

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología Experimental

Título del proyecto:

Expresión del gen de la acetilcolinesterasa en linfocitos
B y en células leucémicas

Alumna:

Biól. Exp. Guillermina Palomec Sánchez

Director: Dr. José Luis Gómez Olivares

Asesoras: Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Octubre, 2012

Comité Tutoral

DIRECTOR

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
e-mail: gool@xanum.uam.mx

ASESORA INTERNA

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Profesora Titular

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
e-mail: leor@xanum.uam.mx

ASESORA EXTERNA

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Profesor Titular

Instituto de Fisiología Celular
Departamento de Neurociencias
Universidad Nacional Autónoma de México.
e-mail: rsalceda@ifc.unam.mx

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

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

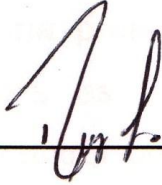
El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca con número de registro 233335

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomembranas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa en colaboración de los Departamentos de Hematología (Jefe de Departamento Dr. Rogelio Paredes), y de Análisis Clínicos y Especializados (Jefa de Departamento E.D.C. Lina T. Romero Guzmán y la Química Fabiola Mujica Guzmán) del Instituto Nacional de Pediatría (INP), y bajo la dirección del Dr. José Luis Gómez Olivares y la asesoría de la Dra. Rodríguez Cruz y Dra. Rocío Salceda Sacanelles.

A todos ellos un profundo y leal agradecimiento por sus atención, dedicación y apoyo incondicional 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 de la acetilcolinesterasa en linfocitos B y en células leucémica".

11 de octubre del 2012



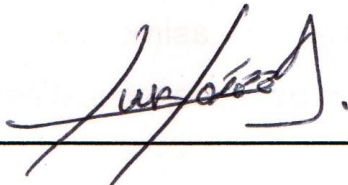
(Presidenta)

Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Dpto. de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



(Secretaria).

Dra. Rocio Salceda Sacanelles
Instituto de Fisiología Celular
Departamento de Neurociencias
Universidad Nacional Autónoma de México



(Vocal)

Dr. Armando Luna López
Investigador en ciencias medicas
Departamento de Investigación Básica, ING



(Vocal)

Dr. Iván Martínez Duncker
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La acetilcolinesterasa (AChE) es una proteína con actividad enzimática, cuya función en los órganos colinérgicos es la de hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina (ACh), permitiendo un control preciso de la sinapsis colinérgica. La expresión del gen de la AChE da como resultado diversas formas moleculares de la proteína, como consecuencia de un proceso de corte y empalme alternativo de un mRNA primario, generándose tres mRNA (mRNA-R, mRNA-H y mRNA-T). La AChE a parte de la función colinérgica, realiza otras funciones alternativas, como participar en procesos de adhesión celular, diferenciación celular, eliminación de algunas drogas, como su participación en el proceso de apoptosis celular. Recientemente se ha estudiado a la AChE en algunas patologías como diabetes, síndrome metabólico, y en distintos tipos de cáncer. En este trabajo nos enfocamos al estudio de la AChE en la leucemia linfoblástica aguda pre B (LLA pre-B), debido a que en varias leucemias se ha reportado variaciones en los mRNA de la AChE, así como modificaciones en su actividad enzimática.

METODOLOGÍA

A partir de muestras de sangre de niños controles (n =100), médula ósea de niños diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda pre-B (n=3) y línea celular REH pre-B (n=3 cultivos) proporcionados por el Instituto Nacional de Pediatría, se purificaron linfocitos B por el método de separación magnética MACS. Se realizó la extracción de mRNA por el método del Trizol. Para la identificación de los mRNA AChE se llevó a cabo la amplificación por RT-PCR de dos pasos. La extracción de la AchE y proteínas totales se logró por un método secuencial sin (S1) o con Triton X-100 (S2). La actividad AChE se estimó por el Ellman y el

contenido total de proteína por el método de Bradford. Para establecer el carácter anfifílico de las formas enzimáticas en los diferentes tipos celulares, se realizó la mezcla de las fracciones S1 y S2 y se sometieron a cromatografía hidrofóbica en una matriz de octil-sefarosa. Para analizar el procesamiento post-traducciona, los extractos de proteínas S1+S2 se pusieron a interactuar con lectinas que reconocen a carbohidratos específicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de actividad AChE se observó un aumento en las células de médula ósea de la leucemia linfoblástica aguda pre-B, y una disminución en la línea celular REH pre-B al compararlos con los valores de actividad AChE extraída de los linfocitos B controles. La actividad AChE estimada estuvo sustentada en la expresión de variantes de mRNA AChE. En el análisis de la expresión de los mensajeros de la AChE, en los linfocitos B controles, las células de médula ósea de leucemia linfoblástica aguda pre-B y las células REH pre-B se detectaron los productos de amplificación que correspondieron a las variantes AChE-H y AChE-R, evidenciando que no hubo variaciones en el proceso de corte y empalme de exones. Hecho que parece sustentarse en el análisis del carácter anfifílico de las formas enzimáticas AChE, donde se observaron dos picos: formas no retenidas (hidrofílicas) que podrían corresponder a monómeros hidrofílicos y formas retenidas, que podrían corresponder a dímeros anfifílicos. El estudio del procesamiento post-traducciona mostró diferencias en los patrones de glicosilación en las células de la médula ósea de leucemia linfoblástica aguda y la línea celular REH pre-B en relación al patrón observado en los linfocitos B controles, evidenciando un proceso de glicosilación anómalo. Estas modificaciones podrían estar relacionadas con las diferencias observadas en la actividad enzimática AChE.

CONCLUSIONES

La actividad AChE en las células de la leucemia linfoblástica aguda pre-B se observó alterada en relación a las células B controles. En la médula ósea se observó un aumento, mientras que, en la línea celular Pre-B se observó una disminución. La actividad dependió de formas moleculares hidrofílicas (no retenidas, AChE-R) y anfifílicas (retenidas, AChE-H) según se desprendió del análisis del carácter anfifílico. El análisis de expresión de las variantes de mRNA-AChE, mostró productos de amplificación que parecen corresponder a las variantes: AChE-H, y AChE-R, que codifican para dímeros anfifílicos anclados por enlace glicofosfatidilinositol y monómeros hidrofílicos, respectivamente. Finalmente, el proceso de glicosilación fue anómalo en las células leucémicas, como se mostró en el análisis de incorporación de carbohidratos.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Acetylcholinesterase (AChE) is a protein with enzymatic activity, which in organs cholinergic function is to hydrolyse the neurotransmitter acetylcholine (ACh), allowing precise control of cholinergic synapses. The expression of AChE gene results in various molecular forms of the protein as a consequence of a process of alternative splicing of a primary mRNA, generating three mRNA (AChE-T, AChE-H, AChE-R). AChE besides cholinergic function performs other alternative activities, such as participating in processes of cell adhesion, cell differentiation, elimination of some drugs, such as their participation in the process of apoptosis. It has recently been studied in some pathologies AChE as diabetes, metabolic syndrome, and cancers. In leukemia has been reported alterations on AChE mRNA, as well as activity AChE. In this study we focused the study of AChE in the pre-B acute lymphoblastic leukemia (pre-B).

METHODOLOGY

From blood samples from control children (n = 100), bone marrow of children diagnosed with acute lymphoblastic leukemia pre-B (n = 3) and cell line REH pre-B (n = 3 cultures) provided by the National Institute of Pediatrics, purified lymphocytes B by MACS magnetic separation method. Was performed by extracting mRNA by Trizol method. To identify the AChE mRNA was carried out by RT-PCR amplification of two steps. The extraction of AChE and total protein was achieved by a sequential method without (S₁) or with Triton X-100 (S₂). The AChE activity was estimated by Ellman et al and the total protein content by the Bradford method. To establish the amphiphilic character of the enzyme forms in the different cellular types was performed fractions mixture S₁ and S₂ and subjected to a hydrophobic chromatography on octyl-sepharose matrix. To analyze post-

translational processing, the extracts S1 + S2 were put to interact with lectins that recognize specific carbohydrates.

RESULTS AND DISCUSSION

In the analysis of AChE activity increase was observed in bone marrow cells of acute lymphoblastic leukemia pre-B, and a decrease in the REH cell line pre-B when were compared with the values of AChE activity from B lymphocytes controls. Estimated AChE activity is sustained on expression of AChE mRNA variants. Analysis of the expression of AChE messengers, controls in B lymphocytes, bone marrow cells of acute lymphoblastic leukemia pre-B cells and pre-B REH were detected amplification products that correspond to variants AChE-H and AChE-R, showing that there was no change in process splicing of mRNA. Done that seems supported by the amphiphilic character analysis of AChE enzyme forms where two peaks were observed: forms not retained that could correspond to hydrophilic monomers and retained forms, which could correspond to amphiphilic dimers. Differences were observed on glycosylation patterns in bone marrow cells of acute lymphoblastic leukemia cell line REH pre-B in relation to the pattern observed in control B cells, showing a glycosylation process anomalous. These modificacione could be related to the observed differences in AChE enzyme activity.

CONCLUSIONS

The AChE activity eas observed in leukemia cells pre-B acute lymphoblastic altered respect to control B cells. In bone marrow showed an increase, while in the pre-B cell line showed a decrease. The activity depended hydrophilic molecular forms (not retained, AChE-R) and amphiphilic (retained AChE-H) as inferred amphiphilic character analysis. The analysis of expression of the mRNA-AChE variants showed amplification products that appear to correspond to variants: AChE-H, and AChE-R encoding amphiphilic dimers and anchored by hydrophilic

monomers glycoposphatidylinositol link, respectively. Finally, the glycosylation process was abnormal in leukemia cells, as shown in the incorporation of carbohydrate analysis.

Abreviaturas más empleadas

A.E: Actividad específica (U/mg)

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa (acetilcolina acetilhidrolasa, EC 3.1.1.7)

AChE-H: Acetilcolinesterasa de la variante H

AChE-R: Acetilcolinesterasa de la variante R

AChE-T: Acetilcolinesterasa de la variante T

CD19: Marcador de superficie de diferenciación para linfocitos B

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

Con A: Concanavalina A (lectina de *Canavalia ensiformis*)

C-terminal: Carboxilo terminal en un polipéptido

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

EDTA: Ácido etilendiamino-tetraacético

g: Unidades de gravedad "g"

GPI: Enlace glicosilfosfatidilinositol

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

Iso-OMPA: Tetraisopropilpirofosforamida

kb: Kilobases

kDa: Kilodaltones

LB: linfocitos B

LCA: Aglutinina de lenteja (Lectina de *Lens culinaris*)

LLA pre-B: Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA: Leucemia Mieloblástica Aguda

mAChR: Receptor muscarínico de acetilcolina

NAcGluc: N-acetil-D-glucosamina

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina

N-terminal: Amino terminal de un polipéptido

p/v: Relación peso/volumen

pb: Pares de bases

RCA: Aglutinina de ricino (Lectina de *Ricinus communis*)

RER: Retículo endoplásmico rugoso

RHE: Línea celular leucémica de linfocitos pre-B

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

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

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

INDICE

1. INTRODUCCION.....	19
1.1. <i>La función biológica clásica de la acetilcolinesterasa y sus propiedades cinéticas.....</i>	<i>19</i>
1.2. <i>La actividad de acetilcolinesterasa y su participación en otras funciones.....</i>	<i>20</i>
1.3. <i>La expresión del gen acetilcolinesterasa.....</i>	<i>25</i>
1.4. <i>La heterogeneidad estructural de la proteína acetilcolinesterasa.....</i>	<i>27</i>
1.5. <i>La comparación entre las formas moleculares asimétricas y las globulares</i>	<i>28</i>
1.6. <i>El procesamiento post-traduccional de la proteína acetilcolinesterasa....</i>	<i>30</i>
1.7 <i>La glicosilación de la proteína acetilcolinesterasa.....</i>	<i>31</i>
1.8. <i>Las lectinas y su aplicación en el estudio del proceso de glicosilación de las colinesterasas.....</i>	<i>34</i>
1.9. <i>Algunas patologías en que se ha observado alteración en la actividad acetilcolinesterasa</i>	<i>36</i>
1.10. <i>Los niveles de la actividad acetilcolinesterasa en diversos tipos de cáncer.....</i>	<i>37</i>
1.11. Definición de la leucemia o cáncer de la sangre.....	40
1. 11.1. <i>La etiología de la leucemia</i>	<i>40</i>
1.11. 2. <i>La clasificación de los tipos de leucemias.....</i>	<i>41</i>

1.11.3. <i>La leucemia linfoblástica tipo infantil (L1)</i>	42
1.11.4. <i>La leucemia linfoblástica tipo adulto (L2)</i>	42
1.11.5. <i>Leucemias linfoides agudas (LLA)</i>	43
1.11.6. <i>Leucemia Mieloblastica Aguda (LMA)</i>	43
1.11.7. <i>Leucemia linfática aguda de precursores de tipo B (LLA Pre-B)</i>	44
2. JUSTIFICACIÓN	50
2.1. <i>La importancia del estudio de la actividad acetilcolinesterasa en la leucemias</i>	50
3. OBJETIVO PRINCIPAL	53
3.1. <i>Objetivos particulares</i>	53
4. HIPÓTESIS	53
5. METODOLOGÍA	54
5.1. <i>Obtención de material biológico</i>	54
5.1.1. <i>Sangre venosa</i>	54
5.1.2. <i>Médula ósea</i>	54
5.1.3. <i>Mantenimiento y propagación de la línea celular pre-B REH</i>	55
5.1.4 <i>Separación de linfocitos por gradiente de densidad</i>	56
5.1.5. <i>Conteo y viabilidad en las células mononucleares aisladas</i>	57

5.1.6. <i>Inmunopurificación de las células B en columnas magnéticas MACs.....</i>	60
5.1.7 <i>La inmunodetección por citometría de flujo de los marcadores de superficie en linfocitos B.....</i>	61
5.1.8 <i>Oligonucleótidos específicos para la técnica de RT-PCR.....</i>	62
5.1.9 <i>El aislamiento de ARNm total</i>	63
5.1.10 <i>Determinación de la expresión de los transcritos de AChE por Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa</i>	65
5.1.11. <i>Solubilización de las colinesterasas de médula ósea, línea celular REH y células mononucleares por un método secuencial con o sin detergentes.....</i>	67
5.1.12. <i>Cromatografía hidrofóbica en octil-Sefarosa.....</i>	68
5.1.13. <i>Determinación de la actividad acetilcolinesterasa en cubeta espectrofométrica.....</i>	69
5.1.14. <i>Determinación de la actividad acetilcolinesterasa en placas de microtitulación.....</i>	70
5.1.15. <i>Determinación del contenido de proteínas totales.....</i>	71
5.1.16 <i>Análisis de la glicosilación de la acetilcolinesterasa.....</i>	72

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
6.1. <i>Análisis por citometría de flujo de las muestras hematopoyéticas analizadas.....</i>	<i>73</i>
6.2. <i>Extracción de proteínas por método secuencial de amortiguador sin y con Triton X-100.....</i>	<i>77</i>
6.3. <i>Extracción de la actividad acetilcolinesterasa.....</i>	<i>83</i>
6.4. <i>Determinación del carácter hidrofílico o hidrofóbico de las especies enzimáticas acetilcolinesterasa.....</i>	<i>88</i>
6.5. <i>Importancia de la actividad acetilcolinesterasa en la funcionalidad de los linfocitos.....</i>	<i>92</i>
6.6. <i>Análisis del procesamiento co- y postraduccional de la acetilcolinesterasa.....</i>	<i>95</i>
6.7. <i>Análisis de expresión del gen acetilcolinesterasa a través de la determinación de las variantes del los transcritos.....</i>	<i>102</i>
7. CONCLUSIONES.....	109
8. PERSPECTIVAS.....	111
9. BIBLIOGRAFIA.....	112

1. INTRODUCCION

1.1. La función biológica clásica de la acetilcolinesterasa y sus propiedades cinéticas

La acetilcolinesterasa (AChE) es la enzima que termina el efecto del neurotransmisor acetilcolina (ACh).

En la naturaleza existen dos colinesterasas (ChEs) denominadas butirilcolinesterasa y acetilcolinesterasa en conjunto llamadas (ChEs) que poseen una capacidad extraordinaria para hidrolizar ésteres de colina, a mayor velocidad que otros ésteres, cuando se comparan las velocidades de hidrólisis en condiciones óptimas de concentración de sustrato, pH y fuerza iónica, usando preparaciones desprovistas de otras esterasas. Las ChEs se diferencian claramente de otras esterasas por la fuerte inhibición que sufren con pequeñas cantidades (10^{-5} M) del alcaloide natural fisostigmina (eserina) (Chávez y Salceda., 2008).

Teniendo en cuenta, que el propósito de este estudio únicamente abarca a la actividad acetilcolinesterasa, describiremos sólo propiedades de ésta. La acetilcolinesterasa (AChE) es reconocida principalmente por su papel enzimático clásico en la hidrólisis del neurotransmisor, la acetilcolina (ACh) una vez que este es liberado en las sinapsis colinérgicas, finalizando de esta manera la transmisión del impulso nervioso, permitiendo un control temporal preciso de la contracción muscular (Soreq y Seidman, 2001; Chavez y Salceda, 2008). Además, presenta

propiedades cinéticas exclusivas: tiene un sustrato preferente, la acetilcolina, se inhibe fuertemente por el BW284c51 y por exceso de sustrato (Tabla 1).

1. 2. La actividad de acetilcolinesterasa y su participación en otras funciones biológicas no colinérgicas

El papel biológico de la AChE no está limitado en la transmisión colinérgica exclusivamente. Esto se relaciona con el hecho de que en los vertebrados, la actividad AChE se encuentra distribuida en diversos tipos celulares no colinérgicos (eritrocitos, linfocitos, hepatocitos, células renales, células uterinas, entre otros) donde su función no depende de ésteres de colina, lo que ha sugerido que la enzima realiza funciones alternativas (Gómez y col., 2000; Grisaru, 2001; Soreq y Seidman, 2001; Pick y col., 2004; Paraoanu y col., 2006). Una posibilidad, es que realice la función de filtro de la acetilcolina circulante, impidiendo que se produzcan los efectos deletéreos de los síndromes muscarínicos y nicotínicos (Perelman y col., 1990).

Adicionalmente, en los últimos años varios grupos de investigación en todo el mundo, se han enfocado a estudiar la posible participación de la AChE en diversos procesos biológicos tales como: la regulación del ciclo celular, la proliferación, apoptosis, adhesión, así como su intervención en el desarrollo establecimiento y mantenimiento de varias patologías (Appleyard, 1992; Jiang, 2008; Greenfield y col., 2008).

Tabla 1. Propiedades cinéticas de la enzima acetilcolinesterasa

Nombre sistemático	<i>Acetilcolina:acetilhidrolasa</i>
Número de la E.C.	3.1.1.7
Sustrato óptimo	<i>Acetilcolina</i>
Exceso de sustrato	<i>Inhibición</i>
D-Acetil-β-metilcolina	<i>Sustrato</i>
pH óptimo	7.5 – 8.0
Inhibición por BW258C51	<i>Inhibición fuerte</i>
Tejidos con alta actividad	<i>Eritrocitos, tejido nervioso, músculo esquelético, timo, placenta.</i>

En los tejidos no colinérgicos, no se ha podido correlacionar con exactitud la función clásica de la acetilcolinesterasa con funciones específicas de manera similar al estímulo como ocurre en el sistema nervioso, donde las neuronas no colinérgicas muestran actividad AChE y su liberación en ciertas circunstancias al espacio extracelular plantea una incógnita respecto a la función que desempeña. Un posible papel fisiológico de la actividad AChE es que podría estar participando en tejidos no colinérgicos hematopoyéticos regulando la respuesta inmunológica. Específicamente en el caso de los linfocitos B y T, ambos tipos celulares expresan componentes colinérgicos, y en este caso la enzima AChE serviría como filtro a

los altos niveles de ACh circulante, y así evitar los efectos de la acetilcolina a través de receptores muscarínicos y nicotínico (Paranau y cols. 2000; Grisaru. 2001).

Respecto a lo anterior, se ha demostrado que la nicotina afecta a la respuesta inmune mediada por linfocitos B, ya que en estudios realizados con este tipo celular, se exploró la presencia de receptores nicotínicos en las líneas de mieloma X63-Ag8 y 1D6 de hibridoma derivados de células B. Donde se demostró la presencia específica de las subunidades del receptor nicotínicos (nAChR) $\alpha 4$ -y $\alpha 7$ en los tipos celulares analizados. Además, se sugirió que la nicotina estimulaba la proliferación de células de hibridoma, mientras que, tuvo un efecto negativo en la producción de anticuerpos específicos (Rinner y col., 1998).

En los mamíferos, se han identificado subtipos 17 subunidades de nAChR diferentes ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ y ϵ), a partir de los cuales, se forman receptores homo y heteropentamérico al receptores. El especial interés es la presencia de nAChR en los linfocitos, ya que éstas células producen acetilcolina, la cual puede ejercer sus efectos a través de la transmisión autocrina o paracrina (Rinner y col., 1998). En linfocitos B y T se ha demostrado claramente la expresión de nAChR. En ambos casos, la nicotina afecta la capacidad de estas células para participar en la respuesta inmunológica (Sato y col., 1999).

Los linfocitos T no son la única clase de célula inmune afectada por la nicotina, debido a que se ha demostrado que animales tratados con nicotina mostraron

tener una respuesta humoral dependiente de linfocitos B alterada hacia lipopolisacárido, anti-IgM, y eritrocitos de oveja (Savage y cols 1991). También, se ha establecido la expresión de nAChR en los linfocitos B transformados, aunque se desconoce su papel funcional (Lustig y col., 2001; Skok y col., 2003).

En relación, a la existencia de componentes colinérgicos en otros tipos celulares, se sugirió que la ACh posee capacidad para estimular la proliferación de las células ovals en el hígado, que se conoce poseen receptores muscarínicos tipo 3 funcionales. En tal caso, la participación biológica de la AChE en los hepatocitos que circundan a las células ovals, estaría relacionada con la hidrólisis de la ACh, impidiendo el acceso del neurotransmisor a los receptores, quienes favorecerían la proliferación (Maussoelie., 2001; Paranau y col., 2006).

Diversos estudios en diferentes patologías en tejidos no neuronales han logrado demostrar la relevancia de la AChE, siendo la evidencia más clara, la alteración en los niveles de la actividad enzimática. Tal es el caso de los eritrocitos y los linfocitos, los megacariocitos, el hígado, el riñón, los nódulos acinares. Varios grupos han estudiado las colinesterasas en diferentes aspectos de la enzima, entre los que se incluyen; la descripción molecular de la acetilcolinesterasa, sus tipos de anclajes y oligomerización (Soreq, 2001; Gómez y Vidal, 2003; Massuolié., 2005). En las leucemias, se han hecho esfuerzos para establecer una asociación entre el nivel de actividad con la expresión de transcritos de la AChE. A este respecto, se ha analizado el cambio en la expresión de transcritos con la

presencia de la acetilcolina y cómo influye la acetilcolinesterasa en el sistema inmunológico (Kawachima, 2003). Se han realizado estimaciones en la actividad AChE y en transcritos expresados en tumores cancerosos en diversos tejidos cerebrales y no cerebrales (Vidal, 2003; Pérez, 2010).

En la diabetes se han analizado modificaciones en la actividad AChE en varios tejidos de ratas (Salceda, 2000). La implicación de la AChE en los estados alterados de proliferación celular, se ha relacionado con sus funciones no enzimáticas, su posible participación en el proceso del desarrollo podría verse involucrado un dominio estructural similar al que presentan algunas proteínas de adhesión celular, como la glutatina, la neurotactina, la gliotactina y las neuroliginas (Paraonau y col., 2006, Sánchez y Salceda., 2008).

Adicionalmente, varias evidencias experimentales indican que la AChE posee actividad peptidásica. A este respecto, se ha observado que la AChE puede hidrolizar otros sustratos no asociados a la transmisión neuronal sináptica u otros procesos fisiológicos específicos, como ocurre con el ácido acetilsalicílico y sus derivados neutros (Masson y col., 1998), la actividad sobre la sustancia P. Además, se ha encontrado actividad tríptica y exopeptidásica en AChE purificada del tejido de electroplaca de ánguila y de suero fetal bovino (Checler y col., 1994).

1.3. La expresión del gen acetilcolinesterasa

En el humano, el gen AChE está localizado en el cromosoma 7 en la región q22, tiene una longitud aproximada de 7 kb y está constituido por seis exones y cuatro intrones (Tabla 2).

La homología en secuencia primaria de la proteína entre los mamíferos es elevada, entre rata y ratón es de 98.3%. Entre la AChE de ratón y la proteína humana es de 89.1%, y finalmente, entre la proteína AChE de rata y la proteína humana es de 89.1% de similitud (Jbilo y col., 1994).

La expresión del gen acetilcolinesterasa produce tres distintos transcritos mediante un proceso de corte y empalme alternativo (Soreq y col., 1990) (ver Figura 1). El mRNA tipo AChE-T está constituido por los exones E2-E3-E4 y E6 que codifica a monómeros, dímeros y tetrámeros anfifílicos (G_1^A , G_2^A y G_4^A), tetrámeros no anfifílicos (G_4^H), así como asociaciones hetero-oligoméricas con un tallo tipo colágena (ColQ), conformando estructuralmente a las formas asimétricas (A_4 , A_8 y A_{12} , donde están presentes; uno, dos y tres tetrámeros, respectivamente), o bien, asociado a una proteína transmembranal (PRiMA; *Proline Rich Membrane Anchor*), constituyendo tetrámeros unidos a membrana ($PRiMA-G_4^A$) (Deutsch y col., 2002; Terrier y col., 2005; Dori y Soreq 2006).

Tabla 1. Características del gen acetilcolinesterasa en algunos mamíferos

Especie	Región cromosómica			Tamaño gen (kb)	Subunidad catalítica (a.a.)	Masa molecular (kDa)
		<i>E</i>	<i>I</i>			
<i>Homo sapiens</i>	7q22	6	4	6-7	614	67.796
<i>Mus musculus</i>	5 (76.32 cM)	6	4	6-7	614	68.169
<i>Rattus norvegicus</i>	12	6	4	6-7	614	68.196

Las letras I significan intrones, y la E exones, respectivamente. La masa molecular aparente se refiere a la subunidad tipo T. Base de información uniprot.org

El mRNA tipo AChE-H, contiene los exones E2-E3-E4-E5, que codifica a los dímeros anfifílicos Tipo I que se anclan a la membrana a través de un enlace glicofosfatidilinositol (GFI) (Soreq y col.1990; Deutsch y col 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. El extremo C-terminal de la subunidad R consta de 30 aminoácidos y carece de Cys, por lo que las subunidades permanecen como monómeros (Grisaru y col., 2006; Sternfeld y col., 2000).

1.4. La heterogeneidad estructural de la proteína acetilcolinesterasa

La AChE tiene diversas formas moleculares, se encuentran como monómeros y oligómeros de subunidades catalíticas glicosiladas. En 1971, la IUPAC-IUB recomendó el término "*forma molecular múltiple*" para designar aquellas proteínas derivadas de asociaciones cuaternarias, que expresen la misma actividad enzimática, de forma natural, en una especie animal determinada, como entidades estables y no interconvertibles fácilmente (Hall., 1973). Se prefiere el término "isoenzima" para las enzimas con estas características que deriven de diferencias en su estructura primaria y que estén determinadas genéticamente.

Las formas moleculares de la AChE proceden de diferentes estadios del procesamiento de una misma estructura original compleja (Soreq y Seidman, 2001). De acuerdo a la forma en que se asocian los diferentes componentes de los complejos, se han denominado como formas *homoméricas* cuando sólo presentan subunidades catalíticas, para distinguirlas de las *heteroméricas*, que contienen subunidades estructurales que incluyen estructuras tipo colagénico (ColQ) o subunidades hidrofóbicas (PRiMA) (Bon y col., 1976; Massoulié y col 1993).

Existen propiedades de acuerdo a las formas moleculares de la AChE, que permite hacer distinción entre ellas; estructura cuaternaria, solubilidad,

interacciones iónicas o hidrofóbicas y parámetros como hidrodinámicos y contenido de carbohidratos. La masa molecular aparente de la subunidad catalítica de AChE oscila entre 70 y 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.

1.5. La comparación entre las formas moleculares asimétricas y las globulares

La AChE se presenta en seis tipos estructurales de asociación cuaternaria. Las formas globulares (G) que pueden ser monómeros (G_1), dímeros (G_2) y tetrámeros (G_4) con una subunidad catalítica de una masa molecular aparente de 75 kDa. Las formas asimétricas (A) contienen uno (A_4), dos (A_8) o tres tetrámeros (A_{12}), asociados a un tallo de naturaleza semejante al colágeno. En esta nomenclatura, el subíndice señala el número de subunidades catalíticas que conforma cada molécula (Vigny y col., 1979).

En la figura 1, se muestra la diversidad estructural de la AChE, las formas moleculares asimétricas son heteroméricas, debido que las subunidades catalíticas están asociadas a una subunidad de anclaje no catalítica semejante a la colágena (Q). Otro tipo de forma heteromérica, son las formas G_4^A , donde las cuatro subunidades catalíticas están asociadas con un polipéptido hidrofóbico.

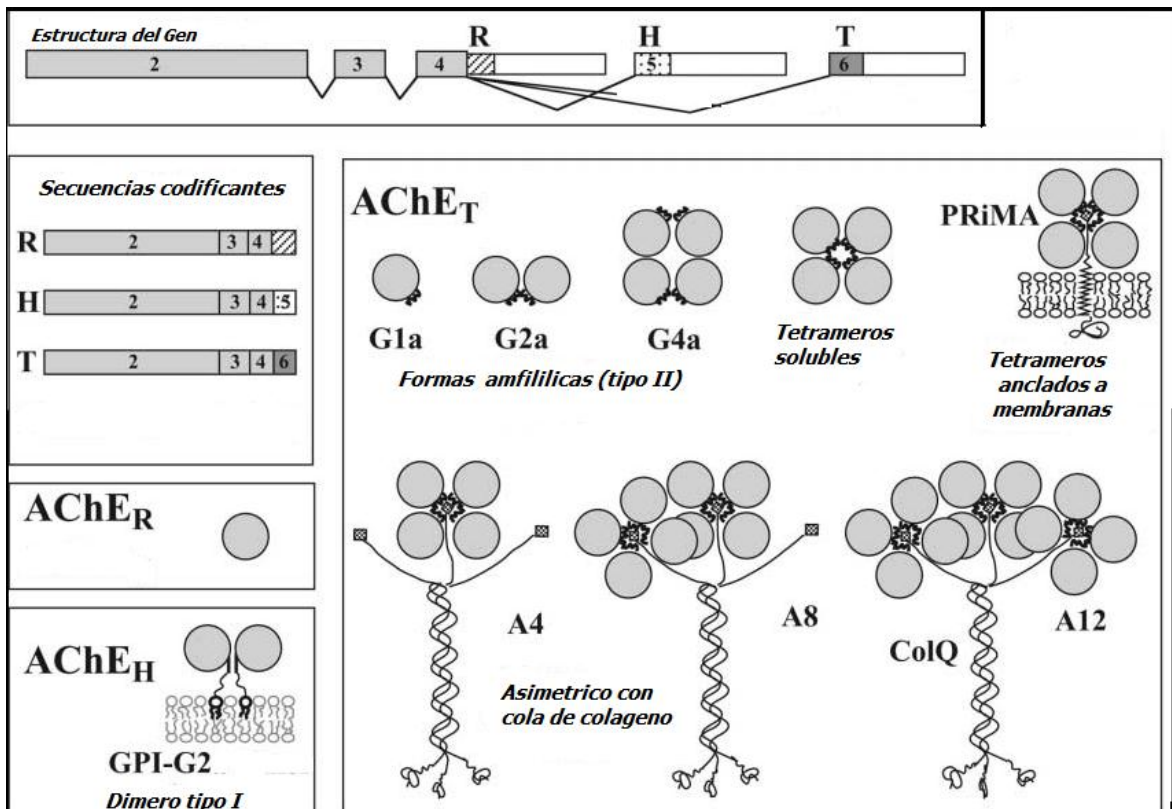


Figura 1. Representación esquemática de proceso de corte y empalme alternativo que genera los diversos transcritos de AChE. El transcrito R codifica a monómeros solubles. El transcrito AChE-H codifica a dímeros anclados por enlace glicofosfatidilinositol. El transcrito AChE-T produce una amplia diversidad estructural; monómeros, dímeros y tetrámeros solubles, tetrámeros anclados por péptido rico en prolina, y tetrámeros anclados a estructuras tipo colágeno, definidos por el número de tetrámeros. (Tomado de Chávez y Salceda, 2008).

Mientras, que las formas homoméricas sólo poseen subunidades enzimáticas que se asocian para formar dímeros o tetrámeros a través de puentes disulfuro intercatenarios. Las formas globulares pueden ser hidrofílicas ($G_{1 \text{ ó } 2}^H$) o anfílicas ($G_{1 \text{ ó } 2 \text{ ó } 4}^A$). Los dímeros y monómeros anfílicos se pueden clasificar en tipo I y tipo II). Las moléculas anfílicas Tipo I tienen un enlace glicofosfatidilinositol (GFI)

unido, mientras que la naturaleza del dominio hidrofóbico de las formas anfifílicas Tipo II se desconoce.

1.6. El procesamiento post-traducciona l de la proteína acetilcolinesterasa

La mitad de las proteínas humanas se encuentran glicosiladas, a las que en general, se denominan glicoproteínas, la AChE es una de ellas. La incorporación de los carbohidratos ocurrió a nivel co- y post-traducciona l por un proceso de unión específica mediado por la acción de diversas glicosiltransferasas. La acetilcolinesterasa forma parte de este grupo de macromoléculas que presentan o-glicanos u oligosacáridos en su estructura.

El término glicosilación se refiere a la unión covalente de oligosacáridos a residuos de aminoácidos situados en secuencias particulares de las proteínas. Los glicanos u oligosacáridos son importantes en muchos procesos en la síntesis de las proteínas, debido a que participan en el control de calidad, tráfico, estabilidad estructural, conformación tridimensional, vida media e influyen en la función de las proteínas glicosiladas, incluyendo la modulación de la interacción con sus ligandos (Martínez y col., 2008). La maquinaria enzimática implicada en la glicosilación representa un 1% del genoma humano. El proceso de glicosilación ocurre bajo un

patrón particular, que depende tanto del tejido celular en cuestión, así como del estado metabólico o fisiológico del organismo (Pérez y col., 2006).

Hay dos tipos principales de glicosilación proteica: 1) La *O-glicosilación*, que ocurre en residuos de Serina, Treonina o hidroxilisina, donde el monosacárido del glicano que se une a dicho residuo puede ser N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), Fucosa, Xilosa, etc. 2) La *N-glicosilación*, la cual ocurre entre el residuo N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) del glicano y el nitrógeno amido de un residuo de Asparagina que se encuentra en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (Rudd y Dwek., 1997; Schumacher y col. 1986; Lockridge y col., 1987) (ver Figura 2).

1.7. La glicosilación de la proteína acetilcolinesterasa

En el caso de la AChE, se sugiere que sufre N-glicosilación, en la que los oligosacáridos preformados se incorporan a restos de asparagina en la secuencia consenso característica: Asn-X-Ser/Thr. Esta secuencia es común en todas las proteínas N-glicosiladas, donde X indica cualquier aminoácido distinto de prolina o aspartato (Schumacher y col. 1986; Lockridge y col., 1987), esta transferencia ocurre en el retículo endoplásmico rugoso. Se ha considerado, que estas secuencias representan sitios potenciales de glicosilación, debido a que es difícil establecer, si todos los sitios potenciales se encuentran ocupados por cadenas de oligosacáridos.

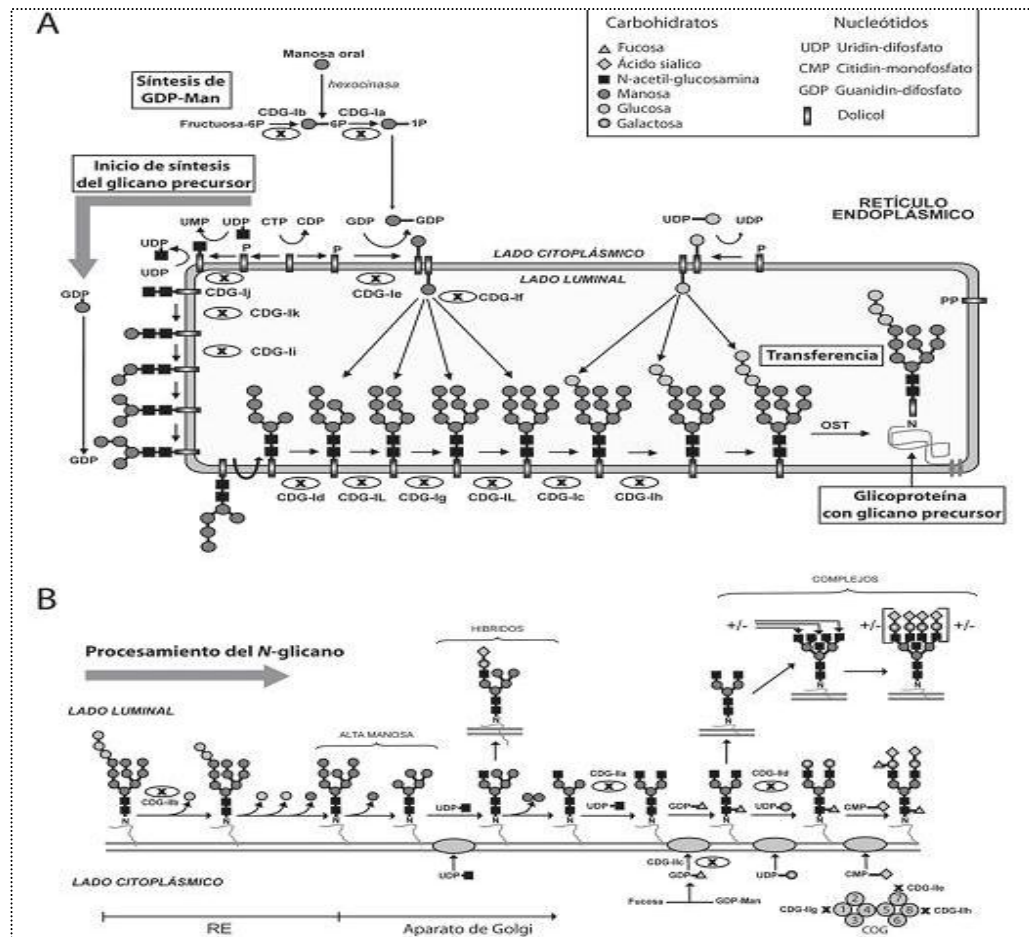


Figura 2. Vía de la N-glicosilación que sufren las proteínas de exportación. A. Síntesis del oligosacárido precursor GlcNAc₂Man₉Glc₃ que se inicia por una serie de reacciones en la cara citosólica del retículo endoplásmico rugoso (RER) que utilizan glicosil-nucleótidos, seguidas de reacciones en la luz de dicho organelo que utilizan carbohidratos unidos a dolicol. Una vez terminada la síntesis el oligosacárido precursor, éste es transferido a la proteína naciente por la acción de una oligosacaryltransferasa (OST). B. Procesamiento de la glicoproteína; comienza en el RER y finaliza en el Golgi; conduce a la síntesis de una gran variedad de estructuras glicánicas a través de la acción inicial de glicosidasas y finalmente de diversas glicosiltransferasas.

El número de sitios potenciales de glicosilación se modifica de especie a especie, incluso de tejido a tejido. En el caso de la subunidad catalítica de la AChE del pez cartilaginoso *Torpedo marmorata* que al analizar su glicosilación, se observó que contiene cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (Schumacher y col., 1986; Sikorav y col., 1987), dos de los cuales son homólogos a tres de las secuencias de acetilcolinesterasa humana, aunque no se sabe si todos los sitios se encuentran realmente glicosilados. En la Tabla 2, se muestra la localización de los residuos de Asp que potencialmente podrían estar glicosilados en las colinesterasas de humano, ratón y rata.

El contenido de carbohidratos en la molécula de la enzima alcanza un 15% de presencia de AChE glicosilada en el órgano eléctrico de pez *Torpedo marmorata* (Bon y col., 1976) y de las membranas de eritrocito (Niday y col., 1977), y entre 10 y 12% en la de cerebro de pollo (Rotundo, 1984).

Con todo, la glicosilación de las subunidades de la AChE es específica del tejido, por lo que, el tamaño de una molécula particular dependerá del tejido donde se produzca (Treskatis y col., 1992). Finalmente, se ha sugerido que la N-glicosilación podría ejercer 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 y col., 1995).

Tabla 2. Localización de los sitios potenciales de glicosilación en la proteína acetilcolinesterasas de algunos mamíferos			
Especie	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus novergicus</i>
	296	296	296
Localización	381	381	381
	495	495	495
<p>La tabla fue elaborada con información disponible en las bases de www.uniprot.org, www.ncbi.nlm.nih.gov</p>			

1.8. Las lectinas y su aplicación en el estudio del proceso de glicosilación de las colinesterasas

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune con capacidad para aglutinar células y precipitar carbohidratos complejos. Se han aislado de gran variedad de bacterias, virus y animales vertebrados e invertebrados, pero las mejor caracterizadas son las de origen vegetal. Poseen una especificidad definida para unirse a los N- u O-glicanos de diferente composición sin modificarlos.

Diversas lectinas por su capacidad de unirse a los carbohidratos específicos en las colinesterasas, se han venido empleando para purificar a la enzima de diferentes tejidos, suero fetal bovino (Flores-Flores y col., 1997), cerebro de rata y pollo (Rakonczay y col., 1981; Zanetta y col., 1981; Rotundo, 1984), eritrocito de ratón (Gómez y col., 2003). Además, las lectinas permiten conocer los procesos

moleculares implicados en la síntesis, ensamblado y procesamiento de las formas múltiples de AChE (Gómez-Olivares y Vidal-Moreno, 2003).

En la Tabla 3, donde se muestra una lista con algunas de las lectinas que se han empleado para el estudio de la glicosilación de las colinesterasas, así como la especificidad de cada una hacia determinados oligosacáridos.

Tabla 3. Propiedades de lectinas de plantas empleadas en el estudio

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

1.9. Algunas patologías en que se ha observado alteración en la actividad acetilcolinesterasa

En las últimas décadas, se ha ampliado el interés en las investigaciones en diversas patologías relacionadas con la relevancia de la acetilcolinesterasa respecto a la expresión génica, actividad, expresión proteínica y procesamiento pos-traducciona.

Existen informes en diversas patologías en los que se ha estimado un alto nivel de la actividad AChE comparado con el grupo sano. Tal es el caso de la enfermedad de Alzheimer (EAz), la Diabetes Mellitus, la enfermedad de Parkinson, el síndrome metabólico, así como en algunos tipos de neoplasias en órganos colinérgicos y no colinérgicos (Donger y col., 1998; Grisaru y col., 1999; Hua y Xue-Jun ,2007; Lapidot y col., 2007; Sánchez y Salceda., 2008; Battisti y col., 2009)..

En la actualidad, una de las patologías de mayor enfoque con respecto de AChE a su expresión y variaciones en la actividad de AChE es la EAz, la mayoría de los fármacos producidos son compuestos con capacidad de inhibir la actividad AChE cuyo mecanismo molecular se relaciona con la interacción con el residuo de aminoácido serina 200 (²⁰⁰Ser) o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo. Aunque la asociación de la AChE y las placas β -amiloides es a través del sitio periférico y no propiamente con el sitio activo de la enzima. En el caso de la EAz, también se ha sugerido que las células gliales son la principal fuente de AChE. El empleo con fármacos anti-colinesterásicos se considera como el único tratamiento

aprobado para los pacientes. Aunque esto es solo paliativo a corto tiempo, debido a sus efectos adversos colaterales.

Por otro lado, a la enzima AChE se le ha relacionado con el desarrollo neuronal normal, en el control y la capacidad de responder a las alteraciones asociadas con la ansiedad y otros trastornos psiquiátricos relacionados al estrés y a la estimulación de neuronas colinérgicas (Grisaru y col., 2001, 2007; Varda y col., 2002; Sánchez y Salceda., 2008).

1.10. Los niveles de la actividad acetilcolinesterasa en diversos tipos de cáncer

En este apartado se señalan algunas observaciones relevantes en diversos tipos de tumores cerebrales y no cerebrales en que se han determinado cambios en los niveles de la actividad acetilcolinesterasa, hecho que se ha considerado una evidencia de una participación de la enzima en la regulación del ciclo celular y/o tumorigénesis (; Lev- leverman y col., 1997; Donger y col., 1998; Liu y col., 1998; Grisaru y col., 1999; Lapidot y col., 2007; Battisti y col., 2009; Shuqiang y col., 2011).

En meningiomas y gliomas la relación de los niveles de actividad AChE varía, siendo independiente del grado de malignidad. Los glioblastomas muestran niveles bajos de AChE en comparación a los meningiomas y neuroblastomas que contienen niveles superiores (Saéz-Valero y col., 1996; Vidal, 2005; Flores, 2008).

En el proceso de la megacariocitopoyesis anormal y cáncer de ovario, el crecimiento de las células neoplásicas se ha visto asociado con la elevación de la actividad AChE, así como con la amplificación de sus genes (Soreq y col., 1992). Las pruebas con oncogenes han demostrado la amplificación del gen de AChE y su sobreexpresión en estados pre-cancerígenos (Lev-Leverman y col., 1997; Donger y col., 1998; Grisaru y col., 1999, 2001 y 2002; Liu y col., 1998; Lapidot y col., 2007; Battisti y col., 2009; Shuqiang y col., 2011).

En tumores de diverso origen se ha observado que el tratamiento de quimioterapia conduce a un aumento de la actividad de la AChE en plasma (Toilko y Caillou., 1985; Zakut y col., 1990; Sánchez y Salceda., 2008). Los cambios en la actividad, expresión y amplificación génica de la AChE en los carcinomas han abierto la posibilidad de emplearla como un marcador del proceso cancerígeno. Se ha considerado, que la expresión de la AChE está relacionada con la causa primaria de algunos tipos de cáncer, sobre todo en las células del sistema hematopoyético, y que participe de manera directa o indirecta en el progreso clínico del mismo (Toilko y Caillou., 1985; Lev-Leverman y cols., 1997; Donger y cols., 1998; Liu y col., 1998; Grisaru y col., 2001 y 2002; Pick y col., 2004; Lapidot., 2007; Battisti y col., 2009; Shuqiang y col., 2011; Gliboa y col., 2012)

En este orden de ideas, se ha demostrado que el uso de polinucleótidos antisentido contra AChE produce cambios importantes en la hematopoyesis, disminuyendo la apoptosis y aumentando la supervivencia de las células

sanguíneas. Utilizando este principio, cabe la posibilidad de que a través de la manipulación de la expresión del gen de la AChE se logre alterar la proliferación y diferenciación de las células, ya sea normales o neoplásicas, (Lev-Lehman y col., 1994; Liu y col., 1998; Battisti y col., 2009; Shuqiang y col., 2011; Gliboa col., 2012).

Finalmente, como se ha descrito en el apartado de la expresión génica y proteínica de la acetilcolinesterasa, el cambio en la actividad se relaciona con la expresión alternativa de transcritos que codifican a formas moleculares específicas. En el caso en meningiomas, astrocitomas y glioblastomas, además de un aumento en la actividad, hay un cambio en el patrón de las formas moleculares respecto al tejido sano. Este mismo comportamiento se ha observado en algunos tipos de leucemias donde se ha evidenciado un aumento en la expresión del transcrito AChE-R, que codifica para un monómero hidrofílico (Stephenson y col., 1995; Donger y col., 1998; Grisaru y col.1999, 2001, 2002 y 2007; Liu y col., 1998; Shapira y col., 2002; Pick y cols., 2004; Shuqiang y cols., 2011; Gliboa y col., 2012).

1. 11. Definición de la leucemia o cáncer de la sangre

La palabra leucemia procede del griego que significa “*sangre blanca*”. Las leucemias son el cáncer que afecta a las células hematopoyéticas en médula ósea, sangre periférica o cualquier órgano de origen hematopoyético, en el que se

produce un número anormal de células blancas y pueden llegar a ser tan numerosas que la sangre puede tener una apariencia blanquecina. Los blastos leucémicos que representan a un “linaje comprometido” proliferan rápidamente y se diseminan en el flujo sanguíneo trasportándose hacia el hígado, bazo, riñón, cerebro, órganos reproductores y ganglios linfáticos, donde continúan proliferando.

1. 11. 1. La etiología de la leucemia

El origen de la leucemia es multifactorial, a excepción de la exposición a rayos X y causa genéticas congénitas, tales como el síndrome de Down o el síndrome de Klinefelter (Crespo, 2010; Mejía, 2010). No existe un agente específico implicado en la aparición de la leucemia y variantes, por eso, se considera que es muy escaso el conocimiento acerca de los factores implicados. Por ejemplo, la aparición de algunas formas de leucemia aguda (LA) se ha asociado a la exposición prolongada a sustancias como benceno, derivados del petróleo y compuestos organofosforados (Crespo 2010; Mejía, 2010; Perry y Soreq, 2010). En algunos casos de leucemia, se ha asociado al uso de inhibidores de DNA-topoisomerasa II en el tratamiento quimioterapéutico (Solano, 2000). La manifestación de la linfoblástica aguda o mielocítica crónica, se ha relacionado con la activación de los oncogenes como c-myc, abl, bcl-2, c-foc y ras, al igual que la formación de genes quiméricos como BCR-AB. Al igual, que muchas mutaciones genéticas como las traslocación, deleción y duplicación de genes en

varios cromosomas como 9q22, 11q23 y 7q22, las cuales pueden ser algunas de las causas para la dicha patología (Cortes y col., 1995).

1. 11. 2. La clasificación de los tipos de leucemias

En el transcurso de las últimas décadas se han desarrollado varios sistemas de clasificación de las leucemias, de acuerdo con su morfología, inmunología y citogenética. Las diversas variedades de leucemias que existen se distinguen de acuerdo a la estirpe celular involucrada de origen linfoide o mieloide.

De acuerdo a la FAO en 1976 con el fin de unificar los criterios de clasificación en esta patología, la definen de acuerdo a las características morfológicas, y la divide en tres tipos fundamentales. Su morfología, citología y genética.

En las leucemias agudas la población celular predominante está formada por blastos, la celularidad presenta un mayor estadio madurativo. Su diagnóstico se realiza mediante el examen de sangre periférica y de médula ósea. En cuanto a la etiopatogenia se ha asociado con cromosomopatías, radiaciones ionizantes, fármacos mielotóxicos como la fenilbutazona, cloranfenicol, citostáticos, una variedad de virus y ciertos factores genéticos, por ejemplo la inactivación de genes supresores y la activación de oncogenes (López y col., 2007).

Las leucemias agudas constituyen alrededor del 30% de las neoplasias malignas en niños, y la leucemia linfoblástica aguda, es el cáncer más frecuente en grupos de edad de 0 a 16 años por diversos factores que la puedan originar como causas

genéticas o contaminantes. En el transcurso de las últimas décadas se han desarrollado varios sistemas de clasificación de las leucemias linfoblásticas de acuerdo con su morfología, inmunología y citogenética (Mejía, 2010).

1. 11. 3. La leucemia linfoblástica tipo infantil (L1)

En la mayoría de los casos, son niños los afectados, las células involucradas tienden a ser precursores de los linfocitos B y producen en sangre periférica células pequeñas denominadas L1.

1. 11. 4. La leucemia linfoblástica tipo adulto (L2)

En la mayoría de los casos son adultos los que la padecen, las células involucradas tienden a ser precursores de linfocitos T y producen en sangre periférica células relativamente grandes en comparación con un linfocito normal y a estas se les denominadas L2.

1. 11. 5. Leucemias linfoides agudas (LLA)

Estos tipos de leucemias se dividen a su vez en agudas y crónicas. Este tipo de leucemia es el más común en niños. La leucemia linfática de precursores tipo T: se caracteriza por mostrar un inmunofenotipo CD10 negativo en el 20% de los casos.

De acuerdo a la clasificación morfológica: en las leucemias linfáticas tipo L1, se observan células pequeñas de núcleo regular. La incidencia en general es de 13

casos por cada 100, 000 habitantes, con una proporción levemente superior en hombres que en mujeres.

Entre las más comunes están la leucemia linfoblástica aguda de precursores de célula B, la leucemia linfoblástica aguda de precursores de célula T, la leucemia de Burkitt. Las leucemias linfoides agudas pueden afectar tanto a los linfocitos B, como a los linfocitos T. Por ello, las LLA se clasifican de acuerdo al tipo de linfocito que afecta.

1. 11. 6. Leucemia Mieloblastica Aguda (LMA)

De acuerdo a la clasificación de las leucemias agudas propuestas por la OMS. La leucemia aguda mieloblástica y las leucemias mieloides son un grupo de patologías, que se caracteriza principalmente por su proceso pro-inflamatorio en las células hematopoyéticas, ya sean sanguíneas, de médula ósea y otros tejidos donde se originen la estirpe mieloide, y pueden ser de proceso rápidamente fatal o lentamente progresivo. Las leucemias mieloides agudas son más frecuentes en adultos, especialmente entre personas que han estado bajo tratamientos de quimioterapia debido a otro tipo de cáncer pero no se exenta a los niños de padecer algún tipo de LMA. Así por este hecho se clasifican en agudas o las alteraciones identificadas en este tipo son numéricos y estructurales asociadas al diagnostico y pronostico de los pacientes. Las más importantes son las monosomia 7 y la pérdida parcial del brazo largo 7q, la cual se observa en una

frecuencia del 6-11% en niños y en adultos se manifiesta con diversos en subtipos de LMA. Otro tipo de estados patológicos dentro de LMA, es la traslocación de t(8;21), se detectan hasta en 16% de los casos de LMA de edad pediátrica y el 8% en adultos, la LMA se han detectado alteraciones adicionales hasta en un 75% de los casos, como la pérdida de un cromosoma ligado al sexo, la delección en 9q, la trisomía 8 y la monosomía 7 sin embargo aun no se conoce el significado clínico de estos cambios secundarios (Potter y Watmore, 2001).

1. 11.7. Leucemia linfática aguda de precursores de tipo B (LLA Pre-B)

En la leucemia aguda linfática se describen alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales. En la Tabla 4, se muestra una clasificación de la leucemia teniendo en cuenta la aneuploidia numérica existente en algunas de las mutaciones que causan la patología. Este tipo de leucemia es más común en niños y de pronóstico favorable en la mayoría de los casos.

La leucemia linfocítica crónica-B (LLA pre-B) representa la leucemia humana más común en los países occidentales que en los países anglosajones y es

caracterizada por la proliferación y acumulación de linfocitos B monoclonales CD5 + en sangre periférica, médula ósea, ganglios linfáticos y órganos relacionados, que morfológicamente tienen apariencia madura, pero que son biológicamente inmaduros. El curso de la enfermedad está determinado por una profunda desregulación inmune con hipogammaglobulinemia progresiva y una disrupción en la interacción entre las células B y T, así como fenómenos de autoinmunidad. Es el prototipo de enfermedad maligna humana que involucra defectos de la muerte celular programada o apoptosis.

Tabla 4. Clasificación de las leucemias linfoblásticas agudas teniendo en cuenta la *aneuploidia* numérica existente

Grupo	Frecuencia (%)	Inmunofenotipo	Pronóstico
Hiperploide bajo (47-50 cromosomas)	10 a 15	Pre- B o T	Intermedio bueno
Hiperploide alto (51-68 cromosomas)	20 a 30	Pre- B temprana	Adverso si se presenta t(17q) o t(9:22)
Pseudodiploide alto (46 cromosomas con alteraciones estructurales)	40 a 50	Pre-B, B y T	Bueno t(12:21) Adverso t(9:22) y alteraciones 11q23
Diploide (46 cromosomas normales)	10 a 30	T	Intermedio por presentar re-arreglos crípticos
Hipoploides cercanos a haploides	7 a 8	Pre-B	Adverso

Tabla modificada de García y col., 2004.

De acuerdo a la clasificación de leucemias agudas propuestas por la Organización Mundial de la salud (OMS), se establece que la leucemia aguda linfoblástica tipo pre-B, también llamada leucemia linfoblástica de células B precursoras y leucemia linfocítica aguda de células B (LLA pre-B), se trata de una variante de la leucemia linfocítica aguda que es más típica en niños.

La leucemia es una enfermedad maligna que afecta al órgano formador de la sangre, como es la médula ósea, y conlleva a una sobreproducción anormal de células sanguíneas. En los diversos tipos de leucemia, existe una asociación con algún(os) tipo(s) de aberraciones cromosómicas, además ocurren defectos a niveles de duplicación y transcripción que conducen a un estado de desdiferenciación, y a algunos cambios en los niveles de expresión de proteínas citosólicas y membranales, que influyen en la fisiología de las células leucémicas.

En relación a las proteínas de membrana, su expresión espacio-temporal se emplea en la distinción de los estados de maduración o de diferenciación de células hematopoyéticas. Desde un punto de vista formal, a una proteína de membrana en particular, se le ha denominado agrupado de diferenciación (CD, *Cluster of Differentiation*) (Abbas., 1999).

El empleo de anticuerpos conjugados con perlas magnéticas dirigidos hacia un agrupado de diferenciación particular, es una alternativa experimental para purificar subpoblaciones celulares hematopoyéticas. Los linfocitos B durante su maduración expresan distintos agrupados de diferenciación, En el caso de las células leucémicas, que son linfocitos B que tienen una expresión de los *CD19*, *CD20* y *CD22* (Hernández. 1999).

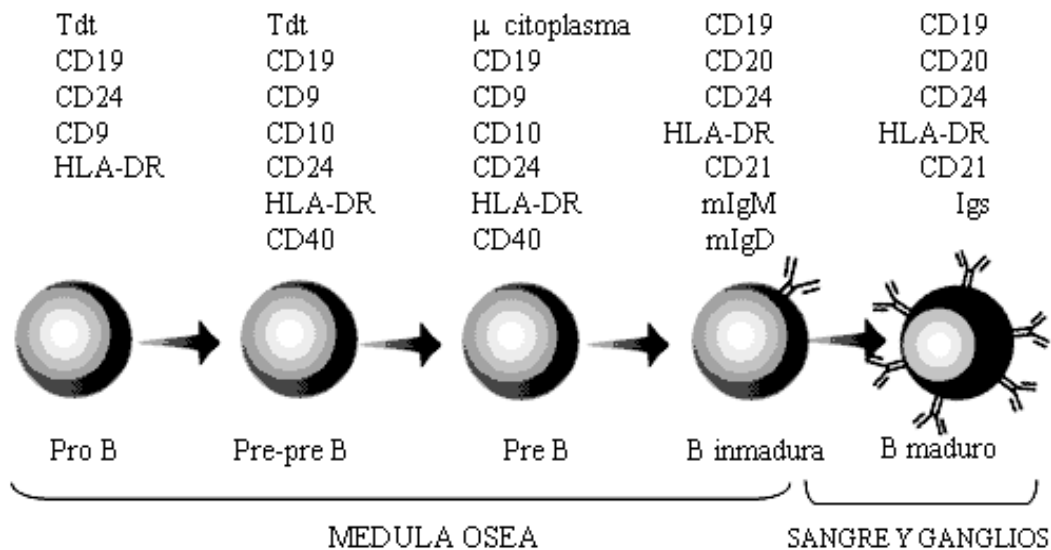


Figura 3. Esquema del proceso de maduración de linfocitos B, indicando los marcadores de diferenciación (CD) presentes en cada etapa de maduración. Como se puede observar en la figura, el marcador de superficie CD19 aparece en el estadio pro-B y se mantiene durante todo el estado de maduración de los linfocitos B.

Se ha calculado la incidencia para neoplasias linfoides teniendo en cuenta, el inmunofenotipo, esto se calculo en relación al tipo de leucemias agudas, en general, fue de 36.4 niños en relación por millón de niños-año.

La leucemia linfoblástica aguda fue la más frecuente, con 387 casos (31.85 por millón de población infantil), seguida de la leucemia mieloblástica con 50 casos (4.03 por millón de población infantil). Se reportaron dos casos de leucemia aguda sin clasificar, cuatro casos de leucemia bifenotípica y un caso de leucemia congénita (leucemia mieloblástica).

En el grupo de leucemia linfoblástica aguda, el inmunofenotipo fue 90.5% de precursores de células B, 8.2% de precursores de células T y 1.3% de células B maduras. La relación masculino-femenino fue de 1.2:1. El porcentaje de presentación por grupos de edad fue: menos de un año 3%, 1 a 10 años 74% (con un pico de incidencia entre los 2 a 5 años de 46%) y más de 10 años 24%.

En niños mexicanos esta leucemia (LLA pre-B) ha sido poco explorado, no obstante en una serie de casos se encontró una frecuencia del 65%, donde 11 de 17 niños positivos a este padecimiento fueron mayores de 2 años y mientras que los niños de 15 de los 17 tuvieron el inmunotipo pre B temprano. Esto es muy importante porque podría dar una explicación de la mayor frecuencia de LLA de mal pronóstico en niños de la Ciudad de México. (Mejia, 2010).

Se ha obtenido información relevante acerca de la naturaleza de las células neoplásicas, entre las que se incluyen; cambios moleculares y cromosómicos, los mecanismos que intervienen en la supervivencia del clon leucémico. No obstante, hacen falta esfuerzos para conocer la biología de la enfermedad, identificar subgrupos pronósticos y lograr una mayor sobrevivencia de los enfermos (Pangalis. 2001; Sánchez., 2004).

En la Tabla 5, se muestran la variación en las alteraciones cromosómicas asociadas a la leucemia linfoblástica aguda, que involucran translocaciones y rearrreglos en y entre los cromosomas 7, 9, 12, 14, 19, 21, 22. Así como, el riesgo pronóstico en cada caso.

Tabla 5. Alteraciones cromosómicas asociadas a la leucemia linfoblástica aguda				
Inmunofenotipo	Alteración cromosómica	Genes alterados	Frecuencia	Pronóstico
<i>Pre-B</i>	<i>t(9;22)</i>	<i>BCR-ABL</i>	<i>4</i>	<i>Adverso</i>
<i>Pre-B</i>	<i>t(12;21)</i>	<i>TEL-AML1</i>	<i>28</i>	<i>Favorable</i>
<i>Pre-B</i>	<i>Rearreglos en 11q23</i>	<i>MLL</i>	<i>6</i>	<i>Adverso</i>
<i>Pre-B</i>	<i>t(1;19)</i>	<i>E2A-PBX1</i>	<i>5</i>	<i>Adverso</i>
<i>Pre-B</i>	<i>t(17;19)</i>	<i>E2A-HLF</i>	<i>1</i>	<i>Adverso</i>
<i>B</i>	<i>t(8;14), t(2;8), t(8;22)</i>	<i>MYC</i>	<i>5</i>	<i>Adverso</i>
<i>T</i>	<i>Rearreglos en 7q35</i>	<i>TCRβ</i>	<i>4</i>	<i>Adverso</i>
<i>T</i>	<i>Rearreglos en 14q11</i>	<i>TCR$\alpha\delta$</i>	<i>3</i>	<i>Adverso</i>

2. JUSTIFICACION.

2.1. La importancia del estudio de la actividad acetilcolinesterasa en leucemias

Dentro de las nuevas investigaciones que se están realizando sobre diversas patologías como; Alzheimer, Parkinson, Diabetes Mellitus, Síndrome Mielodisplásico, Leucemias, Distrofia Muscular, Síndrome Metabólico, entre otras enfermedades donde se han identificado modificaciones la expresión del gen, en el nivel de la actividad y en el procesamiento pos-traducciona l de la proteína codificada. Estas anomalías han tomado un nuevo enfoque con respecto a la función no catalítica de la AChE, abriendo nuevas líneas de investigaciones. Debido a que estos rasgos están alterados notablemente en lo referente, al

cáncer. Siendo un sustento en cuanto a considerar a la acetilcolinesterasa como un factor importante en el desarrollo y/o mantenimiento del estado alterado de la proliferación celular. Esto, teniendo en cuenta, lo señalado en líneas anteriores, en cuestión de que la AChE interviene la regulación del ciclo celular, proliferación adhesión y procesos apoptóticos. A partir de lo anterior, surge las preguntas; ¿Cuál es su participación? ¿Qué tipo de participación tiene la acetilcolinesterasa? y cómo se ven alterados los procesos de expresión del gen AChE, la síntesis, la glicosilación y el ensamblado en el desarrollo y mantenimiento del cáncer. (Lapidot y col., 1989; Perry. 2000; Deutsch. 2002; Grisar y col., 2007).

El análisis de la AChE en las leucemias, la mayoría de los estudios se han centrado en la leucemia mieloide aguda debido a que se asocia con el uso de plaguicidas, los cuales son potencialmente peligrosos a la salud humana por su efecto anti-colinesterásicos leucomogénico y son potencialmente, mutagénicos sobre la región 7q22, lugar donde se localiza el gen AChE (Perry y Soreq 2000 , Massoulié y col. 1999;2000, 2002, 2006. Grisar y col., 2007).

Además, en varios estudios citogenéticos en las leucemias se han observado diversas mutaciones en la región en que se localiza el gen AChE, que incluyen deleciones y translocaciones. En muchos de los casos, se han relacionado con un mal pronóstico para los pacientes leucémicos con roturas cromosómicas en la localización 7q22 (Perry y Soreq., 2000).

Descubrimientos posteriores han sugerido una asociación entre la exposición a agentes anticolinérgicos y los cambios registrados en la AChE. Aunque, en ningún estudio se explica en términos de mecanismos moleculares, lo que sucede cuando las células pierden el control de la proliferación. Sin embargo, las respuestas hematopoyéticas al estrés implican cambios rápidos y duraderos en la composición de las células hematopoyéticas, promoviendo una elevación en el conteo de glóbulos blancos y plaquetas. (Lapidot y col., 1989; 2007). A este respecto a este mismo tema, se ha relacionado la expresión del gen de la AChE en específico del monómero hidrofóbico de la AChE-R con el proceso de diferenciación de células hematopoyéticas, y estar involucradas durante el desarrollo fetal de múltiples tejidos de origen colinérgico y no colinérgico (Grisar y col., 2000; Shapira y col., 2000; Deutsch. 2002). Específicamente, se ha demostrado que la variante AChE-R desempeña un papel activo en el sistema inmune al participar en la regulación de la proliferación de diversos tipos celulares, tales como, hematopoyéticos, hueso, retina y neuronales. Se ha postulado a la acetilcolinesterasa como un candidato en el estudio en procesos proliferativos regulares o neoplásicos (Grisar y col., 2000, 2006, 2007; Deutsch. 2002), abriendo una ventana en la búsqueda de respuestas comunes donde se ve involucrada de manera no patológica, al igual que en varios procesos patológicos.

3.Objetivo general.

Determinar la expresión del gen de la acetilcolinesterasa en linfocitos B y células leucémicas tipo B.

3.1. Objetivos Particulares.

- I. Determinar la expresión del gen AChE a través de sus transcritos particulares AChE-R, AChE-H y AChE-T.
- II. Estimar la actividad AChE.
- III. Conocer el nivel de incorporación de carbohidratos de la AChE con uso de lectinas específicas.
- IV. Determinar la hidrofobicidad de la AChE presente en los tejidos de origen linfoide analizados.

4. Hipótesis.

Si en las células leucémicas linfoides de tipo B existe una desregulación en la expresión del gen de la acetilcolinesterasa, entonces se notarán diferencia en los transcritos expresados entre los linfocitos B controles y los leucémicos, mostrando cambios en la proteína codificada en: Su síntesis, ensamblado y procesamiento pos-traduccional.

5. Metodología

5.1. Obtención de material biológico

5.1.1. Sangre venosa

- La sangre venosa perteneciente a sujetos clínicamente sanos se colectó en tubos conteniendo EDTA (Vacutainer, E.U.A.).
- Los volúmenes proporcionados fueron remanentes de 250-500 uL de aproximadamente 100 pacientes que acudieron a las divisiones médicas de ortopedia, consulta externa y estomatología en el Instituto Nacional de Pediatría.
- Las muestras se conservaron en frío para su preservación y transporte.

5.1. 2. Médula ósea

- Las muestras de médula ósea se obtuvieron por absorción del hueso sacro. (Indicado por médicos especialistas en pacientes de nuevo diagnóstico o de leucemia indicando a los pacientes con alguna sospecha de neoplasia). Las muestras biológicas empleadas en este trabajo fueron los remanentes, que habían sido utilizadas en los estudios de inmunofenotipado, pruebas bioquímicas y genéticas que los médicos especialistas juzgaron pertinentes para la ideal atención de los pacientes de la institución.

- El material biológico utilizado fue proporcionado con el conocimiento y bajo el consentimiento del Jefe del departamento de Hematología el Dr. Rogelio Paredes y la Jefa del Departamento de Análisis Clínicos y Especializados E.D.C. Lina T. Romero Guzmán de la misma institución.

5.1. 3. Mantenimiento y propagación de la línea celular pre-B REH

La línea celular REH se sembró y se cultivo en el laboratorio de Cultivos de Tejidos del Instituto Nacional de Pediatría. La línea celular fue inmortalizada con ETVG, y se emplea como homóloga de leucemia linfoblástica aguda pre B.

- La densidad celular inicial en cultivo fue de 3.45 millones en cajas Falcon.
- El medio de cultivo fue RMPI-1640 suplementado con 15% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico, 1% de piruvato, 1% de aminoácidos esenciales, 1% de L-glutamina;
- Las cajas de cultivo de mantuvieron a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.
- Se cosecharon 100 millones de células por caja sembrada,
- Todo el procedimiento se realizo en medio estéril.

5.1.4. Separación de linfocitos por gradiente de densidad

- Previo a la separación en un gradiente de densidad, las muestras de sangre periférica se diluyeron en NaCl al 0.9% en proporción de 2:1 (V/V).
- Las muestras de sangre se colocaron cuidadosamente con una pipeta Pasteur sobre el medio lymphopred.
- La mezcla se centrifugó a 800 X g durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se colectaron con una pipeta Pasteur los leucocitos mononucleares quienes formaban un anillo blanquecino en la interface del plasma y el lymphopred.
- Los paquetes celulares se lavaron por dos ocasiones en solución salina balanceada de PBS/BSA a pH 7.2
- Finalmente, se lavaron en solución hemolizante ($MgCl_2$ 1M) para eliminar por completo a los eritrocitos restantes, la mezcla se centrifugó a 800 X g por un lapso de 5 minutos.

5.1.5. Conteo y viabilidad en las células mononucleares aisladas

- Los paquetes de células mononucleares se llevaron a un volumen de 1 ml.
- De la suspensión celular se colocaron 25 ul de la suspensión celular en tubos Eppendorf y se mezclaron con 25 ul de azul tripano al 0.2%, y se dejaron incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- La mezcla se colocó en una cámara de Neubauer, evitando cargar en exceso.
- El hemocitómetro se colocó en un microscopio óptico en seco débil (10X), y se llevó a cabo el conteo celular.
- Se tomaron en cuenta, varios criterios para realizar el conteo (Figura 4):
 - a) Se contaron las células de cuatro campos en los cuadrantes de las esquinas
 - b) Se contaron las células localizadas al centro del campo y las que se encuentren en las líneas superiores.
 - c) Se anotaron las células vivas y las muertas en conteos por separado, y al final, se realizó la sumatoria total.

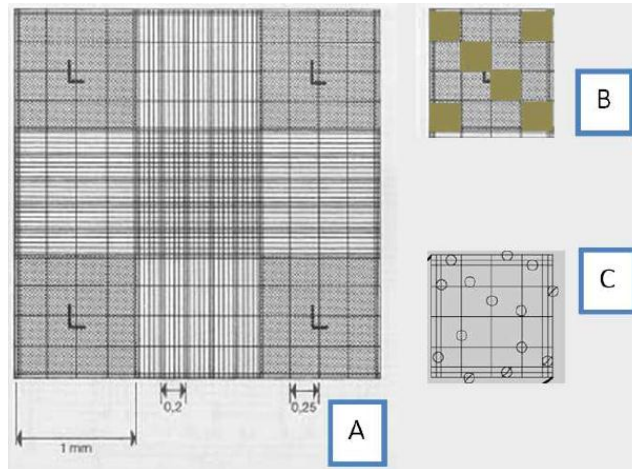


Figura 4. Cuadrícula grabada en la cámara de Neubauer empleada para el conteo de células. (A) Se denotan los cuadrantes en las esquinas que deben tener en cuenta para el conteo (Freshney, 2000)

Cálculos:

- 1) Para calcular las medias de células vivas y células muertas por cuadrante se empleó la fórmula siguiente:

$$\text{Células } (\mu) = \frac{NCv}{4} + \frac{NCm}{4} \times 16$$

Donde:

Células (μ) = Células promedio por cuadrante (células/mm²)

NCv= Número de células vivas contadas en los seis campos

NCm= Número de células muertas contadas en los seis campos

6 = Número de campos contados

16 = Número de campos por cuadrante

2.- Se realizó el procedimiento descrito en los cuatro cuadrantes de cada cámara y al final se obtuvo el promedio total de los 16 cuadrantes y la proporción de células vivas y muertas del total, con esta operación se obtiene el porcentaje de viabilidad.

3.- El resultado de Cel (μ) se multiplica por el factor de dilución empleado y se obtiene un estimado de células por un mililitro.

Para estimar la viabilidad las células que se lograron agrupar, que fueron mononucleares >90% (Linfocitos T y Linfocitos B), al final las células se mantuvieron en 40 μ l de solución HAM fría por 10 min., a una densidad conveniente de 10⁶ células/ml.

5.1.6. Inmunopurificación de las células B en columnas magnéticas MACs

El marcaje de las células mononucleares para la identificación de los linfocitos B línea celular REH, y células B de sangre periférica se empleó un anticuerpo específico anti-CD19 conjugado a esferas ferromagnéticas (MicroBeads de Miltenyi Biotec & Macs, E.U.A.) (Figura 5). En el caso de la médula ósea, los marcadores de superficie identificados fueron CD19+/CD22+/CD45+/ y CD10+ en la detección del leucemia Pre-B de acuerdo al protocolo utilizado para la identificación y clasificación de leucemias linfoblásticas agudas estandarizado por el Laboratorio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría.

- Se empleo una densidad 10^7 células, que se suspendieron en amortiguador PBS/BSA y se añadieron 20 μ l del anticuerpo específico conjugado en microperlas y/o anticuerpo anti-CD19 conjugado con tiocianato de fluoresceína (FICT)
- Se incubaron las células por 10 minutos en oscuridad a 4-8 °C.
- Se realizo un lavado con PBS/BSA 1 a 2 ml por cada 10^6 de células y centrifugando por 10 min a 300 x g para retirar el sobrenadante
- El botón celular se mantuvo en PBS para su inmunopurificación.

- El paquete celular se re-suspendió en amortiguador PBS-BSA y 10^6 millones de células se transfirieron a una columna magnética colocada en un magneto
- Se realizaron tres lavados con amortiguador PBS-BSA y las células no retenidas se dejaron eluir a gravedad (Las células negativas que no poseen el marcador superficial específico). Las células retenidas que presentaban el marcador CD19, correspondían a los linfocitos B
- Se retiró la columna de purificación del magneto y las células CD19 positivas, se recolectaron y almacenaron en amortiguador PBS-BSA.

5.1.7. La inmunodetección por citometría de flujo de los marcadores de superficie en linfocitos B

- Las células leucocitarias se diluyeron en 100 uL de amortiguador fosfato y se añadieron 2 ul de anticuerpo contra CD19 conjugado con FITC (Becton-Dickinson, E.U.A y se dejaron incubar por 30 minutos.
- Se añadieron a la mezcla anterior, 2 ml de solución de lisis (Becton-Dickinson, E.U.A.) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se adquirieron 10, 000 células de cada una de las muestras, utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur (Becton Dickinson, E.U.A.) y el software CELL Quest.

- Se hizo la identificación de los linfocitos utilizando gráficas de puntos de tamaño vs complejidad interna (FSC vs SSC). Los linfocitos fueron aquellas células de menor tamaño y complejidad interna.
- A partir de la región considerada de los linfocitos, se graficó la intensidad de fluorescencia CD19 FICT para identificar a los linfocitos B o células REH pre-B.

5.1.8. Oligonucleótidos específicos para la técnica de RT-PCR

Se utilizaron los cebadores en sentido y antisentido propuestos previamente (Muñoz y col., 2006), que se utilizaron para cada una de las variantes de ARNm expresados del gen AChE. En la tabla 6, se muestran las secuencias de los pares de oligonucleótidos utilizados, así como, el tamaño de producto amplificado esperado.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos iniciadores empleados para detectar a los transcritos AChE-H, AChE-T y AChE-R por RT-PCR

ARNm	Sentido	Antisentido	A (pb)
<i>AChE-H</i>	<i>CCCCTGGACCCCTCTCGAAAC</i>	<i>GGGAGCCTCCGAGGCCGT</i>	273
<i>AChE-T</i>	<i>GGATCCCCCTGGACCCCTCT</i>	<i>GCCTCGTCGAGCGTGTCGGT</i>	280
<i>AChE-R</i>	<i>CAGGGGATCCCAATGAGC</i>	<i>GCTCCCACTCCCCTCCTC</i>	221

A: producto de amplificación (pares de bases)

5.1.9. El aislamiento de RNAm total

Para la extracción de RNAm se siguió el procedimiento de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi 1987; Chomczynski 1993).

- Se limpió el área y utensilios de trabajo con 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).
- 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.
- Se usaron aproximadamente 10^7 células de médula ósea, línea celular REH, o 5×10^6 células marcadas positivamente a CD-19
- Se colocaron en tubos de polipropileno de 5 ml (Falcon, E.U.A.) y se añadió 1 ml de TRIZOL (Invitrogen, E.U.A.) y se homogeneizaron con un pipeteo firme y constante aproximadamente 30 seg y descanso de 30 seg hasta disgregar el precipitado. 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.
- Se centrifugó la muestra 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% y se incubó durante 1 h a – 20 °C.
- Se centrifugó la mezcla a 12,000 x g a -4 °C. x 15 min y se decantó el sobrenadante.
- Se agregó 1 ml de etanol-DEPC al 75%. Se re-suspendió el pellet con 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 μ l de H₂O-DEPC + MiliQ. Las muestras de ARNm se guardaron a -70 °C.
- Para determinar la integridad del RNAm 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.

5.1.10. Determinación de la expresión de los transcritos de AChE por 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 Hexameros, 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 "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 µl de solución inhibidora de RNAasas "RNAsaOUT"
 - Se colocaron 5 µl del "Mix" a cada uno
 - se incubó a 2 min a temperatura ambiente.
 - Posteriormente se añadió 1 µl 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.

El cDNA obtenido a partir de la reacción anterior, se utilizaron las muestras correspondientes de LLApreB, LB control y línea celular RHE, para poder realizar la técnica de PCR. Se utilizaron los cebadores específicos para AChE. 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 μl de solución amortiguadora PCR 10x, 1 μl de la mezcla con dNTP 25 mM, 1 μl del cebador u oligo sentido y 1 μl del cebador anti sentido para AChE y 0.3 μl de la enzima polimerasa GoTaq).
- Se utilizaron 25 μl para cada reacción como volumen final en un tubo para PCR de 0.5 ml, completando el volumen final con agua MiliQ ultrapura libre de RNAasas.
- Se agregaron 5 μl del molde de DNAC 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 60 °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 50 ml de TBE 1X durante 2 h a 70 V.

5.1.11. Solubilización de las colinesterasas de médula ósea, línea celular REH y células mononucleares por un método secuencial con y sin detergentes

Para la extracción de las colinesterasas de medula ósea, línea celular REH y células controles, sano se empleó aprox. \leq a 0.1 g de tejido en peso húmedo.

- 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 ug, pepstatina 10 ug, benzamidina 1 mM y aprotinina 20 U), al 10% p/v de amortiguador.
- El homogenado inicial se centrifugó a 35,000 rpm durante 1 h a 4 °C en una centrifuga XL-90 Optima (Beckman, E.U.A), y se colectó el sobrenadante para separar la AChE soluble o débilmente unida a las membranas (S₁).
- El precipitado se homogeneizó en amortiguador HEPES salino que contenía Triton X-100 y/o Brij 97 al 1% p/v. Esta suspensión se centrifugó bajo las mismas condiciones, y se colectó el sobrenadante para obtener la enzima ligada a las membranas en el sobrenadante (S₂).
- Se determinó la actividad de AChE en las dos etapas de extracción, S₁ y S₂.

5.1.12. Cromatografía hidrofóbica en matriz de octil-Sefarosa

La mezcla de los extractos S₁+S₂ de los linfocitos B controles, línea celular REH y de médula ósea de leucemia aguda linfoblástica se sometieron a un procedimiento de cromatografía hidrofóbica.

- Se depositaron 5 ml de matriz en una columna cromatográfica (10 cm X 1 cm)
- Se hidrató la matriz con 30 volúmenes de amortiguador HEPES salino (HEPES 15 mM pH 7.4, NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 3 mM). Dejando pasar el amortiguador por gravedad.
- Se transfirieron los volúmenes de 0.2-0.4 ml, y se activo a una bomba peristática (BioRad, E.U.A.) para pasar la muestra a una velocidad de 0.5 mL por minuto y cada fracción se recogió un colector de fracciones (BioRad, E.U.A.), una vez que la muestra desapareció de la superficie de la matriz. Se empleó como fase móvil al amortiguador HEPES salino, y se colectaron 40 fracciones de 0.5 mL cada una, representando la actividad no retenida, presumiblemente correspondiendo a las formas enzimáticas AChE hidrofílicas o débilmente anfifílicas.

- Se desligó la fracción enzimática retenida por la matriz al pasar como fase móvil al amortiguador HEPES 10 mM pH 7.4 con Triton X-100 al 2% (P/V), representando a las formas enzimáticas de carácter anfifílico.

5.1.13. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa en cubeta espectrofométrica

Para estimar en la médula ósea, células controles y la línea celular REH pre-B, la actividad en cada una de las fracciones, se empleó el método de Ellman y colaboradores (1961).

- Se estimó la actividad en un volumen final de 1 ml. En una cubeta de cuarzo de 1.5 ml de capacidad, se depositó amortiguador fosfato 10 mM pH 8.0, 25 ul de Iso-OMPA (50 μ M) (inhibidor de la actividad butirilcolinesterasa), 30 ul de DTNB (0.33 mM) y 25 ul de la muestra.
- Se agitó la cubeta y la mezcla se dejó incubar por 20-30 minutos a temperatura ambiente. Para que el DTNB reaccionará con los grupos tioles de la muestra. Se leyó la absorbancia a 412 nm para determinar que la lectura fuera constante.
- Se añadieron 25 uL de acetilticolina (1 mM), se agitó la cubeta y se registró la absorbancia frente a una cubeta “blanco” que contenía todos los reactivos, excepto la muestra, cuyo volumen fue substituido por amortiguador fosfato.

- La actividad AChE se expresó en nmoles de sustrato hidrolizados por hora y por mililitro de muestra ($\text{nanomoles} \times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ o U/ml), el cual se obtuvo al multiplicar el aumento proporcional de la absorbancia por minuto, por un factor que resulto 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, $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

5.1.14. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa en placas de microtitulación

Para estimar en la médula ósea, células controles y la línea celular pre-B REH, la actividad en experimentos de interacción con lectinas, se empleó el método de Ellman adaptado a un microensayo (Campoy. y col. 1992).

El volumen final de reacción fue de 275 μl , donde las concentraciones de los reactivos (sustrato, inhibidor de la actividad BuChE y DTNB) fueron las mismas que para la valoración en cubeta. Aunque, el amortiguador fosfato se ajustó a pH 7.5.

- Se agregaron 25 μl de muestra a estimar por triplicado, en pocillos seleccionados en una placa de microtitulación (Greiner, Alemania) y en otros pocillos “blanco” se puso agua (tetraplicado).

- Se añadieron 225 μ l del medio de reacción (Amortiguador fosfato 100 mM, pH 8.0 con DTNB 0.33 mM, Iso-OMPA 50 μ M).
- Se incubó la microplaca por 20-30 minutos a temperatura ambiente. Para que el DTNB interaccionará con los grupos tioles de las proteínas.
- Se añadieron 25 μ l de ioduro de acetiltiocolina (11 mM), la microplaca se agitó.
- Se leyeron las absorbancias a 405 nm en un lector de microplacas de titulación (Biotek, E.U.A.).

5.1.15. Determinación del contenido de proteínas totales

El contenido de proteínas totales en cada una de las etapas de extracción se estimó por el método de Bradford (1976).

- 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.
- En una microplaca de titulación se añadieron de la solución de BSA, los volúmenes de 0, 2, 4, 8, 10 μ l y se completaron a 10 μ l con agua desionizada.
- Se diluyeron las muestras problema con agua desionizada (1:10 V/V) y se agregaron 10 μ l de cada muestra por tetraplicado.

- Se agregaron 200 ul del reactivo de Bradford, incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente
- Se leyó la absorbancia a 595 nm de longitud de onda.
- Se calcularon los contenidos de proteínas en cada muestra problema, con los valores de la pendiente y ordenada al origen calculados a partir de la curva de calibración a partir de la curva de calibración realizada de manera extemporánea.

5.1.16. Análisis de la glicosilación de la acetilcolinesterasa

La naturaleza de los azúcares terminales en las glicoproteínas se consiguió empleando lectinas de distinta especificidad; *Concanavalina ensiformis* (Con A-Sefarosa), *Lens culinaris* (LCA - Sefarosa), *Triticum vulgare* (WGA-agarosa) y *Ricinus communis-I* (RCA-agarosa). En el caso, de las células REH se mezclaron los extractos de tres cultivos. En el caso de las muestras de médula ósea, la interacción fue individual (n=3).

- Se mezclaron las fracciones S₁ y S₂ en volúmenes iguales.
- Se incubaron dos volúmenes de la mezcla con un volumen de cada una de las lectinas inmovilizadas durante 18 h a 4 °C, en agitación constante.
- La mezcla se centrifugó a 10, 000 X g por 5 min, para precipitar los complejos lectina-AChE.

- Se determinó la actividad AChE en los sobrenadantes por triplicado siguiendo el método de microplaca.
- Se utilizó como control de enzima de unión inespecífica a la matriz inerte a la Sepharose-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.

6. Resultados y Discusión

6.1. Análisis por citometría de flujo de las muestras hematopoyéticas analizadas

Sangre completa

Las muestras de sangre periférica de los niños control se sometieron al análisis de citometría de flujo, en primera instancia se analizó la granulosidad y complejidad de la presencia de las tres poblaciones celulares. En la Figura 5, se muestra un análisis tipo de la muestra de sangre completa donde se seleccionó una región que correspondió a los leucocitos. Las muestras de sangre se incubaron con un anticuerpo anti-CD19 y se sometieron a un análisis de citometría flujo donde se observaron dos poblaciones, una CD19- y una CD19+ representando que, el nivel de fluorescencia se mostró una población plenamente definida como células CD19 positivas que representaron a los linfocitos B o células pre-B en el caso de la línea

celular REH, o muestras procedentes de la médula ósea de pacientes con leucemia (Figura 6).

Las muestras de sangre completa se sometieron a separación en gradientes de densidad de lymphoprep, donde se colectaron las interfaces enriquecidas en leucocitos. Luego, se sometieron a separación magnética usando dos anticuerpos contra el marcador de superficie CD19; uno conjugado con perlas magnéticas (purificación de células CD19+), y otro conjugado con el fluorocromo tiocianato de fluoresceína (identificación de células CD19* por citometría de flujo). En la figura 5 se muestra la distribución de linfocitos CD19+ en un análisis de citometría de flujo, evidente la presencia de una población con valores altos de fluorescencia, localizada en el cuadrante superior izquierdo.

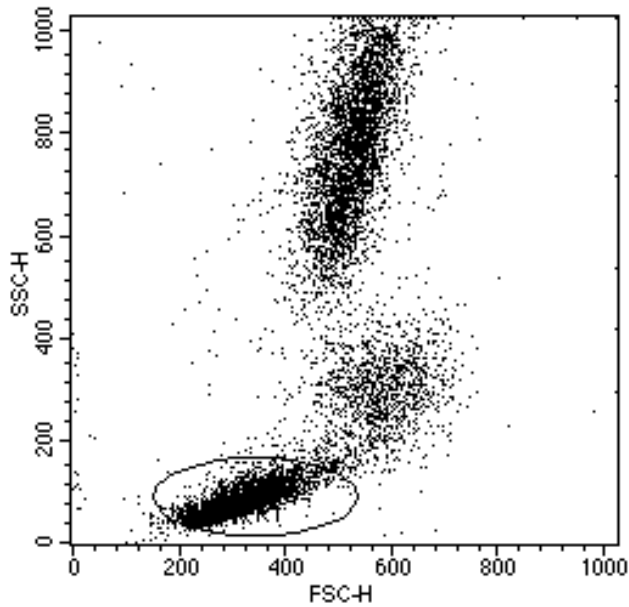
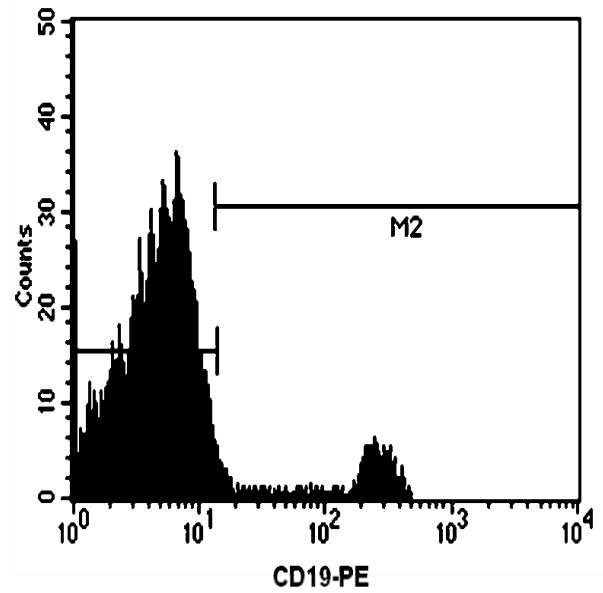


Figura 5. Análisis de citometría flujo de una muestra de sangre completa del grupo control sin marcaje diferencial. Para verificar la existencia y distribución de las diferentes poblaciones de linaje hematopoyético. En un ovalo, se remarcó la población linfoide que se localiza por su tamaño de entre 200 y 400 FSC-H

Figura 6. Análisis de la expresión del marcador de superficie para linfocitos B con el anticuerpo conjugado con el fluorocromo ficoeritrina (PE) de una muestra de sangre completa del grupo control. En el histograma se muestran dos poblaciones celulares plenamente distinta: La región M1, que representan a las células negativas al anticuerpo anti-CD19 y la región M2, las cuales son células que fueron positivas al marcador de superficie específico de linfocitos B.



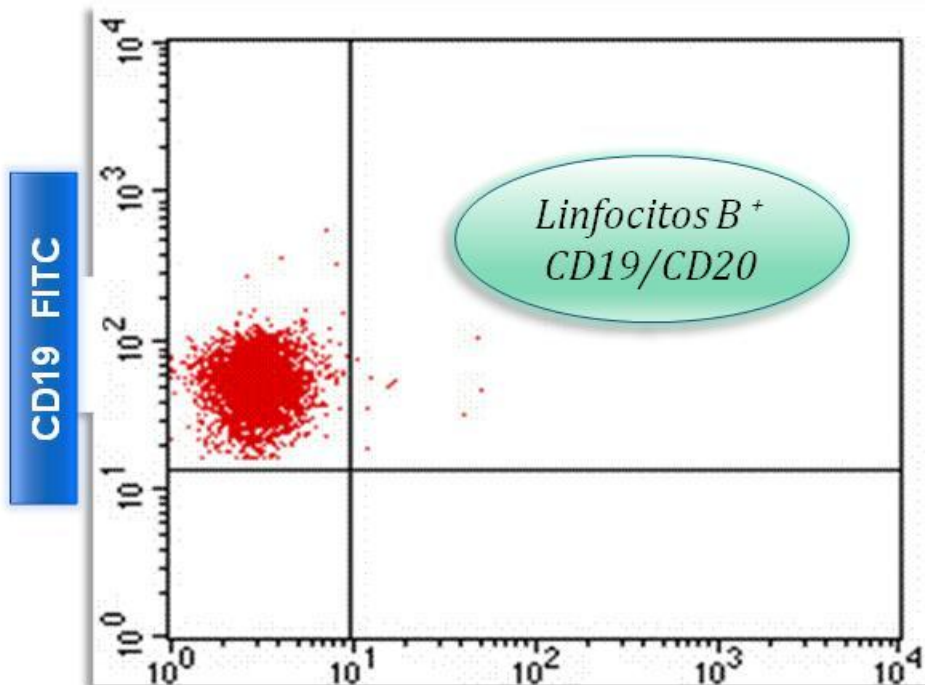


Figura 7. Linfocitos CD19+ analizados por citometría de flujo .Los leucocitos mononucleares separados por gradientes de densidad (Lymphopred) se incubaron con dos anticuerpos: 1) Anti-CD19 conjugado con perlas magnéticas y 2) Anti-CD19 conjugado con tiocinato de fluoresceína (FITC). Se realizó la separación magnética y las células retenidas se sometieron a análisis de citometría de flujo.

A partir de los análisis de citometría de flujo de las inmunopurificaciones con la estrategia de anticuerpos conjugados con perlas magnéticas, se confeccionó la Tabla 6, donde se observa que se consiguió obtener linfocitos B en elevado nivel de pureza

<i>Tipo celular</i>	<i>Obtención de tejido</i>	<i>% de recuperación LB</i>	<i>Viabilidad</i>	<i>% de células</i>
<i>Células control</i>	<i>10 niños</i>	<i><85</i>	<i>85</i>	<i>≤90</i>
<i>Células LLA-PreB</i>	<i>3 pacientes nuevo diagnostico</i>	<i><85</i>	<i>90</i>	<i><90</i>
<i>Línea REH</i>	<i>3cultivos celulares</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>
<i>Cel. LMA (ausencia de LB)</i>	<i>1 paciente de nuevo diagnostico</i>	<i>>5</i>	<i>90</i>	<i>≤85</i>

Tabla 6. Porcentaje de purificación por separación magnética, viabilidad de linfocitos B obtenidos de médula ósea, linfocitos de sangre periférica y la línea celular RHE.

6.2. Extracción de proteínas por método secuencial de amortiguadores sin y con Triton X-100

Debido a que las membranas biológicas básicamente están constituidas por bicapas lipídicas en las cuales están incluidas proteínas periféricas o extrínsecas (Capaldi, 1982). Para la extracción de la membrana de ambos tipos de proteínas, se ha considerado que el procedimiento es la aplicación de un método en dos secuencial de dos etapas; en la primera, de manera preferencial se extraen las proteínas asociadas débilmente a la membrana con un amortiguador salino y en la segunda el amortiguador más algún detergente biológico como Triton X-100. (Stieger y Brodbeck, 1985). Como resultado de ese método en los linfocitos B, el contenido total de proteínas fue de 0.702 mg/ml con una D.E de 0.026 y un

porcentaje de (S_1 con 59% y S_2 con 41 %). En tanto que, en la ausencia total de linfocitos B, como es el caso de la leucemia mieloblástica aguda (LMA), la concentración de proteínas totales fue 0.576 mg/ml con una D.E 0.027 y un porcentaje de (S_1 con 44% y S_2 con 56%) Sin embargo, los contenidos fueron mayores en la leucemia linfoblástica aguda con 0.639 mg/ml con una D.E 0.030 y un porcentaje de (S_1 con 64% y S_2 con 36%) y la línea celular REH (0.853 mg/ml D.E. 0.028 y un porcentaje (S_1 con 53% y S_2 con 47%) en el contenido de proteínas totales. Lo cual evidenció que la extracción de proteínas de membrana fue el óptimo en los tejidos sanos y patológicos para su análisis, demostrando que en el caso de la línea REH pre-B se observó una disminución con respecto al control y hubo un mayor contenido de proteínas totales en LMA que en el resto de las muestras analizadas, ya que con respecto al control el aumento es notorio. En relación con estos datos analizados, se observó que en las neoplasias y en particular las leucemias mieloblásticas se presentan una des-regulación proteica generalizada.

Se ha sugerido que en el proteoma total de una célula eucarionte, las proteínas de membrana comprenden el 25% (Krogh et al, 2001). Muchas de las propiedades alteradas en las células malignas se relacionan con alteraciones en las funciones de la membrana plasmática, que se asocian con una disminución o un aumento en el contenido de proteínas particulares (Hynes, 1976). Por lo que, se podría suponer que en las células leucémicas ocurre una desregulación en los genes que

codifican para proteínas, que les favorecen la proliferación, migración y adhesión celular, indispensables para mantener su propiedad de inmortalidad.

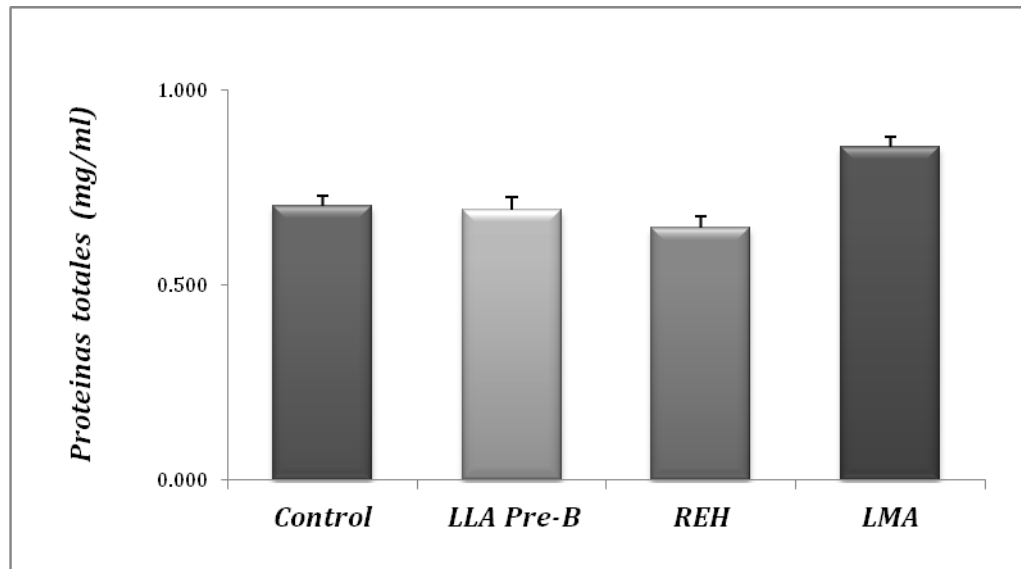


Figura 8. Variaciones en el contenido de proteínas totales en varios tipos de células leucémicas en relación a linfocitos totales. El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford. Los valores mostrados representan el promedio de cuando menos tres muestras en cada caso, estimadas por triplicado en cada caso.

Se han establecido diferencias en el patrón de proteínas sintetizadas entre linfocitos b y células leucémicas linfocíticas demostrando diferencias en la síntesis de proteínas (Battisti, y col. 2009). En algunas líneas celulares linfoides, la identificación de proteínas de membrana puede emplearse para la identificación de la susceptibilidad, la resistencia a drogas y como factor pronóstico (Gez y col. 2007).

Se sabe que algunas proteínas presentan un pequeño número de aminoácidos que constituyen el dominio transmembrana que atraviesa la bicapa y dominios hidrofílicos de mayor tamaño a uno o ambos lados de la membrana (Sudhof y col., 1985) y otras proteínas contienen una sola región hidrofílica y el dominio hidrofóbico no siempre cruza la membrana y puede adoptar una orientación relativamente variable en la bicapa (Thompson, 1993). Tal es el caso de algunas de las formas moleculares de la AChE-H o AChE-T.

Originalmente, se presumió que las interacciones entre proteínas y lípidos, son los que proporcionan a la membrana su integridad estructural y que eran de naturaleza no covalente. Posteriormente, se observó que algunas proteínas de membrana altamente purificadas contenían lípidos unidos covalentemente. En ocasiones, las proteínas tienen ácidos grasos unidos por enlaces amida, tioéster, o éster a residuos de aminoácidos. Estos lípidos pueden participar en el anclaje de la proteína o desempeñar otra tipo de función que no sea meramente de anclaje (Stephenson y col., 1995; Massoulie y col., 2005). Algunas proteínas contienen residuos de glicofosfatidilinositol (GPI) unidos covalentemente al polipéptido, donde el fosfolípido constituye el modo de anclaje a la membrana, tal es el caso de una de las formas moleculares de la AChE-H que está unida a un tallo (GPI) de este tipo que alcanzarían altos niveles presentes en el sobrenadante S₂.

Las diferencias en los niveles de solubilización de proteínas débilmente unidas a membrana presentes en fracción (S₁) o las fuertemente unidas a membrana (S₂),

al realizar el análisis por separado de ambas fracciones, hubo un aumento ligero en el contenido de proteínas en el homogeneizado sin detergente en las células REH leucémicas pre-B. Este efecto podría relacionarse a una síntesis anormal en las células leucémicas causado primordialmente por las características de la patológicas de las leucemias y los cánceres, pero no así en las células de médula ósea de leucemia aguda linfoblática o de la leucemia mielode aguda (Figura 9).

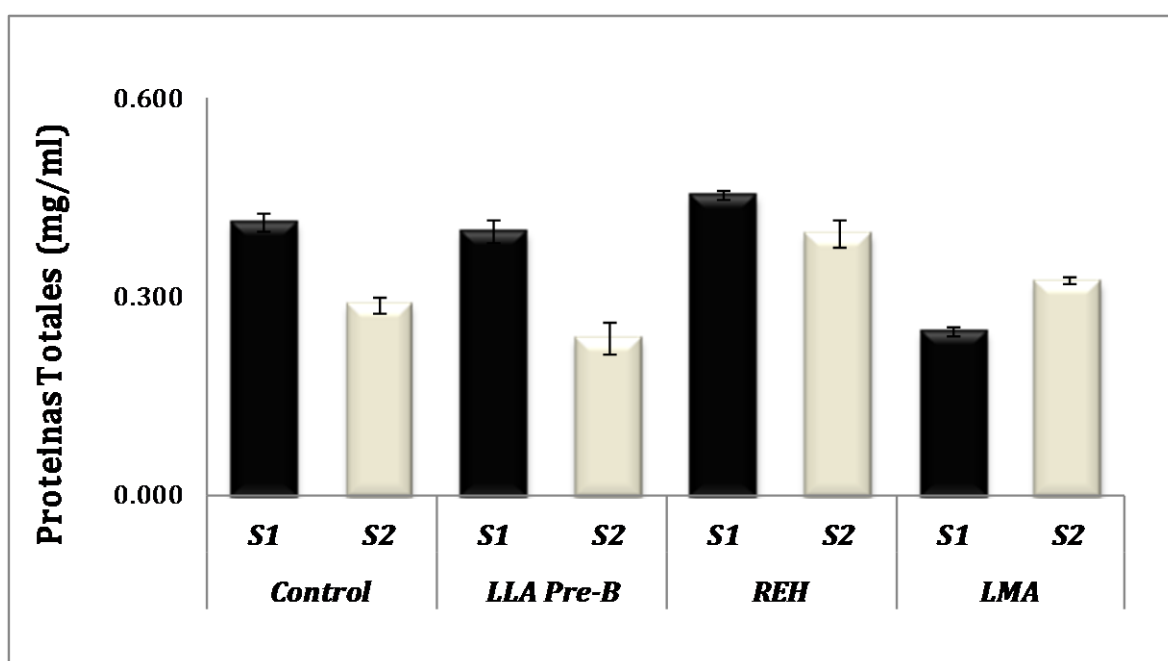


Figura 9. Comparación del contenido de proteínas totales extraído bajo un método secuencial sin o con el detergente Triton X-100. Las proteínas se extrajeron en una relación p/v 1:10 en amortiguador Hapes con sales (S1) y Triton X-100 al 1% p/v (S2). El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford. Los valores mostrados representan en promedio de cuando menos tres muestras en cada tipo celular. En cada caso, cada muestra se estimó por triplicado.

En tanto que en el contenido de proteínas totales en la fracción extraída con Triton X-100 en la línea celular fue mayor en comparación con los valores estimados en los linfocitos B control. La conducta *in vivo* e *in vitro* de las células neoplásicas o transformadas difiere de las células normales en su capacidad proliferativa. Debido a que no están restringidas por los puntos de restricción que regulan de crecimiento celular (Hynes, 1976). Un factor importante en el crecimiento de las células en cultivo de tejidos depende de la densidad celular. Se ha observado que la transformación celular por virus, agentes químicos o físicos altera muchas propiedades celulares especialmente aquellas relacionadas con la membrana plasmática (Mayani y cols. 2007; Pitot. 1981).

Los cultivos celulares son ampliamente recomendados como modelo *in vitro* para el estudio de transformación maligna, algunos tipos celulares incluyen: los fibroblastos, los mioblastos y los linfocitos (Hynes, 1976). Dentro de éstos últimos tipos celulares se encuentra la línea celular REH, que bajo las condiciones de cultivo en que se propagaron, mostraron algunas características funcionales como modelo de LLA pre-B, debido a presentan los receptores y/o traduce los efectos de factores de crecimiento presentes en el suero o a través de la comunidad celular. Tal es el caso de la expresión del marcador de superficie CD19 que se empleó como característica de referencia para purificar a los linfocitos B controles.

6.3 Extracción de la actividad acetilcolinesterasa

Se realizó el análisis de la actividad acetilcolinesterasa total extraída de los diversos tipos celulares hematopoyéticos comprometidas tipo B. En la figura 10, se muestra la comparación de los valores obtenidos de los linfocitos B control con diversos grupos de células leucemias. Donde se observó que hubo un aumento significativo ($p < 0.002$) en las células B purificadas de la médula ósea de la leucemia linfocítica aguda (LLA pre-B), y un comportamiento contrario, fue evidenciado en la línea celular REH que se empleó como modelo homólogo de leucemia linfoblástica aguda pre-B. En las células de la leucemia mieloide aguda se observó una mayor actividad AChE total que las células B control.

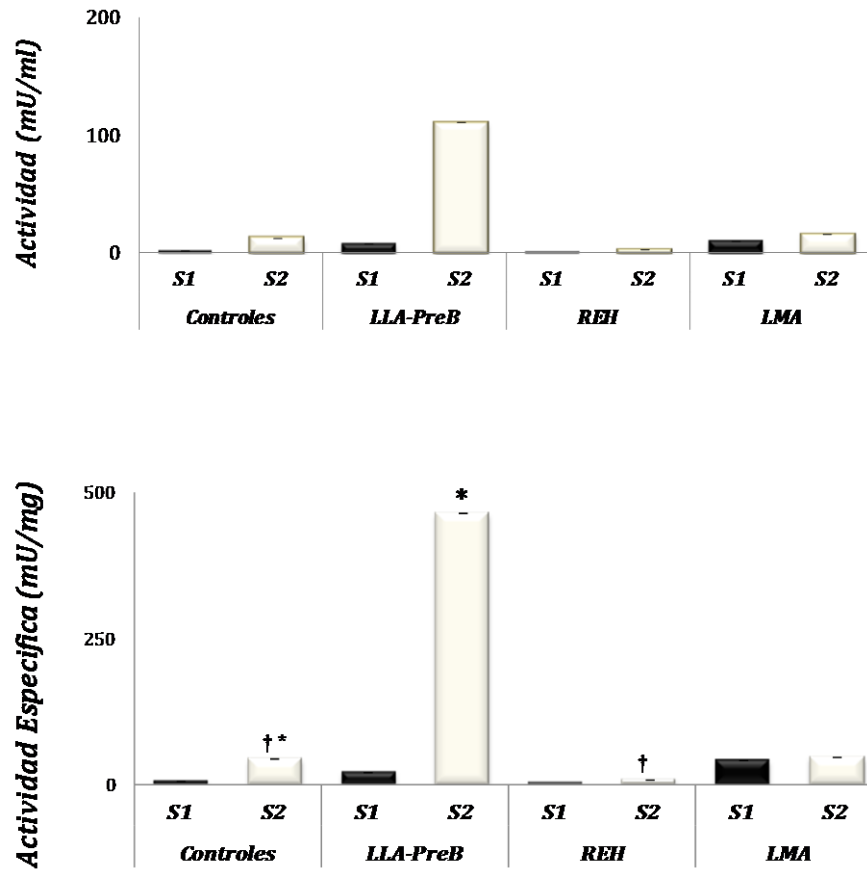


Figura 10. Actividad acetilcolinesterasa total extraída de linfocitos B control y células leucémicas tipo linfoblástica y mieloide. Una unidad de actividad acetilcolinesterasa representa la hidrólisis de la acetiltiocolina por hora, en dos formatos: Lado izquierdo, actividad expresada por unidad de volumen y lado derecho, actividad expresada en relación a un miligramo de proteína. Los valores mostrados representan el promedio y la desviación estándar de cuando menos tres muestras en ambos caso de la línea celular REH, leucemia linfoblástica aguda pre B (LLA-preB) y leucemia mieloblástica aguda (LMA), los linfocitos B controles. Las mediciones se realizaron por triplicado en cada caso. Los valores se compararon por la prueba de U de Mann-Whitney respecto al grupo control * $U = 1.404$, $p = 0.198$ con $g.l = 6$. † $U = 5.441$ con una $p < 0.002$ con $g.l = 6$ y $\alpha = 0.05$.

Las diferencias observadas en los valores de la actividad AChE entre la línea celular REH y LLA pre-B podría relacionarse con varios factores que incluyen el nivel de transformación, que se han generado por la condición de propagación *in vitro*, y por otro lado, el aislamiento de células clonales de linfocitos B representan un momento de diferenciación (Paranau y col., 2000; Kawuachima y Fuji., 2003)

Las preparaciones ricas en proteínas solubles o débilmente unidas a membrana y las fracciones con alto contenido de proteínas hidrofóbicas se logran a través del método de extracción secuencial de un tejido con amortiguadores salinos sin y con detergentes (extractos S₁ y S₂, respectivamente). Además, es conveniente incluir en el medio de extracción un conjunto de inhibidores de proteasas, ya que al disgregar el tejido se liberan las proteasas intracelulares, lo que puede afectar seriamente al número y distribución de las formas enzimáticas de la acetilcolinesterasa, por ser éstas sensibles al ataque proteolítico.

La actividad acetilcolinesterasa de los diferentes tipos celulares hematopoyéticos solubilizada con los distintos amortiguadores de extracción, mostraron que hubo una mayor solubilización de la AChE con el amortiguador conteniendo al detergente Triton X-100, observándose los siguientes resultados, LLA-pre B (S₁: 4% y S₂: 96% de extracción), células control (S₁: 11% y S₂: 89% de extracción) y leucemia tipo B REH (S₁: 9% y S₂: 91% de extracción), con excepción de LMA (S₁:

47% y S₂: 53% de extracción) que al parecer la solubilización es similar con ambos amortiguadores.

Este aumento de la actividad estimada en S₂ podría estar sustentada en la expresión del transcrito AChE-H que puede codificar AChE con capacidad de formar, monómeros y/o dímeros hidrofóbicos anclados a membrana con un tallo glicofosfatidilinositol.

La mejor solubilización de las enzimas con el detergente (S₂), se puede relacionar con el siguiente hecho: en las células hematopoyéticas, principalmente en eritrocitos, se ha establecido que expresan de manera predominante las formas hidrofóbicas de la acetilcolinesterasa (Lev-Lehman y col., 1997; Grisaru y col., 2001); y el haber solubilizado a las enzimas con fuerza iónica se debe al hecho: de que en estados alterados de proliferación se expresa la forma molecular monomérica hidrofílica AChE-R (Pick y col., 2004).

Las proteínas intrínsecas son poco estables en medios acuosos, aumentando su estabilidad conformacional cuando el medio contiene detergentes. Para las proteínas fuertemente ligadas a la membrana donde las fuerzas iónicas no son suficientes para la extracción de la actividad acetilcolinesterasa, estas son solubilizadas usando amortiguador con Triton X-100. El Triton X-100 es el detergente más empleado para solubilizar a las colinesterasas de numerosos tejidos (Gisiger y Stephens, 1983; Rotundo, 1984; Muñoz Delgado y Vidal, 1987; Toutant y Massoulié, 1988; Bon y col., 1991; Verdière-Sahuqué y col., 1991; Hodges-Savola y

Fernández, 1991; Sánchez-Chávez y col., 1995). También se han empleado otros detergentes como C12E9, octilglucósido y sales biliares (Muñoz-Delgado y Vidal, 1987) o Brij-96 (Moral-Naranjo y col., 1997). Como las proteínas de membrana presentan interacciones iónicas, además de las hidrofóbicas, es conveniente añadir altas concentraciones de NaCl a las soluciones amortiguadoras de solubilización.

En cuanto al comportamiento en los valores de actividad AChE en el extracto S₁ que preferencialmente correspondería a las proteínas débilmente unidas a la membrana, se podría sospechar la presencia de la variante monoméricas soluble AChE-R.

En las células controles la actividad AChE en la fracción S₂ fue de 111mU/ml, al evaluar la actividad enzimática de AChE en la línea celular REH logra notarse que fue de 3mU/ml, que no se correlacionaron con los valores estimados en las fracciones extraídas de la médula ósea de pacientes con LLA Pre-B, debido a que la línea celular mostró una menor actividad en cuanto a la AChE extraída y calculada en mU/ml.

En el análisis relacionado a ambas leucemias en la actividad AChE se observó que no mostraron el mismo comportamiento, a pesar de que ambas representan neoplasias de células hematopoyéticas. Es notorio que los linajes que se expresan en estas patologías la actividad acetilcolinesterasa fue diferente, demostrando que existía una expresión distinta entre las células hematopoyéticas dependiendo de su estirpe. La LLA-Pre-B representa en un 100% a células linfoides de tipo B y

LMA que representan un 90% de células mieloblásticas y ausencia total de células B, esta diferencia en linaje podría ser parte de la respuesta a la distinta actividad AChE entre ambas patologías leucémicas.

Este acercamiento en ambas neoplasias nos permitió determinar que la acetilcolinesterasa sufre diferentes alteraciones en los niveles de actividad en ambos procesos patológicos, siendo una evidencia de que la actividad de la acetilcolinesterasa, es tejido dependiente y no está obligada a actuar de manera generalizada en los tejidos. Incluso si ambos tejidos son tejidos hematopoyéticos, por lo cual cabe señalar que si se desea hacer un estudio detallado de su comportamiento es necesario delimitar claramente el tejido a analizar.

Con el propósito de determinar los niveles de enzima acetilcolinesterasa hidrofílica, que confirmará su solubilización, se decidió analizar la interacción de los extractos S_1+S_2 con matrices de afinidad hidrofóbica. En el siguiente apartado se describen los resultados obtenidos al respecto.

6.4. Determinación del carácter hidrofílico o hidrofóbico de las especies enzimáticas acetilcolinesterasa

La confirmación del carácter hidrodinámico de la enzima se logró cuando la mezcla S_1 y S_2 de los extractos de cada una de las muestras de células hematopoyéticas de linfocitos B controles, linfocitos LLA pre-B y la línea REH, fueron sometidas a una cromatografía hidrofóbica para la determinación del

carácter hidrofílico y/o hidrofóbico de la acetilcolinesterasa presente en los extractos. Los soportes de cromatografía por afinidad sirven para identificar regiones específicas de la acetilcolinesterasa de acuerdo al carácter hidrofóbico específico. La característica sobresaliente de la cromatografía por afinidad es la capacidad selectivamente para separar de una mezcla proteínica compleja, a una proteína por su carácter hidrofóbico en particular o un pequeño número de ellas (Gómez, 1999, 2000).

En la cromatografía hidrofóbica, la fase estacionaria está compuesta por el soporte inerte (agarosa, sefarosa, entre otros) y grupos adicionados como el alcohol octílico, grupos bencénicos u otros grupos hidrófobos como hidrocarburos (C4, C8 o C18), los cuales sirven para interaccionar con los centros hidrófobos de las proteínas que son expuestos por exceso de salinidad, a lo que se ha denominado hidrofobicidad superficial. Las regiones hidrofóbicas interaccionan con los grupos hidrofóbicos de la matriz cromatográfica, proceso que resulta termodinámicamente favorable (Lesser y col., 1987).

La primera etapa estaría determinada por el tipo de sal utilizada (especialmente caotrópicas) y la segunda etapa resulta ser una etapa de cinética de separación más lenta que depende de la hidrofobicidad de la proteína y de acuerdo a la matriz (Sofer y Hagel., 1998; Tomaz y cols, 2002).

En la Figura 11, se muestran los perfiles de separación en la matriz hidrofóbica de octil-sefarosa de los extractos en células B control y células leucémicas pre-B, observándose que comparten un patrón similar. En los linfocitos B y células REH, se presentó un primer pico que se despegó de la columna con amortiguador salino con elevada fuerza iónica (Hepes y NaCl, 1M), representando especies de acetilcolinesterasa con carácter hidrofílico, que podría estar relacionado con la expresión de los transcritos AChE-R, que se esperarían en células hematopoyéticas. Se observó un segundo pico con mayor actividad acetilcolinesterasa recuperada cuando empleó amortiguador Hepes con Triton X-100 al 2%, que correspondieron a especies enzimáticas de la acetilcolinesterasa hidrofóbica, que podrían estar relacionadas con la expresión de los transcritos AChE-H, que se conoce codifican para dímeros anclados a la membrana por enlaces glicofosfatidilinositol.

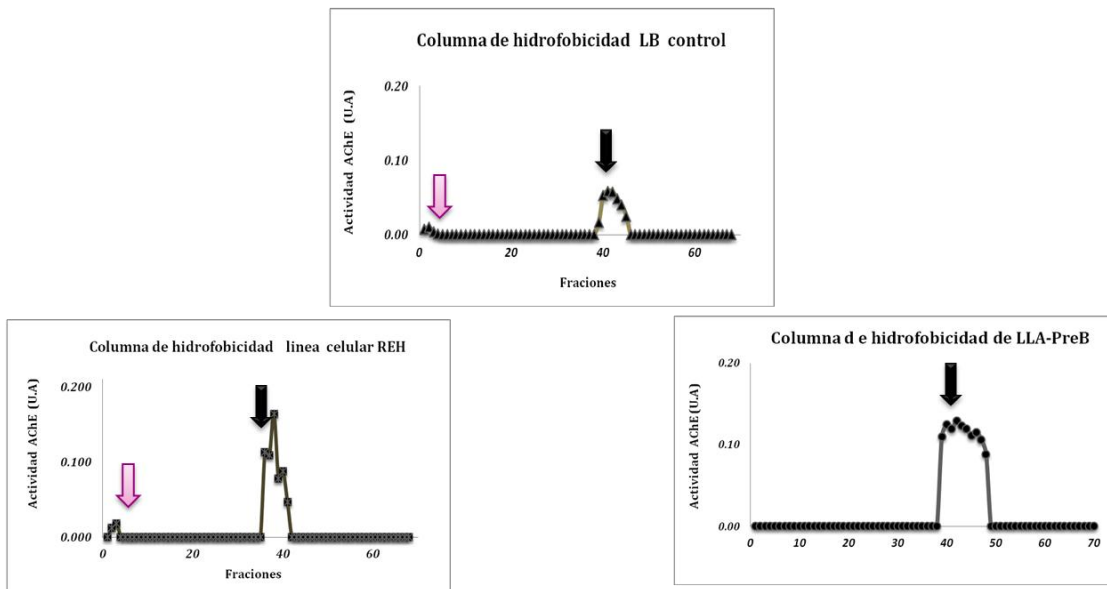


Figura 11. Perfiles de separación de actividad acetilcolinesterasa a partir de la mezcla S1+S2 de extractos en linfocitos B y células leucémicas pre-B en matriz hidrofóbica de octil-sefarosa. En la figura (A) se observan dos picos, el primero representó a las enzimas hidrofílicas se eluyeron libremente con amortiguador Tris-HCl salino pH 7.4 (No retenidas, NR), y hubo actividad que requirió el empleo Hepes con Triton al 2% (V/V), que representaron a las enzimas hidrofóbicas. La actividad AChE en cada fracción colectada se determinó por un método de Ellman por el micrométodo. En el perfil de la línea LLA-preB eliminar o ajustar el pico de mayor actividad, a la forma de la curva inferior. Las Flechas claras marcan las fracciones hidrofílicas (solo con amortiguador salino) y las oscuras marcan las hidrofóbicas (despegadas con amortiguador salino + Triton X-100).

La tendencia de separación de las enzimas AChE con carácter hidrofílico fue similar con el nivel de actividad extraída solo con fuerza iónica (S_1) que coincide en los linfocitos B control, y células REH, pero no con las células de médula ósea de la leucemia linfocítica aguda, donde a pesar de haberse estimado la actividad mU/mg y mU/ml de AChE en la extracción, se observó que la actividad en S_1

correspondieron a las formas debilmente unidas a la membrana que podrían representar las formas moleculares AChE-R, el cual se ha determinado en altos niveles en proliferacion activa y en las células hematopoyeticas, pero el primer pico no es evidente. No obstante, hubo una mayor actividad acetilcolinesterasa recuperada, la cual concuerda con las estimaciones en mU/ml y mU/mg de la fracción S₂ donde se encontró una mayor actividad de AChE. Al realizar el analisis de hidrofobicidad del segundo pico que corresponde a las formas hidrobicas, como lo es la forma molecular AChE-H, concuerda con el comportamiento de la actividad y la presencia de éste transcrito, debido a que posee un anclaje GFI a la membrana, se podría esperar presentarse en el extracto S₂, demostrando que en linfocitos B controles y patológicos presentaron un mayor proporción de formas moleculares de acetilcolinesterasa de carácter hidrofobico en sus membranas plasmáticas.

6.5. Importancia de la actividad acetilcolinesterasa en la funcionalidad de los linfocitos

La proliferación, diferenciación y muerte de las células hematopoyéticas depende de tres sistemas de control; a) el sistema inmunológico, a través de las citocinas, b) el sistema colinérgico linfoide independiente (Kawashima y Fuji, 2000) y c) el sistema nervioso parasimpático, el cual juega un papel en la comunicación inmunoneurohumoral (Kawashima y Fuji, 2003, 2004).

En linfocitos aislados del timo, así como los nódulos linfáticos, el bazo y sangre periférica se han identificado componentes de los tejidos nerviosos como son los receptores muscarínicos (M) y nicotínicos a la acetilcolina, y su capacidad de ser estimulados por agonistas específicos que evidencia una amplia variedad de efectos bioquímicos y funcionales (Kawashima y Fuji, 2004).

En linfocitos B y T de sangre periférica, timo, nódulos linfáticos y bazo, se ha determinado la expresión de la acetilcolinesterasa. Por análisis de inmunodetección en papel e inmunohistoquímica, se ha establecido que todos los linfocitos de sangre periférica expresan inmunoreactividad positiva a la acetilcolina, acetilcolina-transferasa (enzima que sintetiza a la acetilcolina), transportador vesicular de acetilcolina y receptores muscarínicos tipos M2 y M5 (Tayebati y col., 2002; Skok y col., 2003; Kawashima y Fuji, 2003; 2004).

El patrón de inmunoreactividad en las membranas de los linfocitos es similar al tejido cerebral. La inmunofluorescencia láser confocal, mostró a la AChE difusa en el citosol y membrana plasmática. La inmunoreactividad del receptor muscarínico fue localizada en la membrana plasmática del linfocito (Tayebati., 2000). Además de que la acetilcolina se ha detectado en los linfocitos circulantes en la sangre de varias especies. Por otro lado, en los leucocitos mononucleares de sangre humana, las líneas celulares leucémicas tipo-T, se ha identificado la expresión de la acetilcolina-transferasa usando PCR e hibridación DNA-RNA.

En los linfocitos T estimulados con antígeno o mitógeno (fitohemaglutinina) a través del complejo receptor antigénico-CD3 se ha observado la activación del sistema colinérgico, evidenciado como un aumento en la síntesis y la liberación de la acetilcolina, aumento en la expresión del receptor muscarínicos M5, la actividad acetilcolinesterasa, la expresión de los transcritos de la acetilcolina-transferasa y sus receptores (Kawashima y Fuji, 2000).

Se ha propuesto que la acetilcolina participa en la regulación de la función inmune, A este respecto, la observación de que la estimulación del receptor muscarínico por acetilcolina o agonistas promueve un aumento en los niveles de calcio intracelular y favorecen la expresión de c-fos y la síntesis de óxido nítrico a través de los receptores M5 y M7. Mientras, que la estimulación con acetilcolina de los receptores nicotínicos en linfocitos B y T causan una señalización rápida y transitoria de la subunidad alfa-7 del receptor nicotínico Estas evidencia sugieren que la acetilcolina sintetizada y secretada por los linfocitos B y T actúa como un factor paracrino y/o autocrino que regulan la función inmunológica (Kaufer y col.,1998; Kawashima y Fujii, 2004). Una posible confirmación a lo anterior, se sustenta en la detección de los marcadores colinérgicos en linfocitos B y T de sangre periférica (Skok y col., 2003). Lo anterior, también se apoya en modelos animales donde la actividad colinérgica linfocítica está alterada, mostrando anomalías inmunológicas (Kawashima y Fujii, 2004).

El análisis en la actividad AChE realizado en diferentes tipos de leucemia: LLA Pre-B y LMA no mostraron un comportamiento similar. A pesar de que ambas son neoplasias de células hematopoyéticas es notorio que los linajes que se expresan en estas patologías, la actividad AChE fue diferente demostrando que existe una representación distinta a la actividad AChE en células hematopoyéticas dependiendo de su estirpe.

La LLA Pre-B que representa en un 100% las células linfoides de tipo B y LMA que representan una ausencia casi completa en los linfocitos B pero sí la presencia de células mieloblástica, se observó un incremento evidente de S_2 con respecto a S_1 y un ligero aumento de S_2 en LMA comparado con respecto a S_1 (Figura 10).

6.6. Análisis del procesamiento co- y postraducciona l de la acetilcolinesterasa

Las diversas formas moleculares de la AChE 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

En el procesamiento co- y/o postraducciona l de la acetilcolinesterasa, se le incorporan en determinadas secuencias de la proteína, algunos oligosacáridos ricos en manosa preformados en el residuo del aminoácido asparagina (Asn). Esto ocurre en el lumen del retículo endoplásmico rugoso, y ocurre en los sitios

potenciales de glicosilación que siempre se encuentran en una secuencia consenso característica: Asn-X-Ser/Thr. Durante su transcurso de maduración en el Complejo de Golgi, se modifica el oligosacárido rico en manosa, y se le incorporan otros tipos de monosacáridos (Freire y col., 2002; Saldrup, 2009).

Las diversas formas moleculares de la AChE 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

Los cambios en la estructura de carbohidratos de la glicoproteínas puede no ser determinado fácilmente por un simple análisis químico. En una glicoproteína, la composición en los monosacáridos incorporados es heterógena, haciendo difícil reconocer las grandes diferencias entre ellas (Hakomori, 1975). Esta característica hace considerar a las proteínas como marcadores de superficie.

El análisis que realizamos del proceso de glicosilación de la AChE mediante la interacción de lectinas de alta especificidad hacia mono- y disacáridos, evidenció un notorio proceso anómalo en la incorporación de los oligosacáridos. Con respecto a la enzima AChE de las células B controles, se observó un 15% de unión a la aglutinina de *Concanavalia ensiformis* (Con-A), 29% a la lectina de *Lens culinaris*, 37% a la lectina de *Triticum vulgare* (WGA) y no se observó unión a la lectina de *Ricinus communis* (RCA) (Figura 12). Lo anterior sugiere que al menos algunas isoformas de AChE en células B control presentan *N*-glicanos sialilados

con una importante presencia de N-glicanos con presencia de fucosa α 1,6 en el primer residuo de GlcNAc. En el caso de la LLA el análisis sugiere que sigue habiendo la presencia de isoformas N-glicosiladas (Con-A) posiblemente con mayor presencia de fucosilación core (LCA) y sialilación (WGA). En el caso de la LMA, la baja presencia de unión a las lectinas ConA, LCA y RCA sugieren la ausencia de N-glicanos sialilados o hiposialilados, sin embargo, la importante presencia de unión a WGA, indica la presencia de glicanos sialilados, posiblemente de tipo O-glicanos frente a la falta de detección de estructuras de tipo N-glicano.

En cuanto, a la línea celular REH pre-B utilizada como parámetro para comparar el proceso de glicosilación de la acetilcolinesterasa con la misma enzima, pero en las células tipo B leucémicas, se observó un proceso co-y postraducional alterado, y no siendo comparable con el patrón de interacción con el estimado en la enzima de la LLA-PreB. La acetilcolinesterasa de la línea REH mostró mayores valores de interacción, que los determinados en linfocitos B control. Para la aglutinina Con A fue mayor un 20%, con la lectina aglutinina LCA fue en un 9% y por último, con la lectina WGA fue en un 7% (Figura 12). Lo anterior indica la presencia de un componente predominante de N-glicanos sialilados con fucosilación core.

En la Figura 12, se muestra la comparación en el perfil de interacción con lectinas entre el patrón control de unión. En el caso de la acetilcolinesterasa extraída de la LLA-preB éste se modificó. Observándose un aumento en la interacción con varias

lectinas: Con-A (2.5%), LCA (16%) y WGA (31%), no se determinó interacción con la lectina RCA en ninguno de los dos casos de leucemia.

Siguiendo la comparación del patrón control, ahora con la acetilcolinesterasa solubilizadas de las células de leucemia mieloide aguda que fue utilizada como control negativo por la ausencia de linfocitos B, se observó una incorporación anómala en los diferentes azúcares; siendo evidente una mínima interacción con las lectinas Con-A, LCA y RCA, menor al 5%, sólo hubo unión importante con la lectina WGA con un 48%.

En cuanto, a la línea celular REH pre-B utilizada como parámetro para comparar el proceso de glicosilación de la acetilcolinesterasa con la misma enzima, pero en las células tipo B leucémicas, se observó un proceso co-y postraducional alterado, y no siendo comparable con el patrón de interacción con el estimado en la enzima de la LLA-PreB. La acetilcolinesterasa de la línea REH mostró mayores valores de interacción, que los determinados en linfocitos B control. Para la aglutinina Con A fue mayor un 20%, con la lectina aglutinina LCA fue en un 9% y por último, con la lectina WGA fue en un 7% (Figura 12).

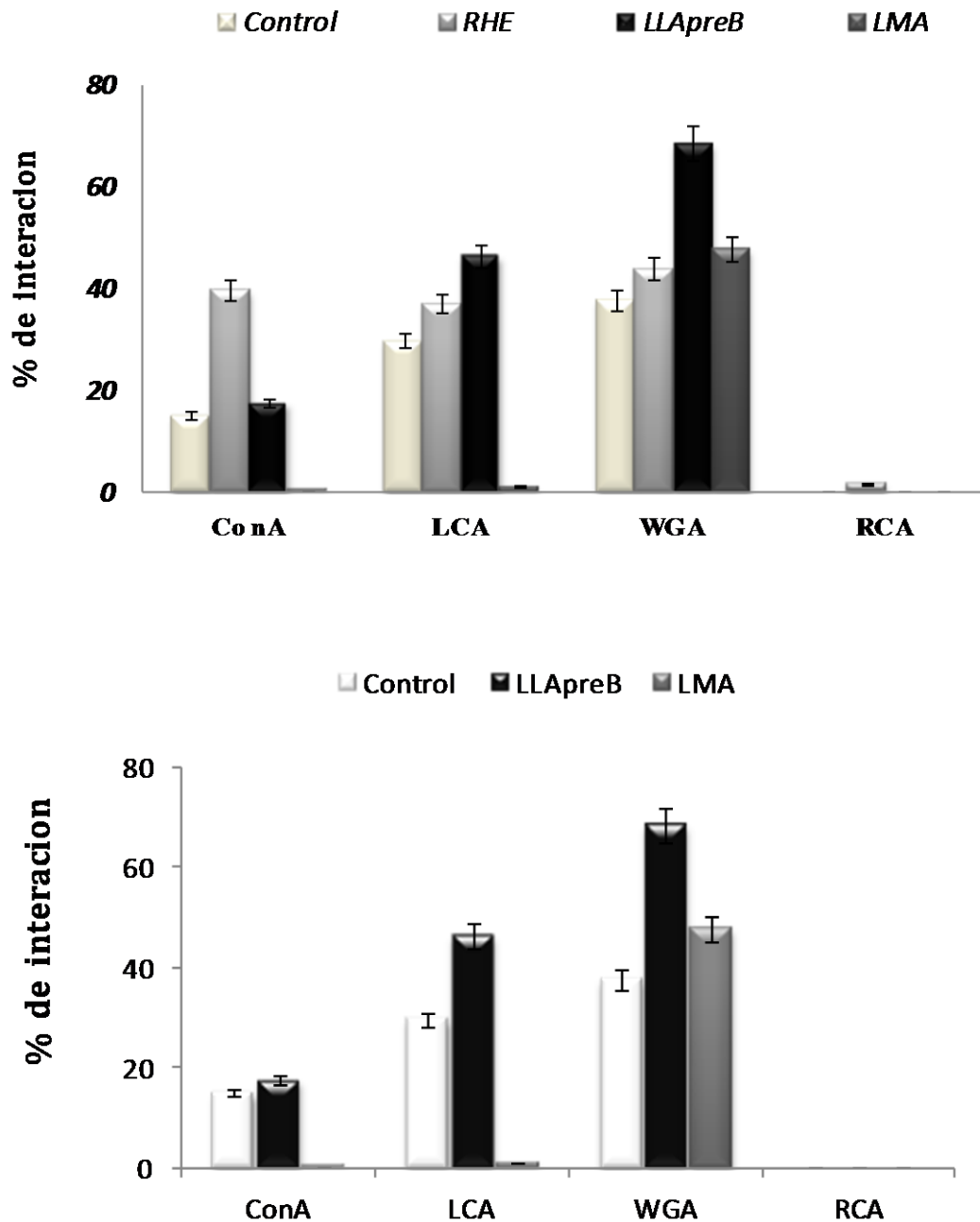


Figura 12. Porcentaje de actividad acetilcolinesterasa en lectinas. Se muestra el contenido en porcentaje de interaccion con lectinas de alta especificidad para la identificacion de azucares especificos en celulas hematopoyeticas de diversosorigenes. LB, LLA pre-B, REH y LMA.

En la acetilcolinesterasa de las células de leucemia linfocítica aguda pre-B, existió una tendencia a una incorporación similar de manosa (Con-A), a una mayor incorporación de glucosa o manosa asociada centros de fucosa (LCA), y N-acetilglucosamina o ácido sialico (WGA). Un patrón completamente distinto fue evidente en la leucemia mielode aguda.

La observación anterior, se podría relacionar con el hecho de que la especificidad de las glicosiltransferasas puede estar sobrelapada para glicoproteínas y glicolípidos (Hakomori, 1975). Algunas evidencias en células transformadas señalan una baja y/o supresión en actividad en las glicosiltransferasas. En células de hámster BHK transformadas por virus, se suprime la actividad de la CMP-ácido sialico: lactosilceramida sialiltransferasa (Den y col., 1971; Fishman y col., 1974).

Además, en la membrana plasmática de células tumorales se han determinado cambios en la composición de residuos de monosácaridos, esto presentan residuos de sialil-galactosyl o sialil-N-acetil-galactosamil (Gahmberg y Hakomori, 1973). Estos cambios podrían depender del rearrreglo genómico que requieren las células plasmáticas normales y leucémicas en la síntesis de RNA para sustentar su crecimiento y diferenciación (Mullinax y col., 1967). En linfocitos de sangre periférica en que se empleo uridina marcada incorporada en ARN se observó que aproximadamente un 80% fueron inestables y con una vida corta menor a una hora (Mullinax y col., 1967).

Aunque, también se han observado modificaciones en los patrones de los gangliósidos cuando los leucocitos son transformados por virus tumorales y carcinógenos químicos (Hildebrand y col., 1972; Hakomori, 1975).

Como se mencionó antes, el proceso de glicosilación es específico y depende de la presencia de los sitios potenciales de N-glicosilación, cuyo número varía entre los organismos. La subunidad catalítica de la AChE de Torpedo californica contiene cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (Schumacher y col., 1986, Lockridge y col., 1987), dos de los cuales son homólogos a los tres de la secuencia de la acetilcolinesterasa humana (Soreq y col., 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 y col., 1993). En la Tabla 3 se muestra la posición de los sitios potenciales de N-glicosilación de la acetilcolinesterasa en algunos mamíferos. Donde se observa, que los sitios en el humano son homólogos a los de ratón y rata.

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 y col., 1992). A este respecto, la masa molecular 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).

Además, 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 y col., 1995).

A partir de los resultados obtenidos, se evidencia que las lectinas son una herramienta de experimentación que permitieron conocer el proceso de glicosilación de la acetilcolinesterasa en linfocitos B y células pre B. Además se han empleado en estudio de los procesos moleculares de ensamblado y secreción de las ChEs (Vidal 1996, Cabezas-Herrera y cols., 1997, Moral-Naranjo y cols., 1997; Gómez y col., 2003).

6.7. Análisis de expresión del gen acetilcolinesterasa a través de la determinación de las variantes de transcritos

Como se señaló en el apartado de las características del gen AChE, éste se encuentra localizado en el cromosoma 7 en la región q22, que presenta amplias regiones ricas en dímeros guanina-citosina (G-C), que se ha sugerido representa una zona de alta mutagenicidad a través de traslocaciones, tranposones, y secuencias específicas de ARS (genes orientados inversamente), ARP (pequeño péptido en el C-terminal del transcrito AChE-R), secuencias Alu (respuestas a tranposones). Todas estas modificaciones estructurales genómicas se ha

considerado que favorecen la aparición de algunos tipos de leucemias (Perry y Soreq, 2001; Massoulié y col., 2005).

Se ha propuesto que la acetilcolinesterasa participa en el proceso de la hematopoyesis a través de la regulación de la proliferación de células madres multipotenciales específicamente en la megacariopoyesis y la trombopoyesis, debido a que el gen AChE se ha observado que se co-amplifica en la leucemia mieloide aguda. Además, se ha involucrado la apoptosis en las células eritroides y la diferenciación mieloide (Stephenson y col., 1995). Sondas de localización por hibridación in situ señalan la región 7q22 que están relacionadas con la leucemia mieloblástica aguda (LMA: M4 y M6) (Saphira y col., 2000; Perry y Soreq, 2001; Massoulié y col., 2005; Kratz y col., 2008).

En los niños se asocia el desarrollo de las leucemias con una predisposición en trastornos como la anemia de Fanconi, y posiblemente el síndrome de Down, que produce un cuadro clínico distinto conocido como el síndrome de la monosomía 7.

En el caso de la LLA pre-B, si bien se ha planteado la participación activa de la AChE en la descripción de las leucemias de origen mieloide, sugiriendo la participación de la región de q22 del cromosoma 7. Realmente, existe escasa información al respecto.

En la expresión del gen acetilcolinesterasa se ha establecido que ocurre un proceso de corte-empalme alternativo, generando tres tipos de transcritos que

codifican a la amplia variedad estructural de formas moleculares. En una primera instancia, se ajustaron las condiciones de amplificación. En el Figura 13 se muestran los productos de amplificación en linfocitos controles y médula ósea de LLA pre-B obtenidos en un gradiente en la concentración de magnesio. Siendo una primera evidencia de la expresión de transcritos AChE-H y AChE-R en ambos tipos celulares.

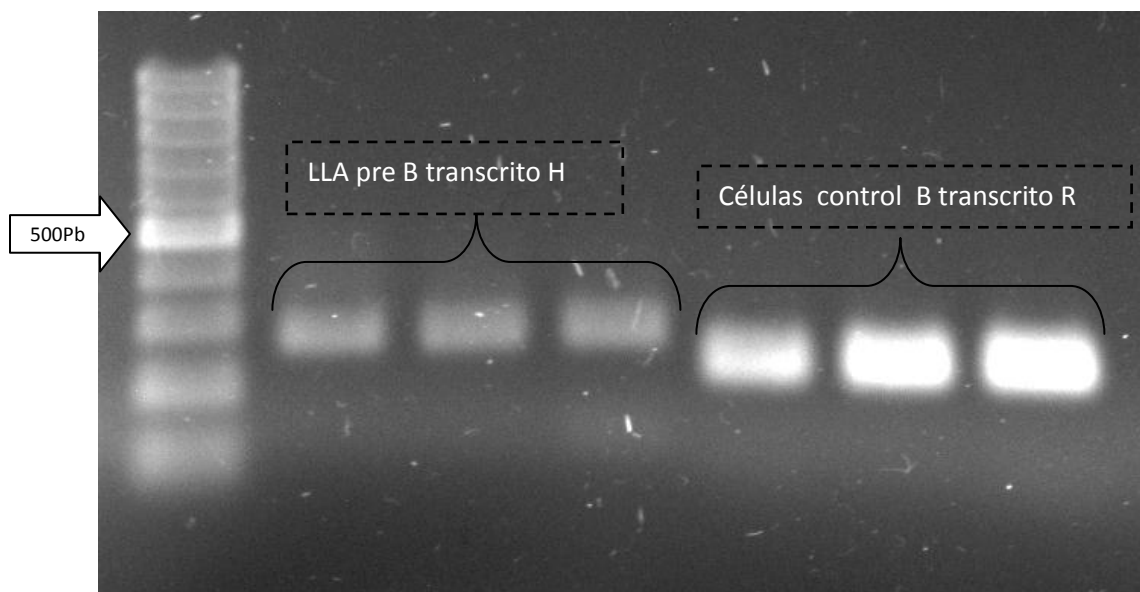


Figura 13. Expresión de las variantes en RNAm del gen acetilcolinesterasa en células de médula ósea de leucemia linfoblástica aguda (LLA pre-B) y en linfocitos B control. Los productos de amplificación en las células de la leucemia linfoblástica aguda pre-B mostraron una longitud de 273 pb (representando al transcrito AChE-H). Mientras, que en los linfocitos B control el amplicón mostró una longitud de 221 pb representando al transcrito AChE-R y 273 pb (AChE-H). Los amplicones se separaron en un gel de agarosa al 1.2 % Con diferentes concentraciones de Mg^{+2}

Con las condiciones óptimas de amplificación, se realizó el análisis de transcritos AChE, en el caso de linfocitos B controles y en estado patológico leucemia linfocítica aguda pre-B, se encontraron los amplicones de los supuestos transcritos AChE-R y AChE-H, sin haber detectado amplicones que corroboren la presencia de transcritos tipo AChE-T (Figura 14). Este mismo comportamiento se observó cuando se comparó la expresión de los transcritos entre linfocitos B controles y la línea celular REH pre B (Figura 15).

La expresión del gen AChE y el posterior proceso de corte y empalme alternativo en las células B y pre-B, señala que el mRNA tipo AChE-H, que contiene los exones E2-E3-E4-E5, codifica a los dímeros anfifílicos Tipo I que poseen el enlace glicofosfatidilinositol (GFI) (Soreq y col.1990; Deutsch y col 2002). Este tipo de dímeros se expresan en las células de la sangre de los mamíferos. La expresión proteínica AChE-H se corroboró en las células B control, las células de médula ósea de leucemia linfocítica aguda y células REH con la presencia de la proteína codificada de carácter hidrofóbico; a) extraída preferencialmente con el uso de amortiguador salino conteniendo detergente (Figura 10), b) fracción enzimática retenida por la matriz de octil-sefarosa, que requirió Triton X-100 para ser liberada del soporte hidrofóbico (Figura 11).

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. El extremo C-terminal de la subunidad R consta de 30 aminoácidos y carece de Cys, por lo que

las subunidades permanecen como monómeros (Sternfeld y col 2000). En los roedores, se expresa de manera significativa en los tejidos embrionarios, y puede sobre-expresarse en diversas condiciones de estrés (Grisaru y col., 2000, 2001, 2006). La expresión proteínica del mRNA AChE-R, se corroboró en las células B control y células REH y pre-B con la presencia de la proteína codificada de carácter hidrofílico; a) extraída preferencialmente con el uso de amortiguador salino con alta fuerza iónica (Figura 10), b) fracción enzimática no retenida por la matriz de octil-sefarosa, que se colectó libremente, solo con amortiguador salino y alta fuerza iónica (Figura 11).

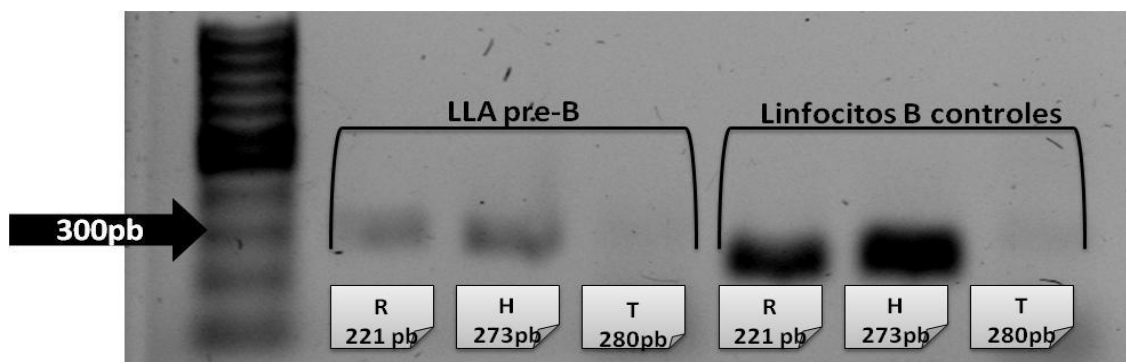


Figura 13. Expresión del gen acetilcolinesterasa en linfocitos B control y en las células de la médula ósea de la leucemia linfocítica aguda (LLA pre-B) (n = 3) y de linfocitos control (n = 100). Las células LLA-preB y los linfocitos B control mostraron la síntesis de los transcritos AChE-H (221 pb) y AChE-R (273 pb). Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1.2 %

A partir de los resultados obtenidos, se abre la posibilidad de estudiar los mecanismos moleculares asociados a la expresión del gen AChE en estados de

salud y enfermedad, en este caso de las leucemias. Para establecer, las condiciones en que se altera la expresión del gen –amplificación y/o supresión, condiciones de las que depende el proceso de corte-empalme alternativo, los niveles de control de expresión proteica, modificación en la actividad y/o expresión de las glicosiltransferasas y/o glicosidasas que intervienen en el proceso de N-glicosilación. La localización cromosómica 7q22 del gen acetilcolinesterasa se ha asociado al desarrollo de diversas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y las leucemias. Sin embargo, la causa (s) de estas alteraciones son todavía desconocidas.

A este respecto, se puede considerar que los reordenamientos cromosómicos podrían resultar en la pérdida o arriba de factores de transcripción, sitios de unión, y por lo tanto afectan a la expresión del gene ACHE y su capacidad de acumulación de estrés o la exposición a la lucha contra la AChE. Esto explica las aberraciones cromosómicas que involucran 7q22 reportados en pacientes con leucemia, el mayor riesgo de linfoma no-Hodgkin en los agricultores expuestos a compuestos con actividad anti-colinesterásica. Por lo tanto, puede ser relevante tanto para la acumulación inducida por los inhibidores de la proteína acetilcolinesterasa y la replicación anormal de este lugar en los linfocitos. Un posible análisis genómico y transcripcional apunta, a que el locus AChE representa una intersección implicada en muchas vías, que pueden conducir a la leucemia.

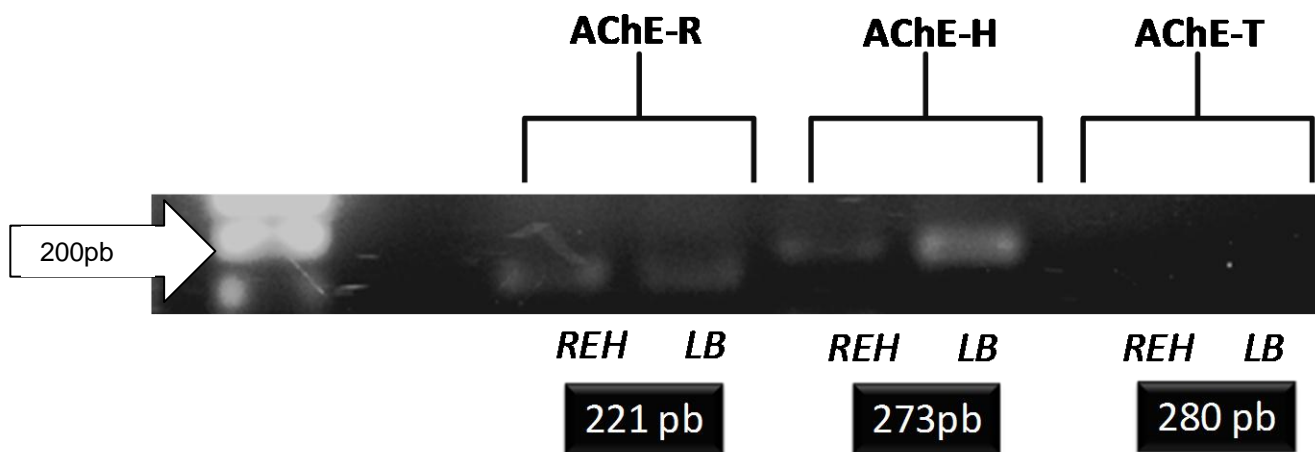


Figura 14. La expresión del gen acetilcolinesterasa en linfocitos B control y la línea celular REH homóloga a LLA pre-B (n=3) y de linfocitos control (n=100). Los productos de amplificación en ambos tipos celulares fueron AChE-R (221 pb) y AChE-H (273 pb), que fueron separados en un gel de agarosa al 1.2 %.

7. Conclusiones

El elevado nivel de pureza conseguido de los linfocitos B controles, células REH pre-B y células de médula ósea de las leucemias aguda linfoblástica aguda sustentan plenamente los análisis sobre la expresión génica y proteica de la acetilcolinesterasa.

La condición neoplásica parece modificar la síntesis de proteínas en las células de médula ósea, siendo evidente en la fracción de formas enzimáticas extraídas con fuerza iónica.

La actividad acetilcolinesterasa se mostró alterada entre los distintos de leucemia y células REH pre-B respecto a la estimada en las células B controles. La actividad AChE en la LLA y la LMA fue significativamente mayor, pero menor en la línea REH.

El análisis del procesamiento co- y post-traducciona l de la acetilcolinesterasa mediante la interacción con lectinas mostró patrones distintos de glicosilación entre las células B controles y las células leucémicas, evidenciándose un proceso de glicosilación anómalo.

En el estudio de la expresión del gen acetilcolinesterasa en los diferentes tipos de leucemias, se observó que LLA pre-B expresaron los transcritos AChE-R y AChE-

H, mismos que se detectaron en los linfocitos B controles. En ningun caso, se observaron transcritos tipo AChE-T.

La interacción de los extractos de la LLA pre-B, la línea REH y los linfocitos B controles con la matriz hidrofóbica, podría considerarse una evidencia clara de que la proteína codificada por los transcritos AChE-H podrían corresponder a dímeros anfifílicos anclados a la membrana por un enlace glicofosfatidilinositol, y los transcritos AChE-R, podrían corresponder a monómeros hidrofílicos.

Finalmente, se considera que la condición neoplásica modificó la síntesis de proteínas, la actividad acetilcolinesterasa y el proceso de la glicosilación.

8. Perspectivas

A la luz de los resultados anteriores se considera necesario:

- Analizar la expresión de los demás componentes colinérgicos en linfocitos B,
- Estudiar los factores que modulan la actividad colinérgica en linfocitos B.
- Evaluar la actividad colinérgica en modelos murinos con trastornos inmunitarios
- Revisar la modulación de la función linfocítica de Lb través de mAChRs y nAChRs.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas. Abul. K. Inmunología celular y molecular. 3ra edición. Edt. Mc.Graw-Hill internacional. Madrid. Espana. 1999. Pp.551.
2. Apleyard. Margaret E. Secreted acetylcholinesterase: Non- classical aspects of classical enzyme. elviser Sciensce publishers Ltd. TiNS, 15. 1992. pp.485-490.
3. Battisti V, Schetinger MR, Maders LD, Santos KF, Bagatini MD, Correa MC, Spanevello RM, do Carmo Araújo M, Morsch VM.(2009). Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. Clin Chim Acta. 402(1-2):114-8.
4. Bon, S., Huet, M., Lemonnier, M., Rieger, F. and Massoulié, J. (1976). Molecular forms of Electrophorus acetylcholinésterase: molecular weight and composition. Eur. J. Biochem. 68: 523-530.
5. 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.
6. Calame Kathryn L., Lin Kuo-I, and Tunyaplin Chainarong. (2003). Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. Annual Rev Immunol. 21: 205-230.
7. 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.
8. Crespo (2010). Epidemiologia de las leucemias agudas Rev. Hematol. 11: 37-39.
9. 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 Hematology. 30(10):1153-61.

10. Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, Chateau D, Gary F, Fardeau M, Massoulié J, Guicheney P. *Am J Hum Genet.* (1998). Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet.* 63(4):967-75.
11. 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.
12. Ellman GL, Cortney KD, Andres VJ, Featherstone RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
13. Evron T, Greenberg D, Mor TS, Soreq H. (2007). Adaptive changes in acetylcholinesterase gene expression as mediators of recovery from chemical and biological insults. *Toxicology.* Apr 20; 233(1-3):97-107.
14. Freshney R.I. (2000). *Culture of animal cells.* Edit. Wiley-Liss. 149-165, 309-313.
15. Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J. Neurochem.* 106(2):186-92.
16. García-Ayllón MS, Gómez JL, Vidal CJ. (1999). Amphiphilic properties of acetylcholinesterase monomers in mouse plasma. *Neurosci Lett.* 23; 265(3):211-4.
17. Gez S, Crossett B, Christopherson RI. (2007). Differentially expressed cytosolic proteins in human leukemia and lymphoma cell lines correlate with lineages and functions. *Biochim Biophys Acta* 1774: 1173-1183.

18. Gilboa-Geffen A, Hartmann G, Soreq H. (2012). Stressing hematopoiesis and immunity: an acetylcholinesterase window into nervous and immune system interactions. *Front Molecular Neuroscience*. Vol.5:30.
19. Gómez J.L y Vidal C.J. (2003). Los monómeros que forman los dímeros de la acetilcolinesterasa de eritrocito de ratón están glicosilados de manera distinta Vol. 2, No.1 Octubre. *Ciencia en la frontera*.
20. Gómez J.L., Moral-Naranjo M.T., Campoy, Vidal C.J (1999). Characterization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase forms in normal and dystrophic Lama2dy mouse heart. *J. Neurosci. Res*. 56: 295-306.
21. 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*. 62(1):134-45.
22. Gómez JL, Nieto-Cerón S, Campoy FJ, Muñoz-Delgado E, Vidal CJ. (2003). Purification and properties of hydrophilic dimers of acetylcholinesterase from mouse erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biology*. 35(7): 1109-18.
23. Greenfield. S. A, Zimmermann M, Bond CE. (2008). Non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase. The significance of C-terminal peptides. *FEBS J*. Febrero; 275(4):604-11.
24. Grisar D, Keidar R, Schreiber L, Lessing JB, Deutsch V. (2007). The effect of the readthrough acetylcholinesterase variant (AChE-R) on uterine muscle and leiomyomas. *Mol Hum Reprod*. 13(5): 351-4.
25. Grisar D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*. 264(3):672-86.
26. Grisar Dan, Deutsch Varda, Michael Shapira, Pick Marjorie, Sternfeld Meira, Melamed-Book Naomi, Kaufer Daniela, Galyam Nilly. Gait Michael J, David Owen., Lessing Joseph B, Eldor Amiram, and Soreq Hermona. (2002). ARP, A Peptide Derived from the Stress-Associated Acetylcholinesterase Variant, Has

- Hematopoietic Growth Promoting Activities. *Molecular Medicine* Vol. 7(2): 93–105.
27. Grisar, D., Pick, M., Perry, C., Sklan, E.H., Almog, R., Goldberg, I., Naparstek, E., Lessing, J.B., Soreq, H. and Deutsch, V. (2006). Hydrolytic and non-enzymatic functions of acetylcholinesterase comodulate hemopoietic stress responses. *J Immunol.* 1: 27-35.
 28. Hakomori S-I. (1975). Structures and organization of cell surface glycolipid dependency on cell growth and malignant transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 417: 55-89).
 29. Hernández Ramírez Porfirio. (1999). Leucemia linfocítica crónica aspectos clínicos y biológicos. *Revista Cubana Hematol inmunol hemoter. Cuba.* 15 (1):7-20.
 30. Higuera N., Vázquez S., Palencia R. (2011). Trastornos congénitos de la glicosilación de las proteínas: patogenia y aspectos clínicos. *Bol. Pediatra;* vol.51 (217):181 – 187.
 31. Jiménez-Díaz M, Martínez-Monge V. (2000) Validación de la determinación de la colinesterasa plasmática humana a 340 nM. *Rev Biomed.* 11:91-98.
 32. Kathryn L. Calman, Kuo-I Lin, and Chainarong Tunyaplin. Regulatory Mechanisms that determine the development and Function of plasma cells. *Annu. Rev.* 2003. V 21:205-230.
 33. Kawashima K, Fujii T. (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.* Vol. 26; 74(6):675-96.
 34. Kawashima K, Fujii T. (2003). The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci.* Vol. 28; 72(18-19):2101-9.
 35. Kratz CP, Emerling MB, Bonifas J, Wang W, Green ED, Le Beau MM, Shannon KM. (2003). Genomic structure of PIK3CG gene on chromosome band 7q22 and evaluation as a candidate myeloid tumor suppressor. *Blood.* Vol. 99:372-374.

36. Lapidot-Lifson Y, Prody CA, Ginzberg D, Meytes D, Zakut H, Soreq H. (2007) Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun; Vol. 86(12):4715-9.
37. Lapidot-lifson Yaron, Catherine A Prody, Dalia Ginzberg, Dina Meytes, Haim Zakut, and Hermona Soreq. (1989). Coamplification of Human with acetylcholinesterase and butylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. *PNAS*.1989 V 86:4715-4719.
38. Lev-Lehman, E., Ginzberg, D., Honreich, G., Erlich, G., Meshorer, A., Eckstein, F., Soreq, H. and Zakut, H. (1994). Antisense inhibition of acetylcholinesterase gene expression cause transient hematopoietic alterations in vivo. *Gene Ther*. 2:1-9.
39. Liu AH, Liu F, Li Z, Gu JX, Chen HL. (1998). Alterations in glycosyltransferases during myeloid and monocytoid differentiation of HL-60 cells. *Cell Biol Int*. 22 (7-8): 545-50.
40. 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.
41. López Dávila María Agripina, Vargas morales Juan Manuel, Correa González Cecilia, Salazar Pachicano Jose. (2007). Prevalencia de leucemia en pacientes del hospital central Dr. Ignacio Morones Prieto, de la ciudad de San Luis Potosi. *Revista bioquímica suplemento A, Asociacion Mexicana de Bioquimica Clinica* A:91.
42. Low MG.(1987).Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J*. 15;244(1):1-13.

43. Luk WK, Chen.VP, Choi. RC, Tsim. KW (2012). N. Linked glycosylation of dimeric acetylcholinesterase in erythrocytes is essential for enzyme maturation and membrane targeting. *The FEBS Journal*; 279(17):3229-39.
44. Martínez-Duncker Iván, Palomares-Aguilera Laura, Mollicone Rosella, Ibarra-González Isabel, Sánchez-Francia Domingo. (2008). Trastornos congénitos de la glicosilación: abordaje clínico y de laboratorio. *Acta Pediatría Mex*; 29(2): 78-88.
45. Massoulié J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*. vol. 11(3):130-43.
46. Massoulie Jean, Suzanne Bon, Noël Perrier, Cinzia Falasca. (2005). The C terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular Trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chemico-Biological Interactions*.15; 157-158:3-14.
47. Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. and Vallette, F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol*. 41:31-91.
48. Mayani Héctor, Flores-Figueroa Eugenia, Pelayo Rosana, Montesinos Juan José, Flores-Guzmán Patricia y Chávez-González Antonieta. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología* 2:95-107.
49. Mejia Arangure Juan Manuel. (2010). Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda infantil. *Revista de hematología*. Vol. 11, Supl. 1: 35-36.
50. Mejía-Aranguré Juan Manuel, Ortega-Álvarez Manuel Carlos, Fajardo-Gutiérrez Arturo. (2005). Epidemiología de las leucemias agudas en niños. Parte 2. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 43 (5): 401-409.
51. Morel N, Leroy J, Ayon A, Massoulié J, Bon S. (2001). Acetylcholinesterase H and T dimers are associated through the same contact. Mutations at this interface interfere with the C-terminal T peptide, inducing degradation rather than secretion. *J Biol Chem*. 276(40): 37379-373789.

52. Niels A. F. Suldrup. (2009). Defectos Congénitos de la Glicosilación de Proteínas. IACA Laboratorios. Departamento de Metabolopatías. San Martín 68 (8000). Bahía Blanca. Argentina.
53. Orkin SH and Zon LI. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. Vol.22; 132(4):631-44.
54. Padilla, S. (1995). Regulatory and research issues related to cholinésterase inhibiton. *Toxicology*. 102: 215-220.
55. Paleari L, Grozio A, Cesario A, Russo P. (2008).The cholinergic system and cancer. *Semin Cancer Biol*. 18(3): 211-7.
56. Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN, Siakantaris FN, Angelopoulou MK.(2002). B- chronic lymphocytic leukemia: Practical aspects. *Hematology Oncology*. Vol. 20:103-46.
57. Pantazis P, Lanfrancon L, Pellici PG, Dalla-Favera, Antoniades H. (1986). Human leukemia cells synthesize and secrete proteins related to platelet-derived growth factor. *Proc. Nati. Acad. Sci*. 83: 5526-5530.
58. Paraoanu LE, Steinert G, Klaczinski J, Becker-Röck M, Bytyqi A, Layer PG. (2006). On functions of cholinesterases during embryonic development. *J Mol Neurosci*. Vol. 30(1-2):201-4.
59. Paulick Margot G. and Bertozzi Carolyn R. (2008). The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Protein. *Biochemistry*. Vol. 47 (27): 6991–7000.
60. Pelayo Rosana (2011). Linfopoyesis temprana y leucemia aguda linfoblástica infantil. Mexico. Volumen 12, Suplemento 1.

61. Perry C, Soreq H. (2001). The leukemic effect of anticholinesterases. *Leuk Res. Nov*; Vol. 25(11): 1027-8.
62. Perry C, Soreq H. (2004). Organophosphate risk of leukemogenesis. *Leukemia Research*; Vol.28 (9):905-906.
63. Pick Marjori, Flores-Flores Cesar, Grisaruc Dan, Shochat Susana, Deutschb Varda, Soreq Hermona. (2004) .Blood-cell-specific acetylcholinesterase splice variations protein anchors. *Biochem. J.*Vol. 244: 1-13.
64. Puente Xose S. , Magda Pinyol, Víctor Quesada, Laura Conde, Gonzalo R. Ordóñez, Neus Villamor, Georgia Escaramis, Pedro Jares, Sílvia Beà, Marcos González-Díaz, Laia Bassaganyas, Tycho Baumann, Manel Juan, Mónica López-Guerra, Dolors Colomer, José M. C. Tubío, Cristina López, Alba Navarro, Cristian Tornador, Marta Aymerich, María Rozman, Jesús M. Hernández, Diana A. Puente, José M. P. Freije, Gloria Velasco. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*.475, 101–105.
65. Pérez Aguilar Benjamín. Expresión génica y proteómica de las colinesterasas en tejido hepático de humano y células HepG2. (México).Tesis de maestría en biología experimental. Inédita. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 2011.
66. Rivera Luna Roberto (2003).Los problemas de la hemato-oncología pediátrica en México *Bol Med Hosp Infant Mex*; 60(1): 125-131.
67. Rodríguez Laura, González-Llano Oscar, Mancias Consuelo, Pompa Teresa, González Guadalupe, Sandoval Adriana, Palafox María Teresa, Támez Liliana, Tovar Cristina, Gómez-Almaguer David. (2010). Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México *Revista de Hematología*. 11(2):78-81.
68. 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.

69. Sáez-Valero, J., Tornel, P.L., Muñoz-Delgado, E. and Vidal, C.J. (1993). Amphiphilic and hydrophilic forms of acetyl- and butyrylcholinésterase in human brain. *J. Neurosci. Res.* 35: 678-689.
70. Sánchez Segura MC., Vianed Marsán Suárez, Socarrás ferrer Bretha B. y Martínez Machado Mercedes. (2004) Lymphoid leukemia. Inmiune and molecular aspects . *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* Vol. 20 (1).
71. Sánchez-Chávez G. y Salceda R. (2008) enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa *Revista de Educación Bioquímica* Vol. 27, Núm. 2: 44-51.
72. Saphira Michael MSc, Alastair Grant BSc, Mira Korner PhD and Hermona Soreq PhD. (2000). Genomic and Transcriptional Characterization of the human ACHE locus: Complex involvement with acquired and inherited diseases. *IMAJ.* V2:470-473.
73. Saunders FK, Sharrard RM, Winfield DA, Lawry J, Goepel JR, Hancock BW, Goyns MH, (1993) 2D-gel analysis of proteins in chronic lymphocytic leukemia cells and normal B-lymphocytes.. *Leukemia Res.*Vol. 17:223-230.
74. 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.
75. Shapira M, Grant A, Korner M, Soreq H.(2000) Genomic and transcriptional characterization of the human ACHE locus: complex involvement with acquired and inherited diseases.*Isr Med Assoc J.* Vol.2(6):470-3.
76. Skok MV, Kalashnik EN, Koval LN, Tsetlin VI, Utkin YN, Changeux JP, Grailhe R. (2003). Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines. *Mol Pharmacol.* 64(4):885-9.

77. 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.
78. Soreq, H. and Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* 4: 294–302.
79. Srivatsan Malathi. (2006). An analysis of acetylcholinesterase sequence for predicting mechanisms of its non-catalytic actions, *Bioinformatics.* 1(8):281-284.
80. Srivastava BI, Koga M, Srivastava P (1984). Phorbol ester-induced differentiation of a non-T/non-B human leukemic cell line (REH) to macrophage-like cells. *cancer Res.*44(7):3017-21.
81. Stephenson J, Czepulkowski B, Hirst W, Mufti GJ. (1995). Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). *Leuk Res. Mar; Vol.20* (3):235-4.
82. Sternfeld, M., Shoham, S., Klein, O., Flores-Flores, C., Evron, T., Idelson, G.H., Kitsberg, D., Patrick, J.W. and Soreq, H. (2000). Excess "read-through" acetylcholinesterase attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15: 8647-52.
83. Szelényi JG, Bartha E, Hollán SR. (1982). Acetylcholinesterase activity of lymphocyte: an enzyme characteristic of T-cells. *Br. J. Haematol.* 50: 241-245.
84. Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F. (2002). Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 132:147-155.
85. Topilko A, Caillou B. (1985). Acetylcholinesterase in human thymus cells. *Blood.* Vol. 66(4):891-5.

86. Tsiftoglou Asterios S, Pappas Ioannis S, Vizirianakis Ioannis S. (2003). Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 100, Issue 3: 257-290.
87. Vidal CJ (2005). Expression of cholinesterases in brain and non brain tumor. *Chem Biol Interact* 157-158: 227-232.
88. Vidal CJ. (1996). Glycosylation of cholinesterases and its alteration in some pathological processes. *Recent. Res. Dev. Neurochem*. 1: 37-5.
89. Walker. John M. *Lectin Methods and protocols*. Edit. Human Press. 1997. University Liverpool. UK. Pp.615.
90. William L. Carroll, Deepa Bhojwani, Dong-Joon Min, Elizabeth Raetz, Mary Relling, Stella Davies, James R. Downing, Cheryl L. Willman and John C. Reed (2003). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *American Society of hematology* 102-131.
91. Woessner S, Florensa L. (2001). Introducción al estudio de las leucemias agudas. Clasificación. Descripción de las distintas variedades. Formas especiales. En: Castillo R, Woessner S. *Hematología Clínica*. 4ª edición. Barcelona (España): Ediciones Harcourt: 345-346.
92. Yamada K.M, Pouyssegur J. (1978). Cell surface glycoproteins and malignant transformation. *Biochimie*. 60(11-12):1221-33.
93. Zeng, W.R., Watson, P., Lin, J., Jothy, S., Lidereau, R., Park, M. and 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*. 8: 2015-2021.