



UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

Biól. Exp. Benjamín Pérez Aguilar

***Expresión génica y proteica de las colinesterasas en
tejido hepático humano y células HepG2***

Director:

Dr. José Luis Gómez Olivares

Asesores:

Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz

Dra. Elizabeth Hernández Pérez

Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno

México D.F.

Julio, 2011

Comité Tutorial

Director:

Dr. José Luis Gómez Olivares
Profesor Titular C
Laboratorio de Biomembranas
Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
E-mail: *gool@xanum.uam.mx*

Asesores:

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Profesor Titular C
Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
E-mail: *mcrgr@xanum.uam.mx*

Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular –A-
Universidad de Murcia, España
E-mail: *cevidal@um.es*

Dra. Elizabeth Hernández Pérez
Profesora Titular C
Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
E-mail: *sila@xanum.uam.mx*

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está considerada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACYT.

Agradecimientos a CONACYT por los apoyo obtenido en el posgrado de Maestría en Biología Experimental, con número de registro UAM-I: 309-0 y con clave: C/PFPN-2002-35-32).

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca con número de registro 224655

Asimismo, este trabajo estuvo parcialmente financiado por el CONACYT bajo la referencia APOY-COMPL-2008-90213-M.

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Biomembranas y de Bioquímica y Fisiología Celular en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la Dirección del Dr. José Luis Gómez Olivares y la asesoría de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz, Dra. Elizabeth Hernández Pérez y del Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno.

A todos ellos un profundo agradecimiento por sus aportaciones, atención y dedicación constantes para el desarrollo y realización de este trabajo.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Expresión Génica y Proteica de las colinesterasas en tejido hepático humano y células HepG2" con fecha del junio de 2011.

(Presidenta)

***Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa***

(Secretaria)

***Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México***

(Vocal)

***Dr. Elizabeth Hernández Pérez
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa***

(Vocal)

***Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto de Geriátría***

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El carcinoma hepatocelular es uno de los tumores malignos más comunes en el mundo, siendo el quinto cáncer más frecuente en hombres y el octavo en mujeres. En México, la incidencia es menor a 3.3 casos por cada 100,000 habitantes, por lo que es indispensable continuar el análisis de cambios moleculares presentes en éste tipo de cáncer. En los últimos años, se ha reportado que la actividad enzimática de la acetilcolinestasa (AChE) se encuentra disminuida en algunas neoplasias. Aunque no se conoce la función biológica específica de la butirilcolinesterasa (BuChE), esta cumple funciones de desintoxicación. La participación de estas enzimas en los procesos cancerosos se desconoce, pero parece existir una relación entre una baja actividad enzimática y el cáncer. El gen de AChE sufre un proceso de corte-empalme alternativo generando tres mRNAs; AChE-T (sistema nervioso y células musculares), AChE-H (eritrocitos y linfocitos), y AChE-R (estados patológicos). Todas las variantes proteicas hidrolizan acetilcolina (ACh) durante la transmisión nerviosa y la unión neuromuscular. El gen de la BuChE no sufre corte-empalme alternativo, expresado en hígado preferentemente. La actividad de ambas colinesterasas depende de una adecuada glicosilación post-traducciona.

METODOLOGÍA

Las muestras de hígado sano se determinaron por un análisis histopatológico y la línea celular HepG2 se propagó en condiciones adecuadas de cultivo. Las actividades AChE y BuChE se solubilizaron de hígado humano sano y las células de hepatoblastoma (HepG2) usando amortiguador Hepes-salino sin y con Brij-97 en una relación 1:10 (P/V). La actividad enzimática se estimó por el método de Ellman y el contenido de proteína total por el procedimiento propuesto por Bradford. La extracción de RNA se realizó por el método de Trizol y la amplificación por RT-PCR de dos pasos, usando cebadores específicos para AChE (H, T y R) y BuChE. El procesamiento post-traducciona se estudió con los sobrenadantes de la solubilización, los que se pusieron a interactuar con lectinas de distinta especificidad.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El hígado humano sano y las células HepG2 sintetizan AChE y BuChE, cuyas actividades fueron menores en HepG2 respecto al hígado sano. Lo anterior, hace suponer la participación de AChE y BuChE en la transformación celular. El hígado humano y las células HepG2 expresaron las tres variantes de RNAm de AChE. Tanto el hígado humano como las células HepG2 expresaron el transcrito de BuChE. La interacción de lectinas con las colinesterasas solubilizadas mostró que el procesamiento post-traducciona fue anómalo en las células HepG2; lo que al parecer tiene repercusión en la baja actividad enzimática. Lo anterior, muestra la relevancia del nivel del proceso de control de calidad de ambas enzimas, o su relación con alteraciones en las glicosiltransferasas específicas.

SUMMARY

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma is one of the most common malignancies in the world, being the fifth most common cancer in men and the eighth in women. In Mexico, incidence is lower at 3.3 cases per 100,000 habitants, making it essential to continue the analysis of molecular changes present in this type of cancer. In recent years, has been reported that the enzymatic activity of acetilcolinestesa (AChE) is decreased in some tumors. Although there is no known biological function of butyrylcholinesterase (BuChE), it appears that performs functions of detoxification. The participation of these enzymes in malignancies is unknown, there is a notable relationship between low enzyme activity and cancer. The AChE gene undergoes a process of three cutting-mRNA alternative splicing generating: AChE-T (nervous system and muscle cells), AChE-H (red blood cells and lymphocytes), and AChE-R (pathological conditions). All AChE variants hydrolyze acetylcholine (ACh) on nerve transmission and the neuromuscular junction. BuChE gene does not undergo by alternative splicing, and it is preferentially expressed on liver. The activity of both cholinesterases depends on proper post-translational glycosylation.

METHODOLOGY

Healthy liver samples were determined by a histopathological analysis and the cell line HepG2 was propagated in suitable conditions of cultivation. AChE and BuChE activities were solubilized from healthy human liver hepatoblastoma cells (HepG2) using HEPES-saline buffer with and without Brij-97 in a ratio 1:10 (P / V). Enzyme activity was estimated by the Ellman method and the total protein content by Bradford method. RNA extraction was performed by the Trizol method and RT-PCR amplification of two steps using specific primers for AChE (H, T and R) and BuChE. The post-translational processing was studied in the supernatants of dissolution, which began to interact with lectins of different specificity.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The healthy human liver HepG2 cells synthesize AChE and BuChE, whose activities were lower on HepG2 when compared of those found on healthy liver cells. This, suggests AChE and BuChE roll on cellular transformation. The human liver and HepG2 cells both expressed the three mRNA variants. Both human liver and HepG2 cells expressed BuChE transcript. Lectins interaction with solubilized cholinesterases showed that post-translational processing was abnormal on HepG2 cells, which apparently has an impact on the low enzyme activity. This shows the relevance of the level of process quality control of both enzymes, or its relationship to alterations in specific glycosyltransferases.

INDICE

1. INTRODUCCION	13
1.1 Cáncer de hígado.....	13
1.2 Características generales de las colinesterasas.....	15
1.2.1. Gen de la acetilcolinesterasa y expresión proteica.....	17
1.2.2. Gen de la butirilcolinesterasa y expresión proteica.....	19
1.2.3. El carácter glicoproteico de las colinesterasas.....	21
1.3. Las lectinas y su importancia en el estudio del procesamiento post-traduccional de proteínas.....	23
1.4. Sistema colinérgico en el hígado de mamíferos.....	24
1.5. Características funcionales hepáticas en las células HepG2.....	26
2. ANTECEDENTES	27
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. OBJETIVO PRINCIPAL	32
4.1. Objetivos particulares.....	32
5. HIPÓTESIS	33
6. METODOLOGÍA	33
6.1. Cultivo celular.....	33
6.2. Extracción y disección de tejido hepático humano.....	34
6.3 Procedimiento de perfusión del tejido hepático.....	36
6.4 Estudio histopatológico de las muestras de hígado humano post-mortem.....	36
6.5 Diseño de oligonucleótidos específicos.....	38
6.6 Aislamiento de ARNm de tejido hepático y de las células HepG2.....	40
6.7. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.....	41

6.8. Solubilización de las colinesterasas de hígado humano o células HepG2 por un método secuencial con o sin detergentes.....	44
6.9. Determinación de la actividad colinesterásica.....	45
6.10. Determinación del contenido de proteínas totales.....	47
6.11. Interacción de las colinesterasas con lectinas de distinta especificidad.....	48
6.12. Análisis estadístico.....	49
7. RESULTADOS.....	49
7.1. Análisis de la actividad colinesterásica en hígado humano.....	49
7.1a. Efecto de los detergentes sobre las actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.....	49
7.1b. Actividad enzimática AChE en hígado humano aplicando una perfusión en el órgano.....	53
7.1c. Análisis morfológico e histopatológico de hígado humano.....	55
7.1d. Estimación de la actividad acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en hígado humano.....	58
7.2. Actividad acetilcolinesterásica y butirilcolinesterásica en células de hepatoblastoma HepG2.....	62
7.3. Estudio del Procesamiento post-traducciona l de las colinesterasas de hígado humano y células HepG2.....	66
7.4. Análisis de la expresión de los genes AChE y BuChE en tejido hepático sano y células HepG2.....	68
8. DISCUSIÓN.....	73
9. CONCLUSIONES.....	86
10. BIBLIOGRAFÍA.....	87
11. ANEXO.....	102

Abreviaturas más empleadas

A4, A8, A12: Formas asimétricas de la acetilcolinesterasa

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa (acetilcolina acetilhidrolasa, EC 3.1.1.7)

AE: Actividad específica (U/mg)

AFP: Alfa-fetoproteína

Agua DEPC: agua con dietil pirocarbonato

ATCh: Acetil-tiocolina

ChE: Colinesterasa

Con A: Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*)

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

DEPC: Dietil pirocarbonato

EGTA: Ácido etilenglicol-bis-(aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético

G₁, G₂, G₄: Formas globulares de la acetilcolinesterasa

G_A: Molécula globular anfifílica de la acetilcolinesterasa

G_H: Molécula globular hidrofílica de acetilcolinesterasa

GFI: Glicosilfosfatidilinositol

HEPES: Ácido N-(2-hidroximetil) piperazina-N'-2-etanosulfónico

HepG2: Hepatocarcinoma celular Humano

HPC: Célula precursora hepática

Iso-OMPA: Tetraisopropilpirofosforamida

kb: Kilobases

kDa: Kilodaltones

LCA: *Aglutinina de lenteja (Lens culinaris)*

NAcGluc: N-acetil-D-glucosamina

N-terminal: Extremo amino terminal de un polipéptido

Np: no perfundidos

P: perfundidos

pb: Pares de bases

P/V: Relación peso/volumen

RCA: *Aglutinina de ricino (Ricinus communis)*

RER: Retículo endoplasmático rugoso

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: Ácido ribonucleico tipo mensajero

rpm: Revoluciones por minuto

S₁: Sobrenadante obtenido con elevada fuerza iónica

S₂: Sobrenadante obtenido con Triton X-100 o Brij 96

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis desnaturizante con SDS, en gel de poliacrilamida

THS: Amortiguador Hepes salino (Hepes 15 mM, NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM; pH 7.5)

TST: Amortiguador Hepes salino con Triton X-100

Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano

TX-100: Detergente Triton X-100

U: Cantidad de enzima capaz de hidrolizar un μmol de sustrato por hora a 37°C

WGA: *Lectina de germen de trigo (Triticum vulgare)*

1 INTRODUCCION

1.1 Cáncer de Hígado

La Sociedad Americana de Cáncer informó que a nivel mundial por año se diagnostican unos 500, 000 casos de cáncer hepático, teniendo una tasa de supervivencia a 5 años en un 10% de la población afectada (American Cancer Society, 2011).

En el mundo, el carcinoma hepatocelular es uno de los tumores malignos más comunes, siendo el quinto cáncer más frecuente en hombres y el octavo en mujeres (Méndez-Sánchez, *et al* 2010). La incidencia en Norteamérica y Europa Occidental es de menos de 10 casos por cada 100,000 habitantes. En Asia y en algunas partes de África se diagnostican 50-150 casos por 100,000 habitantes. En México, la incidencia es de menos de 3.3 casos por 100,000 habitantes (Blum y Spangenberg 2007).

En nuestro país, según las encuestas del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) e informes de la Secretaria de Salud sobre mortalidad en general, en el año 2008 el cáncer de hígado ocupaba el lugar diecisiete entre las causas de muerte (Secretaria de Salud, 2011). Méndez-Sánchez y colaboradores informaron que entre el año 2000 y 2007 hubo un incremento significativo de mortalidad debido a tumores malignos de hígado.

Dentro de los tumores que se pueden formar en el hígado se encuentran: los adenomas hepáticos, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular,

colangiocarcinomas intrahepáticos, angiosarcomas, hemangiosarcomas y hepatoblastoma (American Cancer Society, 2011).

En el análisis molecular del hepatocarcinoma humano, se han encontrado alteraciones genéticas que resultan de la desregulación de oncogenes y de genes supresores de tumores. Dentro de estas modificaciones genéticas se han observado anomalías en el gen supresor de tumores p53, cuya deficiencia participa en el desarrollo del hepatocarcinoma. Con todo, aún no es claro, si la mutación de p53 contribuye a la iniciación o bien en la progresión del cáncer. Otra modificación encontrada en el hepatocarcinoma es la de β -catenina, la cual es un componente río abajo de la ruta de señalización Wnt. Cuando β -catenina se transloca al núcleo, se asocia con factores de transcripción de la familia Tcf, los cuales activan a genes como myc, ciclina D1, COX2 y la metaloproteínasa de matriz (MMP7), que gobiernan procesos relevantes del cáncer. En algunos casos estas mutaciones y el aumento en la expresión nuclear de β -catenina se han relacionado con estados tempranos del hepatocarcinoma y en otros con su progresión (Farazo y DePinho 2006).

Por otro lado, la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico, ErbB, consiste de 4 miembros (ERBB1-ERBB4). Se ha observado que la expresión de ERBB1 Y ERBB3, se correlaciona con una presencia más agresiva y un alto índice de proliferación, metástasis intrahepática, dediferenciación y tamaño del tumor. La inhibición de ERBB1 por gefitinib retrasa el crecimiento, favorece un arresto del ciclo celular e induce la apoptosis de líneas celulares de hepatocarcinoma. Este hecho

sugiere que ERBB1 esta directamente implicada en la carcinogénesis hepática (Farazo y DePinho 2006).

Finalmente, también se ha informado en hepatocarcinoma humano avanzado la sobre-expresión del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (MET), el cual se ha confirmado en modelo de ratones transgénicos. En el modelo de ratones transgénicos también se encontró sobre-expresado el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Farazo y DePinho 2006).

Para el diagnóstico bioquímico del cáncer de hígado se ha recomendado el examen de sangre de la proteína alfa fetoproteína (AFP), la cual se encuentra en altas concentraciones en la sangre de los fetos, pero desaparece después del nacimiento. Esta prueba se ha utilizado para detectar tumores iniciales en las personas que tienen alto riesgo de padecer cáncer de hígado. Uno de los problemas del empleo de AFP como marcador tumoral, es que en algunos tipos de tumores hepáticos no se secretan altas cantidades de AFP, y con frecuencia para cuando el nivel de AFP es elevado, el tumor es demasiado grande para ser extirpado, o se encuentra en estado metastático (American Cancer Society, 2011).

1.2 Características generales de las colinesterasas

En los tejidos de los mamíferos existen dos tipos de colinesterasas (ChEs), las cuales se clasifican como acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, de acuerdo a su especificidad y sensibilidad a inhibidores selectivos (Gordon, *et al* 2005).

La acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7; AChE) convierte la acetilcolina en acetato y colina durante la transmisión nerviosa. Mientras, que la butirilcolinesterasa (E.C. 3.1.1.8, BuChE) también llamada pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o sérica, hidroliza butirilcolina en butirato y colina. La BuChE también, hidroliza acetilcolina cuando la AChE está inhibida (Bin Li, *et al* 2000). Por lo tanto, ambas colinesterasas están involucradas en la neurotransmisión en la sinapsis colinérgicas, así como en las uniones neuromusculares.

La función de la AChE en el organismo es la inactivación rápida de la acetilcolina tras su liberación en las sinapsis colinérgicas, finalizando la transmisión del impulso nervioso, y facilitando el control temporal preciso de la contracción muscular (Katz 1966, Nachmansohn, Neumann 1975, Rosenberry 1979). A pesar de la amplia distribución de la BuChE en tejidos humanos y animales, su función fisiológica aún no se conoce claramente. Se ha propuesto, que la BuChE juega un papel importante en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas (Iwasaki, *et al* 2007), regulando la concentración de la colina en plasma o evitando la acumulación de butirilcolina, con sus efectos nicotínicos, durante el metabolismo de ácidos grasos y lipogénesis (Jiménez-Díaz y Martínez-Monge 2000). Debido a su abundancia en suero, se ha sugerido que participa en la desintoxicación de heroína y cocaína, en sujetos que utilizan estas drogas (Lockridge 1991).

Las colinesterasas se encuentran en invertebrados y vertebrados, y en estos últimos se localizan no sólo en tejidos excitables, tales como músculos y nervios, sino también en vasos sanguíneos, hígado, intestino, páncreas, timo y placenta, entre

otros tejidos, y en tipos celulares tan diversos como células de las meninges y el conjunto de células sanguíneas. No se encuentran en líquidos de excreción como lágrimas, orina y sudor (Soreq y Seidman 2001).

1.2.1. Gen de la acetilcolinesterasa y expresión proteica

En el humano, el gen AChE se encuentra localizado en el cromosoma 7 en la región 22 q, teniendo una longitud de 7 kb en que se incluyen seis exones y cuatro intrones. La expresión del gen AChE puede generar tres distintos transcritos mediante un proceso de empalme alternativo (Soreq, *et al* 1990; Getman, *et al* 1992). El mRNA tipo AChE-T está constituido por los exones E2-E3-E4 y E6 y la proteína producto genera monómeros, dímeros y tetrámeros anfifílicos (G_1^A , G_2^A y G_4^A), tetrámeros no anfifílicos (G_4^{NA}), así como asociaciones hetero-oligoméricas. Si los tetrámeros se unen a una proteína transmembranal (PRiMA; "*Proline Rich Membrane Anchor*") se forman tetrámeros capaces de insertarse en las membranas (PRiMA- G_4^A) (Dori, Soreq 2006, Perrier, *et al* 2005, Deutsch, *et al* 2002) (ver Figura 1). Si los tetrámeros se ligan a un tallo tipo colagénico (ColQ), se generan las formas asimétricas A_4 , A_8 y A_{12} , con uno, dos y tres tetrámeros, respectivamente.

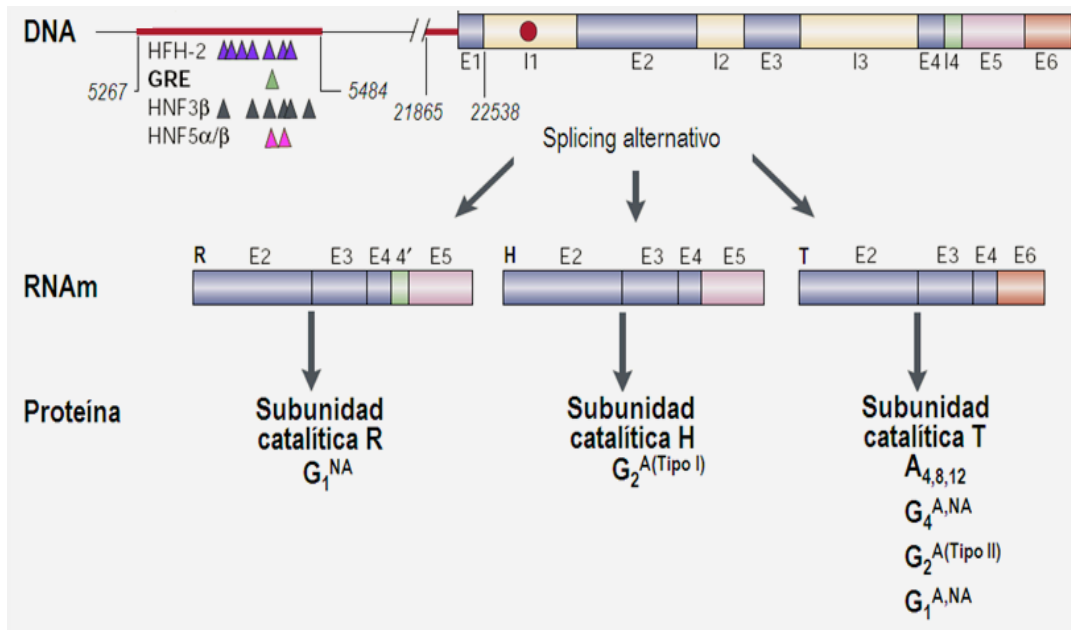


Figura 1. Estructura del gen acetilcolinesterasa humano. El gen de AChE presenta un promotor proximal (línea roja adyacente a E1), una región intensificadora distal (línea roja más distal) que es rica en secuencias reguladoras. El intrón 1 (I1) contiene una secuencia intensificadora indicada por un punto rojo, las secuencias reguladoras son mostradas como cuñas. Hay tres tipos de RNAm para AChE, que se producen por el ensamblado de los exones comunes (E2, E3 y E4), con toda la información necesaria para producir proteínas catalíticamente activas. El pseudointrón I4 y los exones alternativos E5 y E6 generan las diferentes subunidades de AChE que difieren en sus propiedades hidrodinámicas y modos de anclaje a las membranas (Tomado de Soreq y Seidman, 2001).

El mRNA tipo AChE-H, contiene los exones E2-E3-E4-E5, que codifica a los dímeros anfifílicos Tipo I que poseen una estructura de glicofosfatidilinositol (GPI) unido covalentemente (Soreq, *et al* 1990, Deutsch, *et al* 2002). El mRNA tipo AChE-R, no sufre corte y unión después del último exón codificador del dominio catalítico, y por tanto posee el arreglo E2-E3-E4-I4-E5-E6. El extremo C-terminal de la subunidad R consta de 30 aminoácidos adicionales y carece de residuos de Cys, por lo que, las subunidades permanecen como monómeros (Grisaru, *et al* 1999; Grisaru, *et al* 2006; Sternfeld, *et al* 2000).

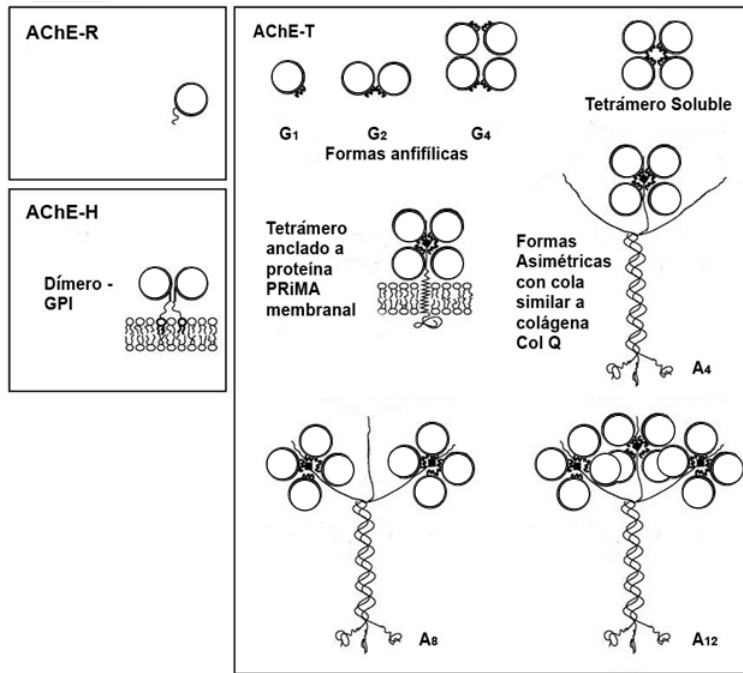


Figura 2. Formas moleculares de la proteína AChE originadas por oligomerización de distintas subunidades y asociaciones cuaternarias con otras proteínas. La AChE-R o AChE de traducción completa esta constituida por variantes monoméricas; la AChE-H o AChE-E (AChE hidrofóbica o de eritrocitos) produce monómeros y dímeros anfifílicos; y la AChE-T o AChE-S (AChE sináptica), genera una gran variedad de componentes globulares y asimétricos que además pueden incorporar o no la proteína de unión a la membrana PRiMA o el tallo colagénico ColQ (Sánchez-Chávez G. y Salceda R., 2008).

1.2.2. Gen de la butirilcolinesterasa y expresión proteica

En el humano, el gen de la butirilcolinesterasa (BuChE), se encuentra en el cromosoma 3, en la posición 26q (Allderdice, *et al* 1991; Guaghan, *et al* 1991). La región genómica del gen BuChE se extiende alrededor de 70 kb y está compuesto por 4 exones y 3 intrones (Arpagaus, *et al*/1990). Todas las formas moleculares de BuChE derivan de un solo RNAm, por lo que no sufre un empalme alternativo (Soreq, *et al* 1989).

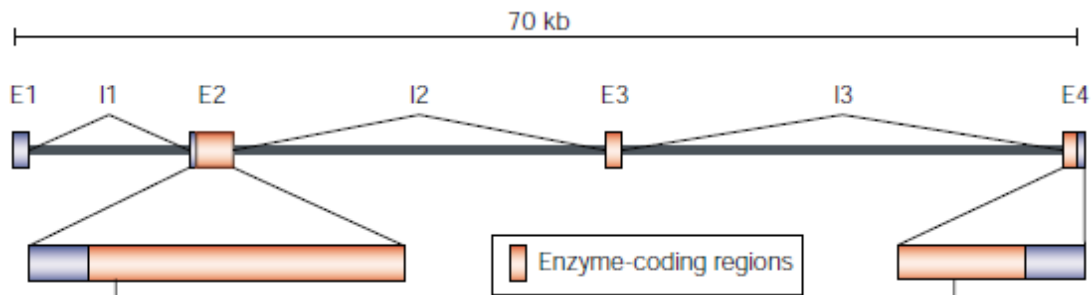


Figura 3. Estructura del gen de butirilcolinesterasa. Se localiza en el cromosoma 3, comprende alrededor de 70 kb, compuesto de 4 exones (E1, E2, E3 y E4) y 3 intrones (I1, I2 y I3) (Tomado de Darvesh, *et al* 2003)

La proteína codificada en el mRNA de la expresión del gen BuChE refleja diferentes formas moleculares incluyendo; monómeros (G_1), dímeros (G_2) y tetrámeros (G_4) solubles, y en estos últimos también anclados a la membrana por el péptido hidrofóbico rico en prolina (PRiMA). También, se presentan formas asimétricas ancladas a membrana por un triplete helicoidal de colágeno. Los tetrámeros anclados a este tallo de colagénico se les conoce como A_4 , y se pueden incorporar de 1 a 3 tetrámeros, aunque, en general, las formas asimétricas A_{12} predominan sobre las A_8 y éstas sobre las A_4 (Darvesh, *et al* 2003).

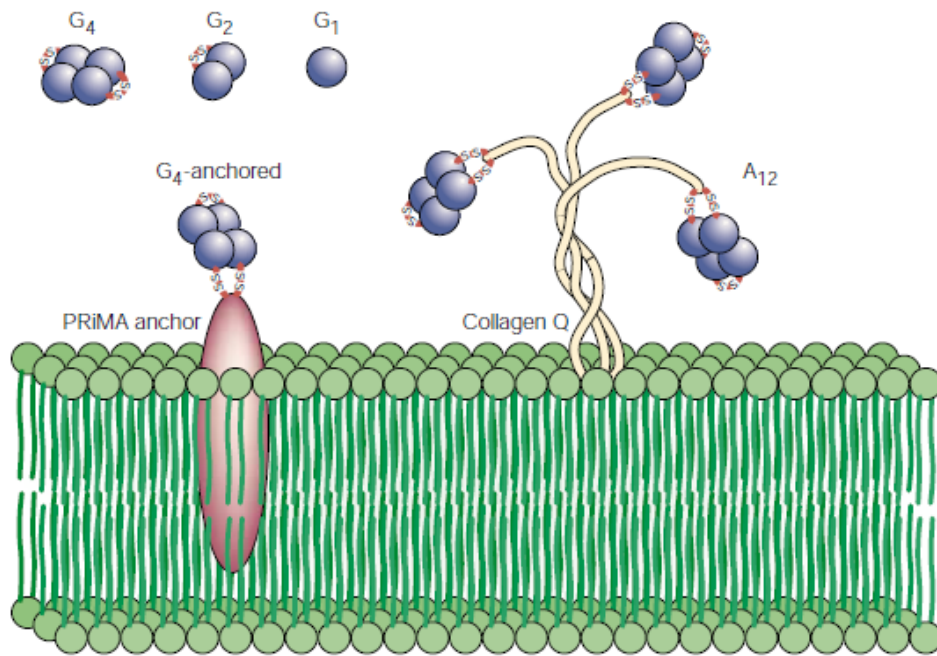


Figura 4. Formas moleculares de la proteína butirilcolinesterasa. G₁ es la forma globular monomérica soluble, G₂ es la forma globular dimérica soluble y G₄ es la forma globular tetramérica soluble. La forma tetramérica globular G₄-anclada a la membrana contiene un transmembranal rico en prolina (PRiMA). La forma A₁₂ es una forma asimétrica en la cual tres tetrámeros son anclados a la membrana por un tallo de tipo colagénico ColQ (colágeno Q) (Tomado de Darvesh, et al 2003)

1.2.3. El carácter glicoproteico de las colinesterasas

Las diversas moléculas de AChE y BuChE provienen de diferentes estadios del procesamiento de una misma estructura original compleja, y sólo se pueden distinguir por su estructura cuaternaria, solubilidad, interacciones iónicas o hidrofóbicas, parámetros hidrodinámicos y contenido de carbohidratos.

La masa molecular aparente de la subunidad catalítica de la AChE oscila entre 70-80 kDa, aunque en algunas especies animales alcanza un valor superior (100-110 kDa), como es el caso de la AChE de cerebro de pollo (Rotundo 1984).

En el procesamiento post-traducciona l de las colinesterasas, se les incorporan algunos oligosacáridos preformados en el residuo del aminoácido asparagina (Asn) en determinadas secuencias de la proteína. Esto ocurre en el lumen del retículo endoplásmico rugoso y se da en los sitios potenciales de glicosilación que siempre se encuentran en una secuencia consenso característica: Asn-X-Ser/Thr.

La subunidad catalítica de la AChE de *Torpedo californica* contiene cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (Schumacher, *et al* 1986, Lockridge, *et al* 1987), dos de los cuales son homólogos a los tres de la secuencia de la acetilcolinesterasa humana (Soreq, *et al* 1990). No se sabe, si todos los sitios se encuentran realmente glicosilados. La eliminación de estos sitios por mutagénesis dirigida reduce la secreción respecto al tipo nativo, y afecta la actividad de la enzima secretada (Velan, *et al* 1993).

La BuChE de suero humano contiene nueve oligosacáridos unidos vía residuos de Asn, que representan el 26% del peso de la molécula (Lockridge, *et al* 1987). Esta es la razón por la que la BuChE presenta una masa molecular mayor que la AChE, a pesar de que ambas subunidades contienen un número parecido de residuos de aminoácidos, alrededor de 575.

Un rasgo relevante respecto a la glicosilación de las subunidades de ambas enzimas, es que se trata de un proceso específico del tejido, por lo que el tamaño o peso de una molécula particular dependerá del tejido donde se produzca (Treskatis, *et al* 1992).

Por último, se ha sugerido que la N-glicosilación ejerce algún control sobre otras funciones, incluidas la protección frente al ataque proteolítico (Lucas y Kreutzberg 1985), o bien, el mantenimiento de las colinesterasas en la circulación plasmática (Kronman, *et al* 1995).

1.3. Las lectinas y su importancia en el estudio del procesamiento post-traducciona

Las lectinas son glicoproteínas, principalmente de origen vegetal, que se han utilizado ampliamente en la purificación de receptores celulares glicosilados. Las lectinas son capaces de reconocer carbohidratos con una alta especificidad, de manera similar a un anticuerpo, lo que ha permitido su utilización para estudiar la interacción carbohidrato-proteína (Hernández, *et al* 2005). Las lectinas permiten conocer los procesos moleculares implicados en el procesamiento, ensamblado y secreción de las ChEs (Vidal 1996, Cabezas-Herrera, *et al* 1997, Moral-Naranjo, *et al* 1997).

Tabla 1. Diversas lectinas y su especificidad hacia algunos oligosacáridos.

Fuente	Monosacárido	Oligosacárido
<i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	α -D-manosa (interna o externa) o α -D-Glucosa	
<i>Lens culinaris</i> (LCA)	α -D-Manosa	Fuc(α 1,6)NAcGlu-(β 1,4)-NAcGlu-Man ₃
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	NAcGlu terminal o interna o terminal, ácido siálico terminal	NAcGlu-(β 1,4)NAcGlu
<i>Ricinus communis</i> I (RCA-I)	Galactosa penúltima o terminal	D-gal-(β 1,4)-NAcGlu

1.4. Sistema colinérgico en el hígado de mamíferos

En los mamíferos, la actividad AChE se localiza principalmente en el sistema nervioso y muscular, pero también en las células sanguíneas, hígado y placenta. El patrón de formas moleculares de las ChEs es específico de tejido. El hígado de vertebrados es rico en BuChE (Arpagaus, *et al* 1991), por lo que, se ha considerado que es el sitio de origen de la enzima, debido a que la secuencia de residuos de aminoácidos la BuChE hepática es idéntica a la de los monómeros del tetramero soluble G₄ en plasma (Lockridge 1988), y se ha propuesto que el incremento en

plasma de las glicofomas de BuChE ricas en fucosa tiene un valor pronóstico para identificar a los pacientes con riesgo elevado de contraer cáncer de hígado, así como para discriminar entre los pacientes que presentan cirrosis y los que padecen hepatitis crónica (Ohkura, *et al* 1994).

Las evidencias señalan que en el hígado normal cada célula precursora hepática (HPC), conocida también como célula oval está rodeada por un cierto número de hepatocitos. Merced a la producción y secreción de ChEs, los hepatocitos impiden la unión de la acetilcolina a sus receptores muscarínicos tipo-3 ubicados en la membrana plasmática de las HCP. Como resultado de la pérdida por hepatectomía de los hepatocitos, la actividad colinesterásica disminuye proporcionalmente a la severidad en la pérdida de los hepatocitos. En esa circunstancia se reduce poderosamente la hidrólisis de ACh. Esto permite, que la ACh ejerza sus efectos tróficos sobre los HPC, en tanto, la biomasa de los hepatocitos se restaura. En pacientes que han padecido enfermedad hepática y se les ha trasplantado un hígado, el efecto estimulador del nervio vago se abate y ello conduce a una activación anómala de las HPC (Cassiman, *et al* 2002). En relación a lo anterior, durante el desarrollo de la carcinogénesis en el hígado de rata, se han observado cambios en la actividad ChE, que se han relacionado a modificaciones en la población de hepatocitos (Kaneko, *et al* 1972).

Se ha reportado que las formas moleculares de acetilcolinesterasa encontradas en los hepatocitos de ratas corresponden a dímeros G_2 y tetrámeros G_4 (Perelman y Brandan 1989).

1.5. Características funcionales hepáticas en las células HepG2

Las células de hepatoblastoma humano, HepG2 muestran características similares al tejido hepático. Así se ha demostrado que expresan una amplia variedad de actividades propias del hígado, entre las que cabe señalar: catalasa, succinato deshidrogenasa, 3-oxoacil-CoA tiolasa y enzimas marcadoras de los peroxisomas (Wanders 1991, Stangl 1995). Además, las células HepG2 secretan albúmina (Tecce y Terrana 1988) y transferrina (Searashi, *et al* 2002), y producen lecitina-colesterol acil-transferasa (Chen, *et al* 1986), triacilglicerol lipasa (Busch, *et al* 1989), gamma glutamil transpeptidasa (Visvikis, *et al* 1990) y fosfatasa alcalina (la que representa el 90% de la actividad sérica) (Nowrouzi y Yazdanparast 2005). También, son capaces de producir el factor de crecimiento de fibroblastos y su receptor respectivo, que median un mecanismo de regulación de la proliferación, que pueden estar asociados a la transformación maligna (Asada, *et al* 2003). De igual forma las células HepG2 sintetizan lisozima, inducida durante la fase aguda de la inflamación y secretan colato y desoxicolato como sales biliares (Cooper, *et al* 1994). Teniendo en cuenta, lo anterior, se puede considerar a la línea celular HepG2 un modelo útil para estudiar el metabolismo de los peroxisomas y lípidos, síntesis de sales biliares y la respuesta a diferentes citocinas relacionadas al eje neuroendócrino y a nivel de respuesta inmune, y para evaluar estados patofisiológicos del hígado.

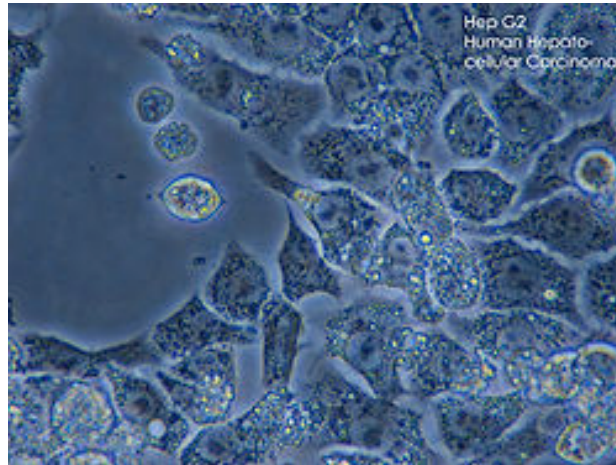


Figura 5. Cultivo de la línea celular de hepatoblastoma HepG2. Las células crecen en monocapa, aunque pueden formar cúmulos.

2. ANTECEDENTES

A partir de hace dos décadas, se ha propuesto la estimación de la actividad butirilcolinesterásica para la evaluación de diagnóstico y pronóstico en distintas enfermedades hepáticas (Uete, *et al* 1985). En suero de pacientes con cirrosis hepática y con hepatoma se ha descrito un patrón anormal de las isoenzimas BuChE (Matsuzaki, *et al* 1980). Resultados similares, se hallaron en homogenados de hígado y sueros de ratas (Lemberg y Macchi 1981). Por otro lado, se ha establecido que para evaluar enfermedades hepáticas a través de la actividad de las ChEs, la eficacia en la medición es independiente del sustrato de la enzima empleado (Matsuzaki, *et al* 1980).

El análisis histológico-enzimático en cortes de carcinoma hepatocelular ha mostrado un aumento en la actividad BuChE en dos casos de hepatocarcinoma (Tajiri, *et al* 1983). El diagnóstico del carcinoma hepatocelular se ha correlacionado con un aumento en las actividades de las ChEs y leucina aminopeptidasa, así como, en el contenido de globulinas, albúmina, bilirruibina, y cambios en la velocidad de sedimentación eritrocitaria (Itoshima, *et al* 1984). Sin embargo, también se ha observado que la actividad de las ChEs disminuyó en casi un 60% en pacientes con hepatoma (Matsuzaki, *et al* 1980).

En cuanto a la actividad colinesterásica en otros tipos de cáncer; se han observado cambios en la expresión de los genes AChE y BuChE en tumores de ovario, mama, próstata y en algunos tipos de leucemias mieloides (Fischer 1998, Zeng 1999, Neville 2001). En algunos casos se produce un incremento en los niveles de actividad de la AChE y BuChE, tanto en tumores cerebrales como no cerebrales. En otros, sucede lo contrario, disminuye la actividad enzimática como ocurre en los tumores de mama, colon y nódulos linfoides (Sáez-Valero y Vidal 1996, Vidal 2005).

En cuanto a la AChE, se ha reportado que la sobre-expresión de esta enzima es necesaria para la apoptosis celular, por lo que se le ha propuesto como un gen supresor de tumores (Zhang, *et al* 2002; Park, *et al* 2004). La fuerte caída en la actividad de AChE en algunos tipos de cáncer (Sáez-Valero y Vidal 1996, Vidal 2005), podría estar relacionada con el bloqueo de la apoptosis y, por lo tanto, el desarrollo del tumor.

Se han observado cambios en la estructura de los oligosacáridos de las proteínas de membrana, que se relacionan con los procesos de transformación y proliferación celular. Es posible que los cambios puedan ser utilizados como marcadores tempranos de cáncer. Una de las principales modificaciones en los oligosacáridos de estas proteínas es la incorporación temprana de ácido siálico al esqueleto de estos azúcares durante el procesamiento post-traducciona, lo cual conduce a la aparición de nuevos antígenos, que se han relacionado con varios tipos de cáncer (Gallegos, *et al* 2008). Se ha informado, que muchas clases de tumores sobre expresan *beta-galactósido-alfa-2-6-sialiltransferasa*, la enzima encargada de incorporar ácido siálico terminal en los esqueletos de los oligosacáridos (López y Vallejos 2007).

Respecto a lo anterior, se sabe que la glicosilación de las proteínas de secreción cambia considerablemente en células cancerosas, por lo que, ha sido de interés el análisis de la incorporación de residuos de monosacáridos en proteínas de células cancerosas. Así, en tumores hepáticos se ha observado una glicosilación anómala en la gamma-glutamyl transpeptidasa, como revela su menor interacción con la lectina de *Concanavalia ensiformis* (*Con-A*) que reconoce manosa (Yamamoto, *et al* 1981). En ratas expuestas a agentes hepatocarcinógenos, aumenta la cantidad de ácido siálico y/o galactosa en la gamma-glutamyl transpeptidasa y glutatión-S-transferasa (Matsuzaki, *et al* 1980, Alam, *et al* 2005). En hepatocarcinomas cambia la actividad de tres glicosiltransferasas: 1) alfa 1-6 fucosiltransferasa, cuya mayor actividad se relaciona con el aumento de fucosa en la AFP, la cual se ha usado para el diagnóstico oportuno del carcinoma hepatocelular; 2) N-acetilglucosaminil-

transferasa-III (GnT-III), cuya actividad enzimática aumenta en el suero de pacientes con carcinoma hepatocelular; y 3) N-acetilglucosiltransferasa-V (GnT-V) su actividad también aumenta en cáncer hepático, pero menos que la actividad de GnT-III (Blomme, *et al* 2009).

Las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa incorporan azúcares durante su ruta de maduración. Varias líneas celulares hepáticas secretan colinesterasas funcionales, como es el caso de las células *HuH-7*, en las cuales se encontró que secretan dos colinesterasas distintas a las encontradas en el suero de pacientes normales, por su distinta interacción con las lectinas de *Ricinus communis* y *Triticum vulgare* (Hada, *et al* 1987). Incluso, se ha propuesto que el incremento en el plasma de glicofomas de BuChE ricas en fucosa tiene un gran valor pronóstico para identificar pacientes con elevado riesgo de contraer cáncer de hígado, así como para discriminar entre los pacientes con cirrosis (Ohkura, *et al* 1994).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática que existe en el diagnóstico del cáncer y la dificultad para obtener biopsias de tejidos humanos, es necesario buscar nuevos marcadores moleculares que permitan diagnosticar de manera temprana y de forma no invasiva el cáncer hepático. Para esto, se ha propuesto estudiar los cambios en la composición y estructura de los oligoglicanos en las glicoproteínas, las cuales se ha visto que presentan alteraciones en su esqueleto oligosacárido; incrementando los

azúcares, sustituyéndolo por otros, o impidiendo su incorporación de estos azúcares al esqueleto oligosacárido.

Recientemente, se ha venido estudiando el papel de las colinesterasas en el desarrollo del cáncer, debido a que son glicoproteínas que sufren N-glicosilaciones y se ha observado un proceso de glicosilación anómala en el cáncer de ovario, mama, próstata, hígado, y en algunos tipos de leucemias mieloides y algunos tumores, y además, una expresión alterada en los genes de AChE y BuChE. Un primer indicio de esta anomalía es una alteración en los niveles de actividad de la AChE y BuChE en tumores cerebrales y no cerebrales.

En general, se ha observado que la expresión alterada de los genes de las colinesterasas se relaciona a cambios en la síntesis, ensamblado y glicosilación de los productos proteicos, por lo que se podrían utilizar como marcadores para el pronóstico temprano del cáncer hepático. El análisis de la expresión génica y proteica de la BuChE, podría ser útil debido a que se sintetiza en el hígado y desde allí una fracción importante marcha al torrente sanguíneo. Por lo tanto, es importante estudiar el carácter glicoproteico de la BuChE plasmática, y si las pruebas demuestran su valor pronóstico utilizarla como un marcador de cáncer hepático no invasivo. Pero se requiere en primera instancia estudiar estas alteraciones en el cáncer hepático para después buscar estas modificaciones en la enzima del plasma.

Dada la información disponible sobre la actividad colinesterásica en tejidos cancerosos, se requieren nuevas investigaciones para continuar con en el estudio de las ChEs y poder considerarlas como pronósticos moleculares de cáncer. También sería importante clarificar los mecanismos moleculares, por los cuales las ChEs podrían estar relacionadas con el origen y/o desarrollo del cáncer. Es necesario explorar diversos modelos de estudio que revelen nueva información acerca de la relación de la expresión de la enzima y los procesos de alteración de la proliferación celular.

4. OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la expresión génica y proteica de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en tejido hepático humano sano y en la línea celular de hepatoblastoma HepG2.

4.1. Objetivos particulares

- I. Establecer el tipo de transcritos que se expresan en el tejido hepático normal de humano sano y en las células de hepatoblastoma HepG2.
- II. Evaluar la diferencia de la actividad enzimática en tejido hepático humano sano y en las células HepG2 de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa débil- y fuertemente unidas a las membranas.

- III. Evaluar la diferencia entre el nivel de glicosilación de la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa en tejido normal hepático sano y en las células HepG2.

5. HIPÓTESIS

Si las colinesterasas participan en las alteraciones que llevan a desarrollar tumores hepáticos, entonces esperaríamos encontrar diferencias tanto a nivel de transcritos, síntesis y procesamiento pos-traducciona l de la AChE y BuChE, al comparar estos parámetros entre las células HepG2 y el tejido normal hepático normal.

6. METODOLOGÍA

6.1. Cultivo celular

Las células HepG2 se cultivaron en medio William's, el cual se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB, HyClone, E.U.A), 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptom icina (Microlab, México). A este medio se le denominó medio W completo. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^6 células en botellas de cultivo de plástico estériles de 75 cm² (Corning, E.U.A). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad, a una temperatura de 37 °C.

Las células se resembraron una vez por semana, levantándose con tripsina conteniendo EDTA al 0.25% (Sigma, E.U.A.) previamente lavadas con un

amortiguador salino de fosfatos (PBS). Después de este tiempo se procedió a realizar los experimentos descritos más adelante.

Para lograr obtener miligramos de peso fresco de células HepG2, éstas se sembraron en las condiciones descritas antes, hasta completar cinco botellas de cultivo de plástico estériles de 75 cm² (Corning, E.U.A) con un 100% de confluencia. Una vez obtenido esto, se resembraron en cajas Petri de 10 cm de diámetro (Corning, E.U.A.) con medio W-completo hasta obtener un 100% de confluencia. Posteriormente, se cambió el medio por uno libre de SFB y se dejaron en incubación por 24 h. Pasado este tiempo, se realizó el conteo celular en un contador (Becton-Dickinson, E.U.A.) obteniendo un promedio de 32×10^6 células. Las células se centrifugaron a 12,000 X g por 10 min., hasta obtener un botón celular. Este material se empleó para realizar la solubilización de las colinesterasas (ver apartado 6.8 de Métodos).

Para la extracción de ARNm, las células HepG2 se sembraron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro (Corning, E.U.A) con medio W-completo hasta obtener un 100% de confluencia. Posteriormente, se contaron las células obteniendo un promedio de 5×10^6 células.

6.2. Extracción y disección de tejido hepático humano

Las muestras de tejido hepático humano sano se obtuvieron del lóbulo derecho de la cara diafragmática. Se colectaron bajo la supervisión y autorización del Servicio Médico Forense del Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal (SEMEOF-

TSJ), con la ayuda y capacitación de los Médicos Forenses y Técnicos especialistas en necropsias (Ver anexo). Se tomaron en cuenta sólo aquellas muestras que cumplían con los criterios de inclusión, los cuales se especifican en la tabla 2

Tabla 2. Criterios para considerar el hígado de un sujeto *post-mórtem* como sano.

	<i>Inclusión</i>	<i>Exclusión</i>
CRITERIOS	Sexo: Masculino	Cirrosis alcohólicas
	Edad: 18 a 35 años	Hígado graso
	Índice de masa corporal: 18.5–25 kg/m ²	Exposición a sobredosis de fármacos
	Hígado sin alteraciones histopatológicas	Hepatitis C y/o VIH
	Muerte: traumática.	

Para descartar la exposición a fármacos, gracias a las facilidades proporcionadas por el Área de Química del SEMEFO-TSJ (ver anexo), se tuvo acceso a los análisis químico-toxicológico, con la finalidad de incluir en nuestro estudio solo aquellas muestras hepáticas sin exposición a algún tipo de droga.

El análisis histológico se realizó en el Área de Patología del SEMEFO-TSJ bajo la supervisión y capacitación del patólogo y técnico encargados (Ver anexo).

6.3 Procedimiento de perfusión del tejido hepático

Para eliminar fuentes contaminantes (plasma, glóbulos rojos y glóbulos blancos) que pudieran interferir en una adecuada estimación de la actividad y extracción de RNAm de origen hepático, se realizó perfusión del hígado a través de la vena central, introduciéndole un conducto de goma del calibre aproximado a la vena hepática, empleando como medio de perfusión, una solución salina conteniendo NaCl 154 mM y EDTA 5.4 mM ajustada a pH 7.4. Con la ayuda de una bomba peristáltica, a un flujo aproximado de 50 ml/min hasta pasar 2 litros por muestra de órgano. Los reactivos fueron de grado analítico (Sigma-Aldrich, E.U.A.).

6.4 Estudio histopatológico de las muestras de hígado humano post-mórtem

Las muestras hepáticas (entre 5 y 10 g) fueron disecadas del lóbulo derecho de la cara diafragmática. Posteriormente, se colocaron en tubos de polipropileno de 50 ml (Falcon, E.U.A.) conteniendo formol al 10% (Gloden Bell, E.U.A.). De las muestras sumergidas en el formol se realizaron cortes transversales de aproximadamente 1 cm³, que se colocaron en el casete de inclusión, para luego colocarlos en el procesador de tejidos (Microm, E.U.A.). Las muestra se deshidrataron por alcoholes de concentración crecientes y después por solventes orgánicos, como xileno (EM Science, E.U.A.). Posteriormente, las muestras se incluyeron en parafina. Para ello, se usó una tina EC 350-1 (Microm, E.U.A.) con parafina fundida (Paraplast, E.U.A.) (56-60 °C). Después de la impregnación con la parafina, el tejido se dejó solidificar, quedando listo para realizarlos cortes histológicos.

En un micrótomo (Microm, E.U.A.) se practicaron cortes de entre 3 y 5 micrómetros de grosor, que se colocaron en una tina de flotación (VWR, E.U.A.) que contenía agua tibia y gelatina (J.T. Baker, México). De este modo se eliminaron los pliegues que se formaron en los cortes y después fueron levantados en portaobjetos (Lauka, E.U.A.). Para eliminar la parafina de los tejidos, los portaobjetos procesados fueron colocados en un horno (Felisa, México) a 20 °C, durante 20 min. Luego, se sumergieron en xileno, y finalmente, se deshidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes hasta llevarlos a agua destilada. Después, se realizó la tinción de hematoxilina-eosina, la cual comprendió el siguiente proceso:

- Hematoxilina de Harris (Golden Bell, E.U.A.) durante 5 min.
- Lavado con agua corriente
- Diferenciación con alcohol-ácido, dos lavados rápidos (Técnica Química, México).
- Lavado con agua corriente
- Carbonato de Litio, diez baños
- Lavado con agua corriente
- Alcohol al 96%. Diez baños
- Tinción con eosina amarillenta al 1%. De 5 a 10 baños (Hycel, México).
- Inmersión en alcohol al 96 % para eliminar el exceso de eosina. Diez baños
- Alcohol al 96 %. Diez baños
- Alcohol absoluto. Diez baños

- Alcohol absoluto. Diez baños
- Alcohol xilol. Diez baños
- Xilol. Diez baños
- Montaje.

El montaje consistió en colocar sobre el corte histológico ya teñido un cubreobjetos el cual se adhirió con resina sintética (Golden Bell, E.U.A.).

6.5 Diseño de oligonucleótidos específicos para la técnica de RT-PCR

Se realizó el diseño de los oligos utilizando el programa OligoPerfect™ Designer Invitrogen, E.U.A. (<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>) para cada una de las variantes de AChE con el ARNm de cada variante. Las secuencias de los pares oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 3 así como el tamaño de producto amplificado.

Tabla 3. Oligos diseñados para las variantes de AChE de humano	
Para AChE H (E4-E5) Sentido TCTCGAAACTACACGGCAGA Anti-sentido TGAGGAGGAAGGGAGCACTA	Tamaño del amplificado 487 pb
Para AChE T (E4-E6) Sentido TCTCGAAACTACACGGCAGA Anti-sentido GCCCAGCCCTGAAATAAATAG	444 pb
Para AChE R (E4-I4) Sentido TCTCGAAACTACACGGCAGA Anti-sentido GGGGAGAAGAGAGGGGTTAC	333 pb

En cuanto a los oligos de BuChE, se emplearon los oligos diseñados por el Dr. Cecilio Vidal Moreno y colaboradores (Muñoz-Delgado, *et al* 2010) (Tabla 4).

Tabla 4. Oligos diseñados para BuChE de humano	
Para BuChE (E2-E4) Sentido TGTCTTTGGTTTACCTCTGGAA Anti-sentido CACTCCATTCTGCTTCATC	Tamaño del amplificado 297 pb

6.6. Aislamiento de ARNm de tejido hepático y de las células HepG2

Para la extracción de ARNm se siguió el procedimiento de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi 1987; Chomczynski 1993). Antes de iniciar la extracción de ARNm, se preparó una solución inhibidora de RNAsas “ZAP” (500 ml de a 1 mM de EDTA y 100 mM de NaOH, a partir de soluciones concentradas de 200 ml de 0.5 M de EDTA tetrasódico tetrahidratado y 200 ml de 1 M de NaOH). La solución se utilizó para limpiar la región y utensilios de trabajo, lo cual aseguró que las moléculas de ARNm no fueran degradadas. Se preparó agua con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1%, EtOH al 75% con el agua DEPC al 0.1% y agua de sistema MiliQ al 0.1% con agua con DEPC. Estas soluciones fueron esterilizadas antes de usarse.

De cada muestra de tejido se usaron entre 100 y 200 mg de tejido hepático, y 5×10^6 células HepG2 que se colocaron en un tubo de polipropileno de 5 ml (Falcon, E.U.A.) con 1 ml de TRIZOL (Invitrogen, E.U.A.), que se utilizó para aislar y preservar el ARNm. Los tejidos y las células se homogeneizaron en TRIZOL con un Politron a una velocidad media durante aproximadamente 30 seg. Se dejó incubar la muestra a temperatura ambiente por 5 min. Se agregaron 200 μ l de cloroformo al 100% y se agitó vigorosamente durante 15 seg. La muestra una vez agitada se transfirió a un tubo nuevo y se dejó incubar durante 3 min. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 g x 15 min a -4 °C. La fase incolora se colocó en un tubo nuevo y se incorporaron 500 μ l de isopropanol al 100%. Se incubó durante 1h a -20 °C. Se centrifugó a 12,000 x g a -4 °C. x 15 min y se decantó el sobrenadante. Se agregó 1ml de etanol-DEPC al 75%. El pellet se resuspendió en un vórtex y se centrifugó

nuevamente a 7500 g x 5 min a -4 °C. Se removió todo rastro del etanol-DEPC al 75% secando con una pipeta y se agregaron 100 µl de H₂O-DEPC + MiliQ. Las muestras de ARNm se guardaron a -70 °C.

Para determinar la integridad del ARNm extraído, se preparó un gel para electroforesis especial que requirió lo siguiente: 35 ml de agua con DEPC 0.1%, 10 ml de formaldehído, 5 ml de MOPS 1X, 0.6 gramos de agarosa. Se utilizaron 250 ml de una solución MOPS 1X como líquido para la cámara de electroforesis.

6.7. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

Para poder realizar la técnica de retrotranscripción a partir de 5 µl de la muestra de ARNm se utilizó el estuche comercial SuperScript First-Strand Síntesis System for RT-PCR (Invitrogen, E.U.A.). De este estuche comercial se utilizaron los siguientes reactivos:

- 2 µl de RANDOM HEXAMERES, 1 µl de DNTPs a 25 mM y 2 µl de agua DEPC.
- Se Incubó a 65°C por 5 min. Posteriormente se incubó en hielo por 1 minuto.
- Se preparó una mezcla maestra o "Mix" para realizar la retro-transcripción:
 - 2 µl de solución amortiguadora para RT 10X
 - 2 µl de MgCl₂ 50 mM
 - 2 µl de solución DTT 0.1 M

- 1 μ l de solución inhibidora de ARNasas “RNAsaOUT”
- Se colocaron 7 μ l del "Mix" a cada uno y se incubó a 2 min a temperatura ambiente. Pasado este periodo se agregó 1 μ l de la enzima retrotranscriptasa SuperScript II (SSII) por muestra.
- Se incubó a temperatura ambiente por 10 min, después a 42 °C por 50 min y finalmente a 70 °C por 15 min para detener la reacción.

Con el cDNA obtenido a partir de la reacción anterior, se utilizaron las muestras correspondientes para poder realizar la técnica de PCR. Se utilizaron los cebadores específicos para AChE y BuChE. Finalmente, se llevó a cabo una reacción de PCR normal partiendo de lo siguiente:

- Se utilizó la solución amortiguadora especial para PCR 10X $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 166 mM, Tris 670 mM a pH 8.8, MgCl_2 67 mM, β -mercaptoetanol 100mM.
- Se preparó la mezcla maestra para cada muestra (4.5 μ l de solución amortiguadora PCR 10x, 1 μ l de la mezcla con dNTP 25 mM, 1 μ l del cebador u oligo sentido y 1 μ l del cebador anti sentido para AChE, así como 1 μ l del cebador u oligo sentido y 1 μ l del cebador anti-sentido para BuChE, y 0.3 μ l de la enzima polimerasa GoTaq). Por cada reacción se utilizaron 25 μ l como volumen final en un tubo para PCR de 0.5 ml, completando el volumen final con agua MiliQ ultra pura libre de ARNasas.
- Se agregaron 5 μ l del molde de ADNc en cada tubo.

○ Cada tubo se introdujo en el termociclador. La PCR comenzó con una desnaturalización a 95°C. Luego se repitieron los 42 ciclos designados para la reacción:

- 30 seg a 95 °C (desnaturalización)
- 30 seg a 59 °C (alineamiento).
- 30 seg a 72 °C (elongación).
- 4 min a 72 °C (final de la elongación).

Con el fin de ver los productos de la reacción de PCR, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.2 % en 250 ml de TBE 1X durante 2 h a 55 V.

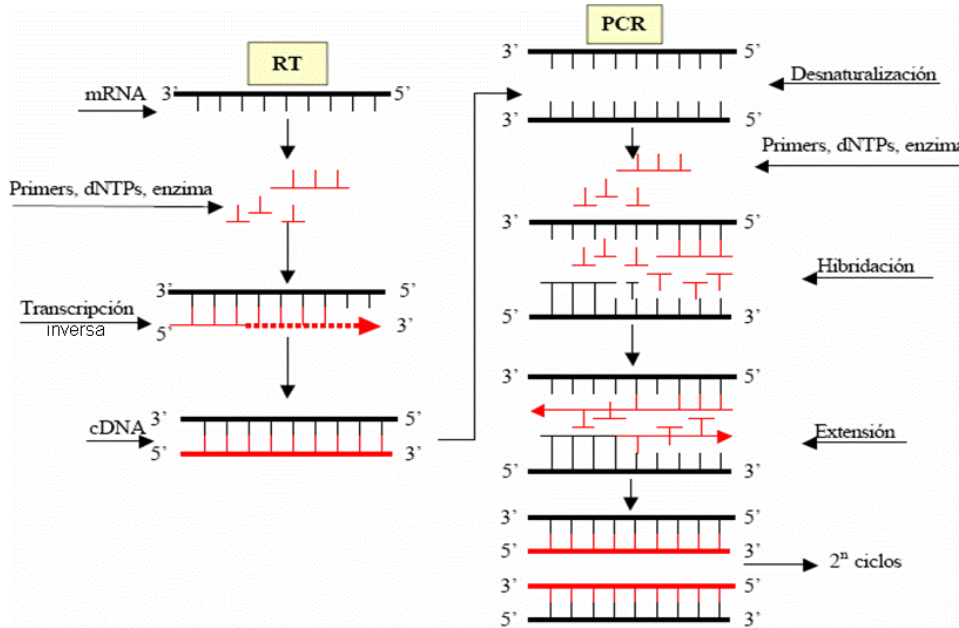


Figura 6. Esquema representativo del proceso de la RT-PCR. La Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA (tanto RNAm como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado.

6.8. Solubilización de las colinesterasas de hígado humano o células HepG2 por un método secuencial con o sin detergentes

Para la extracción de las colinesterasas de hígado humano sano se empleó 1 g de tejido en peso húmedo y 0.120 g en peso húmedo de células HepG2. Las muestras se homogeneizaron en amortiguador HEPES salino (HEPES 15 mM, NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 3 mM, pH 7.5), con una mezcla de antiproteasas (leupeptina 20 µg, pepstatina 10 µg, benzamidina 1 mM y aprotinina 20 U), al 10% P/V de amortiguador. El homogenado inicial se centrifugó a 100,000 x g durante 1 h a 4 °C en una centrifuga XL-90 Optima (Beckman, E.U.A), para separar la AChE y/o

BuChE soluble o débilmente unida a las membranas. Tras recoger el sobrenadante (S_1), el precipitado se homogeneizó en amortiguador HEPES salino que contenía Triton X-100 y/o Brij 97 al 1% p/v. Estas suspensiones se centrifugaron para obtener la enzima ligada a las membranas en el sobrenadante 2 (S_2). Posteriormente, se determinó la actividad de AChE y BuChE en las dos etapas de extracción, S_1 y S_2 .

6.9. Determinación de la actividad colinesterásica

Las actividades AChE y BuChE se estimaron por el método de Ellman (Ellman, *et al* 1961) en el cual se emplean los tio-análogos de los sustratos naturales, la acetiltiocolina (ATCh) para la actividad AChE y butiriltiocolina (BuTCh) para la actividad BuChE. Aunque, la especificidad de las ChEs hacia su sustrato preferente es elevada, se usaron inhibidores selectivos: iso-OMPA para inhibir a la actividad BuChE y BW284C51 para inhibir a la actividad AChE (Austin y Berry, 1953). En este método se aprovechó la capacidad del cromógeno DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) para oxidar los grupos tioles libres de reactivos o proteínas.

El fundamento del método para determinación de la actividad enzimática, se basa en que las ChEs hidrolizan los correspondientes ésteres de la tiocolina liberando tiocolina y acetato (o butirato). La tiocolina reacciona rápidamente con el DTNB produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato, el cual presenta un color amarillo intenso y un máximo de absorbanza a 412 nm (coeficiente de extinción molar: $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

La actividad enzimática, la cual se expresó en μmoles de sustrato hidrolizados por hora y por mililitro de muestra (U/ml) ($\mu\text{m} \times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$), se obtuvo al multiplicar el aumento proporcional de la absorbancia por minuto, por un factor que resulta del cociente del volumen total por el volumen de muestra, expresados en mililitros, multiplicado por 60 y 1000, los cuales son factores de conversión, divididos entre el coeficiente de extinción molar, $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

La actividad específica para cada colinesterasa referida como U/mg proteína ($\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) se obtuvo del cociente entre la actividad en U/ml y el contenido de proteína en mg/ml de los extractos S_1 y S_2 .

Este método tiene el inconveniente de la interferencia producida por los grupos tioles libres presentes en las proteínas de las muestras. Estos grupos reaccionan con el DTNB proporcionando un cambio de absorbancia que no corresponde a la hidrólisis del sustrato. Para evitar este problema, la muestra se incubó con el DTNB antes de añadir el sustrato, para valorar previamente los grupos tioles.

Para estimar en los hígados humanos y la línea celular de hepatoblastoma HepG2, la actividad en experimentos de interacción con lectinas, se empleó el método de Ellman adaptado a un microensayo (Campoy, *et al* 1992). Para ello se utilizaron placas de material plástico transparente (Nunc, E.U.A.), con 96 pocillos de 400 μl y con un fondo plano, la lectura de la actividad colinesterásica fue medida en un lector de placas de microtitulación (Biotek, E.U.A.).

El medio de reacción contenía amortiguador fosfato 100 mM, pH 8.0 con DTNB 0.33 mM, 1 mM de ioduro de acetiltiocolina para AChE o butiriltiocolina para la BuChE y el inhibidor correspondiente (Iso-OMPA 50 μ M para la medida de AChE y BW284C51 10 μ M para la de BuChE). Para la lectura de actividad enzimática, en los pozos se agregaron 25 μ l de muestra, 25 μ l del inhibidor específico de AChE o BuChE y 225 μ l de amortiguador fosfato con DTNB. Todas las muestras se midieron por triplicado.

6.10. Determinación del contenido de proteínas totales

La cantidad de proteína se estimó por el método de Bradford (1976), que se basa en la unión del colorante a las proteínas. La intensidad de color de la muestra cambia, en función de la cantidad de proteína. Este método implica la unión de Azul brillante de Comassie G-250 con los residuos de aminoácidos de Arg y en menor grado con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe de la proteína, que provoca un cambio en el máximo de absorbancia del colorante desde 465 a 595 nm. El azul brillante de Comassie G-250 existe en dos formas con dos colores diferentes rojo y azul, siendo la forma roja la que se convierte en azul al interaccionar con las proteínas. La intensidad del color es proporcional con el contenido de proteína.

Para valorar la proteína, se elaboraron dos rectas patrón a partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 5 μ g/10mL y otra de 28.2 μ g/10mL. Se repartieron volúmenes de 0, 2, 4, 8, 10 μ L y se completaron a 10 μ L con agua desionizada. Los volúmenes de muestra, los cuales fueron diluidos a 1:10, fueron de 10 μ L. Cada

muestra se preparó por tetraplicado. Se agregó a las muestras 200 μ L del reactivo de Bradford, esperando 5 minutos para leer a 595 nm.

6.11. Interacción de las colinesterasas con lectinas de distinta especificidad

La naturaleza de los azúcares terminales presentes en las glicoproteínas puede conocerse empleando lectinas con distinta especificidad; *Concanavalina ensiformis* (Con A-sefarosa), *Lens culinaris* (LCA-sefarosa), *Triticum vulgare* (WGA-agarosa) y *Ricinus communis-I* (RCA-agarosa). Se utilizó como control de unión inespecífica a la matriz inerte a la *sefarosa-4B*. El porcentaje de interacción se obtuvo comparando con la actividad del control y la calculada en los sobrenadantes, tras la interacción con las lectinas.

Las muestras se incubaron con lectinas inmovilizadas en un soporte tipo agarosa durante 18h a 4°C, en agitación constante. Para ello, se mezclaron las fracciones de los extractos (S_1+S_2). Para las muestras de hígado, la interacción fue individual ($n=5$). Se sometieron a la interacción 2 volúmenes de muestra por 1 volumen de matriz. Los complejos lectina-colinesterasa se separaron por centrifugación a 10,000 X g por 5 min, y luego se determinaron las actividades AChE y BuChE en los sobrenadantes por triplicado (ver apartado 6.9 de Métodos).

6.12. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico con los datos obtenidos utilizando la prueba de U Mann-Whitney con una $p \leq 0.05$ con una $n=3$ para la línea celular HepG2 y $n=5$ para las muestras de hígado sano.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis de la actividad colinesterásica en hígado humano

7.1a. Efecto de los detergentes sobre las actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

Se realizó la extracción de las actividades AChE y BuChE en una muestra hepática con Triton X-100 o con Brij 97 ambos al 1% p/v, para determinar cuál de ellos era mejor para la extracción de ambas enzimas.

En primera instancia, se analizó el contenido de proteína total. Se observó que con el Triton X-100 (2.85 ± 0.011 mg/ml) se solubilizó un 25% más que con Brij 97 (ver tabla 5). Esto nos indicó que probablemente el Triton X-100 era la mejor opción para la solubilización de las colinesterasas.

Tabla 5. Efecto de los detergentes Triton X-100 y Brij 97 sobre la extracción de las proteínas totales en el hígado humano sometido a una extracción secuencial. Los datos mostrados aquí son de la fracción S₂

<i>1 Detergente</i>	<i>2 Proteínas totales (mg/ml)</i>
<i>Triton X-100</i>	<i>2.85 ± 0.011</i>
<i>Brij 97</i>	<i>2.14 ± 0.011*</i>

Para la determinación del contenido de proteínas se empleó el método de Bradford (1976). Los valores representan el promedio de tres repeticiones y la correspondiente desviación estándar. * p < 0.05.

Al analizar la actividad colinesterásica extraída por un método secuencial (apartado 6.8 de Métodos) primero sin detergente (fracción S₁) y luego con detergente (fracción S₂), se observaron valores de actividad de AChE en S₂ muy similares para los obtenidos con Triton X-100 y Brij 97 (Figura 7).

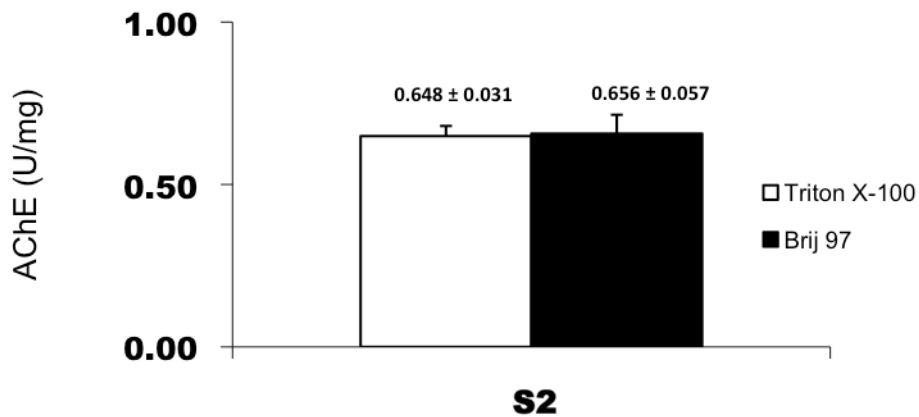


Figura 7. Extracción de la actividad acetilcolinesterásica en hígado humano con Triton X-100 y Brij 97. $p \leq 0.05$. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizado a una muestra por triplicado. En el eje Y se expresa la actividad enzimática de AChE expresada en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). En el eje X se expresa la fracción S_2 , para la cual se utilizaron los detergentes Triton X-100 y Brij 97 para extraer las enzimas fuertemente unidas a membrana.

En la estimación de la actividad BuChE, se observó que la actividad solubilizada con Brij 97 fue 54% mayor que con Triton X-100 (Figura 8), un resultado distinto al obtenido para la AChE. Las diferencias fueron significativas. Esto creó incertidumbre respecto de cuál de los dos detergentes era el más adecuado para la extracción de las colinesterasas.

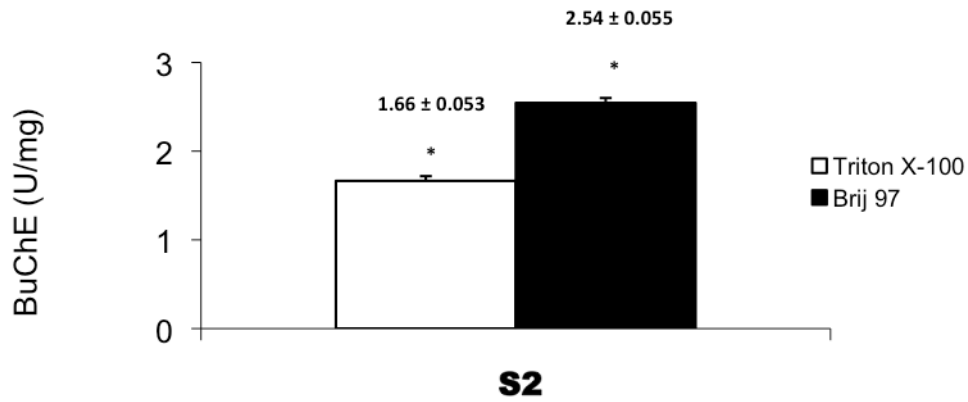


Figura 8. Extracción de la actividad butirilcolinesterásica en hígado humano con Triton X-100 y Brij 97. * $P \leq 0.05$. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizado a una muestra por triplicado. En el eje Y se expresa la actividad enzimática de BuChE expresada en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). En el eje X se expresa la fracción S_2 , para la cual se utilizaron los detergentes Triton X-100 y Brij 97 para extraer las enzimas fuertemente unidas a membrana.

El paso a seguir fue determinar si al momento de realizar el ensayo de la actividad BuChE por el método de Ellman en la fracción S_2 se lograba eliminar la inhibición del Triton X-100 (Li, *et al* 2000).

Para ello, se usó una solución del detergente Brij 97 al 1% p/v y se añadió al ensayo (Figura 9). Los resultados mostraron un aumento en la actividad BuChE, con una recuperación significativa del 13% del efecto inhibitorio del Triton X-100.

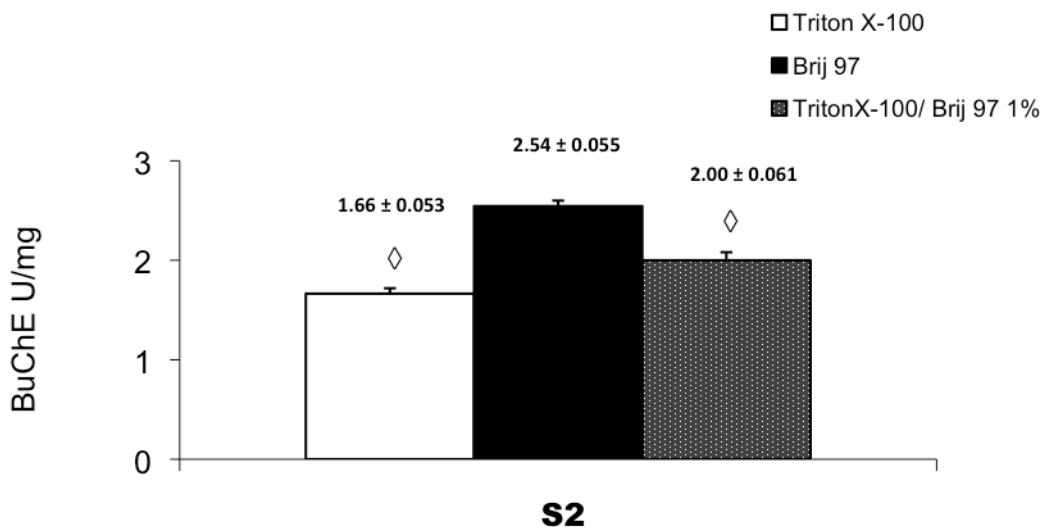


Figura 9. Recuperación de la actividad butirilcolinesterasa extraída con Triton X-100 cuando se incorporó Brij 97 en el ensayo enzimático. $^{\circ}P \leq 0.05$. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizada a una muestra por triplicado. En el eje Y se expresa la actividad enzimática de BuChE expresada en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). En el eje X se expresa la fracción S₂, para la cual se utilizaron los detergentes Triton X-100, Brij 97 y la fracción S₂ de Triton X-100 más Brij 97 al 1%.

7.1b. Actividad enzimática AChE en hígado humano aplicando una perfusión en el órgano

Teniendo en cuenta, que las células hematopoyéticas (glóbulos blancos y eritrocitos) presentan actividad AChE, hubo que hacer una perfusión en los hígados (Figura 10), para eliminar la actividad enzimática ajena al tejido hepático. La perfusión se realizó a cuatro hígados, cuya actividad se comparó con un mismo número de muestras hepáticas sin perfusión.

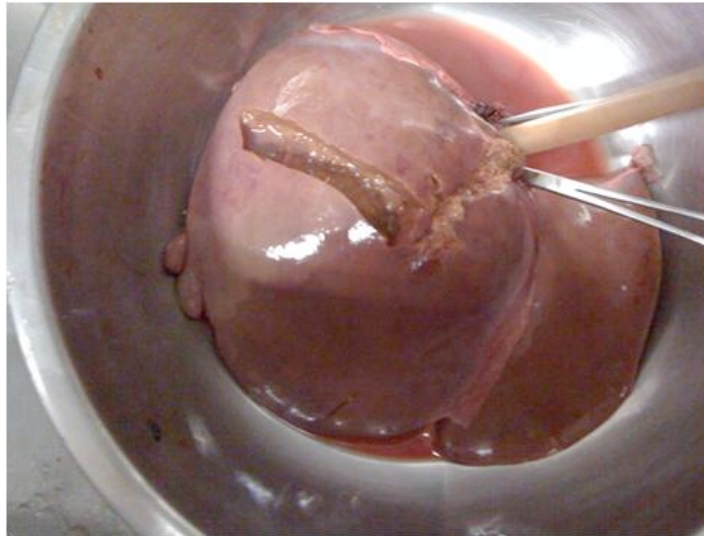


Figura 10. Hígado humano bajo procedimiento de perfusión. Este procedimiento se realizó a través de la vena hepática insertando una manguera de plástico e inyectando con bomba peristáltica una solución fisiológica NaCl 0.154 M y 5 mM EDTA a pH: 7.4 a una velocidad 50 ml/min, Como se puede observar, el hígado muestra un color rosado, sin evidencia aparente de sangre.

Como el único interés era establecer el papel benéfico de la perfusión, no se consideró necesario determinar el contenido de proteínas. Solo se estimó la actividad enzimática en U/g de tejido. En la figura 11 se puede observar que el hígado sintetiza más AChE débilmente unida a membrana (S_1), que fuertemente unida a membrana (S_2).

Al comparar la actividad AChE en las muestras sin y con perfusión se encontró que la actividad AChE fuertemente unida a membrana (S_2) era cinco veces menor en las muestras sometidas a perfusión. Como cabía esperar la actividad solubilizada sin detergente (S_1) no cambió. Lo anterior, señala que la perfusión es indispensable para medir de manera fiable la actividad de AChE unida a las membranas.

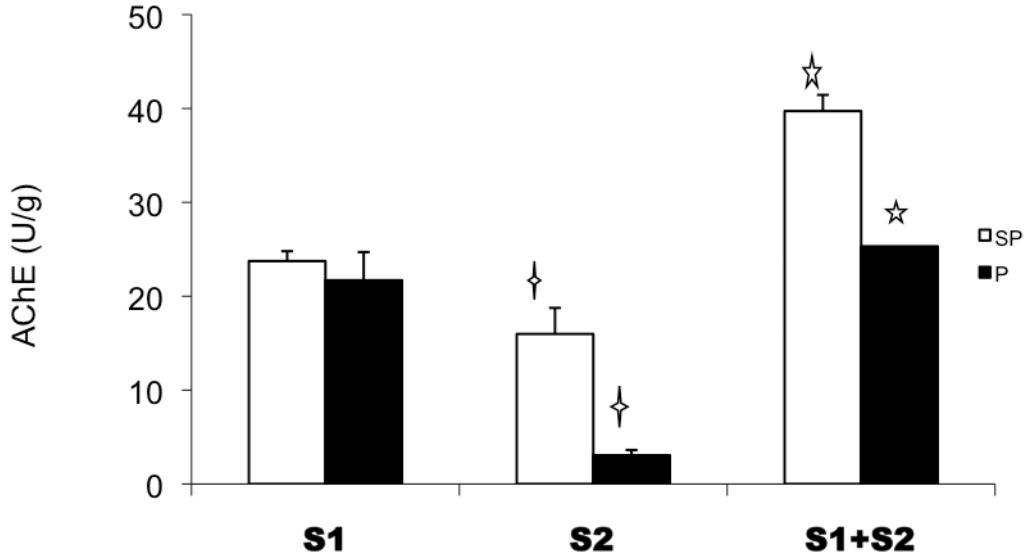


Figura 11. Comparación en la actividad AChE en hígado humano sin someter o sometido al procedimiento de perfusión. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizada a 4 muestra por triplicado. En el eje Y se expresa la actividad enzimática de AChE expresada en unidades por gramo de tejido (U/g). En el eje X se expresa las fracciones S₁, S₂ y S₁ + S₂ (la suma de la fracción S₁ y la fracción S₂). SP: sin perfusión; P: perfusión. Asteriscos indican diferencia estadística **P \leq 0.05 entre procedimientos sin perfusión y con perfusión.

7.1c. Análisis morfológico e histopatológico de hígado humano

Antes de iniciar con el análisis histológico para determinar aquellos hígados como presuntamente sanos, se colectaron 50 muestras hepáticas que cumplían nuestros criterios de inclusión; edad, género, índice de masa corporal, entre otros, como la apariencia post-mórtem; es decir, que desde el punto de vista macroscópico eran aparentemente sanos, en opinión del patólogo. De las 50 muestras, 35 de ellas se excluyeron al revisar los resultados de los análisis químico-toxicológicos. A las 15 muestras restantes, se les realizó el análisis histológico para descartar posibles cambios histopatológicos.

En la figura 12, se presentan las micrografías de ocho muestras de hígado de las 15 muestras analizadas por un estudio histológico. Se encontraron alteraciones patológicas importantes, como esteatosis macrovesicular y lisis (Figura 12a), esteatosis microvesicular (Figura 12b); esteatosis macrovesicular o de gota gruesa (Figura 12c). En las cinco restantes no se observaron alteraciones estructurales. Estas cinco muestras de hígado humano fueron las que se usaron como control para el estudio de las colinesterasas (Figuras 12d, 12e, 12f, 12g y 12h).

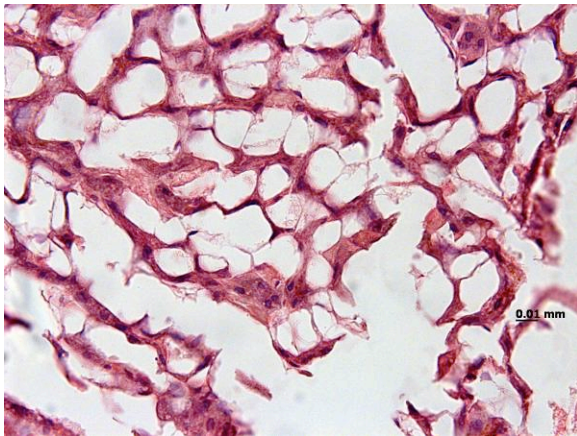


Figura 12a. Corte transversal de hígado humano. Se observa que el tejido presenta lisis hepática y esteatosis macrovesicular y pérdida de citoplasma. Tinción hematoxilina-eosina. X400

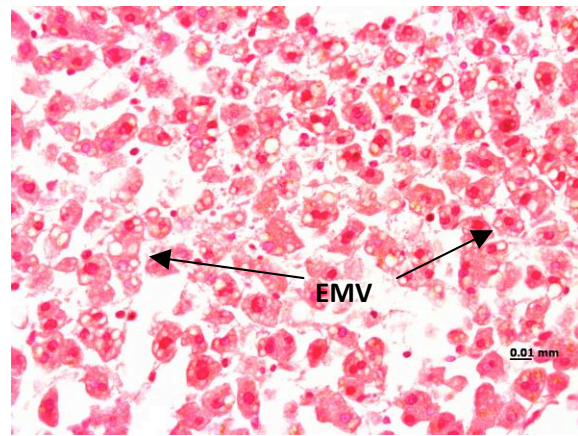


Figura 12b. Corte transversal de hígado humano. Tejido hepático con esteatosis microvesicular. Se logra observar pequeñas vesículas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos. EMV: esteatosis microvesicular. Tinción hematoxilina-eosina. X400.

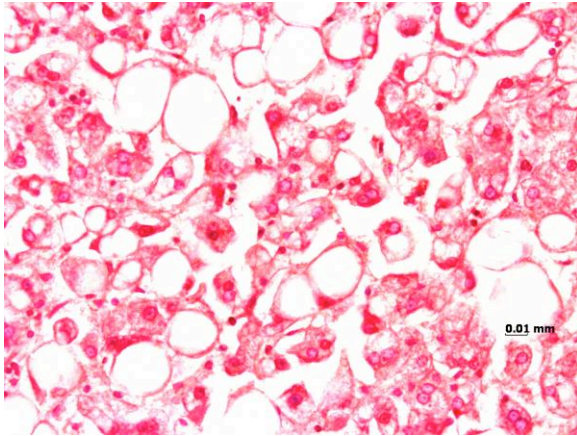


Figura 12c. Corte transversal de hígado humano. Se observa tejido hepático con esteatosis macrovesicular. Se observa como una vesícula desplaza al núcleo hacia la membrana plasmática del hepatocito (*). EMaV: esteatosis macrovesicular. Tinción hematoxilina-eosina. X400.

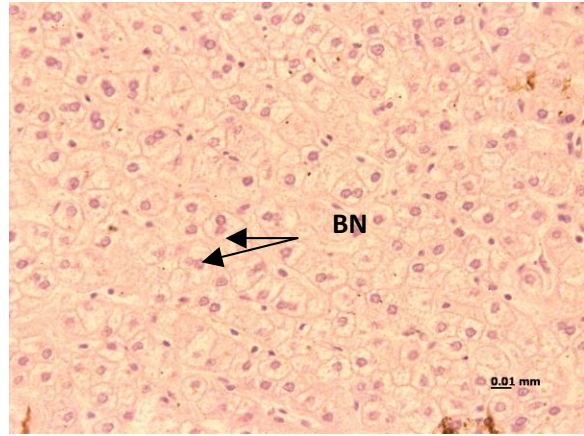


Figura 12d. Corte transversal de hígado humano. Se observa tejido hepático sin anomalías histológicas (sano). Se logran observar algunos hepatocitos binucleados (BN). Tinción hematoxilina-eosina. X400.

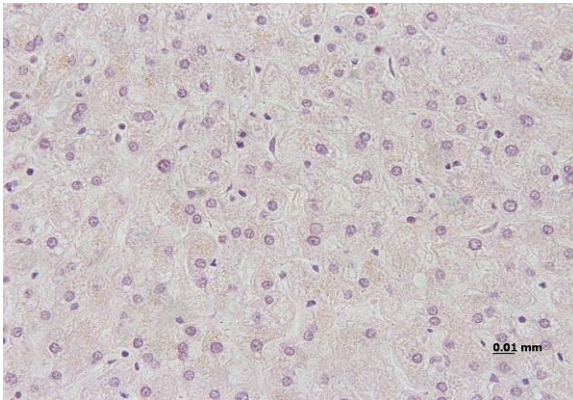


Figura 12e. Corte transversal de hígado humano. Tejido hepático sin cambios histológicos (sano). Tinción hematoxilina-eosina. X400.

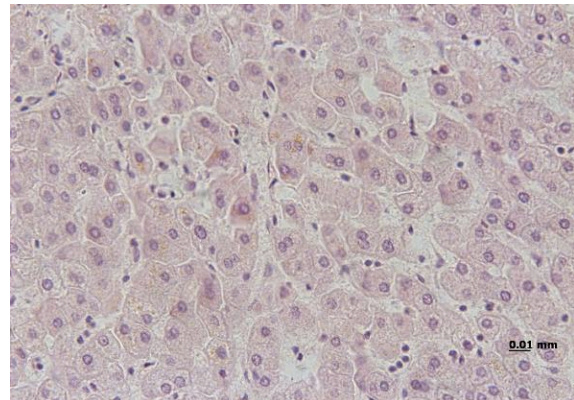


Figura 12f. Corte transversal de hígado humano. Tejido hepático sin cambios histológicos (sano). Tinción hematoxilina-eosina. X400.

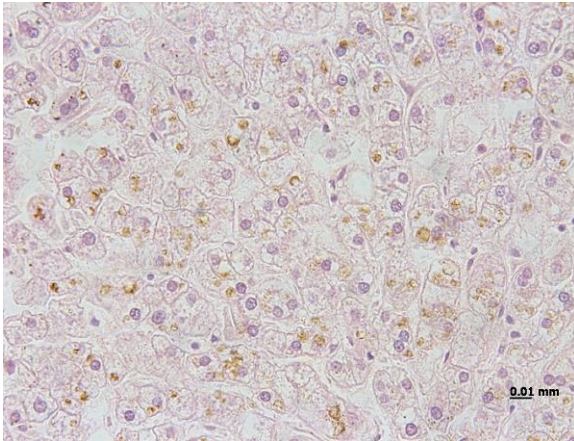


Figura 12g. Corte transversal de hígado humano. Tejido hepático sin cambios histológicos (sano). Tinción hematoxilina-eosina. X400.

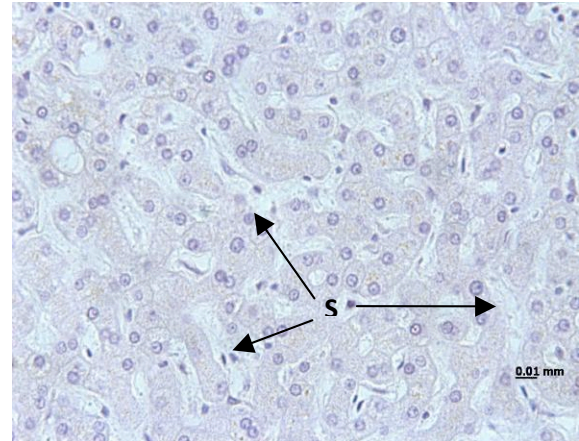


Figura 12h. Corte transversal de hígado humano. Tejido hepático sin cambios histológicos (sano). Se logran ver los sinusoides (S). Tinción hematoxilina-eosina. X400.

7.1d. Estimación de la actividad acetilcolinesterasa y butircolinesterasa en hígado humano

Previo al análisis de la actividad enzimática, se cuantificaron los contenidos de proteínas totales en las diferentes etapas de solubilización. Como se puede observar en la Figura 13, las cantidades de proteína fueron similares entre las fracciones S_1 (55%) y S_2 (45%), no encontrándose diferencias significativas.

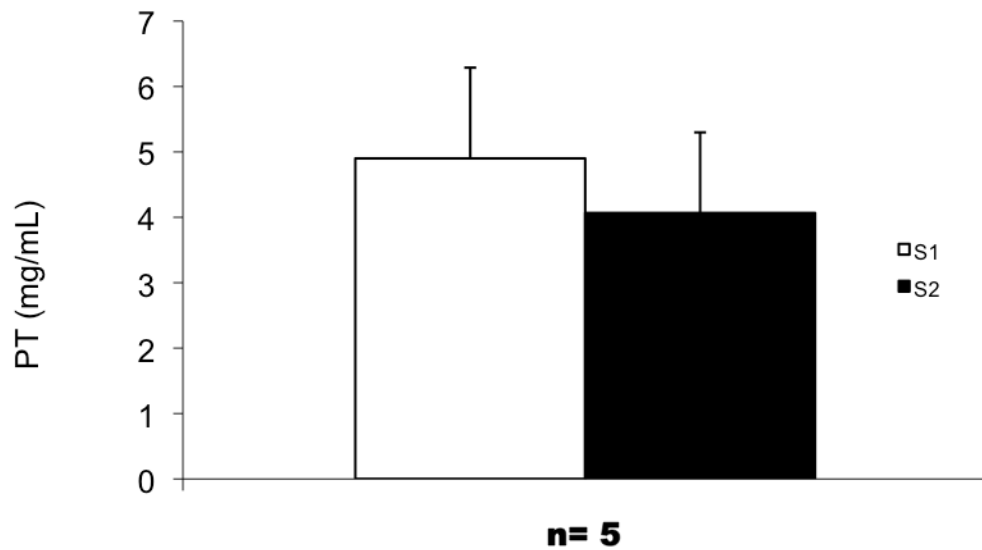


Figura 13. Contenido de proteínas totales en las fracciones S₁ y S₂ de hígado humano estimado por el método de Bradford. La fracción S₁ representa la concentración de proteína total solubilizada sólo con fuerza iónica y la fracción S₂ la concentración de proteína total extraída con detergente (Brij 97). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizada en cinco muestras, el ensayo de Bradford se realizó por triplicado. En el eje de Y se muestra el contenido de proteínas totales (PT) expresado en miligramo de proteína por mililitro (mg/mL). En el eje X se presentan las fracciones analizadas.

El análisis de la actividad AChE mostró que el hígado humano contiene una mayor proporción de enzima fuertemente ligada (66%) que débilmente unida a las membranas (Figura 14), encontrándose diferencias significativas.

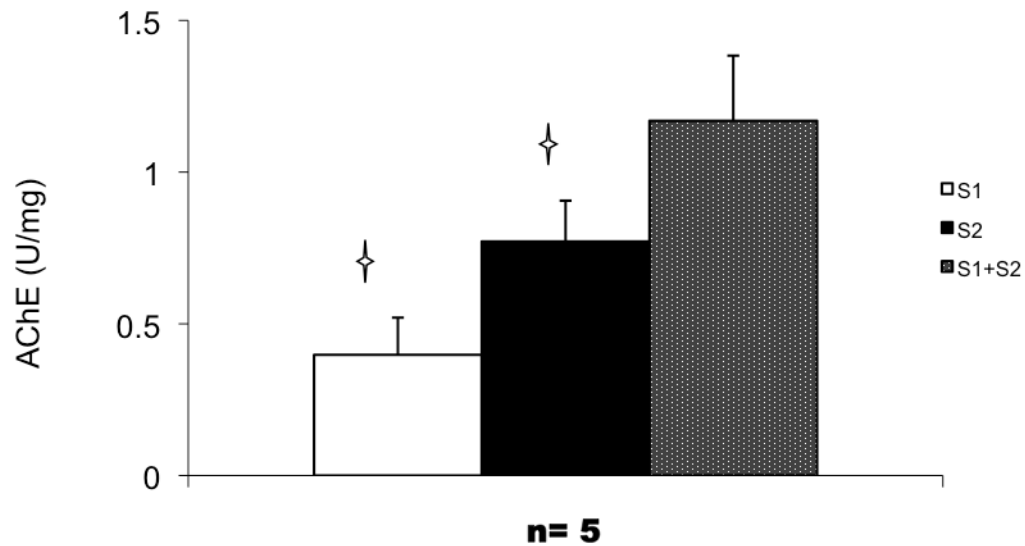


Figura 14. Actividad acetilcolinesterásica solubilizada de hígado humano mediante método secuencial. Se determinó la actividad empleando 25 μ L de muestra de las fracciones S₁ (representa la enzima débilmente unida a la membrana) y S₂ (fracción de enzima fuertemente unida a la membrana) usando el Método de Ellman y colaboradores (1961). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizada en cinco muestras, el análisis de la actividad enzimática se realizó por triplicado. En el eje Y se expone la actividad enzimática de AChE expresada en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). En el eje X se expresan las fracciones S₁, S₂ y S₁ + S₂ (la suma de la fracción S₁ y la fracción S₂). La estrella indica diferencia estadística *P <0.05.

El mismo comportamiento se observó en el análisis de la actividad butirilcolinesterásica (Figura 15); solo se extrajo un 36% por fuerza iónica (S₁) y el resto (64%) requirió detergente (S₂), lo cual indicó que el hígado sintetiza ambas enzimas, las que se extraen con detergentes para exportarlas preferentemente a la membrana plasmática y las que se extraen sólo con sales para liberarlas al medio extracelular. Se encontraron diferencias significativas.

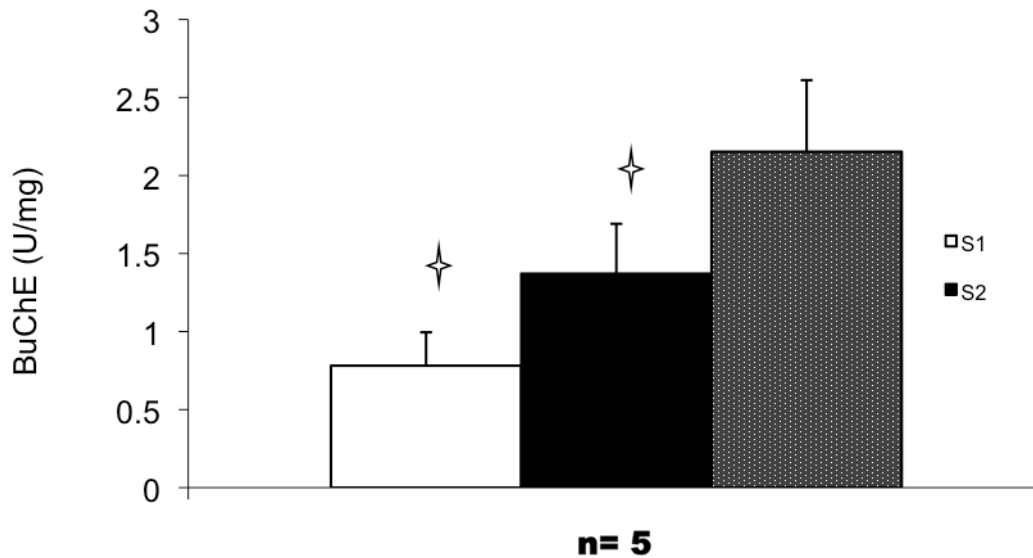


Figura 15. Actividad butirilcolinesterásica solubilizada de hígado humano usando método secuencial. Se determinó la actividad empleando 25 μ L de muestra de las fracciones S₁ (representa la enzima débilmente unida a la membrana) y S₂ (fracción de enzima fuertemente unida a la membrana). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizada en cinco muestras, el análisis de la actividad enzimática se realizó por triplicado. En el eje Y se expone la actividad enzimática de BuChE expresada en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). En el eje X se expresa las fracciones S₁, S₂ y S₁ + S₂ (Suma de la fracción S₁ y la fracción S₂). La estrella indica diferencias estadísticas con *P < 0.05 entre las fracciones S₁ y S₂.

Al comparar la actividad entre ambas colinesterasas, se observó que fue casi dos veces mayor la actividad BuChE respecto al valor promedio de la actividad AChE, siendo significativo, confirmando que el hígado es el principal órgano encargado de la síntesis de BuChE (Figura 16) (Arpagaus, et al 1991).

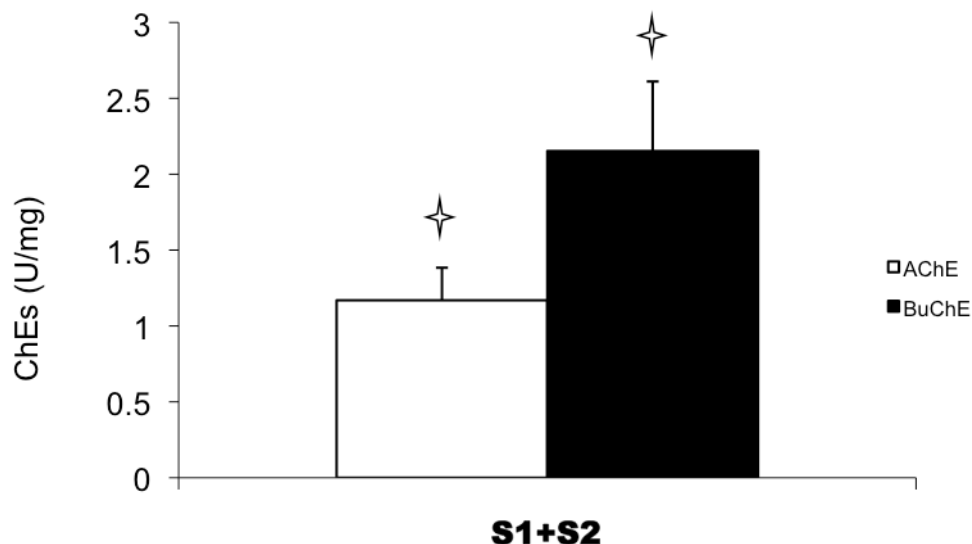


Figura 16. Actividad colinesterásica específica solubilizada de hígado humano. Los valores mostrados representan la suma de las fracciones S_1 y S_2 ($S_1 + S_2$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizada en 5 muestras. En el eje Y se expone la actividad enzimática de AChE y BuChE (ChEs) expresada en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). En el eje X se expresa la fracción $S_1 + S_2$ (Suma de la fracción S_1 y la fracción S_2) de cada una de las colinesterasas. La estrella indica diferencias estadísticas con $*P \leq 0.05$ en las actividades AChE y BuChE.

7.2. Actividad acetilcolinesterásica y butirilcolinesterásica en células de hepatoblastoma HepG2

Al igual que para el hígado, primero se cuantificó el contenido de proteínas totales (Figura 17) no se encontraron diferencias significativas. Se determinó que el contenido en ambas fracciones fue muy similar, para la etapa S_1 representó un 51% y para la fracción S_2 un 49%.

En cuanto a la actividad acetilcolinesterásica en las células HepG2 ($n=3$), hubo una mayor actividad débilmente unida a membrana (S_1) (68%), que fuertemente unida a membrana (S_2) (32%) (Figura 18). Un comportamiento similar se encontró en la

actividad butirilcolinesterasa donde la fracción S_1 representó un 60% y la fracción S_2 un 40% (Figura 18).

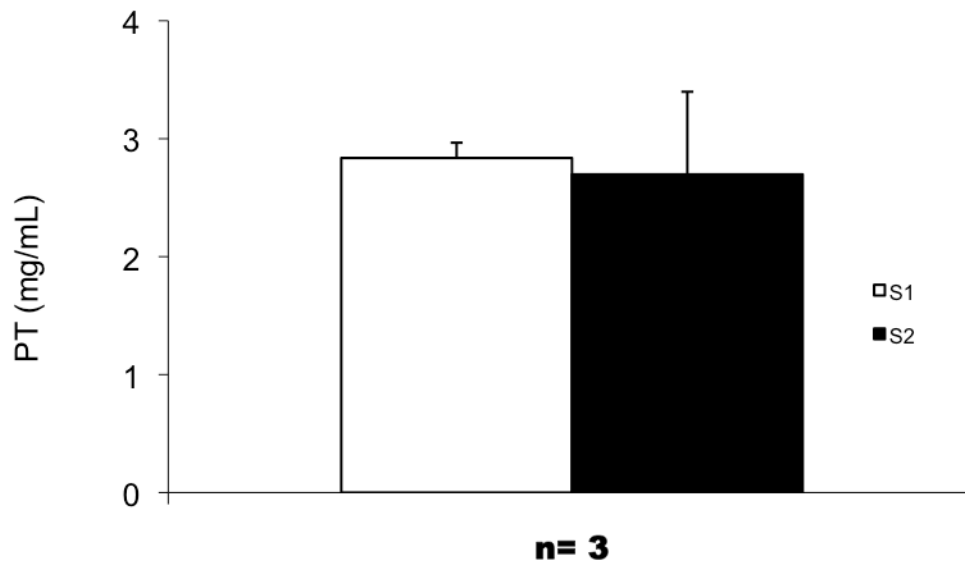


Figura 17. Contenido total de proteínas en las fracciones obtenidas por método secuencial de extracción de células de hepatoblastoma HepG2 estimado por el método de Bradford. La fracción S_1 representa la cantidad de proteína total solubilizada sólo con fuerza iónica y la fracción S_2 la extraída con detergente (Brij 97). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizado a 3 cultivos celulares, el ensayo de Bradford se realizó por triplicado. En el eje de Y se expone el contenido de proteínas totales (PT) expresado en miligramo de proteína por mililitro (mg/mL). En el eje X se expone las fracciones analizadas.

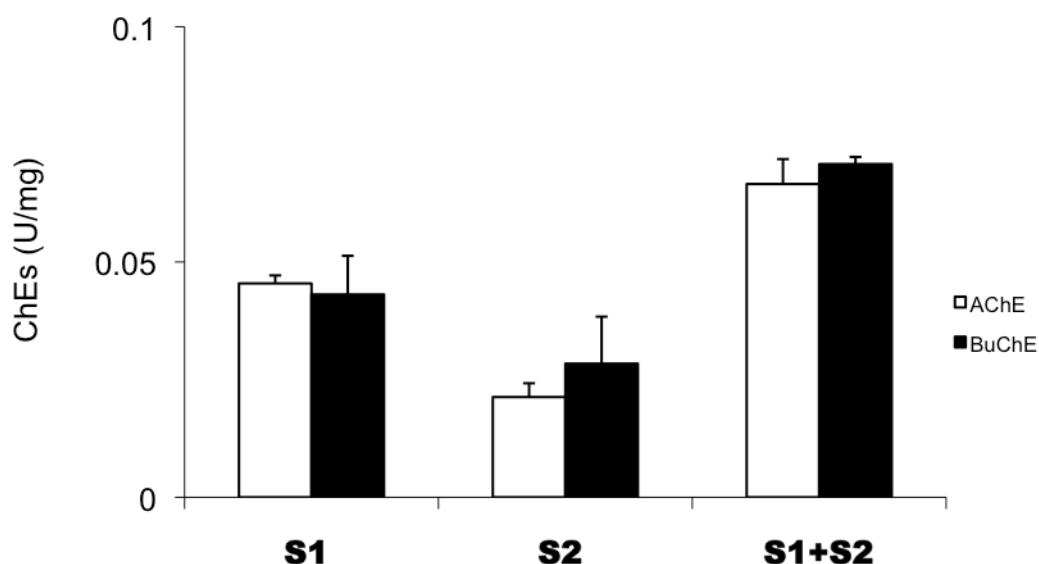


Figura 18. Actividad colinesterásica específica en células de hepatoblastoma HepG2. Los valores para S1+S2 mostrados representan la suma de ambas fracciones considerándose como la actividad total extraída de las células. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizado a 3 cultivos celulares. En el eje Y se expone la actividad enzimática de AChE y BuChE (ChEs) expresada en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). En el eje X se expresa las fracciones S₁, S₂ y S₁ + S₂ (la suma de la fracción S₁ y la fracción S₂).

Al contrario de lo que ocurre en el hígado sano, en las células HepG2 no hubo una síntesis significativa preferencial en una de las colinesterasas (Figura 18), lo cual representa un hallazgo relevante, pues parece señalar que la BuChE, es la enzima blanco en el hepatocarcinoma.

En el mismo análisis comparativo se encontró en la línea celular de hepatoblastoma que la actividad de ambas colinesterasas estaba muy disminuida (Figura 19). En las células HepG2 la actividad AChE en las preparaciones S₁+S₂ (0.07 U/mg) fue unas 20 veces menor que en las correspondientes de hígado (1.25 U/mg). Por su parte, la actividad BuChE en S₁+S₂ de las células de hepatoblastoma (0.08 U/mg) fue cerca

de 30 veces menor que en los extractos de hígado (2.2 U/mg), encontrándose amplias diferencias significativas en los comparativos entre muestras de hígado humano y las células HepG2. Todo ello sugiere que durante la proliferación celular descontrolada se induce una represión directa o indirecta en la expresión génica y/o proteica en ambas enzimas o bien que en las células en cultivo normales o cancerosas expresan poca actividad AChE y BuChE debido a la falta de señales nerviosas y hormonales, así como la ausencia de factores tróficos procedentes del medio externo y de las células de su entorno.

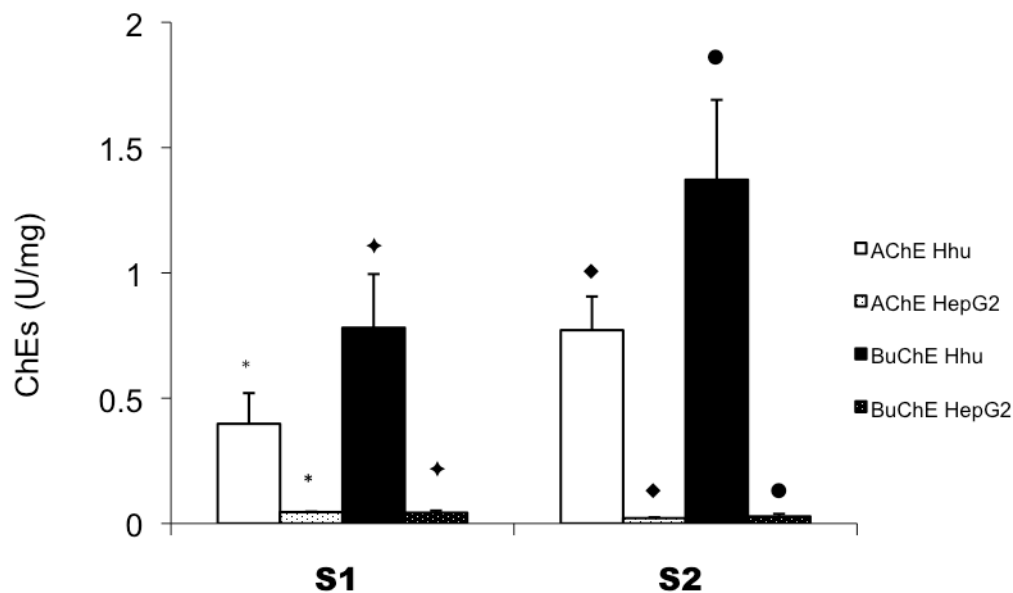


Figura 19. Análisis comparativo entre las diferentes etapas de solubilización de las ChEs en hígado humano (Hhu) y células HepG2. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de la extracción realizada en 5 muestras de hígado y 3 cultivos celulares HepG2. En el eje Y se expone la actividad enzimática de AChE y BuChE (ChEs) expresada en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). En el eje X se expresa las fracciones S₁ y S₂. Los símbolos indican diferencias estadísticas con $^{*♦♦♦}P \leq 0.05$ en las actividades AChE y BuChE de hígado humano y las respectivas actividades de las células de hepatoblastoma HepG2.

7.3. Estudio del Procesamiento post-traduccional de las colinesterasas de hígado humano y células HepG2

El análisis del perfil glicoproteico es específico para cada colinesterasas y es indicador del estado del procesamiento post-traduccional. Como se muestra en las Figuras 20 y 21, tanto AChE como BuChE de hígado o de células HepG2 fueron reconocidas, en mayor o menor grado, por las lectinas Con A, LCA, WGA y RCA, indicando que durante su paso por el retículo endoplásmico rugoso (RER) y las cisternas del Complejo de Golgi, ambas enzimas habían incorporado cantidades variables de manosa (Con A), manosas con centros de fucosa (LCA), N-acetilglucosamina o ácido siálico (WGA) y galactosa (RCA). Llama la atención la menor interacción con lectinas de la AChE en las células HepG2 que en hígado, encontrándose diferencias significativas, lo que cabe atribuir a cambios en el repertorio de glicosil-transferasas en las células cancerosas. Se desconoce si este mismo fenómeno ocurre en células aisladas de hígado normal.

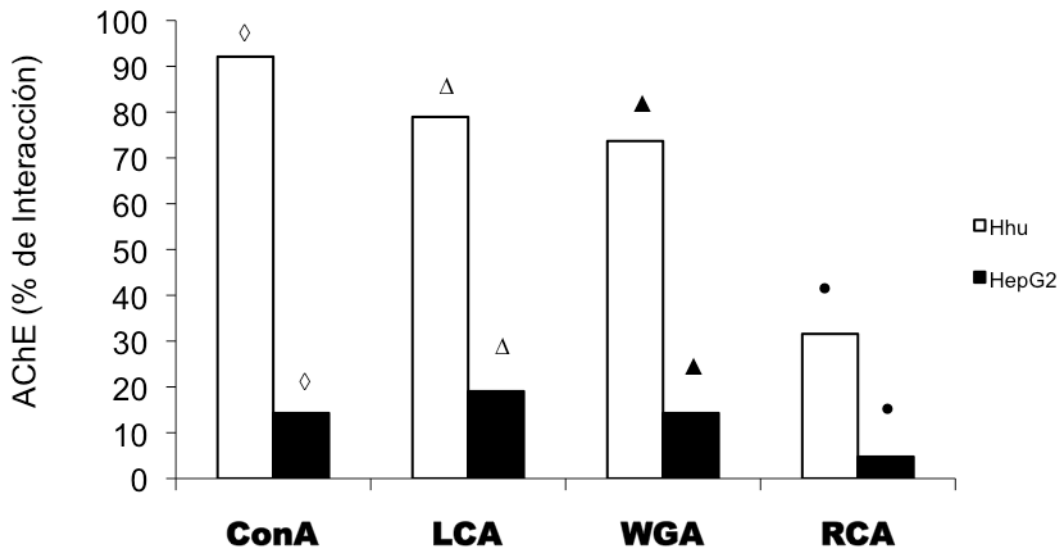


Figura 20. Perfil de interacción de la AChE de las células HepG2 y el hígado humano, con lectinas de distinta especificidad. La mezcla de los sobrenadantes S_1 y S_2 ($S_1 + S_2$) de hígados humanos (Hhu) se pusieron a interaccionar con cada lectina por 16 h a 4°C . Lo mismo se hizo con los sobrenadantes de las células HepG2. Con A reconoce a manosa, LCA reconoce a manosa en oligoglicanos con fucosa, WGA reconoce a N- acetilglucosamina y a ácido siálico, RCA reconoce a galactosa. En el eje Y se expone la actividad enzimática de la AChE expresada en porcentaje de interacción con la lectina específica. En el eje X se exponen las diferentes lectinas a las cuales fueron expuestas por separado tanto las células HepG2 como los hígados humanos. Los símbolos indican diferencia estadística con $\diamond\triangle\bullet P \leq 0.05$ entre los porcentajes de interacción de la AChE de hígado humano respecto a la interacción de la actividad respectiva en las células HepG2.

En cuanto a interacción de la BuChE de hígado normal sano y de las células HepG2, se encontró que presentan un patrón similar de incorporación de azúcares durante su procesamiento post-traducciona, salvo que la incorporación de galactosa fue mucho mayor que en el hígado sano, indicando una alteración en el proceso de incorporación de carbohidratos en el retículo endoplásmico rugoso y en las cisternas del Complejo de Golgi. Por otro lado, el aumento en la incorporación de galactosa parece señalar anomalías en las galactosiltransferasas específicas.

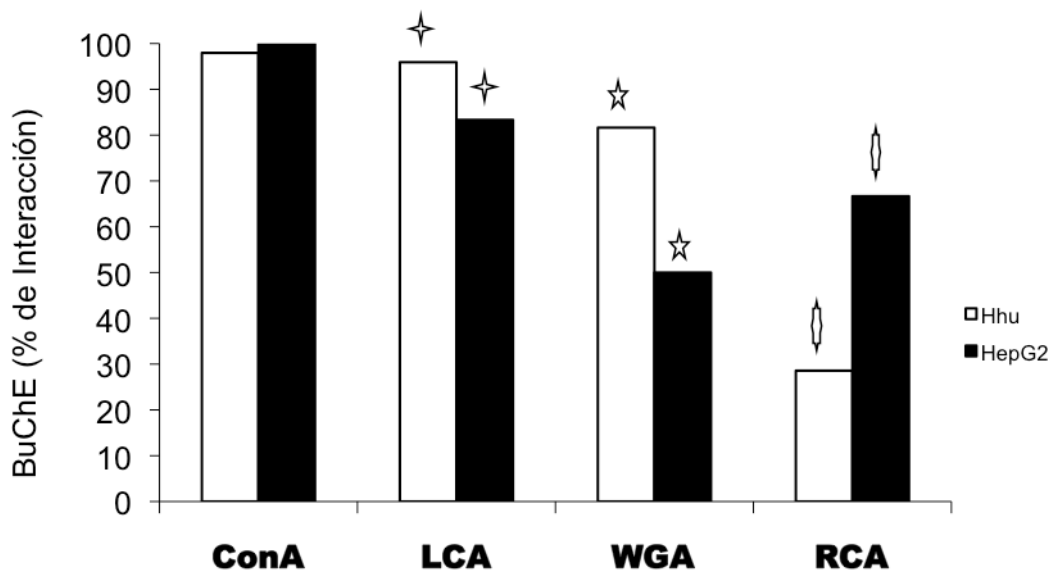


Figura 21. Interacción de la BuChE de las células HepG2 y el hígado humano con lectinas de distinta especificidad. La mezcla de los sobrenadantes S₁ y S₂(S₁+S₂) de hígados humanos (Hhu) se pusieron a interactuar con lectina por 16 h a 4°C. Lo mismo se realizó con los sobrenadantes de las células HepG2. Con A reconoce a manosa, LCA reconoce a manosa en oligoglicanos con fucosa, WGA reconoce a N- acetilglucosamina y ácido siálico, RCA reconoce a galactosa. En el eje Y se expone la actividad enzimática de la BuChE expresada en porcentaje de interacción con la lectina específica. En el eje X se exponen las diferentes lectinas a las cuales fueron expuestas por separado tanto para las células HepG2 como para los hígados humanos. Los símbolos indican diferencia estadística con $\diamond\star P \leq 0.05$ entre los porcentajes de interacción de la AChE de hígado humano respecto a la interacción de la actividad respectiva en las células HepG2.

7.4. Análisis de la expresión de los genes AChE y BuChE en tejido hepático sano y en las células HepG2

Como se ha establecido en párrafos anteriores, el hígado humano presenta actividad AChE y BuChE, pero se desconocen los transcritos involucrados. Para esto, se aisló el ARNm total de hígado humano, en cual se determinó la integridad de ARNm en un

gel de agarosa al 1.2%. Donde se observó que se obtuvo una buena extracción de ARNm de hígado humano.

Para establecer las condiciones óptimas para la reacción de amplificación con los oligos específicos de AChE, se realizó un gradiente de temperaturas con el que se determinó que la temperatura de alineamiento óptima para detectar la expresión del transcrito AChE-T, fue de 59 °C con 5 µl de ADNc obtenido de la reacción de retrotranscripción (Figura 22), de 62 °C para el transcrito AChE-R (Figura 23), para el transcrito AChE-H, no fue necesario hacer un gradiente de temperatura, puesto que la expresión de este se consiguió identificar en la primera prueba, la cual se realizó a los 59 °C.

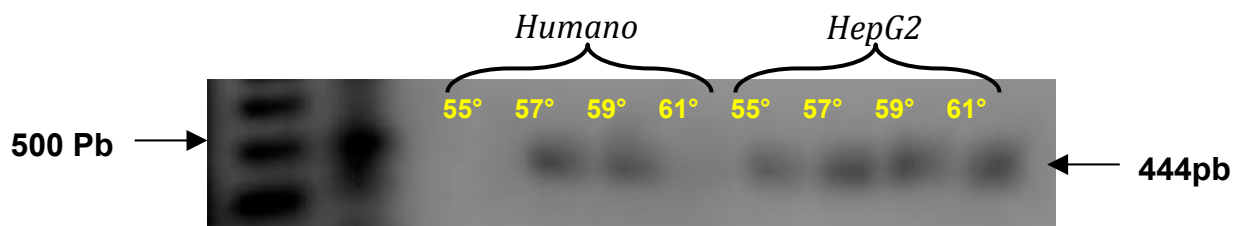


Figura 22. Detección del transcrito AChE-T en hígado humano. Separación de productos de amplificación de un gradiente de temperatura en un gel de agarosa al 1%. Temperatura empleada 55, 57, 59 y 61 °C. La mejor temperatura considerada por nosotros para expresar este transcrito fue de 59°C. La PCR se realizó por tetraplicado de una sola muestra tanto para la línea celular HepG2 como para el hígado humano

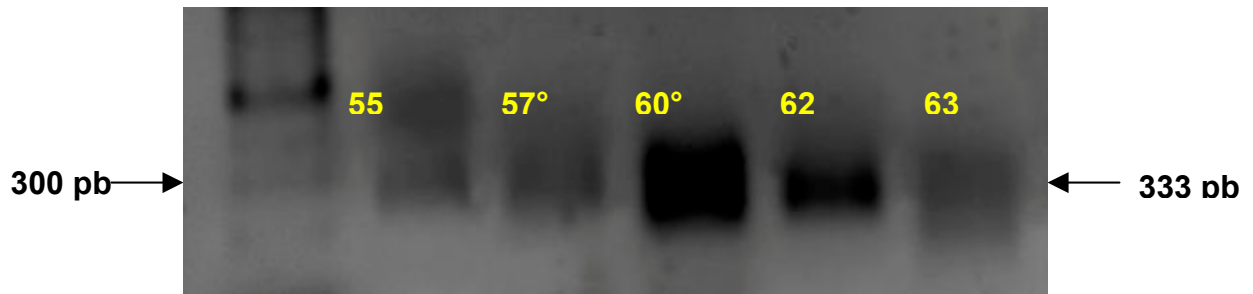


Figura 23. Determinación de la temperatura óptima de amplificación del transcrito AChE-R, de hígado humano. En un gel de agarosa al 1% se separaron los productos de amplificación de un gradiente de temperatura. Temperatura empleada; 55, 57, 60, 62 y 63 °C. La temperatura escogida por nosotros para expresar este transcrito fue 62°C. La PCR se realizó a las cinco muestras de hígado humano.

Para la detección de transcritos de BuChE encontramos que la mejor temperatura era de 59 °C (Figura 24)

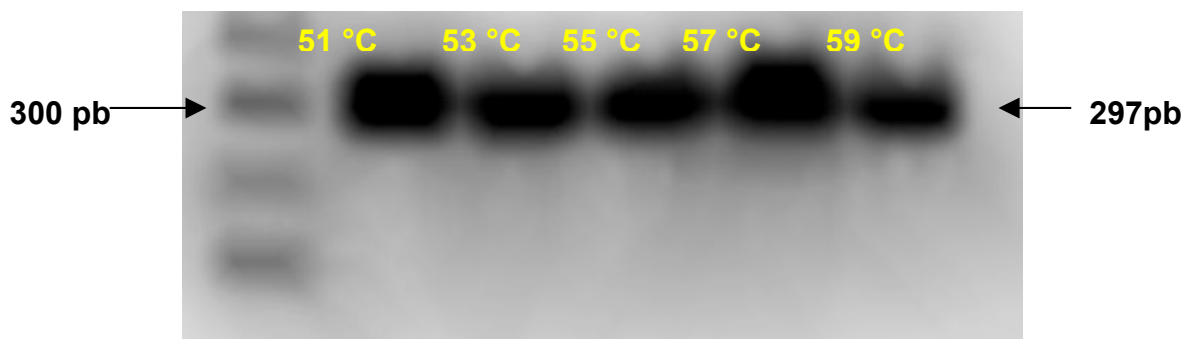


Figura 24. Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de los transcritos de BuChE de hígado humano, a través de gradiente de temperatura. En un gel de agarosa al 1% se visualizaron los amplicones usando bromuro de etidio. Temperatura empleada: 51, 53, 55, 57 y 59 °C. La mejor temperatura considerada por nosotros para expresar este transcrito es a 59 °C. La PCR se realizó en cinco muestras de hígado humano.

Los resultados para la detección de la expresión de transcritos mostraron que el hígado humano expresaba los tres transcritos: AChE-T, AChE-H y AChE-R. (Figuras 25 a 27). Cabe señalar, que el transcrito AChE-T, también se expresa en el sistema nervioso central y muscular.



Figura 25. Determinación de los amplicones del RNA mensajero de AChE-T en hígado humano. La temperatura de alineamiento fue de 59 °C y los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. La PCR se realizó en cinco muestras de hígado humano.

Siguiendo con el análisis molecular, para establecer la expresión de otros tipos de transcritos, los productos de amplificación usando cebadores para AChE-R y AChE-H, se determinó que éstos también se expresaban en el hígado humano (Figura 26 y 27, respectivamente).

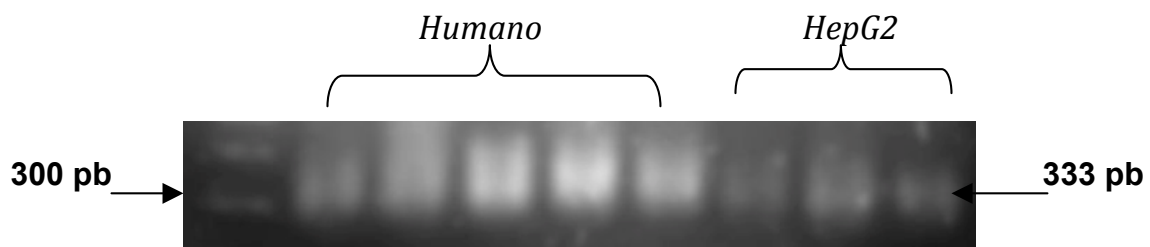


Figura 26. Determinación de productos de amplificación de los transcritos AChE-R en la línea celular de hepatoblastoma HepG2 y el hígado humano sano. Se empleó la temperatura de alineamiento de 62 °C y los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. La PCR se realizó en cinco muestras de hígado humano y en tres cultivos celulares de la línea HepG2.

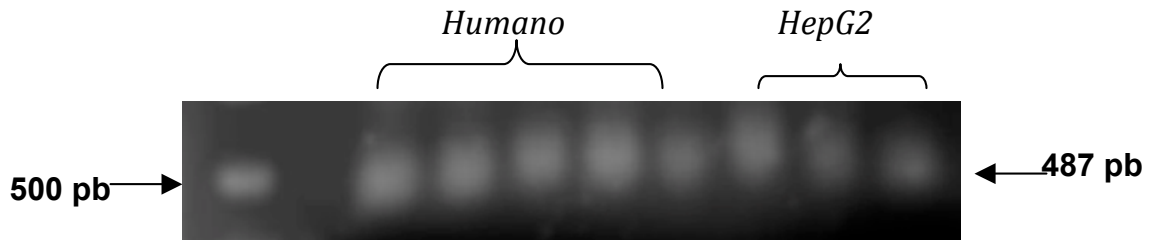


Figura 27. Determinación de productos de amplificación de los transcritos AChE-H en la línea celular de hepatoblastoma HepG2 y el hígado humano sano. Se empleó la temperatura de alineamiento de 59 °C y los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. La PCR se realizó en cinco muestras de hígado humano y en tres cultivos celulares de la línea HepG2.

Al analizar los mensajeros de AChE en la línea celular HepG2, se encontró que al igual que el hígado humano, las células expresaban los tres mensajeros para AChE, es decir, el ARNm T, ARNm H y ARNm R (Figuras 28, 26 y 27, respectivamente), lo cual parece señalar, que la baja actividad AChE en las células HepG2 no se debe a una incapacidad de las células para expresar alguno de los transcritos, sino posiblemente a un descenso importante en su nivel de expresión.



Figura 28. Determinación de productos de amplificación de los transcritos AChE-T en la línea celular de hepatoblastoma HepG2. Se empleó la temperatura de alineamiento de 59 °C y los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. La PCR se realizó en tres cultivos celulares de la línea HepG2.

Tanto en las células HepG2 y el hígado humano, encontramos la expresión de BuChE (Figura 29).

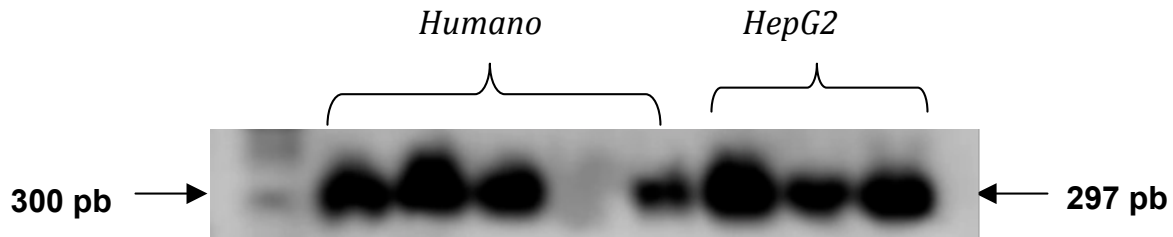


Figura 29. Determinación de productos de amplificación de los transcritos de BuChE en la línea celular de hepatoblastoma HepG2 y el hígado humano. Se empleó la temperatura de alineamiento de 59 °C y los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. %. La PCR se realizó en cinco muestras de hígado humano y en tres cultivos celulares de la línea HepG2.

8. DISCUSIÓN

El gen de acetilcolinesterasa codifica tres mRNAs distintos, cuyas proteínas codificadas generan una amplia variedad de formas moleculares, entre las que se incluyen: monómeros y dímeros sin y con enlace glicofosfatidilinositol, tetrámeros libres y anclados a las membranas celulares internas y externas, y formas asimétricas A_4 , A_{12} plasmática, teniendo una amplia distribución en todos los tejidos (Soreq y Seidman, 2001).

Existen evidencias de que la proteína AChE está presente en las células hepáticas (Berninsone, *et al*, 1989). En un primer acercamiento para asegurar una extracción total de las colinesterasas y estimar de manera fiable su actividad, se decidió realizar la solubilización en el hígado humano usando los detergentes: Triton X-100 y Brij 97, ambos al 1% p/v. Los resultados mostraron que la cantidad de proteína total

extraídas fue mayor con Triton X-100 (2.85 ± 0.011 mg/ml) que Brij 97 (2.14 ± 0.011 mg/ml) (Tabla 5).

Al analizar los resultados de la solubilización de ambas colinesterasas hepáticas, se observó que, en el caso de la actividad acetilcolinesterásica (Figura 7), el Triton X-100 y el Brij 97 presentaron la misma eficiencia. En cuanto al efecto de los detergentes sobre la actividad BuChE, se esperaban los mismos resultados que para AChE. Sin embargo, se observó que la actividad BuChE recuperada en la fracción S₂ fue mayor con Brij 97 (2.54 ± 0.055 U/mg) que con Triton X-100 (1.66 ± 0.053 U/mg) (Figura 8). Esto señaló que para extraer de proteína total era más adecuado el Triton X-100 (2.85 ± 0.011 mg/ml). Para solubilizar la actividad AChE se podría usar cualquiera de los dos detergentes, mientras que para BuChE era preferible el Brij 97.

La valoración de la BuChE mostró que su actividad era menor con Triton X-100 que con Brij 97, lo cual no significa que el primer detergente sea menos eficaz a la hora de extraer la enzima. Se ha observado que la actividad BuChE es inhibida por la mezcla de sales y Triton X-100 (Moral-Naranjo *et al* 1996). A este respecto, la acción inhibidora del Triton X-100 se relaciona con el hecho de que las moléculas del detergente bloquean el acceso del sustrato al sitio catalítico (Li *et al.*, 2000).

Una siguiente etapa de análisis fue esclarecer el tipo de efecto inhibitor del Triton X-100 sobre la actividad BuChE. Para ello, se preparó una disolución de Brij 97 (1% p/v) que se agregó al amortiguador de medida. Los resultados mostraron que la

adición de Brij 97 al medio de medida eliminaba parcialmente el efecto inhibitorio (Triton X-100: 1.66 ± 0.053 U/mg frente a Triton X-100/Brij 97 1%: 2.00 ± 0.081 U/mg) (Figura 9). Una reducción del efecto inhibitorio podría relacionarse a una interacción directa entre ambos detergentes, generando micelas combinadas y dejando libre el acceso del sustrato al sitio catalítico.

Lo anterior nos lleva a proponer que, para la extracción de las enzimas del sistema colinérgico, el detergente adecuado es Brij 97, debido a que con éste se obtuvo una mejor solubilización de AChE y BuChE y una menor cantidad de proteína, con lo que mejora la actividad específica. Por otro lado, si se utiliza Triton X-100 es necesario aplicar las modificaciones que aquí presentamos para la estimar la actividad BuChE.

Las actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se han detectado principalmente en el sistema nervioso central (Dori, Soreq 2006, Perrier, *et al* 2005, Deutsch, *et al* 2002), músculo y células sanguíneas (Soreq, *et al* 1990, Deutsch, *et al* 2002, Gómez *et al.*, 1999, 2003).

Dado, que el hígado es un tejido altamente irrigado, se hizo necesario realizar una perfusión hepática para descartar la actividad colinesterásica en los eritrocitos, linfocitos y plasma. En la Figura 11, se observó que con la perfusión hubo una disminución significativa en la actividad AChE de 39.72 ± 1.71 U/g a 25.31 ± 3.72 U/g. Al analizar por separado la actividad enzimática (sin perfusión y con perfusión), se encontró que con la perfusión, la actividad de la AChE fuertemente unida a las membranas (fracción S_2), disminuyó de 15.98 ± 2.77 U/g a 3.08 ± 0.55 U/g. El hecho

de que la actividad AChE sólo haya disminuido en la fracción S₂, parece relacionarse con la expresión del transcrito AChE-H y de la proteína producto en los eritrocitos y linfocitos. La proteína AChE se puede presentar en forma de monómeros y dímeros anclados a la membrana por un enlace glicofosfatdilositol (Soreq, *et al* 1990, Deutsch, *et al* 2002, Gómez y Vidal, 2003), por lo que se trata de formas moleculares anfífilas, que requieren detergentes para su solubilización.

Cuando se realizó la comparación entre las actividades AChE y BuChE se observó que el hígado humano presento una mayor actividad de BuChE que AChE, confirmando que el hígado es el principal órgano encargado de la síntesis de BuChE (Figura 16) (Lockridge 1988; Arpagaus, *et al* 1991).

Un análisis detallado de ambas colinesterasas, mostró que el hígado sintetiza más enzimas fuertemente unidas a membranas que débilmente ligadas (Figuras 14 y 15), lo cual nos hace pensar que los hepatocitos sintetizan dos tipos de enzimas cuyo destino de exportación es distinto; 1) enzimas dirigidas a la membrana plasmática y 2) enzimas que serán vertidas al espacio extracelular. En la fracción S₁ se supone que se separan aquellas enzimas que están débilmente unidas a membranas y/o son de exportación al torrente sanguíneo. No obstante, hay que recalcar que para confirmar este comentario, se requieren realizar análisis de interacción con matrices hidrofóbicas y comparar las formas moleculares del hígado y plasma.

Por otro lado, el hecho que los hepatocitos sintetizen preferentemente BuChE tiene una importancia fisiológica. Se ha comprobado que BuChE es una enzima que

participa en la desintoxicación de algunas drogas como cocaína y la heroína, fármacos como aspirina, paracetamol y el anestésico succinilcolina. Respecto, a éste último en personas con la ausencia de actividad BuChE, se ha observado que presentan efectos prolongados de apnea (2 y 3 horas), a diferencia de lo que ocurre en individuos con actividad BuChE normal, cuyos periodos de apnea son sumamente cortos (3 a 5 minutos) (Liddell, 1962; Hodgkin, 1965). Además, se ha informado que la BuChE parecer estar relacionada con el metabolismo de lípidos (Iwasaki, 2007), esto debido probablemente a que se genera como metabolito a la butirilcolina (Clitherow J.W., *et al*, 1963), el sustrato preferente de la BuChE.

Otro punto a considerar, se refiere a que la función de la AChE en el hígado no se conoce. Perelman y Brandan (1989) sugieren que puede estar actuando como un filtro hidrolítico para la ACh de la circulación sanguínea y degradación de drogas y agentes anti-ChE (Schwarz, *et al*, 1995), debido al elevado grado de irrigación sanguínea que presenta el hígado. García-Ayllón y colaboradores (2006) señalan que la disminución en los niveles de AChE sérica y los patrones de glicosilación en ratas cirróticas, pueden ser usados como marcadores de cirrosis hepática. Además, la BuChE puede cumplir un papel de protección para la AChE localizada en las uniones neuromusculares y en otros sitios colinérgicos, evitando la inactivación (Neville *et al.*, 1990; Soreq, *et al.*, 1992). Esta última observación, también podría considerarse para la BuChE hepática, dada su abundancia en el hígado y su capacidad de hidrolizar acetilcolina. Además, este órgano está profusamente irrigado por la sangre e igualmente innervado (Gómez, *et al* 2000).

Las células de hepatoblastoma humano (HepG2) crecen en monocapa, razón por la que fue necesario desprenderlas del sustrato de cultivo para someterlas al procedimiento secuencial de solubilización de las colinesterasas. En la figura 18 se muestra que las células HepG2 sintetizan cantidades semejantes de AChE y BuChE, pero en todo caso son mucho menores que el hígado. Al comparar las actividades AChE y BuChE en el hígado y en las células HepG2 se observó que la enzima que se ve alterada en las células de hepatoblastoma fue principalmente la BuChE, cuya determinación se ha empleado en la evaluación de diagnóstico y pronóstico en distintas enfermedades hepáticas (Uete, *et al* 1985). En los sueros de pacientes con cirrosis hepática y con hepatoma se modifica el patrón de componentes de la BuChE (Matsuzaki, *et al* 1980), incluso, se ha observado que es BuChE la que se expresa en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Layer y Sporns 1987; Jbilo, *et al* 1994), lo que indica que este gen podría ser importante para que la embriogénesis transcurra correctamente. Teniendo en cuenta, la baja actividad de BuChE observada en las células HepG2, se podría suponer que esta relacionada con la transformación celular, siendo un blanco pronóstico potencial para hepatoma.

Al comparar la actividad enzimática de BuChE y AChE en las células HepG2 y el tejido hepático sano se encontró una menor actividad de ambas actividades en las células HepG2 (Figura 19). Cabe señalar que este mismo comportamiento se ha observado en tumores de mama, colon y ganglios linfáticos (Vidal 2005). A este

respecto, se ha propuesto que el descenso de la actividad AChE puede estar relacionado con la transformación maligna (Park, *et al* 2004).

Aunque no se conocen los mecanismos moleculares involucrados en la disminución en las actividades AChE y BuChE, se han propuesto dos hipótesis que se han generado en el transcurso de la investigación de las enzimas colinérgicas y el cáncer. 1) Cuando varios tipos celulares son inducidos a la apoptosis por distintos estímulos, la actividad enzimática de AChE aumenta, sugiriendo que la enzima se comporta como un gen supresor de tumores (Zhang, *et al* 2002; Sang, *et al* 2004). Como la actividad AChE está fuertemente reducida en las células de hepatoblastoma HepG2, dicha función no podría estarse llevando adecuadamente, debido a la baja en actividad de AChE. En las células de hepatoblastoma también observamos una importante disminución en la actividad BuChE, por lo que en el caso de los hepatocitos, probablemente la BuChE realice la misma función de supresor de tumores. 2) En un tejido en particular, al ocurrir una disminución en la actividad y/o contenido de AChE y BuChE, los niveles de acetilcolina (ACh) “aumentarán localmente”; este efecto inducirá un aumento en la proliferación celular, a través de los receptores muscarínicos tipo 3, quienes se han involucrado en los procesos de proliferación celular (Cassiman, *et al* 2002).

Trabajos recientes en carcinoma hepatocelular revelan un importante descenso en la expresión AChE y una caída de la proliferación celular cuando AChE se sobreexpresa o añade al medio de cultivo celular. El mecanismo del arresto en la división celular se ha relacionado con un bloqueo de MAP cinasa, PKB, y con la activación

de glucógeno sintasa-3 β , degradación de β -catenina y supresión de la ciclina D1 (Zhao, *et al* 2011). Todo ello apoya el papel supresor de tumores de AChE, al menos, en carcinoma hepático.

La incorporación del oligosacárido precursor a las colinesterasas ocurre en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y la asociación de este oligosacárido precursor a la proteína se da en el aminoácido asparagina. El proceso de adición o eliminación de azúcares, conocido como glicosilación, se lleva a cabo en el aparato de Golgi, y requiere de una acción secuencial de enzimas localizadas en diferentes regiones del aparato de Golgi, por lo que, en general se acepta que el aparato de Golgi tiene una funcionalidad compartimentalizada. La eliminación de manosa ocurre en las regiones *cis* y *media*, llevada a cabo por la manosidasa I y manosidasa II. La adición de *N*-acetilglucosamina ocurre en la región *medial* llevada a cabo por la enzima *N*-acetilglucosaminotrasferasa I. En la región *trans* ocurre la adición del azúcar galactosa llevado a cabo por la enzima galactosiltransferasa y por último en la red *trans*-Golgi ocurre la adición de ácido siálico por la α -2,6-sialiltransferasa (Jiménez y Merchant 2003).

El proceso de glicosilación es un proceso tejido específico, que transcurre en el retículo endoplásmico rugoso y el Complejo de Golgi de los hepatocitos, que puede ser analizado con lectinas particulares que interaccionan específicamente con ciertos monosacáridos incorporados en las glicoproteínas. En relación a lo anterior, en el hígado humano se observó que AChE y BuChE presentaban un patrón de incorporación de azúcares parecido (Figura 20 y 21). Este análisis glicoproteico nos

revela el patrón de incorporación de azúcares en AChE y BuChE de un hígado sano.

Estudios en diferentes tipos de cáncer han demostrado que ocurren cambios en los azúcares que incorporan distintas glicoproteínas, en comparación con aquellos que han incorporado las glicoproteínas de tejidos control.

En células de hepatoma humano, se han observado cambios en la incorporación de monosacáridos específicos en enzimas como la gamma-glutamyl transpeptidasa, en donde disminuye la interacción con Con-A que reconoce a manosa (Yamamoto, *et al* 1981). Estos cambios, también se han observado en las células de hepatoblastoma HepG2, donde se ha visto una glicosilación anómala en la fosfatasa alcalina secretada respecto a la membranal, debido a que se modifica el nivel de interacción a Con-A (Nowrouzi y Yazdanparast 2005). Los cambios en la incorporación de manosa, también se observaron en la AChE, en la cual hay una disminución significativa en su interacción con la Con-A.

Uno de los azúcares cuyo contenido varía con más frecuencia en el cáncer es el ácido siálico. A este respecto, se ha propuesto que durante el desarrollo y/o mantenimiento del proceso del cáncer se favorece la incorporación de este azúcar a las proteínas, vía sobre-expresión de la enzima beta-galactósido-alfa-2-6-sialiltransferasa (Matsuzaki, *et al* 1980; Alam, *et al* 2005; Gallegos *et al.*, 2008; López y Vallejos, 2007). Los cambios en la interacción con lectinas de AChE y BuChE en hígado humano y en células HepG2 (Figuras 20 y 21) pueden reflejar las distintas

dotaciones de glicosiltransferasas en los hepatocitos y en las células de hepatoblastoma, que pueden ser intrínsecas e independientes de la transformación maligna o una consecuencia de ella. Siendo indispensable realizar más pruebas para aclarar este punto.

La elevada incorporación de ácido siálico es peligrosa, debido a que este azúcar se ha observado que participa en la adhesión celular (López y Vallejo, 2007), por lo que en una célula cancerosa con proteínas de membrana con exceso de ácido siálico propicia la invasión (metástasis) en otros órganos no cancerosos. Teniendo en cuenta, que la glicosilación es tejido específica y que hay una mayor incorporación de galactosa (Figura 21), sería importante comparar la glicosilación entre la BuChE propia del tejido hepático y aquella enzima que ha sido secretada y forma parte del reservorio del plasma. Esto permitiría generar una prueba que permitiría discriminar, si el mecanismo de glicosilación de la BuChE es general, o bien, difiere entre la que será parte del tejido hepático o aquella que se encuentra en el plasma.

Por lo anterior, podría utilizarse BuChE como marcador de hepatocarcinoma, debido a que una cantidad de esta enzima es exportada al plasma sanguíneo (S_1 , BuChE: 0.781 ± 0.214 U/mg) y podemos analizar el carácter glicoproteico de dicha enzima y dar un valor pronóstico; aun más importante, en la línea celular HepG2 notamos un notable cambio bioquímico: aumenta la actividad BuChE débilmente unida a membrana, lo cual nos indica que en el plasma sanguíneo la probabilidad de analizar el carácter glicoproteico alterado de BuChE es mayor.

Otras enzimas que trabajan en la maquinaria de glicosilación y que cambian su expresión a consecuencia de las neoplasias, son alfa 1-6 fucosiltransferasa, la N-acetilglucosaminiltransferasa-III (GnT-III) y N-acetilglucosaminiltransferasa-V (GnT-V) (Blomme *et al.*, 2009). La interacción semejante de AChE y BuChE de hígado normal con LCA, que reconoce a manosa en oligoglicanos con fucosa, y WGA, que se une a glicoproteínas con NAcGlu y ácido siálico (Figuras 20 y 21) sugiere que la población de moléculas de AChE que incorporan manosa, NacGlu y ácido siálico es equiparable a las de las moléculas de BuChE. En cambio, la escasa asociación de AChE en células de hepatoblastoma HepG2 con ConA, LCA, WGA y RCA contrasta con la elevada interacción de BuChE con las lectinas. Los resultados indican que en las células de hepatoblastoma el cambio en la glicosilación de AchE es mucho más acusado que en la de BuChE, lo cual sugiere que el conjunto de glicosiltransferasas es distinto en los hepatocitos y en las células HepG2.

Se ha planteado que la expresión de los diferentes ARNm de AChE es tejido específico. Se tiene bien caracterizado que el ARNm-T es predominante en cerebro y músculo. Mientras que el ARNm-H se expresa en células hematopoyéticas. En cuanto al ARNm-R, se ha sugerido se expresa en durante situaciones de estrés y el desarrollo embrionario (Dori, Soreq 2006; Perrier, *et al* 2005; Deutsch, *et al* 2002; Soreq, *et al* 1990; Grisar, *et al* 1999; Grisar, *et al* 2006; Sternfeld, *et al* 2000; Soreq y Seidman 2001). Por lo que, al analizar los transcritos de AChE en el hígado humano sano se esperaba encontrar sólo el ARNm característico de ese tejido. Fue relevante evidenciar que en el hígado se expresan los tres ARNm de AChE.

En un principio, en el hígado se esperaba encontrar la expresión del ARNm AChE-T, al igual que cerebro y músculo, tejidos que desarrollan gran actividad colinérgica. Aunque, se debe recalcar que el hígado también presenta una importante irrigación nerviosa y sanguínea, en ésta última también hay una importante concentración de acetilcolina y su eliminación requiere la síntesis hepática de variantes de AChE y BuChE con elevado número de subunidades catalíticas para degradarla. De esta manera, el hígado podría cumplir el papel de filtro del neurotransmisor y evitar los indeseables efectos muscarínicos y nicotínicos (Perelman y Brandan 1989).

En cuanto al ARNm AChE-H, su expresión en el hígado se puede relacionar con la participación de este órgano en la hematopoyesis durante el desarrollo embrionario. La identificación de RNAm AChE-H demuestra que, aún en el estado no embrionario, los hepatocitos expresan el transcrito AChE-H, característico de las células hematopoyéticas.

En cuanto al ARNm AChE-R, se ha demostrado que solo aparece en alteraciones patológicas (Grisaru, *et al* 1999). Se ha informado que la proteína AChE-R participa en interacciones proteína-proteína, promueve la actividad de la enzima enolasa de la ruta glucolítica, y que por lo tanto, es importante para la generación de adenosina trifosfato (Mor, *et al* 2008). Entonces, en el entendido de que el hígado es el órgano metabólico por excelencia, la expresión del mARN AChE-R y de la proteína R podría no estar relacionada con procesos patológicos, sino con la actividad metabólica de los hepatocitos, de modo que la proteína AChE-R mejoraría la ruta glucolítica en condiciones anaeróbicas.

En la determinación de los transcritos AChE en las células de hepatoblastoma HepG2, se detectaron los tres tipos de ARNm de AChE. Aunque, no se analizaron los niveles de expresión, sería importante valorar posibles diferencias entre el hígado y las células HepG2, puesto que se esperan alteraciones a nivel de ARNm, a la vista de la escasa actividad AChE y BuChE en las células de hepatoblastoma.

Al retomar los resultados del análisis del procesamiento post-traducciona l de las ChEs, a través de la incorporación de monosacáridos, se podría pensar que la disminución en la actividad de AChE en las células HepG2 está relacionada con los cambios en los azúcares. Estudios de mutagénesis dirigida han mostrado que la mutación de sitios potenciales de glicosilación en secuencias Asn-X-Ser o Thr provoca cambios conformacionales en la AChE, promoviendo una disminución significativa en la actividad catalítica (Velan 1993).

Otra alternativa, en relación con la observación anterior, es el hecho de que en el cáncer hay alteraciones en algunas glicosiltransferasas específicas del Complejo de Golgi. En tal caso, la disminución en la actividad AChE en células HepG2 podría no deberse a alteraciones a nivel de mensajeros. A la vista de los resultados, se hace indispensable analizar la expresión génica, proteica y funcional de las glicosiltransferasas del Complejo de Golgi, con el propósito de establecer si una alteración directa en estas enzimas, repercute en la actividad enzimática de AChE por un anómalo proceso de glicosilación enzimático.

Una explicación alternativa podría ser la presencia de mutaciones en el gen de AChE, lo cual provocaría que la enzima fuera inactiva, por un plegamiento inadecuado o, aún activa, escasa, a causa de su rápida degradación.

Finalmente, en cuanto a la expresión del gen BuChE en hígado humano sano y las células HepG2 que representan un estado alterado de proliferación celular se encontró que en ambos se detectaron transcritos de la BuChE. La disminución en la actividad BuChE en las células de hepatoblastoma HepG2 podría deberse a un anómalo procesamiento post-traducciona l de esta enzima, a mutaciones en el gen y/o a un menor número de copias del mRNA de la BuChE.

9. CONCLUSIONES

- El hígado humano presenta una mayor actividad de BuChE que de AChE, confirmándolo como el sitio de origen de la BuChE
- En la línea celular de hepatoblastoma HepG2 se estimó una menor actividad enzimática de AChE y BuChE en comparación con los valores en el hígado humano sano, lo cual hace suponer que ambas enzimas (AChE y BuChE) tengan una relación con la transformación celular.
- Los modelos de interacción con lectinas fueron distintos para AChE (y BuChE) en células de hepatoblastoma y en el hígado humano sano. Tales diferencias reflejan cambios en los restos de oligoglicanos incorporados y

podrían ser la causa de la baja actividad de ambas enzimas en el hepatoblastoma.

- En el hígado humano sano como en la línea celular de hepatoblastoma se detectaron los tres ARNm de AChE (H, R y T), y el RNAm BuChE.
- El hígado post-mortem de aproximadamente 20 h de deceso sirvió como control sano para hacer análisis génico y funcional de AChE y BuChE.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alam A, Singha LI, Singh V. (2005). Molecular characterization of tumor associated antigen in mice exposed to a hepatocarcinogen. *Mol. Cell. Biochem.* 271: 177-188.
- Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpine PJ. 1991. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics.* 11, 452–454.
- American Cancer Society. (2011). Detailed Guide. *American Cancer Society* (online) <http://www.cancer.org/Cancer/LiverCancer/DetailedGuide/index>
- Arpagaus M, Chatonnet A, Masson P, Newton M, Vaugan TA, Bartels CF, Nogueira Cp, La Du BN, Lockridge O. (1991). Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. *J. Biol. Chem.* 266: 6966-6974.

- Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*.9, 124–131.
- Asada N, Tanaka Y, Hayashido Y, Toratani S, Kan M, Kitamoto M, Nakanishi T, Kajiyama G, Chayama K, Okamoto T. (2003). Expression of fibroblast growth factor receptor genes in human hepatoma-derived cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 39: 321-328.
- Austin L. y Berry W.K. (1953). Two selective inhibitors of cholinesterase. *Biochem. J.* 54: 695-700
- Bernisone P., Katz E., Napp M. and Azcurra J. (1989). Acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase activities in rat liver: Subcellular localization, molecular forms, and some extraction properties. *Biochem. Cell. Biol.* 140: 203 – 208.
- Blomme, B., Van Steenkiste, C., Callewaert, N., Van Vlierberghe, H. (2009). Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J. Hepatol.* 50: 592-603.
- Blum HG, Spangenberg HC. (2007). Hepatocellular carcinoma: An update. *Arch. Iranian Med.* 10: 361-371.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brown LM, Blair A, Gibson R, Everett GD, Cantor KP, Schuman LM, Burmeister LF, Van Lier, SF, Dick F. (1990) Pesticide exposures and other

agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* 50: 6585-6591.

- Busch SJ, Krstenansky JL, Owen TJ, Jackson RL. (1989). Human hepatoma (HepG2) cells secrete a single 65 K dalton triglyceride lipase immunologically identical to postheparin plasma hepatic lipase. *Life Sci.* 45: 615-622.
- Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, Duran V, Rudolph I, Hrepic N, Calaf G. (2001). A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environ. Health Persp.* 5: 471-479.
- Cabezas-Herrera J, Moral-Naranjo MT, Campoy FJ, Vidal CJ. (1997). Glycosylation of acetylcholinesterase forms in microsomal membranes from normal and dystrophic Lama2dy mouse muscle. *J. Neurochem.* 69: 1964-1974.
- Campoy FJ, Cabezas-Herrera J, Vidal CJ. (1992). Interaction of acetylcholinesterase with *Lens culinaris* agglutinin reveals differences in glycosylation of molecular forms in sarcoplasmic reticulum membrane subfractions. *J. Neurosci. Res.* 33: 568-578.
- Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, Desmet V, Deneef C, Roskams T. (2002). The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am. J. Pathol.* 161: 521-530.

- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15: 532-534. 536-537.
- Chomczynski, P. Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Chen CH, Forte TH, Cahoon BE, Thrift RN, Albers JJ. (1986). Synthesis and secretion of lecithin-cholesterol acyltransferase by the human hepatoma cell line HepG2. *Biochim. Biophys. Acta.* 877: 433-439.
- Clitherow J.W, Mitchad M., Harper N.J. (1963). The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature*. 199: 1000-1001.
- Cooper AD, Craig WY, Taniguchi T, Everson GT. (1994). Characteristics and regulation of bile salt synthesis and secretion by human hepatoma HepG2 cells. *Hepatology*. 20: 1522-1531.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. (2003). Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 131-138.
- Deutsch VR, Pick M, Perry C, Grisaru D, Hemo Y, Golan-Hadari D, Grant A, Eldor A, Soreq H. (2002). The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Exp. Hematol.* 10: 1153-1161.

- Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami HO. (1997) Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control* 8: 420-443.
- Dori A, Soreq H. (2006). ARP, the cleavable C-terminal peptide of "readthrough" acetylcholinesterase, promotes neuronal development and plasticity. *J. Mol. Neurosci.* 28: 247-55.
- Ellman GL, Cortney KD, Andres VJ, Featherstone RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- Farazi PA and DePinho RA. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat.Rev.Cancer.* 6: 674-687.
- Fischer K, Brown J, Scherer SW, Schramm P, Stewart J, Fugazza G, Pascheberg U, Peter W, Tsui LC, Lichter P, Zhang X, Yang L, Zhao Q, Caen, JP, He H, Jin Q, Guo L, Alemany M, Zhang L, Shi Y. (1998). Delineation of genomic regions in chromosome band 7q22 commonly deleted in myeloid leukemias. *Recent Results Cancer Res.* 144: 46-52.
- Gallegos Velasco IB, Coutiño R, Martínez G y Hernández Cruz P. (2008). Marcadores glicosilados en cáncer de mama. *REB.* 27: 52-59.
- García-Ayllón MS, Silveyra MX, Candela A, Compañ A, Clária J, Jover R, Pérez-Mateo M, Felipo V, Martínez S, Galcerán J, Sáez-Valero J. (2006). Changes in liver and plasma acetylcholinesterase in rats with cirrhosis induced by bile duct ligation. *Hepatology.*43: 444-453.

- Gaughan, G., Park, H., Priddle, J., Craig, I. & Craig, S. (1991). Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomics*. 11, 455–458.
- Getman, D., Eubanks, J., Camp, S., Evans, G, and Taylor, P. (1992). The human gene encoding AChE is located on the long arm of chromosome 7. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 170–177.
- Gómez JL, García.Ayllón MS, Campoy FJ, Vidal CJ. (2000). Muscular dystrophy alters the processing of light acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase forms in liver of lama2(dy) mice. *J. Neurosci. Res.* 67: 134 – 145.
- Gómez-Olivares JL y Vidal Moreno CJ. (2003). Los monómeros que forman los dímeros de la acetilcolinesterasa de eritrocito de ratón están glicosados de manera distinta. *Ciencia en la frontera.* 2: 11 - 20
- Gordon KR, Haigh R J, Garcia EG, Feaster SR, Riel AM, Lenz E.D, Aisen SP, Doctor PB. (2005). Oral Administration of pyridostigmine bromide and huperzine A protects human whole blood cholinesterases from ex vivo exposure to soman. *Chem. Biol. Interact.* 157–158: 239–246.
- Grisar D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* 264: 672-686.
- Grisar D, Pick M, Perry C, Sklan EH, Almog R, Goldberg I, Naparstek E, Lessing JB, Soreq H, Deutsch V. (2006). Hydrolytic and nonenzymatic

functions of acetylcholinesterase co-modulate hemopoietic stress responses. J. Immunol. 176(1):27-35.

- Hada T, Yamamoto T, Imanishi H, Takahashi S, Amuro Y, Higashino K, Sato J. (1987). Novel cholinesterase expression in the HuH-7 cell line. Tumour Biol.8: 3-8.
- Hernández CP, Pérez CE, Martínez ML, Ortiz B, Martínez G. (2005) Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB. 24: 21-27.
- Hodgkin W, Giblett ER, Levine H, Bauer W, Motulsky AG. (1965). Complete pseudo-cholinesterase deficiency: genetic and immunologic characterization. J. Clin. Invest. 44:486–93.
- Itoshima T, Kawaguchi K, Ukida M, Ito T, Hattori S, Kitadai M, Ogawa H, Mizutani S, Kita K, Tanaka R.(1984). Diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis using liver function assays. Acta Med. Okayama. 38: 159-168.
- Iwasaki T, Yoneda M, Nakajima A, Terauchi Y. (2007). Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. Int. Med. 46: 1633-1639.
- Jbilo O, L'hermite Y, Talesa V, Toutant JP, Chatonnet A. (1994). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase expression in adult rabbit tissues and during development. Eur. J. Biochem. 225: 115 – 124.

- Jiménez-Díaz M, Martínez-Monge V. (2000) Validación de la determinación de la colinesterasa plasmática humana a 340 nM. *Rev. Biomed.* 11:91-98.
- Jiménez García LF, Merchant Larios H. (2003). *Biología celular y molecular*. Editorial Prentice Hall. Primera edición. 431, 457-459.
- Kaneko A, Dempo K, Onoe T. (1972). Heterogeneity of esterases and cell types in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 284: 128-135.
- Katz B. (1966). *Nerve, muscle and synapse*. McGraw Hill, New York.
- Kronman C, Velan B, Marcus D, Ordentlich A, Reuveny S, Shafferman A. (1995). Involvement of oligomerization, N-glycosylation and sialylation in the clearance of cholinesterases from the circulation. *Biochem. J.* 311: 959-967.
- Layer PG and Sporns O. (1987). Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterase with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 284–288.
- Lemberg A, Macchi MC. (1981). Usefulness of serum pseudocholinesterase isoenzymes in acute and chronic liver diseases and neoplasms (experimental and clinical study). *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 11: 125-132.
- Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond M, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O. (2000) Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Neurochem.* 75: 1320-1331
- Liddell J, Lehmann H, Silk E. (1962) A 'silent' pseudo-cholinesterase gene. *Nature.* 193:561–562.

- Lockridge O, Adkins CF, La Du BN. (1987). Localization of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 262: 12945-12952.
- Lockridge O. (1988). Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays.* 9:125-128.
- Lockridge O. (1991). Structure of human butyrylcholinesterase gene and expression in mammalian cells. (En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology.* Pg. 168-171. Edit. Por J. Massaoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D. M. Quinn). American Chemical Society, Washington D.C.
- Lodish H, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira M, Baltimore y Darnell J. (2002). *Biología celular y molecular.* Editorial Médica Panamericana. Cuarta edición. México. 1054-1062 pp.
- López Morales D y Vallejo V. (2007). Expresión de ácido siálico y de la β -galactósido- α -2,6-sialiltransferasa en cáncer. *REB.* 26: 93-98.
- Lucas CA, Kreutzberg GW. (1985). Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures. I. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin. *Neuroscience.* 14: 349-360.
- Matin, R.G. and Ames, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes. Application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236: 1372-1379.

- Matsuzaki S, Iwamura K, Itakura M, Katsunuma T. (1980). Abnormalities of serum cholinesterase isozyme in liver cirrhosis and hepatoma (Part II). *Gastroenterol. Jpn.* 15: 543-549.
- Méndez-Sánchez N, García-Villegas E, Merino-Zeferino B, Ochoa-Cruz S, Villa AR, Madrigal H, Kobashi-Margáin RA, Gutiérrez-Grobe Y, Chávez-Tapia N, Ponciano-Rodríguez G, Uribe M. (2010). Liver diseases in Mexico and their associated mortality trends from 2000 to 2007: A retrospective study of the nation and the federal states. *Ann. Hepatol.* 9: 428–438.
- Mor I, Bruck T, Greenberg D, Berson A, Schreiber L, Grisaru D, Soreq H. (2008). Alternate AChE-R variants facilitate cellular metabolic activity and resistance to genotoxic stress through enolase and RACK1 interactions. *Chem.-Biol.Interact.* 175: 11-21.
- Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Vidal CJ. (1996). Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 43:224–234.
- Moral-Naranjo MT, Montenegro MF, Muñoz-Delgado E, Campoy Fj, Vidal CJ. (2010). The levels of both lipid rafts and raft-located acetylcholinesterase dimers increase in muscle of mice with muscular dystrophy by mesorin deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1802: 754-764.
- Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Campoy FJ, Vidal CJ. (1997). Differential glycosylation of asymmetric acetylcholinesterase forms in external and internal muscle membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 441S.

- Muñoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Kovacs G, Vidal CJ. (2010). Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types. *FEBS J.* 277 (21): 4519-29.
- Nachmansohn D, Neumann E. (1975). Chemical and molecular basis of nerve activity. Academic Press, New York.
- Neville LF, Gnatt A, Padan R, Seidman S, Soreq H. (1990). Anionic site interactions in human butyrylcholinesterase disrupted by two single point mutations. *J. Biol. Chem.* 265:20735-20738.
- Neville PJ, Thomas N, Campbell IG. (2001). Loss of heterozygosity at 7q22 and mutation analysis of the CDP gene in human epithelial ovarian tumors. *Int. J. Cancer.* 91: 345-349
- Nowrouzi A, Yazdanparast R. (2005). Alkaline phosphatase retained in HepG2 hepatocarcinoma cells vs. alkaline phosphatase released to culture medium: difference of aberrant glycosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 400-409.
- Ohkura T, Hada T, Higashino K, Ohue T, Kochibe N, Koide N, Yamashita K. (1994). Increase of fucosylated serum cholinesterase in relation to high risk groups for hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 154:55-61.
- Perelman A and Brandan E. (1989). Different membrane-bound forms of acetylcholinesterase are present at cell surface of hepatocyte. *Eur. J. Biochem.* 182: 203-207.

- Perrier NA, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G, Massoulie J. (2005). The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *J. Neurochem.* 94: 629-638.
- Rosenberry TL. (1979). Quantitative simulation of endplate currents at neuromuscular junctions based on the reaction of acetylcholine with acetylcholine receptor and acetylcholinesterase. *Biophys. J.* 26: 263-290.
- Rotundo RL. (1984). Purification and properties of the membrane-bound form of acetylcholinesterase from chickenbrain. Evidence for two distinct polypeptide chains. *J. Biol. Chem.* 259: 13186-13194.
- Sáez-Valero J, Vidal CJ. (1996). Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1317: 210-218.
- Sánchez-Chávez Gustavo, Salceda Rocío. (2008) Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. *REB* 27: 44-51.
- Park SE, Kim ND, and Yoo YH. (2004). Acetylcholinesterase Plays a Pivotal Role in Apoptosome Formation. *Cancer Res.* 64, 2652–2655.
- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S.S., Friedmann, T. and Taylor, P. (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinésterase deduced form its cDNA sequence. *Nature* 319: 407-409.

- Schwarz M., Glick D., Loewenstein Y., Soreq H. (1995). Engineering of human cholinesterase explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmac. Ther.* 67: 283-322
- Searashi Y, Yamauchi M, Sakamoto K, Ohata M, Asakura T, Ohkawa K. (2002). Acetaldehyde-induced growth retardation and micro-heterogeneity of the sugar chain in transferrin synthesized by HepG2 cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26: 32S-37S.
- Secretaría de Salud. (2011). Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). (online) <http://www.sinais.salud.gob.mx/estadisticasportema.html>
- Soreq H, Ben Aziz R, Prody CA, Seidman S, Gnatt A, Neville L, Lieman-Hurwitz J, Lev-Lehman E, Ginzberg D, Lipidot-Lifson Y, Zakut H. (1990) Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C rich attenuating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9688-9692.
- Soreq H, Gnatt A, Loewenstein Y, Neville LF. (1992). Excavations into the active-site gorge of cholinesterases. *Trends Biochem. Sci.* 9:353-8.
- Soreq H. and Seidman S. (2001). Acetylcholinesterase: new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 294–302.
- Soreq H., Seidman S., Dreyfus P.A., Zevin-Sonki D. y Zakut H. (1989). Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholinesterasa in microinjected *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 264: 10680-10613.

- Stangl H, Kovacs W, Böck P, Kremser K. (1995). Differential induction of peroxisomal enzymes by hypolipidaemics in human (HepG2) and rat (MH1C1) hepatoma cell lines. *Eur. J.Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33: 775-783.
- Sternfeld M, Shoham S, Klein O, Flores-Flores C, Evron T, Idelson GH, Kitsberg D, Patrick JW, Soreq H. (2000). Excess "read-through" acetylcholinesterase attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 15: 8647-8652.
- Tajiri J, Nishizono Y, Fujiyama S, Sagara K, Sato T, Shibata H. (1983). Hypercholinesterasemia in patients with hepatocellular carcinoma: a new paraneoplastic syndrome. *Gastroenterol. Jpn.* 18:137-141.
- Tecce MF, Terrana B. (1988). High-yield and high-degree purification of human alpha-fetoprotein produced by adaptation of the human hepatoma cell line Hep G2 in a serum-free medium. *Anal. Biochem.* 169: 306-311
- Treskatis S, Ebert C, Layer PG. (1992). Butyrylcholinesterase from chicken brain is smaller than that from serum: its purification, glycosylation and membrane association. *J. Neurochem.* 58: 2236-2247.
- Uete T, Masui K, Miyauchi M. (1985). Comparison of substrates for measuring serum choline esterase activity in hepato-biliary disease. *J. Clin. Biochem.* 23: 669-675.
- Velan B, Kronman C, Ordentlich A, Flashner Y, Leitner M, Cohen S, Shafferman A. (1993). N-glycosilation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochem J.* 296: 649-656.

- Vidal CJ. (2005). Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. *Chem. Biol. Interact.* 15: 157-158.
- Vidal CJ. (1996). Glycosylation of cholinesterases and its alteration in some pathological processes. *Recent. Res. Dev. Neurochem.* 1: 37-54.
- Visvikis A, Goergen JL, Oster T, Bagrel D, Wellman M, Marc A, Engasser JM, Siest G. (1990). Gamma-glutamyltransferase from human hepatoma cell lines: purification and cell culture of HepG2 on microcarriers. *Clin. Chim. Acta.* 191: 221-232.
- Wanders RJ, van Roermund CW, Griffioen M, Cohen L. (1991). Peroxisomal enzyme activities in the human hepatoblastoma cell line HepG2 as compared to human liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1115: 54-59.
- Yamamoto H, Sumikawa K, Hada T, Higashino K, Yamamura Y. (1981). Gamma-glutamyltransferase from human hepatoma tissue in comparison with normal liver enzyme. *Clin. Chim. Acta.* 111: 229-237.
- Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, GuoLH, Alemany M, Zhang LY and Shi YF. (2002) Induction of acetylcholinesterase expression apoptosis in various cell types. *Cell Death Differentiation.* 9: 790–800.
- Zhao Y, Wang X, Wang T, Hu X, Hui X, Yan M, Gao Q, Chen T, Li J, Yao M, Wan D, Gu J, Fan J, He X. (2011). Acetylcholinesterase a key prognostic predictor for hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization. *Hepatology*, 53: 493-503.

- Zeng WR, Watson P, Lin J, Jothy S, Lidereau R, Park M, Nepveu A. (1999). Refined mapping of the region of loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 7 in human breast cancer defines the location of a second tumor suppressor gene at 7q22 in the region of the CUTL1 gene. *Oncogene*. 18: 2015-2021.

11. ANEXO

Médico Forense

Dr. Gregorio U. Mundo Cancino

Dr. Braulio Quezada Benítez

Dr. Humberto Gabriel Hernández Escorcía

Dr. Jorge N Cárdenas Gómez

Técnicos especialistas en necropsias

Saúl González Rosales

César Estrada Estrada

Vicente Garduño Ordóñez

Área de química

Entomólogo Arturo Cortes Cruz

Q.F.B. Emilio González

Q.F.B. Adrián Waldo Capetillo

Área de patología

Dr. Fernando García Dolores

Técnico Histo-tecnólogo César Sánchez Bautista

Dr. José Luis Raúl Dorantes Ramírez

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Expresión Génica y Proteica de las colinesterasas en tejido hepático humano y células HepG2" con fecha de 22 de julio de 2011.



(Presidenta)

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



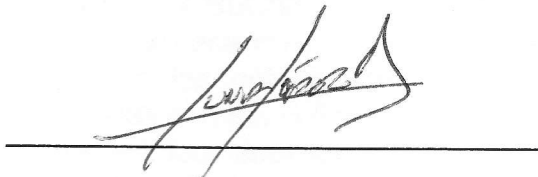
(Secretaria)

Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México



(Vocal)

Dr. Elizabeth Hernández Pérez
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



(Vocal)

Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto de Geriatria