub>) durante 17 horas, o en un rotor Sorvall VT-865 a 55.000 rpm (286.000 x g<sub>max</sub>) durante 2.5 horas. En cada fraccionamiento se incluyeron los siguientes standards de sedimentación: fosfatasa alcalina, 6.1 S y catalasa 11.3 S. Las fracciones (500 ul cada una) se recogieron desde el fondo y en aliquotas de 50 ul de cada una de ellas se ensayó la actividad de AchE y ChE. Los porcentajes de cada forma molecular se calcularon tomando en cuenta el área bajo cada pico de actividad (ver figura III).

### 3.4 Fraccionamiento subcelular

#### Aislamiento de membrana plasmática: (Esquema III)

Se realizó de acuerdo al método descripto por Hubbard y col. (1983) que se basa fundamentalmente en centrifugación en gradiente de sacarosa isopicnico que permite separar esta membrana de otras membranas celulares por diferencias en su densidad.

#### Aislamiento de retículo endoplásmico liso y rugoso (REL y RER) y Aparato de Golgi (GA): (Esquema IV)

Las fracciones de REL, RER y GA se obtuvieron según el método descripto por Fleisher y Kervina (1974) modificación Carey y Hirshberg (1980). Este método se basa en una combinación de centrifugación diferencial con centrifugación isopícnica para purificar y separar las membranas provenientes de estas tres organelas subcelulares. En el último paso de centrifugación se emplea CsCl con el objeto de disminuir el tiempo de separación de las vesículas de RER y REL.

#### **Aislamiento de Aparato de Golgi (GA): (Esquema V)**

Se empleó la técnica descripta por Leelavathi y col. (1970) la cual se basa en purificar estas membranas por flotación en gradientes de densidad.

#### **Aislamiento de Microsomas (MIC):**

El hígado perfundido fue homogeneizado (1:10 p/v) en una solución de sacarosa 0.25 M; Tris-HCl 20 mM, pH 7.4; EDTA 1mM. Se centrifugó el homogenato a 10.000 g x 20 min obteniéndose un sobrenadante post-mitocondrial a partir del cual se obtuvo la fracción microsomal por centrifugación a 100.000 g x 1 h.

#### **3.5 Lavados**

La liberación de proteínas adsorbidas a las vesículas microsómicas se realizó de acuerdo a lo descripto por Autori y col. (1975). Brevemente, la fracción microsómica se suspende en buffer Tris-HCl 0.15 M, pH 8 (2 g tejido húmedo/10 ml) y se centrifuga a 100.000 g x 1 h.

La liberación de proteínas periféricas de membrana y las del contenido luminal de las vesículas se realizó mediante un lavado alcalino (Fujiki y col., 1982). Los sedimentos correspondientes a las distintas fracciones se homogeneizan (1:10 P/V) en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M, pH 11.5, se colocan los tubos en hielo durante 30 minutos y luego se centrifugan a 100.000 g x 1 h.

Como control de disrupción mecánica de las vesículas se realizó un lavado con una solución de sacarosa isotónica (sacarosa 0.25 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7.4) que consistió en los mismos pasos que el lavado alcalino.

### 3.6 Integridad de las vesículas del Reticulo endoplásmatico (RE)

La integridad de las vesículas del RE se determinó por la latencia de hidrólisis de la manosa-6-fosfato por la glucosa-6-fosfatasa (Arion y col., 1976). El fundamento de esta técnica es el siguiente: la glucosa-6-fosfatasa es una enzima cuya actividad está orientada hacia el lumen del retículo endoplasmático, su sustrato natural es la glucosa-

6-fosfato que ingresa al lumen desde el citoplasma utilizando un transportador. La glucosa-6-fosfatasa es también capaz de hidrolizar manosa-6-fosfato, pero este sustrato no puede acceder al lumen del retículo endoplasmático (carece de transportador) si las membranas de las vesículas están intactas.

Los sedimentos correspondientes a las fracciones de RER, REL o MIC se suspenden suavemente con homogeneizador Dounce en una solución de sacarosa isotónica (Sacarosa 0.25 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7.4), esta suspensión se separa en dos aliquotas. A una de estas aliquotas se le agrega Tritón-X-100 (concentración final 0.05%) para permear las vesículas y así permitir el acceso al sustrato. En ambas preparaciones, con detergente y sin detergente, se determina la actividad de la glucosa-6-fosfatasa utilizando como sustrato manosa-6-fosfato.

**Nota:** todas las centrifugaciones fueron realizadas a 4°C y los extractos o las fracciones que no fueron utilizadas inmediatamente luego de su obtención, fueron guardados a -70°C hasta el momento de realizarse las determinaciones bioquímicas.

### 3.7 Estabilidad térmica de AChE y ChE

Aliquots de 500 ul de los extractos (con y sin  $Mg^{2+}$ ) obtenidos directamente por medio de alta fuerza iónica y

detergente (ver item 3.2; "actividad total"), fueron calentadas durante distintos tiempos (5 a 60 min.) a 45°C o a 55°C en un baño regulado termostáticamente y con agitación constante. Luego de finalizado el periodo de exposición correspondiente, la alicuota se reservó en hielo. Las muestras control (actividad inicial) fueron mantenidas en hielo a lo largo de todo el experimento. Finalmente, se realizó la determinación de actividad de AchE y ChE en todas las alicuotas al mismo tiempo.

### 3.8 Ensayos con inhibidores específicos de AchE y ChE:

Los ensayos de inhibición cruzada se realizaron empleando como fuente de enzimas, AchE purificada a partir de eritrocitos humanos (Tipo XIII, Sigma) y ChE purificada a partir de suero de caballo (Tipo VII, Sigma). En ambos casos se midió la actividad en ausencia de inhibidores selectivos de AchE y ChE y en presencia de distintas concentraciones de los mismos. Los inhibidores utilizados fueron el BW 62C47, ioduro de 1,5-bis(4-tetrametilamoniofenil)pentano-3-ona, específico para AchE y Ethopropazina, 10-[2-(dietilamino)propil]ferotiacina, específico para ChE. En los ensayos para discriminar la actividad de AchE y ChE en tejido hepático se utilizó una preparación de microsomas aislada como se describe en el item 3.4, en la cual se

determinó la actividad de la muestra en presencia y en ausencia de los inhibidores selectivos de AchE y ChE antes mencionados.

### 3.9 Determinaciones bioquímicas

#### Determinación de la actividad de colinesterasas:

La actividad de colinesterasas en las fracciones subcelulares fue determinada mediante la técnica colorimétrica descripta por Ellman y col. (1961). En la misma se utiliza como sustrato ioduro de acetiltiocolina (ATC), análogo del sustrato natural de AchE el cual también es sustrato de ChE. La hidrólisis del sustrato produce acetato y tiocolina; la tiocolina liberada reacciona con el ión 5,5 ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB) produciendo el ión 5-nitrobenzoato de color amarillo, cuya aparición se determina espectrofotométricamente a 412 nm. Para discriminar entre las actividades de AchE y ChE, cada muestra se incuba en dos tubos, uno de ellos conteniendo BW 62C47 (inhibidor específico de la AchE). El tubo sin inhibidor corresponde a la actividad de colinesterasa total, el otro a ChE, por lo tanto la actividad de AchE se calcula por diferencia.

Las actividades presentes en las fracciones de los gradientes de sacarosa y en los distintos extractos se

determinó también mediante el método de Ellman pero con las siguientes modificaciones: la actividad de AchE se determinó en presencia de Ethopropazina (inhibidor específico de ChE) utilizando como sustrato acetiltiocolina (ATC) y la actividad de ChE se midió en presencia de BW 62C47, utilizando como sustrato butiriltiocolina (BTC), análogo de uno de los sustratos naturales de ChE, pero que no es hidrolizado por AchE.

**Controles:**

**Linealidad de la reacción:** para cada tipo de muestra se determinó la linealidad de la reacción enzimática, para lo cual se realizó la reacción directamente en las cubetas de un espectrofotómetro termostatizado y se registró continuamente la absorbancia durante 1 hora.

**Hidrólisis no enzimática del sustrato :** en todos los ensayos se incuba un tubo con todos los reactivos, sustrato incluido, pero sin muestra.

**Sustrato endógeno :** para cada muestra se incuba un tubo con reactivos y muestra pero sin sustrato.

**Blanco de reactivos:** en todos los ensayos se incuba un tubo con reactivos, sin muestra y sin sustrato.

Dado que la sacarosa interfiere con la reacción de Ellman — una mayor concentración de sacarosa da la apariencia de una

mayor actividad de la que realmente está presente-, en todos los tubos en los cuales se determina la hidrólisis no enzimática del sustrato se agregó una concentración de sacarosa equivalente a la presente en la muestra. En el caso de la determinación de la actividad de las formas moleculares, las cuales se fraccionan en gradientes continuos de concentración creciente (5-20%) de sacarosa, incluimos en cada centrifugación un gradiente control (sin muestra) a partir del cual se determinó la hidrólisis de ATC y BTC para descontar el fenómeno de interferencia.

#### Esquema de ensayo:

La muestra se preincuba durante 20 min a 28°C en buffer fosfato 0.1 M, pH 8 conteniendo : DTNB  $6.3 \times 10^{-4}$  M; Ethopropazina  $10^{-5}$  M o BW 62C47  $5 \times 10^{-4}$  M (concentraciones en volumen final). Luego se agrega el sustrato , ATC o BTC, en concentración final de  $5.4 \times 10^{-4}$  M. La incubación se realiza a 28°C durante 15-30 min. La reacción se detiene colocando los tubos en hielo y agregando prostigmina  $1.12 \times 10^{-7}$  M (inhibidor de ambas colinesterasas). Volumen final de ensayo: 1.1 ml. Se determina la absorbancia a 412 nm (coeficiente de extinción molar del ión 5-tio-2-nitrobenzoato: 13.600 lts.  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{mol}^{-1}$ ). A cada tubo se le descuentan las absorbancias de los blancos correspondientes: D.O. de la muestra - [D.O. sustrato endógeno + (hidrólisis

no enzimática del sustrato - Blanco de reactivos], (ver controles).

**Determinación de la actividad de enzimas marcadoras y standards de sedimentación.**

**Glucosa-6-fosfatasa (E.C. 3.1.3.9)** (enzima marcadora de RE): se determinó de acuerdo a la técnica descripta por Aronson y col. (1974). La actividad de la enzima se determina midiendo la velocidad de liberación de fósforo inorgánico a partir de glucosa-6-fosfato). La muestra se incuba durante 30 minutos a 37°C en presencia de: Na-glucosa-6-fosfato 20 mM, pH 6.5; Histidina 17.5 mM, pH 6.5; NA-EDTA 1 mM, pH 7 , en volumen final de 500 ul. La reacción se detiene colocando los tubos en hielo y agregando 25 ul de TCA 50%; luego se centrifuga a 2000 rpm x 15 min. Se determina fósforo inorgánico en una alícuota del sobrenadante.

**Glucosa-6-fosfatasa (E.C. 3.1.1.9.)** (ensayo de latencia): se utilizó la técnica descripta por Arion y col. (1976). La actividad de la enzima se determina midiendo la velocidad de liberación de fósforo inorgánico a partir de manosa-6-fosfato. Se incuba la muestra (con y sin TX-100 al 0.05%) durante 10 min. a 30°C en presencia de Tris-HCl 45 mM, pH 7.1; albúmina de suero bovino 9 mg/ml; sacarosa 0.125 M y manosa-6-fosfato 9 mM, en volumen final de 550 ul. Se

detiene la reacción colocando los tubos en hielo y agregando 25 ul de TCA 50%; luego se centrifuga a 2000 rpm durante 15 min. En una alícuota del sobrenadante se determina fósforo inorgánico.

**5' Nucleotidasa (E.C. 3.1.1.5.)** (enzima marcadora de PM): se determinó de acuerdo a la técnica descripta por Aronson y col. (1974). La actividad de la enzima se determina midiendo la velocidad de liberación de fósforo inorgánico a partir de la adenosina 5'monofosfato (5'AMP). La muestra se incuba durante 30 min. a 30°C en presencia de : Na-AMP 4.5 mM, pH 7; Na-glicina 90 mM, pH 9.1; MgCl<sub>2</sub> 9 mM , en volumen final de 500 ul. Se detiene la reacción colocando los tubos en hielo y agregando 25 ul de TCA 50%; se centrifuga a 2000 rpm durante 15 min. En una alícuota del sobrenadante se determina fósforo inorgánico.

**Ac.N-Acetylneuramico Transferasa (E.C. 2.4.99.1)** (enzima marcadora de GA): se determinó de acuerdo a la técnica descripta por Briles y col. (1977). En cada tubo se incuban 50 ul de muestra con 150 ul de reactivo [(<sup>3</sup>H)-CMP-sialíco 0.15 uCi/ml (15 Ci/mmol); 50 ul de asialofetuina 10 mg/ml; 100 ul buffer ST: Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.254%; NaCl 100 mM; 0.2% TX-100; pH 7.5]. Se incuban los tubos durante 1 hora a 37°C, luego se detiene la reacción con 1 ml de una solución de ácido

fosfatúngstico 1% en 0.5 N HCl. Se centrifuga a 2.000 rpm x 15 min., el sedimento se lava dos veces y se disuelve en 1 ml de NaOH 1M. Luego se agregan 0.5 ml de H<sub>2</sub>O ; 350 ul de HCl 4 N y 18 ml de líquido de centelleo.

**Fosfatasa Alcalina (E.C. 3.1.3.1) (standard de sedimentación):** Se realizó de acuerdo a la técnica descripta por Lowry O.H (1957) con algunas modificaciones. Una alícuota de cada una de las fracciones del gradiente se incubó, durante 30 min a 37° C, en presencia de p-nitrofenilfosfato 6 mM; glicina 0.1 M; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; ZnCl<sub>2</sub> 1 mM (concentraciones en volumen final); pH 10.4. La aparición de p-nitrofenol se determinó espectrofotométricamente a 405 nm.

**Catalasa (E.C. 1.11.1.6) (standard de sedimentación):** Se utilizó la técnica descripta por Beers y Siger (1952). A una alícuota de cada una de las fracciones del gradiente se le agrega una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.002% en buffer fosfato 0.05 M, pH 7 y se determina la desaparición del sustrato por disminución de la absorbancia a 240 nm.

**Determinación de fósforo inorgánico:** se determinó de acuerdo a la técnica descripta por Chen y col. (1956). Una alícuota del sobrenadante de la reacción enzimática correspondiente,

se lleva a un volumen de 250 ul con H<sub>2</sub>O bidestilada; se agregan 700 ul de reactivo (MbNH<sub>4</sub> 0.42% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N + ácido ascórbico 10 % en proporción 6:1, respectivamente). Se incuba durante 20 min. a 45°C y se determina la absorbancia a 660 nm.

**Determinación de proteínas:** las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col. (1951), utilizándose albúmina bovina como standard.

**Nota:**

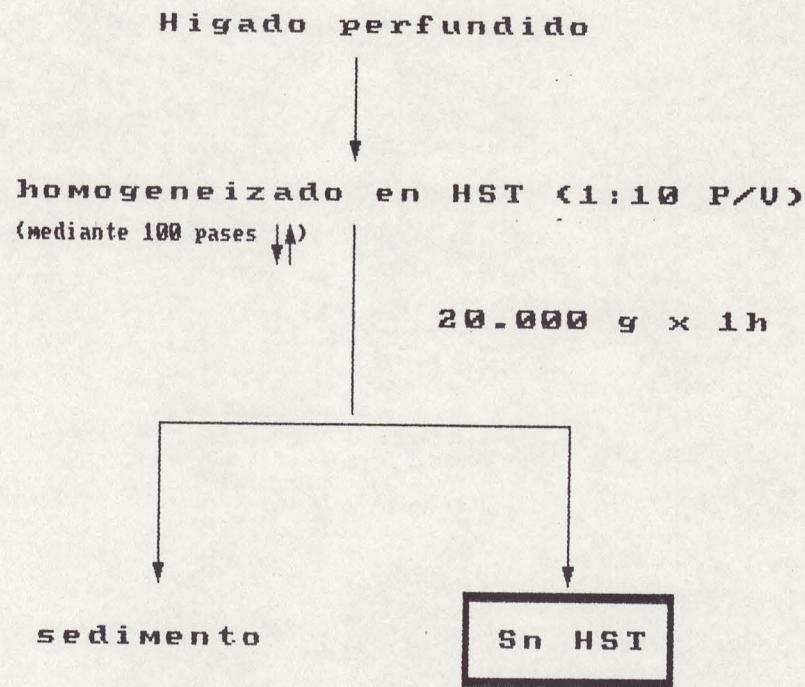
Las actividades específicas de las enzimas se expresan referidas al total de proteínas en la fracción correspondiente, excepto en la fracción de retículo endoplasmático rugoso (RER) en la cual se descuentan las proteínas ribosomales (1/3 del total) (Fleisher y Kervina, 1974).

Todas las determinaciones bioquímicas se realizaron por triplicado.

### **3.10 Drogas Utilizadas**

Las enzimas AchE, ChE, Catalasa, Fosfatasa Alcalina y sus sustratos correspondientes; los inhibidores específicos BW 62C47 y Ethopropazina; y los sustratos de las enzimas marcadoras utilizados en este trabajo provienen de la compañía Sigma. El (<sup>3</sup>H)CMP-sialíco proviene de la compañía New England Nuclear. El resto de los reactivos utilizados son de grado analítico.

## EXTRACCION DE ACTIVIDAD TOTAL

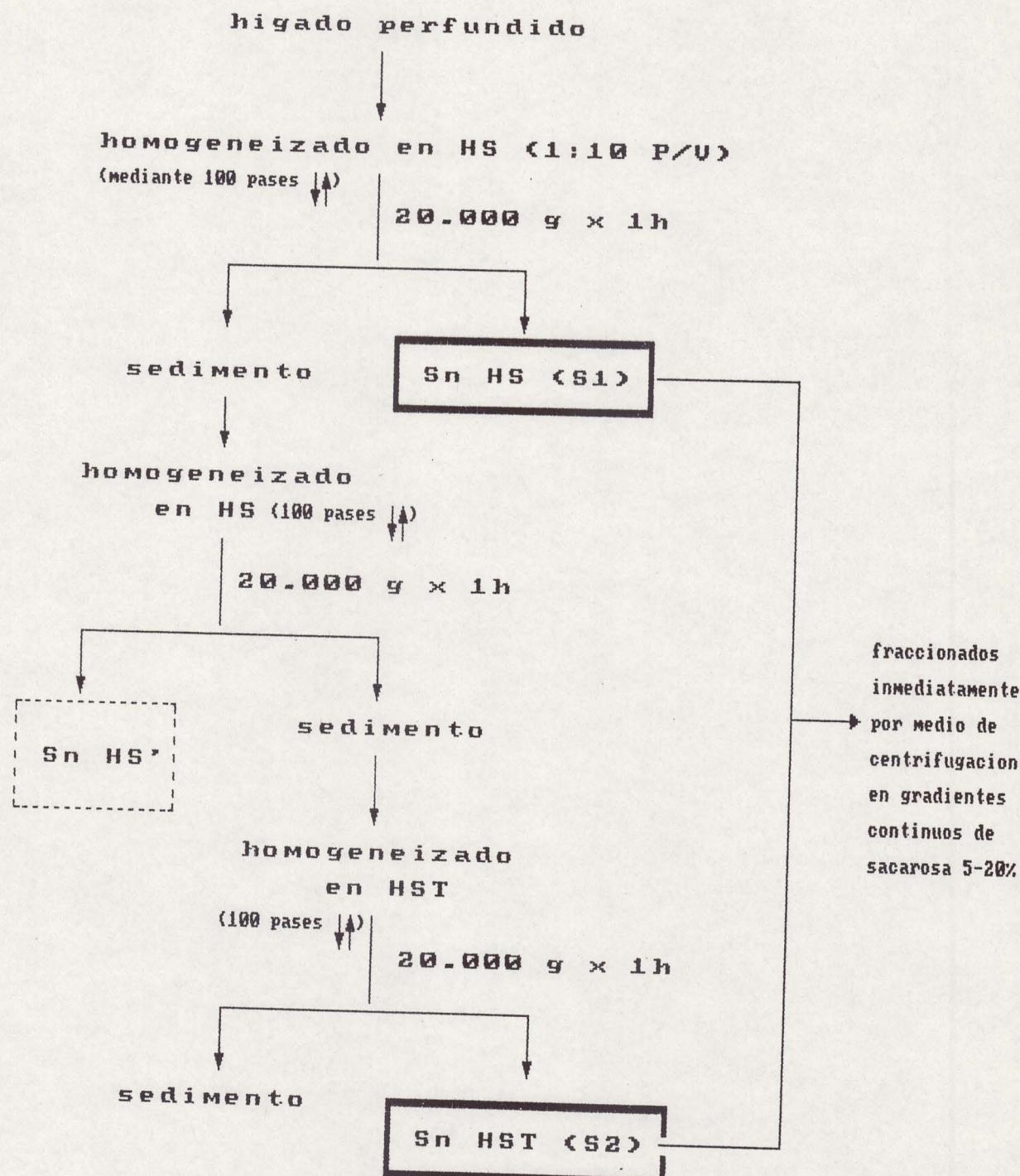


**HST:** NaCl 1M; MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH; TX-100 1%

### **ESQUEMA II**

33

## **EXTRACCION SEGUENCIAL**

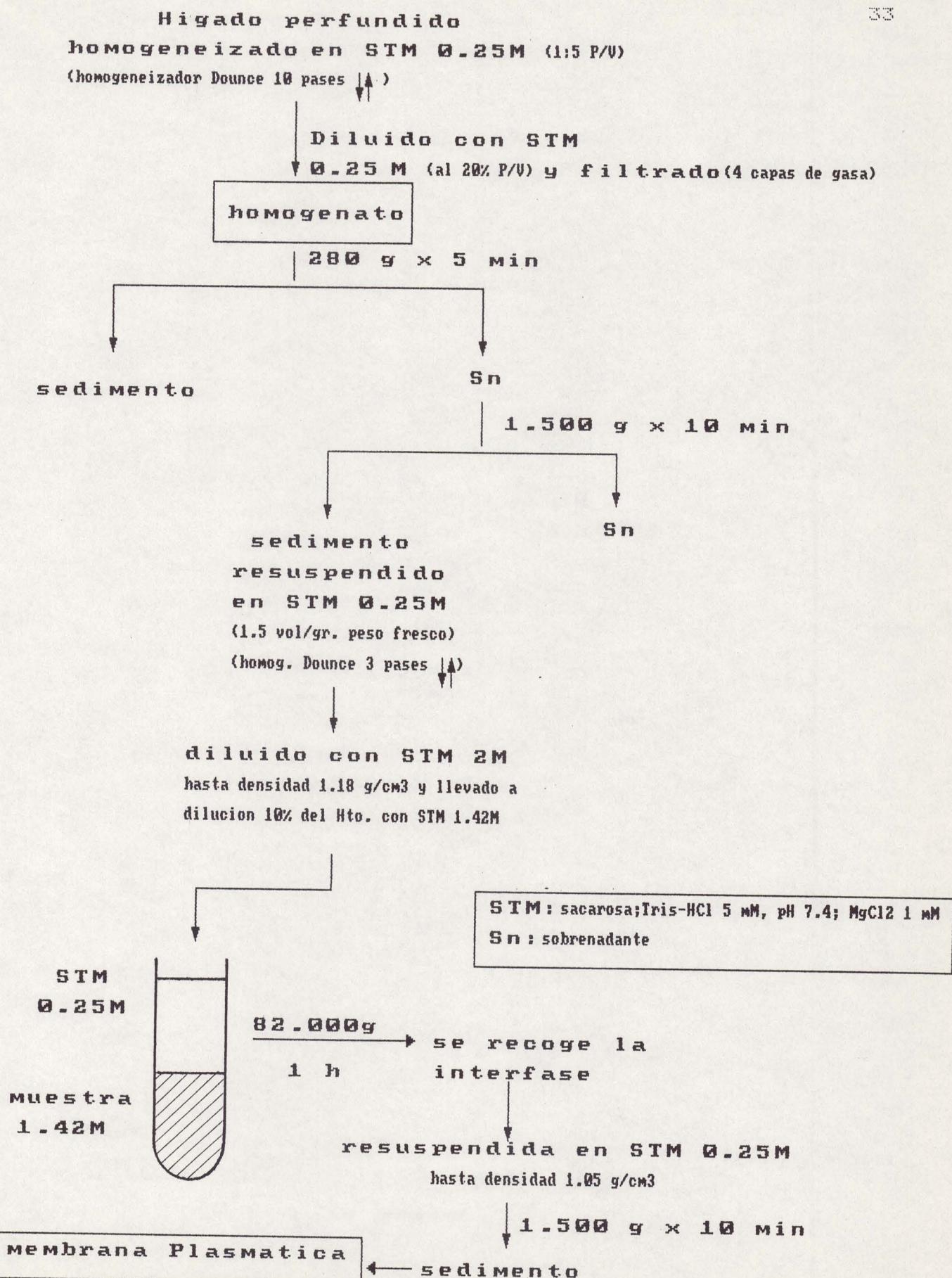


HS : NaCl 1M; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7.

HST: NaCl 1M; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7; TY-100 1%

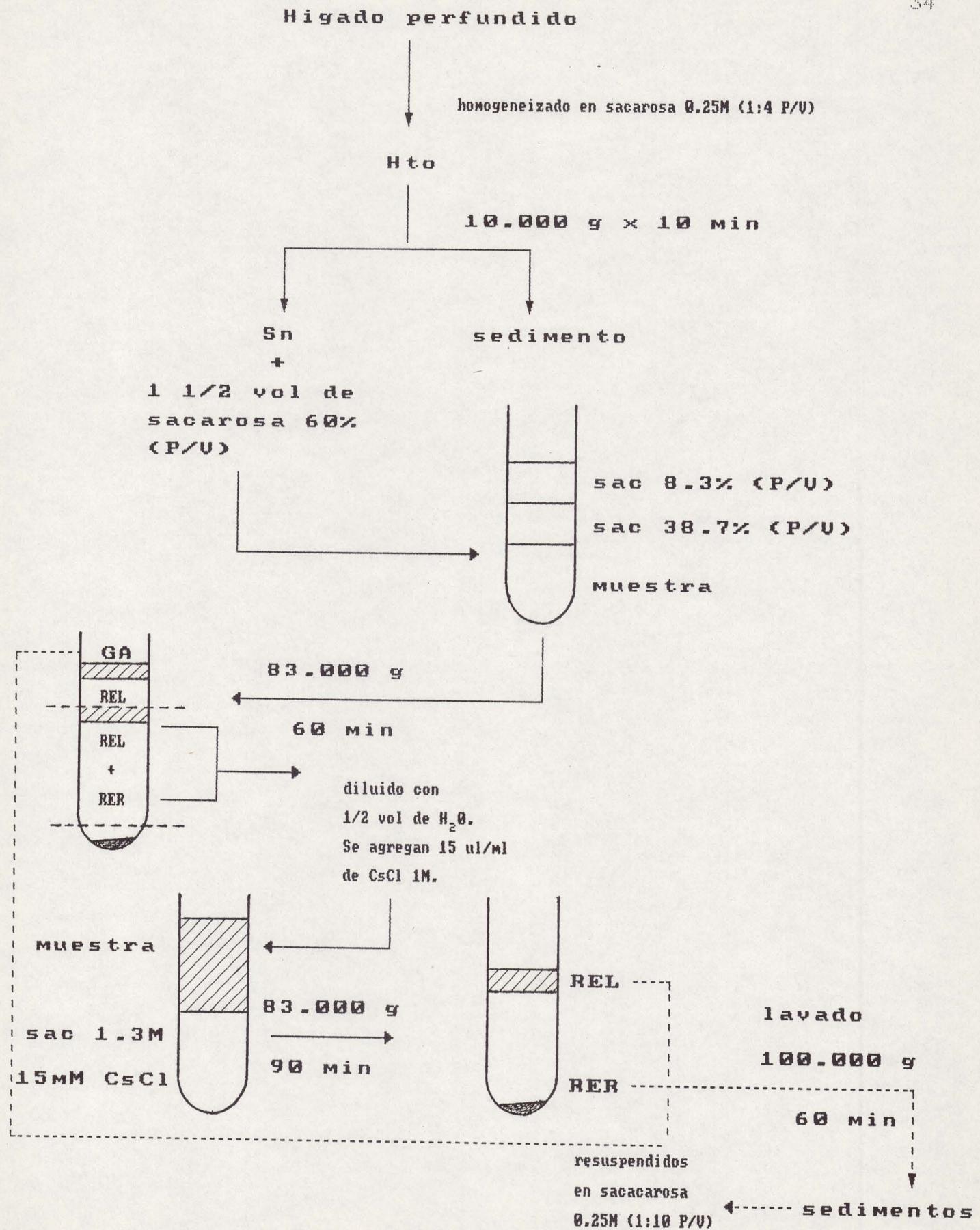
### **ESQUEMA III: PURIFICACION DE MEMBRANA PLASMATICA**

23



**ESQUEMA IV: PURIFICACION DE RETICULO ENDOPLASMATICO RUGOSO,  
LISO (RER; REL) Y APARATO DE GOLGI (GA).**

34



**ESQUEMA VI PURIFICACION DE APARATO DE GOLGI (GA)**

Higado perfundido

35

homogeneizado en 4 vol. de sac 0.25M en buffer Leel

Hto

2.500 rpm x 10 min  
(rotor Sorvall ss-34)

Sn

sedimento

muestra

sac 1.3M  
en buffer Leel

27.000 rpm x 1 h

rotor Sorvall AH-627

sac 0.25M  
en buffer Leel

muestra 1.1M

sac 1.25M  
en buffer Leel

27.000 rpm x 1 h

rotor Sorvall AH-627

Interfase diluida 1:2 con H<sub>2</sub>O

30.000 rpm x 20 min

rotor Sorvall T-865.1

sedimento (GA)

resuspendido en sac 0.25M;

Tris-HCl 10 mM, pH 7.4

(1 ml/gr. tejido húmedo)

Buffer Leel: K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.65; MgCl<sub>2</sub> 5mM

#### 4.- RESULTADOS: DISCUSION Y CONSIDERACIONES METODOLOGICAS

##### 4.1 ENSAYOS CON INHIBIDORES ESPECIFICOS DE ACHE Y CHE

Determinación de concentraciones óptimas de inhibidores específicos para la determinación de AchE y ChE.

Este ensayo se realizó con el objeto de determinar la concentración óptima de los inhibidores BW 62C47, específico de AchE y la Ethopropazina, específico de ChE, a utilizar en nuestros ensayos. A fin de hacer esta evaluación, utilizamos AchE purificada a partir de eritrocitos humanos (Type XIII, Sigma) y ChE purificada a partir de suero de caballo (Type VII, Sigma). Los resultados de este experimento se muestran en la tabla I.

La elección de la concentración óptima de inhibidor se realizó en base a dos criterios: mayor porcentaje de inhibición de la enzima para la cual es específico y mínima inhibición de la enzima que se desea determinar.

Como puede observarse en la tabla I, a la concentración seleccionada ( $5 \times 10^{-4}$  M), el BW 62 C47 inhibe casi toda la actividad de AchE (94%) y solo un bajo porcentaje de ChE y la Ethopropazina ( $10^{-5}$  M), inhibe totalmente la actividad de ChE (99,6%) sin afectar significativamente la de AchE. Considerando estos resultados, los datos de los experimentos se corrigen por el factor correspondiente al inhibidor utilizado.

Tabla I:

Determinación de concentración óptima de inhibidores específicos.

Inhibidor	Concentración (Molar)	% Actividad remanente	
		AchE	ChE
BW 62C47	$5 \times 10^{-4}$ *	6.0	87.5
	$5 \times 10^{-5}$	12.0	94.9
	$1 \times 10^{-5}$	21.2	98.1
Ethopropazina	$1 \times 10^{-4}$	75.0	00.0
	$5 \times 10^{-5}$	84.9	00.0
	$1 \times 10^{-5}$ *	93.8	0.4

**Nota:** Los valores son las medias de 2 ensayos realizados por separado (determinaciones por triplicado); DS < 10%.

Concentración de inhibidor seleccionada: \*

BW 62C47: ioduro de 1:5 bis-(4-tetrametilamonio fenil)-pentano-3-ona.

Ethopropazine: hidroclouro de 10-[2-(diethylamino)propil] fenotiazina.

**Discriminación de la actividad de AchE y ChE en una muestra de tejido hepático:**

Debido a que los sustratos específicos de AchE y ChE (ATC y BTC) pueden ser también hidrolizados por otras esterasas nos interesa determinar si la hidrólisis de los mismos en hígado se debe a la actividad de AchE y ChE.

Dado que estas enzimas son sensibles a inhibidores selectivos, el uso de los mismos en una preparación proveniente de tejido hepático permite discriminar entre la actividad de AchE y ChE y la actividad debida a esterasas inespecíficas, las cuales no son susceptibles a los inhibidores utilizados.

En este ensayo se utilizó una preparación de microsomas (ver MM) y se determinó la hidrólisis de acetiltiocolina (ATC) y butiriltiocolina (BTC), en presencia y en ausencia de BW 62047 y/o Ethopropazina, inhibidores específicos de AchE y ChE, respectivamente, en las concentraciones seleccionadas en el ítem 4.1 (Inhibición cruzada). La tabla II muestra los resultados de tres experimentos realizados por separado.

La hidrólisis de BTC (sustrato hidrolizado por ChE pero el cual no es hidrolizado en forma significativa por AchE), (tabla II,A), es inhibida en un 90% por Ethopropazina

lo cual indica que en este tejido la butiriltiliocolina es hidrolizada principalmente por ChE. En presencia de BW 62C47 la hidrólisis de BTC se ve inhibida en un 24% (siendo sólo el 76% adjudicable a ChE); sin embargo si se tiene en cuenta que el BW 62C47 a esta concentración inhibe el 12.5% de la actividad de ChE, ambos resultados son coincidentes.

El análisis de la hidrólisis de ATC resulta más complejo dado que es sustrato de ambas enzimas. Considerando los resultados sobre BTC, existe actividad de ChE en tejido hepático; la Tabla II B muestra que el remanente de actividad que resulta de inhibir la ChE mediante Ethopropazina, es totalmente inhibible (excepto un 3% de inespecífico) por RW 62C47. Esto pone en evidencia la presencia de actividad de AchE en este tejido.

Asimismo, se observa que es factible la discriminación entre la actividad de AchE y ChE utilizando un solo inhibidor, el BW 62C47 (específico para AchE). Considerando los resultados mostrados en la tabla II, la suma de la actividad sobre ATC medida en presencia de BW 62C47 -la cual corresponde a ChE- y la actividad medida en presencia de Ethopropazina -la cual corresponde a AchE- no resulta significativamente diferente de la actividad medida sin inhibidores -la cual corresponde a Colinesterasa total.

En base a la sensibilidad a inhibidores específicos, concluimos que un 90% de la hidrólisis de BTC en hígado se debe a actividad de ChE y que más del 95% de la hidrólisis de ATC es producida por la actividad de AchE y ChE en este tejido.

Teniendo en cuenta estos resultados, de ahora en más llamamos actividad de AchE a la hidrólisis sobre ATC no inhibible por Ethopropazina y actividad de ChE a la hidrólisis de ATC no inhibible por BW 62C47 o a la hidrólisis de BTC(en presencia o en ausencia de BW 62C47).

Tabla II:

Discriminación de la actividad de AchE y ChE en una muestra de tejido hepático.

## A) Sustrato: BTC

Muestra	Actividad Relativa %	Actividad Absoluta D.O./30 min
MIC	100	0,49 ± 0,06
MIC+Etho	10 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,01
MIC+BW	76	0,37 ± 0,04
MIC+Etho+BW	6 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,01

## B) Sustrato: ATC

Muestra	Actividad Relativa %	Actividad Absoluta D.O./30 min.
MIC	100	1,2 ± 0,14
MIC+Etho	59	0,71 ± 0,10
MIC+BW	47	0,56 ± 0,07
MIC+Etho+BW	3 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,02

Los valores son la medias tres experimentos. MIC: fracción microsomal; Etho: Ethopropazina; BW: BW 62047; (<sup>b</sup>): hidrólisis inespecífica.

#### 4.2 ESTABILIDAD TERMICA DE ACHE Y CHE

Estudios previos (Vigny y col, 1978; Edwards y Brimijoin, 1983; Pavlic, 1988) han demostrado que las actividades de AchE y ChE se comportan en forma diferente frente a la temperatura. Además se demostró, para el ganglio cervical superior de rata, que el comportamiento de ChE frente a la temperatura es modificado por el ión  $Mg^{2+}$ , mientras que la estabilidad de AchE no es afectada por este catión (Vigny, 1978).

En esta etapa nos interesó estudiar los patrones de inactivación térmica de AchE y ChE extraídas a partir de hígado de rata.

Las dos temperaturas a las cuales trabajamos, 45 °C y 55 °C, fueron seleccionadas teniendo en cuenta los patrones de inactivación térmica de enzimas de otros orígenes, a saber: que a 45 °C la ChE no se inactiva mientras que la AchE pierde alrededor de un 40-50% de su actividad inicial (Edwards y Brimijoin, 1983), a 55 °C ambas enzimas se inactivan pero su patrón de inactivación es diferente, siendo la actividad de ChE más sensible que la de AchE en ausencia de  $Mg^{2+}$  (Vigny, 1978).

Los ensayos se realizaron sobre un extracto HST (alta fuerza iónica y detergente) obtenido en presencia o en ausencia de Mg<sup>2+</sup> como se describe en MM.

Como se observa en la figura IA, cuando se realiza el ensayo de estabilidad a 45 °C utilizando un extracto que contiene Mg<sup>2+</sup>, la actividad de ChE aumenta en un 30% a los 5 min de exposición a esa temperatura y esta actividad se mantiene a lo largo del tiempo, mientras que la actividad de AchE se reduce a un 60% luego de los 20 minutos de exposición. En la figura IB se muestran los resultados de estabilidad a 45 °C en un extracto sin Mg<sup>2+</sup>. En este caso la actividad de ChE presentó el mismo porcentaje de aumento inicial, pero a lo largo del tiempo fue decreciendo hasta un valor del 40%. Este resultado difiere del obtenido para ChE extraída a partir de suero de ratón, la cual no se inactiva a lo largo del tiempo a esta temperatura; la AchE tuvo el mismo comportamiento que observamos en el extracto con Mg<sup>2+</sup>. Con respecto al aumento de la actividad de ChE a 45 °C, queremos aclarar que el desvío del valor medio de los 4 experimentos realizados fue muy elevado (30% ± 20%), la inconsistencia de este fenómeno ya fue reportada previamente para ChE extraída a partir de suero de ratón (Edwards y Brimijoin, 1983). Esta variación en el aumento de actividad no afectó el comportamiento subsiguiente de la enzima frente

a la temperatura, ya que en todos los casos se mantenía la actividad alcanzada a los 5 minutos de exposición a 45 °C, si el extracto contenía Mg<sup>2+</sup> y su actividad decrecía, luego de 15 min. de exposición, si no había Mg<sup>2+</sup> en el medio.

Cuando se estudió la estabilidad a 55 °C en un extracto con Mg<sup>2+</sup> (Figura IIA), la actividad de ChE decreció en un 90% a los 5 minutos alcanzando un valor mínimo del 6% del inicial a los 60 minutos, mientras que la actividad de AchE bajó a un 17% de la inicial a los 5 minutos y se mantuvo alrededor de ese valor hasta el último punto considerado (60 minutos).

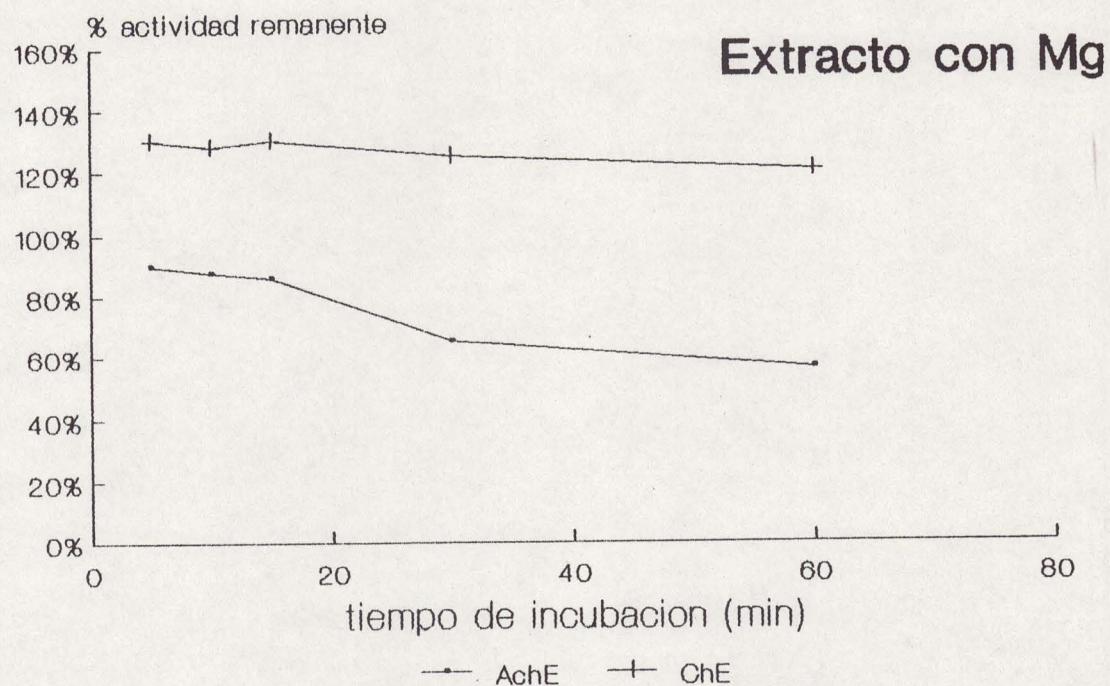
Cuando se realizó la exposición a 55 °C utilizando un extracto sin Mg<sup>2+</sup>, los resultados fueron similares (Figura IIB). Los resultados obtenidos en ausencia de Mg<sup>2+</sup> concuerdan con lo reportado para AchE y ChE extraídas a partir del ganglio cervical superior de rata (Vigny, 1978) y para las extraídas a partir de suero de ratón, sin embargo no pudimos observar el efecto protector del Mg<sup>2+</sup> sobre la actividad de ChE a esta temperatura.

Se observa que, las actividades de AchE y ChE detectadas en hígado de rata se comportan frente a la temperatura en forma similar, en algunos aspectos, a lo reportado para otros tejidos, a saber: a 45 °C la actividad de AchE disminuye, en presencia o en ausencia de Mg<sup>2+</sup>, mientras que la actividad de ChE (\*) solo se ve afectada si este ión está ausente. A

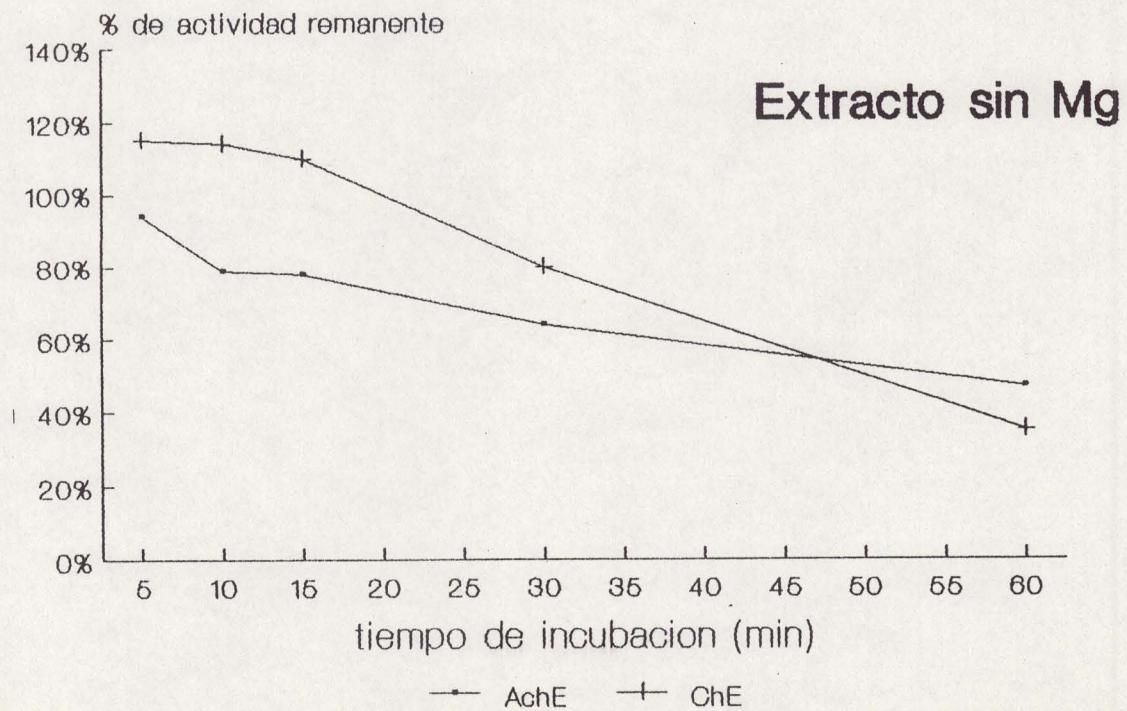
55 °C ambas enzimas se inactivan independientemente de la presencia o ausencia de  $Mg^{2+}$  en el extracto..

(\*) Nota: Con respecto al aumento observado en la actividad de ChE al ser expuesta a 45 °C, se realizaron experimentos con el objeto de contrastar algunas hipótesis que se pueden plantear para explicar este fenómeno. Los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten, en una primera aproximación, descartar la existencia de un inhibidor endógeno que se inaktivase a esa temperatura o que la ChE sufriese un cambio conformacional que le hiciese perder afinidad por algún inhibidor, sin necesidad de que este se inactive. Lo que nos podemos descartar es que ese cambio conformacional modifique la afinidad de la ChE por el sustrato.

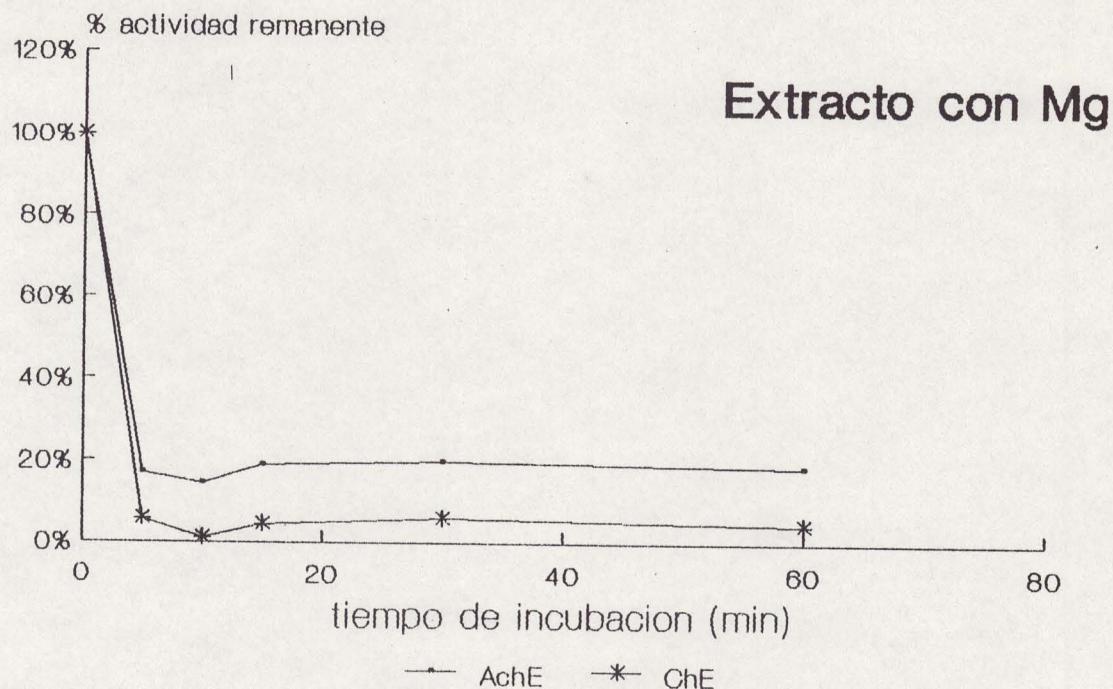
**FIGURA I (A)**  
**Estabilidad Termica a 45 oC**



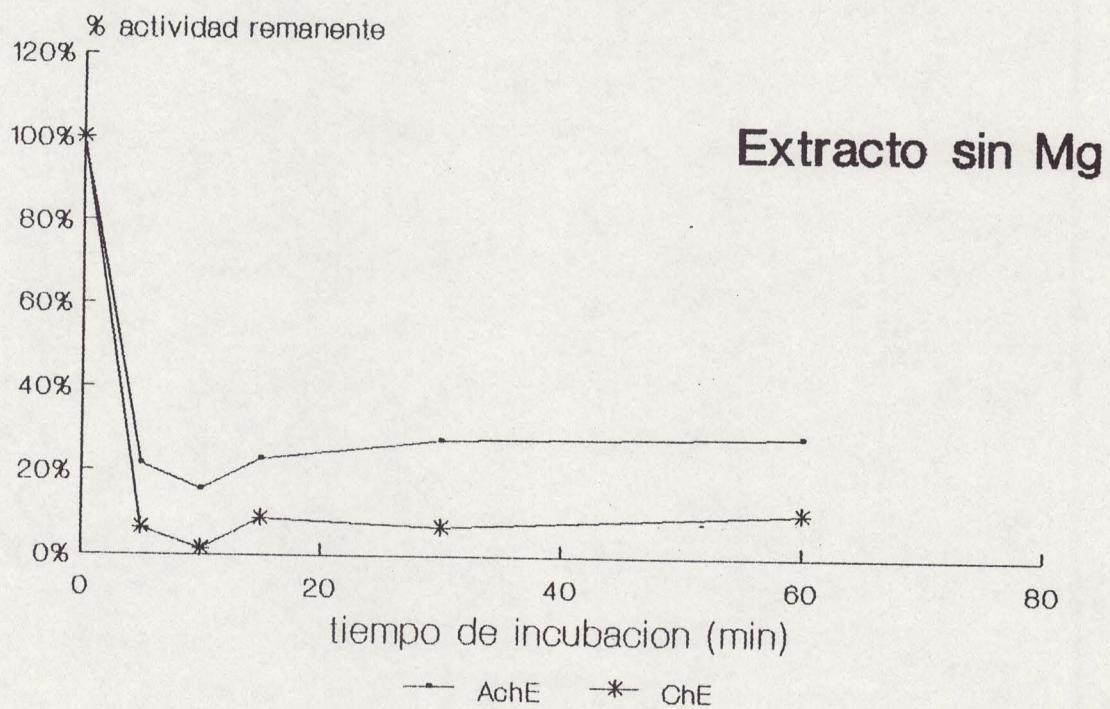
**FIGURA I (B)**  
**ESTABILIDAD TERMICA A 45 oC**



**FIGURA II (A)**  
**Estabilidad Termica a 55 oC**



**FIGURA II (B)**  
**Estabilidad termica a 55 oC**



#### 4.3 EXTRACCIONES

##### Actividad celular total de AchE y ChE:

En general, la solubilización cuantitativa de la actividad de colinesterasas en un tejido no es posible si se realiza en un buffer acuoso en ausencia de detergente. Sin embargo, usualmente una proporción significativa de la actividad es solubilizable en estas condiciones; y se la ha denominado "soluble" en contraste con la actividad que requiere detergente para su solubilización; la cual en la literatura se menciona como "unida a membranas".

Por lo tanto, con el objeto de evaluar la *actividad celular total* de colinesterasas en tejido hepático se realizó una extracción con alta fuerza iónica y detergente [S<sub>n</sub> HST], tomando en cuenta que en estas condiciones se verían desestabilizadas las interacciones iónicas e hidrofóbicas. Los resultados de esta extracción se muestran en la Tabla III.

Luego, con el objeto de discriminar entre la *actividad soluble* y la *actividad "unida a membranas"*, realizamos una extracción secuencial de acuerdo a los criterios ampliamente usados en el estudio de distribución de colinesterasas. Los

resultados de este esquema de extracción se muestran en la tabla IV.

En todos los casos se determinó la actividad de AchE y ChE en una aliquota del homogenato inicial con el fin de conocer la eficiencia de cada esquema de solubilización.

TABLA III

Extracción con alta fuerza iónica y detergente:

	Actividad Total nmoles/min/gr tejido	
	AChE	ChE
Hto. HST	310	400
Sn. HST	182.7 (58.9%)	417.6 (104%)

Los valores son las medias de tres experimentos separados; DS < 15% de la media. Las cifras entre paréntesis son las recuperaciones con respecto al homogenato (Hto. HST).

TABLA IV

Extracción secuencial:

	Actividad Total nmoles/min/gr. de tejido	
	AchE	ChE
Hto HS	324	487
Sn S1	29,7 (12%)	200 (41%)
Sn S2	217,8 (88%)	292 (59%)

Los valores son las medias de tres experimentos realizados por separado; DS< 12% de la media. Las cifras entre paréntesis son los porcentajes de recuperación respecto al total recuperado en S1+S2 ( AchE: 76,3% y ChE: 101%).

Como se muestra en la tabla III el 100% de la actividad de ChE se solubiliza según ambos métodos de extracción. Con respecto a la actividad de AchE, la eficiencia de solubilización es mayor cuando se utiliza el método de extracción secuencial (76.3% versus 59.8%). En este caso la menor recuperación obtenida en la extracción directa con detergente podría deberse a una relación detergente/membrana insuficiente para desplazar totalmente las interacciones hidrofóbicas.

En una reextracción con alta sal ( $\text{Sn}^+ \text{HS}'$ ) nunca se solubilizó más del 5% de la actividad de AchE o ChE, lo que indica que la solubilización parcial de actividad en HS no es adjudicable a una escasa dilución. Por otra parte, en nuestras condiciones experimentales todas las vesículas de RE estaban disruptas en la fracción particulada obtenida después de la extracción con HS, ya que no se detectó latencia a la hidrólisis de manosa-6-fosfato por la glucosa-6-fosfatasa. Esto descarta la posibilidad de que se considerara actividad unida a membranas a aquella que se halla soluble en el lumen de vesículas intracelulares que no hubiesen sido disruptas por el proceso de homogeneización. Por lo tanto, la presencia de detergente no iónico es necesaria para solubilizar el resto de la actividad. Esto sugiere que la actividad remanente podría presentar

interacciones de tipo hidrofóbicas con las membranas celulares.

Estos resultados muestran que casi toda la actividad (88%) de AchE requiere detergente para su solubilización, en cambio una gran proporción (41%) de la actividad se ChE se solubiliza en buffer de alta fuerza iónica en ausencia de detergente.

Si bien las técnicas de solubilización que empleamos son las que habitualmente se utilizan para extraer la actividad de AchE y ChE "soluble" y "unida a membranas" en distintos tejidos (revisado por Massoulie y Bon, 1982), queremos destacar que estos términos son operativos y se los usa para estandarizar las actividades solubilizadas en esta forma. Asimismo, cabe destacar que en estas condiciones, la actividad llamada soluble podría estar sobreestimada ya que una centrifugación a 20.000 g x 1 hora no es suficiente para obtener un sobrenadante totalmente libre de pequeños fragmentos de membrana.

Estos resultados muestran que la mayor parte de la actividad de AchE presente en tejido hepático se halla unida a membranas, con un pequeño porcentaje solubilizable mediante alta fuerza iónica. Existirían asimismo, dos poblaciones de ChE: una solubilizable en alta fuerza iónica y otra que requiere detergente para su solubilización.

#### 4.4 FORMAS MOLECULARES:

Tanto la AchE como la ChE son enzimas de elevado polimorfismo estructural que se manifiesta, entre otras cosas, como especies que difieren en el grado de ensamblaje (asociaciones cuaternarias de subunidades catalíticas). Si bien informes previos indican que las formas moleculares presentes en tejido hepático son monómeros ( $G_1$ ) de ChE y monómeros ( $G_1$ ), dimeros ( $G_2$ ) y tetrameros ( $G_4$ ) de AchE (Massoulié y Bon, 1982), decidimos analizar si las actividades extraídas en diferentes condiciones corresponden a poblaciones homogéneas o heterogéneas respecto al grado de ensamblaje.

Con este objeto, realizamos un fraccionamiento de los extractos HS(S1) y HST(S2) por medio de centrifugación en gradientes continuos de sacarosa 5-20% (ver MM).

Los perfiles de sedimentación de las actividades de AchE y ChE extraídas en ausencia y en presencia de detergente (S1 y S2, respectivamente) se muestran en la figura III. Las formas moleculares detectadas fueron:  $G_4$  (9.5S)(40%) y  $G_1+G_2$  (6.0-5.1S)(60%) para AchE y  $G_1+G_2$  (6.5-5.1S) para ChE. Estos resultados coinciden con los ya reportados para este tejido.

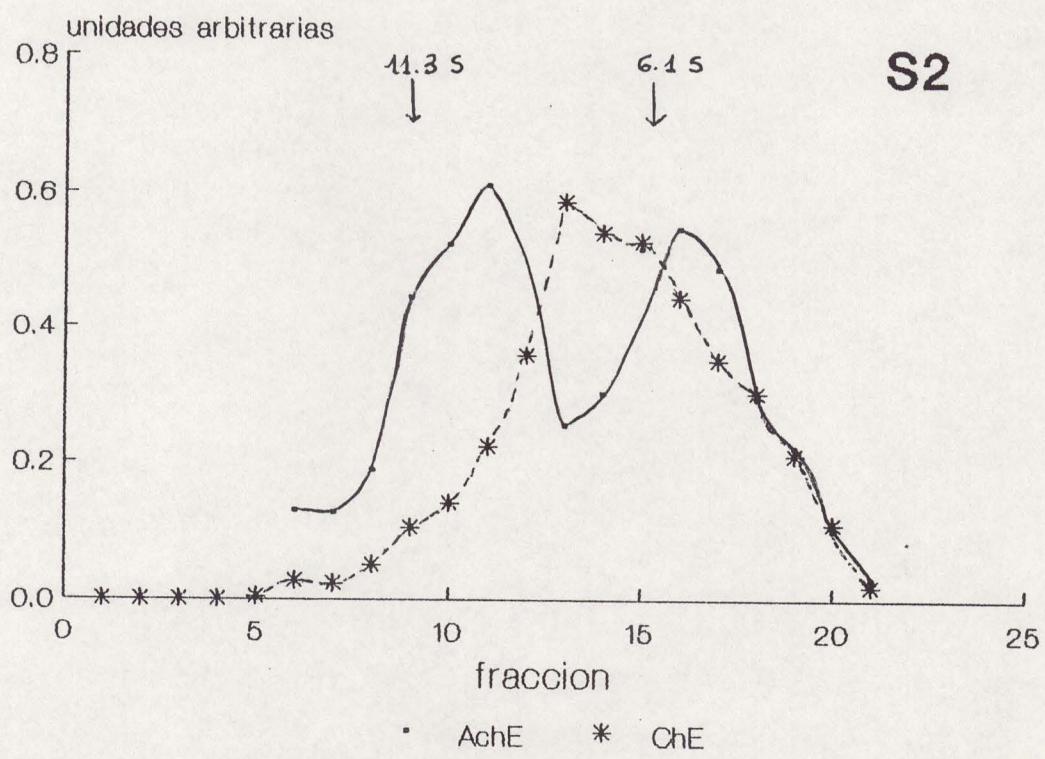
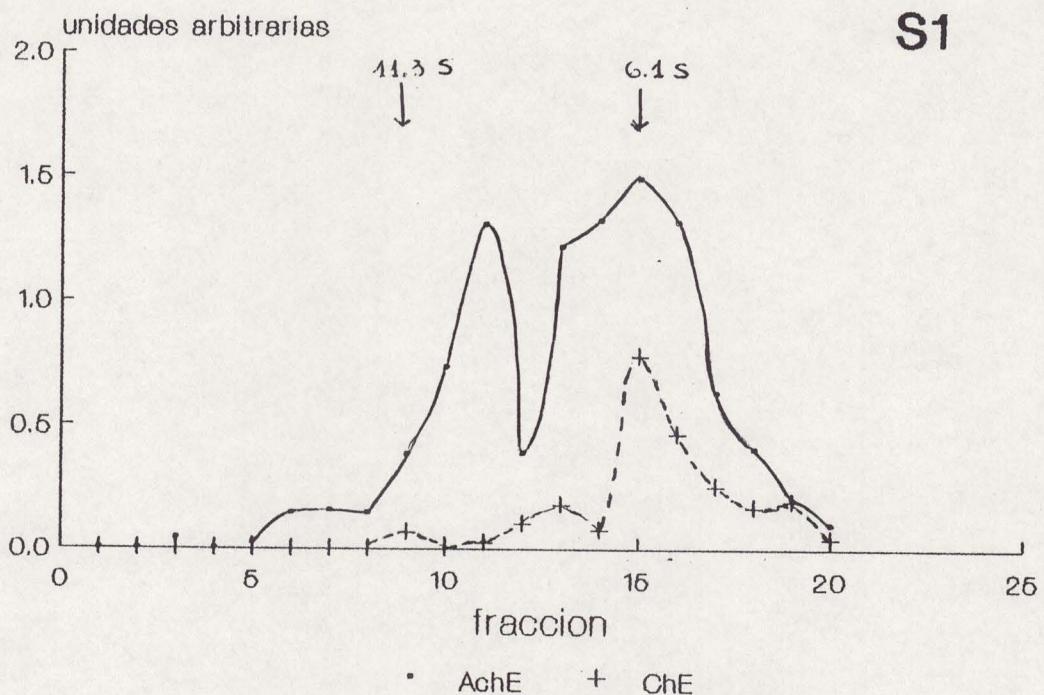
Como se observa en la figura III, los monómeros-dímeros (G1+G2) correspondientes a AchE y ChE y los tetrámeros (G4) correspondientes a actividad de AchE, se distribuyen entre especies "solubles" y "unidas a membranas". Esta distribución heterogénea de una misma forma globular, ya fue previamente reportada para otros tejidos (Atack, 1986; Massoulie y Bon, 1982). Estos resultados corroboran la hipótesis de P.Taylor (1987) de que el grado de ensamblaje de las subunidades catalíticas de estas enzimas no es el único factor que determina su distribución subcelular. Esta heterogeneidad en la distribución podría reflejar el hecho de que en una misma población de moléculas que se consideran homogéneas en cuanto a su coeficiente de sedimentación, existieran especies que difieren en: patrón de glicosilación, unión a anticuerpos específicos o grado de hidrofobicidad, tal como fue descripto en otros tejidos (Ralston y col., 1984; Meflah y col., 1984; Massoulie y Toutant, 1988).

Teniendo en cuenta que las formas moleculares pueden sufrir cambios durante los procesos de homogeneización, fraccionamiento y almacenamiento, como por ejemplo: conversión de formas asimétricas en globulares debido a proteólisis endógena (Massoulie y Toutant, 1988); conversión de formas globulares de mayor grado de ensamblaje en

monómeros debido a proteólisis o reducción (Allemand y col., 1981; Ott, 1985) o conversión de formas moleculares livianas en especies de mayor coeficiente de sedimentación (por agregado entre monómeros entre si o con otras proteínas del medio), hemos trado de minimizar estos factores de error en nuestras condiciones experimentales, a saber: fraccionamiento inmediato del extracto para evitar la proteólisis y uso de detergente no iónico en los gradientes continuos de sacarosa para evitar el efecto de agregación. Por este motivo consideramos como poco probable que los resultados que aquí se presentan estén afectados por el problema de interconversiones de formas moleculares antes mencionado.

Nuestros resultados muestran que en hígado de rata la AchE se encuentra como forma G4 (40%) y G1+G2 (60%) y que solo se detecta la forma G1+G2 de ChE, ambas distribuidas entre especies solubles y unidas a membrana, verificándose también en este tejido, que el grado de ensamblaje de las subunidades catalíticas no determina su distribución subcelular.

### FIGURA III Formas Moleculares



#### 4.5 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR:

Como se indicó en la sección precedente, los procedimientos de extracción muestran que la mayor parte de la actividad de AchE está unida a membranas y que existirían dos poblaciones de ChE – "soluble" y "unida a membranas" – distribuidas homogéneamente.

En esta etapa nos interesó investigar a qué tipo de membranas celulares se asociaban estas actividades y, en el caso de la actividad soluble, evaluar si correspondía a la fracción citosólica o al lumen de alguna organela intracelular.

En una primera aproximación, realizamos fraccionamientos subcelulares primarios mediante centrifugación por velocidad de sedimentación (Lahav y col, 1982) con la cual se obtienen las distintas fracciones subcelulares: Nuclear, Mitocondrial I, Mitocondrial II, microsomal y citosol o soluble. No se detectó enriquecimiento con respecto al homogenato en la actividad de colinesterasas en ninguna de las fracciones mencionadas, así como tampoco enriquecimiento en la actividad de las enzimas marcadoras de algunas de estas fracciones (datos no mostrados). Si bien estos experimentos

no permitieron atribuir las actividades de AchE y ChE presentes en el homogenato a ninguna fracción subcelular, resultaron un primer indicio de que la actividad de las mismas no se hallaba presente -al menos en cantidad significativa- en el citosol, dado que con este tipo de técnica de separación, ésta es la única fracción que se puede esperar obtener con un alto grado de pureza (Freifelder, 1979).

Por esta razón, se procedió a utilizar otras técnicas de fraccionamiento subcelular (ver MM) que permitieran obtener las diferentes organelas con mayor grado de pureza.

#### Valoración de la pureza de las fracciones:

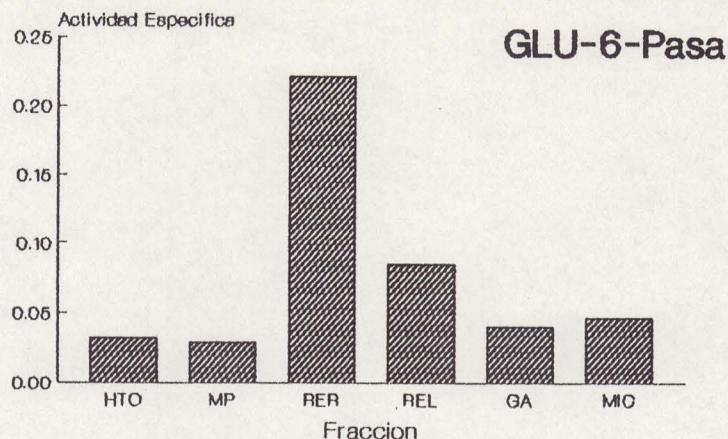
La pureza de las fracciones se evaluó por métodos bioquímicos. Se determinó en cada fracción la actividad de 5' Nucleotidasa (5' AMPasa), ácido N-acetilneuramínico transferasa (NeuNac-transferasa) y glucosa-6-fosfatasa (Glu-6-Pasa), enzimas marcadoras de membrana plasmática (PM), Aparato de Golgi (GA) y retículo endoplasmático liso y rugoso (REL y RER), respectivamente.

Los resultados de la figura IV muestran que el enriquecimiento en la actividad específica de las enzimas diagnósticas de PM, GA, RER y REL coinciden con resultados obtenidos previamente por otros autores (Carey Hirshberg, 1980; Fleisher y Kervina, 1974). La fracción de PM resultó enriquecida 10x en 5'AMPasa, la fracción GA resultó 28x enriquecida en NeuNac-transferasa (se utilizó la fracción de GA obtenida por el método de Leelavathi pues la fracción obtenida mediante el otro método descripto en MM, solo resultó enriquecida 10x en la enzima diagnóstica) y las fracciones de RER y REL presentaron un enriquecimiento de 6.9x y 2.6x, respectivamente, en la actividad de Glu-6-Pasa. Las preparaciones microsómicas estaban enriquecidas 1.2x en 5'AMPasa, 1.8 en Glu-6-P y 2.2x en NeuNac-transferasa; resultados que reflejan la composición heterogénea de esta fracción.

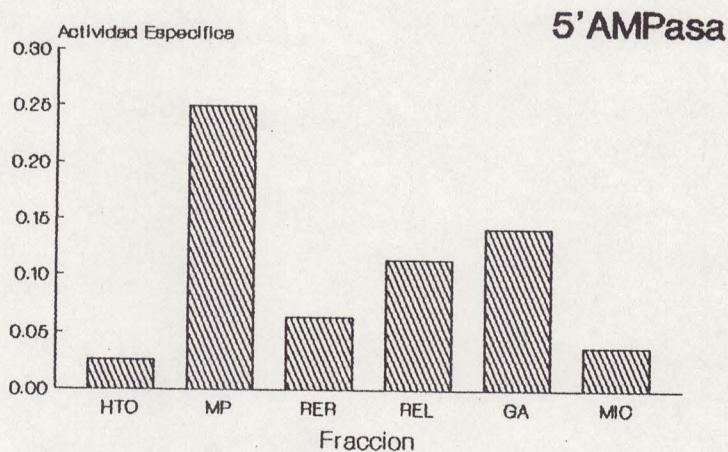
Las actividades específicas de las enzimas marcadoras se utilizaron para la evaluación de la contaminación cruzada, es decir para determinar qué porción de las proteínas presentes en una determinada fracción provienen de membranas de otras fracciones subcelulares.

## FIGURA IV: ENZIMAS MARCADORAS

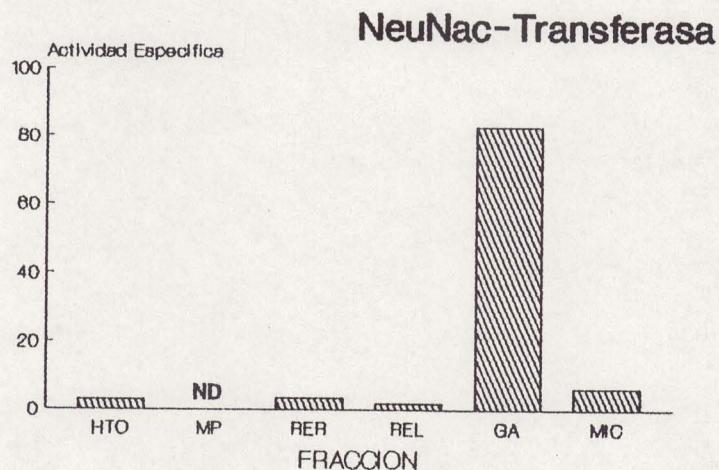
63



AE:umol Pi/min/mg prot.



AE:umol Pi/min/mg prot.



AE:nmol/hora/mg prot.

#### 4.6 DISTRIBUCION DE ACTIVIDADES DE ACHE Y CHE EN DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES:

Como se observa en la Tabla V, todas las fracciones resultaron Enriquecidas en actividad de colinesterasa total respecto al homogenato. Sin embargo cuando se discriminó entre la actividad de AchE y ChE utilizando un inhibidor específico de la primera (ver MM), se encontró que las fracciones de PM y GA estaban Enriquecidas 6x en AchE, mientras que ChE resultó Enriquecida 13x en RER y 9.6x en REL. La fracción microsomal (MIC) presentó un Enriquecimiento de 2.5x y 2.8x en AchE y ChE, respectivamente, mientras que en el sobrenadante post-microsomal no se detectó actividad de colinesterasas.

En las fracciones de RER y REL se detectó actividad de AchE y en PM y GA actividad de ChE, sin embargo estas actividades eran bajas y no resultaron significativamente Enriquecidas respecto al homogenato. Teniendo en cuenta la contaminación cruzada que presentaban estas fracciones, encontramos que la actividad de AchE medida en las fracciones de RER y REL podría deberse a contaminación con membranas de las fracciones de PM y GA, asimismo la actividad de ChE medida en PM y GA podría explicarse por contaminación con las

fracciones de RER y REL, aunque no se descarta la posibilidad de que fueran componentes intrínsecos de estas membranas, "enmascarados" por contaminantes de alta actividad específica presentes en las mismas.

Tabla V

Actividad de AchE y ChE: Distribución subcelular

Fracc.	Chol. Total	AchE	ChE
HTO	7.58	4.12	4.08
MP	26.90	23.50	4.08
RER	57.30	5.19	53.85
REL	44.80	4.12	39.20
BA	26.50	26.40	6.53
MIC	19.70	10.12	11.60

La actividad específica (AE) se expresa como nmoles de sustrato hidrolizado por minuto por mg de proteínas. Los valores son las medias de tres experimentos realizados por separado. DS < 15% de la media. Nota: no se detectó actividad de AchE ni ChE en el sobrenadante post-microsomal.

A fin de descartar la posibilidad de que la actividad de AchE y ChE medida en la fracción microsomal se debiera a adsorción de estas enzimas a las vesículas, se realizó un lavado con Tris (ver MM) que libera proteínas adsorbidas. En las vesículas cuya integridad era -a juzgar por la latencia de hidrólisis de la manosa-6-fosfato por la glucosa-6-fosfatasa (ver MM)- del 88% en el pellet luego del lavado, se recuperó el 100% y el 76% de la actividad de AchE y ChE, respectivamente.

El hecho de no haber encontrado actividad de AchE en el sobrenadante de 100,000 g (post-microsomal) y que se recupera el 100% de su actividad luego del lavado de la fracción microsomal con Tris, indica que no existe actividad soluble de esta enzima en el citosol.

Con respecto a la ChE, tampoco se detectó actividad en el sobrenadante de 100,000 g. En este caso, dado que la recuperación del lavado con Tris fue del 76%, el no haber detectado actividad en el citosol podría deberse a adsorción de la enzima a vesículas microsómicas. Sin embargo, parte de la actividad extraída con Tris podría atribuirse a enzima proveniente del lumen de vesículas disruptas ya que el

porcentaje de vesículas intactas luego del lavado fue del 88%.

Podemos observar que la actividad de AchE detectada en este tejido proviene principalmente de las fracciones de PM y GA mientras que la actividad de ChE se asocia mayormente con vesículas del RE. Asimismo, estos resultados nos permiten descartar la presencia de actividad significativa de estas enzimas en el citosol.

#### 4.7 ORIENTACION

Para evaluar la orientación del sitio catalítico activo de las colinesterasas comparamos sus actividades específicas en vesículas microsomales intactas y disruptas. La integridad de las vesículas de RE se determinó por la latencia de hidrólisis de la manosa-6-fosfato (sustrato no permeante; ver MM) por la glucosa-6-fosfatasa. El porcentaje de vesículas intactas resultó de  $89.1 \pm 5.4$  ( $n=4$ ). Como se muestra en la Tabla VI, la disrupción de las vesículas, ya sea por sonicación o por tratamiento con Tritón-X-100, llevó a un incremento de la actividad específica de ChE mientras que la actividad de AchE no se vió modificada por el tratamiento.

Estos resultados indican una orientación luminal para la actividad de ChE presente en el RE. Con respecto a la AchE, no podemos sacar conclusiones sobre la orientación de su sitio activo dado que, a) la fracción microsomal resultó compuesta por el doble de proteínas provenientes de fragmentos de PM que por proteínas de GA (cálculo realizado en base a las actividades de las enzimas diagnósticas de estas fracciones). Esto indica -teniendo en cuenta que la actividad de AchE es principalmente adjudicable a estas dos fracciones- que las dos terceras partes de la actividad no

presentan orientación detectable por este método ya que provienen de fragmentos de PM y b) no podemos asegurar el grado de integridad de las vesículas de GA presentes en la fracción microsomal.

*Estos resultados ponen en evidencia que el sitio catalítico de la ChE presente en RE tiene una orientación luminal.*

TABLA VI

Efecto de la disruptión sobre la actividad de AchE y ChE:

Tratamiento	AchE	ChE
Sonicación	0,9	2,6
T-X-100 0,05%	1,2	2,4

Los resultados se expresan como actividad específica en las preparaciones tratadas respecto a las no tratadas. (n=4; DS < 12%)

#### 4.8 GRADO DE ASOCIACION A MEMBRANAS

Para investigar si AchE y ChE son proteínas integrales de membrana o periféricas o solubles en el lumen de vesículas intracelulares, realizamos un tratamiento alcalino ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M, pH 11.5) seguido por centrifugación que libera las proteínas periféricas y del contenido luminal, con lo cual en las membranas que se recuperan en el sedimento luego de la centrifugación a 100.000 g x 1h, solo quedan las proteínas integrales.

La Tabla VII muestra los resultados obtenidos en las membranas luego del tratamiento alcalino a las diferentes fracciones. Mientras que el 78% de la actividad de AchE permaneció asociada a las membranas microsómicas luego del tratamiento, la actividad de ChE fue completamente extraída. La recuperación de ambas enzimas fue del 83% respecto a la fracción microsomal total.

Como la fracción microsomal es una población heterogénea de vesículas, decidimos realizar el mismo tratamiento en fracciones enriquecidas en cada una de las enzimas, es decir utilizamos una preparación de GA para extraer la actividad de AchE y una de RER para ChE. Los resultados (ver Tabla

VII) muestran que mientras el 96% de la actividad de ChE en RER fue extraída por el tratamiento alcalino, el 92% de la actividad de AchE permaneció asociada a las membranas de GA. Las actividades medidas en las fracciones particuladas luego del lavado de sacarosa utilizado como control (datos no mostrados), no resultaron significativamente diferentes de las preparaciones no tratadas indicando que en nuestras condiciones de trabajo no hubo disrupción mecánica durante el tratamiento.

*Los resultados obtenidos con nuestro diseño experimental muestran que en el hígado la AchE se comporta como una proteína integral de membrana, mientras que la ChE lo hace como una proteína periférica de membrana y/o soluble en el lumen del RE.*

Tabla VII

LAVADO ALCALINO ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M pH 11)

	AchE	ChE
(MIC)	1.3	0.2
	(78%)	(2%)
(RER)	-----	0.04
		(4.3%)
(BA)	0.92	-----
	(92%)	

Los resultados se expresan como actividad específica en preparaciones tratadas respecto a las no tratadas. Las cifras entre paréntesis son el porcentaje de recuperación de actividad total luego del tratamiento. Los valores son las medias de tres preparaciones separadas; DS < 12 % de la media.

## 5.- DISCUSION FINAL Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que en tejido hepático la hidrólisis de ATC se debe principalmente a la actividad de AchE y ChE y que dichas actividades pueden discriminarse por medio de la utilización de inhibidores selectivos, siendo la susceptibilidad de AchE y ChE presentes en este tejido la misma que presentan a la inhibición por BW 62D47 y Ethopropazine.enzimas de otros orígenes (*Torpedo Marmorata*, *Torpedo Californica* *Electrophorus*, *Drosophila melanogaster*). Asimismo se verifica también en este tejido que el sustrato preferencial de la AchE es ATC y que la ChE hidroliza tanto ATC como BTC (Silver, 1974). Con respecto a la estabilidad térmica, se observa que la AchE es inhibible a temperaturas relativamente bajas ( $>45^\circ\text{ C}$ ) mientras que la ChE solo es inhibible por temperaturas "normales" de inactivación ( $>55^\circ\text{ C}$ ) como se ha reportado para enzimas presentes en otros tejidos (Edwards y Brimijoin, 1983; Pavlic, 1987).

Las formas moleculares detectadas,  $G_1+G_2$  y  $G_4$  de AchE y  $G_1+G_2$  de ChE, están de acuerdo a las previamente descriptas para este tejido (Massoulie y Bon, 1982). El análisis de su solubilidad muestra que, tanto los monómeros y dímeros como

los tetrámeros se distribuyen entre especies "solubles" y "unidas a membrana", lo cual nos permite corroborar la hipótesis de que el grado de ensamblaje no es el único determinante de la distribución subcelular de estas variantes moleculares (P.Taylor, 1987).

De acuerdo a nuestros resultados la AchE se comporta como una proteína integral de membrana: a) requerimiento de detergente para su solubilización pues solo un 12% se extrajo con alta fuerza iónica y b) permanencia en las membranas luego de un tratamiento alcalino -el 92% de la actividad se detectó en las membranas del GA luego del tratamiento. Dado que el análisis de la secuencia peptídica de la AchE de otros orígenes (órgano eléctrico de peces, *Drosophila Melanogaster*) indica que esta proteína no posee secuencias hidrofóbicas que permitan inferir que sea un proteína integral de membrana sino que presenta características de una proteína de secreción (Schumacher y col. 1986a, 1986b; P. Taylor, 1987), se pueden plantear dos hipótesis para explicar el comportamiento observado: una, que la estructura primaria de la AchE de hígado de rata sea muy diferente a las ya secuenciadas y otra, que una modificación post-traduccional le confiera el carácter hidrofóbico. Nos inclinamos por la segunda hipótesis pues por un lado, las secuencias de AchE estudiadas hasta el

presente muestran una gran homología entre sí, y por otro lado ya ha sido demostrado que ciertas modificaciones post-traduccionales son las responsables del carácter hidrofóbico que presentan por ejemplo, la forma G<sub>2</sub> de AchE de la membrana del eritrocito de varios orígenes y la forma G<sub>4</sub> (ver figura C, item 1) en distintos tejidos de mamíferos (Lee y col., 1982; Futterman y col., 1985; Rosenberry y col., 1986; Inestrosa y col., 1987).

Significación del ChE en el RE: su actividad reflejando la asociación a membranas: Con respecto a la ChE, nuestros resultados muestran la existencia de dos poblaciones en cuanto a su grado de asociación a membranas: una población soluble en el lumen del RE o unida a membranas por medio de interacciones iónicas y otra población que presenta un grado de asociación mayor, a juzgar por la necesidad de utilizar detergente para su solubilización. El hecho de requerir detergente no indica que sea una proteína integral, pues al utilizarlo liberamos tanto proteínas integrales como aquellas que sean periféricas pero que requieran un tratamiento más drástico que el aumento de la fuerza iónica (Fujiki y col., 1982). En nuestro caso podemos decir que esta segunda población se comporta como periférica de membrana pues a diferencia de la actividad del AchE, la actividad de ChE presente en RE fue casi completamente extraída de las membranas por medio de un tratamiento alcalino.

En cuanto a la distribución subcelular y topografía de las ChEs presentes en este tejido, la AchE se localiza preferencialmente en la PM y en el GA, no pudiéndose con la metodología empleada, detectar su orientación en estas membranas, mientras que la ChE se encuentra enriquecida en la fracción de RE, presentando en esta organela una orientación luminal. El hecho de no detectarse actividad significativa de AchE en RE podría estar reflejando una situación similar a la descripta para células musculares en cultivo. En las mismas se encontró que la población intracelular de AchE representa solo el 40% del total celular y que esa población sufre un alto recambio, siendo su permanencia en el RER mucho más corta que en el GA a juzgar por el tiempo que media entre la adición de los residuos de manosa, de N-acetilglucosamina y galactosa terminal y su aparición en el medio de cultivo (Rotundo, 1984, 1989). Con respecto a la ChE, el no detectarse actividad significativa en PM, reflejaría el hecho de que, al ser el hígado el lugar de síntesis de la ChE del plasma, la mayor parte de la enzima biosintetizada por este tejido se secretara. Sin embargo, resulta llamativo que no se encuentre actividad significativa de ChE en GA, dado que se ha descripto la presencia de oligosacáridos complejos cuyo procesamiento implica un tránsito por el GA en ChE de

plasma, hígado y cerebro fetal humanos (Lockridge, 1987; Prody y col., 1987). No obstante, si consideramos que los carbohidratos están involucrados en diferentes funciones biológicas incluyendo la determinación de rutas y destinos finales de las proteínas en la célula (Feizi, 1981), es factible que una misma enzima presente diferencias en sus carbohidratos en diferentes células y, dentro de una misma célula, en diferentes localizaciones subcelulares. Una composición heterogénea de carbohidratos ya fue descripta para la misma forma molecular de AchE de eritrocitos y de linfocitos de un mismo organismo, asimismo se encontraron diferencias en el patrón de glicosilación de las formas G<sub>4</sub> y G<sub>1</sub>-G<sub>2</sub> provenientes de un mismo tejido, no presentando los monómeros y dímeros activos sus azúcares totalmente procesados (Meflah y col., 1984). Teniendo en cuenta estas consideraciones y el hecho de que para la AchE se ha descripto que el 80% de los monómeros de AchE sintetizados por células musculares y neuronales en cultivo son degradados intracelularmente (Rotundo y Farmbrough, 1982; Lazar y col., 1984; Brockman y col., 1986; Rotundo y col., 1988, 1989) y que no transitan por el GA (Rotundo, 1989); podemos postular dos alternativas para explicar nuestros resultados: que la ChE presente en RE (solo en forma G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>) sea en su mayoría destinada a degradación y que solo la pequeña fracción detectada en GA se secrete o, que la ChE de

hígado de rata no posea azúcares complejos, siendo exportada a través de vesículas exocíticas desde el RE sin transitar por el GA; sin descartar que ocurran ambas cosas. Por cierto, para evaluar las hipótesis planteadas sobre la ruta biosintética de las ChEs se requiere el empleo de otras metodologías conjuntamente con las técnicas de fraccionamiento subcelular empleadas en el presente trabajo.

En conclusión encontramos que el tejido hepático es un buen modelo para el estudio del polimorfismo de las ChEs en relación con su distribución subcelular, basamos nuestra afirmación en los siguientes resultados:

- En este tejido, a diferencia de lo que ocurre en los tejidos habitualmente utilizados para el estudio de las ChEs, la hidrólisis de ACh es adjudicable en partes iguales a la actividad de AchE y ChE.
- Las distintas formas moleculares detectadas son heterogéneas en cuanto a su solubilidad.
- Se pueden obtener fracciones subcelulares, con alto grado de pureza, rendimiento e integridad, enriquecidas en actividad de AchE y /o de ChE lo cual facilita el estudio de diversas características de estas enzimas y asimismo permitiría el empleo de este tejido para estudios de

biosintesis, transporte intracelular y destino final de estas enzimas.

## 6.- BIBLIOGRAFIA

- Allemand P. y col. (1981) The quaternary structure of chicken acetylcholinesterase and butyryl-cholinesterase: effect of collagenase and trypsin. *J. Neurochem* 28: 605-615
- Anglister L. y Sillman I. (1978) Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase. *J. Mol Biol* 125: 293-311
- Arion W. y col. (1976) Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose-6-phosphatase system. *J. Biol Chem* 251: 1901-1907
- Aronson N. y Touster O. (1974) Isolation of plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods in Enzymol* 31: 90-102
- Attack J. y col. (1986) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J. Neurochem* 47: 263-276
- Autori F. y col. (1975) Biogenesis of microsomal membrane glycoproteins in rat liver. I. Presence of glycoproteins in microsomes and cytosol. *J. Cell Biol* 67: 687-714
- Beers R. y Siger I. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of  $H_2O_2$  by catalase. *J. Biol Chem* 195: 133-140
- Bon S. y col. (1979) Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2546-2550
- Bon S. y col. (1988) Amphiphilic and non-amphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases. II. Electrophoretic variants and phosphatidylinositol Phospholipase C-sensitive and insensitive forms. *J. Neurochem* 81: 786-795
- Bon S. y Massoulie J. (1976) Molecular forms of *Electrophorus* acetylcholinesterase, the catalytic subunits: fragmentation, intra- and inter-subunit disulfide bonds. *FEBS Lett* 71: 273-278
- Bon S. y Massoulie J. (1980) Collagen-tailed and hydrophobic component of acetylcholinesterase in *Torpedo marmorata* electric organ. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4464-4468

- Brimijoin G. (1983) Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Prog Neurobiol* 21: 291-322
- Brimijoin G. y col. (1983) Production and characterization of separate monoclonal antibodies to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Mol Pharmacol* 24: 513-520
- Brockman S. (1982) Cellular localization of the molecular forms of acetylcholinesterase in cultured rat myotubes. *J. Neurosci* 2: 1775-1785
- Brockman S. y col. (1986) Assembly of monomeric acetylcholinesterase into tetrameric and asymmetric forms. *J. Biol Chem* 261: 1201-1207
- Carey D. y Hirshberg C. (1980) Kinetics of glycosylation and intracellular transport of sialoglycoproteins in mouse liver. *J. Biol Chem* 255: 4348-4354
- Couraud J. y col. (1985) Rapid axonal transport of three molecular forms of AChE in the frog sciatic nerve. *Neuroscience* 14: 1141-1147
- Chen P. y col. (1956) Microdetermination of phosphorous. *Anal. Chem* 28: 1758-1758
- Chubb I. y col. (1980) Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. *Neuroscience* 5: 2065-2072
- Chubb I. y col. (1983) The enkephalins are amongst the peptides hydrolyzed by purified acetylcholinesterase. *Neuroscience* 10: 1369-1378
- Chubbi. y Millar T. (1984) Is intracellular acetylcholinesterase involved in the processing of peptides neurotransmitters? *Clin Exp Hypertens [A]* 6: 79-89
- Dallner G. (1974) Isolation of Rough and Smooth Microsomes. *Methods in Enzymol* 31: 191-200
- Davis R. y Koelle G. (1981) Electron microscope localization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the superior cervical ganglion of the cat. II. Pregangionically denervated ganglion. *J. Cell Biol* 96: 217-229

- Di Giambardino L. y Couraud J. (1978) Rapid accumulation of high molecular weight acetylcholinesterase in transected sciatic nerve. *Nature* 27: 170-172
- Edwards J. y Brimijoin S. (1983) Thermal inactivation of the molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 742: 509-516
- Ellman G. y col., (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95
- Falugi C. y Rainieri M. (1985) Acetylcholinesterase (AChE) and pseudocholinesterase (BuChE) activity distribution pattern in early developing chick limbs. *J. Embryol Exp Morphol* 86: 89-108
- Feizi T. (1981) Carbohydrate determination antigens. *Trends in Biochem Sci* 6: 333-335
- Fleisher S. y Kervina M. (1974) Subcellular fractionation of rat liver. *Methods in Enzymol* 31: 6-41
- Freifelder D. (1979) *Técnicas de Bioquímica y Biología Fundamental*. Capítulo 11. Editorial Peverté, S.A.
- Fujiki Y. y col. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol* 93: 97-102
- Futerman A. y col. (1985) Solubilization of membrane bound acetylcholinesterase by a phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. *J. Neurochem* 45:1487-1494
- Gautron J. (1982) Ultrastructural localization of acetylcholinesterase. A direct method for light and electron microscopy. *Histochemistry* 76: 469-478.
- Gisiger V. y col. (1978) Acetylcholinesterase of rat sympathetic ganglion: molecular forms, localization and effects of denervation. *J. Neurochem* 30: 501-516
- Grassi J. y col. (1982) Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character. *J. Neurochem* 38: 457-469

Hodgkin W. y col. (1965) Complete pseudocholinesterase deficiency: genetic and immunologic characterization. *J. Clin Invest* 44 (3): 486-493

Hubbard A. y col. (1983) Isolation of hepatocyte plasma membrane. I. Presence of three major amines. *J. Cell Biol* 96: 217-229

Inestrosa N. y col. (1987) Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterase in other tissues. *J. Biol Chem* 262: 4441-4444

Koelle G. (1969) Significance of acetylcholinesterase in central synaptic transmission. *Fed Proc* 28 (1): 95-100

Koelle G. (1977) Effects of inactivation of butyrylcholinesterase on steady state and regenerating levels of ganglionic acetylcholinesterase. *J. Neurochem* 28: 313-319

Lahav M. y col. (1982) A method for obtaining high recovery of purified subcellular fractions of rat liver homogenate. *Anal Biochem* 121: 114-122

Layer P. (1983) Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chicken brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6413-6417

Layer P. y col. (1985) Development of embryonic cholinesterases and cell proliferation in chick brain and retina. *J. Neurochem* 44: 5129

Layer P. y col. (1987) Quantitative development and molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase during morphogenesis and synaptogenesis of chick brain and retina. *J. Neurochem* 49 (1): 175-182

Layer P. y col. (1988) Sequential activation of butyrylcholinesterase in rostral half somites and acetylcholinesterase in motoneurones and myotomes preceding growth of motor axons. *Development* 102: 387-396

Lazar M. y col. (1984) Heavy isotope labelling study of the metabolism of monomeric and tetrameric acetylcholinesterase forms in the murine neuronal-like T28 hybrid cell line. *J. Biol Chem* 259: 3703-3713

- Lazar M. y Vigny M. (1980) Modulation of the distribution of acetylcholinesterase molecular forms in murine neuroblastoma X sympathetic ganglion cell hybrid cell line. *J. Neurochem* 35: 1067-1079
- Lee S. y col. (1982) Characterization of a hydrophobic dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo*. *J. Biol Chem* 257: 12302-12309
- Leelavathi D. y col. (1970) Isolation of a Golgi-rich fraction from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 211: 124-138
- Li Z. y Bon C. (1983) Presence of a membrane-bound acetylcholinesterase form in a preparation of nerve endings from *Torpedo marmorata* electric organ. *J. Neurochem* 40: 338-349
- Lockridge O. (1982) Substance P hydrolisis by human serum cholinesterase. *J. Neurochem* 39 (1): 106-110
- Lockridge O. y col. (1987) Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol Chem* 262: 549-557
- Lowry O. (1957) Micromethods for the assays of enzymes. *Methods in Enzymol* 4: 371
- Lowry O. y col. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193: 265-273
- Martelli y Gautron (1988) differential expression of acetylcholinesterase molecular forms in neural retina and retinal pigmented epithelium during chick development. *Brain Res* 460: 205-213
- Massoulie J. y col. (1985) Expression of acetylcholinesterase in murine neural cells in vivo and in culture. *Molecular Basis of Nerve Activity*. de Gruyter, Berlin p.619 (\*)
- Massoulie J. y Bon S. (1982) The molecular forms of cholinesterases in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 5: 57-106
- Massoulie J.y Toutant J. (1988) Vertebrate cholinesterases: structure and types of interaction. *Handbook Exp Pharmacol* 86: 167-224
- McLlah K. y col. (1984) Interactions with lectins indicate differences in the carbohydrate composition of the membrane

bound enzymes acetylcholinesterase and 5'nucleotidase in different cell types. *Biochimie* 66: 59-69

Miledi R. y col. (1984) Acetylcholinesterase activity in intact and homogenized skeletal muscle of the frog. *J. Physiol* 349: 663-686

Millar T. y Chubb I. (1984) Sections of chick retinae treated with acetylcholinesterase show enhanced enkephalin and substance P immunoreactivity. *Neuroscience* 12: 441-451

Mintz K. 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

Musset F. y col. (1987) Monoclonal antibodies against acetylcholinesterase from electric organs of *Electrophorus* and *Torpedo*. *Biochimie* 69: 147-156

Ott P. (1985) Membrane acetylcholinesterase: purification, molecular properties and interactions with amphiphilic environments. *Biochim Biophys Acta* 822: 375-392

Pavlic M. (1988) Thermal inactivation of cholinesterases. *Periodicum Biolorum* 90 (2): 115-118

Prody C. y col. (1987) Isolation and characterization of full-length cDNA clones for cholinesterase from fetal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3555-3559

Ralston J. y col. (1985) Acetylcholinesterase from fetal bovine serum. Purification and characterization of soluble G<sub>a</sub> enzyme. *J. Biol Chem* 260: 4312-4318

Rackonczay Z. y Brimijoin S. (1986) Monoclonal antibodies to rat brain acetylcholinesterase: comparative affinity for soluble and membrane-associated enzyme and for enzyme from different vertebrate species. *J. Neurochem* 46: 280-287

Randall W. (1985) Acetylcholinesterase of muscle and nerve. *Molecular Basis of Nerve Activity*. de Gruyter, Berlin, p.595 (\*)

Robertson R. y Mostamand F. (1988) Development of "nospecific" cholinesterase in the dorsal thalamus of the rat. *Dev Brain Res* 41: 43-60

Rosenberry T. y col. (1986) Glycolipid binding-domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Fed Proc* 45: 2970-2973

Rosenberry T. y Richardson J. (1977) Structure of 18 S and 14 S acetylcholinesterase: identification of collagen tailed subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits. *Biochemistry* 16: 3550-3558

Rotundo R. (1984) Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi Apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 479-483

Rotundo R. (1988) Biogenesis of acetylcholinesterase molecular forms in muscle. *J. Biol Chem* 263: 19398-19406

Rotundo R. (1989) Intracellular transport, sorting and turnover of acetylcholinesterase. *J. Biol Chem* 264 (6): 3146-3152

Rotundo R. y Fambrough D. (1980a) Synthesis, transport and fate of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle cells. *Cell* 22: 583-594

Rotundo R. y Fambrough D. (1980b) Secretion of acetylcholinesterase: relation to the acetylcholine receptor metabolism. *Cell* 22: 595-602

Rotundo R. y Fambrough D. (1982) Biosynthesis and secretion of catalytically active acetylcholinesterase in *Xenopus* oocytes microinjected with mRNA from rat brain and from *Torpedo* electric organ. Proc Natl Acad Sci 79: 830-834

Rotundo R. y col. (1987) Neurons segregate clusters of membrane bound acetylcholinesterase along their neurites. Proc Natl Acad Sci 84: 2063-2067

Rotundo R. y col. (1988) Allelic variants of acetylcholinesterase: genetic evidence that all acetylcholinesterase forms in avian nerves and muscles are encoded by a single gene. Proc Natl Acad Sci 85: 7805-7809

Schumacher M. y col. (1986a) Primary structure of *Torpedo California* acetylcholinesterase deduced from cDNA sequence. Nature 319: 407-409

Schumacher M. y col. (1986b) Primary structure of acetylcholinesterase: implications for regulation and function. Fed Proc 45: 2976-2981

Silver A. (1963) A histochemical investigation of cholinesterases at neuromuscular junctions in mammalian and avian muscle. J. Physiol 169: 386-393

Silver A. (1974) The Biology of Cholinesterases. North Holland, Amsterdam (\*)

Sikorav J. y col. (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

Soreq H. y col. (1982) Biosynthesis and secretion of catalytically active acetylcholinesterase in *Xenopus* oocytes microinjected with mRNA from rat brain and from *Torpedo* electric organ. Proc Natl Acad Sci USA 79: 830-834

Soreq H. y col. (1983) Biosynthesis of acetylcholinesterase in rat brain and *Torpedo* electric organ is directed by source mRNA species. Prog Brain Res 58: 107-115

Soreq H. y col. (1984) Expression of cholinesterase gene(s) in human brain tissues: translational evidence for multiple mRNA species. EMBO J. 3: 1371-1375

