



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Actividad de las colinesterasas en diferentes mutantes  
sensoriales de *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ISMAEL JOSAFAT GIMATE BAÑOS



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

Directora de Tesis:  
Dra. Rocío Salceda Sacanellas

Codirector de Tesis:  
Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

COMISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Actividad de las colinesterasas en diferentes mutantes sensoriales de Drosophila melanogaster"

realizado por Ismael Josafat Gimete Baños

con número de cuenta 9960231-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Rocío Salceda Sacanelles.  
Codirector de Tesis

Propietario Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar.

Propietario Dra. María Luisa Fanjul de Moles.

Suplente Dr. Edgardo Escamilla Marván.

Suplente Biól. Gustavo Sánchez Chávez.

*[Handwritten signatures of Rocío Salceda Sacanelles, Juan Rafael Riesgo Escovar, and María Luisa Fanjul de Moles]*

*[Handwritten signature of Edgardo Escamilla Marván]*

*[Handwritten signature of Gustavo Sánchez Chávez]*

FACULTAD DE CIENCIAS



Consejo Departamental de Biología.

*[Handwritten signature of Juan Manuel Rodríguez Chávez]*

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

**“Emancipate yourselves from mental slavery;  
None but ourselves can free our minds.”**

**Robert Nesta Marley.**

*Dedicado a mi familia a quien amo con todo el corazón:*

*Dra. Bertha Eugenia Baños Alarcón (Pe)*

*Biol. Jorge Rafael Gimete Leyva (Gor)*

*Biol. Sandra A. Gimete Baños (Shauny Brownny)*

*Gracias totales.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Salceda Sacanelles por apoyarme en todo momento y permitirme (aguantarme) trabajar en su laboratorio, aun con mi forma de ser tan poco común y mi muy exótica apariencia.

A los Drs. María Luisa Fanjul de Moles y Edgardo Escamilla Marván por revisar de manera crítica este trabajo.

Agradezco a Jah, por darle la fuerza al Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar para que pudiera atravesar el camino tortuoso entre el Edén y la ciudad de la perdición, dejando así una vida virtual y convirtiéndose en Little John quien ayudando a los pobres (como yo) pero sin fastidiar a los ricos realiza una gran labor como científico, tutor y amigo.

De manera especial, agradezco a Erandi García Cordero de Dios por retrasarme de la manera más encantadora en la realización del presente trabajo, y por que lo obvio es obvio.

Además, agradezco al parcialmente “six pack” (Mmm, Diana, Jaco, Elizabeth y Chiopitas) por su amistad incondicional tanto en las buenas (y que buenas fueron) como en las malas.

Asimismo, a mis amigos Emmanuel “Che” Varela, Oscar el Oso y Maui López-Caste, por ser como son.

También agradezco a mis amigos del laboratorio al Biol. Luigi Ber., Cencilia, Miguelao, Shicly perdón Shirley Baker, Naty y al Biol. Jethro Hernandez, por apoyarme en este proyecto, proveyéndome de la glucosa y cafeína necesaria para el buen funcionamiento de mi SNC, así como por los buenos ratos en el lab..

Agradezco a Carmen “Dory” Vilchis, quien estará en nuestros corazones y para quien siempre habrá ½ taza.

A todos mis familiares quienes me apoyaron de cualquier forma para la realización de este trabajo (ustedes saben a quien me refiero); y a los familiares que no me apoyaron también les agradezco y no olviden que mi carrera apenas comienza.

Finalmente agradezco a todas aquellas personas que estuvieron a mi lado durante toda mi carrera pero que como son tantos no los nombraré para no olvidar ningún nombre.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM por apoyar parcialmente este trabajo (Proyecto No. IN204000-3).

Por cierto, no crean que me olvide de ustedes y por que lo bueno viene siempre al final:

Agradezco de manera especial al Biol. Gustavo Sánchez Chávez no solo por su apoyo técnico y por revisar de manera crítica este trabajo, sino por ser un gran tutor en el campo de las ChEs, y sobre todo por ser un magnífico amigo.

Asimismo, agradezco a Clo (Loca la Claus) por su manera tan especial de ver las cosas.

Gracias a Nanahuatzin por traernos la luz.

## ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	3
Resumen.....	5
I. Introducción.....	6
1.1. El sistema visual.....	6
1.1.1. El ojo compuesto.....	7
1.1.2. La fototransducción.....	8
1.1.3. Transmisión del estímulo visual.....	10
1.2. El olfato.....	12
1.2.1. Receptores a odorantes y quimiotransducción.....	12
1.3. El cerebro de <i>Drosophila</i> .....	15
1.4. Las colinesterasas.....	17
1.4.1. Propiedades catalíticas.....	18
1.4.2. Sitios activos.....	19
1.4.3. Forma moleculares.....	21
1.4.4. Biosíntesis y secreción.....	22
1.4.5. Localización celular y tisular de la AChE en invertebrados.....	22
II. Hipótesis y objetivos.....	25
III. Métodos.....	26
3.1. Animales.....	26
3.2. Determinación bioquímica de AChE.....	27
3.3. Determinación de proteínas.....	28
3.4. Determinación histoquímica de AChE.....	28
3.5. Métodos estadísticos.....	29
IV. Resultados.....	30
4.1. Cinética enzimática.....	30
4.2. Actividad de AChE en mutantes sensoriales.....	31
4.3. Histoquímica de la AChE.....	33
V. Discusión.....	36
5.1. Histoquímica de AChE.....	36
5.2. Propiedades de la AChE en <i>Drosophila</i> .....	37
5.3. Actividad de la AChE en mutantes sensoriales.....	38



VI. Conclusiones.....	40
VII. Literatura citada.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina.
AChE	Acetilcolinesterasa.
AcSCh	Acetiltiocolina.
AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico.
ATP	5'-trifosfato de adenosina.
BChE	Butirilcolinesterasa.
BuSCh	Butiriltiocolina.
BW284c51	1,5-bis (4-alil-dimetil-amonio-fenil) pentan-3-uno-dibromuro.
ChEs	Colinesterasas.
DAG	Diacilglicerol.
DAG lipasa	Diacilglicerol lipasa.
DTNB	5,5'ditiobis-2-nitrobenzoico.
ERG	Electrorretinograma.
G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> y G <sub>4</sub>	Formas globulares de las colinesterasas con una, dos o cuatro subunidades catalíticas respectivamente.
GABA	Ácido $\gamma$ -amino butírico.
INR	Receptor de insulina.
IRS	Sustrato del receptor de insulina.
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato.
iso-OMPA	Tetra-isopropil-pirofosforamida.
L1 – L6	Células de la lámina.
M1 – M6	Células de la médula que hacen sinapsis con las células de la lámina.
ORNs	Neuronas receptoras olfativas.
PFA	Paraformaldehído.
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PKC	Proteína cinasa C.
PLC	Fosfolipasa C.
PM	Peso molecular.
PrCh	Propionilcolina.
PRiMA	Proteínas de anclaje a la membrana ricas en prolina.

PrSch	Propioniltiocolina.
PUFAs	Ácidos grasos poli-insaturados.
R1 – R8	Células fotorreceptoras presentes en las omatidias.
SNC	Sistema Nervioso Central.
TRP	Canales del potencial transitorio del receptor.
TRPL	Canales parecidos al canal del potencial transitorio del receptor.

## RESUMEN

La acetilcolinesterasa (AChE; EC: 3.1.1.7) es la enzima encargada de degradar al neurotransmisor acetilcolina (ACh), aunado a esto, se sabe también que esta enzima juega un papel importante en la neurogénesis durante el desarrollo tanto en vertebrados como en invertebrados. Además se ha reportado que la AChE de invertebrados presenta características algo diferentes a la de los vertebrados (Gnagey et al., 1987).

Por todo esto y sabiendo que la ACh es el neurotransmisor más utilizado en el cerebro de los invertebrados, en este trabajo se determinó por medios bioquímicos y farmacológicos la actividad de la AChE en cepas silvestres y mutantes sensoriales de *Drosophila melanogaster*.

Nuestros resultados indican la presencia de una enzima (AChE; el gen *Ace*) con características diferentes a la de los vertebrados como lo propusieron Gnagey y colaboradores (1987), que es capaz de hidrolizar BuSCh y es sensible a iso-OMPA.

La AChE en la cepa heteróciga para el gen *Ace* es más sensible a iso-OMPA que la de las cepas silvestres debido a que es un fondo genético sensibilizado. En el caso de las cepas mutantes para los genes *nana* y *norpA*, se cree que existe una alteración en la membrana plasmática de las células o bien de las vesículas transportadoras de los neurotransmisores, lo que conlleva cambios en la actividad sináptica (reducción de la misma en ambos casos), lo que se refleja en la alteración de la actividad de la AChE.

La mutante *chico*<sup>-/-</sup> considerada un modelo experimental de la diabetes, muestra alteraciones sensoriales como ocurre en pacientes diabéticos y modelos experimentales en vertebrados donde también se ha determinado una disminución en la actividad de AChE.

En conclusión, y de manera análoga a lo que ocurre con la cepa heterocigota para el gen *Ace*, alteraciones sutiles en la neurotransmisión colinérgica pueden detectarse y cuantificarse usando a la actividad de la AChE en condiciones no ideales de ensayo (presencia de iso-OMPA, sustratos con menor afinidad).

## I. INTRODUCCIÓN

Los sistemas sensoriales proporcionan a los organismos la capacidad de obtener información del medio externo e interno y, consecuentemente, la de responder adecuadamente a cambios de estos medios. En invertebrados y vertebrados, tanto la visión como el olfato juegan un papel muy importante que determina su sobrevivencia.

### 1.1. El sistema visual.

A lo largo de toda la escala filogenética, los organismos han desarrollado diferentes mecanismos para poder detectar la luz, y han obtenido la capacidad de percibir diferentes intensidades de luz y longitudes de onda, lo que ha dado como resultado una gran variedad de comportamientos, en respuesta a estos estímulos.

Organismos unicelulares, y ciertas células especializadas en la dermis de algunos organismos sencillos, tienen la capacidad de percibir diferentes intensidades de iluminación difusa; a esta capacidad se le conoce con el nombre de fotosensibilidad, y representa el tipo más simple de sensibilidad a la luz. En organismos más complejos se han desarrollado estructuras y mecanismos localizados y especializados para detectar los cambios de iluminación, los que constituyen el sentido de la vista. A través de estos mecanismos, los diferentes organismos además de detectar la intensidad de la luz, pueden detectar el movimiento en el campo visual y la forma de los objetos; algunos pueden discriminar la polarización de la luz difusa y usar esto para su orientación (Giurfa y Menzel, 1997; Pérez-León y Salceda, 1998).

De acuerdo con la capacidad de formar una imagen, los ojos pueden ser simples como el caso de los ocelos de las arañas, o complejos. Los ojos complejos pueden ser de tres tipos: el ojo compuesto (de crustáceos e insectos), el de los cefalópodos y el ojo de los vertebrados (Pérez-León y Salceda, 1998). Los ojos compuestos no sólo están adaptados a la detección del movimiento, sino que también son capaces de distinguir colores, luz polarizada y patrones geométricos (Giurfa y Menzel, 1997; Chiba 2001; Clandinin y Zipursky, 2002).

Desde hace 350 millones de años los insectos han logrado dominar gran cantidad de ecosistemas en parte gracias a su visión (Giurfa y Menzel, 1997; Frye y Dickinson 2001). Así, uno de los mejores ejemplos de orientación por medio de la luz, se observa en la gran variedad de invertebrados voladores. Los insectos voladores despliegan un gran repertorio

de conductas aéreas, y son capaces de ejecutar en 30 ms una corrección en el curso de su vuelo una vez que su objetivo ha cambiado de dirección (Frye y Dickinson, 2001). Los ojos compuestos de los insectos adultos o imagos son los órganos principales de la visión.

### 1.1.1. El ojo compuesto.

El ojo compuesto es característico de los insectos y los crustáceos, y consiste entre cien y mil unidades idénticas llamadas omatidias (800 en el caso de *Drosophila melanogaster* o mosca de la fruta, figura 1a y 1b); cada omatidio es análogo a un ojo de los vertebrados, contiene su propio aparato de refracción y retina (figura 1c) (Pérez-León y Salceda, 1998).

En los ojos compuestos, el aparato de refracción formado por la córnea y el cono cristalino es funcionalmente análogo a la córnea y el cristalino de los vertebrados. Por debajo del cono cristalino y de forma cilíndrica se encuentran las células retinulares cuyos lados están alineados con células accesorias pigmentadas que regulan y protegen de la luz que pasa entre los omatidios adyacentes (figura 1c) (Pérez-León y Salceda, 1998).

La retina de la mosca consiste de 8 fotorreceptores, dispuestos en forma trapezoidal, con su eje mayor paralelo al del omatidio; los axones salen por la parte proximal del omatidio a través de la membrana basal y después de varias decenas de micrómetros hacen sinapsis con las neuronas de la lámina y de la médula localizadas en el lóbulo óptico (Pérez-León y Salceda, 1998; Chiba 2001; Clandinin y Zipursky, 2002). Diversos estudios han demostrado que cada una de las 8 células fotorreceptoras (R1 a R8) proyecta sus axones de manera precisa: los axones de las células R1 a R6 se dirigen a la lámina haciendo sinapsis con las células monopolares, mientras que R7 y R8 lo hacen en la médula. Además las células fotorreceptoras se clasifican en tres grupos dependiendo del espectro de luz al que sean sensibles: R1 a R6 se diferencian para poder captar el espectro verde, las R7 y R8 captan la luz UV y el espectro azul (Zuker, 1996; Chiba 2001; Clandinin y Zipursky, 2002).

La célula fotorreceptora presenta en la superficie central del eje del omatidio prolongaciones de la membrana denominadas rdomeros; y es en estas estructuras (formadas por aproximadamente 60,000 microvellosidades que contienen a las opsinas ó pigmentos visuales), donde se lleva a cabo el proceso de la fototransducción (Zuker, 1996; Pérez-León y Salceda, 1998).

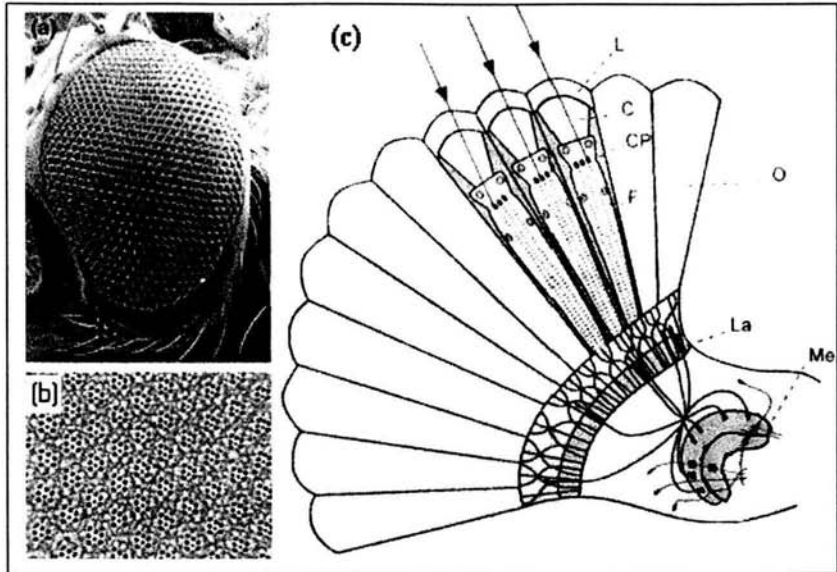


Figura 1. (a) Foto de ojo compuesto de *Drosophila*. (b) Corte transversal de la retina mostrando la disposición de los omatidios (Tomado de Brogiolo, 2001). (c) Diagrama de un corte longitudinal a través del ojo compuesto y parte del lóbulo óptico de la mosca. O, omatidio; La, lámina; Me, médula; L, lente de la córnea; C, cono cristalino; F, fotorreceptor; CP, Célula pigmentada. (Tomado de Pérez-León y Salceda, 1998)

### 1.1.2. La fototransducción.

El proceso de fototransducción, es la conversión del estímulo luminoso en un estímulo eléctrico. Al llegar la luz a los fotorreceptores se isomeriza el retinaldehído de las opsinas, activándolas. Las opsinas activas estimulan a una proteína  $G_q$  que a su vez activa al elemento proteico del gen *norpA*, una fosfolipasa C (PLC) de tipo  $\beta$  (Figura 2). La PLC hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ). Esto origina una molécula de diacilglicerol (DAG) y una molécula de inositol 1,4,5 trifosfato ( $IP_3$ ), los cuales funcionan como mensajeros intracelulares (Zuker, 1996). El  $IP_3$  inicia la movilización de calcio que se encuentra almacenado intracelularmente en las cisternas subabdoméricas (especialización del retículo endoplásmico), mientras que el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) (Zuker, 1996).

Se piensa que en algunos invertebrados como es el caso de la cacerolita de mar (*Limulus*), la liberación de calcio modulada por  $IP_3$ , es un paso importante para la despolarización del fotorreceptor (Hardie y Raghu, 2001); no obstante, en el caso de *Drosophila* estudios recientes muestran que la vía del  $IP_3$  no está involucrada en la

transmisión del estímulo visual. Las evidencias señalan que es la vía del DAG la responsable de que se lleve a cabo la fototransducción (Acharya et al., 1997; Hardie y Raghu, 2001; Hardie, 2003). Se sabe que la diacilglicerol lipasa (DAG lipasa) usa como sustrato al DAG para la generación de ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) como el ácido araquidónico; y que tanto el DAG como los PUFAs intervienen en la apertura de dos clases de canales de calcio que son los encargados de llevar a cabo la despolarización de los fotorreceptores, a saber: Los canales del potencial transitorio del receptor (TRP) y los canales parecidos al potencial transitorio del receptor (TRPL) (Hardie y Raghu, 2001; Hardie, 2003).

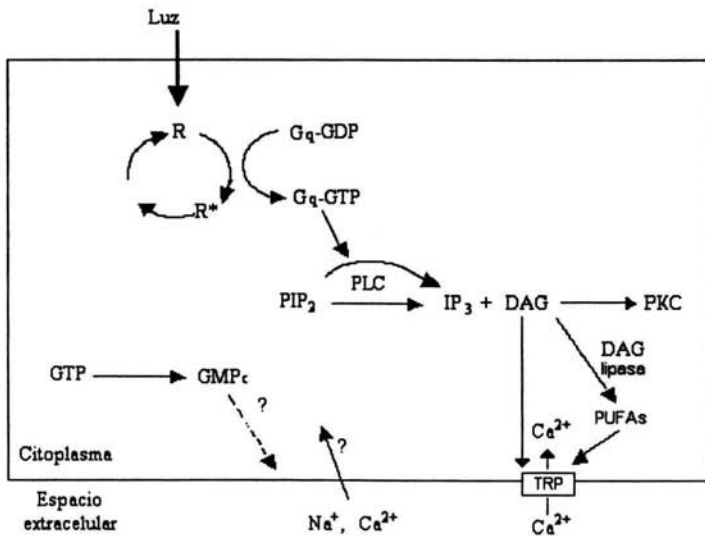


Figura 2. Esquema de las reacciones iniciadas por la luz en el fotorreceptor de los invertebrados. R, rodopsina; R\*, rodopsina activada; G<sub>q</sub>, proteína G; PLC, fosfolipasa C; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol; DAG lipasa, diacilglicerol lipasa; TRP, canales de potencial transitorio de receptor; PKC, proteína cinasa C. (Modificado de Zuker, 1996).



### 1.1.3. Transmisión del estímulo visual.

La despolarización de la membrana del fotorreceptor, originada por el estímulo lumínico, llega al final del axón propiciando la liberación de un neurotransmisor, afectando así, a la primera sinapsis de la vía visual (Pérez-León y Salceda, 1998). Diversos estudios han demostrado que diferentes invertebrados usan como neurotransmisores principalmente al ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), la dopamina, la acetilcolina (ACh) y la histidina (Pérez-León y Salceda, 1998). Las evidencias en *Drosophila* apuntan a que el neurotransmisor de los fotorreceptores es la histamina, que actúa como neurotransmisor inhibitorio.

Las terminales de los fotorreceptores se dirigen hacia el lóbulo óptico, el cual está formado por 4 neurópilos: la lámina, la médula y la lóbula, cada uno de los cuales está separado por un quiasma, y la placa de la lóbula (figura 3 a). Los axones de las células fotorreceptoras R1 a R6 dirigen sus axones a la lámina donde hacen sinapsis con neuronas de segundo orden (las células monopolares L1 a L6; figura 3b), que a su vez proyectan sus axones a través del 1<sup>er</sup> quiasma dirigiéndose hacia la médula donde mantienen contacto sináptico con neuronas de tercer orden. Los fotorreceptores R7 y R8 dirigen sus axones a través del 1<sup>er</sup> quiasma haciendo sinapsis con neuronas específicas de la médula (figura 3b) (Pérez-León y Salceda, 1998; Chiba 2001; Clandinin y Zipursky, 2002).

Las fibras visuales cruzan en un plano a una posición equivalente al otro lado del eje del quiasma, es decir, fibras de la región posterior de la lámina cruzan a la región anterior de la médula y viceversa, lo que significa que la proyección de la retícula en la médula es una imagen en espejo. Además se ha demostrado tanto en crustáceos como en insectos, la existencia de interneuronas que reciben señales de los fotorreceptores y sirven de procesadores centrales de información visual; esto refleja un parecido entre estas neuronas y las interneuronas que existen en la retina, cuerpo geniculado y corteza de los vertebrados (Pérez-León y Salceda, 1998).

Parece ser que las neuronas encargadas de la transmisión del estímulo visual, por lo menos en el caso de los dípteros, son de tipo colinérgico, ya que se ha observado que tanto la acetilcolin transferasa y la acetilcolinesterasa (enzimas encargadas de la síntesis y degradación de la ACh respectivamente) colocalizan en las diferentes zonas de los lóbulos ópticos (Toutant, 1989).

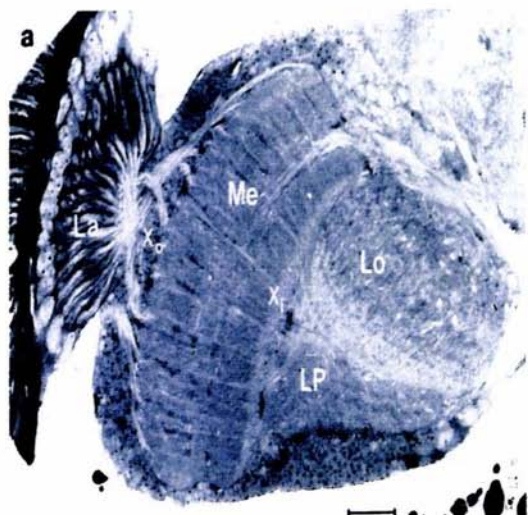
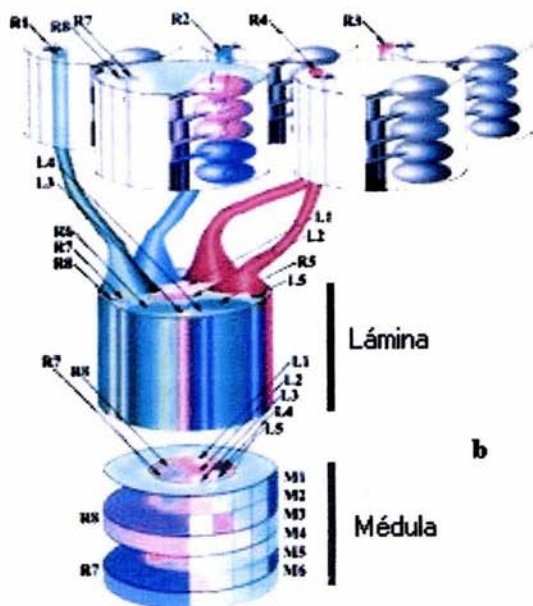


Figura 3 (a) Corte del lóbulo óptico (la barra indica 25  $\mu$ m; La, lámina; Me, médula; Lo, lóbula; LP, placa de la lóbula; X<sub>1</sub>, 1° quiasma; X<sub>2</sub>, 2° quiasma (Tomado de Fly Brain). (b) Las células receptoras (R1 a R6) proyectan sus axones hacia la lámina (L1 a L6), posteriormente las neuronas L1 a L6 atraviesan el 1<sup>er</sup> quiasma haciendo sinapsis con neuronas de la médula (M1 a M6); las células R7 y R8 proyectan sus axones hacia zonas específicas de la médula. (Tomado de Clandinin y Zipursky, 2002).



## 1.2. El olfato.

Otra manera en que los organismos son capaces de percibir su entorno es a través de la captación de estímulos odorantes disueltos en el medioambiente. Estos estímulos son moléculas químicas capaces de ser percibidas por los organismos, generando ya sea una respuesta de atracción o de repulsión. Toda esta información es esencial para la sobrevivencia de los organismos e influyen profundamente las conductas de éstos.

En los animales existen dos formas de captación de señales químicas (quimiorrecepción): el gusto y el olfato; este último y del cual trataremos en este apartado, es el encargado en gran parte de percibir los diferentes estímulos químicos en el aire. Estos estímulos son importantes para muchas conductas; por ejemplo, la búsqueda y selección de alimento o pareja. La versatilidad y capacidad discriminativa de los órganos olfativos, los cuales son capaces de percibir y diferenciar una gran cantidad de moléculas odorantes que se encuentran en el ambiente, es crítica para la sobrevivencia de los organismos, puesto que no solo sirve para la detección de alimento, sino también para percibir la presencia de predadores o bien para la comunicación con otros organismos de la misma especie.

Los invertebrados poseen notables habilidades quimiosensoriales; esto ha hecho que se usen como modelos ideales para responder a preguntas básicas sobre el reconocimiento de la señal, transducción químico-eléctrica y su posterior procesamiento (Krieger y Breer, 1999).

### 1.2.1. Receptores a odorantes y quimiotransducción.

Los sistemas olfatorios son capaces de detectar y diferenciar entre una gran cantidad de estímulos odorantes. De esta forma uno de los principales problemas a los que se enfrentan las neuronas receptoras olfativas, es el de codificar información cualitativa, cuantitativa y espacio-temporal concerniente a los olores o estímulos a los cuales están expuestas (Bruyne et al, 1999).

El reconocimiento y la conversión de los estímulos olfativos, inicia con la interacción de las moléculas odorantes con los receptores a odorantes que se encuentran en las membranas de las terminales dendríticas de las neuronas receptoras olfativas (ORNs por sus siglas en inglés), las cuales a su vez se encuentran en los órganos olfativos de cada organismo (Bruyne et al, 1999; Laurent, 1999).

*Drosophila* tiene dos órganos olfativos en su estado adulto. La antena, que contiene en su tercer segmento aproximadamente 500 pelos sensoriales (sensilas), los cuales se

dividen en tres clases morfológicas: sensilas basicónica, tricodea y celocónica (Figura 4). Cada sensila puede contener de dos a cuatro ORNs. En la pared de cada sensila existen poros que permiten el paso de los odorantes para que estos puedan estimular a las ORNs. El otro órgano olfativo en el adulto son los dos palpos maxilares, los cuales alojan 60 sensilas basicónicas cada uno. En total, existen en las antenas y en los palpos 1200 y 120 ORNs respectivamente (Carlson, 1996; Bruyne et al., 1999; Stocker, 2001).

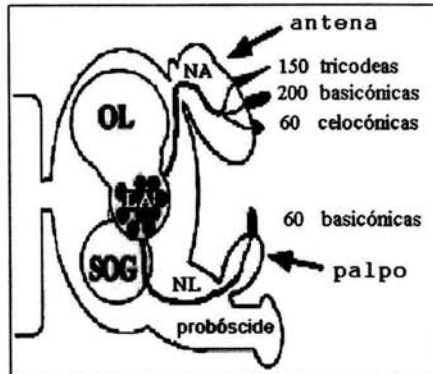


Figura 4. Representación esquemática del sistema olfativo de *Drosophila*, donde se muestran el tipo y número de sensilas en los dos órganos olfativos, y sus proyecciones hacia el SNC. LA, lóbulo de la antena; NA, nervio de la antena; NL, nervio labiomaxilar; OL, lóbulo óptico; SOG, ganglio subesofágico. (Tomado de Bruyne *et al.*, 1999).

La identidad molecular de los receptores olfativos fue resuelta por primera vez en los vertebrados, donde se demostró que estos receptores pertenecen a una familia de más de 1000 receptores a odorantes unidos a proteínas G, que se emplean en la discriminación olfativa (Bargmann, 1997; Krieger y Breer, 1999; Mombaerts, 1999).

Sin embargo, los invertebrados, como es el caso de *Caenorhabditis elegans* y de *Drosophila*, poseen una menor cantidad de receptores olfativos. Se han encontrado en el genoma de *C. elegans* poco más de 500 genes que codifican para quimiorreceptores unidos a proteínas G, pero lo más interesante es que una gran fracción de estos genes, se expresan en más de una ORN y en algunas células que no tienen funciones quimiosensoriales, aunque existen genes que se expresan exclusivamente en una neurona (Krieger y Breer, 1999). En *Drosophila* el número de receptores olfatorios acoplados a proteínas G es de alrededor de 60.

Las ORNs reciben la información química y posteriormente la convierten a una señal eléctrica. Una vez que las moléculas odorantes estimulan los receptores unidos a

proteínas G, las proteínas G inician una cascada de señales que puede ser de dos tipos principales dependiendo de la especie de organismo o bien del tipo celular; Al igual que ocurre en la visión, la proteína G activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), lo cual origina una molécula de diacilglicerol (DAG) y una molécula de inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) que a su vez funcionan como mensajeros intracelulares, activando canales iónicos en la membrana celular y generando un potencial de acción en el receptor (Krieger y Breer, 1999).

En la otra cascada de señalización, la proteína G actúa sobre la adenilato ciclasa que cataliza la formación del 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) a partir del 5'-trifosfato de adenosina (ATP), lo que también promueve la activación de canales iónicos (Krieger y Breer, 1999). Existen también evidencias de ORN en langostas donde la misma célula es capaz de responder a diferentes estímulos por medio de la cascada del IP<sub>3</sub> o del AMPc (Fadool y Ache, 1994).

### 1.3. El cerebro de *Drosophila*.

El cerebro de la mosca de la fruta está conformado por alrededor de 250,000 células. A pesar del relativamente pequeño número de células en el cerebro, la mosca es capaz de realizar tareas complejas como son la orientación (Giurfa y Menzel, 1997), el aprendizaje y la memoria (<http://flybrain.uni-freiburg.de/Flybrain/html/.com>).

Como ya se ha mencionado, en el cerebro de *Drosophila* existen dos lóbulos ópticos en los cuales se inicia el procesamiento de los estímulos visuales, y entre los cuales se localiza el cerebro central el cual recibe la información que se procesó de los sistemas visual y quimiorreceptor. Los lóbulos ópticos se localizan de manera adyacente a los ojos, y como ya se mencionó están constituidos por cuatro neuropilos: la lámina, la médula, la lóbula y la placa de la lóbula (figura 5).

El cerebro central consiste en los lóbulos antenales, los cuerpos setíferos o fungiformes y un complejo central.

Los lóbulos de las antenas forman parte del sistema olfativo. Estas estructuras globulares están constituidas de aproximadamente 40 glomérulos, que reciben la información de las fibras receptoras provenientes del tercer segmento de las antenas y de los palpos maxilares. Los lóbulos de las antenas están posicionados enfrente del cerebro y cercanos a la línea media (figura 5, en azul) (<http://flybrain.uni-freiburg.de/Flybrain/html/.com>).

Los cuerpos setíferos contienen 2,500 neuronas cada uno, y se han correlacionado con la función del aprendizaje y la memoria. Los cuerpos setíferos (figura 5, en café) están constituidos por el neuropilo del cáliz situado de manera posterodorsal en el protocerebro, el cáliz se extiende de manera anteroposterior subdividiéndose en el lóbulo dorsal que se extiende de manera ascendente, y en el lóbulo medio y central que se extienden en dirección de la línea media del cerebro (<http://flybrain.uni-freiburg.de/Flybrain/html/.com>).

El complejo central (figura 5, en verde), se sitúa en la parte media del cerebro arriba del esófago justo enfrente de la gran comisura. La gran comisura es el mayor tracto de fibras que une los dos hemisferios.

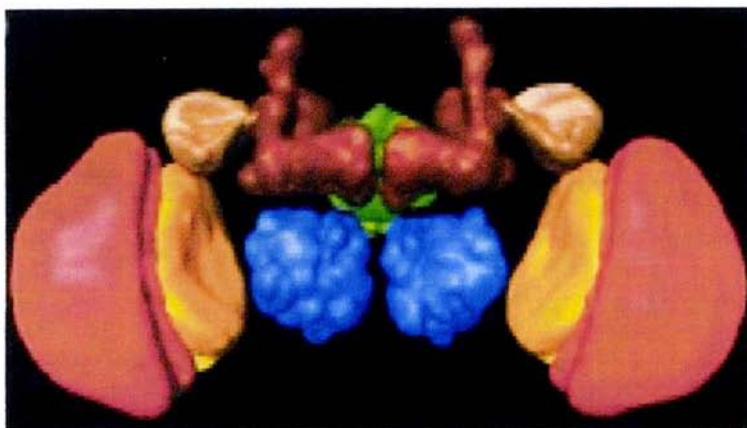


Figura 5. Reconstrucción tridimensional del cerebro de *Drosophila*. Rojo: médula; Naranja: lóbula; Amarillo: placa de la lóbula; Café oscuro: cuerpos setíferos; Café claro: cuernos laterales; Azul: lóbulos de las antenas; Verde: complejo central (Tomado de Rein et al., 2002).

#### 1.4. Las colinesterasas

En 1914 Sir Henry Dale postuló la existencia de una actividad enzimática responsable de finalizar la neurotransmisión mediada por acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas, enzima que posteriormente fue nombrada acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7., acetilcolin-hidrolasa, acetilcolin-acetilhidrolasa) (Taylor, 1991; Soreq et al., 1992). En 1932 se tuvo la primera evidencia de que existía otra enzima capaz de hidrolizar esteres de colina de manera similar a la AChE. Esta enzima se denominó butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8., BuChE, acilcolin-acilhidrolasa) debido a que esta enzima presenta menor afinidad por el neurotransmisor ACh y tiene gran afinidad por la butirilcolina. Para diferenciarlas se nombró colinesterasa verdadera o específica a la AChE (Darvesh et al., 2003). Aunque se creía que la BChE era una enzima no esencial, su estudio tuvo un gran auge en el campo de la anestesia por la introducción de relajantes musculares como la succinilcolina, durante las cirugías. Esto se debió al descubrimiento de que la BChE es la principal enzima encargada de terminar la acción de la succinilcolina y otros compuestos como el mivacurium (Darvesh et al., 2003).

Hoy en día diversas evidencias señalan que en los vertebrados la AChE no es la única encargada de mediar la neurotransmisión. Estudios con ratones “knock out” para el gen de la AChE y por lo tanto incapaces de producir AChE, han demostrado que los niveles de acetilcolina se mantienen en equilibrio gracias a la acción de la BChE, cosa opuesta a lo que pasa en ratones “knock out” para BChE; estos resultados demuestran que una de las funciones biológicas de la BChE es actuar como corregulador en la degradación de la ACh durante la neurotransmisión (Darvesh et al., 2003). Igualmente en vertebrados se ha propuesto que ambas enzimas, además de su función clásica como reguladoras de la transmisión colinérgica, tienen otras funciones. Diferentes autores han propuesto que ambas enzimas actúan como factores tróficos durante la proliferación y diferenciación celular del sistema nervioso (Toutant, 1989; Wolfgang y Forte, 1989; Sánchez-Chávez, 1990; Taylor, 1991; Salceda y Martínez, 1992; Appleyard, 1994; Sánchez-Chávez y Salceda, 2001; Darvesh et al., 2003).

También, se ha demostrado que las colinesterasas comparten un alto grado de homología con proteínas de adhesión celular como la neurotactina y la tiroglobulina, las cuales se asemejan a las colinesterasas excepto que carecen del sitio activo (Mori et al., 1987; Escalera et al., 1990; Scholl y Scheiffele, 2003).



En el caso de los insectos, la AChE ha sido el campo de interés de bioquímicos, toxicólogos y genetistas por las siguientes razones (Toutant, 1989):

- En algunos dípteros, la AChE presenta actividades específicas considerablemente altas lo que permite llevar a cabo diversos estudios bioquímicos.
- La AChE es el blanco de compuestos de organofosfatos y carbamatos, los cuales son dos tipos de poderosos inhibidores utilizados ampliamente como pesticidas.
- Gracias a la facilidad de estudiar mutaciones en *Drosophila*, se ha podido localizar el gen *Ace* que codifica para la AChE en el cromosoma 3 (Hall y Kankel, 1976), esto ha permitido estudios genéticos más precisos de los sistemas colinérgicos, y la clonación del gen.

Asimismo diversos trabajos parecen indicar que existe una sola colinesterasa con características compartidas entre la AChE y la BChE (Melanson, 1985; Gnagey et al., 1988).

#### **1.4.1. Propiedades catalíticas (especificidad a sustratos).**

La AChE y la BChE, también conocidas como colinesterasas (ChEs), son glicoproteínas del grupo de las esterasas de serina cuya función característica, como ya se ha indicado, es el hidrolizar ésteres de colina tales como la acetilcolina (Toutant, 1989; Sánchez-Chávez, 1990; Soreq et al., 1992; Brochier et al., 2001). Las colinesterasas pueden diferenciarse de otras esterasas no específicas (las cuales no usan ésteres de colina como sustrato óptimo), debido a que presentan inhibición por concentraciones de  $10^{-5}$  M de eserina (fisostigmina) (Toutant, 1989; Sánchez-Chávez, 1990).

Asimismo existen criterios farmacológicos para diferenciar entre la AChE y la BChE. Se ha visto que la AChE es típicamente inhibida por concentraciones de  $10^{-5}$  M de 1,5-bis (4-alil-dimetil-amonio-fenil) pentan-3-uno-dibromuro (BW284c51), mientras que la BChE es sensible a concentraciones de  $10^{-5}$  M de tetra-isopropil-pirofosforamida (iso-OMPA) (Toutant, 1989; Sánchez-Chávez, 1990). Además, la AChE presenta inhibición por altas concentraciones de sustrato e hidroliza específicamente a la ACh o su análogo acetiltiocolina (AcSCh o ATCh), pero hidroliza de manera menos eficiente a la propionilcolina (PrCh) y a la propioniltiocolina (PrSCh), y aún en menor grado a la butirilcolina (BuCh) (Toutant, 1989). La BChE utiliza como sustrato específico la BuCh o a

su análogo la butiriltocolina (BuSCh o BTCh). La BChE además es capaz de degradar a una gran variedad de esteres de colina y aunque no hay evidencia de que presente inhibición por sustratos (Toutant, 1989; Soreq et al., 1992), la concentración y el tipo de sustrato óptimo varía entre especies (Toutant, 1989).

Se ha visto que en extractos crudos de diferentes insectos, existe una diferencia en la actividad de hidrólisis de ACh, lo que indica que hay una notable diferencia en el contenido total de ChEs. Esto parece estar relacionado con la conducta de cada organismo, ya que se ha observado que el nivel de actividad de la AChE es alto en el cerebro de la abeja y el ganglio ventral de la cucaracha, pero el nivel de actividad es bajo en hemípteros, coleópteros y lepidópteros. De acuerdo con Toutant (1989), la amplitud de las variaciones en las actividades específicas de las distintas especies es probablemente mayor a 20 veces.

Melanson *et al.* (1985) concluyó que el 95% de la hidrólisis de la ACh en *Drosophila*, es debida únicamente a la actividad de AChE; Sin embargo, se ha postulado que la AChE de invertebrados posee una especificidad a sustratos intermedia entre la AChE y la BChE de mamíferos (Gnagey et al., 1986; Toutant, 1989).

#### 1.4.2. Sitios activos.

El sitio activo de las colinesterasas se localiza al fondo de una garganta y está formado por dos subsitios: un subsitio aniónico constituido por un residuo de triptofano cuya función consiste en unirse al nitrógeno cuaternario de la colina, y un subsitio de unión a ester que se encuentra en el fondo del sitio activo y que es donde se lleva acabo la reacción catalítica (Figura 6) (Sánchez-Chávez, 1990; Taylor, 1991; Marcel et al., 2000; Brochier et al., 2001; Darvesh et al., 2003). Por experimentos de mutagénesis dirigida a sitios específicos, se han encontrado los residuos de aminoácidos relacionados con la actividad catalítica y los sitios de unión de los inhibidores; esto ha demostrado que el sitio catalítico (subsitio de unión a esteres) está formado por una tríada compuesta por serina, histidina y un residuo ácido que es glutamato (en muchas otras esterasas de serina como es el caso de la tripsina, el residuo ácido es por lo general aspartato) (Taylor, 1991; Soreq et al., 1992; Soreq y Seidman, 2001; Darvesh et al., 2003).

Existe otro subsitio de unión a sustratos e inhibidores, el cual es periférico y se localiza a la entrada del sitio activo (Figura 6) (Soreq et al., 1992; Brochier et al., 2001; Darvesh et al., 2003); se ha demostrado que este subsitio es el que le confiere a las colinesterasas algunas de las propiedades que son diferentes a las de la hidrólisis de la ACh.

Layer y Small (citados en Soreq y Seidman, 2001) demostraron que la neurogénesis no se ve afectada cuando se inhibe el sitio activo de las ChEs, sin embargo el tratamiento con un inhibidor que actúa sobre el subsitio periférico disminuye la neurogénesis.

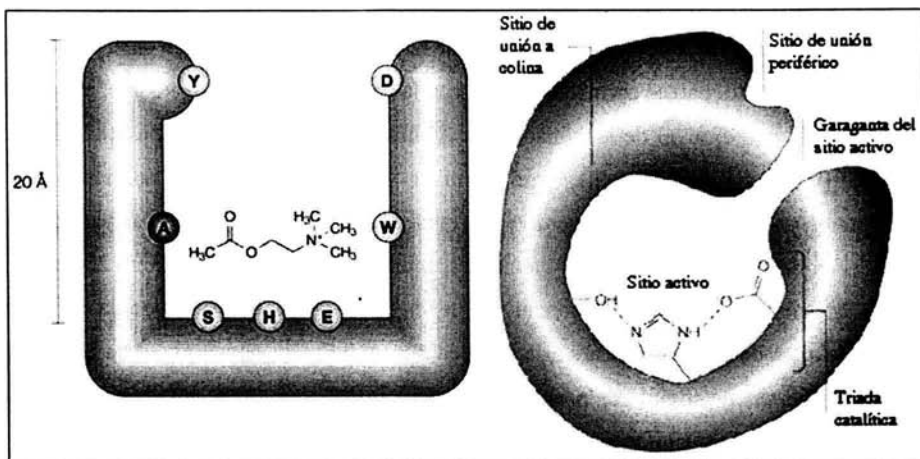


Figura 6. Por cristalografía de rayos X, se ha determinado que el sitio activo de las colinesteras se encuentra formado por una tríada (subsitio catalítico) formada por los residuos de serina (S), histidina (H) y contrario a las demás hidrolasas de serina, un glutamato (E). Además existe un subsitio aniónico constituido por un triptofano (W), al cual se une el nitrógeno cuaternario de la colina. Los sustratos son guiados al fondo de la garganta del sitio activo por las interacciones con los residuos de ácido aspártico (D) y tirosina (Y) que se encuentran en la entrada de la garganta. A la derecha, se señalan las partes que conforman la garganta del sitio activo así como el sitio de unión periférico [Tomado de Darvesh et al., 2003 (izquierda); Soreq y Seidman, 2001 (derecha)].

Así bien, la reacción catalítica de la enzima se lleva a cabo de la siguiente manera: el nitrógeno cuaternario de la ACh cargado positivamente, se une con el triptofano del subsitio aniónico (que presenta una carga negativa), posteriormente el grupo hidroxilo de la serina de la tríada del sitio activo reacciona con el acetato, separando así a la colina del resto de la molécula sustrato y liberándola al medio (en este proceso la enzima es acetilada). El siguiente paso es la liberación del producto, para lo cual es necesaria la adición de una molécula de agua que desacetila a la enzima y da como resultado la formación de una molécula de ácido acético (Figura 7) (Toutant, 1989; Sánchez-Chávez, 1990; Taylor, 1991; Soreq et al., 1992; Soreq y Seidman, 2001; Darvesh et al., 2003).

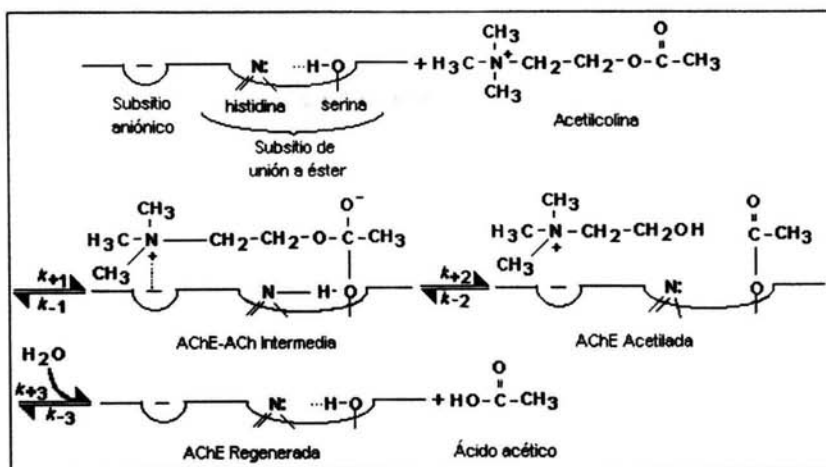


Figura 7. Representación esquemática de la hidrólisis de la AChE.  $k_1$ : interacciones alostéricas de la colina con el subsitio aniónico,  $k_2$ : la AChE es acetilada liberando a la colina,  $k_3$ : una molécula de agua conlleva a la regeneración de la AChE y a la formación de ácido acético (Modificado de Toutant, 1989).

### 1.4.3. Formas moleculares.

En vertebrados las ChEs se presentan en seis formas moleculares diferentes, que a su vez se clasifican en globulares y asimétricas; estas últimas pueden presentar uno, dos o tres tetrámeros de la subunidad catalítica, y además se encuentran unidas a una cola con naturaleza similar a la colágena (Figura 8) (Toutant, 1989; Sánchez-Chávez, 1990; Taylor, 1991; Massoulié et al., 1991; Massoulié et al., 1992; Darvesh et al., 2003). No obstante en invertebrados no hay evidencias de la existencia de formas asimétricas.

Las formas globulares son solubles en soluciones de baja fuerza iónica, y pueden ser de tres tipos dependiendo del número de subunidades catalíticas: el monómero G1 (4S; PM 70,000), el dímero G2 (6S; PM 165,000) y el tetrámero G4 (11S; PM 331,000); y para formar los dímeros y los tetrámeros las subunidades catalíticas se unen entre sí por medio de puentes disulfuro (Toutant, 1989; Sánchez-Chávez, 1990; Massoulié et al., 1991; Taylor, 1991; Darvesh et al., 2003).

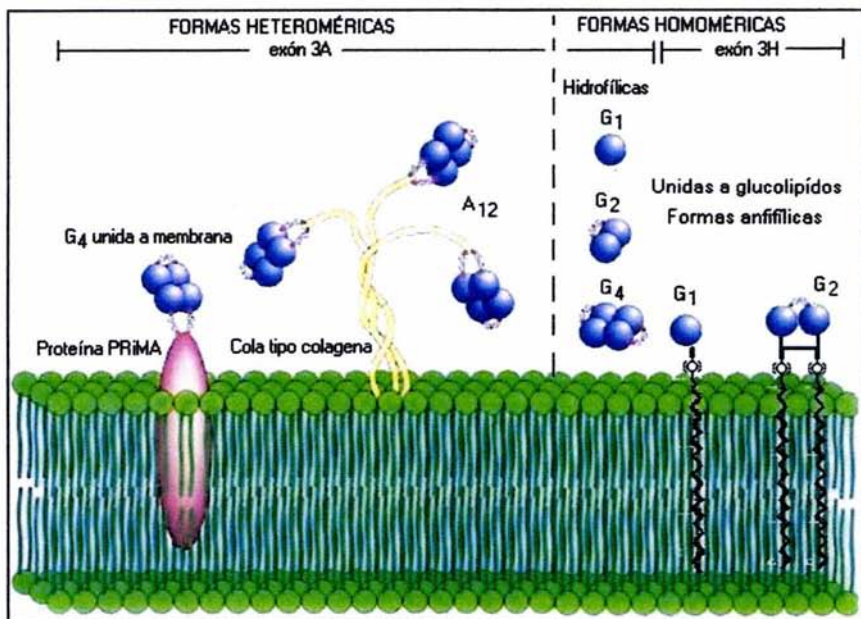


Figura 8. Formas moleculares de las ChEs. Las formas globulares se denominan G1, G2 y G4 dependiendo del número de subunidades catalíticas que las constituyen; cada una de estas formas puede ser procesada postranscripcionalmente de manera alternativa dependiendo de su extremo carboxilo. Algunas formas asimétricas (A) están unidas a una cola tipo colágena que las mantiene ancladas a la matriz extracelular (Modificado de Darvesh et al., 2003).

Tanto en vertebrados como en invertebrados existen formas globulares con propiedades anfílicas, las cuales son monómeros o dímeros (G<sub>1m</sub> y G<sub>2m</sub> respectivamente; la letra "m" hace referencia a que están unidas a la membrana) de la subunidad catalítica, que son procesados postranscripcionalmente en el aparato de Golgi, donde las subunidades catalíticas se unen a un dominio hidrofóbico formado por un glucosfolípido; este dominio mantiene a la molécula unida a la membrana celular. También se han podido encontrar moléculas anfílicas que son secretadas al medio extracelular (Massoulié et al., 1991). Igualmente, en vertebrados se ha visto que las formas G<sub>4</sub> también pueden presentarse como formas asimétricas con propiedades anfílicas. En este caso el tetrámero se encuentra unido a la membrana por proteínas de anclaje (figura 8); dichas proteínas son conocidas como proteínas de anclaje a la membrana ricas en prolina (algunos autores las han nombrado PRiMA, por sus siglas en inglés), y son subunidades hidrofóbicas no catalíticas de aproximadamente 20 kDa (Massoulié et al., 1991; Perrier et al., 2002; Darvesh et al., 2003).

No obstante, en invertebrados no existen evidencias de la presencia de las formas G4 unidas o no a la proteína PRiMA.

En el caso de los dípteros como *Drosophila*, se sabe que la mayor cantidad de la enzima se encuentra en forma G2<sub>m</sub>, aunque también existen las formas G1 y G2 hidrofílicas, y la forma G1<sub>m</sub> pero en una menor proporción (Gnagey et al., 1987; Fournier et al., 1987; Toutant et al., 1988; Toutant, 1989).

#### **1.4.4. Biosíntesis y secreción.**

La AChE y la BChE de vertebrados son codificadas cada una por un gen, el cual por procesamiento alternativo de mRNA y por modificaciones postraduccionales, produce las diferentes formas moleculares (Sánchez-Chávez, 1990; Taylor, 1991; Vallette et al., 1991). En *Drosophila* la AChE está codificada por un solo gen (*Ace*). El gen *Ace* tiene una longitud de 30629 nucleótidos y se encuentra en el segmento 87E2-87E3 (<http://flybase.bio.indiana.edu:82/>) del brazo derecho del tercer cromosoma (Hall y Kankel, 1976).

El gen *Ace* codifica para una proteína precursora cuyo peso es de 70 kDa que durante su modificación produce dos polipeptidos (55 kDa y 16 kDa respectivamente e inicialmente se encuentran unidos de manera no covalente) (Gnagey et al., 1987; Fournier et al., 1988; Mutero y Fournier, 1991). El polipéptido de 16 kDa contiene el extremo amino de la molécula inicial, mientras que el de 55 kDa contiene el extremo carboxilo (sitio de unión al glucolípido de anclaje a la membrana), el sitio activo, y la cisteína involucrada en el anclaje por puentes disulfuro entre las subunidades que forman los dímeros G2 (Fournier et al., 1988; Toutant 1989; Mutero y Fournier, 1991).

El sitio hipotético para la ruptura proteolítica encargada de generar los fragmentos de 16 kDa y 55 kDa, se localiza en la secuencia de residuos de aminoácido 148-180, y no es una secuencia homóloga a la de vertebrados (Fournier et al., 1988; Toutant 1989; Mutero y Fournier, 1991). No obstante, se considera que la proteólisis de las diferentes formas moleculares de la enzima, se lleva a cabo de manera postraducciona y después de la unión a los glucolípidos.

#### **1.4.5. Localización celular y tisular de la AChE en invertebrados.**

En los dípteros, la zona de mayor actividad enzimática de ChEs está concentrada en la cabeza (65-90%) y el tórax (Toutant, 1989).

Diversos estudios muestran una localización preferencial de la AChE en los neurópilos del sistema nervioso central y menos frecuentemente en los cuerpos celulares de las neuronas aunque ninguno de estos estudios ha confirmado la presencia de la BChE en una gran variedad de invertebrados (Toutant, 1989). Así bien, en *Drosophila* se ha podido localizar actividad de la AChE en el ganglio metatorácico y en el cerebro (Hall y Kankel, 1976); específicamente en la lámina y la médula del lóbulo óptico, así como en los lóbulos de las antenas y en los tractos glomerulares de las antenas (Toutant, 1989).

Con el uso de anticuerpos monoclonales, Wolfang y Forte (1989) demostraron la presencia de AChE durante el desarrollo del sistema visual de *Drosophila* (principalmente en células de la retina). Además observaron que hay una acumulación bifásica de la AChE durante el desarrollo del sistema visual, la enzima se expresa primero en las células de la retina, y una vez diferenciada ésta la proporción de la enzima disminuye y comienza a acumularse en los lóbulos ópticos.

Resulta interesante que el patrón de expresión de la acetilcolintransferasa (enzima encargada de la síntesis de ACh) en *Drosophila*, es muy similar al que presenta la AChE (Toutant, 1989).

En estudios con mutaciones del gen *Ace* usando mosaicos genéticos, se demostró la ausencia del transitorio *off* en el electroretinograma, lo que indica que la transmisión sináptica es anormal (Toutant, 1989).

Sabiendo que la acetilcolina es uno de los principales neurotransmisores del cerebro de la mosca y la AChE es importante en el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) y del sistema visual, es importante estudiar la actividad de esta enzima en el SNC de moscas silvestres y con mutaciones sensoriales.

## II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

### Hipótesis

Las mutantes sensoriales de *Drosophila* pueden presentar cambios en la actividad de AChE, lo cual posiblemente refleja alteraciones en la neurotransmisión colinérgica.

### Objetivos.

Determinar las características cinéticas y el efecto de inhibidores específicos en la actividad de la AChE en *Drosophila*.

Determinar la actividad de la AChE en diferentes cepas mutantes de *Drosophila*, utilizando los sustratos e inhibidores específicos caracterizados en las colinesterasas de vertebrados.

Determinar por métodos histoquímicos la actividad de las colinesterasas en cepas mutantes y silvestres de *Drosophila*.



### III. Métodos

#### 3.1. Animales.

Diferentes cepas de *Drosophila* fueron cultivadas en el laboratorio en frascos con piloncillo, agar, levadura y grenetina; fueron mantenidas a 25° C en una humedad relativa del 50% ó a temperatura ambiente.

Se utilizaron dos cepas silvestres de *Drosophila* (*yw* y *ORR*) y las siguientes mutantes:

- Cepa mutante *norPA*.

El producto proteico codificado por el gen *norPA* es la PLC de tipo  $\beta$ , la cual se encarga de hidrolizar el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato originando una molécula de diacilglicerol (DAG) y una molécula de inositol 1,4,5 trifosfato ( $IP_3$ ); compuestos que funcionan como mensajeros intracelulares tanto en la fototransducción como en la quimiotransducción. El fenotipo de la mutante del gen *norPA* se identificó por sus defectos electrofisiológicos y conductuales (Riesgo-Escovar et al., 1995; Carlson, 1996; Krieger y Breer, 1999).

- Cepas nanahuatzin (*nana*): *nana<sup>l</sup>* y *nana<sup>lb</sup>*.

Las cepas mutantes *nana<sup>l</sup>* y *nana<sup>lb</sup>* fueron obtenidas a partir de una inserción de un transposón (conocido como elemento P) en el gen que codifica para una acil glicerol 3-P-aciltransferasa, enzima que se encarga de agregar una segunda cadena de ácido graso a un lisofosfolípido, dando como resultado un fosfolípido. La actividad de esta enzima es 50 % menor que la de la cepa silvestre (Riesgo-Escovar et al. no publicado). Experimentos de hibridación *in situ* han mostrado que este gen se expresa en fotorreceptores y neuronas olfatorias. El electroretinograma (ERG) muestra una reducción importante, lo cual implica que la neurotransmisión entre los fotorreceptores y las primeras interneuronas está disminuida o no existe, esto correlaciona con las pruebas conductuales (Riesgo-Escovar et al. no publicado).

- Cepa *nana<sup>rev13</sup>*.

La cepa *nana<sup>rev13</sup>* es una revertiente de la mutante *nana<sup>l</sup>*. En este caso se hizo saltar al elemento P de manera limpia, y el gen quedó intacto. Las pruebas de comportamiento, las de actividad bioquímica, así como los electroretinogramas, muestran que la función visual y la actividad enzimática de la acil glicerol 3-P-aciltransferasa se han restablecido en esta cepa.

- Ceba *chico*.

El gen *chico* codifica para una proteína adaptadora que participa en la activación del receptor de insulina (INR), esta proteína es homóloga al sustrato del receptor de insulina (IRS) de vertebrados, y juega un papel crucial en el control del tamaño corporal, interviniendo en el crecimiento y proliferación celular (Böhni et al., 1999; Brogiolo et al., 2001; Oldham, 2002). La mutante homocigota para el gen *chico* (*chico*<sup>-/-</sup>) presenta alteraciones visuales, que se reflejan en una disminución importante de la amplitud del potencial del receptor en el ERG; Sin embargo, la mutante heterociga para el gen *chico* (*chico*/CyO) se comporta como la cepa silvestre. Por lo anterior se puede considerar a la mutante *chico*<sup>-/-</sup> como un modelo de estudio de la diabetes.

Pacientes diabéticos y modelos animales de esta enfermedad presentan complicaciones secundarias que incluyen diversas neuropatías, las cuales se caracterizan por presentar una gran variedad de cambios asociados con una disminución en la actividad sensorial y motora de los organismos (Suhail y Rizvi, 1989).

- Ceba *Ace*.

El gen *Ace* como ya se mencionó, codifica para la AChE; la mutante heterociga para este gen es viable en condiciones óptimas, pero en condiciones de estrés las mutantes son poco resistentes debido a que esta cepa no es capaz de producir una mayor cantidad de AChE. Mutantes homocigotas para este gen son letales (Hall y Kankel, 1976).

### 3.2. Determinación bioquímica de AChE.

Para las determinaciones de la actividad de la AChE se hicieron lotes de 6 a 9 moscas, las cuales se adormecieron en un refrigerador a 4 °C por 10 minutos, y después se colocaron en cajas de petri sobre hielo y se decapitaron con pinzas. Las cabezas de las moscas se colocaron en tubos pequeños y se guardaron a una temperatura de -70 °C de 3 a 15 días.

Las cabezas se homogenizaron en 100µl de una solución buffer (Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, NaCl 1 M, pH 7.0) y 10µl de un coctel de antiproteínaeolíticos (1 mM de EGTA, 1 mg/ml de bacitracina, 2 mM de benzamidina, 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina de soya, 10 µg/ml de pepstatina, 20 U/ml de aprotinina y 20 µg/ml de leupeptina); la homogenización se llevó a cabo en hielo, en un tubo eppendorf con un pistón de plástico a 480 rpm. Las muestras se congelaron a -70 °C hasta la determinación de la actividad enzimática.

La actividad de la AChE se determinó por el método de Ellman et al (1961) modificado para microplacas. El método utiliza acetiltiocolina (AcSCh) ó butiriltiocolina (BuSCh) como sustratos específicos para la AChE y BChE, respectivamente. La reacción se lleva a cabo en dos pasos: primero la AcSCh es hidrolizada por la AChE formando ácido acético y tiocolina reducida. Esta reacciona con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) que se oxida a 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina y finalmente es reducido al 5-tio-2-nitrobenzoato, anión amarillo cuya absorbencia se puede medir a 410 nm.

Para medir la actividad de AChE se tomaron 5 µl del homogenado a los cuales se les agregaron 45 µl de buffer de homogenización, 200 µl de una mezcla de reacción que contiene buffer fosfato de Na 100 mM pH 7.5, 450 µM de DTNB y Tritón X-100 a una concentración final de 0.05 %. Se preincubó a temperatura ambiente durante 30 min., se agregó el sustrato AcSCh o BuSCh según el caso a una concentración final de 1 mM, y la actividad se siguió a 37 °C durante 10 min. a 410 nm en un lector de microplacas CERES UV 900C BIO-TEK Instruments Inc.

La actividad específica de cada reacción enzimática se determinó por la adición al sistema de incubación de los inhibidores específicos de AChE y BChE, BW 248c51 (15 µM) y iso-OMPA (75 µM). Todas las muestras se midieron por duplicado.

### **3.3. Determinación de proteínas.**

La concentración de proteína en las muestras se determinó por el método de Lowry et al. (1951), utilizando un sistema de reactivos de Bio-Rad, con albúmina de suero bovino como estándar.

### **3.4. Determinación histoquímica de AChE.**

Las cabezas de las moscas se fijaron por dos procedimientos: 1) Las moscas vivas se congelaron a -20 °C de 20 a 30 min., se decapitaron y las cabezas se mantuvieron a -70 °C por una hora. Posteriormente se incluyeron en Tissue-Tek durante 15 min. a -70 °C, y se cortaron. 2) Las cabezas se fijaron en paraformaldehído 4% (PFA) / buffer fosfatos salinos 0.1 M, pH 7.4 (PBS) por 15 min. Luego se añadió Tween 20 al 0.1% y se fijó por 30 min. adicionales. Se hicieron 2 lavados de 10 min. cada uno en una solución de PBS /

Tween al 0.1% (PBST). Las cabezas se embebieron en Tissue-Tek y se hicieron cortes por congelación, de 6 a 10  $\mu\text{m}$  de grosor, en un CRYOTOME 620 de Anglia Scientific.

Los cortes se montaron en laminillas tratadas con Poly-L-lisina. Posteriormente se pusieron a secar las laminillas a 60° C por 30 min. Los cortes se postfijaron en PFA 4% / PBST por 10 min., se lavaron con el mismo buffer y se guardaron en refrigeración a 4° C.

Los cortes se procesaron siguiendo la técnica histoquímica de colinesterasas de Karnovsky y Roots (1964). Las laminillas con los cortes se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en 2 ml de una solución que contenía: AcSCh o BuSCh, 0.1 M de citrato de sodio, 30 mM de sulfato de cobre, 5 mM de ferricianuro de potasio, en un buffer de fosfato de sodio 0.1 M a pH 6.0. La actividad específica se identificó añadiendo al medio de incubación 0.1 mM de iso-OMPA y/o 0.01 mM de BW 284c51. Al finalizar la incubación, las muestras se lavaron con agua desionizada y se montaron con cubreobjetos utilizando gelatina glicerizada. Paralelamente se realizaron incubaciones sin el sustrato (controles negativos).

La reacción utiliza la hidrólisis de AcSCh por la AChE formando ácido acético y tiocolina reducida. La tiocolina reducida se oxida reduciendo el ferricianuro en ferrocianuro. Este último se combina con iones de cobre para formar ferrocianuro de cobre, de color pardo rojizo e insoluble. Este compuesto se denomina Hatchett's Brown (pardo de Hatchett). El cobre actúa como agente quelante y por ello se compleja con citrato para evitar la formación de ferricianuro de cobre (Sánchez-Chávez, 1990).

Los cortes se observaron en un microscopio óptico Nikon ALPHAPHOT YS, y las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon DXM1200.

### **3.5. Métodos estadísticos.**

La actividad de la AChE en las diferentes cepas se comparó por medio de una prueba de *t* de *student*.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Cinética enzimática.

Para conocer la cinética de la AChE en *Drosophila* se utilizó la cepa silvestre *yw*. La actividad de la enzima en función de la concentración de sustrato (0.03-1.5 mM de AcSCh y BuSCh respectivamente) presentó una curva de saturación Michaeliana (figura 9). La actividad para ambos sustratos se inhibió completamente en presencia de BW284c51. La gráfica de Eddie-Hofstee muestra una afinidad aparente ( $K_{m,app}$ ) de 160  $\mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de 6.8  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína, para el sustrato AcSCh (Figura 10). En presencia de (iso-OMPA 50  $\mu\text{M}$ ) se observó una  $K_{m,app}$  de 340  $\mu\text{M}$  y  $V_{max}$  de 4.1  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

La actividad para BuSCh mostró un valor de  $K_{m,app}$  de 400  $\mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de 4.2  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

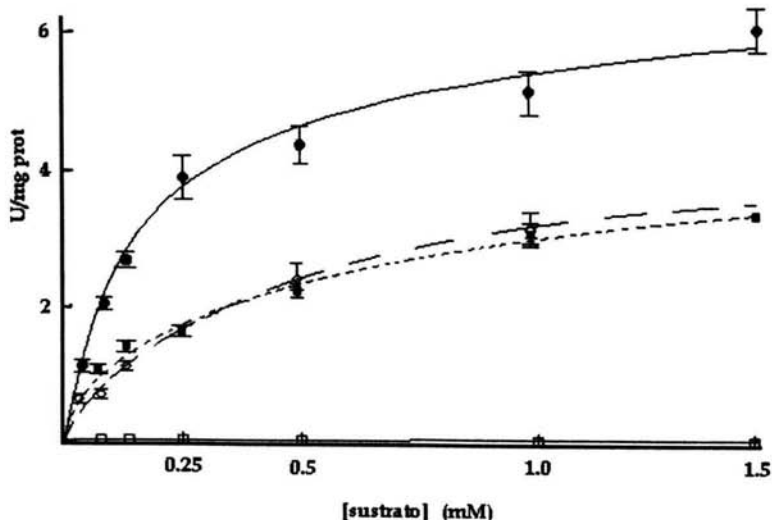


Figura 9. La velocidad de hidrólisis de las ChEs en la cepa *yw*, se graficó contra diferentes concentraciones (0.03-1.5 mM) de AcSCh y BuSCh. AcSCh (círculos negros), AcSCh más iso-OMPA 50  $\mu\text{M}$  (círculos blancos), BuSCh (cuadrados negros) y BuSCh más BW284c51 10  $\mu\text{M}$  (cuadrados blancos). Cada punto es el promedio de por lo menos 3 experimentos individuales  $\pm$  el error estándar.

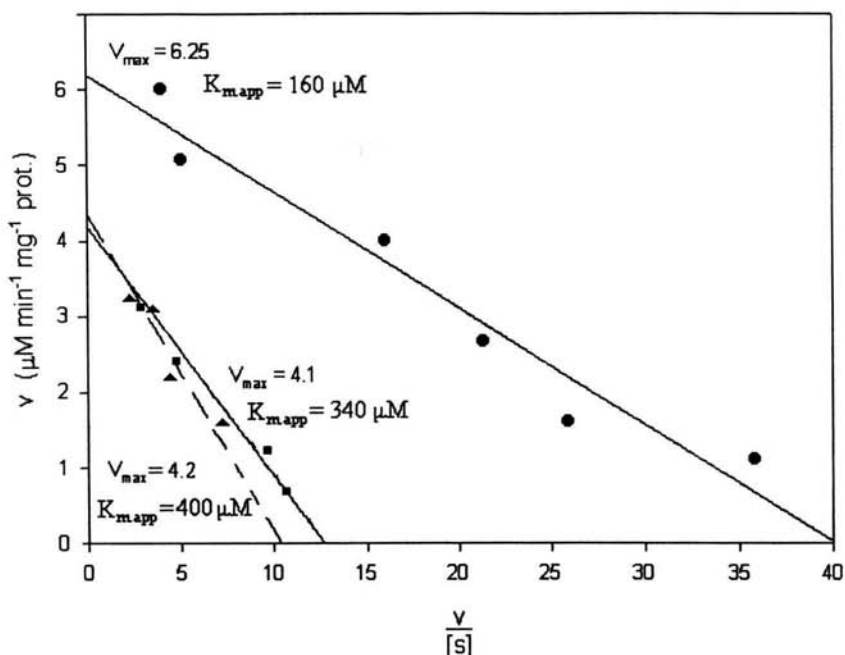


Figura 10. Gráfica de Eddie-Hofstee. Los datos se tomaron de la figura 8. AcSCh (círculos), AcSCh en presencia de iso-OMPA (cuadrados) y BuSCh (triángulos).

#### 4.2. Actividad de AChE en mutantes sensoriales.

La actividad de la AChE no mostró diferencias entre las cepas silvestres estudiadas. Como se muestra en la tabla I, no existe diferencia significativa en la actividad de la AChE entre las cepas mutantes y las silvestres, al usar AcSCh como sustrato. Esta actividad se inhibió en un 30-35 % por iso-OMPA en la mayoría de las cepas (tabla 1). Sin embargo la mutante *Ace* presenta una inhibición mayor, y aunque no se pudo medir la actividad total en la cepa *chico*, la actividad en presencia de iso-OMPA es significativamente menor a la que presentan las cepas silvestres (tabla I).

La actividad de AChE determinada con BuSCh fue similar en todas las cepas estudiadas (figura 11) y se inhibió totalmente en presencia de BW284c51. La actividad de AChE utilizando BuSCh es 30 % menor que para AcSCh; esta actividad disminuyó en un 30 % en presencia de iso-OMPA en las cepas silvestres y 50 % en las mutantes estudiadas.

La actividad de la enzima en la mutante *Ace* presentó una mayor sensibilidad para el iso-OMPA (inhibición del 60 %).

TABLA I

Actividad de AChE en diferentes cepas de *Drosophila*

CEPA	Actividad ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína)	
	AcSCh	AcSCh + iso-OMPA
<i>ORR</i>	$4.410 \pm 0.250$	$3.070 \pm 0.210$ ●
<i>yw</i>	$4.870 \pm 0.278$	$3.082 \pm 0.189$ ●
<i>norpA</i>	$4.678 \pm 0.184$	$3.212 \pm 0.236$ ●
<i>nana</i> <sup>1</sup>	$5.451 \pm 0.316$	$3.123 \pm 0.225$ ●
<i>nana</i> <sup>1b</sup>	$4.108 \pm 0.451$	$3.301 \pm 0.251$ ●
<i>nana</i> <sup>rev13</sup>	$4.800 \pm 0.475$	$2.870 \pm 0.394$ ●
<i>chico / CyO</i>	$3.992 \pm 0.690$	$2.315 \pm 0.298$ ●
<i>chico</i> <sup>-/-</sup>	nd	$1.638 \pm 0.163$ *
<i>Ace</i>	$4.466 \pm 0.181$	$2.023 \pm 0.05$ * ●

La actividad de AChE en diferentes cepas de *Drosophila* se midió como se describe en materiales y métodos. Los experimentos se realizaron con acetiltiocolina 1 mM en ausencia y presencia de iso-OMPA. Cada dato es el promedio  $\pm$  el error estándar. n = 4 – 12. (\*); diferencia contra el control con una  $p < 0.01$ . (●); diferencia contra la actividad total de la misma cepa con una  $p < 0.05$ . nd; no determinado.

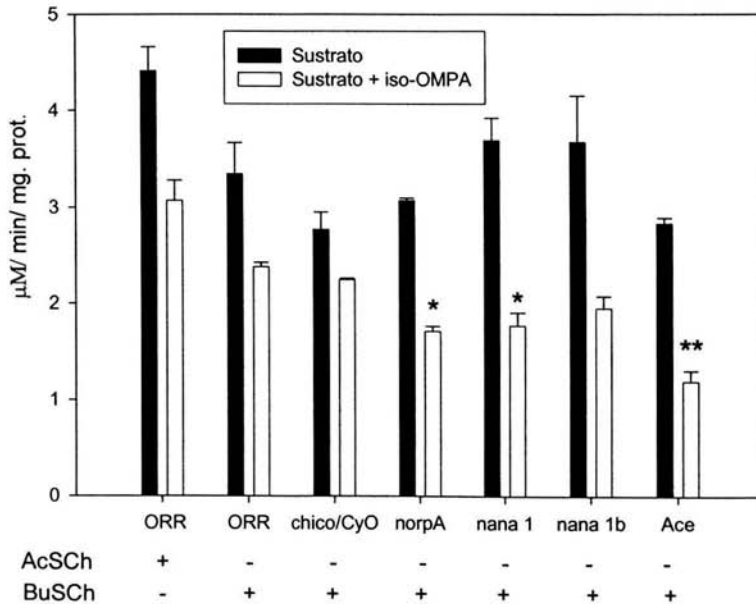


Figura 11. La actividad de las ChEs con 1 mM de AcSCh o BuSCh, en presencia (barras negras) y ausencia (barras blancas) de iso-OMPA 50  $\mu\text{M}$  en diferentes cepas de *Drosophila*, se determinó como se describe en materiales y métodos. Los datos son el promedio  $\pm$  el error estándar de por lo menos tres experimentos. (\*); diferencia significativa contra el control con una  $p < 0.05$ . (\*\*); diferencia significativa contra el control con una  $p < 0.01$ .

### 4.3. Histoquímica de la AChE.

La actividad de AChE en cabezas de *Drosophila* se estudió histoquímicamente en diferentes mutantes sensoriales. La estimación de la intensidad de la coloración del producto de la reacción se estimó de manera cualitativa por la observación de cortes de 5-10 cabezas por cepa, tomando como control la incubación sin sustrato y la coloración obtenida en las cepas silvestres (tabla II).

Como se observa en la figura 12, la coloración que presenta el cerebro de las cepas silvestres incubadas en AcSCh o BuSCh es evidente en comparación con los cortes incubados sin sustrato. Dado que la cepa *yw* carece de pigmentación en los ojos a diferencia de las otras cepas incluida la *ORR*, los cortes de esta cepa incubados sin sustrato se muestran totalmente transparentes (figura 12 A); esto permite que se pueda comparar entre el color formado por la reacción de la AChE en presencia de los sustratos, y los cortes que se incubaron sin estos. Así se determinó que los pigmentos de los ojos (en las cepas que los presentan, ejemplo *ORR*), no interfiere con la coloración obtenida por el producto de reacción.

TABLA II  
Histoquímica de colinesterasas en diferentes cepas de *Drosophila*

Cepa	Sin sustrato	AcSCh	AcSCh + iso-OMPA	AcSCh + BW	AcSCh + iso-OMPA +BW	BuSCh	BuSCh + Iso-OMPA	BuSCh + BW	BuSCh + Iso-OMPA + BW
<i>ORR</i>	0	+	+/-	0	0	nd	nd	0	nd
<i>yw</i>	0	+	+/-	-	-	+	nd	+/-	+/-
<i>norpA</i>	0	+	+/-	-	nd	+/-	+/-	nd	nd
<i>nana<sup>1</sup></i>	0	nd	+/-	0	0	nd	+/-	0	0
<i>nana<sup>1b</sup></i>	0	nd	+/-	-	+/-	nd	+/-	-	0
<i>nana<sup>rev13</sup></i>	0	nd	+	-	+/-	nd	+	+/-	+/-

La actividad de las colinesterasas se interpretó de acuerdo a la intensidad del producto: (0) intensidad ausente; (-) intensidad apenas tenue; (+/-) intensidad moderada; (+) intensidad marcada. nd: no determinado.

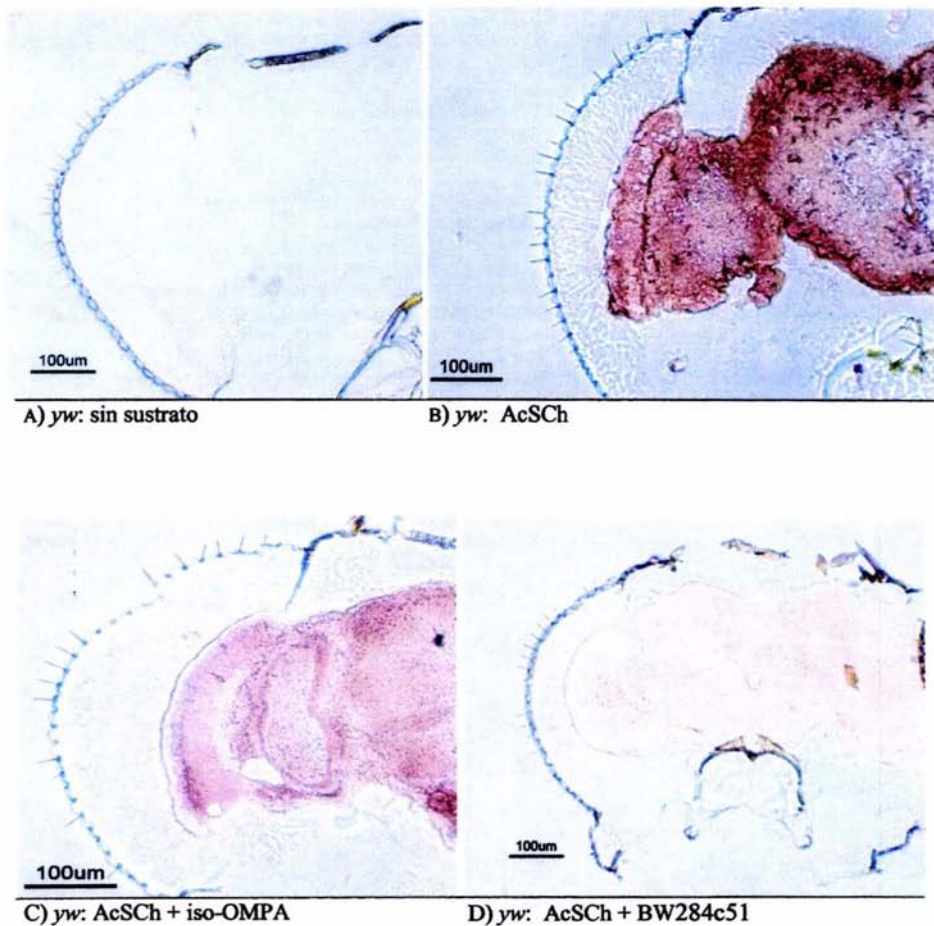
En las cepas *yw* y *ORR* se observó que la AChE se encuentra distribuida homogéneamente en todas las áreas del cerebro. Además en algunos cortes se pudo constatar la presencia de las ChEs en las antenas; no obstante, en las células de la retina no se encontró actividad. Sin embargo, en la lámina que es donde se encuentran las

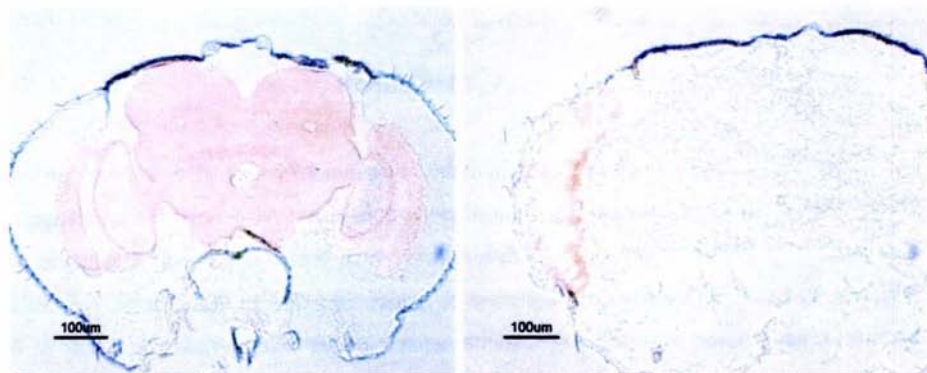


primeras sinapsis entre los fotorreceptores y el cerebro, se observó una marcada actividad (figura 12 B). Esta actividad disminuyó en presencia de iso-OMPA (figura 12 C). Resultados similares se observaron en las mutantes (figura 12 G y H; tabla II).

Los cortes de la cepa silvestre incubados con AcSCh o BuSCh en presencia de BW284c51 mostraron muy baja actividad (figura 12 D y E).

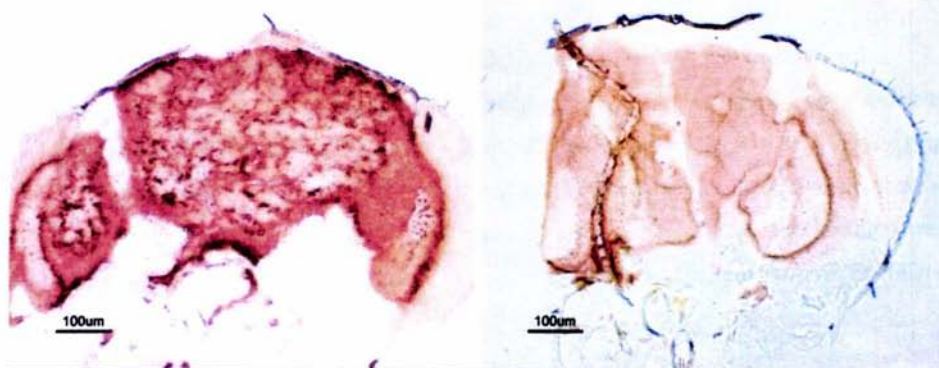
Resultados semejantes se observaron en los dos tipos de fijación empleados, sin embargo en el pretratamiento sin PFA el tejido quedó mejor preservado.





E) *yw*: BuSCh + BW284c51

F) *norpA*: Sin sustrato



G) *norpA*: AcSCh

H) *norpA*: AcSCh + iso-OMPA

Figura 12. La determinación de la actividad de la ChEs por métodos histoquímicos se realizó como se describe en materiales y métodos. La coloración que presentaron las cepas *yw* y *ORR* se tomó como control, y la actividad de las diferentes cepas mutantes se comparó con ésta.

## V. DISCUSIÓN

La AChE es una enzima ampliamente distribuida en el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados, que elimina al neurotransmisor ACh del espacio sináptico. Esta enzima es altamente específica para hidrolizar ACh y es inhibida selectivamente por BW284c51. La BChE o pseudocolinesterasa es una enzima que en vertebrados, colocaliza muchas ocasiones con la AChE, no obstante, existen pocos invertebrados en donde se ha postulado la presencia de esta enzima (Chatonnet y Lockdrige, 1989; Toutant, 1989). La BChE hidroliza preferentemente BuCh y es inhibida por iso-OMPA. La actividad de estas enzimas varía en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.

En *Drosophila*, la actividad de AChE se ha correlacionado con el desarrollo del sistema visual y olfativo, y condiciones homocigas mutantes en mosaicos genéticos para el gen *Ace* (AChE) en el lóbulo óptico llevan a alteraciones en el electroretinograma. Lo anterior señala que esta enzima tiene una función relevante en la fisiología de los sistemas sensoriales, por lo que en este estudio se analizó la posible alteración en la actividad de la AChE en distintas mutantes sensoriales.

### 5.1. Localización histoquímica de AChE.

Como se muestra en la figura 13, la actividad de la AChE está distribuida de manera homogénea en el cerebro de *Drosophila*. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos anteriormente por diversos autores (Toutant, 1989), quienes han localizado a la AChE en los neuropilos de todo el cerebro. Debe hacerse notar que la actividad de la AChE está presente en las antenas pero no en la retina, como previamente se describió por Wolfgang y Forte (1989).

Nuestros resultados no muestran diferencias en la localización de AChE en el cerebro de las cepas estudiadas. La técnica histoquímica resulta adecuada para observar la distribución de la enzima estudiada, pero no permite conocer la variación en la actividad; por lo que para su cuantificación fue necesario realizar estudios bioquímicos, en donde si se observa una disminución de la actividad de esta enzima en presencia de iso-OMPA.

## 5.2. Propiedades de la AChE en *Drosophila*.

En *Drosophila* existe relativamente poca información respecto a las características de la AChE. Estudios previos demostraron que la AChE de invertebrados hidroliza ACh con alta afinidad ( $K_m$  20-60  $\mu$ M, Silver y Presscott, 1982; Zingde et al., 1983; Melanson et al., 1985). Nuestros resultados en *Drosophila* demostraron una  $K_m$  (160  $\mu$ M) semejante a la reportada en eritrocitos de humanos (150  $\mu$ M, Suhail y Rizvi, 1989), microsomas de músculo en conejo (100-120  $\mu$ M, Muñoz-Delgado y Vidal, 1986) y retina de vertebrados (150-420  $\mu$ M, Hutchins, 1987; Salceda y Martinez, 1992). Melanson et al. (1985) reportaron que la AChE de *Drosophila* no es afectada por iso-OMPA. En contraste, nuestros resultados presentan una disminución en la  $K_m$  y  $V_{max}$  en presencia de este inhibidor.

Resulta interesante que la actividad de AChE en presencia de iso-OMPA, es la misma que se midió usando BuSCh como sustrato. Estos resultados sugieren que se puede tratar de la presencia de dos enzimas (AChE y BChE) que utilizan ambos sustratos con diferente afinidad. La  $K_m$  para BuSCh o AcSCh en presencia de iso-OMPA (340-400  $\mu$ M) es semejante a la reportada para la BChE en retina de vertebrados (132-666  $\mu$ M) y diferente a la observada en suero de caballo (24  $\mu$ M, Gatley, 1990). Adicionalmente la actividad de AChE observada para ambos sustratos es totalmente inhibida en presencia de BW284c51. De acuerdo con este último resultado, estudios previos mostraron que el 95 % de la AChE de *Drosophila* es inhibida con BW284c51 (Hall y Kankel, 1976; Zingde et al., 1983; Melanson et al., 1995; Gnagey et al., 1987; Toutant, 1988; Toutant et al., 1989). En estos trabajos el análisis electroforético reveló sólo la presencia de AChE en *Drosophila* (Melanson et al., 1995; Gnagey et al., 1987; Toutant, 1988; Toutant et al., 1989). El genoma de *Drosophila* se secuenció recientemente, y búsquedas exhaustivas no encontraron un gen que codifique para la BChE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> y <http://flybase.bio.indiana.edu:82/>). Estas búsquedas confirmaron estudios previos en que se identificó un solo gen para AChE en *Drosophila* (Hall y Kankel, 1976). Sin embargo, la caracterización de la actividad de AChE en nuestro trabajo muestra que esta enzima comparte algunas características de la BChE de vertebrados (inhibición por iso-OMPA, parecido en parámetros enzimáticos con BuSCh como sustrato) y de la AChE de vertebrados (inhibición por BW284c51, parecido en parámetros enzimáticos con AcSCh como sustrato). En conjunto estos resultados indican la presencia de una enzima (AChE/ el gen *Ace*) con características algo diferentes a la de los vertebrados, que tiene una

preferencia intermedia entre AChE y BChE por sus sustratos tal como lo reportaron Gnagey y colaboradores (1987), y que es sensible a iso-OMPA.

### 5.3. Actividad de la AChE en mutantes sensoriales.

Los resultados muestran que la actividad de la AChE (utilizando como sustrato AcSCh) es similar en todas las cepas estudiadas, aunque la actividad de la enzima en la cepa *chico/CyO* mostró una pequeña reducción, que no es estadísticamente significativa.

La actividad total de la AChE en todas las cepas estudiadas disminuyó totalmente en presencia de BW284c51 y parcialmente (30 % comparada con las silvestres) en presencia de iso-OMPA excepto en las mutantes *Ace* y probablemente *chico*<sup>-/-</sup>. Es interesante señalar que la mutante *chico*<sup>-/-</sup> mostró una actividad 50 % menor a la de las cepas silvestres. Aunque no se determinó la actividad de la AChE sin iso-OMPA en la cepa *chico*<sup>-/-</sup>, es posible inferir que ésta es entre un 30 y 40% menor que la actividad de las cepas silvestres, considerando la inhibición por iso-OMPA observada en todas las otras cepas.

En el caso de la cepa mutante *Ace* la actividad de AChE en presencia de iso-OMPA disminuyó un 50 %; esta cepa presenta únicamente una sola copia silvestre del gen por lo que se dice que es un fondo genético sensibilizado. Esta cepa heterocigota para *Ace* expresa la cantidad indispensable de AChE para su sobrevivencia, por lo cual en condiciones óptimas la actividad de la AChE es igual a la que presenta la de la cepa silvestre (Hall y Kankel, 1976); no obstante, en condiciones desfavorables para la enzima (con iso-OMPA), la actividad se ve afectada significativamente comparada a la de la cepa silvestre.

La actividad de la AChE utilizando BuSCh como sustrato no presentó diferencias entre las cepas mutantes y las cepas silvestres. Esta actividad fue totalmente inhibida por BW284c51. En presencia de iso-OMPA, la actividad de la enzima en las cepas mutantes disminuyó significativamente, disminución que como se esperaba fue aún mayor en el caso de la cepa *Ace* dado que es un fondo genético sensibilizado. Esto resulta interesante debido a que al igual que en vertebrados no se ha demostrado la presencia de BuCh (ó BuSCh) y que esta disminución en la actividad de la AChE es el reflejo de una alteración epigenética en la neurotransmisión sináptica de tipo colinérgica. Aunque de diferente origen (epigenético. debido a cambios en la homeostasis colinérgica en el caso de las mutantes sensoriales), esto se puede explicar de igual manera que como ocurre con la mutante *Ace*, ya que los únicos cambios encontrados en la actividad de la AChE, se observaron usando

BuSCh (sustrato para el cual la enzima no es tan afin) y/o en presencia de iso-OMPA, condiciones que son no tan favorables para la enzima.

De este modo es posible correlacionar alteraciones en la actividad colinérgica en las mutantes sensoriales con alteraciones en la actividad de la AChE. Las alteraciones en la actividad de la AChE en las mutantes sensoriales pueden deberse a las siguientes explicaciones:

Tanto el gen *norpA* (Riesgo-Escovar et al., 1995; Carlson 1996; Krieger y Breer, 1999) como el gen *nana* (Riesgo-Escovar et al. no publicado) codifican para proteínas que intervienen en el metabolismo de lípidos de membrana. Se piensa que mutaciones en estos genes pueden llevar a una alteración en la membrana plasmática de las células y a su vez a alteraciones en la actividad sináptica (reducción de la misma en ambos casos); esto se refleja en la alteración sensorial en las pruebas de conducta y electrofisiológicas y en la concomitante actividad de la AChE mostrada en este trabajo.

La mutante *chico*<sup>-/-</sup> se considera un modelo experimental de la diabetes, ya que presenta alteraciones en la vía de señalización de la insulina. La diabetes conlleva a alteraciones asociadas con la actividad sensorial y motriz de los organismos. Es interesante que tanto en pacientes diabéticos como en modelos experimentales en vertebrados se haya determinado una disminución en la actividad de AChE así como cambios en la proporción de las diferentes isoformas (Suhail y Rizvi, 1989; Sánchez-Chávez y Salceda 2000, 2001a, 2001b). Con base en esto, es posible inferir que exista una disminución en la actividad de AChE y posibles cambios en la proporción de las isoformas de la AChE en la mutante *chico*<sup>-/-</sup>. Es posible que alteraciones en las formas moleculares también existan en las otras mutantes.

En conclusión, y de manera análoga a lo que ocurre con la cepa heterocigota para el gen *Ace*, alteraciones sutiles en la neurotransmisión colinérgica pueden detectarse y cuantificarse usando a la actividad de la AChE en condiciones no ideales de ensayo (presencia de iso-OMPA, sustratos con menor afinidad). No obstante, los mecanismos de regulación de la AChE que provocarían estos cambios en la actividad de la enzima se desconocen. En el caso de la mutante *chico*<sup>-/-</sup>, los trastornos metabólicos son mayores que en las demás cepas, lo que explicaría el porqué la actividad colinérgica se ve más afectada.

## VI. CONCLUSIONES

- En *Drosophila* la AChE es capaz hidrolizar tanto AcSCh como BuSCh, y es sensible a iso-OMPA y se inhibe totalmente por BW284c51.
- La AChE en la cepa heteróciga para el gen *Ace* es más sensible a iso-OMPA que la de las cepas silvestres debido a que es un fondo genético sensibilizado.
- La actividad de la AChE de las mutantes sensoriales presenta una mayor sensibilidad al inhibidor iso-OMPA al usar BuSCh como sustrato, lo que señala cambios en la neurotransmisión de tipo colinérgica de estas mutantes.
- Nuestro sistema de estudio, utilizando condiciones subóptimas para medir la actividad de la AChE, parece ser muy sensible para detectar alteraciones en la actividad colinérgica que de otra manera serían imperceptibles.
- Alteraciones de diferente envergadura y origen en la neurotransmisión colinérgica se ven reflejadas de magnitud diferente en la actividad de la AChE.

## VII. LITERATURA CITADA

Acharya, J. K., Jalink, K., Hardy, R. W., Harstenstein, V. y Zuker, S. C. "InsP3 receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila*." *Neuron*, 1997, 18: 881-887.

Appleyard, M. E. "Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase." *Structure, Mechanism and Inhibition of Neuroactive Enzymes*, 1994, 22: 749-755.

Bargmann, C. I. "Olfactory receptors, vomeronasal receptors, and the organization of olfactory information." *Cell*, 1997, 90: 585-587.

Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andrus, B., Beckingham, K. y Hafen, E. "Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4." *Cell*, 1999, 97: 865-875.

Brochier, L., Pontié, Y., Willson, M., Estrada-Mondaca, S., Czaplicki, J., Klaébé, A. y Fournier, D. "Involvement of deacylation in activation of substrate hydrolysis by *Drosophila* acetylcholinesterase." *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(21): 18296-18302.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R. y Hafen, E. "An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control." *Current Biology*, 2001, 11: 213-221.

Bruyne, M., Clyne, P. y Carlson, J. R. "Odor coding in a model olfactory organ: The *Drosophila* maxillary palp." *The Journal of Neuroscience*, 1999, 19, (11): 4520-4532.

Carlson, J. R. "Olfaction in *Drosophila*: From odor to behavior." *Trends in Genetics*, 1996, 12(5): 175-180.

Chatonnet, A. y Lockridge, O. "Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase." *Biochemical Journal*, 1989, 260: 625-634.

Chiba, A. "Precision networking: A look through the eyes of a fly." *Neuron*, 2001, 32: 381-384.

Clandinin, T. R. y Zipursky, S. L. "Making connections in the fly visual system." *Neuron*, 2002, 35: 827-841.

Darvesh, S., Hopkins, D. A. y Geula, C. "Neurobiology of butyrylcholinesterase." *Nature Reviews / Neuroscience*, 2003, 4: 131-138.



Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. y Featherstone, R. M. "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7: 88-95.

Escalera, S., Bockamp, E-O., Moya, F., Piovant, M. y Jiménez, F. "Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases." *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1990, 9(11): 3593-3601.

Fadool, D. y Ache, B. "Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-gated channels interact with inositol 1,4,5-triphosphate-gated channels in olfactory receptor neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 9471-9475.

Fournier, D., Bride, J-M., Karch, F. y Bergé, J-B. "Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster*." *Letters Federation of European Biochemical Societies*, 1988, 238(2): 333-337.

Frye, M. y Dickinson, M. H. "Fly flight: A model for the neuronal control of behavior." *Neuron*, 2001, 32: 385-388.

Gatley, S. J. "Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase." *Biochemical Pharmacology*, 1990, 41(8), pp. 1249-1254.

Giurfa, M. y Menzel, R. "Insect visual perception: complex abilities of simple nervous systems." *Current opinion in neurobiology*, 1997, 7: 505-513.

Gnagey, A. L., Forte, M. y Rosenberry, L. "Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*." *The Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(27): 13290-13298.

Hall, J. C. y Kankel, D. R. "Genetics of acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*." *Genetics*, 1976, 83(3 PT. 2): 517-535.

Hardie, R. C. y Raghu, P. "Visual transduction in *Drosophila*." *Nature*, 2001, 413: 186-193.

Hardie, R. C. "TRP channels in *Drosophila* photoreceptors: the lipid connection." *Cell Calcium*, 2003, 33: 385-393.

Hutchins, J. B. "Review: acetylcholine as a neurotransmitter in the vertebrate retina." *Experimental Eye Research*, 1987, 45: pp. 1-38.

Karnovsky, M. J. y Roots, L. "A 'direct coloring' thiocholine method for cholinesterases." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1964, 12(3): 219-221.

Krieger, J. y Breer, H. "Olfactory reception in invertebrates." *Science*, 1999, 286(5440): 720-723.

Laurent, G. "A systems perspective on early olfactory coding." *Science*, 1999, 286: 723-728.

Lowry, O. H., Rousebrough, N. J., Farr, A. L. y Randal, R. J. "Protein measurement with the Folin-phenol reagent." *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193: 265-275.

Marcel, V., Estrada-Mondaca, S., Magné, F., Stojan, J., Kláébé, A. y Fournier, D. "Exploration of the *Drosophila* acetylcholinesterase substrate activation site using a reversible inhibitor (Triton X-100) and mutated enzymes." *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(16): 11603-11609.

Massoulié, J., Bon S., Krejci, E., Coussen, F., Duval, N., Chatel, J-M, Anselment, A., Legay, C. y Vallette, F-M. "The structure and significance of multiple cholinesterase forms," *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*. Washington D.C.: American Chemical Society, 1991: 2-6.

Massoulié, J., Bon, S., Anselment, A., Chatel, J-M, Coussen, F., Duval, N., Krejci, E., Legay, C. y Vallette, F. "Biosynthesis of the molecular forms of acetylcholinesterase," *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*. New York: Plenum Press, 1992: 17-24.

Melanson, S. W., Yun, C-H., Pezzementi, M. L. y Pexxementi L. "Characterization of acetylcholinesterase activity from *Drosophila melanogaster*." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 1985, 81(1): 87-96.

Mombaerts, P. "Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors." *Science*, 1999, 286: 707-711.

Mori, N., Itoh, N. y Salvaterra, P. M. "Evolutionary origin of cholinergic macromolecules and thyroglobulin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84: 2813-2817.

Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C. "Kinetic behaviour of acetylcholinesterase from muscle microsomal membranes." *Biochemistry International*, 1986, 13(4): 625-632.

Mutero, A. y Fournier, D. "*Drosophila* acetylcholinesterase structure," *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*. Washington D.C.: American Chemical Society, 1991: 141-145.

Oldham, S., Stocker, H., Laffargue, M., Wittwer, F., Wymann y Hafen E. "The Drosophila insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating PtdnsP<sub>3</sub> levels." *Development*, 2002, 129: 4103-4109.

Pérez-León, J. y Salceda, R. "El proceso visual en invertebrados y vertebrados," *Biología funcional de los animales*. México, D. F.: Siglo veintiuno editores y facultad de Ciencias, UNAM, 1998: 313-346.

Perrier, A. L., Massoulié, J. y Krejci, E. "PRiMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain." *Neuron*, 2002, 33: 275-285.

Riesgo-Escovar, J., Raha, D. y Carlson, R. "Requirement for a phospholipase C in odor response: Overlap between olfaction and vision in Drosophila." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92: 2864-2868.

Rein, K., Zöckler, M., Mader, M., Grübel, C. y Heisenberg, M. "The Drosophila standard brain." *Current Biology*, 2002, 12: 227-231.

Salceda, R. y Martinez, M. T. "Characterization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in retinal chick pigment epithelium during development." *Experimental Eye Research*, 1992, 54: 17-22.

Sánchez-Chávez, G. *Presencia de actividad de colinesterasas en células del epitelio pigmentario de retina de pollo, en cultivo*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., 1990.

Sánchez-Chávez, G. y Salceda, R. "Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterases in the rat retina." *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 2000, 49: 283-287.

Sánchez-Chávez, G. y Salceda, R. "Acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and diabetic rat retina." *Neurochemical Research*, 2001, 26(2): 153-159.

Sánchez-Chávez, G. y Salceda, R. "Acetyl- and butyrylcholinesterase molecular forms in normal and streptozotocin-diabetic rat retinal pigment epithelium." *Neurochemistry International*, 2001, 39: 209-215.

Scholl, F. G. y Sheiffle, P. "Making connections: cholinesterase domain in the CNS." *TRENDS in Neurosciences*, 2003, 29(11): 618-624.

Silver, L. H. y Prescott, D. J. "Aggregation properties of the acetylcholinesterase from the central nervous system of *Manduca sexta*." *Journal of Neurochemistry*, 1982, 38: 1709-1018.

Soreq, H., Gnatt, A., Loewenstein, Y. y Neville, L. F. "Excavations in to the active-site gorge of cholinesterases." *Trends In Biochemistry Science*, 1992, 17(9): 353-358.

Soreq, H. y Seidman, S. "Acetylcholinesterase - new roles for and old actor." *Nature reviews / Neuroscience*, 2001, 2: 294-302.

Stocker, R. F. "*Drosophila* as a focus in olfactory research: Mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity." *Microscopy Research and Technique*, 2001, 55: 284-296.

Suhail, M. y Rizvi, S. "Erythrocyte membrane acetylcholinesterase in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus." *Biochemical Journal*, 1989, 259: 897-899.

Taylor, P. "The cholinesterases." *The journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(7): 4025-4028.

Toutant, J-P. "Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms." *Progress in Neurobiology*, 1989, 32: 423-446.

Toutant, J-P., Arpagaus, M. y Fournier, D. "Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*: Quaternary structure and hydrophobic character." *Journal of Neurochemistry*, 1988, 50: 209-218.

Toutant, J-P, Murray, N. R., Krall, J. A., Richards, M. K. y Rosenberry, T. L. "Amphiphilic G1 and G2 forms of acetylcholinesterase: sensitivity or resistance to phosphatidylinositol-specific Phospholipase C," *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*. Washington D.C.: American Chemical Society, 1991: 12-16.

Vallette, F. M., De la Porte, S., Massoulié, J. "Regulation and distribution of acetylcholinesterase molecular forms in vivo and in vitro," *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*. Washington D.C.: American Chemical Society, 1991: 98-102.

Wolfgang, W. J. y Forte, M. "Expression of Acetylcholinesterase during Visual System Development in *Drosophila*." *Developmental Biology*, 1989, 131: 321-330.

Zindge, S., Rodrigues, V., Joshi, S. y Krishnan, K. "Molecular properties of *Drosophila* acetylcholinesterase." *Journal of Neurochemistry*, 1983, 41: 1243-1252.

Zuker, C. "The biology of vision in *Drosophila*." *Proceedings of the National Academy of Science*, 1996, 93: 571-576.

<http://flybase.bio.indiana.edu:82/>

<http://flybrain.uni-freiburg.de/Flybrain/html/.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>