



Posgrado en
Biología Experimental



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“EFECTO ANTIOXIDANTE, TRANSCRIPCIONAL Y POSTRADUCCIONAL DE
NICOTINAMIDA SOBRE COLINESTERASAS EN UN MODELO DE SÍNDROME
METABÓLICO INDUCIDO CON FRUCTOSA EN RATA”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta:

M. Biol. Exp. Juan David Villeda González

**Co-Directora: Dra. Margarita Díaz Flores
Co-Director: Dr. José Luis Gómez Olivares
Asesor: Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno**

Iztapalapa, Ciudad de México, marzo 2021

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe _____ JUAN DAVID VILLEDA GONZÁLEZ _____, alumno (a) del posgrado _____ DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL _____, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "_____ EFECTO ANTIOXIDANTE, TRANSCRIPCIONAL Y POSTRADUCCIONAL DE NICOTINAMIDA SOBRE COLINESTERASAS EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO CON FRUCTOSA EN RATA _____",

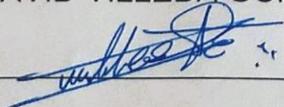
Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante _____ La comisión del posgrado en Biología Experimental, miembros del Jurado y Tutores _____ para lo obtención del grado de _____ Doctor en Biología Experimental _____ es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 15 de Marzo del 2021.

Atentamente

JUAN DAVID VILLEDA GONZÁLEZ.



Nombre y firma del alumno

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.

CÓMITE TUTORAL

Co-Directora Externa

Dra. Margarita Díaz Flores

Investigador Asociado D

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades Médicas “Dr. Bernardo Sepúlveda”

Centro Médico Nacional siglo XXI

Correo electrónico: mardiaz2001@yahoo.com

Co-Director Interno

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular C

Laboratorio de Biomembranas

Depto. de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Correo electrónico: gool@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno

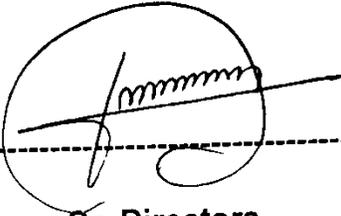
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Depto. Bioquímica y Biología Molecular-A

Universidad de Murcia, España

Correo electrónico: cevidal@um.es

FIRMAS DEL COMITÉ TUTORAL



A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke, is written over a solid horizontal line. A dashed horizontal line is positioned below the solid line. The signature is partially enclosed by a circle.

Co-Directora

Dra. Margarita Díaz Flores



A handwritten signature in black ink, featuring a long horizontal stroke and a large loop on the right side, is written over a solid horizontal line. A dashed horizontal line is positioned below the solid line. The signature is partially enclosed by a circle.

Co-Director

Dr. José Luis Gómez Olivares



A handwritten signature in black ink, featuring a large loop on the left and a long horizontal stroke, is written over a solid horizontal line. A dashed horizontal line is positioned below the solid line.

Asesor

Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca N° 570363, CVU 634838.

Y el apoyo para la realización de la estancia de investigación doctoral a través de la beca mixta con base en la convocatoria BECAS DE MOVILIDAD 2018 EN EL EXTRANJERO (291250).

Agradezco al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por darme la oportunidad de llevar a cabo mi trabajo experimental en sus instalaciones, específicamente en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, CMN S XXI, bajo el proyecto titulado “Efecto antioxidante, transcripcional y postraduccional de nicotinamida sobre esterasas hepáticas en un modelo de síndrome metabólico” con número de registro institucional R-2017-3601-145.

Además agradezco el apoyo complementario otorgado para la realización del proyecto y de la estancia de investigación doctoral a través del Programa de Cooperación Internacional (PCI, convocatoria 2017), del Fondo de Investigación en Salud del IMSS.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. CDMX. México.

Dentro de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. CDMX. México.

Por ultimo en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular-A- de la Facultad de Biología y Veterinaria de la Universidad de Murcia, España.

Bajo la dirección y asesoría de los Doctores: Dra. Margarita Díaz Flores, Dr. José Luis Gómez Olivares, Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno, Dra. Encarnación Muñoz y Dr. Francisco Javier Campoy.

A todos ellos mi más profundo agradecimiento por sus enseñanzas, dedicación y constante apoyo para la realización y desarrollo de este trabajo.

Los miembros del jurado designados por la comisión del posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis doctoral titulada “EFECTO ANTIOXIDANTE, TRANSCRIPCIONAL Y POSTRADUCCIONAL DE NICOTINAMIDA SOBRE COLINESTERASAS EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO CON FRUCTOSA EN RATA”



Dr. Luis Arturo Baiza Gutman



Dra. Leticia Manuel Apolinar



Dr. Adán Valladares Salgado



Dr. Julio César Almanza Pérez

Agradecimientos

Sería un capítulo completo citar a cada una de las personas que a lo largo de mi formación académica y personal han contribuido con consejos, ideas u observaciones a mi trabajo y a mi pensamiento, mejorando cada parte de mí, tratare de ser breve...

En primer lugar agradezco a la vida por darme a mis padres, seres responsables y amorosos que me han guiado en cada aspecto de mi vida, siendo un reflejo de su amor, comprensión y trabajo; ya que a pesar de todas las circunstancias; nos dieron lo mejor a mis hermanos y a mí para llegar a ser personas de provecho y grandes profesionistas. A mi madre Laura González; y mi padre Ernesto Villeda, infinitas gracias.

A mis hermanos Juan Fernando y Guadalupe Villeda por motivarme a ser mejor persona cada día, por siempre creer en mí y apoyarme en todo momento. Por ser un ejemplo para mí de superación y esfuerzo. Gracias.

A mis abuelos Margarita y Ernesto, cuyas enseñanzas desde niño me formaron para ser una persona trabajadora y entusiasta. Gracias.

A mi compañera de vida Karen Hernandez por ayudarme a ser mejor persona, por motivarme a seguir adelante pese a toda adversidad, por ser mi cómplice y compañera de aventuras, por darme a mi hijo; el mejor regalo de la vida. Gracias por ayudarme a lograr mis objetivos y metas, espero poder ayudarte a cumplir las tuyas. Gracias amor, y que la vida nos permita seguir caminando juntos.

A mis compañeros de formación, colegas, amigas y amigos, que sin su ayuda y compañía no hubiese sido posible culminar este trabajo, Mari Carmen, Armando, Saraí, Fernando, Gabriela, Miguel Alexander, Luis Valderrábano, Omar, Martita y Rubén, a todos ellos infinitas gracias por las charlas, los ratos alegres y aventuras que hicieron ameno este camino.

Así también a los compañeros, amigos y amigas que durante mi estancia me hicieron sentir como en casa: Emilio, Rebeca, Luis, María Jesús, Silvia, Toñi, Juana, Dr. Neptuno, gracias.

A mis maestros y directores de tesis que sin duda no solo me enseñaron aspectos académicos si no que han dejado su huella en mi mente y mi corazón.

Doctora Margarita Díaz Flores, gracias por sus enseñanzas, su paciencia y atenciones hacia mi persona, por todo su conocimiento compartido y por ser una verdadera maestra para mí. Gracias por el apoyo para cumplir una de mis metas y por inculcar en mí el seguir aprendiendo y nunca dejar de aprender.

Doctor José Luis Gómez Olivares, mil gracias por las enseñanzas, por el apoyo, por toda la atención recibida en todo momento. Por motivarme siempre a cumplir mis metas y ayudarme a hacerlo. Gracias por las charlas que me motivaron a seguir adelante. Finalmente agradecer el que me haya presentado al Dr. Cecilio y apoyado para la realización de la estancia doctoral.

A mi asesor; Dr. Cecilio Vidal, gracias por la oportunidad y confianza que depositó en mí, que aunque no me conocía desde la primera vez que le escribí recibí un excelente trato y apoyo para cumplir uno de mis máximos sueños, gracias por

recibirme en su laboratorio y compartir conmigo sus conocimientos, sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible. Gracias también por acercarme a la Doctora Encarnación Muñoz y al Doctor Javier Campoy, grandes maestros a quien aprovecho para agradecer su apoyo y brindarme sus conocimientos, fue muy grato compartir momentos y aprender de ustedes, para ellos mi más sincero agradecimiento.

Agradezco también a la Doctora Leticia Manuel por su colaboración durante el desarrollo del proyecto, por sus consejos y enseñanzas, por abrirme la puerta de su laboratorio.

De igual forma a la Química Leticia Damasio por su ayuda y colaboración, sus enseñanzas y consejos.

Al Doctor Luis Arturo Baiza por su atención y ayuda en el desarrollo de los escritos, por sus acertadas correcciones y contribuciones al trabajo.

Al Doctor Noé Salinas por su apoyo y amistad desde la maestría.

A los Doctores Gerardo Blancas, Adán Valladares, Fernando Suarez, Jaime Gómez y Jesús Peralta por sus consejos y comentarios siempre positivos.

Al Doctor Miguel Cruz por abrirme las puertas de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.

Espero no omitir a alguien y si así fuera pido disculpas, a todas las personas que he conocido durante este camino. GRACIAS!!!

Resumen

Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BChE) se han asociado con factores de riesgo para el síndrome metabólico (SM).

Objetivo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la nicotinamida (NAM) sobre las actividades, la expresión y el contenido de proteínas de las colinesterasas en un modelo de SM *in vivo* e *in vitro*.

Métodos principales: Se indujo SM en ratas macho mediante la administración de fructosa al 40% en el agua de bebida durante 16 semanas. Posteriormente, a partir de la quinta semana en adelante, la solución de carbohidrato fue intercalada por solución de NAM, en diferentes concentraciones durante 5 h cada mañana durante las siguientes 12 semanas. En la semana 15, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa y se midió la presión arterial. Una vez concluido el período de tratamiento, se obtuvieron muestras para evaluar el perfil bioquímico; estrés oxidativo; marcadores proinflamatorios; y se evaluó la actividad, concentración y expresión de colinesterasas y se realizó un análisis de acoplamiento molecular.

Hallazgos principales: El grupo de SM mostró alteraciones antropométricas, hemodinámicas y bioquímica; así como aumento de la actividad de las colinesterasas, marcadores de inflamación y estrés oxidativo. En el hígado, los niveles de actividad de colinesterasas y ARN mensajero, ácidos grasos libres, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS) aumentaron, mientras que disminuyeron los niveles de glutatión reducido (GSH). NAM disminuyó parcial o totalmente los factores de riesgo de SM, marcadores de

estrés e inflamación, y la actividad (suero e hígado) y expresión (hígado) de colinesterasas. El análisis de acoplamiento molecular mostró que NAM tiene una mayor afinidad por las colinesterasas que la acetilcolina (ACh), lo que sugiere que la NAM es un inhibidor de las colinesterasas.

Conclusiones: La suplementación con 40% de fructosa induce SM, además de aumentar la actividad y expresión de colinesterasas, el estrés oxidativo y la inflamación. NAM atenuó estas alteraciones inducidas por SM y cambios en colinesterasas.

Abstract

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) have been associated with risk factors for metabolic syndrome (SM).

Aim: Our objective was to evaluate the effect of nicotinamide (NAM) on the activities, expression and protein content of cholinesterases in a SM model.

Main methods: SM was induced in male rats administrating 40% fructose to the drinking water for 16 weeks. Additionally, from 5th week onward, the carbohydrate solution was replaced by NAM, at several concentrations for 5 h each morning for the next 12 weeks. In the 15th week, the glucose tolerance test was conducted, and blood pressure was measured. After the treatment period had concluded, the biochemical profile; oxidant stress; proinflammatory markers; and the activity, quantity and expression of cholinesterases were evaluated, and molecular docking analysis was performed.

Key findings: The SM group showed anthropometric, hemodynamic and biochemical alterations and increased cholinesterase activity, inflammation and stress markers. In the liver, cholinesterase activity and mRNA, free fatty acid, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels were increased, while reduced glutathione (GSH) levels were decreased. NAM partially or totally decreased risk factors for SM, markers of stress and inflammation, and the activity (serum and liver) and expression (liver) of cholinesterases. Molecular docking analysis showed that NAM has a greater affinity

for cholinesterases than acetylcholine (ACh), suggesting that NAM as an inhibitor of cholinesterases.

Significance: Supplementation with 40% fructose induced SM, which increased the activity and expression of cholinesterases, oxidative stress and the inflammation. NAM attenuated these MetS-induced alterations and changes in cholinesterases.

Índice general

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición, prevalencia y factores de riesgo para Síndrome Metabólico.....	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Definición, especificidad y mecanismo catalítico de colinesterasas.....	9
2.2 La genética de las colinesterasas.....	10
2.3. El ensamblado y modificaciones postraduccionales de las colinesterasas....	12
2.4. El papel de las colinesterasas en patologías y el metabolismo	14
2.5. La nicotinamida y sus propiedades generales.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
7. MATERIAL y MÉTODOS.....	26
7.1. Materiales	26
7.2. Modelo in vivo en ratas.....	26
7.3. Inducción del síndrome metabólico y tratamientos	27
7.4. Determinación de presión arterial	29
7.5. Curva de tolerancia a la glucosa.....	29
7.6. Obtención de muestras biológicas.....	29
7.7. Marcadores metabólicos.....	30
7.8. Cuantificación de insulina, ácidos grasos libres y citocinas pro inflamatorias (TNF-α e IL-6).....	30
7.9. Marcadores de estrés oxidante	30
7.10. Actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.....	31
7.11. Valoración del contenido total de proteínas.....	33
7.12. Detección de proteínas por Western Blot.....	33
7.13. Expresión de los genes AChE y BChE en hígado de rata.....	34
7.14. Estudios en las líneas celulares HepG2 y AML12	35
7.15. Prueba de citotoxicidad.....	36
7.16. Ensayos de Osmolaridad	36
7.17. Preparación de muestras con ambas líneas celulares	36

7.18.	Análisis de Docking Molecular	37
7.19.	Análisis estadístico	38
8.	RESULTADOS	39
8.1.	Fructosa induce síndrome metabólico alterando los parámetros bioquímicos y antropométricos considerados por la ATPIII.	39
8.2.	La nicotinamida regula la absorción de glucosa circulante determinado por: la prueba de tolerancia a la glucosa, los niveles de insulina y el índice HOMA-IR	42
8.3.	La NAM restablece GSH y PON1 al disminuir AGL, TBARS y TNF-α	43
8.4.	NAM reduce las actividades y expresión de transcritos de BChE y AChE en hígado, así como sus actividades en suero	48
8.5.	NAM regula el crecimiento en células HepG2 tratadas con fructosa	55
8.6.	Efecto de NAM sobre las actividades AChE y BChE en células HepG2 tratadas con alta fructosa	56
8.7.	Efecto de NAM sobre las actividades AChE y BChE en medio condicionado por células HepG2 tratadas con alta fructosa	58
8.8.	Efecto de NAM sobre la actividad AChE y BChE en la línea celular AML12 cultivadas con alta fructosa	60
8.9.	Efecto de NAM sobre la expresión de los transcritos de AChE y el gen BChE en células HepG2 tratadas con alta fructosa	61
8.10.	Efecto de NAM sobre la expresión de transcritos BChE en células HepG2 tratadas con fructosa	63
8.11.	Efecto de NAM sobre la expresión de AChE y BChE en las células AML12 tratada con alta fructosa	64
8.12.	Efecto de NAM sobre la cantidad de AChE y BChE en células HepG2 tratadas con alta fructosa	67
8.13.	Efecto de NAM sobre la cantidad de AChE y BChE en células AML12 tratadas con alta fructosa	69
8.14.	NAM interactúa con los sitios catalíticos BChE y AChE	70
9.	DISCUSIÓN	73
10.	CONCLUSIONES	82
11.	PERSPECTIVAS	85
12.	BIBLIOGRAFÍA	86
13.	Anexos	108

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición, prevalencia y factores de riesgo para Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico (SM) fue descrito por Gerald Reaven como síndrome “X” (1988), es una alteración antropométrica y hemodinámica provocada por un aumento en la circunferencia abdominal, debido al exceso de tejido adiposo, el cual propicia desregulación de parámetros bioquímicos y clínicos incluidos, concentraciones altas de triacilgliceroles y glucosa en sangre, bajas concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y aumento de la presión sanguínea. Los cinco factores de riesgo señalados predisponen a un individuo a desarrollar enfermedades crónico degenerativas como: enfermedad de hígado graso no alcohólico, diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular, y algunos tipos de cáncer (Ford et al., 2008).

El panel para el tratamiento de las dislipidemias en los adultos (ATP III, del inglés Guidelines for treatment of dyslipidemia in adults III) menciona, que la identificación en una persona de tres de los cinco factores de riesgo; podría considerarse como un paciente con SM (Pasternak, 2003). La tabla 1 muestra los valores estándar utilizados por la ATP III para el diagnóstico clínico del SM. Sin embargo, no es la única clasificación que se utiliza de diagnóstico, existen diferentes criterios los cuales han sido diseñados por los diferentes instituciones de salud a nivel mundial, para ello se han considerado a las diferentes etnias, alimentación y estilos de vida en los diferentes países y continentes. Por ejemplo las estipuladas por la asociación americana del corazón (AHA), la asociación americana de diabetes (FDA), la

sociedad europea de cardiología (ESC) o la organización mundial de la salud (WHO), por mencionar algunas. En México, se utiliza hasta el momento los estándares de la ATP III; debido a que es la más acertada para la población mexicana. Otro factor de riesgo adicional es la resistencia a la insulina, la cual junto con la obesidad son reconocidos como factores causales del SM (Reaven, 2011).

Tabla 1. Factores de riesgo utilizados por la ATP III considerados para población mexicana para el diagnóstico de SM.

Identificación Clínica del Síndrome Metabólico	
Considerando 3 de los siguientes factores	
Factor de Riesgo	Valores considerados
Obesidad abdominal	Circunferencia abdominal
Hombre	>102 cm
Mujer	>88 cm
Triacilgliceroles	>150 mg/dL
Colesterol HDL	
Hombre	<40 mg/dL
Mujer	<50 mg/dL
Presión Sanguínea	>130 / >85 mmHg
Glucosa en ayuno	>110 mg/dL

Nuestro país afronta el SM como un problema de salud, debido al alto índice de personas que lo padecen y sus enfermedades subsecuentes. En 2014 se informó que 36.8% de la población mexicana padece SM y el 71.3% sobrepeso u obesidad,

siendo estos últimos candidatos potenciales para desarrollar SM (Orozco et al., 2014). En México, la falta de estrategias de control provocó un aumento en las cifras, la última encuesta proporcionada por ENSANUT en el año 2018 refirió aumento en la población con sobrepeso y obesidad de 76.8% y 73%, respectivamente. Cabe destacar que el SM es un estado regresivo y crucial para prevenir el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, las cuales no son reversibles. Debido a la carencia de una educación en materia de salud es imposible detectar este tipo de enfermedades a tiempo. Por ello, se buscan marcadores tempranos del SM para su diagnóstico y posterior control.

Las causas por las cuales la población mexicana desarrolla obesidad, y posteriormente SM son diversas y pueden estudiarse con varios enfoques; social, económico, clínico, familiar y nutricional. Existen cuatro factores como causa principal: factor genético, sedentarismo, baja actividad física, y finalmente una inadecuada selección de los alimentos. La dieta actual consta de alimentos procesados industrializados, con grandes cantidades de grasas y carbohidratos; principalmente fructosa, este carbohidrato ha sido relacionado con la epidemia de obesidad que prevalece en el mundo (Klurfeld et al., 2013, Rosset et al., 2016, Loza-Medrano et al., 2019).

La utilización de la fructosa en la industria alimentaria inició en los años setenta como sustituto de la sacarosa o azúcar común de caña, debido a mayor poder edulcorante y menor costo. Estudios recientes han demostrado a partir de esos años una asociación entre el consumo de la fructosa incorporada en los alimentos con el aumento de la obesidad (Bray et al., 2013).

El jarabe de maíz de alta fructosa es el principal edulcorante en los alimentos procesados y las bebidas gasificadas. Aporta 55% de fructosa que se metaboliza en un 80% en el hígado y contribuye a la hiperuricemia. La producción de ácido úrico por fructosa puede contribuir a la resistencia a la insulina hepática al provocar estrés oxidante y esteatosis (Lanaspa et al., 2012). También, el ácido úrico bloquea la eficiencia de la insulina para estimular la vasodilatación de los vasos sanguíneos, lo cual es importante en la captación de glucosa por el músculo esquelético. Alternativamente, se induce inflamación local en tejido adiposo con una reducción en la producción de adiponectina (Baldwin et al., 2011). Adicionalmente, cabe mencionar que el ácido úrico provoca disfunción de la célula β -pancreática (Roncal-Jiménez et al., 2011).

Actualmente, los análisis proteómicos con énfasis en el estudio de enzimas ha contribuido a comprender más a fondo las enfermedades metabólicas y su impacto a nivel celular y molecular, así como los daños producidos durante el SM en diferentes vías de señalización fundamentales para procesos de síntesis de proteínas, modificaciones postraduccionales, estado redox celular y degradación de moléculas (Fon & Rozman, 2011), contribuyendo de forma directa al desarrollo y/o progresión de la enfermedad.

Las esterasas como butirilcolinesterasa E.C.3.1.1.8 y paraoxonasa I E.C. 3.1.1.2 comprenden dos grupos de enzimas sintetizadas principalmente en hígado, ambas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, lipoproteínas y ácidos grasos (Mata et al., 2013; Boshtam et al., 2013. Lima et al., 2013), y en menor medida acetilcolinesterasa E.C.3.1.1.7, que puede sintetizarse en otros tejidos, como el

sistema nervioso central y músculo. También, se ha confirmado que estas esterasas participan en procesos inflamatorios, en la respuesta antioxidante, en estado aterogénico y del metabolismo (Das, 2007; Rosas-Ballina et al., 2009; Lampón et al., 2012).

No existe un tratamiento médico plenamente establecido para combatir el SM. Hasta la fecha se ha propuesto que el cambio de alimentación y la actividad física son los únicos tratamientos que pueden prevenir y revertir el daño producido por un desorden metabólico. En este contexto, durante el estudio del SM como patología multifactorial se han empleado diversas moléculas para controlar la inflamación sistémica de bajo grado, el metabolismo de glucosa y de lípidos, así como el estrés oxidante con el objetivo de evitar daño celular. (Bulut et al., 2013; Colak et al., 2014; Le et al., 2014; Merino-Aguilar et al., 2014).

El uso de la vitamina hidrosoluble específicamente la vitamina B3 conocida como nicotinamida (NAM), y precursor de la coenzima NAD⁺ pudiera ser un buen adyuvante para disminuir los factores de riesgo del SM, debido a sus propiedades antiinflamatoria, inmunoreguladora y antilipémica (Torres-Ramírez et al., 2013, Loza-Medrano et al., 2020).

2. ANTECEDENTES

Acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor sintetizado en neuronas presinápticas por acción de la enzima colina O-aciltransferasa (E.C. 2.3.1.6.) que utiliza colina y acetil-CoA como sustratos; este neurotransmisor es almacenado en vesículas hasta su liberación en la hendidura sináptica donde neuronas postsinápticas captarán el neurotransmisor a través de receptores nicotínicos (ionotrópicos), muscarínicos (metabotrópicos; M1, M2, M3, M4 y M5) y dependientes de potasio a nivel neuronal y muscular. Al unirse el ligando a su receptor se desencadena una señalización río abajo mediada por proteínas G principalmente, y señalizaciones dependientes de despolarización e hiperpolarización de la membrana. Una vez que ACh ejerce su acción es hidrolizada por acción de las dos colinesterasas: acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE), en la hendidura sináptica generando los productos acetato y colina respectivamente. Es por esto, que la actividad de ambas colinesterasas es considerada como regulador en la sinapsis colinérgica neuronal y neuromuscular.

Las vías de señalización que se ven comprometidas por la unión de ACh a sus receptores nicotínicos y muscarínicos, son vías universales que actúan en diferentes mecanismos y a distintos niveles; entre ellas destacan: la vía de las MAPs-cinasas, la vía de JAK-STAT, PI3K-AKT y señalización dependiente de calcio (Ca^{2+}). Es por ello que la desregulación en la señalización colinérgica afecta a distintos niveles y se involucran diversos procesos fisiológicos y celulares que son importantes en los movimientos peristálticos de la digestión, la contracción

muscular, la memoria, el aprendizaje, la atención y el control motor (Eglen RM, 2006).

El sistema colinérgico podría clasificarse en “neural” y sistema colinérgico “no neural” debido a que algunos tejidos u órganos donde ACh lleva a cabo su influencia no pertenecen directamente al sistema nervioso, sin embargo todas las células tienen la capacidad de sintetizar a diferentes cantidades el neurotransmisor ACh y las enzimas que se encargaran de hidrolizarlo (AChE y BChE). Actualmente la relevancia en el estudio de colinesterasas se centra en sus funciones no neurales.

Las células de origen no nervioso que además expresan los receptores muscarínicos y nicotínicos han servido de modelo para estudiar la influencia del sistema colinérgico no neural en diferentes procesos celulares como apoptosis, diferenciación celular, proliferación, inflamación, morfogénesis, hematopoyesis y tumorigénesis, definiendo que las enzimas AChE y BChE cumplen funciones denominadas “no colinérgicas”, por lo que la función de terminación de la neurotransmisión colinérgica solo es el primer eslabón de una serie de funciones siguientes (Zimmerman G & Soreq H, 2006).

Los inhibidores selectivos de AChE y BChE se asocian con un desbalance en la cantidad de ACh libre que ocasiona síndrome colinérgico, este se caracteriza por dolor muscular, parálisis, taquicardia, hipertensión, miosis, vomito, incontinencia y problemas respiratorios. Debido a la sobre estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos por el neurotransmisor ACh; pues ambas colinesterasas no ejercen su acción de hidrolisis (Bargull-Díaz, 2012).

Los primeros estudios de AChE y BChE se desarrollaron en la investigación de enfermedades crónico degenerativas debido a su relación directa con el sistema nervioso central y periférico, hoy en día se sabe que el sistema parasimpático es regulado por la ACh.

El estudio de la transmisión colinérgica antecede al estudio de otros procesos biológicos, en civilizaciones antiguas ya se conocían agentes colinérgicos y se utilizaban para la caza, la guerra y en diversos rituales (Holmste DT, 1972). Los indios nativos americanos solían mojar sus flechas o lanzas con sustancias tóxicas extraídas de plantas y animales, las cuales tienen un efecto secretor de ACh que produce ataques, convulsiones y la muerte de terminaciones nerviosas. Hoy en día, la batracotoxina, un alcaloide secretado por ranas del género *Phyllobates* y *Dendrobates* es de los más estudiados.

Hacia 1850 en Edimburgo, Escocia se inician los estudios de la neurotransmisión con aportaciones de misioneros y farmacólogos, sin embargo fueron investigadores alemanes, franceses, ingleses y estadounidenses los que establecieron las bases de la transmisión química periférica y central (Kaczmar, 1970).

Dale en 1914 fue el primero en proponer que la ACh era el agente principal en la transmisión sináptica neuromuscular. Rápidamente surgió la idea de que una enzima debería terminar con el impulso sináptico que produce esta molécula, ya que la sobre estimulación produce los efectos nocivos mencionados anteriormente. Loewi y Navratil en sus reportes oficiales que datan de los años veinte y treinta identificaron en el músculo sartorio de la rana y el músculo gastrocnemio de perro, que la colinesterasa era la enzima que hidrolizaba al neurotransmisor. Sin embargo,

fue hasta 1938 que, los trabajos de Marnay y Nachmansohn en los órganos eléctricos de *Torpedo* y *Electrophorus* se asentó el papel de las colinesterasas en la transmisión colinérgica; concluyendo que AChE es la enzima principal encargada de eliminar de forma inmediata la estimulación neuromuscular tras la liberación de ACh dentro de los límites del periodo refractario (milisegundos).

2.1. Definición, especificidad y mecanismo catalítico de colinesterasas.

Por definición las colinesterasas son enzimas de tipo éster hidrolasas (AChE; E.C.3.1.1.7, BChE; E.C.3.1.1.8), que regulan al sistema colinérgico neuromuscular a través de la hidrólisis de los ésteres de colina; específicamente al neurotransmisor ACh. El mecanismo se debe de dar en un medio acuoso, bajo catálisis ácida o básica para producir ácidos carboxílicos y alcoholes.

Saponificación es el proceso básico de hidrólisis que transforma ésteres en carboxilatos; este mecanismo se da en tres etapas: 1) adición nucleófila del agua al carbonilo. 2) eliminación del metóxido. 3) equilibrio ácido base entre el ácido carboxílico y el metóxido. Este equilibrio se antepone a los anteriores hacia el producto final (Alberts et al., 2004).

La alta afinidad de la AChE por la ACh es debida a que evolutivamente esta enzima se especializó a partir de la BChE, la cual además de hidrolizar ACh, puede actuar sobre otros ésteres de colina como butirilcolina, propionilcolina, succinilcolina. El sitio catalítico de la AChE muestra una tríada catalítica compuesta por los residuos de aminoácidos: Serina-200, Histidina-440 y Ácido glutámico-327. Dada la semejanza en la estructura entre BChE y AChE, se cree que el mecanismo catalítico es el mismo o similar (Harel et al., 1992).

Estudios de mutagénesis dirigida ha servido como herramienta para comprobar que la triada catalítica prevalece en todas las isoformas de las colinesterasas, una sustitución de alguno de los aminoácidos de la triada catalítica por ejemplo con Triptófano-84 reduce considerablemente su actividad, sin alterar la secreción de la enzima (Shafferman et al., 1992, Harel et al., 1993).

2.2 La genética de las colinesterasas

En el humano el gen de AChE se ubica en la región 22 q del cromosoma 7, tiene una longitud de 7 kb, la cual incluye seis exones y cuatro intrones. Mediante corte y empalme alternativo se generan tres diferentes transcritos: mRNA tipo T constituido por los exones 2, 3, 4 y 6 cuya proteína traducida se da en forma de monómeros, dímeros y tetrámeros anfifílicos (G_1^A , G_2^A y G_4^A). Además este transcrito forma tetrámeros no anfifílicos (G_4^{NA}), así como asociaciones hetero-oligoméricas, sin embargo si estos tetrámeros se unen a una proteína transmembranal rica en prolina (PRiMA) se forman tetrámeros capaces de unirse a la membrana (PRiMA- G_4^A) (Dori & Soreq, 2006, Perrier et al., 2002, Deutsch et al., 2002). Por otro lado si los tetrámeros se ligan a un tallo tipo colagénico (ColQ) se generan formas asimétricas A_4 , A_8 y A_{12} con uno, dos o tres tetrámeros, respectivamente.

El mRNA tipo H de AChE tiene los exones 2, 3, 4 y 5, que codifica para dímeros anfifílicos tipo 1 que se unen covalentemente a una ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Soreq et al., 1990, Deutsch et al., 2002).

El mRNA tipo R no experimenta corte y empalme después del último exón codificador del dominio catalítico, por lo tanto posee a los exones 2, 3, 4, 5 y 6, y entre el cuatro y cinco se encuentra el intron 4. El extremo carboxilo terminal de la

subunidad R consta de 30 aminoácidos adicionales y carece de residuos de Cisteína, por lo que la isoformas proteicas solo son monómeros (Sternfeld et al., 2000, Grisaru et al., 2006).

El gen de BChE se ubica en el cromosoma 3 en la región 26 q con un tamaño de 70 kb y se compone por cuatro exones y tres intrones. El gen de BChE no experimenta corte y empalme alternativo; todas su isoformas proteicas provienen de un mismo gen (Soreq et al., 1989).

La traducción del mRNA-BChE genera monómeros, dímeros, tetrámeros, solubles y tetrámeros también anclados a la proteína PRiMA. También, se presentan formas asimétricas ancladas a la membrana por un triplete helicoidal de colágeno (Darvesh et al., 2003).

El amplio polimorfismo proteínico se genera a partir de los diferentes estadios del procesamiento de una estructura original compleja, y solo se distinguen hasta formar su estructura cuaternaria y mediante su carácter soluble, sus tipos de interacciones y sus modificaciones post tradicionales.

Por todo lo anterior descrito podemos encontrar enzima de forma libre o unida a las membranas celulares.

2.3. El ensamblado y modificaciones postraduccionales de las colinesterasas

Durante el procesamiento postraduccionales de las colinesterasas al igual que otras proteínas de secreción y glicoproteínas transmembranales, las subunidades se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso (RER), para que posteriormente se transloquen al lumen, donde el complejo de la peptidasa enciende el péptido señal, y se producen precursores inactivos, con la participación de proteínas chaperonas de la familia de proteínas de choque térmico (HSP), como BiP/GRP78 se facilita el ensamblado y así adquieren la capacidad enzimática (Eichler et al., 1991).

Teniendo en cuenta, que la estructura cuaternaria de las isoformas se unen progresivamente siguiendo un patrón lógico desde monómeros, dímeros, tetrámeros, y las formas asimétricas. Las moléculas heteroméricas se forman a partir de la unión al péptido "P" o al tallo de tipo colágeno. A pesar de los diferentes estudios *in vitro*, el ensamble de las isoformas proteicas parece ser un proceso más complejo *in vivo*.

Las colinesterasas son glicoproteínas que experimentan modificaciones postraduccionales, tal como la glicosilación ("O-" y "N-"): proceso regulado enzimáticamente que adiciona glúcidos a las proteínas, en este contexto la glicosilación representa un marcador idóneo para conocer la progresión de las diferentes formas.

Al parecer las formas globulares se ensamblan poco después de su síntesis, cuando las subunidades aún permanecen en el lumen del RER (Rotundo et al., 1984). Tras su ensamblado las moléculas se transportan al aparato de Golgi donde se eliminan

manosas y se incorporan restos de N-acetilglucosamina, este remodelado ocurre en las cisternas medias del Golgi, y en la región Trans se les incorporan restos de galactosa terminal y ácido siálico. Esta vía es la general, no obstante existen vías alternas entre las diferentes especies, incluso entre los diferentes tejidos de una misma especie.

En el caso de AChE los glúcidos representan entre un 10 a 15% de su peso total (Niday et al., 1977), mientras que los glúcidos de BChE corresponden a un 25% (Muensch et al., 1976). Estos oligosacáridos unidos a las isoformas de AChE y BChE difieren entre tejidos particulares y entre especies y también entre la misma especie (Liao et al., 1993, Cabezas-Herrera et al., 1994).

La estructura primaria de las subunidades de ambas colinesterasas tiene varias secuencias consenso para adicionar oligosacáridos: Asparagina (sitios de N-glicosilación cuyo número depende del organismo y tejido. AChE y BChE de suero humano tienen 3 y 8 sitios potenciales de N-glicosilación respectivamente (Vidal et al., 1996). En diversos estudios se observa que la pérdida de los carbohidratos afecta la secreción de las enzimas pero no su actividad (Velan et al., 1993).

En este contexto se conoce que la secuencia de carbohidratos de BChE sérica es idéntica a la de hígado, deduciendo que la enzima circulante proviene preferentemente del hígado (Tornel et al., 1992, Sáez-Valero et al., 1996).

2.4. El papel de las colinesterasas en patologías y el metabolismo

En el ámbito toxicológico se ha evaluado la actividad de ambas colinesterasas como un biomarcador de contaminación por plaguicidas organofosforados y carbámicos en personas dedicadas a la agricultura y al campo. También, en algunas especies de peces, crustáceos (Tu et al., 2009), y ostras (Choi et al., 2011), se han considerado una importante herramienta para determinar el grado de contaminación de las aguas. Sin embargo, los primeros estudios relacionados con la actividad de AChE y BChE en el ámbito de la medicina fueron dirigidos a fisiopatologías que involucran al sistema colinérgico neuromuscular, destacando las enfermedades de Parkinson y la de Alzheimer. Las colinesterasas han sido consideradas como blancos terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer; debido a que participa en los depósitos de la proteína beta-amiloide que forman las placas seniles, así como la toxicidad que estas generan (Reyes et al., 2004). En pacientes con la enfermedad de Alzheimer se ha observado un aumento significativo en la actividad de ambas colinesterasas, y se ha correlacionado positivamente con los niveles de homocisteína, que a su vez se ha asociado con problemas neurológicos y apoptosis neuronal (Stefanello et al., 2005). Actualmente para mejorar la calidad de vida del paciente con Alzheimer continúan las investigaciones relacionadas con inhibir ambas enzimas utilizando antagonistas sintéticos o de origen natural (Ozarowski M et al., 2017, Moss DE et al., 2017).

En otro estudio donde se analizó la actividad de AChE en sangre de pacientes con enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer y su primera generación asintomática, se observó que podría ser considerado un biomarcador en los

familiares asintomáticos de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, y que además en pacientes con enfermedad Parkinson la actividad de AChE en glóbulos rojos es más alta; donde los inhibidores de la enzima podrían ser una alternativa terapéutica (Bawaskar et al., 2015).

En pacientes con trastornos metabólicos, tales como obesidad, SM y diabetes tipo 2 (DT2) se han analizado las actividades AChE y BChE, en estos estudios se encontró aumento en la actividad de ambas colinesterasas en plasma y suero, se encontró una correlación positiva con varios parámetros antropométricos y bioquímicos, que incluyeron: el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia abdominal, la glucosa circulante, los niveles de triacilgliceroles (TG), el colesterol y las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL); éstas últimas en exceso son responsables de la formación del ateroma, y a su vez, del desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Kálmán et al., 2004, Rao et al., 2007, Sridhar et al., 2010, Vallianou et al., 2014).

En otros estudios, también se encontró una correlación positiva entre los factores de riesgo para el SM y la actividad de las colinesterasas asociado como resultado de daño en el hígado con el que desarrollan los pacientes con este tipo de enfermedades; sobre todo teniendo en cuenta que la BChE es producida principalmente en hígado y secretada a nivel sistémico (Lockridge, 2015). Otras enzimas, también se ven afectadas en hepatologías, es el caso de las transaminasas: alanina y aspartato amino transferasas (ALT y AST, respectivamente), o como la gama glutamil transferasa (GGT) cuya función es transferir grupos amino o gama glutamil entre los péptidos en el citosol de los

hepatocitos; al verse comprometido el estado de la célula hepática por daños físicos, químicos o mecánicos se pierde la permeabilidad de las membranas y se liberan muchas proteínas al espacio extra celular y de ahí al torrente circulatorio es por ello que la actividad catalítica de todas estas proteínas las encontramos altas en suero; cuando se encuentra en riesgo la integridad del hígado (Tsai et al., 2012).

Existen diversas evidencias que muestran la correlación de la actividad de colinesterasas con los factores de riesgo que determinan cuando una persona padece SM, DT2 o simplemente cursa con obesidad (Tabla 2).

En otro estudio donde además se determinaron otro tipo de enzimas asociadas al estrés oxidante y a la inflamación; procesos poco estudiados en la enfermedad metabólica, pero que sin duda son muy importantes para la etiología de la enfermedad, se analizó la actividad de BChE, la cual de inicio estuvo más elevada en pacientes con SM, este aumento también se vio en la actividad de la GGT, en los niveles de óxido nítrico (NOx) y la proteína C-reactiva (PCR). Estos resultados se mantuvieron cuando se ajustó en términos del índice de masa corporal. La actividad de BChE también correlacionó con la cantidad de colesterol total (TC) y la CRP, reflejando el estado pro inflamatorio del SM (De Bona et al., 2013).

Tabla 2. Revisión sobre evidencias que correlacionan la actividad de las colinesterasas y enfermedades metabólicas	
DT1, DT2 y Enfermedad de Alzheimer: ↑ AChE y BChE.	Rao Allam et al., 2007
DT1 y DT2: ↑ AChE y BChE favorece el proceso inflamatorio.	Das Undurti, 2007
PCCI: ↑ BChE ↓ ACh, neurotransmisor en la sinapsis colinérgica.	Vaisi-Raygani et al., 2009
Ratón KO para BChE con dieta hipercolesterolémica desarrollan obesidad; indicando participación de BChE en el metabolismo de lípidos.	Sridhar et al., 2010
Enfermedad cardiovascular: ↑ BChE correlaciona con ↑ homocisteína e hipertensión.	Sridhar et al., 2010
↑ BChE correlaciona con IMC, LDL y TG, factores de riesgo cardiovascular en población juvenil.	Stovanov et al., 2011
SM y deterioro parasimpático: ↑BChE correlaciona con IMC, PC-R, hipertensión y dislipidemia.	Shenhar-Tsarfaty et al., 2011
↑ BChE asociada con inflamación sistémica de bajo grado.	Lampón et al., 2012
↑ BChE incrementa la poza de colina ↑ aminofosfolípidos = fosfatidilcolina; ácido graso constituyente de membranas lipídicas y el componente más importante de las VLDL.	Zom et al., 2011
SM: ↑ BChE correlaciona con CT y GGT.	De Bona et al., 2013
Pacientes aparentemente sanos: ↑ BChE correlaciona con IMC, LDL, CT y TG.	Vallianou et al., 2014
LDLox; ↑ AChE y correlaciona con la producción de ERO.	Yamchuen, 2014

Ratas hipertensas: el ejercicio previene las alteraciones en la actividad de colinesterasas.	Cardoso et al., 2014
Obesidad abdominal y resistencia a la insulina correlaciona con alta actividad de colinesterasas.	Tangvarasittichai et al., 2015
La vía antiinflamatoria colinérgica previene la producción de citocinas en macrófagos	Payolla et al., 2015
↑ AChE y BChE, correlaciona con estrés, peso corporal y lípidos en un modelo de obesidad con fructosa en ratas	Amri et al., 2017

AChE: acetilcolinesterasa, BChE: butirilcolinesterasa, DT1: diabetes tipo 1, DT2: diabetes tipo 2, PCCI: pacientes con accidente cerebrovascular isquémico, KO: knockout, IMC: índice de masa corporal, LDL: lipoproteínas de baja densidad, TG: triacilgliceroles, PC-R: proteína C-reactiva, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, CT: colesterol total, GGT: gama glutamil transferasa, ERO: especies reactivas de oxígeno.

Se han desarrollado diversos métodos experimentales en animales de laboratorio (ratas y ratones) para inducir trastornos metabólicos para analizar a las colinesterasas tratando de responder el papel que podrían tener este grupo de enzimas en el establecimiento y desarrollo de las enfermedades metabólicas.

Con los antecedentes descritos en la tabla 2, se ha inhibido a AChE y BChE con el alcaloide natural fisostigmina (eserina), en ratones con previo ayuno y evaluado como afecta el mecanismo lipídico con el que se ha ligado a las colinesterasas, los datos reportados confirman que existe una regulación parasimpática en la acumulación de TG a nivel hepático. Esta inhibición de AChE se vio acompañada de niveles bajos de insulina circulante, lo que a nivel sistémico es perjudicial, la baja insulina no permite la captación de glucosa a los órganos y tejidos insulino-dependientes, por lo tanto, la inhibición con fisostigmina al igual que el ayuno

prolongado induce acumulación de TG hepáticos, pero además aumenta la expresión de factores de transcripción para la síntesis de ácidos grasos como la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP-1) y la proteína de unión a ácidos grasos de hígado (L-FABP) (Yokota S et al., 2014).

En este contexto, algunos estudios proponen utilizar la actividad de AChE y BChE como un marcadores tempranos del SM y la DT2 (Sridhar et al., 2010). Sin embargo, aún es imprecisa la relación que pudiera existir entre la actividad elevada de las colinesterasas y los factores bioquímicos alterados durante estas patologías metabólicas. La hipótesis más explorada hasta el momento, es que al ocurrir una hidrólisis exacerbada del neurotransmisor acetilcolina y otros ésteres de colina, se incrementa el reservorio de colina, que puede ser un sustrato en la formación de amino fosfolípidos como fosfatidilcolina; constituyente de las membranas lipídicas y el componente más importante de las VLDL (Zom et al., 2011). La fosfatidilcolina, también puede transformarse en diacilglicerol, y posteriormente favorecer la creación de triacilgliceroles, además de facilitar su exportación desde el hígado a otros tejidos (Zom et al., 2011). Otro metabolito, producto de la hidrólisis de acetilcolina es el acetato (ácido graso más pequeño), el cual puede incrementar la formación de acetil-CoA, y posteriormente acil-CoA (ácido graso) y triacilgliceroles (Nakamura et al., 2014).

En condiciones de hiperglucemia ocurre que ciertas moléculas experimentan reacciones de incorporación de glucosa por un mecanismo no enzimático (denominado glicación) como es el caso de la fosfatidilcolina, la cual al reaccionar con glucosa favorece la formación de lipoperóxidos. El exceso de colina, también

ha sido asociado al aumento en la ganancia de peso corporal y a la intolerancia a la glucosa, mediante la generación de la fosfatidilcolina elemento constitutivo de membranas celulares y lipoproteínas-LDL. La formación de este fosfolípido se da mediante su precursor: citidina 5'-difosfocolina o a través de la metilación de fosfatidiletanolamina por la enzima fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT) (Wu et al., 2012).

La enzima AChE además de compartir con BChE, lo antes descrito, también se ha comprobado su participación en procesos de inflamación sistémica de bajo grado; el neurotransmisor, ACh posee propiedades anti-inflamatorias al unirse a su receptor nicotínico en la subunidad $\alpha 7$ de los macrófagos, monocitos y otras células inmunes. Esta unión impide la translocación al núcleo del factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) y atenúa la liberación de TNF- α e IL-6, citocinas pro-inflamatorias (Rosas-Ballina et al., 2009, Shenhar-Tsarfaty et al., 2014). Este mecanismo anti-inflamatorio se podría ver afectado por la unión del neurotransmisor a su receptor en este tipo de células, teniendo en cuenta, la actividad exacerbada de las colinesterasas y favorecer la liberación de citocinas pro-inflamatorias a nivel sistémico y local (Das et al., 2007, Rosas-Ballina et al., 2009; Shenhar-Tsarfaty et al., 2014).

Estudios recientes destacan la actividad no colinérgica de BChE a través de regular la acción de grelina; péptido encargado de regular la sensación de saciedad. La grelina es considerada una hormona orexigénica o estimulante del apetito sintetizada en las células del fundus del estómago que viaja al cerebro y es captada por sus receptores (GHS-R 1a y GHS-R 1b) a nivel de hipotálamo e hipófisis, esta hormona se activa al agregarse un ácido n-octanoico en la serina 3 de su cadena

poli peptídica de 28 aminoácidos, generando acil-grelina; que se considera la forma activa de la hormona, cuyo efecto es: disminuir el gasto energético, inducir el apetito y la secreción de la hormona de crecimiento (Chen VP et al., 2017).

BChE hidroliza la acil-grelina; rompiendo el enlace del ácido n-octanoico de la cadena de residuos de aminoácidos, por lo cual la transforma a un estado inactivo de la hormona (desacil-grelina), impidiendo que cumpla sus funciones entre ellas; la sensación de hambre. La asociación de esta información con la actividad elevada de las colinesterasas podría dar un indicio de protección en contra de una señal inductora del apetito que en definitiva desfavorece el sobrepeso y la obesidad. En este contexto; la actividad elevada de las colinesterasas representaría un mecanismo protector para reducir las señales de apetito a nivel cerebral, así como una mejora en la homeostasis de la glucosa facilitando la liberación de insulina en ratones obesos (Chen et al., 2017).

Nuestro grupo de trabajo demostró en un modelo animal de SM con una ingesta excesiva de fructosa, que la glicosilación de las colinesterasas séricas se modifica, este efecto trajo consigo cambios en la vida media de la enzima que podría explicar el motivo, por el cual se observa aumento en su actividad; probablemente al unirse más carbohidratos a la proteína, la señal dada por el ácido siálico para la eliminación de la proteína vía proteosoma se pierde o enmascara por estos otros carbohidratos adicionados de manera alterada, lo que resulta en un aumento de la actividad sérica de ambas colinesterasas, contribuyendo a la inflamación sistémica de bajo grado, la síntesis de ácidos grasos y la pérdida de apetito (Villeda-González JD, Tesis de Maestría. 2016).

2.5. La nicotinamida y sus propiedades generales

La nicotinamida (NAM) es una vitamina hidrosoluble del complejo B, también llamada vitamina B3, precursora de nucleótidos de piridina adenina (NAD⁺, NADH, NADP⁺ y NADPH). La actividad biológica de NAM es variada, incluyendo su acción antioxidante, inmunoreguladora, antiapoptótica y anticancerígena. Cuando se ha utilizado a altas dosis farmacológicas no se observan efectos de citotoxicidad, teratogénicos u oncogénicos. Aunque, su efecto farmacológico depende de la concentración empleada (Yan et al., 1999, Burkart, 1999, Bai, 2008).

En distintos modelos experimentales de diabetes tipo 1 (DT1), se ha comprobado que la NAM evita la destrucción de las células β pancreáticas (Lee et al, 2013), al disminuir la producción de citocinas pro-inflamatorias y bajar la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (Hedman, 2006). Esta acción de la NAM se atribuye a la inhibición de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) o la formación del óxido nítrico, los cuales ocasionan muerte de la célula β pancreática (Kolb et al., 1999). La NAM como precursora de NAD⁺ activa indirectamente a la AMPK, mecanismo guiado por sirtuínas, y en consecuencia podría inhibir a diversas proteínas involucradas en el metabolismo lipídico, como son la lipasa sensible a hormonas, la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa (FAS) (Rossmeisl M et al., 2004).

En cardiomiocitos expuestos a NAM se ha observado un aumento en la concentración de NAD⁺, ATP y enzimas antioxidantes, y al mismo tiempo una disminución en la necrosis y en las especies reactivas de oxígeno (Tong et al., 2012). En ratones con DT2 y una dieta alta en grasa, la nicotinamida mononucleótido (intermediario en la síntesis de NAD⁺ a partir de NAM), indujo el

aumento de la poza de NAD⁺, mejorando la sensibilidad a la insulina al disminuir la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y actividad de sirtuínas (Yoshino et al., 2011). Paralelo a estos resultados un estudio reciente realizado por nuestro grupo demostró que el suplemento de NAM al modular la actividad de la enzima G6PD mediante la inhibición no competitiva mixta causa una disminución en el estrés oxidante y la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1 cultivados con alta glucosa (Torres-Ramírez et al., 2013). Cabe señalar, que en ratón knockout para glicina n-metil transferasa, la acumulación anómala de S-adenosil metionina puede corregirse por la administración de la NAM, al normalizar la expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos, estrés oxidante, inflamación, proliferación y apoptosis (Varela-Rey et al., 2010).

Otro trabajo derivado de nuestra línea de investigación demostró además que NAM regula la expresión de SRBP y CREB; enzimas lipogénicas relacionadas con el desarrollo de esteatosis (Loza-Medrano et al., 2019).

Con base en estas investigaciones, queda claro que la administración de NAM en modelos experimentales de trastornos metabólicos podría modular a otros genes, disminuir el estrés oxidante o influir en las modificaciones postraduccionales de esterasas hepáticas, disminuir la inflamación y mejorar el metabolismo de ácidos grasos.

3. JUSTIFICACIÓN

El término “síndrome metabólico” fue asignado para describir un conjunto de anomalías metabólicas y hemodinámicas, incluyendo obesidad central, hipertensión, dislipidemia, hiperglucemia y resistencia a la insulina. En particular la obesidad y resistencia a la insulina son reconocidas como factores causales. Es importante destacar que el síndrome metabólico es una condición reversible y crucial para prevenir el inicio y progreso de enfermedades crónicas degenerativas, las cuales no son reversibles. Por ello, se buscan marcadores tempranos del SM para su diagnóstico y posterior control; con esta apreciación pudieran ser reconocidas las colinesterasas como marcadores tempranos en el desarrollo y establecimiento del SM. Además, la administración de NAM pudiera mejorar el sistema redox del glutatión y reflejarse en una disminución en las actividades de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, incrementando la actividad en la paraoxonasa-1 impidiendo la hidrólisis de acetilcolina y la oxidación de las LDL. La administración de NAM constituye un enfoque fundamentado teóricamente y experimentalmente, que por ser accesible e innovador conviene investigar.

4. HIPÓTESIS

Las colinesterasas pueden ser reguladas por NAM que manifiesta su efecto antioxidante y antiinflamatorio en el modelo de SM en rata.

5. OBJETIVO GENERAL

Conocer el mecanismo de acción por el cual NAM regula la actividad de colinesterasas hepáticas y reduce las alteraciones del SM.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar el modelo *in vivo* de SM con un modelo en cultivo celular (*in vitro*), del efecto de NAM sobre la expresión, el contenido y la actividad de colinesterasas.
- Determinar la expresión de transcritos de ambas colinesterasas en los dos modelos de experimentación.
- Determinar el contenido proteínico de ambas colinesterasas en los dos modelos de experimentación.
- Evaluar el estado redox celular mediante; relación GSH/GSSG, malondialdehído (MDA) y paraoxonasa 1 (PON1).
- Realizar un análisis de modelado molecular de NAM y colinesterasas, y su interacción *in silico* mediante la técnica de docking molecular.

7. MATERIAL y MÉTODOS

7.1. Materiales

Los reactivos grado biología molecular y lectinas utilizadas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El reactivo de Trizol de ROCHE (Indianapolis, IN, USA), kit Turbo DNA-free™ de Ambion, kit First Stand cDNA de Thermo Scientific (Massachusetts, USA), Master SYBR Green Plus para la reacción de qPCR de ROCHE (Mannheim, Germany), kit Immunoassay Quantify Insulin marca ALPCO (New Hampshire, USA), kit Quantify Free Fatty Acids marca BioVision (Milpitas, CA, USA), kit BD OptEIA TNF ELISA marca BD (San José, CA, USA), kit Rat IL-6 Standard ABTS ELISA marca Peptotech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA) y primers proporcionados por Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA).

7.2. Modelo in vivo en ratas

Se utilizaron treinta ratas de la cepa *Sprague Dawley* con un peso de 250 ± 5.0 g en condiciones controladas de temperatura (22.5 °C), humedad relativa (50%) y períodos luz/oscuridad (12 / 12 h), alimentadas con dieta chow 5008 de purina. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2001), para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

7.3. Inducción del síndrome metabólico y tratamientos

El SM se indujo mediante la ingesta de fructosa al 40% (P/V) disuelta en el agua de beber. Las ratas se dividieron en cinco grupos (n=6 por grupo), se mantuvieron en jaulas de acrílico de 90 X 50 X 30 cm (de forma individual). En la tabla 3 se describen los grupos:

Grupo	Tratamiento
Grupo 1	Control
Grupo 2	SM (fructosa 40%)
Grupo 3	SM - NAM 5 mM
Grupo 4	SM - NAM 10 mM
Grupo 5	SM - NAM 15 mM

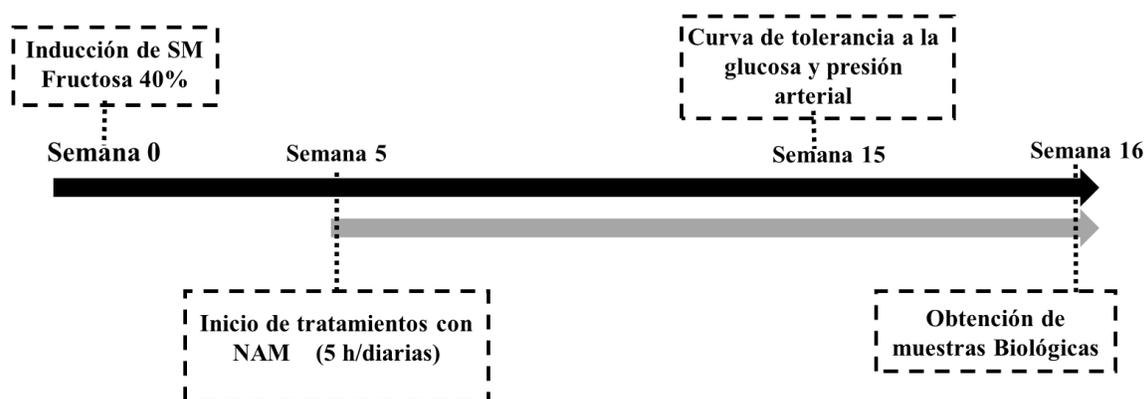


Figura 1. Diseño experimental. Durante los primeros treinta días se indujo el SM experimental en los grupos de animales 2, 3, 4 y 5. Posteriormente, a partir del día treinta y uno se administró la nicotinamida a diferentes concentraciones a los grupos 3, 4 y 5 (5, 10, y 15 mM en el agua de beber), respectivamente.

Se preparó fructosa al 40% (P/V) para administrar en el agua de beber a los grupos 2, 3, 4 y 5, para inducir SM, a partir del día treinta y uno se administró NAM a sus respectivas concentraciones. La vitamina se disolvió de igual forma en agua de beber, en un bebedero diferente, bajo disponibilidad *ad libitum* durante cinco horas diarias (de 9:00 am a 2:00 pm). A las concentraciones establecidas para cada grupo de tratamiento. Cabe mencionar que durante el tratamiento se retiró el bebedero del carbohidrato durante las cinco horas de tratamiento y se colocó el bebedero con la NAM. Posteriormente, se intercambiaron los bebederos nuevamente; esto para asegurar que al consumir la vitamina no se mezclará con el carbohidrato. Se consideró que la administración de NAM era la más adecuada debido a que nos permite controlar el tiempo e impedir que la NAM se transforme en NAD⁺ y por saturación hepática sea metabolizado. Sin embargo, no se puede excluir que el NAD⁺ tenga una función importante en el estudio presente, por ello es que optamos por dar el tratamiento durante la mañana y por un tiempo establecido. No obstante que conocemos que la vida activa de la rata es nocturna, en este contexto hemos observado que suelen consumir bebida durante su etapa de descanso, demostrado mediante el registro que se llevó en cuanto al consumo de la vitamina. Se completaron ciento veinte días de tratamiento, durante ese tiempo se llevó un registro de consumo de alimento, bebida, tratamiento y ganancia de peso corporal. Una vez finalizado el tratamiento los roedores se sacrificaron para la obtención de muestras biológicas.

7.4. Determinación de presión arterial

Dos semanas antes de concluir los tratamientos se determinó la presión sistólica y diastólica de cada rata utilizando el equipo no invasivo, CODA® High Throughput (System Noninvasive Blood Pressure System), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.5. Curva de tolerancia a la glucosa

Ocho días antes de finalizar los tratamientos se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral. Previamente, los animales se dejaron en ayuno por 7 horas. A cada animal se administró una carga de glucosa (2 g/kg) (DX-50, Pisa) por vía intraperitoneal. La muestra de sangre se obtuvo mediante un corte sagital de la punta de la cola y utilizando un glucómetro FreeStyle Optium Neo de Abbott® y tiras reactivas de la misma marca. Se cuantificó la glucosa basal, y posteriormente cada 30 minutos y hasta los 180 minutos.

7.6. Obtención de muestras biológicas

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg vía I.P.) para realizar una punción cardíaca y obtener sangre total que se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 °C para coleccionar el suero y formar alícuotas de 100 uL. Las muestras de suero se almacenaron a -70 °C hasta su uso para las determinaciones correspondientes. Se realizó la extracción del hígado que se fraccionó para las determinaciones correspondientes (Análisis de expresión génica; Trizol o RNA-later; Análisis bioquímico: sin amortiguador a -80 °C y análisis de western blot en RIPA).

7.7. Marcadores metabólicos

Se determinaron TG, HDL, LDL, alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y proteínas totales en muestras de suero, se determinaron utilizando el equipo SPOTCHEM™ EZ SP-4430, Arkray, USA.

7.8. Cuantificación de insulina, ácidos grasos libres y citocinas pro inflamatorias (TNF- α e IL-6)

La concentración de insulina, ácidos grasos libres y citocinas pro-inflamatorias se determinó en muestras de suero utilizando kits específicos para rata, siguiendo las recomendaciones del inserto para cada ensayo y mediante el análisis de sus absorbancias obtenidas a 450, 570 y 450 nm de longitud de onda, respectivamente usando el lector de placas Multiskan™ de Thermo Scientific™.

7.9. Marcadores de estrés oxidante

La determinación de glutatión (GSH) en hígado se determinó después que una fracción de órgano se homogeneizó (10% P/V) en ácido meta fosfórico al 5 % (V/V) y se centrifugó a 15, 000 rpm por 20 min a 4 °C. El fundamento del método de cuantificación se basa en la reacción estequiométrica entre el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y el grupo tiol del GSH, el producto nitromercaptobenzoato absorbe a una longitud de onda a 412 nm, siendo proporcional a la concentración de GSH.

La determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico o malondialdehído (MDA), se realizó un homogenado de hígado (10% P/V) en PBS 0.1 M, pH 7.5. El fundamento del método cuantitativo se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico

(TBA) con el producto de la lipoperoxidación el cual absorbe a una longitud de 595 nm.

Cabe destacar la adición de ácido tricloroacético para la formación de lipoperóxidos y posteriormente la extracción de estos con n-butanol.

La actividad de la paraoxonasa-1 (PON1), se determinó en suero, midiendo la velocidad de hidrólisis del sustrato paraoxón (fosfato de dietil-p-nitrofenilo), a su transformación en p-nitrofenol cuya absorbancia se observa a 412 nm. La mezcla de reacción (800µl), contenía paraoxón 2,0 mM, CaCl₂ 2,0 mM y 20 µl de suero o plasma en tampón Tris / HCl 100 mM (pH 8,0). Se procesó simultáneamente una muestra blanco que contenía la mezcla de reacción sin suero para corregir la degradación espontánea del sustrato. La actividad enzimática se calculó a partir de ϵ_{412} de p-nitrofenol ($18290 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), y se expresó en U / ml; 1 U de enzima hidroliza 1 nmol de paraoxón / min (Schiavon et al., 1996, Ayub et al., 1999).

Todas las absorbancias fueron determinadas por el lector de placas MultiskanTM de Thermo ScientificTM.

7.10. Actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

La actividad de AChE y BChE se determinó en muestras de suero e hígado mediante el método de Ellman (1961), en el cual se emplean los tio-análogos de los sustratos naturales (acetil-tiocolina y butiril-tiocolina para AChE y BChE, respectivamente), e inhibidores selectivos para cada enzima (BW284C51 e Iso-OMPA para inhibir AChE y BChE, respectivamente). El método se basa en la capacidad del DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) para oxidar grupos tioles

libres formando el anion 5-tio-2-nitrobenzoato que genera un color amarillo, que absorbe a un máximo de absorbancia a 412 nm de longitud de onda.

La actividad enzimática, expresada en μ moles de sustrato hidrolizados por hora y por ml de muestra (U/ml), se obtiene multiplicando el incremento de absorbancia / min por el factor que, para un paso óptico de 1 cm, resulta de la expresión:

$$F = \frac{60 \times 1000 \times V_t}{1,36 \times 10^4 \times V_m}$$

En la que V_t y V_m representan, respectivamente el volumen total en la cubeta y volumen de muestra, expresados en mililitros; $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar del cromóforo (ϵ_{412}), y 60 y 1000 son factores de conversión. Por lo tanto una unidad de actividad de AChE o BChE (U) representa la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de sustrato por hora en las condiciones de ensayo. La actividad específica se expresa en unidades por miligramo de proteína (U/mg).

La actividad en el hígado se determinó a través de un homogenizado del tejido (10% P/V) en amortiguador de lisis (Trizma 15 mM, pH 7,5 (NaCl 1 M, MgCl 50 mM, EGTA 1 mM y EDTA 3 mM), en Polytron PT 1200, que se centrifugó a 15, 000 rpm a 4 ° C durante 60 min (Thermo Scientific Sorvall ST 40R), considerando el sobrenadante como la fracción S₁. Además se obtuvo una segunda fracción solubilizando las membranas citoplasmáticas del precipitado utilizando el detergente Brij 96 (fracción S₂).

La estimación de las actividades se realizó mediante una cinética enzimática, utilizando un lector de microplacas Labsystems Multiskan EX de 96 pozos (Helsinki, Finlandia). La mezcla de reacción contenía muestras de suero o hígado (fracciones S₁ y S₂) más tio-análogos específicos (11 µM) e inhibidores específicos 5.5 µM.

La actividad se normalizó utilizando el contenido total de proteínas, finalmente la actividad se expresó como actividad específica (U/mg).

7.11. Valoración del contenido total de proteínas

La cuantificación de proteínas totales en hígado se realizó mediante el método de Lowry (1951), cuyo fundamento se basa en dos reacciones: 1) La formación de un complejo de estructura plano-cuadrada entre los enlaces peptídicos de las proteínas y el cobre (reacción de Biuret) y 2) Reacción oxido-reducción del reactivo de Folin-Cicalteau con el complejo cobre-proteína, principalmente grupos aromáticos de los aminoácidos tirosina, fenilalanina y triptófano. Esta segunda reacción intensifica la coloración de acuerdo a la concentración de proteínas. Se determina por espectrofotometría a 660 nm de longitud de onda.

7.12. Detección de proteínas por Western Blot

Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en amortiguador RIPA con un coctel inhibidor de proteasas utilizando un Politron durante 10 min. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 15, 000 g durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante se colectó en un tubo del cual se tomaron las alícuotas para determinar proteínas totales por el método descrito en el apartado anterior. Una vez conociendo la concentración de proteínas se ajustó el volumen para conseguir un contenido 40 µg de proteína en cada muestra con amortiguador de muestra. Se

realizó la separación electroforética de proteínas en condición disociante utilizando el equipo de BioRad, y posteriormente, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de polivinilo (PVDF) previamente activada. Posteriormente, se realizó la incubación con anticuerpos primarios específicos para cada la proteína acetilcolinesterasa (Santa Cruz Biothecnology), butirilcolinesterasa (Santa Cruz, Biothecnology) y como control de carga de utilizó la detección de la beta-Actina (Santa Cruz Biothecnology), el revelado fue por quimioluminiscencia utilizando un foto documentador (Fusion FX, Vilber US).

7.13. Expresión de los genes AChE y BChE en hígado de rata

El aislamiento del RNA se llevó a cabo mediante el método de Tioisocianato de guanidina (Trizol®-Invitrogen) (Chomczynski, 1993), y la purificación mediante lavados con isopropanol y etanol 75%, además se utilizó el kit Turbo DNA-free™ de Ambion®, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El RNA se cuantificó usando el NanoDrop y se determinó la relación 260/280 para verificar su pureza, la integridad se determinó mediante la electroforesis en un gel de agarosa 1% usando bromuro de etidio, la visualización se llevó a cabo en un analizador de imagen (BioRad).

La retrotranscripción se llevó a cabo con cebadores aleatorios, una mezcla de desoxiribonucleotidos (DNTP's) y la transcriptasa reversa en termociclador (Eppendorf, EE.UU.AA) siguiendo las recomendaciones del kit First Strand cDNA de Thermo Scientific.

La reacción de qPCR se llevó a cabo con una mezcla de Master SYBR Green Plus de ROCHE, primers específicos que se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de los primers y tamaño de amplicones para análisis de transcritos			
	Sentido	Anti sentido	pb
BChE	F5'-TGCCCTGCACTGGAGTTTAC-3',	R5'-CCACACTGTGCTATTGCCCT-3'	273
AChE General	F5'-CTGGGTTTGAGGGATCCGAG-3'	R5'-TGAGGACAGGTGTGGGAGAA-3'	114
AChE-H	F5'-CCACAGCCACAGAGGTTCC-3'	R'-GGAGTGGAGGAGGAAAAGGA-3'	116
AChE-R	F5'-CTCAGCGCCACAGGTAGG-3'	R5'-TCTCTCCCGTCCTTCCAAC-3'	76
AChE-T	F5'-CAGCAATACGTGAGCCTGAA3'	R5'-CTCGTCCAGCGTGTCTGT-3'	123
18S	F5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3'	R5'-CGCTGAGCCAGTTCAGTGTA-3'	218

El sistema de Applied Biosystems 7900 se programó a 40 ciclos de 95 °C por 10 seg, 61 °C por 7 seg y 72 °C durante 10 min. La expresión relativa se determinó mediante la comparación de los genes de interés con el gen control (18S) normalizada mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7.14. Estudios en las líneas celulares HepG2 y AML12

Las líneas celulares empleadas fueron HepG2 (ECACC, derivadas de un hepatoblastoma humano) y AML12 (ATCC, hepatocitos normales de ratón), cultivadas en medio EMEM y DMEM, respectivamente, y suplementados con suero fetal bovino 10%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 1%, estreptomicina 100 mg/mL y penicilina 100 UI/mL a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Adicionalmente, para las células AML12 se utilizó un coctel de insulina-transferrina-

selenio (10µg/ml-5.5µg/ml-4ng/ml), dexametazona (40 ng/ml) y amortiguador HEPES (0.5 mM). Después tres pases para su adaptación, se cultivaron en medio normal, y luego de 72 horas las células se cultivaron con alta fructosa 10 y 25 mM con y sin NAM 10 mM por 72 horas más.

7.15. Prueba de citotoxicidad

El ensayo de metil-tiazolil-tetrazolium (MTT) se empleó para determinar el poder reductor intracelular (Stockert et al., 2012) en referencia a la actividad metabólica. El fundamento del método se basa en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas para reducir el MTT de color amarillo, en un producto de color azul violáceo (formazan) que absorbe a 540 nm de longitud de onda. La capacidad de las células para reducir el MTT es indicativo de integridad y actividad mitocondrial, por lo que, los resultados pueden ser interpretados como una medida de viabilidad y/o número de células.

7.16. Ensayos de Osmolaridad

Se determinó la osmolaridad en los medios, teniendo en cuenta que pudiera influir sobre el cultivo celular y ser un factor que alterará las pruebas. El ensayo se realizó en el equipo Vapro Wescor 5520, para ello se utilizó una alícuota de 10 µL por medio previamente preparado, siguiendo las condiciones e instrucciones establecidas.

7.17. Preparación de muestras con ambas líneas celulares

Una vez concluidos los diferentes tratamientos en los diferentes lapsos de tiempo, las células se levantaron con tripsina-EDTA 0.25% (Thermo-Fisher), durante 3 minutos, se colocaron en un tubo eppendorf de 50 ml. Posteriormente, se lavaron

con PBS, se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 minutos, y luego se fraccionaron en partes iguales para los ensayos de cuantificación de proteínas, inmunodetección en papel, ensayos de PCR y ensayos de actividad. Cabe mencionar que además de recolectar las células para las diferentes determinaciones se colectaron medios de cultivo que estuvieron en contacto con las células (medio condicionado), para saber si existía la posibilidad de que enzima citosólica saliera fuera de las células y poder determinar actividad extracelular. Finalmente, los análisis de actividad, expresión y proteínas se determinaron de la misma forma antes descrita.

7.18. Análisis de Docking Molecular

En este estudio se utilizaron BChE humana (PDBID: 6AQB) y AChE (PDBID: 4M0E). Se agregaron átomos de hidrógeno a ambas estructuras utilizando el servidor CHARMM-GUI (Jo S et al., 2008), y la energía se minimizó con 100 pasos de descenso más pronunciado con CHARMM versión 44b1 disponible gratuitamente (Brooks et al, 2983, Brooks et al, 2009), utilizando parámetros CHARMM36 (Best et al., 2012). Las estructuras de ACh y NAM se obtuvieron de la base de datos PubChem, y el mejor conformador para ambas estructuras se obtuvo usando MarvinSketch versión 19.20 (ChemAxon, Marvin, 2019). Se realizaron mil experimentos de acoplamiento independientes para ambas proteínas utilizando AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010). Se centró una cuadrícula de 15 Å³ en el centro de masa de cada sitio de unión (AChE: S203, E334, H447. BChE: S198, E325, H438). Los valores de RMSD se calcularon utilizando scripts internos. Solo se presentan los resultados del grupo más poblado (RMSD <2 Å). Las imágenes se obtuvieron utilizando VMD (Humphrey et al., 1996) y Maestro (Schödinger, 2019).

7.19. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar. Las comparaciones entre los grupos se realizaron por ANOVA y las pruebas pos hoc mediante la prueba de Tukey-Kramer considerando un valor significativo $p < 0.05$. Se utilizó el software SPSS Statistics IBM 21 para los análisis de normalidad y pruebas estadísticas, también se utilizó GraphPad Prism 6 para comprobar análisis y el diseño de gráficos.

8. RESULTADOS

MODELO *IN VIVO*

8.1. Fructosa induce síndrome metabólico alterando los parámetros bioquímicos y antropométricos considerados por la ATPIII.

Las calorías aportadas por el consumo frecuente de fructosa equivalen a un 45% más de lo que consumen los animales del grupo control (Figura 2), éste aporte extra de calorías son suficientes para inducir el SM confirmado por el aumento en el peso corporal de los animales, el contenido en triacilgliceroles (TG), la insulina y la presión arterial, junto con una disminución en la concentración de HDL (Tabla 5).

Las calorías extras se reflejaron en la ganancia en peso corporal (10 %) a partir de la 6ª semana finalizando con un aumento en 20% el grupo SM en comparación al grupo control. Asimismo, se encontraron los porcentajes más altos en TG (20 %), ácidos grasos libres (FFA) (7 %), presión sistólica (15 %) y diastólica (18 %), paralelo con porcentajes bajos (30 %) en la concentración de HDL al comparar con el grupo control. El suplemento de la NAM 10 y 15 mM aminora totalmente los marcadores para SM, con porcentajes menores para los TG (10 %) y los FFA (~10 %) con aumento (30 %) en la concentración de HDL. Con respecto a la presión arterial NAM a las 3 dosis disminuye presión sistólica (~15 %) y diastólica (~15 %); efecto benéfico cuando se compara con el grupo SM.

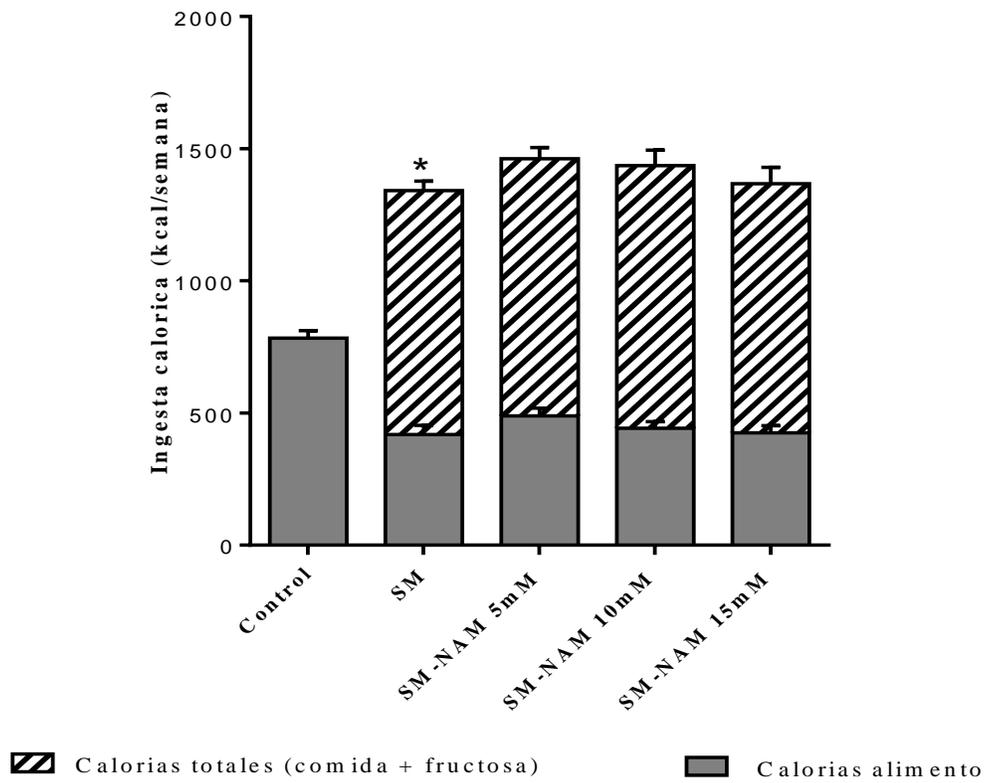


Figura 2. Ingesta calórica representada en kilocalorías consumidas por semana en los diferentes grupos. Los valores representan la media \pm error estándar, la comparación entre grupos se realizó por el análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar las diferencias significativas entre grupos con una $*p < 0.05$ con respecto al control.

Tabla 5. Efecto de NAM sobre los factores de riesgo para SM en rata

	Control	SM	SM-NAM5	SM-NAM10	SM-NAM15
Ganancia de peso (g)	242.7±15	307.3±4*	274.3±6**	275±12**	247.5±13**
CT (mg/dL)	114.3±6.4	101.2±1.1	100.0±1.0	102.5±2.1	105.0±7
TG (mg/dL)	148.6±2.4	184.0±3.6*	177.5±2.4**	165.0±1.0**	164.5±3.5**
HDL (mg/dL)	43.0±1.4	28.0±2.8*	29.0±2.8	35.0±1.4**	35.5±3.5**
VLDL (mg/dL)	29.7±0.5	36.8±0.7*	21.5±0.5**	33±0.2**	32.9±0.7**
AGL (nmol/μL)	4.24±0.96	4.54±0.21*	4.01±0.78**	3.88±0.95**	4.30±0.89**
Presión Sistólica (mmHg)	136.5±9.1	160.3±5.6*	124.7±10.4**	140.7±4.1**	143.2±4.2**
Presión Diastólica (mmHg)	99.5±13	121.6±5.0*	93.2±6.9**	102.2±9.3**	108.7±6.9**

Valores expresados como la media ± error estándar de 6 animales por grupo, utilizando el análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas. *p<0.05, con respecto al grupo control, **p<0.05 con respecto al grupo SM. CT (colesterol total), TG (triacilglicérols), HDL (lipoproteínas de alta densidad), VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), AGL (ácidos grasos libres).

8.2. La nicotinamida regula la absorción de glucosa circulante determinado por: la prueba de tolerancia a la glucosa, los niveles de insulina y el índice HOMA-IR

El grupo SM mostró un mal manejo de la glucosa sanguínea durante la prueba de tolerancia a la glucosa, aunque a los treinta minutos no obtuvo el valor más alto, desde ese tiempo se mantuvieron elevadas hasta el final de la prueba, terminando con un aumento del 68 % respecto a la grupo de control (Figura 3A). Por otro lado, la NAM a las tres dosis diferentes ajustó los valores de glucosa circulante adecuadamente durante la prueba, terminando con valores similares al control. Además al observar el área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa se confirmó el aumento de los valores en el grupo SM, aproximadamente un 43 % con respecto al control, el tratamiento con NAM disminuyó un 30 % los valores totales, asemejándose al grupo control (Figura 3B). Podemos observar que la dosis de 10 mM de NAM fue estadísticamente significativa.

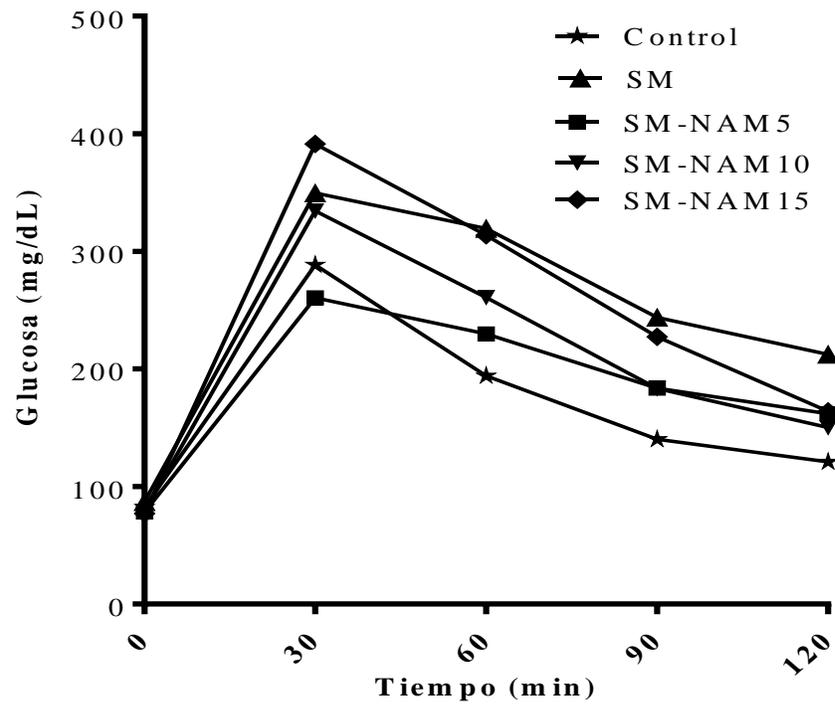
Los valores de insulina en el grupo SM aumentaron en un 62 % con respecto al grupo control. NAM disminuyó los valores principalmente a la concentración de 5 y 10 mM de NAM (40 %) (Figura 3C). Este efecto fue similar al realizar el cálculo del índice HOMA-IR, cuyo incremento fue del 65 % del grupo SM con respecto al control, y una disminución del 50, 40 y 25 % con las concentraciones de 5, 10 y 15 mM de NAM respectivamente (Figura 3D).

8.3. La NAM restablece GSH y PON1 al disminuir AGL, TBARS y TNF- α

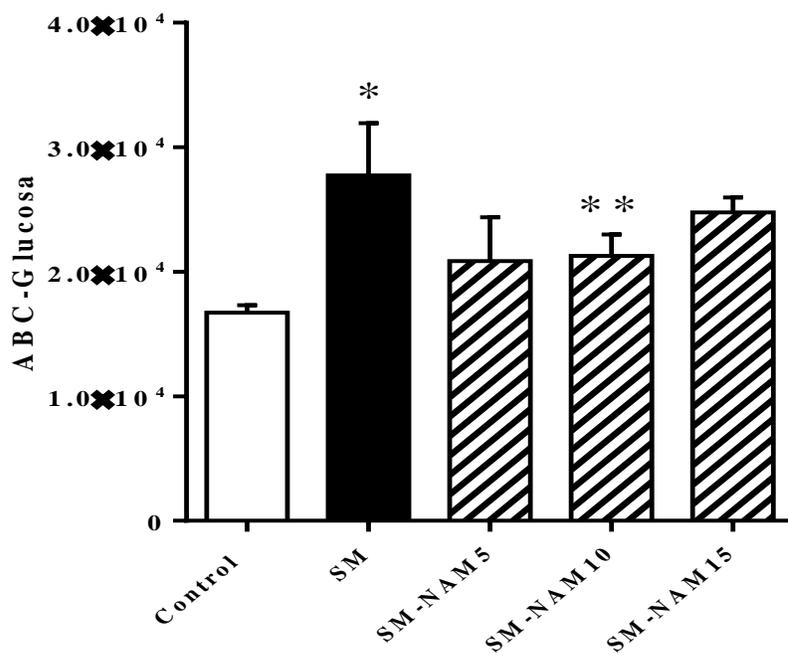
Las alteraciones metabólicas y hemodinámicas son características del SM, inducen lipoperoxidación y reacción inflamatoria de bajo grado, observada así por los altos porcentajes séricos de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (144 %) y TNF- α (100 %) en discrepancia con la disminución de IL-6 (20 %), así como la actividad de PON1 (27 %) del grupo SM en comparación con el control. Además, aunque GSH no mostró cambios significativos en el suero en ninguno de los grupos, a nivel hepático, GSH disminuyó (13 %) junto con un aumento de GSSG (225 %), TBARS (58 %) y AGL (226 %), todos en comparación con el grupo de control.

El tratamiento con NAM a las concentraciones empleadas disminuyó significativamente la presencia del TNF- α siendo más acentuado a la concentración de 15 mM de NAM (29 %). La IL-6 mostró un efecto opuesto al TNF- α , aumentando notablemente (35 %) con 15 mM de NAM. Además, TBARS disminuyó significativamente (140 %) con NAM 5 y 10 mM de NAM. Estas disminuciones de marcadores inflamatorios y oxidantes se reflejaron en el aumento en la actividad de PON1 (~ 30%) con NAM 10 y 15 mM. A nivel hepático, NAM recuperó GSH con valores cercanos al control y GSSG disminuyó (~ 68 %) con valores cercanos al control con NAM 10 y 15 mM. Además, los AGL disminuyeron un 55 % con las concentraciones de 10 y 15 mM de NAM (Tabla 6).

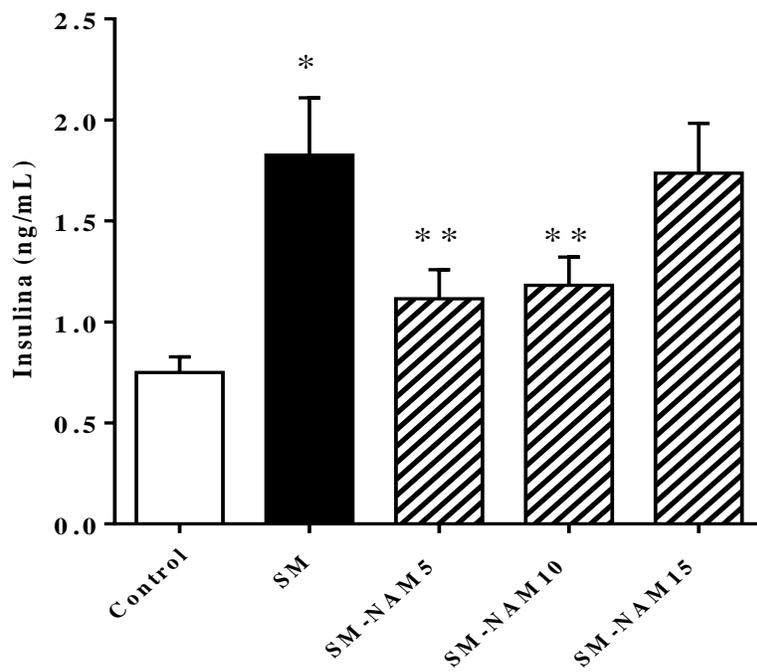
A)



B)



C)



D)

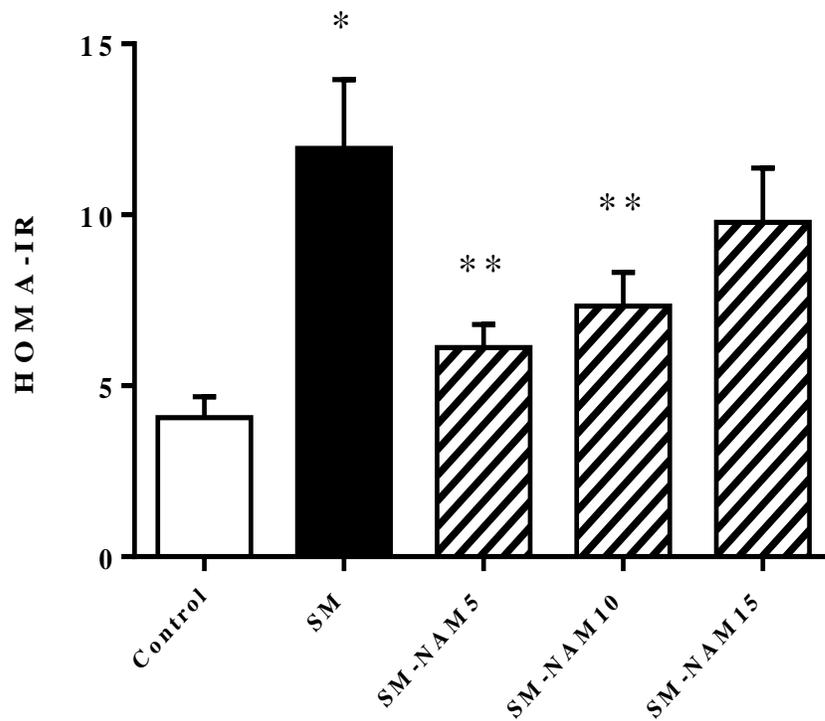


Figura 3. Efecto de NAM sobre la tolerancia a la glucosa, insulina e índice HOMA-IR en un modelo de rata de SM. (A) Resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa oral incluida, la concentración de glucosa basal (después de un ayuno de 6 h) y las concentraciones de glucosa poscarga a los 30, 60, 90 y 120 min. (B) Área bajo la curva para la prueba de tolerancia oral a la glucosa (ABC-glucosa). (C) Concentración de insulina sérica y (D) índice HOMA-IR. Los valores se expresan como la media \pm error estandar de 6 animales por grupo. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas * $p < 0.05$, con respecto al grupo control, ** $p < 0.05$, con respecto al grupo SM.

Tabla 6. Efecto de NAM sobre marcadores de inflamación y estrés oxidante en SM en ratas

	Control	SM	SM-NAM5	SM-NAM10	SM-NAM15
Suero					
TNF-α (pg/mL)	7 \pm 1.67	14 \pm 2.99*	11 \pm 2.18**	11 \pm 2.66**	10 \pm 2.66**
IL-6 (pg/mL)	35 \pm 1.50	28 \pm 2.18*	34 \pm 3.15**	34 \pm 2.12**	38 \pm 6.54**
PON1 (mU/mg)	14.14 \pm 1.43	10.29 \pm 0.52*	9.29 \pm 1.37	13.13 \pm 1.06**	13.61 \pm 0.29**
GSH (μ M)	80.34 \pm 17.26	85.03 \pm 7.38	71.27 \pm 7.19	98.33 \pm 10.02	76.16 \pm 2.62
TBARS (nM)	0.38 \pm 0.07	0.93 \pm 0.08*	0.32 \pm 0.02**	0.35 \pm 0.11**	0.78 \pm 0.22
Hígado					
GSH (μ M)	177.5 \pm 3.82	153.8 \pm 2.85*	172.1 \pm 5.17**	174.8 \pm 6.76**	174.4 \pm 1.42**
GSSG (μ M)	6.30 \pm 2.63	20.52 \pm 4.17*	11.96 \pm 2.33**	6.97 \pm 1.60**	6.14 \pm 1.79**
TBARS (nM)	9.40 \pm 0.76	14.83 \pm 0.15*	10.85 \pm 0.64**	8.09 \pm 0.24**	10.65 \pm 1.29**
AGL (nmol/ μ L)	3.78 \pm 1.08	12.34 \pm 2.43*	6.56 \pm 2.04**	5.26 \pm 1.77**	8.84 \pm 2.27

Valores expresados como la media \pm error estándar de 6 animales por grupo. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas * p <0.05 con respecto al grupo control. ** p <0.05 con respecto al grupo SM. TNF α (factor de necrosis tumoral alpha), IL-6 (interleucina 6), PON1 (paraoxonasa-1), GSH (glutación reducido), TBARS (sustancia reactiva al ácido tio-barbiturico), GSSG (glutación oxidado), AGL (ácidos grasos libres).

8.4. NAM reduce las actividades y expresión de transcritos de BChE y AChE en hígado, así como sus actividades en suero

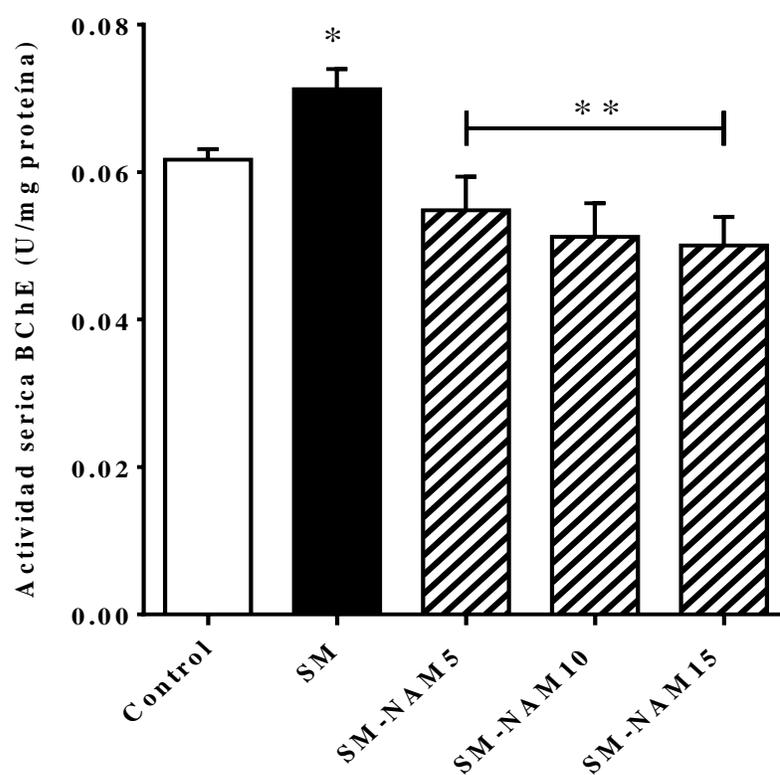
El grupo SM mostró una mayor actividad sérica en BChE y AChE con un aumento del 14 % y ~ 10 %, respectivamente en comparación con el grupo de control (Figura 4A y 4B). El tratamiento con NAM a diferentes concentraciones regula la actividad de ambas colinesterasas con valores similares al grupo control, con un comportamiento dosis-dependiente (Figura 4A y 4B).

En el hígado, el grupo SM también tuvo un aumento en la actividad de ambas colinesterasas; 40 % para BChE y 90 % para AChE en comparación con el grupo control. El tratamiento con NAM también disminuyó la actividad de ambas enzimas; las diferencias significativas se observan en la concentración de 5 y 10 mM. En el caso de BChE, NAM 5 mM disminuyó 13 % y NAM 10 mM 22 % y para AChE; La NAM 10 mM disminuyó su actividad en un 28% en comparación con el grupo SM. En el hígado, la NAM 15 mM no mostró ningún efecto sobre la actividad de ambas enzimas (Figura 5E y 5F).

La expresión de BChE en el grupo SM se vio favorecida 2,5 veces en comparación con el control. La expresión de AChE 1,5 veces más que el control. Cabe mencionar que la expresión de transcritos; AChE-H, AChE-R y AChE-T tuvieron un comportamiento similar. Por lo que, se decidió reportar solo la transcripción general de AChE, siendo la más representativa. Los diferentes tratamientos de NAM regularon la expresión de ambas enzimas, en el caso de BChE la concentración de 5 mM se redujo 50% en comparación con el grupo SM, la concentración de 10 y 15 mM la disminución fue de aproximadamente 75%. Para AChE, la disminución de la expresión fue

significativa en la concentración de 10 y 15 mM con un 50% menos que en el grupo SM (Figura 5C y 5D). No se observaron diferencias en la cantidad de proteína (Figura 5A y 5B).

A)



B)

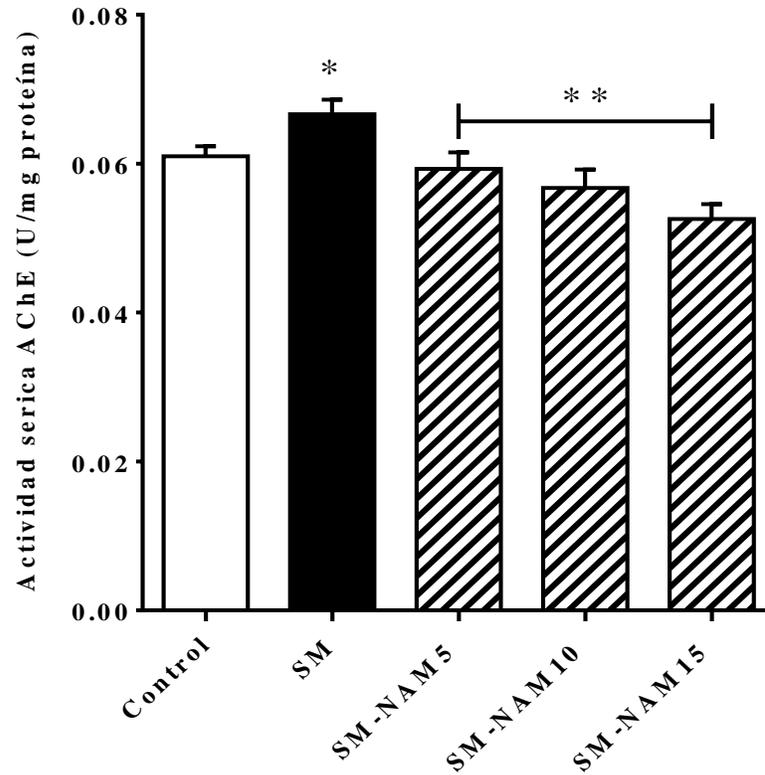
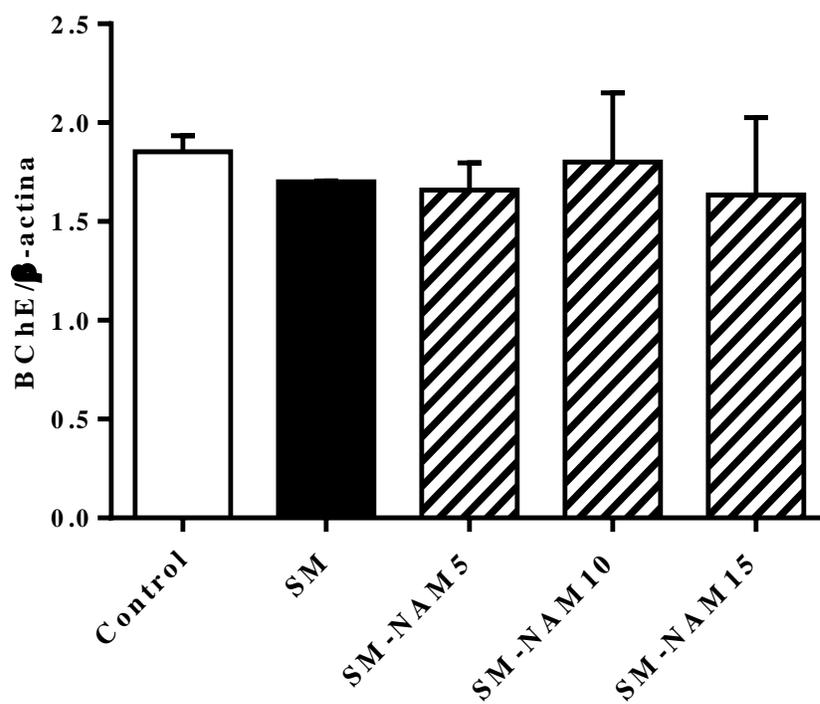
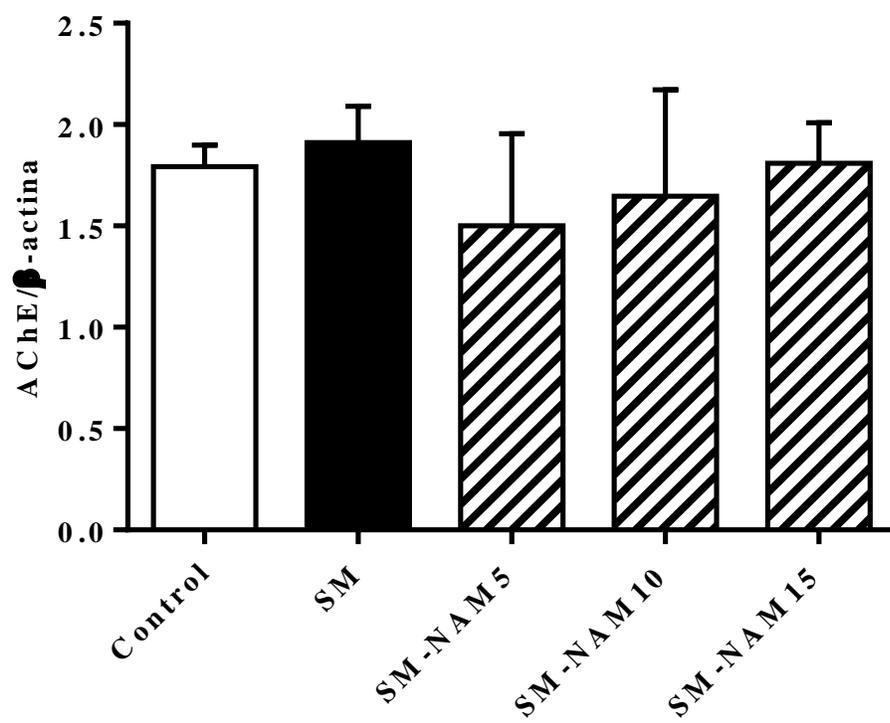


Figura 4. Efecto del tratamiento de NAM sobre la actividad de BChE y AChE séricas en ratas con SM. Las actividades de BChE (A) y AChE (B). Los valores se expresan como la media \pm error estándar de 6 animales por grupo. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas * $p < 0,05$, con respecto al grupo de control, ** $p < 0,05$, con respecto al grupo SM.

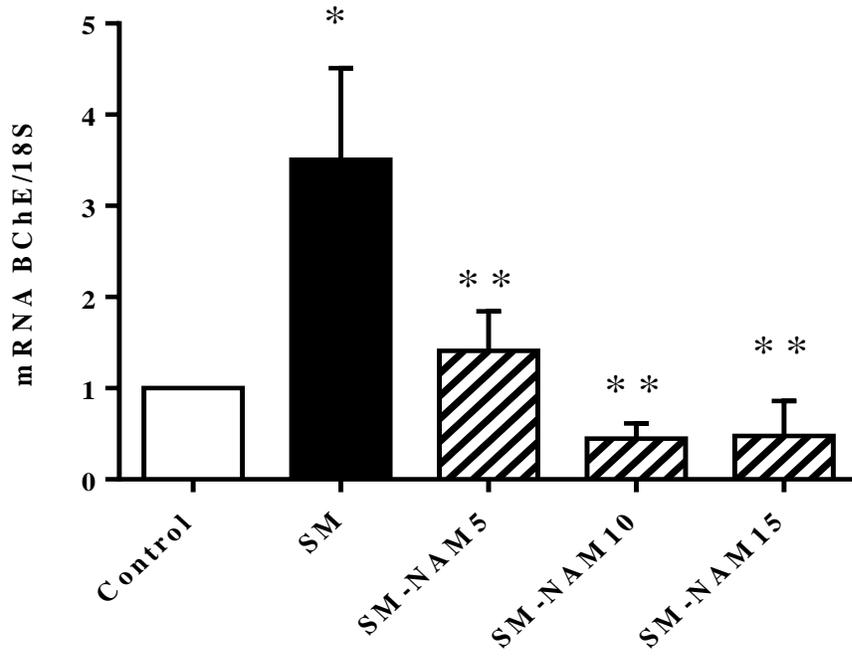
A)



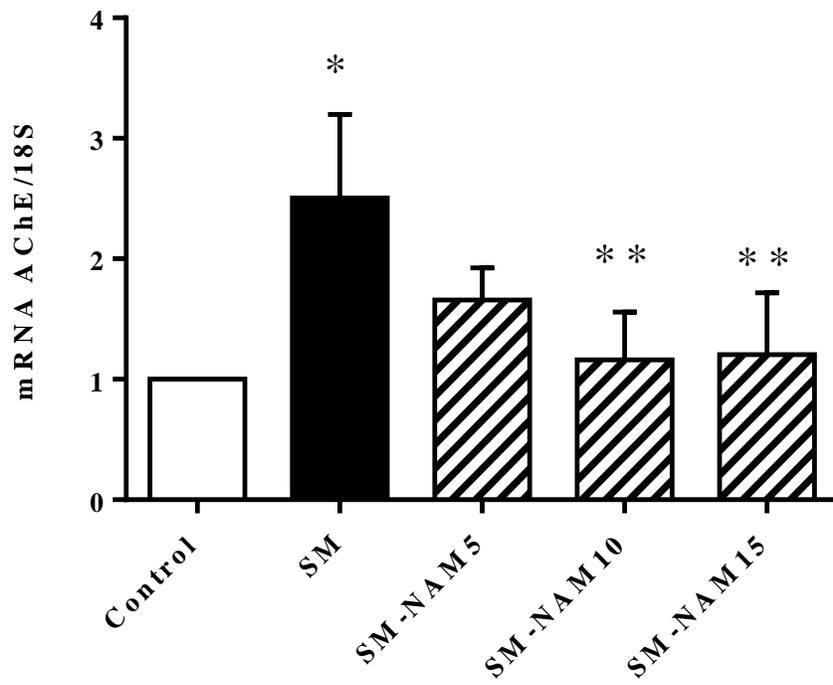
B)



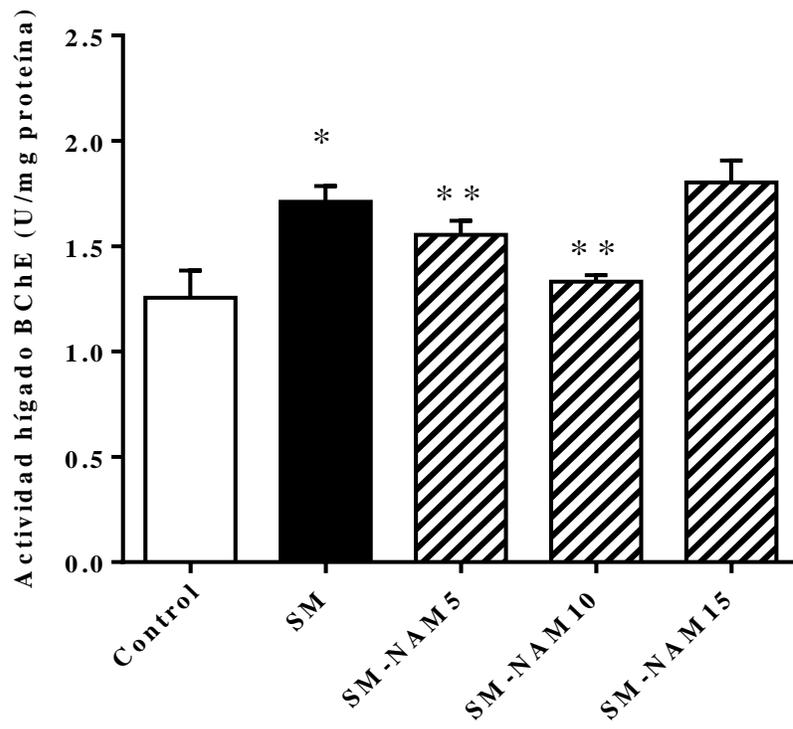
C)



D)



E)



F)

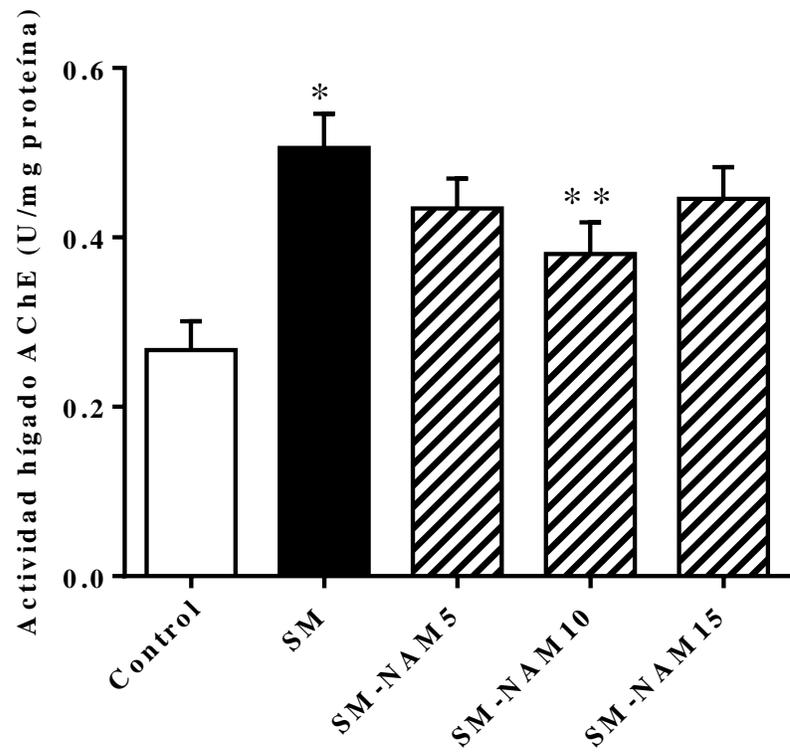


Figura 5. El efecto en ratas con SM del tratamiento de NAM sobre los niveles, expresión y actividad hepática de BChE y AChE. (A) Niveles, (C) expresión y (E) actividad de BChE. (B) Niveles, (D) expresión y (F) actividad de AChE. Los valores se expresan como la media \pm error estándar de 6 animales por grupo. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas * $p < 0.05$, con respecto al grupo control, ** $p < 0.05$, con respecto al grupo SM.

MODELO *IN VITRO*

8.5. NAM regula el crecimiento en células HepG2 tratadas con fructosa

El crecimiento de las células de la línea HepG2 se vió favorecido en condiciones de alta fructosa (25 y 50 mM) a partir de las 48 horas de tratamiento (10 y 15 %, respectivamente, diferencia no estadísticamente significativa), en comparación con el grupo control. En contraste el suplemento de NAM a 10 y 15 mM disminuyó la proliferación celular a partir de las 48 horas, siendo más marcado a las 72 y 96 horas (35 y 40 %, respectivamente), en comparación con el control (Figura 6).

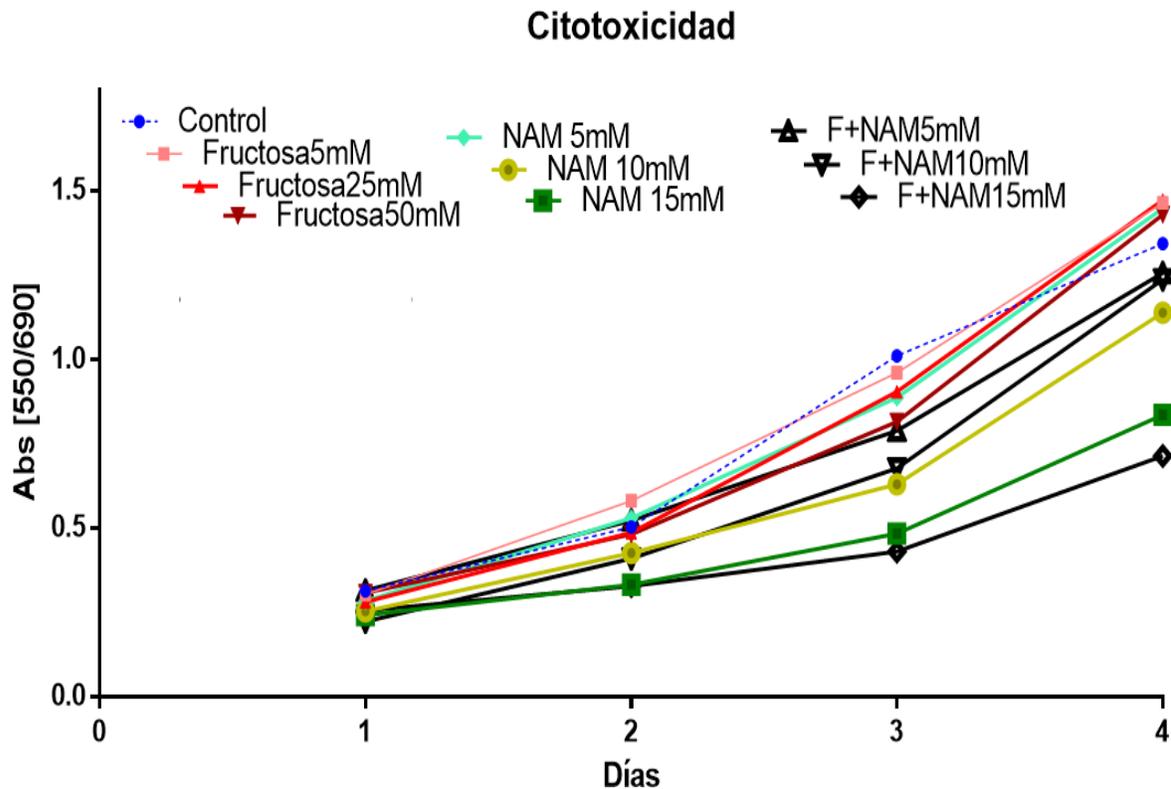


Figura 6. Curva de crecimiento desarrollada por la técnica de MTT, células cultivadas en condiciones de alta fructosa, con suplemento de NAM y fructosa con NAM a diferentes concentraciones. El análisis se observó a través de cuatro días consecutivos post tratamientos. Los valores son presentados como la media de 8 experimentos por grupo.

8.6. Efecto de NAM sobre las actividades AChE y BChE en células HepG2

tratadas con alta fructosa

La actividad de AChE en los lisados del modelo *in vitro* en células HepG2 se vio ligeramente aumentada (sin embargo no existe diferencia significativa), por acción del tratamiento con fructosa, principalmente la concentración de 25 mM, en comparación al grupo control. Por otro lado, el tratamiento de NAM 10 mM por sí sola, así como la mezcla de fructosa (10 y 25 mM) y NAM disminuyó la actividad de AChE (Figura 7).

Sin embargo, estas diferencias no logran significancia estadística debido a la dispersión de los datos.

Cabe mencionar, que a diferencia de lo observado en el hígado testigo, las células HepG2 mostraron una actividad AChE más elevada que BChE. En este contexto la actividad BChE no mostró diferencias con los diferentes tratamientos (Figura 7).

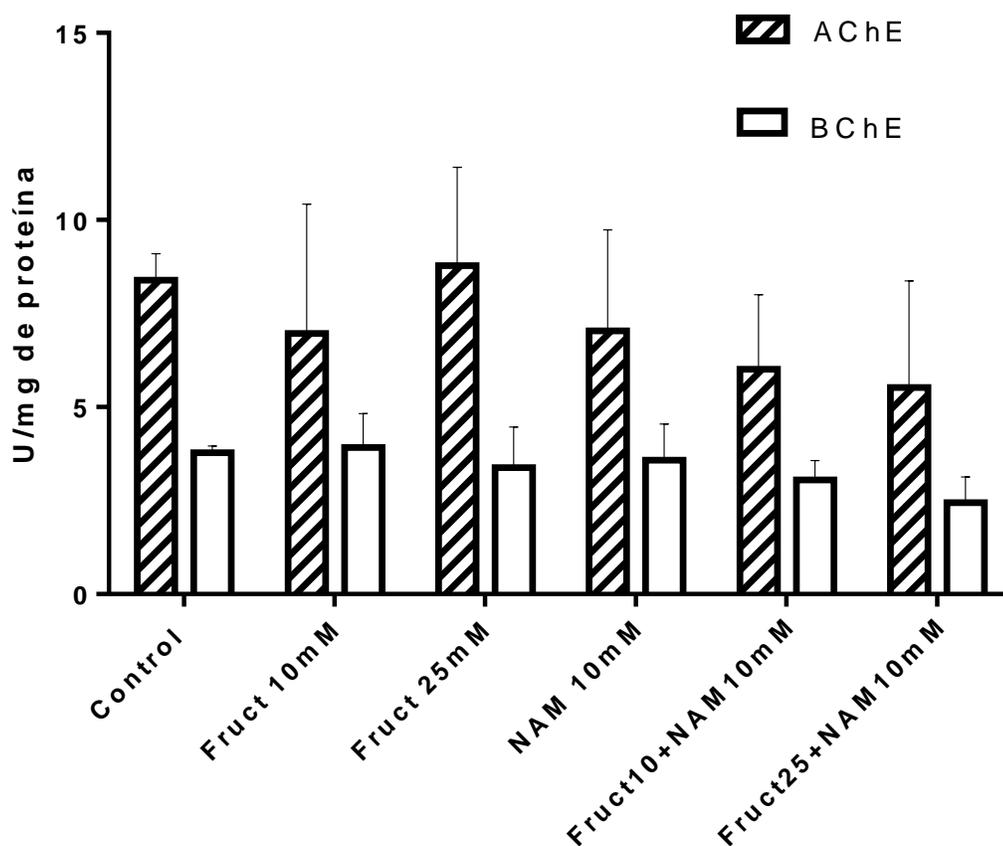


Figura 7. Actividad de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE) en células HepG2 lisadas. Los valores representan la media \pm error estándar de 8 experimentos independientes por grupo.

8.7. Efecto de NAM sobre las actividades AChE y BChE en medio condicionado por células HepG2 tratadas con alta fructosa

Considerando que ambas colinesterasas pueden ser enzimas de secreción, se consideró determinar la actividad en los medios de cultivo con la intención de conocer si existe enzima activa secretada por las células HepG2.

Se observó que de manera opuesta a lo observado anteriormente, la actividad de ambas enzimas no se modificó con el suplemento de NAM 10 mM. Por otro lado, el tratamiento de fructosa disminuyó significativamente las actividades AChE y BChE (15 %), en el medio de cultivo de las células comparado con el grupo control (Figura 8).

De igual manera que la actividad en los lisados celulares, la actividad AChE fue 50 % mayor a la actividad BChE (Figura 8).

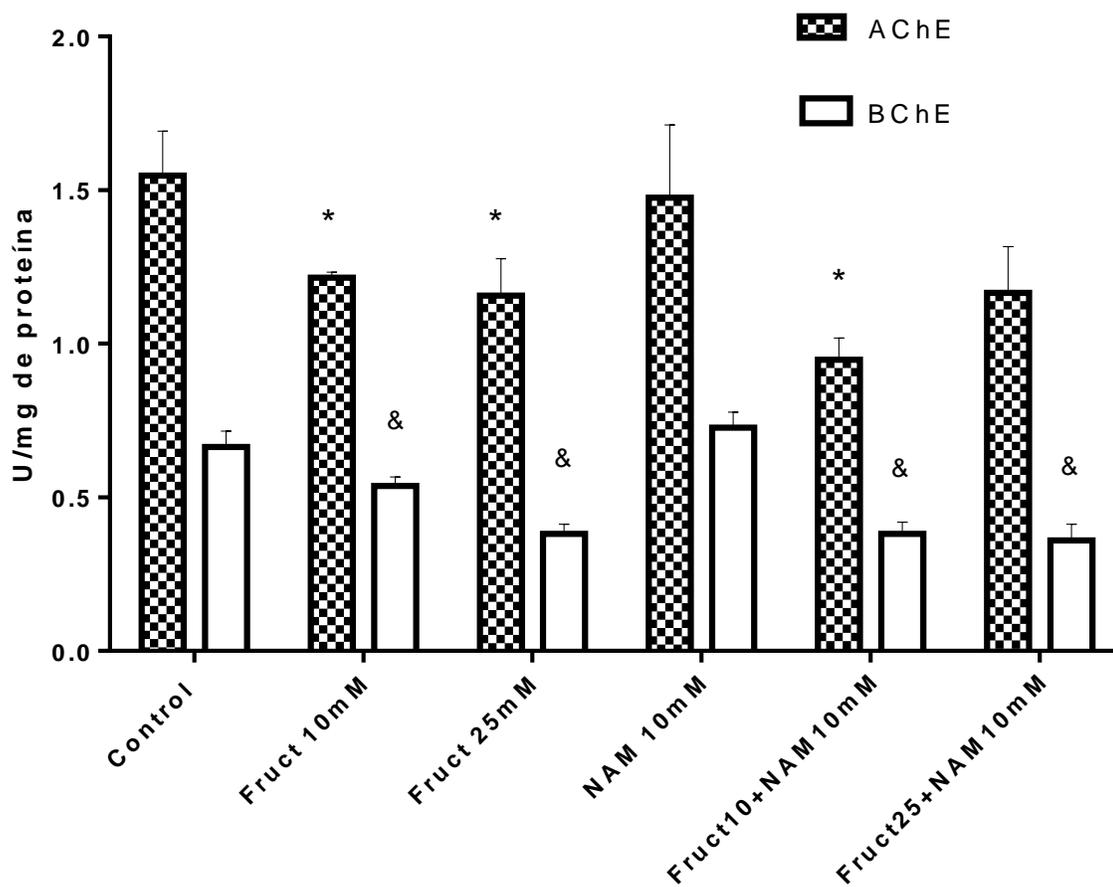


Figura 8. Actividad de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en medios de cultivo de células HepG2. Los valores representan la media \pm error estándar de 8 experimentos independientes por grupo. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas. * $p < 0.05$ actividad acetilcolinesterasa (AChE) en medios de cultivo vs grupo control. & $p < 0.05$ actividad butirilcolinesterasa (BChE) en medios de cultivo vs grupo control.

8.8. Efecto de NAM sobre la actividad AChE y BChE en la línea celular AML12 cultivadas con alta fructosa

Adicionalmente se realizaron ensayos con otra línea celular proveniente de hepatocitos normales de ratón (AML12), a diferencia de las células HepG2 que provienen de hepatocarcinoma. Para la línea AML12 la actividad AChE y BChE disminuyó alrededor del 20 % en condiciones de alta fructosa comparada al grupo control. Por otro lado, el suplemento de NAM sola y mezclada con fructosa restablece la actividad siendo similar al control (Figura 9).

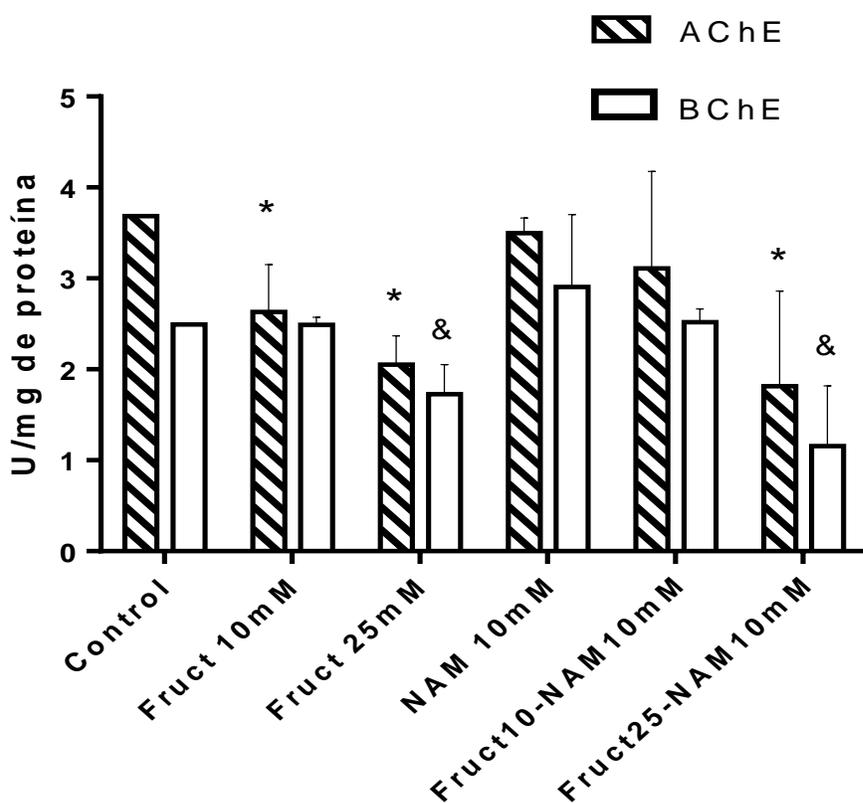


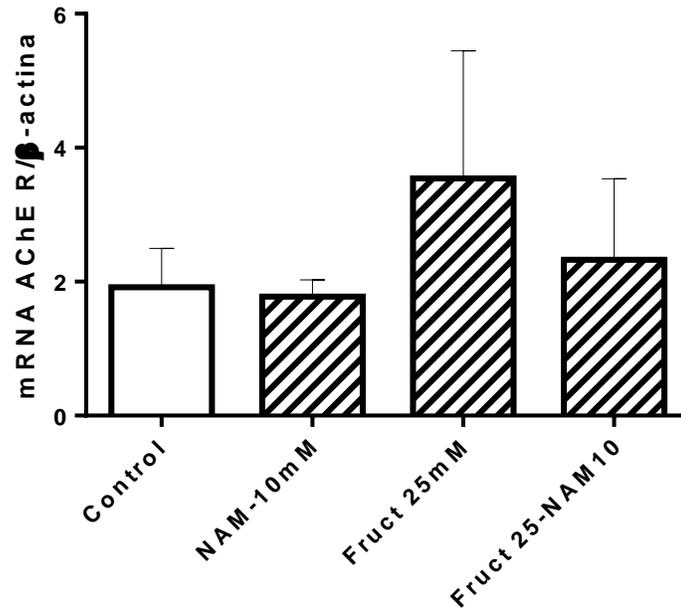
Figura 9. Actividad enzimática de AChE y BChE en lisados celulares de la línea AML12. Los valores representan la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes por grupo. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas. * $p < 0.05$ actividad acetilcolinesterasa (AChE) en medios de cultivo vs control. & $p < 0.05$ actividad butirilcolinesterasa (BChE) en medios de cultivo vs control.

8.9. Efecto de NAM sobre la expresión de los transcritos de AChE y el gen

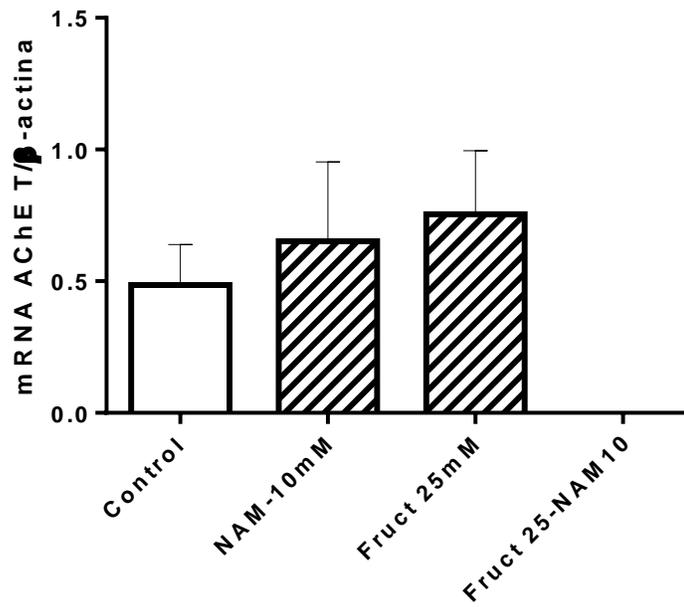
BChE en células HepG2 tratadas con alta fructosa

La expresión del gen AChE genera tres diferentes transcritos; R, T y H, cada uno a su vez generan diferentes isoformas proteicas con actividad catalítica. El cultivo de HepG2 con alta fructosa incrementa la expresión (30 %) del transcrito R con respecto al control (Figura 10A). En contraste, el suplemento de NAM disminuye 20 % la expresión, con valores cercanos al control. Fructosa no afectó al transcrito T aunque no es significativo (Figura 10B). El suplemento de NAM causó disminución en la expresión de los transcritos R y T, alcanzando valores similares al control (Figura 10A y 10B). Opuesto a lo esperado la expresión del transcrito H mostró una disminución (25%) por la alta fructosa (Figura 10C). NAM provocó disminución en el nivel del transcrito H observado con fructosa (Figura 10C). Sin embargo, cuando se mezclaron ambos suplementos (fructosa y NAM), la expresión del transcrito H se restableció con valores semejantes al control, este es un fenómeno totalmente opuesto a lo observado anteriormente con el modelo *in vivo*.

A)



B)



B)

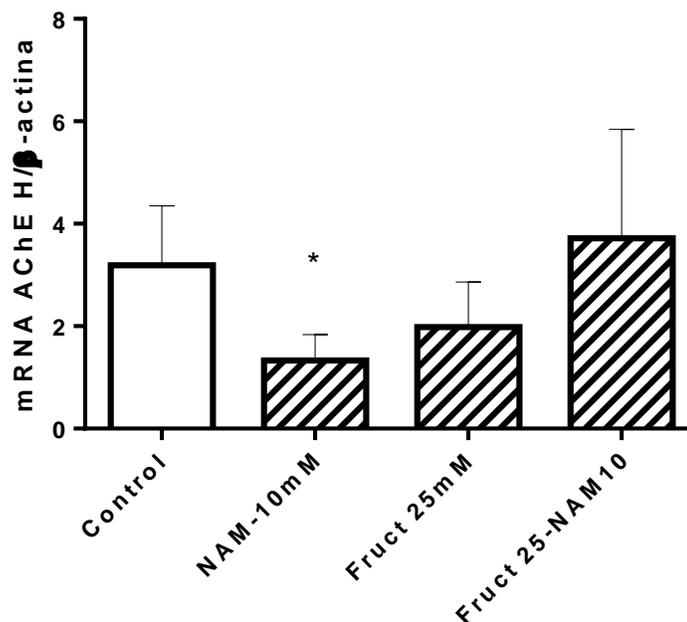


Figura 10. Expresión del transcrito tipo R (A), T (B) y H (C) de AChE expresado en células HepG2. Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes \pm error estándar del número de copias de cada transcrito por cada 10^6 copias de β -actina. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas. * $p < 0.05$ del grupo NAM vs control.

8.10. Efecto de NAM sobre la expresión de transcritos BChE en células HepG2 tratadas con fructosa

La expresión de transcritos BChE se abatió (90%) en las células HepG2 cultivadas con alta fructosa sola y en presencia de NAM en comparación con el grupo control. Este dato se confirmó aumentando el número de ensayos. Cabe destacar que la expresión de BChE así como su actividad en esta línea celular fue sumamente baja, poco perceptible (Figura 11).

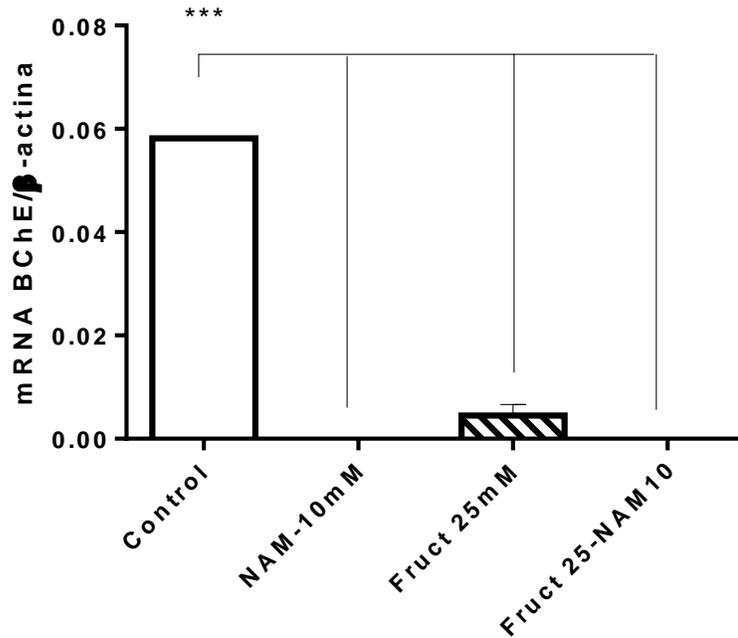


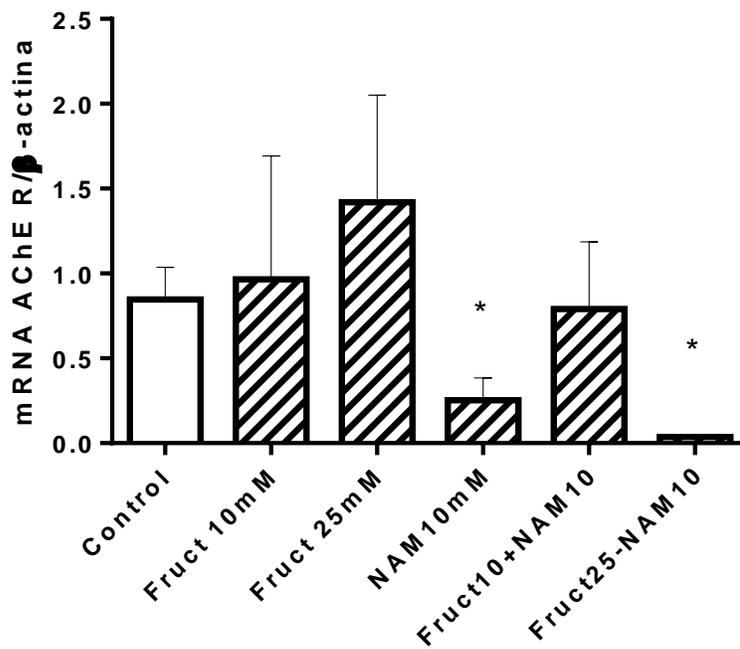
Figura 11. Expresión de transcritos BChE en lisados celulares de HepG2 tratadas con alta fructosa y NAM. Los resultados son expresados como la media \pm error estándar del número de copias de BChE por cada 10^6 copias de β -actina. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas. *** $p < 0.05$ de los grupos NAM, fructosa y ambos vs control.

8.11. Efecto de NAM sobre la expresión de AChE y BChE en las células AML12 tratada con alta fructosa

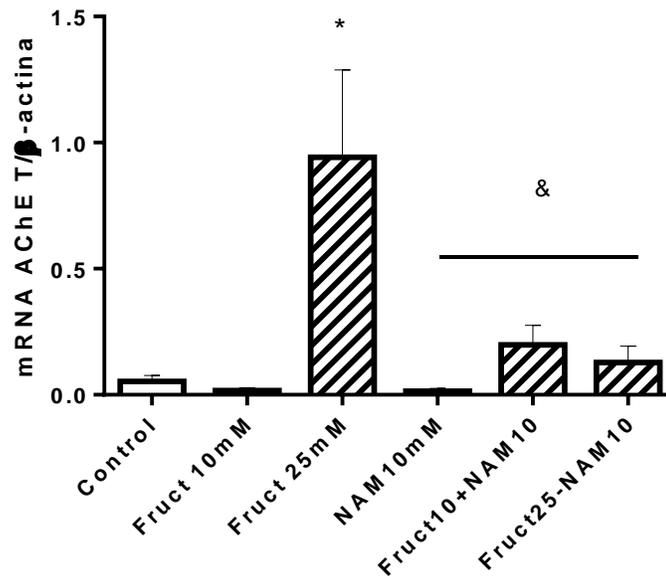
La expresión de ambas enzimas de la línea celular AML12 mostraron un comportamiento similar a lo observado en las células HepG2, los transcritos R y T aumentaron su expresión 40% y 90% respectivamente en los grupos tratados con fructosa con respecto al grupo control (Figura 12A y 12B). Por otra parte, la administración de NAM la expresión de ambos transcritos disminuyó (40 y 70 % aproximadamente), con valores similares al control. Un dato importante de las células AML12 es que no expresan transcrito H (dato no presentado gráficamente).

Finalmente, el transcrito BChE en células AML12 cultivadas con alta fructosa, no presentó cambios significativos en su expresión comparando con el control. Por otro lado, la presencia de NAM atenúo más aun su expresión entre un 15-30 % en comparación con el grupo control (figura 12C). Siendo significativo cuando se administran ambos suplementos a las células en comparación con el control.

A)



B)



C)

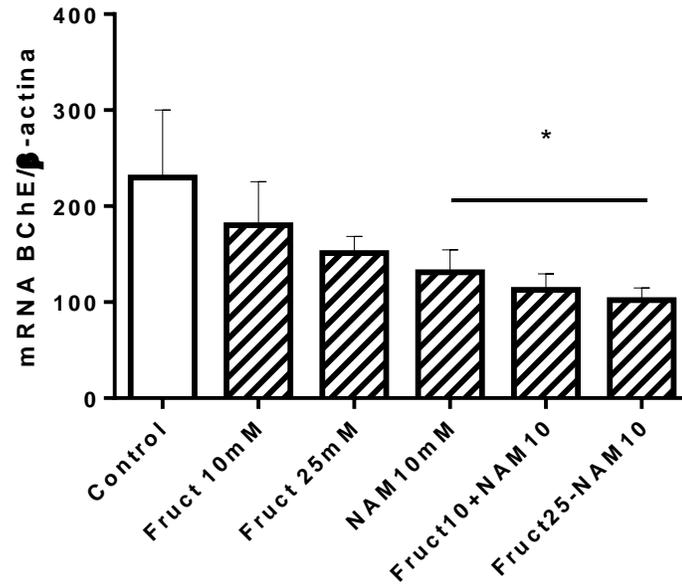


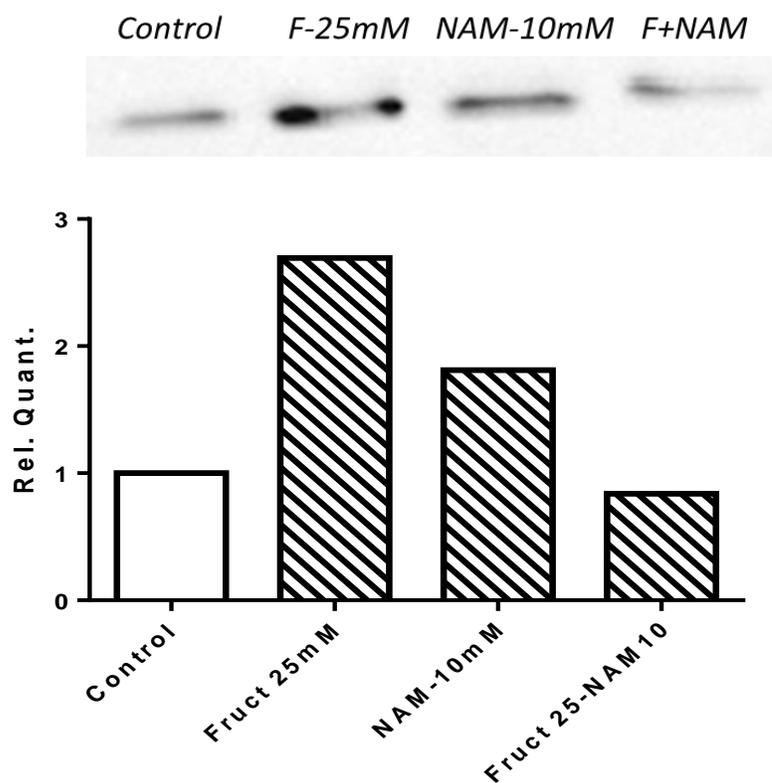
Figura 12. Efecto de la NAM en las células AML12 sobre la expresión de los transcritos R (A) y T (B) de AChE y BChE (C). Los valores representan la media de 3 experimentos independientes \pm error estándar, del número de copias de cada mensajero por cada 10^6 copias de β -actina. Análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas. A) $*p < 0.05$ grupos NAM, fructosa-NAM vs fructosa. B) $*p < 0.05$ fructosa vs control, $\&p < 0.05$ NAM, fructosa-NAM vs fructosa. C) $*p < 0.05$ NAM, fructosa-NAM vs fructosa.

8.12. Efecto de NAM sobre la cantidad de AChE y BChE en células HepG2

tratadas con alta fructosa

En células HepG2 cultivadas, la cantidad de proteína de AChE incrementó (100 %) con el estímulo de fructosa 25 mM en comparación con el control; el suplemento de fructosa adicionalmente con el tratamiento de NAM disminuyó la cantidad de proteína 30 % en comparación con el grupo suplementado con fructosa, este efecto también se observó en el grupo suplementado únicamente con NAM, teniendo una disminución de un 60 % (Figura 13A). El suplemento de fructosa en las células HepG2, también causó un aumento en la cantidad de proteína BChE, aunque en menor proporción (10 %) en comparación con el control; el suministro de NAM sola mantiene la cantidad de proteína similar al control (Figura 13B). Sin embargo, cuando se mezclan ambos tratamientos la cantidad de proteína disminuye considerablemente (30 %) en comparación con el grupo fructosa.

A)



B)

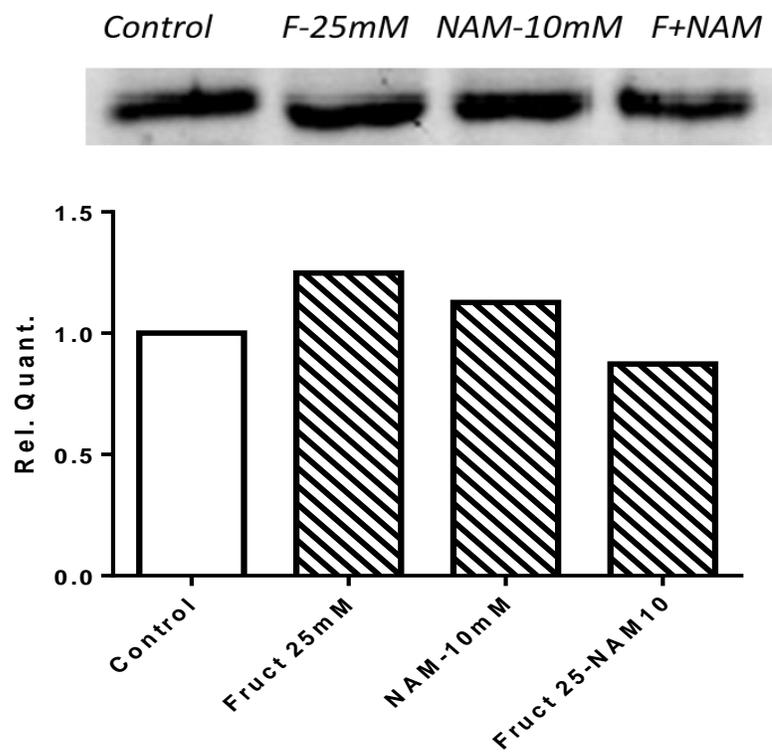
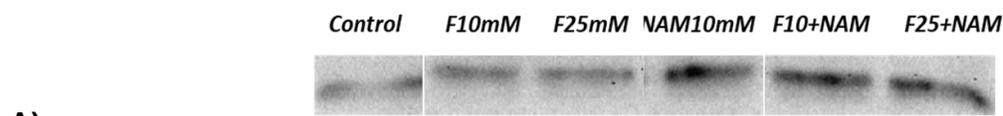


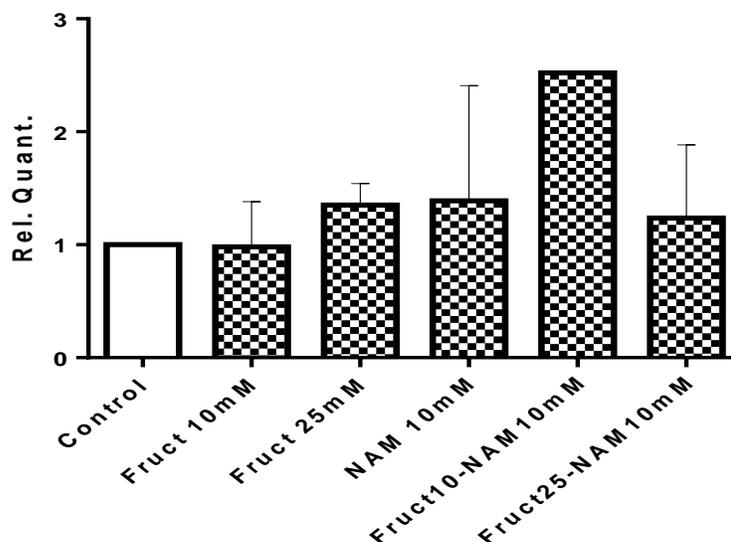
Figura 13. Relación cuantitativa en células HepG2, determinada por la emisión de luz que reflejan las bandas de cada inmunodetección en papel. A) AChE, B) BChE. Este experimento solo se realizó una vez por lo tanto no existen desviaciones estándar.

8.13. Efecto de NAM sobre la cantidad de AChE y BChE en células AML12 tratadas con alta fructosa

Para las células AML12, la cantidad de proteína AChE no mostró cambios importantes; ni con alta fructosa ni agregando el suplemento de NAM, los valores permanecieron similares al grupo control (Figura 14A). Por otro lado, la cantidad proteica de BChE disminuyó con NAM sola y en el grupo de fructosa suplementada además con NAM (40 y 30%) respectivamente con respecto al control (Figura 14B). Cabe destacar que estos experimentos se realizaron por duplicado, valdría la pena aumentar el número de casos por grupo para certificar nuestros resultados.



A)



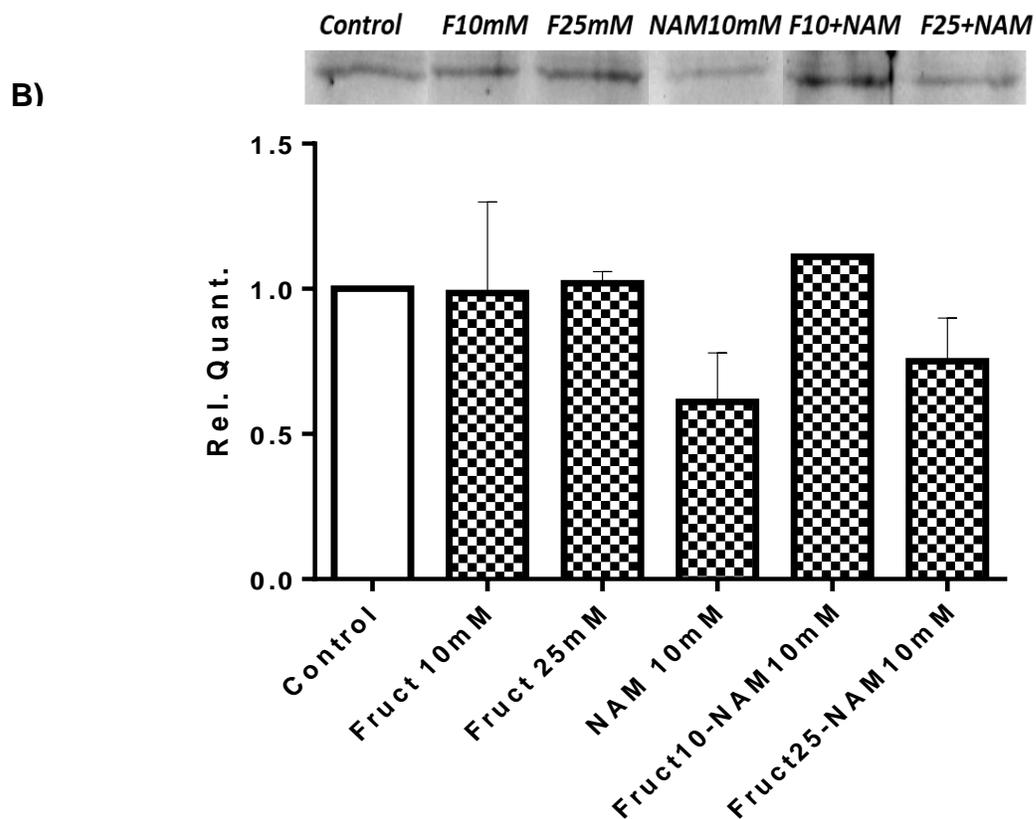


Figura 14. Relación cuantitativa en células AML12, determinada por la emisión de luz que reflejan las bandas inmunodetección en papel. A) acetilcolinesterasa (AChE), B) butirilcolinesterasa (BChE). Este experimento se realizó por duplicado a excepción de la muestra Fruct10+NAM10mM, los valores se presentan como la media \pm desviación estándar.

8.14. NAM interactúa con los sitios catalíticos BChE y AChE

Una de las grandes incógnitas sobre el mecanismo potencial del porque NAM modifica la actividad de ambas colinesterasas (de forma positiva o negativa), recae sobre la idea de que NAM pueda interactuar directamente con los sitios catalíticos de ambas enzimas.

Una estrategia para explorar este fenómeno fue utilizar una metodología *in silico* para conocer la afinidad de unión entre la molécula de NAM y los sitios catalíticos de las colinesterasas.

Para el desarrollo de la metodología se analizó el acoplamiento de la nicotinamida y el sustrato natural de las enzimas; ACh. Se observó que el acoplamiento molecular de la ACh y la NAM a la estructura de AChE y BChE, los resultados de acoplamiento se presentan en la Tabla 7. La NAM tuvo una energía de afinidad más fuerte para ambas proteínas. Los mapas de interacción mostraron que NAM hizo interacciones π - π con triptófano-86 (W86) y tirosina-337 (Y337) en AChE y triptófano-231 (W231) y fenilalanina-329 (F329) para BChE. Por otro lado, la ACh es una molécula más grande que la NAM, que mostró un mayor número de interacciones con ambas proteínas (22 para con AChE y 23 para con BChE), a diferencia de NAM que solo tuvo 16 con AChE y 15 con BChE. Sin embargo, esas interacciones parecen ser más débiles con ACh que con NAM, lo que explica su menor energía de afinidad. La figura 15 muestra las posiciones de los ligandos en ambas enzimas y sus correspondientes mapas de interacción.

Tabla 7. Energías de afinidad entre ambas enzimas con ACh y NAM como sustratos.

Energías de afinidad (kcal/mol)		
	ACh	NAM
BChE	-4.69 ± 0.03	-5.00 ± 0.00
AChE	-4.79 ± 0.04	-5.75 ± 0.09

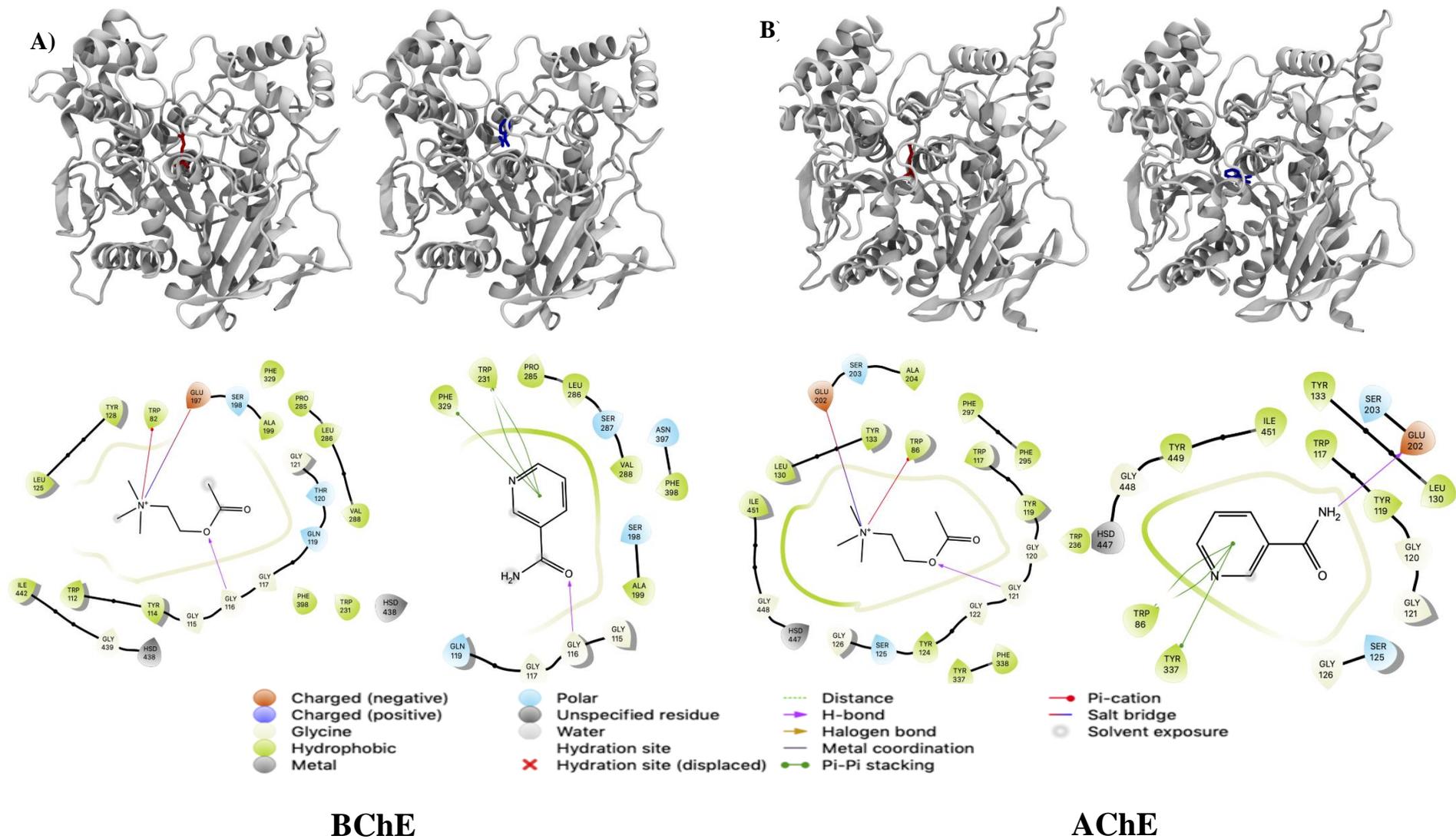


Figura 15. Análisis *In Silico* de los sitios de interacción de la acetilcolina y la nicotinamida con la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, respectivamente. (A) BChE y (B) AChE. Las proteínas se muestran mediante dibujos animados y los ligandos se muestran como barras (ACh, rojo; NAM, azul). Las interacciones proteína-ligando se muestran en la parte inferior de las imágenes. Como era de esperar, las interacciones proteína-ligando son principalmente hidrófobas. Las interacciones cargadas o polares con AChE ocurren a través de glutamato-202 (E-202), serina-203 (S-203) y serina-125 (S-125). La interacción cargada o polar con BChE ocurre a través de glutamina-119 (Q-119), treonina-120 (T-120), glutamato-197 (E-197), serina-198 (S-198), serina-287 (S-287) y asparagina-397 (N-397).

9. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo mostraron que el consumo excesivo de fructosa desencadena alteraciones bioquímicas, antropométricas y hemodinámicas propias del SM, y el aumento de la actividad de BChE y AChE sérica y hepática en el modelo *in vivo*, así como alteraciones en el modelo *in vitro*. Además se demostró que el tratamiento con NAM previene o aminora los cambios inducidos por el SM experimental. Con base en estudios de los modelos de acoplamiento molecular, se sugirió que NAM interactúa directamente con la colinesterasas causando probablemente una inhibición en su actividad; debido a que interactúa con su sitio activo y con mayor afinidad que sus propios sustratos.

Varias características del SM, como el aumento de peso corporal y el aumento de TG, AGL y presión arterial, se desarrollaron en el modelo experimental de SM utilizado, de acuerdo con estudios previos (Dupas et al., 2017, Lírio et al., 2016, Maithili et al., 2014, Mahmoud & Elshazly, 2014).

El aumento en el peso corporal en el grupo de SM fue el primer eslabón de una cadena de alteraciones metabólicas, que pueden explicarse en parte, por los efectos conjuntos de la lipogénesis *de novo* y la adipogénesis. La lipogénesis *de novo* inducida por fructosa deriva en la activación de proteínas que se unen a los elementos de respuesta de esteroides y carbohidratos (SREBP-1c y ChREBP, respectivamente), que a su vez induce enzimas lipogénicas, lo que conduce a la producción de ácido palmítico (Ter Horst & Serlie, 2017) y dislipidemia, lo que explica los aumentos observados en las concentraciones de TG, AGL, VLDL y una

disminución en la concentración de las HDL. Por otro lado, un aumento en las concentraciones de VLDL contribuye a la adipogénesis, debido a que su aumento se ha asociado con mayor expresión de la proteína adaptadora-2 y el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas y ambos marcadores de este proceso. Paralelamente, la fructosa activa la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la hexosa-6-fosfato deshidrogenasa, generando glucocorticoides activos, que inducen genes adipogénicos (Liu et al., 2018), lo que explica el aumento en el peso corporal observado en el grupo SM con respecto al grupo control.

Una disminución en la concentración de las HDL es el resultado de la síntesis de TG; A través de la lipogénesis, las HDL se transportan preferiblemente a la circulación en forma de VLDL, un efecto que se ha demostrado que aumenta con la transcripción de ApoCIII (una apoproteína que se une a VLDL) inducida por glucosa o fructosa, pero no por la transcripción de ApoB100 (una apoproteína que se une a HDL), en hepatocitos de rata y humanos por ChREBP (Steenenson et al., 2017).

A pesar de las condiciones normoglucémicas, se observaron alteraciones en la tolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y aumento en el índice HOMA-IR, lo que indicó resistencia a la insulina. La acumulación de diacilgliceroles derivados de un aumento de ácidos grasos activa la proteína quinasa Θ , que fosforila la Serina-101 (S-101) del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1), interrumpiendo la señalización de la insulina. Anteriormente, se señaló que los ácidos grasos estimulan la vía de la hexosamina, aumentando la producción de glucosamina-6-fosfato y activando indirectamente la glucógeno sintasa quinasa-3, que en

consecuencia fosforila la serina-332 (S-332) del IRS-1 y altera la señalización de la insulina (Tamer et al., 2019).

A través de estas primeras alteraciones, una serie de eventos pudieron conducir a la hipertensión por desencadenar cambios en la función endotelial, promoviendo la rigidez arterial. La resistencia a la insulina por el aumento de la liberación del receptor del péptido natriurético-C disminuye los péptidos vasodilatadores, lo que contribuye a la disfunción endotelial (Hernandez-Díazcorder et al., 2011, Stanhope et al., 2015). Además, el ATP consumido durante la fosforilación de fructosa se convierte en AMP, y como producto de su degradación, se forma ácido úrico, un metabolito tóxico para el endotelio vascular que causa hipertensión (Loza-Medrano et al., 2019). Una baja biodisponibilidad de vasodilatadores, como el óxido nítrico (NO), se ha observado debido a un aumento en las especies reactivas de oxígeno inducidas por la fructosa (Belin de Chantemele et al., 2012). En particular, la reacción del óxido nítrico con el anión superóxido genera peroxinitrito, una consecuencia en una baja actividad de la superóxido dismutasa y las concentraciones reducidas de GSH. Paralelamente, un aumento en las colinesterasas, como se observó en este estudio, puede conducir a una disminución de otro vasodilatador importante, como lo representa la ACh sérica y hepática (Nacci et al., 2009).

El GSH tiene la capacidad de atrapar diferentes ERO producidos en la cadena respiratoria mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico y un aumento de las enzimas NADPH oxidasa y xantina oxidasa. Estos factores juntos, pueden contribuir a generar condiciones oxidantes, lo que explicaría un aumento de TBARS sérico e

hepático, así como una disminución en el contenido de GSH hepático en ausencia de cambios en el GSH sérico. El último efecto podría deberse a que el GSH se sintetiza en el hígado y se distribuye a los tejidos y órganos después de la agresión inducida por especies reactivas de oxígeno.

Otro marcador antioxidante evaluado en el presente estudio fue la actividad de la paraoxonasa 1 (PON1, E.C. 3.1.8.1) una arildialquilfosfatasa que degrada los peróxidos lipídicos en las HDL y LDL. Una baja actividad en la PON-1 en el grupo de animales con SM fue otro indicador en la disminución de las defensas antioxidantes en SM, y podría explicarse debido a que la hiperinsulinemia, dislipidemia y estrés oxidante disminuyen la actividad de la PON1. En parte, porque esta enzima puede sufrir en su estructura la incorporación de glucosa no enzimáticamente (glicación) durante el desarrollo de trastornos metabólicos (Meneses et al., 2019). El tratamiento con la NAM al causar una reducción en las TBARS, GSSG y un aumento en el contenido de GSH mejora la actividad de la PON1 y, por lo tanto, restaura la concentración de las HDL.

El aumento observado en las concentraciones de TBARS y GSSG, y una disminución en el GSH hepático son consistentes con un aumento en la actividad y expresión de las colinesterasas. Como no se observaron cambios en la cantidad de proteína, el aumento en la expresión y actividad del ARNm está asociado con la síntesis rápida de enzimas en respuesta a la señalización y su modificación postraducciona. Por otro lado, el consumo de fructosa modificó el patrón en la glicosilación de AChE y BChE séricas, siendo relevante en los residuos de ácido siálico (no se muestran los datos preliminares). Cabe señalar, que este carbohidrato

es esencial en la vida media de la enzima, y su potencial degradación a través del proteasoma. Si estos residuos se pierden o se enmascaran con otros carbohidratos, el proteasoma no puede detectar ninguna enzima, lo que prolonga su vida media y sus actividades biológicas.

Por otro lado, la ACh ejerce un efecto antiinflamatorio al inhibir la translocación de NFκ-β al núcleo y, por tanto, la síntesis de citocinas proinflamatorias (Pavlov & Tracey, 2012, Shenhar-Tsarfaty et al., 2014), principalmente en células inmunes y macrófagos responsables de sintetizar citocinas sistémicas. Por tanto, un aumento en la actividad de BChE y AChE provocó la hidrólisis de la ACh circulante o liberada en el hígado, impidiendo su efecto antiinflamatorio y amplificando así la respuesta pro-inflamatoria; consistente con el aumento de TNF-α y en contraste con IL-6 baja (Diagrama 1).

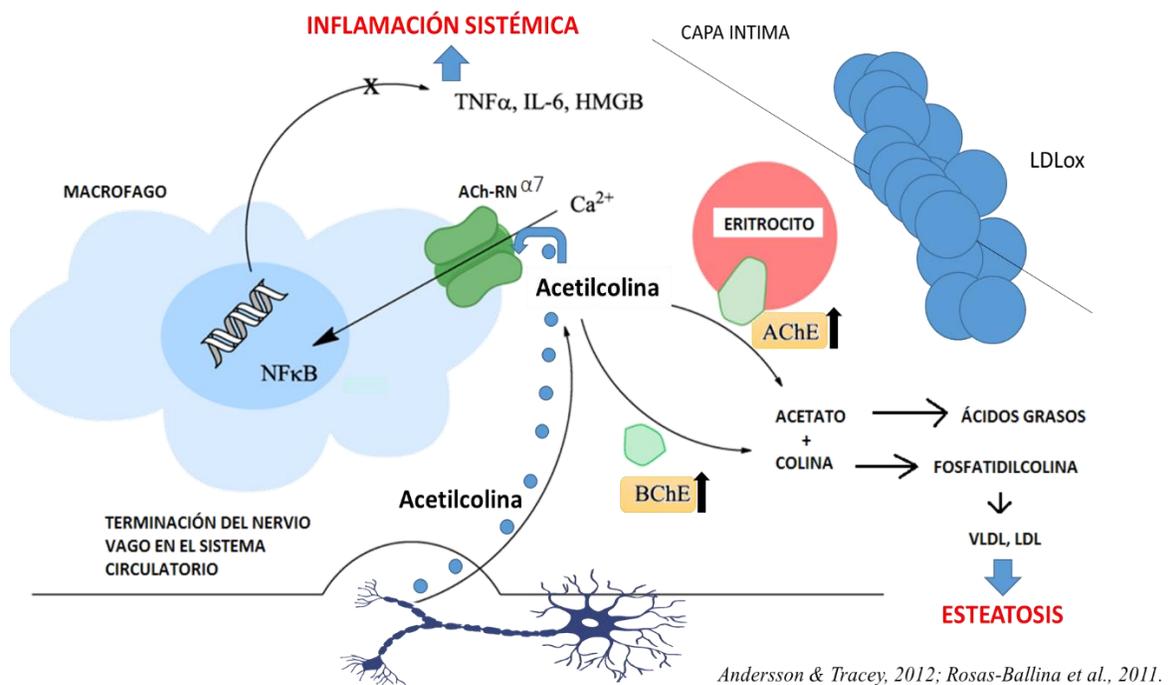


Diagrama 1. Función de AChE y BChE en la inflamación sistémica.

Se ha establecido que el receptor nicotínico alpha-7 de ACh ($\alpha 7nAChR$), es el principal modulador de este efecto, a partir del cual se ha descrito esta vía colinérgica antiinflamatoria (Pavlov & Tracey, 2012). Este mismo fenómeno ocurre en el hígado, donde la ACh, a través de su liberación por el nervio vago ejerce su efecto antiinflamatorio. Las colinesterasas presentes en los hepatocitos, los glóbulos rojos y el suero hidrolizan constantemente a la ACh, evitando su captura por células inmunes, macrófagos y células de Kupffer. De esta forma, ejercen sus efectos antiinflamatorios. Por lo tanto, sugerimos que la actividad elevada de BChE y AChE contribuye a la inflamación de bajo grado durante el SM.

Además, la ACh exhibe actividad vasodilatadora (Nacci et al., 2009), y la prevención de su degradación puede contribuir a reducir la disfunción endotelial, que es típica del SM y diabetes mellitus, previniendo así la hipertensión.

La investigación sobre enfermedades neurodegenerativas ha revelado que un aumento en las ERO, promueve la actividad de las colinesterasas, contribuyendo a una reducción de los niveles de ACh y afectando la sinapsis y los procesos cognitivos e inflamatorios. El uso de extractos de plantas con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias disminuye la actividad de ambas colinesterasas, lo que confirma la relación entre el estrés oxidante y la actividad colinérgica (Bezerra et al., 2017). Así, podemos concluir que el estrés oxidante es un factor clave en la vía colinérgica antiinflamatoria.

La administración de la NAM a diferentes concentraciones disminuyó la lipogénesis y la adipogénesis *de novo*, lo que se reflejó en una disminución en el aumento de peso corporal, la dislipidemia y la resistencia a la insulina. Recientemente,

demostramos que NAM atenuó la esteatosis inducida por fructosa y la esteatohepatitis no alcohólica regulando las enzimas dependientes de NADP⁺, disminuyendo la acumulación de lípidos y TBARS, aumentando la relación GSH / GSSG (Mejía et al., 2018, Loza-Medrano et al., 2020). Un comportamiento similar se observó en células de adipocito 3T3-L1 cultivadas, en las que G6PD se sometió a inhibición de tipo mixto no competitivo después de la administración de NAM, que disminuyó la síntesis de lípidos y mejoró el sistema redox celular (Torres-Ramírez et al., 2013).

El presente estudio aborda un posible mecanismo por el cual la NAM afecta la actividad BChE y AChE, y cómo NAM podría regular su expresión y actividad. Los inhibidores de las colinesterasas promueven la transmisión colinérgica en enfermedades neurodegenerativas (Chang et al., 2019).

En este contexto diversas moléculas; como por ejemplo la fisostigmina, tacrina, donepezil, rivastigmína, ácido amino para-benzoico, flavonoides y la galantamína han sido ampliamente estudiadas como inhibidores de la actividad colinesterásica dentro de las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. La finalidad de inhibir la actividad de AChE y BChE radica en mejorar la transmisión colinérgica. La galantamína es un alcaloide aislado de la familia *Amaryllidaceae*, cuyo mecanismo de acción se basa en separar la triada catalítica dentro de la estructura de garganta de la AChE, el estudio Meta dinámico atemperado muestra que la triada catalítica se separa en presencia de la galantamina, este mismo efecto podría ser desencadenado por NAM (Diagrama 2), ya que dentro de su estructura destaca la presencia de anillos de piridina (Ghosh et al., 2020).

El acoplamiento molecular mostró que la afinidad de NAM por los sitios activos de ambas colinesterasas fue mayor que la de ACh, y predijo su unión más fuerte. Según la simulación molecular, los residuos en AChE que interactúan con la NAM son consistentes con un estudio en el que se observó un vínculo entre AChE y cafeína. Llevando a proponer que la cafeína es un inhibidor no competitivo de la AChE (Pohanka & Dobes, 2013).

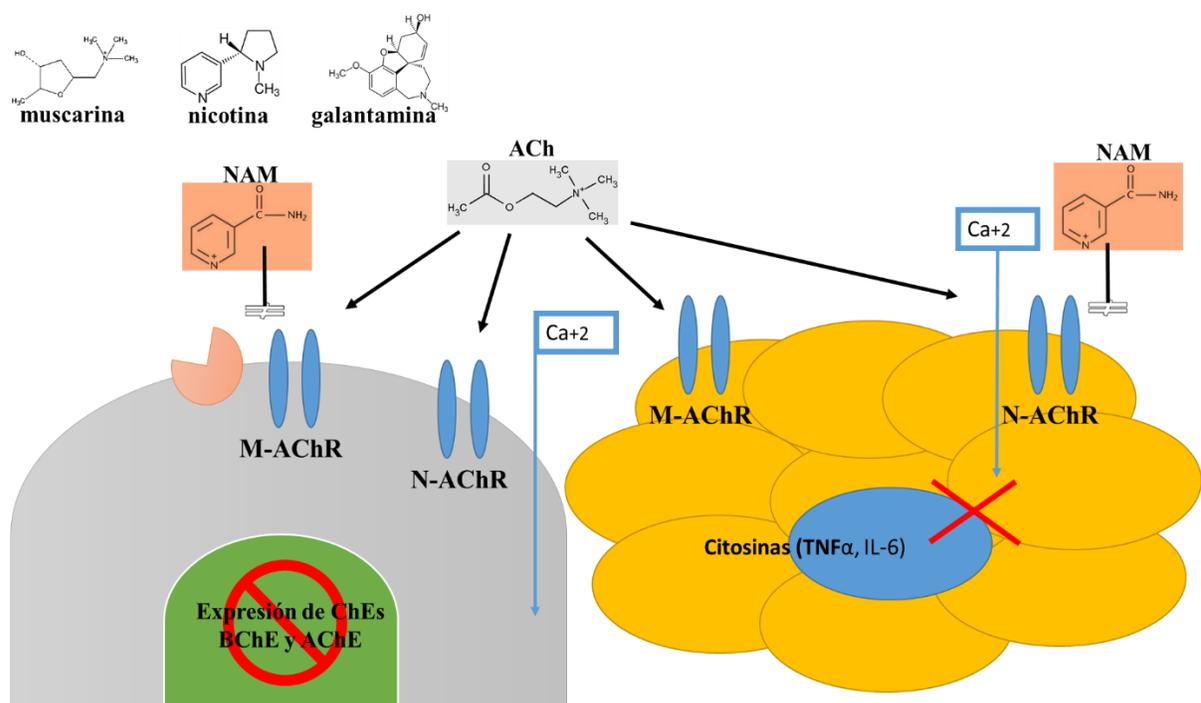


Diagrama 2. Unión de diversos fármacos a los receptores muscarínicos y nicotínicos de ACh, lo cual ejercen un efecto agonista o antagonista, modulando a su vez la expresión de colinesterasas o inhibiendo su acción.

En cuanto al modelo *in vitro* los resultados obtenidos son diferentes a lo observado en el modelo *in vivo* en animales con SM inducido con fructosa 40% por 4 meses; debido a que la enzima con mayor aumento en actividad en suero e hígado es la BChE. Esto se explica en que la regulación de ambas colinesterasas no solo

depende del entorno nutricional, sino de una serie de factores que regulan su expresión, cantidad y actividad, entre estos factores destaca la irrigación sanguínea; donde se establece comunicación entre diferentes órganos y tejidos a través de proteínas, hormonas y neurotransmisores, por último la interacción con las diferentes estirpes celulares y el papel que desempeñan los receptores para acetilcolina que a su vez regulan la expresión de las colinesterasas. Estos factores se anulan cuando se utilizan células aisladas por lo tanto es natural que el efecto sobre las colinesterasas no sea el mismo que en el modelo animal.

Paralelo a esto, la estimación de la actividad BChE fue baja en la línea HepG2, proveniente de células hepáticas transformadas; ya que al perder la morfología y aumentar la división celular, la mayor parte de las proteínas sintetizadas en células normales dejan de expresarse. Demostrando que AChE participa en los procesos de regulación del ciclo celular dentro de sus funciones no colinérgicas (Pérez-Aguilar et al., 2015, Campoy et al., 2016).

La explicación del efecto de la administración de la NAM, puede ocurrir sobre los receptores muscarínicos y nicotínicos, que a su vez regulan la expresión y síntesis de ambas colinesterasas. Sin dejar de lado que NAM favorece los sistemas antioxidantes y regula la síntesis de ácidos grasos, que también podría ejercer efecto indirecto sobre las colinesterasas como se observó con el análisis de acoplamiento molecular.

10. CONCLUSIONES

- El análisis desarrollado a partir del modelo *in vivo* respalda un modelo que define a la NAM como un modulador de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, lo que contribuye a mejorar las vías colinérgicas antiinflamatorias y vasodilatadoras al atenuar la degradación de ACh en el SM inducido por fructosa.
- Este estudio representa un análisis novedoso donde se integra información puntual y general sobre cómo se comportan las enzimas colinérgicas en una patología metabólica, así como en modelos *in vitro* donde se analiza el papel de las colinesterasas bajo un enfoque aislado, exclusivamente hepatocitos transformados (HepG2) y normales (AML12), cuya influencia externa no influye en su comportamiento. Este es un punto donde vale la pena poner más atención tratando de descifrar si la influencia del nervio vago hacia los órganos periféricos como el hígado contribuye a potenciar el efecto derivado de una alteración metabólica.
- Con base a los resultados en el modelo *in vitro* concluimos que la actividad AChE y BChE es completamente diferente a lo observado en el modelo *in vivo*, siendo un factor importante para el análisis de que las colinesterasas no solo cumplen una función catalítica, sino además son proteínas estructurales y que participan en otros mecanismos dependiendo su entorno. Por ejemplo, en la regulación del ciclo celular, como proteína de transporte, dado que se encontró actividad fuera de las células, directamente en el medio de cultivo, y finalmente como proteína estructural de las membranas.

- NAM tuvo efecto en ambos modelos, regulando en la actividad, su expresión y su cantidad de las colinesterasas, siempre asemejándose a los grupos controles, este efecto como ya mencionamos, podría ser derivado del entorno donde se encuentre la célula o si cursa con alguna alteración.
- Sobre este contexto mencionar que el modelo *in vitro* desarrollado en células normales (AML12), fue mucho más parecido a los resultados observados en el modelo *in vivo* considerando que estos modelos son más cercanos tratándose de que no existen células transformadas con diferentes requerimientos y funciones.
- Cabe mencionar, que el comportamiento de ambas enzimas depende mucho de la etapa de alteración metabólica donde se encuentre posicionada en el momento del análisis, como observamos en diferentes referencias en estadios avanzados de enfermedad la actividad de las colinesterasas cambia radicalmente, esto se asemeja mucho a la actividad observada en el modelo *in vitro* de células HepG2 donde en procesos de cáncer, las enzimas cambian completamente su función.
- Por este motivo también se propone a AChE y BChE como marcadores tempranos de la enfermedad metabólica. Un análisis que podría dar un diagnóstico acertado sobre si una persona se encuentra en etapas de síndrome metabólico.
- Además de considerar a ambas enzimas como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la inflamación de bajo grado y el estrés oxidante.
- El uso de nicotinamida a nivel experimental comprende una serie de hallazgos novedosos dentro del grupo de investigación, donde destacan las

bondades de dicha vitamina, sus múltiples efectos positivos son relevantes y de gran interés para su uso como adyuvante en el tratamiento de enfermedades metabólicas incluyendo el síndrome metabólico y la regulación de diversas enzimas.

- El presente estudio reporta información novedosa sobre el mecanismo de acción de nicotinamida y un grupo de enzimas blanco donde lleva a cabo su función.

11.PERSPECTIVAS

El sistema colinérgico está regulado por diferentes mecanismos donde interviene el neurotransmisor acetilcolina, los receptores muscarínicos y nicotínicos y la acetilcolina-transferasa, etc. en este supuesto sería interesante demostrar cómo es que se regula la expresión, cantidad y actividad de ambas colinesterasas considerando el sistema colinérgico completo. Así como en los diferentes órganos y tejidos involucrados en las enfermedades metabólicas como por ejemplo el tejido adiposo, páncreas, riñón, corazón, pulmón, músculo y cerebro.

Además evaluar el efecto de NAM en los órganos involucrados, mencionados anteriormente, sobre los receptores muscarínicos y nicotínicos de acetilcolina.

Finalmente conocer el mecanismo por el cual NAM puede actuar como una molécula agonista o antagonista de los receptores regulando la expresión de colinesterasas.

12.BIBLIOGRAFÍA

A

- Alberts y col., (2004). "Biología Molecular de la célula" (4ª ed.), Ed. Omega. Barcelona. España.
- Amri Z, Ghorbel A, Turki M, Akroun FM, Ayadi F, Elfeki A, Hammami M. (2017). Effect of pomegranate extracts on brain antioxidant markers and cholinesterase activity in high fat-high fructose diet induced obesity in rat model. *BMC Complement Alternative Medicine*. Jun 27;17(1):339.
- Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PM. (1999) Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 19:330–5.

B

- Bai L, Pang WJ, Yang YJ, Yang GS. (2008). Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Jan;307(1-2):129-40.
- Baldwin W, McRae S, Marek G, Wymer D, Pannu V, Baylis C, Johnson RJ, Sautin YY. (2011). Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. *Diabetes*. Apr;60(4):1258-69.

- Bargull-Díaz, I.C.; Lozano, N.; Pinto, J.K. & Aristizábal, J.J. (2012). Síndrome intermedio en intoxicación aguda por organofosforados: reporte de caso. *Medicina U.P.B.* 31 (1): 53-58.
- Bawaskar HS, Bawaskar PH, Bawaskar PH. (2015). RBC acetyl cholinesterase: A poor man's early diagnostic biomarker for familial alzheimer's and Parkinson's disease dementia. *Journal of Neurosciences in Rural Practice.* Jan;6(1):33-8.
- Belin de Chantemele EJ, Stepp DW. (2012). Influence of obesity and metabolic dysfunction on the endothelial control in the coronary circulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* Apr; 52(4): 840-7.
- Best RB, Zhu X, Shim J, Lopes PE, Mittal J, Feig M, Mackerell AD Jr. (2012). Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *Journal of Chemical Theory and Computation.* Sep 11; 8(9): 3257-3273.
- Bezerra OC, França CM, Rocha JA, Neves GA, Souza PRM, Teixeira Gomes M, Malfitano C, Loleiro TCA, Dourado PM, Llesuy S, de Angelis K, Irigoyen MCC, Ulloa L, Consolim-Colombo FM. (2017). Cholinergic Stimulation Improves Oxidative Stress and Inflammation in Experimental Myocardial Infarction. *Scientific Reports.* Oct 20; 7(1): 13687.
- Boshtam M, Razavi AE, Pourfarzam M, Ani M, Naderi GA, Basati G, Mansourian M, Dinani NJ, Asgary S, Abdi S. (2013). Serum paraoxonase 1 activity is associated with fatty acid composition of high density lipoprotein. *Disease Markers.* 35:273–280.

- Bray GA. (2013). Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. *Advances in Nutrition* 4:220-225.
- Brooks BR, Brooks CL 3rd, Mackerell AD Jr, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoscek M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, Karplus M. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*. Jul 30; 30(10): 1545-614.
- Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, S Swaminathan, Karplus M. (1983). CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry*. Volumen 4, Issue 2: 187–217.
- Bulut S, Bodur E, Colak R, Turnagol H. (2013). Effects of conjugated linoleic acid supplementation and exercise on post-heparin lipoprotein lipase, butyrylcholinesterase, blood lipid profile and glucose metabolism in young men. *Chemico-Biological Interactions*. 323–329.
- Burkart V, Blaeser K, Kolb H. (1999). Potent beta-cell protection in vitro by an isoquinolinone-derived PARP inhibitor. *Hormone and Metabolic Research*. Dec;31(12):641-4.

C

- Cabezas-Herrera J, Moral-Naranjo MT, Campoy FJ, Vidal CJ. (1994). G4 forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse muscle differ in their interaction with Ricinus communis agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta*. Feb 22;1225(3):283-8.
- Campoy FJ, Vidal CJ, Muñoz-Delgado E, Montenegro MF, Cabezas-Herrera J, Nieto-Cerón S. (2016). Cholinergic system and cell proliferation. *Chemico-biological Interactions*. Nov 25;259(Pt B):257-265.
- Cardoso AM, Abdalla FH, Bagatini MD, Martins CC, Fiorin Fda S, Baldissarelli J, Costa P, Mello FF, Fiorenza AM, Serres JD, Gonçalves JF, Chaves H, Royes LF, Belló-Klein A, Morsch VM, Schetinger MR. (2014). Swimming training prevents alterations in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*. Apr;27(4):522-9.

CH

- Chang EH, Chavan SS, Pavlov VA. (2019). Cholinergic Control of Inflammation, Metabolic Dysfunction, and Cognitive Impairment in Obesity-Associated Disorders: Mechanisms and Novel Therapeutic Opportunities. *Frontiers in Neuroscience*. Apr 5; 13: 263.
- ChemAxon. (2019). Marvin 19.20. Retrieved from www.chemaxon.com
- Chen VP, Gao Y, Geng L, Brimijoin S. (2017). Butyrylcholinesterase gene transfer in obese mice prevents postdieting body weight rebound by suppressing ghrelin

signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. Oct 10;114(41):10960-10965.

- Chen VP, Gao Y, Geng L, Brimijoin S. (2017). Butyrylcholinesterase regulates central ghrelin signaling and has an impact on food intake and glucose homeostasis. *International Journal of Obesity*. (Lond). Sep;41(9):1413-1419.
- Choi JY1, Yu J, Yang DB, Ra K, Kim KT, Hong GH, Shin KH. (2011). Acetylthiocholine (ATC) cleaving cholinesterase (ChE) activity as a potential biomarker of pesticide exposure in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, of Korea. *Marine Environmental Research*. Apr;71(3):162-8.
- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*. Sep;15(3):532-4, 536-7.
- Colak Y, Yesil A, Mutlu HH, Caklili OT, Ulasoglu C, Senates E, Takir M, Kostek O, Yilmaz Y, Yilmaz Enc F, Tasan G, Tuncer I. (2014). A Potential Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease with SIRT1 Activators. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 23:311-319.

D

- Dale HH. (1914). The action of certain esters of choline and their relation to muscarine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 6:147-190.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*. 4:131-138.

- Das U. (2007). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitor*. 13:214-221.
- De Bona KS, Bonfanti G, Bitencourt PE, Cargnelutti LO, da Silva PS, De Lucca L, Pimentel VC, Tatsch E, Gonçalves TL, Premaor M, Moresco RN, Moretto MB. (2013). Butyrylcholinesterase and γ -glutamyltransferase activities and oxidative stress markers are altered in metabolic syndrome, but are not affected by body mass index. *Inflammation*. Dec;36(6):1539-47.
- 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. *Experimental Hematology*. 10: 1153-1161.
- Dori A, Soreq H. (2006). ARP, the cleavable C-terminal peptide of “readthrough” acetylcholinesterase, promotes neuronal development and plasticity. *Journal of Molecular Neuroscience*. 28: 247-255.
- Dupas J, Feray A, Goanvec C, Guernec A, Samson N, Bougaran P, Guerrero F, Mansourati J. (2017). Metabolic Syndrome and Hypertension Resulting from Fructose Enriched Diet in Wistar Rats. *BioMed Research International*. 2017:2494067.

E

- Eglén RM. (2006). Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*. Jul;26(3):219-33.

- Eichler J, Toker L, Silman I. (1991). Effect of heat shock on acetylcholinesterase activity in chick muscle cultures. *FEBS Letters*. 293:16-20.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. Jul; 7: 88-95.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018. Presentación de resultados (insp.mx).

F

- Fon Tacer K, Rozman D. (2011). Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *Journal of Lipids*.783976.
- Ford ES, Li C. (2008). Defining the metabolic syndrome in children and adolescents: will the real definition please stand up? *The Journal of Pediatrics*. 152:160-4.

G

- Ghosh S, Jana K, Wakchaure PD, Ganguly B. (2020). Revealing the cholinergic inhibition mechanism of Alzheimer's by galantamine: a metadynamics simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020 Dec 31:1-12.
- Grisaru D, Pick M, Perry C, Sklan EH, Almog R, Goldberg I, Naparstek E, Lessing JB, Soreq H, Deutsch V. (2006). Hydrolytic and nonenzymatic functions of acetylcholinesterase comodulate hemopoietic stress responses. *Journal of Immunology*. Jan 1;176(1):27-35.

H

- Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 90:9031-9035.
- Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulié J, Silman I. (1992). Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase, modeling and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 89:10827-10831.
- Hedman M, Ludvigsson J, Faresjö MK. (2006). Nicotinamide reduces high secretion of IFN-gamma in high-risk relatives even though it does not prevent type 1 diabetes. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 26(4):207-213.
- Hernández-Díazcouder A, Romero-Nava R, Carbó R, Sánchez-Lozada LG, Sánchez-Muñoz F. (2019). High Fructose Intake and Adipogenesis. *International Journal of Molecular Sciences.* Jun 7; 20(11). pii: E2787.
- Holmstedt B. (1972). The ordeal vean of old calabar. The pageant of physostigma vanenosum in medicine. *Plants in the development of modern medicine.* Pag. 303-360. Edit. Por Swain, T. Cambridge University Press.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* Feb; 14(1): 33-8, 27-8.

I

J

- Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. (2008). CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*. Aug; 29(11): 1859-65.

K

- Kaczmar AG. (1970). History of the research with anticholinesterase agents. *Acetylcholinesterase Agents*. Pag. 1–44. Edit. Por Kaczmar AG. Vol. 1 Section 13, Int. Encyclop. Pharmacol. Ther. Pergamon Press. Oxford.
- Kálmán J, Juhász A, Rakonczay Z, Abrahám G, Zana M, Boda K, Farkas T, Penke B, Janka Z. (2004). Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. *Life Sciences*. Jul 23;75(10):1195-204.
- Klurfeld DM, Foreyt J, Angelopoulos TJ, Rippe JM. (2013). Lack of evidence for high fructose corn syrup as the cause of the obesity epidemic. *International Journal of Obesity*. 37:771–773.
- Kolb H, Burkart V. (1999). Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care*. Mar;22 Suppl 2:B16-20.

L

- Lampón N, Hermida-Cadahia E, Riveiro A, Tutor J. C. (2012). Association between butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. *Annals Hepatology*. 11:356-363.

- Lanaspá MA, Sánchez-Lozada LG, Choi YJ, Cicerchi C, Kanbay M, Roncal-Jiménez CA, Ishimoto T, Li N, Marek G, Duranay M, Schreiner G, Rodríguez-Iturbe B, Nakagawa T, Kang DH, Sautin YY, Johnson RJ. (2012). Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver. *Journal of Biological Chemistry*. Nov;23;287(48):40732-44.
- Le T, Urasaki Y, Pizzorno G. (2014). Uridine prevents fenofibrate-induced fatty liver. *Plos One*. 24. 9.
- Lee SJ, Choi SE, Jung IR, Lee KW, Kang Y. (2013). Protective effect of nicotinamide on high glucose/palmitate-induced glucolipotoxicity to INS-1 beta cells is attributed to its inhibitory activity to sirtuins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 535(2):187-196.
- Liao J, Nørgaard-Pedersen B, Brodbeck U. (1993). Subunit association and glycosylation of acetylcholinesterase from monkey brain. *Journal of Neurochemistry*. Sep;61(3):1127-34.
- Lima JK, Leite N, Turek LV, Souza RL, da Silva Timossi L, Osiecki AC, Osiecki R, Furtado-Alle L. (2013). 1914G variant of BCHE gene associated with enzyme activity, obesity and triglyceride levels. *Gene*. 532; 24–26.
- Lírio LM, Forechi L, Zanardo TC, Batista HM, Meira EF, Nogueira BV, Mill JG, Baldo MP. (2016). Chronic fructose intake accelerates non-alcoholic fatty liver disease in the presence of essential hypertension. *Journal of Diabetic Complications*. Jan-Feb;30(1):85-92.

- Liu L, Wang Y, Wang J, Dong Y, Chang S, Liu X, Lutfy K, Chen H, Friedman TC, Jiang M, Liu Y. (2018). Enhanced hexose-6-phosphate dehydrogenase expression in adipose tissue may contribute to diet-induced visceral adiposity. *International Journal of Obesity*. (Lond). Dec; 42(12): 1999-2011.
- Lockridge O. (2015). Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics*. 148:34–46.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. Nov; 193(1): 265-75.
- Loza-Medrano SS, Baiza-Gutman LA, Ibáñez-Hernández MÁ, Cruz-López M, Díaz-Flores M, (2019). Molecular alterations induced by fructose and its impact on metabolic diseases. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. Jan:28(56(5)), 491–504.
- Loza-Medrano SS, Baiza-Gutman LA, Manuel-Apolinar L, García-Macedo R, Damasio-Santana L, Martínez-Mar OA, Sánchez-Becerra MC, Cruz-López M, Ibáñez-Hernández MA, Díaz-Flores M. (2020). High fructose-containing drinking water-induced steatohepatitis in rats is prevented by the nicotinamide-mediated modulation of redox homeostasis and NADPH-producing enzymes. *Molecular Biology Reports*. Oct 24.

LL

M

- Mahmoud AA, Elshazly SM. (2014). Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One*. Sep 9;9(9):e106993.
- Maithili Karpaga Selvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Sripradha R. (2014). Curcumin Attenuates Oxidative Stress and Activation of Redox-Sensitive Kinases in High Fructose- and High-Fat-Fed Male Wistar Rats. *Scientia Pharmaceutica*. Nov 4; 83(1): 159-75.
- Marnay A. & Nachmansohn D. (1938). Cholinesterase in voluntary muscle. *The Journal of Physiology*. 92:37-47.
- Mata C, Lares M, Hernández P. (2013). Enzima paraoxonasa 1 y modulación del estrés oxidativo. *Síndrome cardiometabólico*. Volumen III N° 1, 2244-7261.
- Mejía SÁ, Gutman LAB, Camarillo CO, Navarro RM, Becerra MCS, Santana LD, Cruz M, Pérez EH, Flores MD. (2018). Nicotinamide prevents sweet beverage-induced hepatic steatosis in rats by regulating the G6PD, NADPH/NADP⁺ and GSH/GSSG ratios and reducing oxidative and inflammatory stress. *European Journal of Pharmacology*. Jan 5;818:499-507.
- Meneses MJ, Silvestre R, Sousa-Lima I, Macedo MP. (2019). Paraoxonase-1 as a Regulator of Glucose and Lipid Homeostasis: Impact on the Onset and Progression of Metabolic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. Aug 19;20(16):4049.
- Merino- Aguilar H. Arrieta-Baez D. Jimenez-Estrada M. Magos-Guerrero G. Hernandez-Bautista RJ. Susunaga-Notario A. Hernandez-Perez E. Lopez-

Diazguerrero N, Almanza-Perez J, Blancas-Flores G, Roman-Ramos R, Alarcon-Aguilar F. (2014). Effect of fructooligosaccharides fraction from *psacalium decompositum* on inflammation and dislipidemia in rats with fructose-induced obesity. *Nutrients*. 6:591-604.

- Moss DE, Perez RG, Kobayashi H. (2017). Cholinesterase Inhibitor Therapy in Alzheimer's Disease: The Limits and Tolerability of Irreversible CNS-Selective Acetylcholinesterase Inhibition in Primates. *Journal of Alzheimer's Disease*. 55(3):1285-1294.
- Muensch H, Goedde HW, Yoshida A. (1976). Human-serum cholinesterase subunits and number of active sites of the major component. *European Journal of Biochemistry*. Nov 1;70(1):217-23.

N

- Nacci C, Tarquinio M, De Benedictis L, Mauro A, Zigrino A, Carratù MR, Quon MJ, Montagnani M. (2009). Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature. *Endocrinology*. Feb; 150(2): 849-61.
- Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*. Jan;53:124-44.
- Niday E, Wang CJ, Alaupovic P. (1977). Studies on the characterization of human erythrocyte acetylcholinesterase and its interaction with antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 469:180-193.

Ñ

O

- Orozco L, Martínez-Hernández AG, Barajas-Olmos FM. (2014). Genómica de las enfermedades metabólicas. *Revista Digital Universitaria*. Vol. 15 N° 6. ISSN1607–6079.
- Ozarowski M, Mikolajczak PL, Piasecka A, Kujawski R, Bartkowiak-Wieczorek J, Bogacz A, Szulc M, Kaminska E, Kujawska M, Gryszczynska A, Kachlicki P, Buchwald W, Klejewski A, Seremak-Mrozikiewicz A. (2017). Effect of *Salvia miltiorrhiza* root extract on brain acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities, their mRNA levels and memory evaluation in rats. *Physiology & Behavior*. May 1;173:223-230.

P

- Pasternak RC. (2003). Report of the adult treatment panel III: the 2001 national cholesterol education program guidelines on the detection, evaluation and treatment of elevated cholesterol in adults. *Cardiology Clinics*. 21:393-398.
- Pavlov VA, Tracey KJ. (2012). The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*. Dec; 8(12):743-54.
- Payolla TB, Lemes SF, de Fante T, Reginato A, Mendes da Silva C, de Oliveira Micheletti T, Rodrigues HG, Torsoni AS, Milanski M, Torsoni MA. (2015). High-fat diet during pregnancy and lactation impairs the cholinergic anti-inflammatory pathway

in the liver and white adipose tissue of mouse offspring. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Feb 15;422:192-202.

- Pérez-Aguilar B, Vidal CJ, Palomec G, García-Dolores F, Gutiérrez-Ruiz MC, Bucio L, Gómez-Olivares JL, Gómez-Quiroz LE. (2015). Acetylcholinesterase is associated with a decrease in cell proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. Jul;1852(7):1380-7.
- Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. (2002). PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*. Jan 17;33(2):275-85.
- Pohanka M, Dobes P. (2013). Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *International Journal of Molecular Sciences*. May 8; 14(5): 9873-82.

Q

R

- Rao A, Sridhar G, Das U. (2007). Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*. 69:1272-1276.
- Reaven GM. (2011). The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round? *Journal of Internal Medicine*. 269: 127–136.
- Reyes AE, Chacón MA, Dinamarca MC, Cerpa W, Morgan C, Inestrosa NC. (2004). Acetylcholinesterase-Abeta complexes are more toxic than Abeta fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive

astrocytosis, and neuronal cell loss. *The American Journal of Pathology*. 164(6):2163-2174.

Roncal-Jimenez CA, Lanaspa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andres-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, Mc Fann K, Sautin YY, Johnson RJ. (2011). Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism*. Sep;60(9):1259-70.

- Rosas-Ballina M, Tracey K.J. (2009). Cholinergic control of inflammation. *Journal of Internal Medicine*. 265:663–679.
- Rosset R, Surowska A, Tappy L. (2016). Pathogenesis of Cardiovascular and Metabolic Diseases: Are Fructose-Containing Sugars More Involved Than Other Dietary Calories? *Current Hypertension Reports*. Jun;18(6):44.
- Rossmeisl M, Flachs P, Brauner P, Sponarova J, Matejkova O, Prazak T, Ruzickova J, Bardova K, Kuda O, Kopecky J. (2004). Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorder*. 28 Suppl 4:S38-44.
- Rotundo RL, (1984,b). Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. 81:479-483.

S

- Sáez-Valero J, Poza-Cisneros G, Vidal CJ. (1996). Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human glioma. *Neuroscience Letters*. Mar 15;206(2-3):173-6.

- Schiavon R, De Fanti E, Giavarina D, Biasioli S, Cavalcanto G, Guidi G. (1996) Serum paraoxonase activity is decreased in uremic patients. *Clinica Chimica Acta*. 247: 71–80.
- Schrödinger L. (2019). Maestro. Schrödinger Release 2019-2. New York, NY. <https://www.schrodinger.com/maestro>.
- Shafferman A, Velan B, Ordentlich A, Kronman C, Grosfeld H, Leitner M, Flashner Y, Cohen S, Barak D, Ariel N. (1992). Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues involved in signal transduction from the surface to the catalytic center. *The EMBO Journal*. 11:3561-3568.
- Shenhar-Tsarfaty S, Berliner S, Bornstein NM, Soreq H. (2014). Cholinesterases as biomarkers for parasympathetic dysfunction and inflammation-related disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. Jul;53(3):298-305.
- Shenhar-Tsarfaty S, Bruck T, Bennett ER, Bravman T, Aassayag EB, Waiskopf N, Rogowski O, Bornstein N, Berliner S, Soreq H. (2011). Butyrylcholinesterase interactions with amylin may protect pancreatic cells in metabolic syndrome. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Aug;15(8):1747-56.
- Soreq H, Seidman S, Dreyfus PA, Zevin-Sonkin D, Zakut H. (1989). Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholine esterase in microinjected *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*. Jun 25;264(18):10608-13.
- Soreq H, Zakut H. (1990). Expression and in vivo amplification of the human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes. *Progress in Brain Research*. 84:51-61.

- Sridhar G, Rao A, Srinivas K, Nirmala G, Lakshmi G, Suryanarayna D, Nageswara Rao P, Kaladhar D, Veeresh Kumar S, Uma Devi T, Nitesh T, Hanuman T. (2010). Butyrylcholinesterase in metabolic syndrome. *Medical Hypotheses*. 75(6):648-651.
- Stanhope KL, Medici V, Bremer AA, Lee V, Lam HD, Nunez MV, Chen GX, Keim NL, Havel PJ. (2015). A dose-response study of consuming high-fructose corn syrup-sweetened beverages on lipid/lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in young adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Jun; 101(6): 1144-54.
- Steenson S, Umpleby AM, Lovegrove JA, Jackson KG, Fielding BA. (2017). Role of the Enterocyte in Fructose-Induced Hypertriglyceridaemia. *Nutrients*. Apr 1; 9(4). pii: E349.
- Stefanello FM, Franzon R, Tagliari B, Wannmacher C, Wajner M, Wyse AT. (2005). Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocysteinemia. *Metabolic Brain Disease*. Jun;20(2):97-103.
- Sternfeld M, Shoham S, Klein O, Flores-Flores C, Evron T, Idelson GH, Kitsberg D, Patrick JW, Soreq H. (2000). Excess "read-through" acetylcholinesterase attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. Jul 18;97(15):8647-52.
- Stojanov M, Stefanovic A, Dzingalasevic G, Mandic-Radic S, Prostran M. (2001). Butyrylcholinesterase activity in young men and women: association with cardiovascular risk factors. *Clinical biochemistry*. 44(8-9):623-626.

T

- Tamer F, Ulug E, Akyol A, Nergiz-Unal R. (2019). The potential efficacy of dietary fatty acids and fructose induced inflammation and oxidative stress on the insulin signaling and fat accumulation in mice. *Food and Chemical Toxicology*. Oct 28: 110914.
- Tangvarasittichai S, Pongthaisong S, Meemark S, Tangvarasittichai O. (2015). Abdominal Obesity Associated with Elevated Serum Butyrylcholinesterase Activity, Insulin Resistance and Reduced High Density Lipoprotein-Cholesterol Levels. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. Jul;30(3):275-80.
- Ter Horst KW, Serlie MJ. (2017). Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. Sep 6;9(9):981.
- Tong DL, Zhang DX, Xiang F, Teng M, Jiang XP, Hou JM, Zhang Q, Huang YS. (2012). Nicotinamide pretreatment protects cardiomyocytes against hypoxia-induced cell death by improving mitochondrial stress. *Pharmacology*. 90(1-2):11-18.
- Tornel PL, Sáez-Valero J, Vidal CJ. (1992). Ricinus communis agglutinin I reacting and non-reacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid. *Neuroscience Letters*. Sep 28;145(1):59-62.
- Torres-Ramírez N, Baiza-Gutman LA, García-Macedo R, Ortega-Camarillo C, Contreras-Ramos A, Medina-Navarro R, Cruz M, Ibáñez-Hernández MÁ, Díaz-Flores M. (2013). Nicotinamide, a glucose-6-phosphate dehydrogenase non-competitive mixed inhibitor, modifies redox balance and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Life Sciences*. 18;93(25-26):975-985.

- Trott O, Olson AJ. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. Jan 30; 31(2): 455-61.
- Tsai J, Ford ES, Zhao G, Li C, Greenlund KJ, Croft JB. (2012). Co-occurrence of obesity and patterns of alcohol use associated with elevated serum hepatic enzymes in US adults. *Journal of Behavioral Medicine*. Apr;35(2):200-10.
- Tu HT, Silvestre F, Scippo ML, Thome JP, Phuong NT, Kestemont P. (2009). Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Jul;72(5):1463-70.

U

V

- Vaisi-Raygani A, Tavilani H, Zahrai M, Rahimi Z, Sheikh N, Aminian M, Pourmotabbed T. (2009). Serum butyrylcholinesterase activity and phenotype associations with lipid profile in stroke patients. *Clinical Biochemistry*. Feb;42(3):210-4.
- Vallianou NG, Evangelopoulos AA, Bountziouka V, Bonou MS, Katsagoni C, Vogiatzakis ED, Avgerinos PC, Barbetseas J, Panagiotakos DB. (2014). Association of butyrylcholinesterase with cardiometabolic risk factors among apparently healthy adults. *Journal of Cardiovascular Medicine*. (Hagerstown). May;15(5):377-83.
- Varela-Rey M, Martínez-López N, Fernández-Ramos D, Embade N, Calvisi DF, Woodhoo A, Rodríguez J, Fraga MF, Julve J, Rodríguez-Millán E, Frades I, Torres L,

Luka Z, Wagner C, Esteller M, Lu SC, Martínez-Chantar ML, Mato JM. (2010). Fatty liver and fibrosis in glycine N-methyltransferase knockout mice is prevented by nicotinamide. *Hepatology*. 52(1):105-114.

- Velan B, Kronman C, Ordentlich A, Flashner Y, Leitner M, Cohen S, Shafferman A. (1993). N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochemical Journal*. Dec 15;296 (Pt 3):649-56.
- Vidal CJ. (1996). Glycosylation of cholinesterases and its alteration in some pathological processes. *Recent Research Development Neurochemistry*. 1:37-54.
- Villeda-González JD. (2016). Tesis de Maestría. Posgrado en Biología Experimental. UAM-I.

W

- Wu G, Zhang L, Li T, Lopaschuk G, Vance D, Jacobs R. (2012). Choline deficiency attenuates body weight gain and improves glucose tolerance in ob/obmice. *International Journal of Obesity*. 7.

X

Y

- Yamchuen P, Aimjongjun S, Limpeanchob N. (2014). Oxidized low density lipoprotein increases acetylcholinesterase activity correlating with reactive oxygen species production. *Neurochemistry International*. Dec;78:1-6.
- Yan Q, Briehl M, Crowley CL, Payne CM, Bernstein H, Bernstein C. (1999). The NAD⁺ precursors, nicotinic acid and nicotinamide upregulate glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA in Jurkat cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 255(1):133-136.

- Yokota S, Nakamura K, Ando M, Kamei H, Hakuno F, Takahashi S, Shibata S. (2014). Acetylcholinesterase (AChE) inhibition aggravates fasting-induced triglyceride accumulation in the mouse liver. *FEBS Open Bio*. Oct 22;4:905-14.
- Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metabolism*. 14(4):528-536.

Z

- Zimmerman G, Soreq H. (2006). Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and Tissue Research*. Nov;326(2):655-69.
- Zom R, Van Baal J, Goselink R, Bakker J, de Veth M, Van Vuuren A. (2011). Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 94:4016 – 4027.

13. Anexos



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Nicotinamide reduces inflammation and oxidative stress *via* the cholinergic system in fructose-induced metabolic syndrome in rats

J.D. Villeda-González^{a,b}, J.L. Gómez-Olivares^c, L.A. Baiza-Gutman^d, L. Manuel-Apolinar^e, L. Damasio-Santana^e, C. Millán-Pacheco^f, S. Ángeles-Mejía^d, M.C. Cortés-Ginez^b, M. Cruz-López^b, C.J. Vidal-Moreno^g, M. Díaz-Flores^{b,*}

^a Programa de Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, México City, México

^b Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades "Bernardo Sepúlveda Gutiérrez" Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

^c Laboratorio de Biomembranas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, México City, México

^d Laboratorio en Biología del Desarrollo, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

^e Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Hospital de Especialidades "Bernardo Sepúlveda Gutiérrez" Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

^f Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

^g Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Universidad de Murcia, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Metabolic syndrome
Acetylcholinesterase
Butyrylcholinesterase
Nicotinamide
Fructose

ABSTRACT

Aims: Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) have been associated with risk factors for metabolic syndrome (MetS). Our objective was to evaluate the effect of nicotinamide (NAM) on the activities, expression and protein content of cholinesterases in a MetS model.

Main methods: MetS was induced in male rats administering 40% fructose to the drinking water for 16 weeks. Additionally, from 5th week onward, the carbohydrate solution was replaced by NAM, at several concentrations for 5 h each morning for the next 12 weeks. In the 15th week, the glucose tolerance test was conducted, and blood pressure was measured. After the treatment period had concluded, the biochemical profile; oxidant stress; proinflammatory markers; and the activity, quantity and expression of cholinesterases were evaluated, and molecular docking analysis was performed.

Key findings: The MetS group showed anthropometric, hemodynamic and biochemical alterations and increased cholinesterase activity, inflammation and stress markers. In the liver, cholinesterase activity and mRNA, free fatty acid, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels were increased, while reduced glutathione (GSH) levels were decreased. NAM partially or totally decreased risk factors for MetS, markers of stress and inflammation, and the activity (serum and liver) and expression (liver) of cholinesterases. Molecular docking analysis showed that NAM has a greater affinity for cholinesterases than acetylcholine (ACh), suggesting NAM as an inhibitor of cholinesterases.

Significance: Supplementation with 40% fructose induced MetS, which increased the activity and expression of cholinesterases, oxidative stress and the inflammation. NAM attenuated these MetS-induced alterations and changes in cholinesterases.

1. Introduction

Fructose overload generates metabolic syndrome (MetS) [1,2], which favors the production of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines can generate type 2 diabetes (T2D). The

acetylcholinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE, E.C.3.1.1.8) enzymes regulate the neuromuscular cholinergic system, and recent research has shown their relationship to risk factors for MetS [3,4]. In addition, an increase in their activities maintains hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), eliminating

* Corresponding author at: Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades (1er. Piso), "Bernardo Sepúlveda Gutiérrez" Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, C.P. 06725 Ciudad de México, México.

E-mail address: mardiaz2001@yahoo.com (M. Díaz-Flores).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117585>

Received 30 November 2019; Received in revised form 28 February 2020; Accepted 20 March 2020

Available online 31 March 2020

0024-3205/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

anti-inflammatory regulation mediated by the cholinergic system [5].

The presynaptic neurons of the vagus nerve secrete ACh, which is captured by muscarinic and nicotinic receptors; specifically, nicotinic $\alpha 7$ receptor ($\alpha 7nAChR$) regulates the translocation of nuclear factor kappa-beta ($NF\kappa-\beta$) to the nucleus and synthesis of proinflammatory cytokines, a mechanism called the cholinergic anti-inflammatory pathway [6].

Numerous studies have associated the elevated activity of both cholinesterases with body mass index (BMI), dyslipidemia, hypertension, increased triacylglycerols (TGs), low-density lipoprotein (LDL), C-reactive protein and proinflammatory cytokines [7–9]. In contrast, the activity of these cholinesterases is associated with decreased high-density lipoprotein (HDL).

For this reason, AChE and BChE have been proposed as early markers of MetS and as therapeutic targets to counteract low-level systemic inflammation, lipid synthesis and oxidative stress, factors associated with MetS development.

Nicotinamide (NAM) is an amide derived from nicotinic acid and the main precursor for nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) formation [10]. NAM supplementation could be beneficial due to the antioxidant, anti-inflammatory [11,12], immunoregulatory and antitumorigenic actions [13], which could be mediated by the synthesis of NAD^+ . Additionally, NAD^+ and cofactors derived from NAD^+ , such as reduced/oxidized NAD (phosphate), are intimately involved in all essential bioenergetic, anabolic and catabolic pathways and contribute to posttranslational protein modification. NAM prevents pancreatic β -cell death by inhibiting poly-(ADP-ribose) polymerases and nitric oxide formation [14]. In addition, NAM inhibits NAD^+ -dependent deacetylase or sirtuins (SIRT) in obese rats with T2D [15,16], preventing alterations in glucose metabolism and hepatic steatosis. The inhibition of SIRT stops the activation of acetyl-CoA synthetase and therefore the production of acetyl-CoA, a precursor of fatty acids associated with steatosis. A study by our group showed that NAM supplementation decreased oxidative stress and lipid accumulation by modulating glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity in 3 T3-L1 adipocytes grown with high glucose [17]. Furthermore, NAM decreased lipid synthesis and improved antioxidant systems and steatosis in the livers of rats that consumed sucrose or fructose [12]. Recently, we reported that NAM improved nonalcoholic steatohepatitis, preventing lipid accumulation, the inflammatory response and oxidative stress in rats supplemented 40% fructose [18].

The purpose of this study was to evaluate whether NAM attenuates increases in AChE and BChE activities, improving anti-inflammatory cholinergic signaling and decreasing risk parameters for MetS.

2. Material and methods

2.1. Materials

The chemicals used in this study were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). An RNeasy isolation kit (Qiagen, Valencia, California, USA), TriPure isolation reagent (Roche, Indianapolis, USA), a First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Massachusetts), Fast Start DNA Master SYBR Green Plus (Roche, Mannheim, Germany), polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore, Bedford, MA, USA), protease inhibitor (GenDEPOT, Houston, Texas, USA), a rat insulin ELISA kit (ALPCO, New Hampshire, USA), Free Fatty Acid Quantification Kit (BioVision, Milpitas, California, USA), rat IL-6 standard ABTS ELISA kit (PeproTech, Inc., Rocky Hill, New Jersey, USA) and rat TNF- α immunoassay ELISA kit (R&D, Systems, Inc., Minneapolis, USA) were also used. The primers used were manufactured by Invitrogen (California, USA), and primary antibodies against AChE and BChE were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, USA).

2.2. Animals

Male Sprague Dawley rats (250 ± 5 g) were provided by the Vivarium of the National Medical Center Century XXI of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). The rodents were acclimatized to a 12/12-h light/dark cycle and ventilation to ensure optimum humidity (50%) and temperature (23°C) conditions.

2.3. Ethical statement

The experimental design and animal management protocols were approved by the Local Committee of Research and Ethics in Health of the IMSS with the register number R-2017-3601-145 in accordance with the Official Mexican Standard for the Care and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999, revised 2001).

2.4. Metabolic syndrome induction and treatments

Thirty animals were randomly distributed into 5 groups and subjected to the following treatments: 1) control, 2) metabolic syndrome (MetS), 3) metabolic syndrome and 5 mM NAM (MetS-NAM5), 4) metabolic syndrome and 10 mM NAM (MetS-NAM10) and 5) metabolic syndrome and 15 mM NAM (MetS-NAM15). MetS was induced by dissolving 40% fructose in the drinking water and providing the supplemented drinking water for 16 weeks *ad libitum*; however, from the 5th week onward, for 5 h each morning, carbohydrate-free drinking water containing different concentrations of NAM was provided. Additionally,

Metabolic syndrome induction and treatment

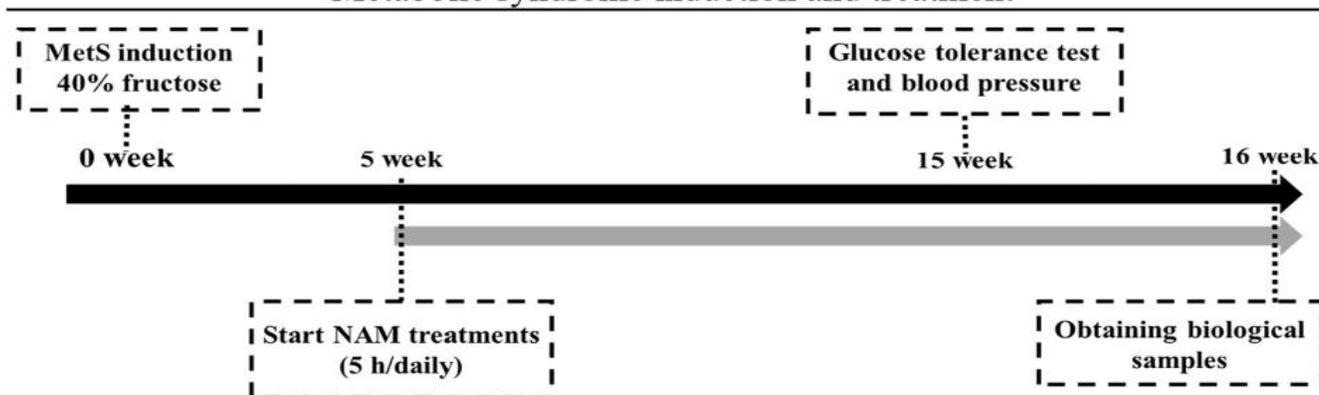


Diagram 1. Schematic illustration of the induction of MetS and treatment with NAM.

the MetS group received carbohydrate-free water for 5 h each morning. After 5 h, the treatments were withdrawn, and the administration of fructose was continued (Diagram 1). All animals were given *ad libitum* access to chow (Purina, 5008). During the treatment period, the consumption of food and liquids and body weight were recorded.

2.5. Glucose tolerance test

Starting in the 15th week, the glucose tolerance test was conducted for all fasting animals for 6 h. Prior to the test, the basal glucose concentration in a blood sample obtained from a sagittal section of the rat tail was measured with a FreeStyle Optium glucometer (Abbott Laboratories, Madrid, Spain). A 50% glucose solution (2 g/kg of weight, i.p.) was then administered, and the blood glucose concentration was measured 30, 60, 90, and 120 min after the administration of this solution.

2.6. Arterial pressure measurement

Blood pressure in the tail of the rat was measured at the end of the 15th week using a CODA high-throughput noninvasive blood pressure system (NBT New Biotechnology, Ltd., Jerusalem, Israel).

2.7. Biological sample acquisition

At the end of the treatment period, the animals were weighed and anesthetized with pentobarbital (25 mg/kg, i.p.). Blood samples were obtained by cardiac puncture and placed in tubes with or without anticoagulant (EDTA). Subsequently, the animals were sacrificed by cervical dislocation. Liver fragments were removed, and some liver fragments were stored in TriPure, while the remaining fragments were stored at -70°C until use. Blood samples were centrifuged at $5200 \times g$ for 15 min in a Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6 R centrifuge. Serum and plasma were stored at -70°C and thawed immediately before use.

2.8. Analysis of metabolic markers

Concentrations of the serum markers total cholesterol (TC), TGs, HDL, and very low-density lipoprotein (VLDL) were determined using a SPOTCHEM EZ SP-4430 automated analyzer (ARKRAY, Inc., Miami, Florida, USA).

2.9. Quantification of insulin, free fatty acids and proinflammatory cytokines

The levels of insulin, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured in duplicate by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following the manufacturer's protocols. Plates were read at an absorbance of 450 nm using an ELISA microplate reader (LabSystems Multiskan EX 96-well microplate reader, Helsinki, Finland). Intra-assay coefficients of variation $> 7\%$ were considered acceptable. A standard curve was also generated for each assay. Free fatty acids (FFA) were quantified using a colorimetric kit, and the absorbance was obtained at 570 nm.

2.10. Determination of reduced and oxidized glutathione levels

The liver fragments were homogenized (10% w/v) in 5% metaphosphoric acid or 0.1 M PBS, pH 7.5, to determine the reduced glutathione (GSH) or oxidized glutathione (GSSG) concentrations, respectively. The homogenates were centrifuged at $23,314 \times g$ and 4°C for 20 min, and the supernatants were used for the measurements. GSH in the serum and supernatants was determined spectrophotometrically using Ellman reagent [5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), DTNB]. This assay is based on the stoichiometric reaction between DTNB and the

thiol group of GSH. The product, nitromercapto benzoate, has a maximum absorbance at 412 nm proportional to the GSH concentration [19]. An enzymatic method was used to determine the GSSG concentration after the supernatant had been treated with 10 mM 1-methyl-2-vinylpyridium trifluoromethanesulfonate, which sequesters thiol groups without interfering with the glutathione reductase (GR) present in the assay. In this assay, GSSG is reduced to GSH by GR in the presence of NADPH, and the generated GSH is quantified using Ellman reagent. The color change during the reaction and the reaction rate are proportional to the concentrations of GSH and GSSG.

2.11. Determination of the degree of lipoperoxidation

Aliquots of liver homogenates (in 0.1 M PBS, pH 7.5) and serum were used to determine the degree of lipoperoxidation evaluated as TBARS by a spectrophotometric technique [20]. The foundation of this method is the reaction between thiobarbituric acid (TBA) and the lipoperoxidation product malondialdehyde, which produces TBARS. Briefly, 10% trichloroacetic acid was added to each serum aliquot and liver homogenate; the mixtures were maintained on ice and then centrifuged at $23,314 \times g$ and 4°C for 15 min. TBA was added to the supernatants, which were then shaken vigorously and incubated at 100°C for 60 min, cooled to room temperature, mixed, and centrifuged, following which the absorbance at 535 nm was read. A reference standard was prepared with 1,1,3,3-tetramethoxypropane.

2.12. Paraoxonase 1 specific activity assay

The activity of paraoxonase 1 (PON1) in serum was determined according to the methods of Beltowski et al. [21]. The reaction mixture consisted of a prepared mixture of serum, $5 \mu\text{M}$ physostigmine (to inhibit other nonspecific esterases) and 2 mM paraoxon (as a substrate) in 100 mM Tris-hydrochloride with 2 mM calcium chloride at pH 8. The formation of *p*-nitrophenol was monitored spectrophotometrically at 412 nm for 5 min. PON1 activity is expressed as U/mg protein. Protein quantification was performed using the modified Lowry method [22].

2.13. BChE and AChE specific activity assay

Liver fragments were homogenized (10% w/v) in 15 mM Tris-hydrochloride, pH 7.5 (containing 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and 3 mM EDTA). The homogenate was centrifuged at $23,314 \times g$ and 4°C for 15 min (Thermo Scientific Sorvall ST40R).

BChE and AChE activity was determined by the Ellman method [23] with samples pretreated with specific inhibitors of each enzyme ($50 \mu\text{M}$ isoOMPA and $10 \mu\text{M}$ BW284C51, respectively) for 20 min at room temperature. The reaction mixture contained serum or supernatant from the homogenate, 0.01 M DTNB in 0.1 M PBS and thio analogues of the natural substrates of BChE and AChE (1 mM butyrylthiocholine and 1 mM acetylthiocholine, respectively). DTNB oxidizes free thiol groups, producing 5-thio-2-nitrobenzoate, which has a yellow color and absorbs at 412 nm, in levels proportional to the activity. Activity is expressed as U/mg protein. Proteins were quantified using the modified Lowry method [22].

2.14. RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated using TriPure reagent following the manufacturer's protocol. To verify the purity of the RNA from each sample, the absorbance at 260 and 280 nm was measured, and a ratio between the absorbance at 260 nm and 280 nm of 1.9 ± 0.2 was consistent with the absence of protein contaminants. To confirm the RNA integrity, $1 \mu\text{g}$ of RNA was subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel, and the RNA was stained with ethidium bromide and visualized using an imaging analyzer (Bio-Rad). Two main ribosomal bands (28S and 18S rRNA) were detected and showed no RNA degradation. From $2 \mu\text{g}$ of

Table 1
Oligonucleotide sequences.

	Sense Fw 5'-3'	Antisense Rv 5'-3'	Size (bp)	Tm (°C)
BChE	TGCCCTGCACTGGAGTTTAC	CCACACTGTGCTATTGCCCT	273	58
AChE	CTGGGTTTGAGGGTACCGAG	TGAGGACAGGTGTGGGAGAA	114	62
AChE-H	CCACAGCCACAGAGGTTCC	GGAGTGGAGGAGGAAAAGGA	116	62
AChE-R	CTCAGGGCCACAGGTTAG	TCTCTCCGTCTTCCAAC	76	57
AChE-T	CAGCAATACGTGAGCCTGAA	CTCGTCCAGCGTGTCTGT	123	59
18S	ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG	CGCTGAGCCAGTTCAGTGTA	218	59

total RNA, cDNA was synthesized using a Thermo Scientific First Strand cDNA synthesis kit according to the manufacturer's protocols in a final volume of 20 µL. qPCR was performed in a final volume of 20 µL on a LightCycler 2.0 using Fast Start DNA Master Plus SYBR Green Plus (Roche). The qPCR mixtures contained 0.5 mM primers, the sequences of which are provided in Table 1, and the 18S gene was used as an internal control. PCR was performed in duplicate with the following reaction conditions: initial step of 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 10 s, 61 °C for 7 s and 72 °C for 10 s. Quantified BChE and AChE expression is expressed as relative mRNA levels compared to the control. Relative gene expression after normalization to the 18S gene was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.15. Western blot analysis

Liver homogenates (10% w/v) were prepared with lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Tween 20, 0.2% NP-40, and protease inhibitors. After centrifugation at 23,314 ×g for 20 min, aliquots of supernatants containing an equal amount of protein (40 µg) were separated by 10% SDS-PAGE, and the proteins were transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked with 5% albumin in Tris-buffered saline Tween (TBS-Tw) for 2 h and incubated at 4 °C overnight with primary anti-BChE, anti-AChE and anti-β-actin antibodies (1: 1000 in 1% bovine serum albumin (BSA) and TBS-Tw). The membranes were washed and then incubated at room temperature for 2 h with peroxidase-labeled anti-rabbit or anti-mouse (1:2000) secondary antibodies. Bands were detected with an Amersham ECL Plus chemiluminescence system (GE Healthcare Life Sciences; Piscataway, New Jersey, USA) and a Kodak Gel Logic 200 imaging system/scanner (Rochester, New York, USA).

2.16. Molecular docking analysis

Human BChE (PDBID: 6AQB) and AChE (PDBID: 4M0E) were used in this study. Hydrogen atoms were added to both structures using the CHARMM-GUI server [24], and energy was minimized with 100 steps of steepest descent with freely available CHARMM version 44b1 [25,26] using CHARMM36 parameters [27]. The structures of ACh and NAM were obtained from the PubChem database, and the best conformer for both structures was obtained by using MarvinSketch version

19.20 [28].

One thousand independent docking experiments were performed for both proteins using AutoDock Vina [29]. A grid of 15 Å³ was centered on the mass center of each binding site (AChE: S203, E334, H447. BChE: S198, E325, H438). RMSD values were calculated using in-house scripts. Only the results from the most populated cluster (RMSD < 2 Å) are presented. Images were obtained using VMD [30] and Maestro [31].

2.17. Statistical analysis

The results are expressed as the mean ± standard error (SE). Comparisons between groups were performed with ANOVA, and the Tukey-Kramer test was used for analyses between groups. The normality of all data was first verified using IBM SPSS Statistics V.21 software. Statistical calculations were confirmed with GraphPad Prism 6 software (Kaysville, UT, USA), and values of *p* < 0.05 indicated statistical significance.

3. Results

3.1. Fructose induces MetS by altering some biochemical and anthropometric parameters

The sustained consumption of fructose produces caloric overload, leading to weight gain, increased TGs and VLDL levels and blood pressure, and decreased HDL levels; these changes can be used to confirm the presence of MetS.

Compared with the control group, the MetS group showed a 20% weight gain and the highest increases in TGs (20%), VLDL (24%) and systolic and diastolic pressure (15 and 18%, respectively) among treatment groups, which occurred in parallel with a decrease in HDL (30%). Supplementation with NAM at different concentrations decreased weight gain and risk markers for MetS. Compared to the corresponding parameters in the MetS group, NAM at different concentrations decreased the TGs (10%; 10 and 15 mM NAM), FFA (~13%; 5 and 10 mM NAM), VLDL (42%; 5 mM NAM), systolic pressure (22%; 5 mM NAM) and diastolic pressure (23%; 5 mM NAM) and increased the HDL (by ~25%; 10 and 15 mM NAM) (Table 2).

The consumption of food and fructose is presented as caloric intake in Fig. 1S of the supplement section.

Table 2
Effect of NAM on risk markers for MetS in rats.

	Control	MetS	MetS-NAM5	MetS-NAM10	MetS-NAM15
Weight gain (g)	242.7 ± 15	307.3 ± 4*	274.3 ± 6**	275 ± 12**	247.5 ± 13**
TC (mg/dL)	114.3 ± 6.4	101.2 ± 1.1	100.0 ± 1.0	102.5 ± 2.1	105.0 ± 7
TGs (mg/dL)	148.6 ± 2.4	184.0 ± 3.6*	177.5 ± 2.4**	165.0 ± 1.0**	164.5 ± 3.5**
HDL (mg/dL)	43.0 ± 1.4	28.0 ± 2.8*	29.0 ± 2.8	35.0 ± 1.4**	35.5 ± 3.5**
VLDL (mg/dL)	29.7 ± 0.5	36.8 ± 0.7*	21.5 ± 0.5**	33 ± 0.2**	32.9 ± 0.7**
SBP (mmHg)	136.5 ± 9.1	160.3 ± 5.6*	124.7 ± 10.4**	140.7 ± 4.1**	143.2 ± 4.2**
DBP (mmHg)	99.5 ± 13	121.6 ± 5.0*	93.2 ± 6.9**	102.2 ± 9.3**	108.7 ± 6.9**
FFA (nmol/µL)	4.24 ± 0.96	4.54 ± 0.21	4.01 ± 0.78**	3.88 ± 0.95**	4.30 ± 0.89**

Values are expressed as mean ± SE of 6 animals for group. **p* < 0.05 with respect to control group; ***p* < 0.05 with respect to MetS group. SBP, Systolic Blood Pressure; DBP, Diastolic Blood Pressure.

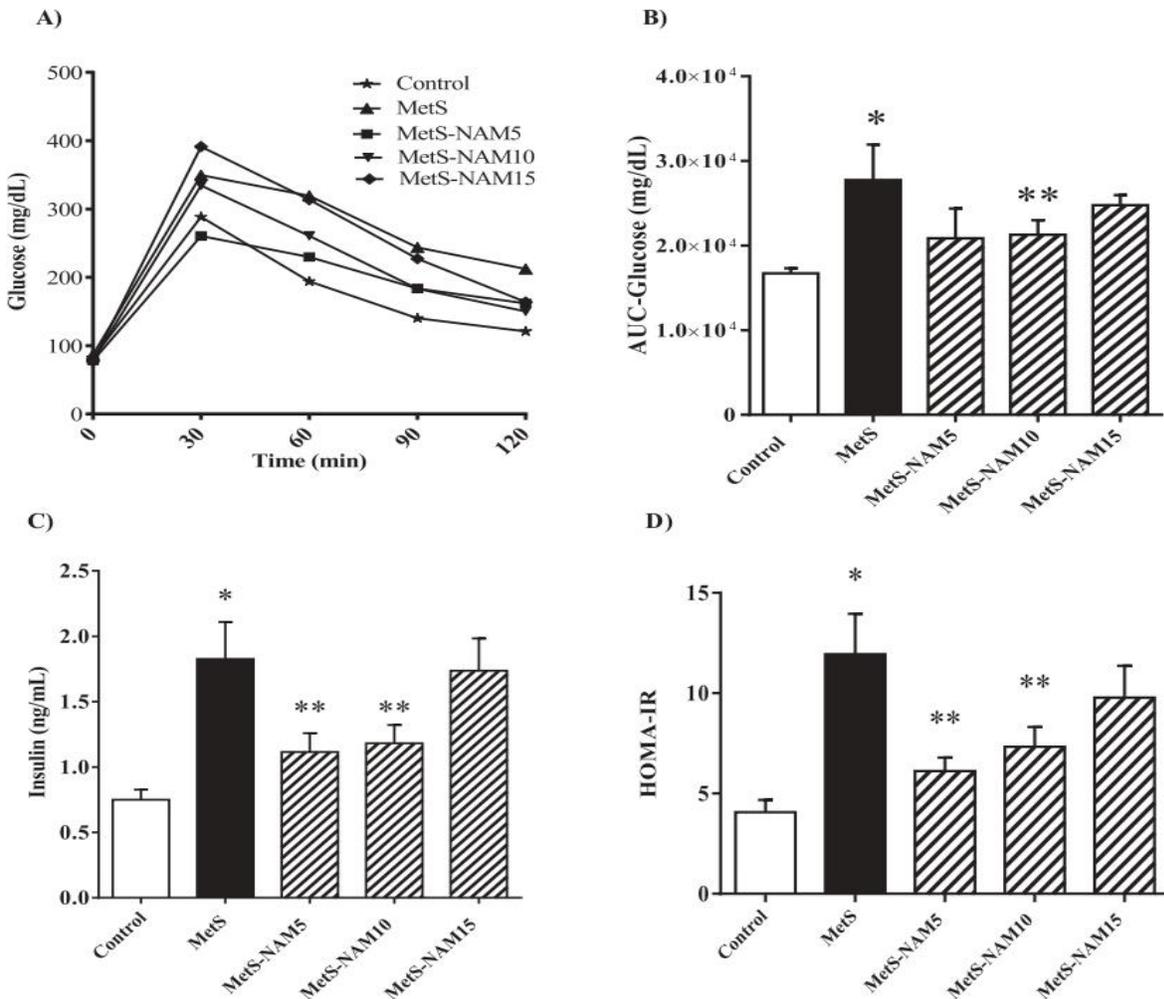


Fig. 1. Effect of NAM on glucose tolerance, insulin and IR-HOMA in a rat model of MetS. (A) Results of the oral glucose tolerance test, including basal glucose concentration (after a 6-h fast) and postload glucose concentrations at 30, 60, 90, and 120 min. (B) Area under the curve for the oral glucose tolerance test (AUC-glucose). (C) Serum insulin concentration and (D) IR-HOMA. Values are expressed as the mean \pm SE of 6 animals per group. * $p < 0.05$, with respect to the control group, ** $p < 0.05$, with respect to the MetS group.

3.2. NAM regulates the absorption of circulating glucose during the glucose tolerance test, insulin levels and the IR-HOMA index

The MetS group tolerated circulating glucose poorly during the tolerance test, and even though after 30 min glucose levels were not at their highest values, they remained elevated until the end of the test, ending 68% higher than glucose levels in the control group. On the other hand, NAM at the different concentrations used normalized circulating glucose values during the test, and glucose values at the end of the test were similar to those of the control group (Fig. 1A).

The area under the curve in the glucose tolerance test confirmed the increase in glucose in the MetS group by approximately 43% with respect to those in the control group. NAM administration decreased the total glucose value by 30% to a level similar to that in the control group; the most significant effect was observed with NAM at a 10 mM concentration (Fig. 1B).

The insulin concentrations in the MetS group increased by 62% with respect to those in the control group; NAM at 5 and 10 mM decreased (40%) this value (Fig. 1C). A similar effect was observed for the IR-HOMA index, which was increased by 65% in the MetS group with respect to the control group and decreased by 50, 40 and 25% following treatment with NAM at 5, 10 and 15 mM, respectively (Fig. 1D).

The IR-HOMA index was calculated by formula:

$$\text{IR - HOMA} = \frac{[\text{fasting glucose (mmol/l)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{IU/ml})]}{22.5}$$

3.3. NAM increases GSH and PON1 by decreasing FFA, TBARS and TNF- α

The metabolic and hemodynamic alterations characteristic of MetS induce lipoperoxidation and a low-level inflammatory reaction, as observed by the increased levels of TBARS (144%) and TNF- α (100%) and the decreased level of IL-6 (20%) and activity of PON1 (27%) in the MetS group compared to the control group. Furthermore, although serum GSH levels did not differ between any of the groups, compared to those in the control group, liver levels of GSH were decreased (13%), and GSSG (225%), TBARS (58%) and FFA (226%) levels were increased.

Treatment with NAM at the concentrations used significantly decreased TNF- α , and this effect was more pronounced with 15 mM NAM (29%). IL-6 followed a trend opposite that of TNF- α and was markedly (35%) increased with treatment with 15 mM NAM. Additionally, TBARS levels were significantly decreased (140%) with 5 and 10 mM NAM treatment. These decreases in inflammatory and oxidative markers were reflected in the increased activity of PON 1 (~30%) following treatment with 10 and 15 mM NAM. In the liver, NAM treatment

Table 3
Effect of NAM on inflammation and oxidant stress markers in MetS rats.

	Control	MetS	MetS-NAM5	MetS-NAM10	MetS-NAM15
Serum TNF- α (pg/mL)	7 \pm 1.67	14 \pm 2.99*	11 \pm 2.18**	11 \pm 2.66**	10 \pm 2.66**
IL-6 (pg/mL)	35 \pm 1.50	28 \pm 2.18*	34 \pm 3.15**	34 \pm 2.12**	38 \pm 6.54**
PON1 (mU/mg)	14.14 \pm 1.43	10.29 \pm 0.52*	9.29 \pm 1.37	13.13 \pm 1.06**	13.61 \pm 0.29**
GSH (μ M)	80.34 \pm 17.26	85.03 \pm 7.38	71.27 \pm 7.19	98.33 \pm 10.02	76.16 \pm 2.62
TBARS (nM)	0.38 \pm 0.07	0.93 \pm 0.08*	0.32 \pm 0.02**	0.35 \pm 0.11**	0.78 \pm 0.22
Liver					
GSH (μ M)	177.5 \pm 3.82	153.8 \pm 2.85*	172.1 \pm 5.17**	174.8 \pm 6.76**	174.4 \pm 1.42**
GSSG (μ M)	6.30 \pm 2.63	20.52 \pm 4.17*	11.96 \pm 2.33**	6.97 \pm 1.60**	6.14 \pm 1.79**
TBARS (nM)	9.40 \pm 0.76	14.83 \pm 0.15*	10.85 \pm 0.64**	8.09 \pm 0.24**	10.65 \pm 1.29**
FF (nmol/ μ L)	3.78 \pm 1.08	12.34 \pm 2.43*	6.56 \pm 2.04**	5.26 \pm 1.77**	8.84 \pm 2.27

Values are expressed as mean \pm SE of 6 animals for group. * p < 0.05 with respect to control group; ** p < 0.05 with respect to MetS group.

restored GSH levels, which were close to those of the control group, while GSSG levels were decreased (~68%) and close to those in the control group following treatment with 10 and 15 mM NAM. In addition, the FFA was decreased by 55% following treatment with NAM at concentrations of 10 and 15 mM (Table 3).

3.4. NAM reduces BChE and AChE expression and activity in the liver and serum activity

The MetS group showed increased serum BChE and AChE activities, were 14% and ~10% higher, respectively, than those in the control group (Fig. 2). Treatment with NAM at different concentrations regulated the activities of both cholinesterases in a dose-dependent manner (Fig. 2).

The MetS group also exhibited an increase in the activities of both cholinesterases in the liver by 40% (for BChE) and 90% (for AChE) compared to those in the control group. NAM treatment also decreased the activities of both enzymes; significant differences were observed following treatment with NAM at concentrations of 5 and 10 mM. In the case of BChE, 5 mM NAM decreased its activity by 13%, and 10 mM NAM decreased its activity by 22%; in the case of AChE, 10 mM NAM treatment decreased its activity by 28% compared to that in the MetS group. Treatment with 15 mM NAM had no effect on the activities of both enzymes in the liver (Fig. 3).

The expression of BChE in the MetS group was increased 2.5-fold compared to that in the control group. The expression of AChE was 1.5-

fold greater than that in the control group. [Notably, the AChE H, R and T transcripts showed behavior similar to that of the overall AChE transcript, so we decided to report only the overall AChE transcript, as it was the most representative.] Treatment with NAM at different concentrations regulated the expression of both enzymes; in the case of BChE, NAM at 5 mM reduced their expression by 50% compared to the MetS group, while NAM at 10 and 15 mM decreased their expression by approximately 75%. The decrease in AChE expression was significant following treatment with NAM at 10 and 15 mM and decreased by 50% compared to that in the MetS group (Fig. 3). No differences in the protein amount were observed.

3.5. NAM interacts with the BChE and AChE catalytic sites

ACh and NAM were docked on AChE and BChE to explore their affinities for both proteins. The results of docking simulations for the most populated cluster are presented in Table 4. As noted, NAM had a lower affinity for both proteins. Interaction maps showed that NAM engaged in π - π interactions with W86 and Y337 on AChE and W231 and F329 on BChE. ACh (a larger molecule than NAM) appeared to engage in a greater number of interactions with both proteins (22 with AChE and 23 with BChE) than NAM (16 with AChE and 15 with BChE). However, the interactions of ACh with the proteins appeared to be weaker than those of NAM, explaining its lower affinity. Fig. 4 shows the positions of the ligands on both enzymes and their corresponding interaction maps.

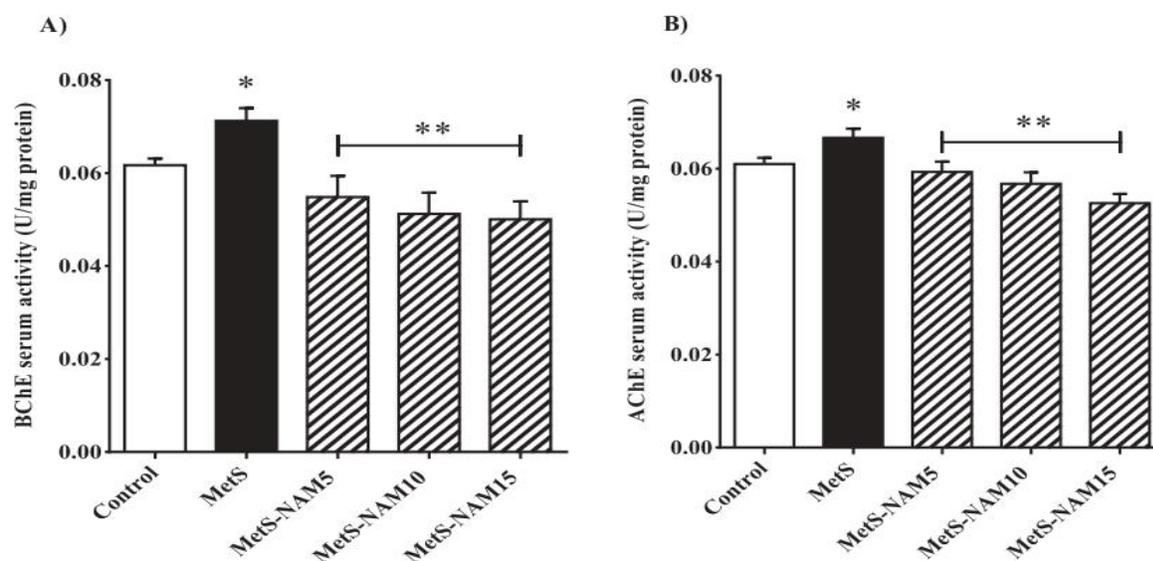


Fig. 2. Effect of NAM on the activities of serum BChE and AChE. The activities of BChE (A) and AChE (B). Values are expressed as the mean \pm SE of 6 animals per group, * p < 0.05, with respect to the control group, ** p < 0.05, with respect to the MetS group.

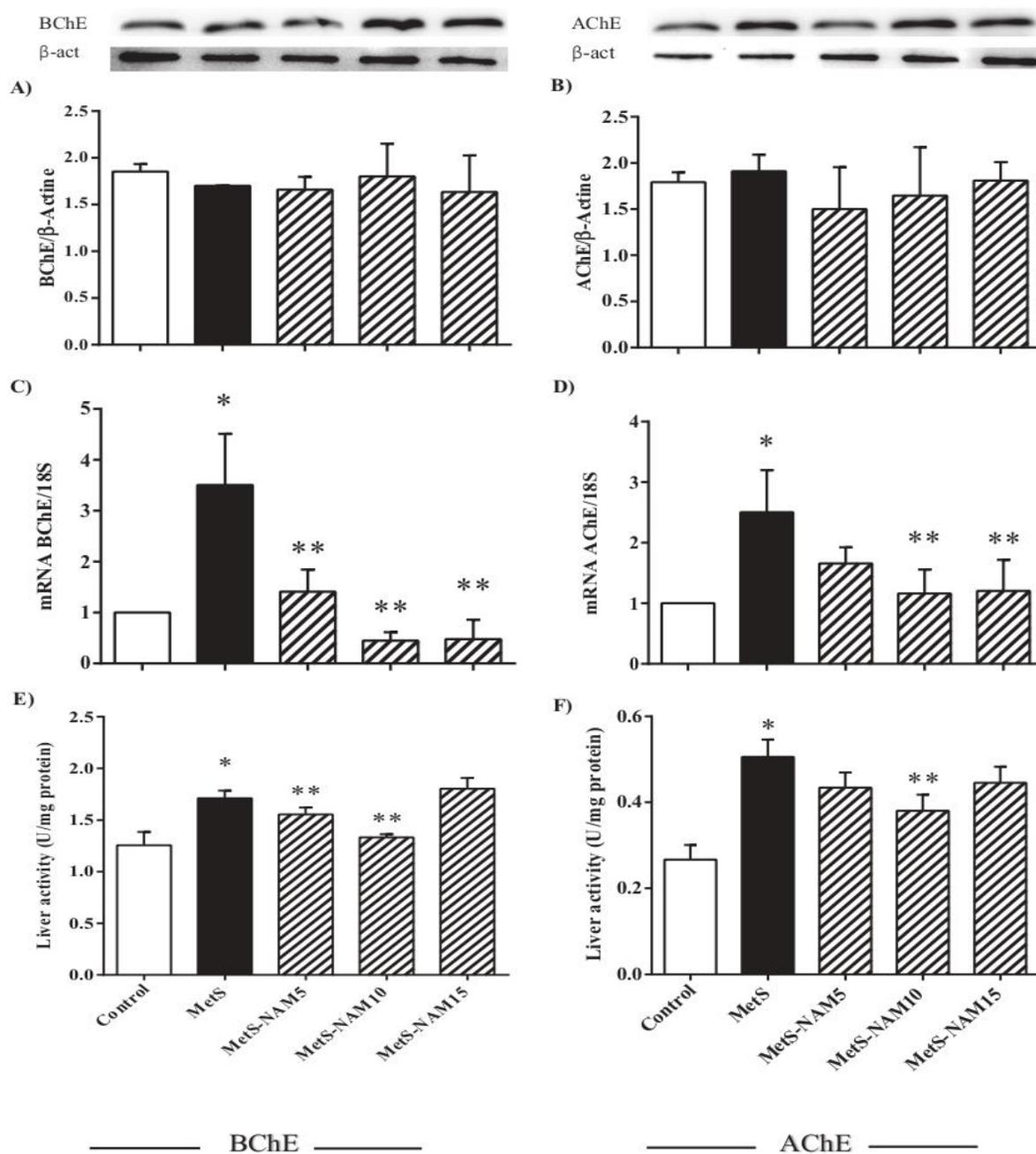


Fig. 3. Effect of NAM on the levels, expression and hepatic activity of BChE and AChE. (A) Levels, (C) expression, and (E) activity of BChE. (B) Levels, (D) expression, and (F) activity of AChE. Values are expressed as the mean \pm SE of 6 animals per group. * $p < 0.05$, with respect to the control group, ** $p < 0.05$, with respect to the MetS group.

Table 4
Affinity energies between both enzymes with ACh and NAM substrates.

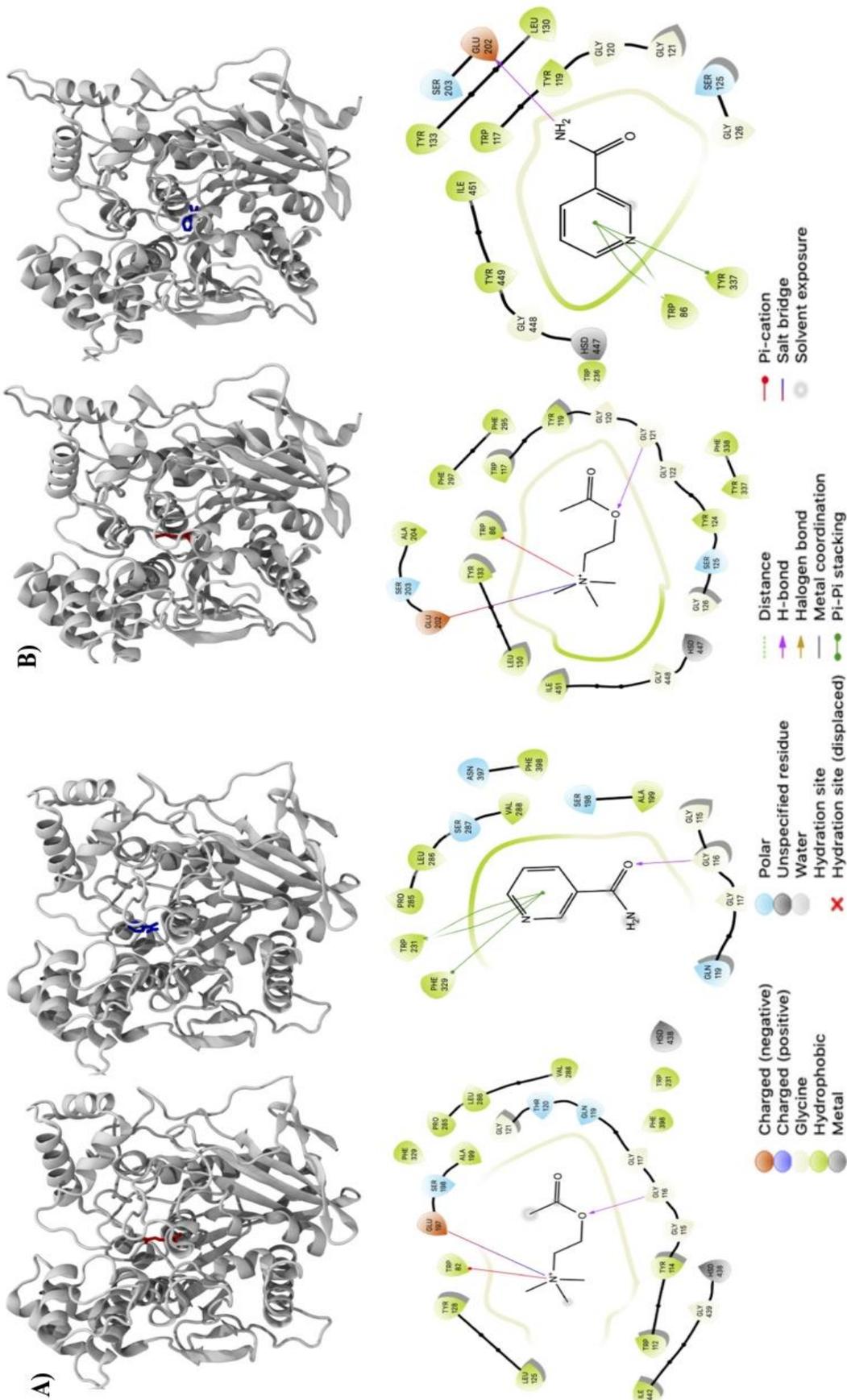
Affinity energies (kcal/mol)	Affinity energies (kcal/mol)	
	Acetylcholine	Nicotinamide
BChE	-4.69 \pm 0.03	-5.00 \pm 0.00
AChE	-4.79 \pm 0.04	-5.75 \pm 0.09

4. Discussion

The present study shows that the excessive consumption of fructose triggers biochemical, anthropometric and hemodynamic alterations characteristic of MetS and the increased activity of serum and liver BChE and AChE. NAM was shown to prevent or mitigate these changes induced by MetS. Based on molecular modeling studies, we suggest that NAM interacts directly with cholinesterase to inhibit its activity.

Various characteristics of MetS, such as weight gain and increases in TGs, FFA and blood pressure, were developed in the experimental model of MetS used, consistent with previous studies [32–35].

Weight gain in the MetS group was the first link in a chain of



AChE

BChE

Fig. 4. Acetylcholine and nicotinamide interaction sites. (A) BChE and (B) AChE. NAM and ACh were docked on AChE and BChE. Proteins are shown by cartoon representation, and ligands are shown as sticks (ACh, red; NAM, blue). Protein-ligand interactions are shown at the bottom of the images. As expected, protein-ligand interactions are primarily hydrophobic. Charged or polar interactions with AChE occur via E202, S203, and S125. Charged or polar interaction with BChE occur via Q119, T120, E197, S198, S287, and N397. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

metabolic alterations that can be explained, in part, by the joint effects of *de novo* lipogenesis and adipogenesis. *De novo* lipogenesis induced by fructose is derived from activation of proteins that bind the response elements of sterols and carbohydrates (SREBP-1c and ChREBP, respectively), which in turn induces lipogenic enzymes, leading to the production of palmitic acid [36] and dyslipidemia, which explains the observed increases in TGs, FFA, VLDL and decreased HDL. On the other hand, an increase in VLDL contributes to adipogenesis, since the increased expression of adaptor protein 2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma are both markers of this process. In parallel, fructose activates 11 β -Hydroxy steroid dehydrogenase and hexose-6-phosphate dehydrogenase, generating active glucocorticoids, which induce adipogenic genes [37], explaining the weight gain observed in the MetS group with respect to the control group. A decrease in HDL is the result of TGs synthesis; *via* lipogenesis, HDL is preferably transported into the circulation in the form of VLDL, an effect shown to be increased by glucose- or fructose-induced ApoCIII (an apoprotein that binds VLDL) transcription, but not ApoB100 (an apoprotein that binds HDL) transcription, in rat and human hepatocytes by ChREBP [38].

Despite normoglycemic conditions, glucose tolerance was altered, and hyperinsulinemia and increased IR-HOMA, indicating insulin resistance, were observed. The accumulation of diacylglycerols derived from an increase in fatty acids activates protein kinase Θ , which phosphorylates serine 101 of insulin-1 receptor substrate (IRS-1), interrupting insulin signaling. It was previously shown that fatty acids stimulate the hexosamine pathway, increasing the production of glucosamine-6-phosphate and indirectly activating glycogen synthase kinase-3, which consequently phosphorylates serine 332 of IRS-1 and alters insulin signaling [39].

Through these first alterations, a series of events that lead to hypertension are triggered by changes in endothelial function, promoting arterial stiffness. Insulin resistance by increased release of the natriuretic-C peptide receptor decreases vasodilator peptides, contributing to endothelial dysfunction [40,41]. Additionally, ATP consumed during the phosphorylation of fructose is converted to AMP, which, through hypoxanthine, becomes a precursor of uric acid, a metabolite toxic to the vascular endothelium that causes hypertension [42]. The low bioavailability of vasodilators, such as nitric oxide (NO), has been observed due to an increase in fructose-induced ROS [43]. In particular, the reaction of NO with superoxide anion, generates peroxynitrite, a consequence of low superoxide dismutase activity and reduced concentrations of GSH. Parallel to this, an increase in cholinesterase, as observed in this study, can lead to a decrease in another important vasodilator, serum and hepatic ACh [44].

GSH has the ability to trap different ROS produced by the mitochondrial respiratory chain, endoplasmic reticulum stress and an increase in the enzymes NADPH oxidase and xanthine oxidase. Together, these factors contribute to generating oxidizing conditions, explaining the increase in serum and liver TBARS as well as the decrease in hepatic GSH in the absence of changes in serum GSH. The latter effect could be because GSH is synthesized in the liver and distributed to tissues and organs following ROS-induced insult.

Another antioxidant marker evaluated in the present study was the activity of PON1 (E.C. 3.1.8.1) an arylalkylphosphatase that degrades lipid peroxides in HDL and LDL. The low activity of PON-1 in the MetS group is another indicator of decreased antioxidant defenses in MetS, and could be explained due that hyperinsulinemia, dyslipidemia and oxidative stress decrease the activity of PON1, in part, because this enzyme can be glycosylated during the development of metabolic disorders [45]. NAM by reducing TBARS, GSSG and increasing GSH improves the activity of PON1 and therefore restored HDL concentration.

The observed increase in TBARS and GSSG and decrease in hepatic GSH are consistent with the increase in cholinesterase activity and expression. As no changes in the protein amount were observed, the increase in mRNA expression and activity are associated with the rapid synthesis of enzymes in response to signaling and their posttranslational

modification. On the other hand, fructose consumption modified the glycosylation of serum AChE and BChE at sialic acid residues (preliminary data not shown). This carbohydrate is essential for determining the lifetime of the enzyme and assessing its degradation *via* the proteasome. If these residues are lost or masked by other carbohydrates, neither enzyme can be detected by the proteasome, extending their half-life and biological activities. ACh exerts an anti-inflammatory effect by inhibiting the translocation of NF κ - β and thus the synthesis of proinflammatory cytokines [46,47], mainly in immune cells and macrophages responsible for synthesizing systemic cytokines. Therefore, an increase in the activity of BChE and AChE caused the hydrolysis of ACh, preventing its anti-inflammatory effect and thus amplifying the inflammatory response; consistent with the increase in TNF- α and in contrast to low IL-6.

α 7nAChR is the main modulator of this effect, from which this anti-inflammatory cholinergic pathway has been described [46]. This same phenomenon occurs in the liver, where ACh, through of the vagus nerve, exerts its anti-inflammatory effect. The cholinesterases present in hepatocytes, red blood cells, and the serum constantly hydrolyze ACh, avoiding capture by immune cells, macrophages and Kupffer cells. In this way, they exert their anti-inflammatory effects. Hence, we suggest that the elevated activity of BChE and AChE contributes to inflammation during MetS.

Additionally, ACh exhibits vasodilator activity [44], and prevention of its degradation can contribute to reduced endothelial dysfunction, which is typical of MetS and diabetes mellitus, thus preventing hypertension.

Research on neurodegenerative diseases has revealed that an increase in ROS promotes cholinesterase activity, contributing to a reduction in ACh levels and affecting the synapse and cognitive and inflammatory processes. The use of plant extracts with antioxidant and anti-inflammatory properties has been observed to decrease the activity of both cholinesterases, confirming the relationship between oxidative stress and cholinergic activity [48]. Thus, we can conclude that oxidative stress is a key factor in the anti-inflammatory cholinergic pathway.

NAM at different concentrations decreased *de novo* lipogenesis and adipogenesis, reflected by decreased weight gain, dyslipidemia and insulin resistance. Recently, we demonstrated that NAM attenuated fructose-induced steatosis and nonalcoholic steatohepatitis by regulating NADP⁺-dependent enzymes, decreasing lipid accumulation and TBARS and increasing the GSH/GSSG ratio [12,18]. A similar effect was observed in cultured 3T3-L1 adipocyte cells, in which G6PD was subjected to noncompetitive mixed-type inhibition following the administration of NAM, which decreased lipid synthesis and improved the cellular redox system [17].

The present study addresses a possible mechanism by which NAM affects BChE and AChE and how NAM could regulate their expression and activity. Cholinesterase inhibitors promote cholinergic transmission in neurodegenerative diseases. Based on this argument, like galantamine, NAM could influence the catalytic sites of BChE and AChE and reduce their activity [49].

Molecular docking showed that the affinity of NAM for both enzymes was higher than that of ACh and predicted its stronger binding. The residues in AChE that interact with NAM are consistent with a study in which a link between AChE and caffeine link was observed. The authors of this study consider caffeine to be a noncompetitive inhibitor of AChE [50].

5. Conclusion

Our *in vivo* analysis supports a model defining NAM as a modulator of both cholinesterases, contributing to improved anti-inflammatory and vasodilator cholinergic pathways by attenuating ACh degradation in fructose-induced metabolic syndrome.

Supplementary data to this article can be found online at <https://>

doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117585.

Acknowledgments

The research was funded by Fondo de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/GH-2/1738). And to CONACyT for granting me the scholarship with registration number 570363 and No. CVU 634838.

References

- [1] L. Tappy, Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders, *J. Exp. Biol.* 7 (221) (2018) 1–9, <https://doi.org/10.1242/jeb.164202> Mar.
- [2] M.R. Taskinen, C.J. Packard, J. Borén, Dietary fructose and the metabolic syndrome, *Nutrients* 11 (9) (2019) 1–16, <https://doi.org/10.3390/nu11091987> Aug; 22.
- [3] P. Duchnowicz, A. Ziobro, E. Rapacka, M. Koter-Michalak, B. Bukowska, Changes in cholinesterase activity in blood of adolescent with metabolic syndrome after supplementation with extract from *Aronia melanocarpa*, *Biomed. Res. Int.* 26 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2018/5670145> Mar.
- [4] Han Y, Ma Y, Liu Y, Zhao Z, Zhen S, Yang X, Xu Z, Wen D. Plasma cholinesterase is associated with Chinese adolescent overweight or obesity and metabolic syndrome prediction. 2019. *Diabetes Metab Syndr Obes. May*; 14;12:685–702. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S201594>.
- [5] M. Rosas-Ballina, K.J. Tracey, Cholinergic control of inflammation, *J. Intern. Med.* 265 (6) (2009) 663–679, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x> Jun.
- [6] V.A. Pavlov, K.J. Tracey, Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (Pt 6) (2006) 1037–1040, <https://doi.org/10.1042/BST0341037> Dec.
- [7] M. Stojanov, A. Stefanović, G. Džingalašević, S. Mandić-Radić, M. Prostran, Butyrylcholinesterase activity in young men and women: association with cardiovascular risk factors, *Clin. Biochem.* 44 (8–9) (2011) 623–626, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.03.028> Jun.
- [8] N.G. Vallianou, A.A. Evangelopoulos, V. Bountziouka, M.S. Bonou, C. Katsagoni, E.D. Vogiatzakis, P.C. Avgerinos, J. Barbetseas, D.B. Panagiotakos, Association of butyrylcholinesterase with cardiometabolic risk factors among apparently healthy adults, *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)* 15 (5) (2014) 377–383, <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e3283627700> May.
- [9] R. Ramírez-Jiménez, M.F. Martínez-Salazar, D. Almenares-López, L. Yáñez-Estrada, A. Monroy-Noyola, Relationship between paraoxonase-1 and butyrylcholinesterase activities and nutritional status in Mexican children, *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 16 (2) (2018) 90–96, <https://doi.org/10.1089/met.2017.0138> Mar.
- [10] M. Romani, D.C. Hofer, E. Katsyuba, J. Auwerx, Niacin: an old lipid drug in a new NAD+ dress, *J. Lipid Res.* Apr 60 (4) (2019) 741–746, <https://doi.org/10.1194/jlr.S092007>.
- [11] C. Cantó, R.H. Houtkooper, E. Pirinen, D.Y. Youn, M.H. Oosterveer, Y. Cen, P.J. Fernandez-Marcos, H. Yamamoto, P.A. Andreux, P. Cettour-Rose, K. Gademann, C. Rinsch, K. Schoonjans, A.A. Sauve, J. Auwerx, The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity, *Cell Metab.* 15 (6) (2012) 838–847, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.022> Jun; 6.
- [12] M.S. Ángeles, G.L.A. Baiza, C.C. Ortega, N.R. Medina, B.M.C. Sánchez, S.L. Damasio, M. Cruz, P.E. Hernández, F.M. Díaz, Nicotinamide prevents sweet beverage-induced hepatic steatosis in rats by regulating the G6PD, NADPH/NADP+ and GSH/GSSG ratios and reducing oxidative and inflammatory stress, *Eur. J. Pharmacol.* 5 (818) (2017) 499–507, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.048> Jan.
- [13] AIM-HIGH Investigators, The role of niacin in raising high-density lipoprotein cholesterol to reduce cardiovascular events in patients with atherosclerotic cardiovascular disease and optimally treated low-density lipoprotein cholesterol: baseline characteristics of study participants. The atherothrombosis intervention in metabolic syndrome with low HDL/high triglycerides: impact on Global Health outcomes (AIM-HIGH) trial, *Am Heart J. Mar* 161 (3) (2011) 538–543, <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2010.12.007>.
- [14] S.J. Lee, S.E. Choi, I.R. Jung, K.W. Lee, Y. Kang, Protective effect of nicotinamide on high glucose/palmitate-induced glucolipotoxicity to INS-1 beta cells is attributed to its inhibitory activity to sirtuins, *Arch. Biochem. Biophys.* 535 (2) (2013) 187–196, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.03.011> Jul; 15.
- [15] J. Yu, J. Auwerx, The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173 (Suppl. 1) (2009) E10–E19, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04952.x> Sep.
- [16] H.J. Lee, Y.S. Hong, W. Jun, S.J. Yang, Nicotinamide Riboside ameliorates hepatic metaflammation by modulating NLRP3 inflammasome in a rodent model of type 2 diabetes, *J. Med. Food* 18 (11) (2015) 1207–1213, <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.3439> Nov.
- [17] N. Torres-Ramírez, L.A. Baiza-Gutman, R. García-Macedo, C. Ortega-Camarillo, A. Contreras-Ramos, R. Medina-Navarro, M. Cruz, M.A. Ibáñez-Hernández, M. Díaz-Flores, Nicotinamide, a glucose-6-phosphate dehydrogenase non-competitive mixed inhibitor, modifies redox balance and lipid accumulation in 3T3-L1 cells, *Life Sci.* 93 (25–26) (2013) 975–985, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.10.023> Dec; 18.
- [18] S.S. Loza-Medrano, L.A. Baiza-Gutman, L. Manuel-Apolinar, R. García-Macedo, L. Damasio-Santana, O.A. Martínez-Mar, M.C. Sánchez-Becerra, M. Cruz-López, M.A. Ibáñez-Hernández, M. Díaz-Flores, High fructose-containing drinking water-induced steatohepatitis in rats is prevented by the nicotinamide-mediated modulation of redox homeostasis and NADPH-producing enzymes, *Mol. Biol. Rep.* 47 (1) (2020) 337–351, <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05136-4> Jan.
- [19] F. Tietze, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Anal. Biochem.* 27 (3) (1969) 502–522, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5) Mar.
- [20] A.M. Jentzsch, H. Bachmann, P. Fürst, Biesalski HK improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (2) (1996) 251–256, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).
- [21] Beltowski J, Wójcicka G, Marciniak A. Species- and substrate-specific stimulation of human plasma paraoxonase 1 (PON1) activity by high chloride concentration. 2002. *Acta Biochim. Pol. Nov*; 49(4):927–936. <https://doi.org/10.2478/abp.2002.04904927>.
- [22] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. 1951. *J. Biol. Chem. Nov*; 193(1):265–275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>.
- [23] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr., R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9) Jul.
- [24] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* Aug 29 (11) (2008) 1859–1865, <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- [25] Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, S Swaminathan, Karplus M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. 1983. *J. Comp. Chem. Volumen 4, Issue 2:187–217.* <https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>.
- [26] B.R. Brooks, C.L. Brooks 3rd, A.D. Mackerell Jr., L. Nilsson, R.J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A.R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, M. Karplus, CHARMM: the biomolecular simulation program, *J. Comput. Chem.* 30 (10) (2009) 1545–1614, <https://doi.org/10.1002/jcc.21287> Jul; 30.
- [27] R.B. Best, X. Zhu, J. Shim, P.E. Lopes, J. Mittal, M. Feig, A.D. Mackerell Jr., Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles, *J. Chem. Theory Comput.* 8 (9) (2012) 3257–3273, <https://doi.org/10.1021/ct300400x> Sep; 11.
- [28] ChemAxon, Marvin 19.20, Retrieved from, 2019. www.chemaxon.com.
- [29] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 30 (31(2)) (2010) 455–461, <https://doi.org/10.1002/jcc.21334> Jan.
- [30] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1) (1996) 33–38 Feb. 27–28 [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [31] L. Schrödinger, Maestro, Schrödinger Release 2019-2, New York, NY, 2019. <https://www.schrodinger.com/maestro>.
- [32] J. Dupas, A. Feraý, C. Goanvec, A. Guernec, N. Samson, P. Bougaran, F. Guerrero, J. Mansourati, Metabolic syndrome and hypertension resulting from fructose enriched diet in Wistar rats, *Biomed. Res. Int.* (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1155/2017/2494067> Apl; 11.
- [33] L.M. Lírio, L. Forechi, T.C. Zanardo, H.M. Batista, E.F. Meira, B.V. Nogueira, J.G. Mill, M.P. Baldo, Chronic fructose intake accelerates non-alcoholic fatty liver disease in the presence of essential hypertension, *J. Diabetes Complicat.* 30 (1) (2016) 85–92, <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.10.008> Jan-Feb.
- [34] N. Maithili Karpaga Selvi, M.G. Sridhar, R.P. Swaminathan, R. Sripradha, Curcumin attenuates oxidative stress and activation of redox-sensitive kinases in high fructose- and high-fat-fed male Wistar rats, *Sci. Pharm.* 83 (1) (2014) 159–175, <https://doi.org/10.3797/scipharm.140816> Nov; 4.
- [35] A.A. Mahmoud, S.M. Elshazly, Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats, *PLoS One* 9 (9) (2014) 1–8, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106993> Sep; 9.
- [36] K.W. Ter Horst, M.J. Serlie, Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease, *Nutrients* 9 (9) (2017) 1–20, <https://doi.org/10.3390/nu9090981> Sep; 6.
- [37] L. Liu, Y. Wang, J. Wang, Y. Dong, S. Chang, X. Liu, K. Lutfy, H. Chen, T.C. Friedman, M. Jiang, Y. Liu, Enhanced hexose-6-phosphate dehydrogenase expression in adipose tissue may contribute to diet-induced visceral adiposity, *Int. J. Obes.* 42 (12) (2018) 1999–2011, <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0041-1> Dec.
- [38] S. Stenson, A.M. Umpleby, J.A. Lovegrove, K.G. Jackson, B.A. Fielding, Role of the enterocyte in fructose-induced hypertriglyceridaemia, *Nutrients* 9 (4) (2017) 1–15, <https://doi.org/10.3390/nu9040349> Apr; 1.
- [39] F. Tamer, E. Ulug, A. Akyol, R. Nergiz-Unal, The potential efficacy of dietary fatty acids and fructose induced inflammation and oxidative stress on the insulin signaling and fat accumulation in mice, *Food Chem. Toxicol.* 28 (2019) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110914> Oct.
- [40] A. Hernández-Díazcouder, R. Romero-Nava, R. Carbó, L.G. Sánchez-Lozada, F. Sánchez-Muñoz, High fructose intake and adipogenesis, *Int. J. Mol. Sci.* 7 (20(11)) (2019) 1–18, <https://doi.org/10.3390/ijms20112787> Jun.
- [41] K.L. Stanhope, V. Medici, A.A. Bremer, V. Lee, H.D. Lam, M.V. Nunez, G.X. Chen, N.L. Keim, P.J. Havel, A dose-response study of consuming high-fructose corn syrup-sweetened beverages on lipid/lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in young adults, *Am. J. Clin. Nutr.* 101 (6) (2015) 1144–1154, <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.100461> Jun.

- [42] S.S. Loza-Medrano, L.A. Baiza-Gutman, M.Á. Ibáñez-Hernández, M. Cruz-López, M. Díaz-Flores, Molecular alterations induced by fructose and its impact on metabolic diseases, *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 28 (56(5)) (2019) 491–504 Jan <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30777418/> [Indexed for MEDLINE].
- [43] E.J. Belin de Chantemele, D.W. Stepp, Influence of obesity and metabolic dysfunction on the endothelial control in the coronary circulation, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52 (4) (2012) 840–847, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.08.018> Apr.
- [44] C. Nacci, M. Tarquinio, L. De Benedictis, A. Mauro, A. Zigrino, M.R. Carratù, M.J. Quon, M. Montagnani, Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature, *Endocrinology* 150 (2) (2009) 849–861, <https://doi.org/10.1210/en.2008-1069> Feb.
- [45] M.J. Meneses, R. Silvestre, I. Sousa-Lima, M.P. Macedo, Paraoxonase-1 as a regulator of glucose and lipid homeostasis: impact on the onset and progression of metabolic disorders, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (20(16)) (2019) 1–22, <https://doi.org/10.3390/ijms20164049> Aug.
- [46] V.A. Pavlov, K.J. Tracey, The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism, *Nat Rev Endocrinol* 8 (12) (2012) 743–754, <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.189> Dec.
- [47] S. Shenhar-Tsarfaty, S. Berliner, N.M. Bornstein, H. Soreq, Cholinesterases as biomarkers for parasympathetic dysfunction and inflammation-related disease, *J. Mol. Neurosci.* 53 (3) (2014) 298–305, <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0176-4> Jul.
- [48] O.C. Bezerra, C.M. França, J.A. Rocha, G.A. Neves, P.R.M. Souza, M. Teixeira Gomes, C. Malfitano, T.C.A. Loleiro, P.M. Dourado, S. Llesuy, K. de Angelis, M.C.C. Irigoyen, L. Ulloa, F.M. Consolim-Colombo, Cholinergic stimulation improves oxidative stress and inflammation in experimental myocardial infarction, *Sci. Rep.* 20 (7(1)) (2017) 1–12, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14021-8> Oct.
- [49] E.H. Chang, S.S. Chavan, V.A. Pavlov, Cholinergic control of inflammation, metabolic dysfunction, and cognitive impairment in obesity-associated disorders: mechanisms and novel therapeutic opportunities, *Front. Neurosci.* 5:13 (263) (2019) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00263> Apr.
- [50] M. Pohanka, P. Dobes, Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (14(5)) (2013) 9873–9882, <https://doi.org/10.3390/ijms14059873> May.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00126

Matricula: 2143801176

EFFECTO ANTIOXIDANTE,
TRANSCRIPCIONAL Y
POSTRADUCCIONAL DE
NICOTINAMIDA SOBRE
COLINESTERASAS EN UN MODELO
DE SÍNDROME METABÓLICO
INDUCIDO CON FRUCTOSA EN
RATA.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 18 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DR. ADAN VALLADARES SALGADO
DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: JUAN DAVID VILLEDA GONZALEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. ADAN VALLADARES SALGADO

VOCAL

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

SECRETARIA

DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR