



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Biología Experimental

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

M en B.E. Benjamín Pérez Aguilar

***Participación de la acetilcolinesterasa (AChE) en la proliferación celular y
tumorigenicidad de las células de cáncer de hígado Huh-7 y HepG2***

Directores:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dr. José Luis Gómez Olivares

Asesor:

Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno

México D.F.

Septiembre, 2015

Comité tutorial

Director:

*Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Profesor Titular C
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud
D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
E-mail: legq@xanum.uam.mx*

Co-director:

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

Asesor:

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

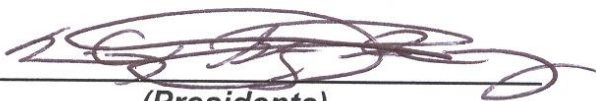
El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 224655.

Asimismo, este trabajo estuvo parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de proyecto 153902, siendo responsable técnico la Dra. Leticia Bucio Ortiz.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la Dirección del Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz y el Dr. José Luis Gómez Olivares del laboratorio de Biomembranas y la asesoría del Dr. Cecilio Jesús Vidal Moreno de la Universidad de Murcia, España.

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

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Participación de la Acetilcolinesterasa (AChE) en la proliferación celular y tumorigenicidad de las células de cáncer de hígado Huh-7 y HepG2" con fecha de septiembre de 2015.



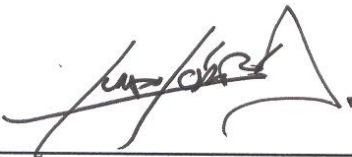
(Presidenta)

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



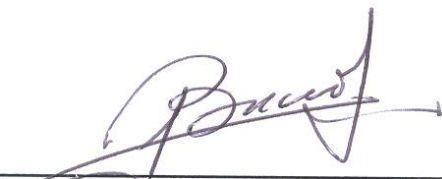
(Secretaria)

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



(Vocal)

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



(Vocal)

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana---Iztapalapa

Abreviaturas más empleadas

A4, A8, A12: Formas asimétricas de la acetilcolinesterasa

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa (acetilcolina acetilhidrolasa, EC 3.1.1.7)

ATCh: Acetil-ticolina

Bw: Bw248c51

Bw248c51: 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-one dibromide

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

G1, G2, G4: Formas globulares de la acetilcolinesterasa

GA: Molécula globular anfifílica de la acetilcolinesterasa

GH: Molécula globular hidrofílica de acetilcolinesterasa

GFI: Glicosilfosfatidilinositol

HepG2: Hepatoblastoma celular humano

HPC: Célula precursora hepática

Huh-7: Carcinoma hepatocelular humano

Iso-OMPA: Tetraisopropilpirofosforamida

kb: Kilobases

kDa: Kilodaltones

N-terminal: Extremo amino terminal de un polipéptido

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sodio

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

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

V/V: Relación Volumen/Volumen

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La acetilcolinesterasa (AChE) es una proteína con actividad enzimática cuya función en el sistema nervioso es la de hidrolizar a la acetilcolina (ACh) en acetato y colina. Presenta funciones no colinérgicas, a través de las cuales pueden participar en el control de la proliferación celular y la apoptosis. Por otro lado, la ACh es un transmisor cuya función principal es la comunicación neurológica dentro del sistema nervioso, sin embargo en los últimos años se ha observado que participa activamente en la proliferación celular e inhibe los procesos de apoptosis. Estas dos características podrían ser relevantes en el cáncer, ya que se ha observado que los niveles de actividad enzimática de la AChE disminuyen drásticamente y las concentraciones de ACh se elevan, particularmente en el carcinoma hepatocelular (HCC), un tumor muy agresivo con alta incidencia y mal pronóstico en etapas avanzadas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue observar si los niveles de la actividad de la AChE juegan un papel muy importante en la proliferación celular a través de la regulación, vía enzimática, del contenido de ACh.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las células Huh-7 y HepG2 se sembraron a alta y baja confluencia con la finalidad de observar si los niveles de actividad enzimática y contenido de la AChE se modificaban. La actividad enzimática fue ensayada por medio del método de Ellman y el contenido de la AChE se midió por la técnica de western blot. Se realizó un ensayo de proliferación celular con ayuda del kit comercial CCK-8. Se realizó el ensayo de formación de esferoides para observar si la inhibición de la AChE, por medio del Bw248c51, tenía influencia sobre la tumorigenicidad tanto en células Huh-7 como HepG2. Por último se realizó un ensayo de inmunohistoquímica en una pieza quirúrgica de tumor hepático, para observar si los niveles de contenido de la AChE coincidían con los niveles de actividad enzimática.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados mostraron una relación en la expresión de AChE y la progresión del ciclo celular, un efecto que dependió de la confluencia celular. La inhibición de la actividad AChE condujo a un aumento en la proliferación celular, que se asoció con disminución en la expresión de p27 y un incremento de ciclina D1. El hecho de que las líneas celulares Huh-7 y HepG2 proporcionaron resultados similares dio mayor certeza a la relación de la expresión de AChE con la progresión del ciclo celular en líneas de hepatoma. Las muestras de tumores hepáticos humanos mostraron una disminución en la actividad de AChE en comparación con el tejido normal. La evidencia presentada en este trabajo proporciona un apoyo adicional para el papel supresor tumoral propuesta para la AChE, lo que la coloca como una diana terapéutica potencial contra el HCC.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Acetylcholinesterase (AChE) is a protein with enzymatic activity whose function in the nervous system is hydrolyzed to acetylcholine (ACh) in choline and acetate. AChE presents functions no cholinergic, through which AChE can participate in the control of cell proliferation and apoptosis. Furthermore, ACh is a transmitter whose primary function is the neurological communication within the nervous system, however in recent years, the ACh has been view that actively involved both in proliferation as in inhibit of apoptosis processes. These two characteristics may be relevant in cancer, since it has been observed that levels of enzymatic activity of the AChE dramatically decrease and ACh concentrations rise, particularly in hepatocellular carcinoma (HCC), a very aggressive tumor with high incidence and poor prognosis in advanced stages. So the aim of this study was to see if levels of AChE activity play an important role in cell proliferation through of the regulation of ACh vía enzymatic.

MATERIALS AND METHODS

Huh-7 and HepG2 cells were seeded at high and low confluence in order to observe whether the levels of enzymatic activity of AChE and content were changed. Enzyme activity was assayed by the method of Ellman. AChE content was measured by Western blotting. Cell proliferation assay using the commercial kit CCK-8 was performed. The spheroid formation assay was performed to see if inhibition of AChE, through Bw248c51, had influence in both tumorigenicity of Huh-7 and HepG2 cells. Finally the immunohistochemical assay was performed in a liver tumor surgical specimen, to observe whether the levels of AChE content matched the levels of enzyme activity.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Results showed a relation in AChE expression and cell cycle progression, an effect which depended on cell confluence. Inhibition of AChE activity led to an increase in cell proliferation, which was associated with downregulation of p27 and increase of cyclin D1. The fact that Huh-7 and HepG2 cell lines provided similar results lent weight to the relationship of AChE expression with cell cycle progression in hepatoma cell lines at least. Human liver tumor samples exhibited a decrease in AChE activity as compared with normal tissue. The evidence presented herein provides additional support for the proposed tumor suppressor role of AChE, which makes it a potential therapeutic target in therapies against hepatocellular carcinoma.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	12
1.1 Cáncer de hígado.....	12
1.2 Características generales de las colinesterasas.....	13
1.3 El carácter glicoproteico de la acetilcolinesterasa.....	16
1.4 La acetilcolina como agente promotor de la proliferación celular.....	18
1.5 El sistema colinérgico en el hígado.....	19
2. ANTECEDENTES.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVO PRINCIPAL.....	24
4.1. Objetivos particulares.....	24
5. HIPÓTESIS.....	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
6.1. Diseño experimental.....	25
6.2. Cultivo celular.....	26
6.3 Extracción de proteínas.....	26
6.4 Cuantificación de proteínas.....	27
6.5 Análisis de proteínas por transferencia de gel a papel e inmunodetección.....	27
6.6 Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa.....	29
6.7. Ensayo de proliferación celular.....	29
6.8. Ensayo de formación de esferoides.....	30
6.9. Análisis estadístico.....	30

7. RESULTADOS.....	31
8. DISCUSIÓN.....	44
9. CONCLUSION.....	52
10. PERSPECTIVAS.....	54
11. REFERENCIAS.....	54

INTRODUCCIÓN

Cáncer de Hígado

El tratamiento de las enfermedades hepáticas representa uno de los principales retos en materia de salud pública, principalmente en México y en los países de América del Sur. Los cambios en los hábitos humanos tienden a aumentar la prevalencia de las enfermedades hepáticas graves, como cirrosis, hepatitis viral y el cáncer hepático (Mendez-Sanchez et al., 2010). El carcinoma hepatocelular (HCC) es uno de los tumores más frecuentes y agresivos en todo el mundo con una alta tasa de recurrencia posquirúrgica (Forner, Llovet, & Bruix, 2012; Kaposi-Novak et al., 2006; Verslype et al., 2009). El HCC es el quinto cáncer más frecuente en hombres y el octavo en mujeres (Mendez-Sanchez et al., 2010). La incidencia en Norteamérica y Europa Occidental es de menos de 10 casos por cada 100,000 habitantes. En Asia y en algunas partes de África se diagnostican 50-150 casos por 100,000 habitantes. En México, la incidencia es de menos de 3.3 casos por 100,000 habitantes (Blum & Spangenberg, 2007).

En el análisis molecular del HCC humano, se han encontrado alteraciones genéticas que resultan de la desregulación de oncogenes y de genes supresores de tumores. Entre estas modificaciones genéticas se han observado anomalías en el gen supresor de tumores p53, causando el desarrollo del HCC. Con todo, aún no es claro, si la mutación de p53 contribuye a la iniciación o bien en la progresión del cáncer. Otra modificación encontrada en el HCC es la de β -catenina, la cual es un componente río abajo de la ruta de señalización Wnt. Cuando β -catenina se transloca al núcleo, se asocia con factores de transcripción de la familia Tcf, los

cuales activan a genes como *myc*, ciclina D1, COX2 y la metaloproteinasa de matriz (MMP7), que gobiernan procesos relevantes del cáncer para su progresión y agresividad. En algunos casos estas mutaciones y el aumento en la expresión nuclear de β -catenina se han relacionado con estados tempranos del HCC y en otros con su progresión (Farazi & DePinho, 2006).

Características generales de la acetilcolinesterasa (AChE)

En los seres humanos, el gen *AChE* se encuentra localizado en el cromosoma 7 en la región q22. Tiene una longitud de 7 kb en la cual se incluyen seis exones y cuatro intrones (Getman, Eubanks, Camp, Evans, & Taylor, 1992). Mediante un proceso de corte y empalme alternativo el gen puede generar tres distintos transcritos a los cuales se les denomina AChE-R, AChE-H y AChE-T (Figura 1) (Massoulie et al., 1998; Massoulie, Pezzementi, Bon, Krejci, & Vallette, 1993).

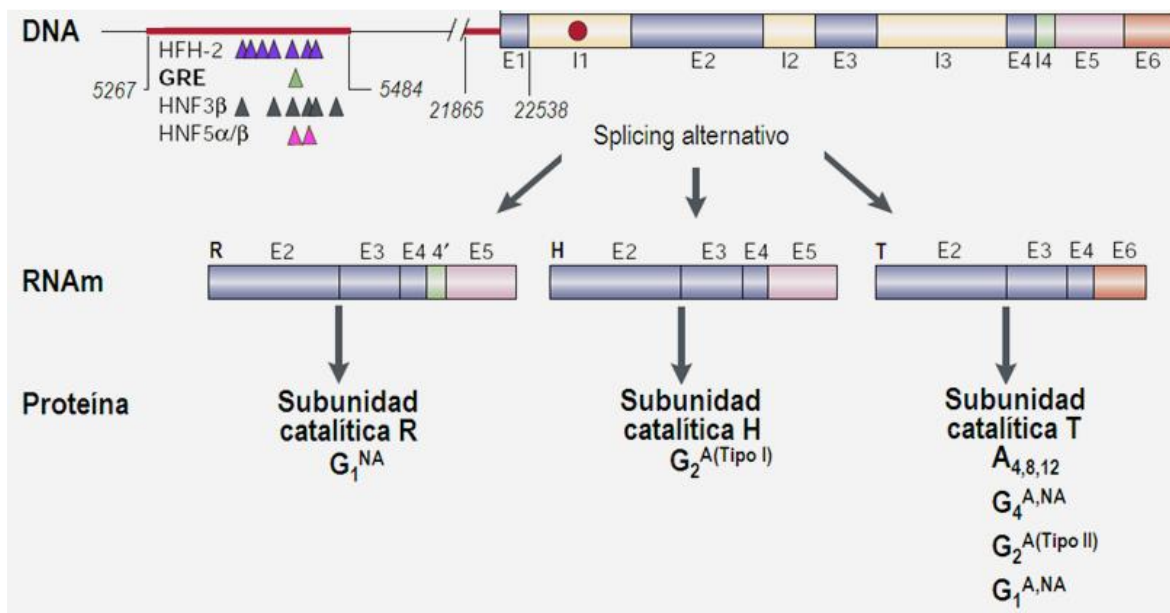


Figura 1. Estructura del gen acetilcolinesterasa humano. El gen de la AChE presenta un promotor proximal (línea roja adyacente a E1), una región amplificadora distal (línea roja más distal) que es rica en secuencias reguladoras. El intrón 1 (I1) contiene una secuencia intensificadora indicada por un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

La variante del mRNA AChE-T está constituido por los exones E2-E3-E4 y E6 y la proteína producto genera monómeros, dímeros y tetrámeros anfifílicos (G₁^A, G₂^A y G₄^A), tetrámeros hidrofílicos (G₄^H), así como asociaciones hetero-oligoméricas (Bon & Massoulie, 1997). Si los tetrámeros se unen a la proteína transmembranal PRiMA (Proline Rich Membrane Anchor) se forman tetrámeros capaces de insertarse en las membranas (PRiMA-G₄^A) (Perrier, Massoulie, & Krejci, 2002). Si

los tetrámeros se ligan a un tallo tipo colagénico (ColQ), se generan las formas asimétricas A₄, A₈ y A₁₂, con uno, dos y tres tetrámeros, respectivamente (Massoulie, 2002) (Figura 2).

El mRNA AChE-H, contiene los exones E2-E3-E4-E5, que codifica a los dímeros anfifílicos tipo I, en los que cada subunidad posee un resto glicofosfatidilinositol (GPI) unido covalentemente (Coussen et al., 2001) (Figura 2).

El mRNA tipo AChE-R, no sufre corte y unión después del último exón codificador del dominio catalítico, y por tanto posee el arreglo E2-E3-E4-I4-E5-E6. El extremo carboxilo terminal de la subunidad R consta de 30 aminoácidos adicionales y carece de residuos de Cys, por lo que las subunidades permanecen como monómeros (Soreq & Seidman, 2001) (Figura 2).

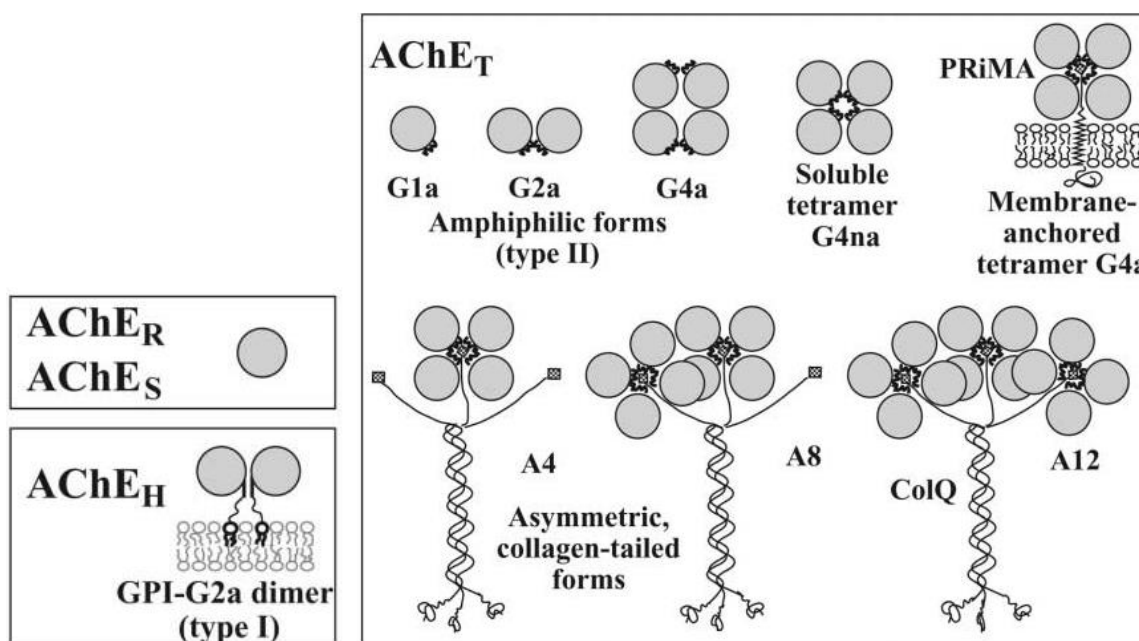


Figura 2. Formas moleculares de la proteína AChE originadas por oligomerización de distintas subunidades y asociaciones cuaternarias con otras proteínas. La AChE-R o AChE de traducción completa está constituida por variantes monoméricas; la AChE-H o AChE-E (AChE hidrofóbica o de eritrocitos) produce monómeros y dímeros anfifílicos; y la AChE-T o AChE-S

(AChE sináptica), genera una gran variedad de componentes globulares y asimétricos que además pueden incorporar o no la proteína de unión a la membrana PRiMA o el tallo colagénico ColQ (Massoulie, 2002).

El carácter glicoproteico de la acetilcolinesterasa

La subunidad completa de AChE tiene una masa molecular variable, entre 70 y 80 KDa y un número variable de restos oligosacáridos incorporados por procesamiento post-traducciona. Los oligosacáridos preformados se fijan en restos particulares del aminoácido asparagina (Asn). Esto ocurre en el lumen del retículo endoplásmico rugoso y en secuencias consenso de N-glicosilación Asn-X-Ser/Thr. La AChE de humanos posee tres sitios potenciales de N-glicosilación (Soreq et al., 1990) (Figura 3). Además, para un mismo organismo, la composición de azúcares de cada oligo-glicano ligado a la AChE frecuentemente varía entre distintos tejidos y células (por ejemplo, eritrocitos y linfocitos), y para un mismo tejido, entre uno normal y otro patológico (Saez-Valero, Sberna, McLean, & Small, 1999; Tornel, Saez-Valero, & Vidal, 1992). Tales diferencias en los oligo-glicanos unidos a la AChE pueden ser útiles para el diagnóstico de enfermedades.

Experimentos de mutagénesis dirigida han demostrado que la eliminación de los sitios de N-glicosilación reduce la secreción de la AChE del 20% al 1%, respecto al tipo nativo. En todo caso, no parece que la actividad enzimática cambie (Velan et al., 1993), pero en cultivos celulares de pollo, la tunicamicina, un potente inhibidor de la N-glicosilación, suprime la formación de enzima catalíticamente activa, pero no afecta a la síntesis de proteína (Massoulie et al., 1993). Por tanto, aumenta poderosamente la cantidad de AChE inactiva no competente para la catálisis.

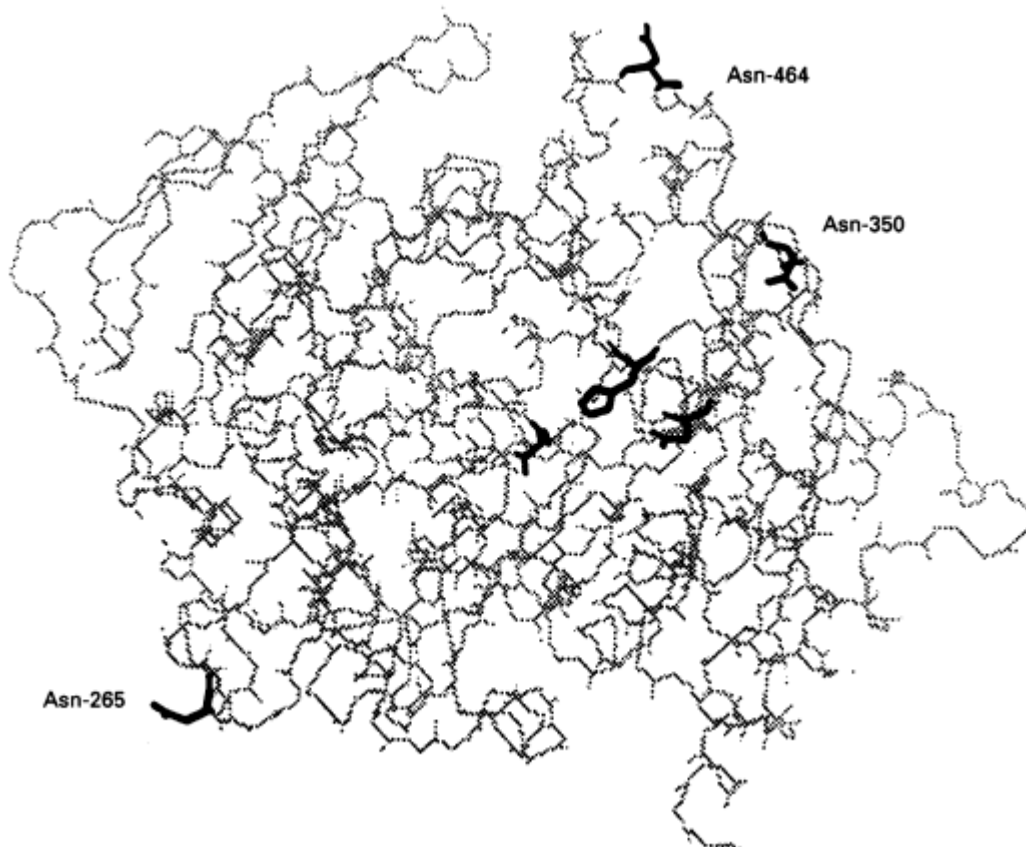


Figura 3. Sitios de N-glicosilación en HuAChE. En la figura podemos observar los residuos Asn-265, Asn-350 y Asn-464, los cuales se consideran sitios potenciales de glicosilación, así como la tríada del sitio activo (en el centro). Este modelo tridimensional de HuAChE se basa en la estructura de la enzima de *Torpedo californica* (Sussman et al., 1991). Imagen tomada de Velan y colaboradores (Velan et al., 1993).

La glicosilación correcta de las subunidades de AChE es importante para la formación de oligómeros y su posterior secreción (Rotundo et al., 1989), así como para protegerlas de la proteólisis (Lucas & Kreutzberg, 1985). En algunos casos, se ha observado que la AChE desprovista de carbohidratos o con una glicosilación anómala, puede perder su actividad catalítica o dirigirse a un compartimento celular erróneo (Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, Campoy, & Vidal, 1994). De todo lo anterior, queda claro que la glicosilación de la AChE es relevante no sólo

para que la proteína alcance el plegamiento óptimo para la catálisis, sino también para que cada subunidad pueda interaccionar con otras subunidades catalíticas, para formar homo-oligómeros, y con subunidades estructurales (no catalíticas, PRiMA y ColQ), para formar hetero-oligómeros.

La acetilcolina como agente promotor de la proliferación celular

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor colinérgico cuya principal función biológica es la comunicación celular en el sistema nervioso (Horiuchi et al., 2003). Su papel como neurotransmisor ya ha sido estudiado ampliamente. En los últimos años se ha observado que también cumple funciones autocrinas, dentro de las cuales se ha observado la inducción de la proliferación celular (Resende, Alves, Britto, & Ulrich, 2008; Wessler et al., 2003) e inhibición de la apoptosis (Lindenboim, Pinkas-Kramarski, Sokolovsky, & Stein, 1995; Yan, Lin, Irwin, & Paul, 1995). Estas observaciones sugieren una participación fundamental de la ACh en otras funciones diferentes alejadas a la del concepto sináptico.

El término “sistema colinérgico no-neuronal” sugiere que las células de un tejido no neural, poseen la capacidad de capturar y transportar la colina disponible en el ambiente extracelular vía un transportador de alta afinidad, lo que permite la síntesis de la ACh a través de la enzima colin-acetil transferasa (ChAT). Luego, las células forman vesículas de secreción conteniendo a la ACh y finalmente la secretan para actuar de modo autocrina o paracrina, cuyos efectos son mediados por su unión a receptores específicos unidos a la membrana celular.

Además, la ACh citosólica puede interaccionar de modo directo a proteínas de señalización intracelular. A diferencia del sistema colinérgico, la ACh puede no

estar necesariamente almacenada en organelos especializados de los cuales es liberada en respuesta a señales específicas. En células no-neuronales, la ACh podría ser sintetizada y liberada de manera constitutiva, sugiriendo que éstos tipos celulares desarrollaron mecanismos distintos a las neuronas para almacenar y regular la liberación de la ACh local (Wessler, Kirkpatrick, & Racke, 1998). Respecto a estas observaciones, en el HCC se ha visto que la ACh promueve migración e invasión celular e inhibe los procesos de apoptosis (Nie et al., 2013). Todo esto ha llevado a pensar que la ACh puede participar en la formación y/o progresión de los tumores.

Debido a que los niveles de ACh están regulados por la AChE se podría pensar y suponer que esta proteína trabaja como un regulador indirecto de los procesos celulares descritos en el párrafo anterior.

El sistema colinérgico en el hígado

Está plenamente establecido que el hígado de los vertebrados es rico en butirilcolinesterasa (BuChE) (Arpagaus et al., 1991), hecho que se sustenta en que la secuencia de residuos de aminoácidos de la BuChE hepática es idéntica a la de los monómeros del tetrámero soluble G₄ en plasma (Lockridge, 1988), por lo que se admite que el hígado es la fuente de la BuChE plasmática, y se ha propuesto que el incremento en el plasma de las glicoformas de BuChE ricas en fucosa tiene un valor pronóstico para identificar a los pacientes con riesgo elevado de contraer cáncer de hígado, así como para discriminar entre los pacientes que presentan cirrosis y los que padecen hepatitis crónica (Ohkura et al., 1994).

En cuanto a la AChE, es bien conocido ya que la actividad de esta enzima se halla principalmente en el sistema nervio y muscular. El hígado es capaz de producir y secretar AChE, por lo que la concentración de las colinesterasas (ChEs) séricas reflejan con una gran precisión la masa de los hepatocitos (Brown, Kalow, Pilz, Whittaker, & Woronick, 1981; Schuman, Brimfield, & Hunter, 1984). La AChE se ha encontrado en las membranas de los hepatocitos (Berninsone, Katz, Napp, & Azcurra, 1989; Perelman & Brandan, 1989) y aunque la actividad de la AChE es menor en el hígado que en los demás tejidos (Montenegro et al., 2014), recientemente no se le ha podido encontrar una función fisiológica para la AChE. Existen estudios en los cuales se observa que la actividad de la AChE se altera durante la cirrosis hepática (Garcia-Ayllon, Millan, Serra-Basante, Bataller, & Saez-Valero, 2012; Garcia-Ayllon et al., 2006) y en tumores de hígado (Zhao et al., 2011), pero ninguno aclara el papel fisiológico de la AChE. Sin embargo, las evidencias señalan que en el hígado normal cada célula precursora hepática (HPC), conocida también como célula oval está rodeada por un cierto número de hepatocitos. Debido a la producción y secreción de la AChE, los hepatocitos impiden la unión de la acetilcolina a sus receptores muscarínicos tipo-3 (M3 AChR) ubicados en la membrana plasmática de las HCP (Cassiman et al., 2002). Se ha observado en un modelo de vagotomía hepática en ratas, que el nervio vago estimula la activación de las células progenitoras hepáticas vía liberación de ACh y activación de receptores M3 AChR en los precursores hepáticos HPC, por lo que al producirse una lesión hepática o en casos de cirrosis disminuye la cantidad de hepatocitos y con ello la actividad AChE, reduciéndose poderosamente la hidrólisis de ACh, permitiendo así que el transmisor pueda

llegar a su blanco en las células ovales para promover la proliferación y reparar el daño hepático (Cassiman et al., 2002).

En pacientes que han padecido enfermedad hepática y se les ha trasplantado un hígado, el efecto estimulador del nervio vago se abate y ello conduce a una activación anómala de las HPC (Cassiman et al., 2002). En relación a lo anterior, durante el desarrollo de la carcinogénesis en el hígado de rata, se han observado cambios en la actividad de las ChEs, que se han relacionado a modificaciones en la población de hepatocitos (Kaneko, Dempo, & Onoe, 1972). De lo anterior se infiere que la posible función fisiológica de la AChE en el hígado podría ser el control de los niveles de ACh y así poder regular la proliferación celular promovida por este neurotransmisor.

ANTECEDENTES

En las últimas décadas se ha estudiado el papel de la AChE en los tumores. Respecto a esto, se ha observado que existen modificaciones a nivel del gen *AChE* en tumores de ovario, mama, próstata y algunos tipos de leucemia mieloides (Bernardi, Ribeiro Ede, Cavalli, Chautard-Freire-Maia, & Souza, 2010; Fischer et al., 1998; Neville, Thomas, & Campbell, 2001), las cuales podrían causar alteraciones en la expresión del propio gen y por otro lado, en la síntesis y actividad enzimática de la proteína codificada. Se ha establecido que la sobreexpresión de la AChE se relaciona con los procesos de apoptosis celular (donde ésta proteína juega un papel fundamental para la consolidación de dicho proceso) (Jing, Jin, Wu, & Zhang, 2008; Park et al., 2008; Park, Kim, & Yoo, 2004; Soreq et al., 1994; Ye et al., 2010; J. Y. Zhang et al., 2008; X. J. Zhang et al., 2002) y con la

inhibición del ciclo celular (Layer et al., 2013; Xiang, Xie, & Zhang, 2008). Por todo ello, es posible que la fuerte caída en la síntesis a nivel de proteína, como en la actividad enzimática de la AChE observada en algunos tipos de cánceres (Vidal, 2005) favorezca tanto el bloque de la apoptosis como la aceleración del ciclo celular, favoreciendo aún más la aparición y/o agresividad de los tumores.

Ya ha sido reportada una relación entre los bajos niveles de actividad enzimática y una gran variedad de tumores. Se ha observado que dicha actividad disminuye en tumores pulmonares (Martinez-Lopez de Castro et al., 2008; Martinez-Moreno et al., 2006), carcinomas de cabeza y cuello los cuales surgen de la capa mucosa del tracto digestivo (Castillo-Gonzalez, Nieto-Ceron, et al., 2015), cáncer de laringe (Castillo-Gonzalez, Pelegrin-Hernandez, et al., 2015), colon (Montenegro et al., 2006), gliomas (Garcia-Ayllon, Saez-Valero, Munoz-Delgado, & Vidal, 2001) y tumores hepáticos (Zhao et al., 2011), lo cual hace suponer que ésta proteína tiene una participación importante en el desarrollo y/o mantenimiento del cáncer.

Como se mencionó antes, la ACh promueve procesos de proliferación celular e inhibe la apoptosis a través de los receptores muscarínicos y nicotínicos. Por lo que, el descenso en la actividad de la AChE podría ocasionar un aumento en los niveles locales de la ACh. Es posible que la disminución en la actividad y la síntesis de la AChE estén contribuyendo al desarrollo del tumor, no solo al evitarse la formación del apoptosoma, sino también al permitir que las concentraciones locales de la ACh aumenten de forma prolongada. Respecto a este tema, se ha demostrado que en el carcinoma hepatocelular y las líneas celulares de hepatocarcinoma tienen la capacidad de producir ACh (Wang et al., 2008; Xu et al., 2014; Zhao et al., 2011), por lo que se ha observado que los niveles de ACh

estaban inversamente correlacionados con la actividad de la AChE (Xu et al., 2014; Zhao et al., 2011), notándose una relación entre la baja actividad de la AChE y el aumento en la cantidad de la ACh, lo cual es especialmente relevante en los tumores, ya que a estas altas concentraciones la ACh podrían estar participando en la progresión de los tumores.

JUSTIFICACIÓN

En diferentes estudios se ha demostrado la participación de la AChE en los procesos de apoptosis celular e inhibición del ciclo celular, siendo característico de estos dos eventos la sobre-expresión de esta proteína. Esta particularidad hace suponer y proponer a la AChE como un supresor de tumores, por lo que la disminución de esta proteína podría pretender una participación importante en los distintos tipos de cáncer, posicionándola como uno de los actores importantes dentro de la progresión y/o agresividad de los tumores.

Respecto a esto último, se ha estudiado el papel de la AChE en una amplia variedad de cánceres. Los datos señalan una fuerte relación entre los bajos niveles en la síntesis y actividad enzimática, con la progresión y agresividad de los tumores, lo que nos hace pensar que la capacidad de la AChE como supresor de tumores está siendo afectada (Xu et al., 2014; Zhao et al., 2011).

Aunque la acción de la AChE como supresor de tumores podría estar relacionada con su participación en la apoptosis y su poca entendida y explorada contribución en la inhibición del ciclo celular, es imposible dejar fuera su acción hidrolítica sobre la ACh. Se han demostrado los efectos que tiene este neurotransmisor en la proliferación celular y en la inhibición de la apoptosis, por lo que, tanto la AChE

como la ACh son actores importantes y peligrosos en el cáncer (Wang et al., 2008; Zhao et al., 2011).

En el HCC ha sido demostrado ya que los niveles de ACh aumentan y que los niveles de actividad de la AChE tienen una fuerte caída, lo que nos hace suponer que el desequilibrio entre estos dos parámetros tiene una participación importante dentro de esta neoplasia (Zhao et al., 2011). Aunque, tanto en los tejidos como en las líneas celulares de HCC se ha demostrado que este tipo de cáncer tiene la capacidad de sintetizar ACh, aún queda la duda de si los bajos niveles de actividad de la AChE causa un incremento fuerte en las concentraciones de ACh y si este desajuste contribuye a la progresión del HCC y lo hace aún más agresivo.

En este trabajo nos propusimos aclarar la participación de la actividad de la AChE en la progresión del HCC.

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la participación de la AChE en la agresividad y progresión tumorigénica en líneas celulares de cáncer de hígado.

Objetivos particulares

- Evaluar el contenido y actividad de la AChE a diferentes confluencias en cultivo de las líneas celulares Huh-7 y HepG2.
- Estudiar el efecto de la exposición a la ACh sobre la proliferación de las células Huh-7.

- Analizar el impacto de la inhibición química de la AChE sobre la proliferación celular y la síntesis de proteínas del ciclo celular en células Huh-7.
- Determinar el efecto de ACh y de la inhibición de la AChE en el nivel de tumorigenicidad de las líneas celulares Huh-7 y HepG2.

HIPÓTESIS

Si la AChE tiene una participación importante en la progresión y agresividad del cáncer hepático, entonces esperaríamos encontrar que tanto la proliferación celular como la tumorigenicidad en las células Huh-7 y HepG2 se incrementarían al inhibir la actividad de la AChE y este efecto se potenciaría al agregar la ACh.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se utilizaron las células Huh-7 derivadas de un HCC humano y las células HepG2 derivadas de un hepatoblastoma, ambas líneas fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). Las células se sembraron a diferentes densidades con medio con suero de crecimiento bovino y medio sin suero de crecimiento bovino durante 24 horas. Pasado ese tiempo se realizó la extracción de proteínas para el análisis de la síntesis de la AChE, Ciclina D1, Ciclina A, p53, p21 y p27 por medio de western blot y actividad enzimática de la AChE por medio del método de Ellman. Se analizó la proliferación celular al inhibir a la AChE con 10 μ M de 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-one dibromide (Bw248c51) durante los tiempos 24, 48 y 72 horas con ayuda del

estuche comercial CCK-8. Por último se realizó el ensayo de formación de esferoides añadiendo 10 μ M de ACh y 10 μ M de Bw284c51 durante cuatro días. Al cuarto día se contó el número de esferoides formados y después fueron fotografiados.

Cultivo celular

Las células Huh-7 y HepG2 se cultivaron en medio Williams (Gibco BRL, EUA), que se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB, Hy-Clone, Logan, UT, EUA), 100 U/ml de ampicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (Microlab, México). Para la realización de los experimentos, las líneas celulares se cultivaron en medio Williams sin suero. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Costar, EUA). Las células se despegaron de la botella de cultivo con tripsina-EDTA (Sigma, EUA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad, a una temperatura de 37°C.

Extracción de proteínas

Las células se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS) y se agregaron 80 μ l de una solución de lisis celular (Tris 20 mM, NaCl 150 mM y NP-40 1% a pH: 8.0) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Francia). Las células se despegaron mediante un gendarme de goma. La suspensión celular se dejó reposar 20 minutos a 4 °C, manteniéndose en agitación vigorosa durante 10 segundos con ayuda de un vortex en intervalos de 5 minutos de descanso. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se tomó

el sobrenadante y se guardó a -20 °C en alícuotas hasta realizar los análisis necesarios.

Cuantificación de proteínas

La proteína se valoró colorimétricamente utilizando el estuche comercial del ácido bicíncónico (BCA) (Pierce, EUA), se siguieron las instrucciones del fabricante. Para elaborar la curva de calibración, se empleó a la albúmina sérica bovina como proteína estándar.

Análisis de proteínas por transferencia de gel a papel e inmunodetección

Se utilizaron entre 40 a 70 µg de proteínas que se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS al 0.1%. Se empleó un equipo MiniProtean III (BioRad, EUA) y un voltaje de 120 V durante 90 minutos. Posteriormente, la proteína fue transferida a una membrana de PVDF durante 90 minutos a 120 V en un equipo de Transblot (BioRad, EUA). La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS-Tween durante 1 hora en agitación constante. Para la detección de las proteínas de interés, la membrana se incubó con anticuerpos específicos (Cuadro 1) durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Posteriormente se lavó 2 veces con TBSTween por 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en una solución de albúmina en TBS-Tween por 90 min. Posteriormente, la membrana se lavó 2 veces por 10 minutos con TBS-Tween. Se reveló con 1 ml de sustrato luminiscente (SuperSignal® West Pico 20 Substrate, Pierce, EUA). La

intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría usando el fotodocumentador Gel logic 1500 (Kodak, EUA).

Cuadro 1. Anticuerpos empleados en el estudio

Anticuerpos	Dilución	Fabricante	# catálogo
AChE	1:1500	BD Transduction Labs (Lexington, KY)	610268
Ciclina A	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, EUA)	Sc-751
p53	1:1000	Cell Signaling Technology (Massachusetts, EUA)	2524S
Ciclina D1	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, EUA)	Sc-753
p27	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, EUA)	Sc-776
p21	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, EUA)	Sc-756
Actina	1:5000	Sigma-Aldrich (San Louis, MO, EUA)	A3854

Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa

La actividad enzimática de la AChE se estimó por el método de Ellman y colaboradores (Ellman, Courtney, Andres, & Feather-Stone, 1961). La actividad AChE se valora empleando el tio-análogo del sustrato natural, la acetiltiocolina (ATCh) a 1 mM y el DNTB a 0.3 mM. Aunque la especificidad de la AChE hacia su sustrato es elevada, se utilizó el inhibidor selectivo iso-OMPA a 50 μ M para bloquear la actividad de la butirilcolinesterasa (BuChE) (Austin y Berry, 1953). Los reactivos y las muestras se añadieron al amortiguador de fosfatos a 100 mM, pH 8,0. Se recomienda el uso de este amortiguador, ya que mantiene el pH casi invariable a lo largo del tiempo de reacción (5-10 min). La reacción enzimática fue medida cada minuto a una absorbancia de 412 nm. Una unidad (U) de actividad de AChE representa la hidrólisis de 1 μ mol del sustrato por minuto a 37 ° C.

Ensayo de proliferación celular

Las células se sembraron a una densidad de 20 x10³ células/cm² en placas estériles de 96 pozos (Nunc, EUA). Se dejaron adaptar por 12 horas y se cambió el medio completo a otro medio sin SFB. Luego, se añadió se añadió 10 μ M de Bw248c51 o 0.1 μ M de ACh durante 0, 24, 48 y 72 horas. Al finalizar los tiempos correspondientes se adicionó en cada pozo de 100 μ L de medio, 10 μ L del reactivo CCK-8 (Cell Counting Kit 8, Dojindo Inc. Japón) se incubó 1 hora en condiciones estándar de cultivo celular. El kit tiene su fundamento en la reducción de una sal soluble de tetrazolio WST-8 por la acción de una enzima deshidrogenasa en la célula. Si las células están vivas generan un producto de

color naranja, el cual se detectó a 450 nm en un lector multimodal de placas DTX 880 (Beckman Coulter, Inc, EUA).

Ensayo de formación de esferoides

Se sembraron 1250 células Huh-7 y HepG2 por pocillo en placas de 6 pozos de baja adherencia (Costar, EUA) con medio Williams suplementado con 10% de SFB (Hy-Clone, Logan, UT, EUA), 100 U/ml de ampicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Microlab), 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 5 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Los cultivos fueron suplementados cada 12 horas con 10 µM de ACh y 10 µM de Bw284c51, durante 4 días. Los esferoides fueron contados y fotografiados mediante un microscopio invertido Carl Zeiss VERT.A1. En la base de la placa de cultivo se dibujaron cuadrantes con el fin de tener un recuento exacto.

Análisis estadístico

La prueba de Mann Whitney se utilizó para evaluar la significancia estadística a la hora de establecer las diferencias en los niveles de la actividad AChE, los niveles de proteína de las células cultivadas a baja o alta confluencia y los niveles de las proteínas de las células cultivadas con el inhibidor de AChE.

Una prueba de ANOVA de una vía seguida por el post-test de Bonferroni nos permitió analizar las diferencias observadas en los niveles de síntesis de la AChE realizadas con células Huh-7 en diferentes densidades, el número de esferoides en las células Huh-7 y HepG2, y los cambios en la actividad de la AChE entre las muestras de hígado no afectados y cancerosas. Una ANOVA de dos vías seguido

por el post-test de Bonferroni fue útil para hacer el análisis de datos de la proliferación celular.

RESULTADOS

En un primer acercamiento para observar si la AChE se modificaba según la confluencia celular, la línea celular Huh-7 se sembró a distintas densidades, utilizando las siguientes concentraciones: 47×10^3 células/cm², 105×10^3 células/cm², 147×10^3 células/cm², 283×10^3 células/cm². En la figura 4 observamos cómo a 283×10^3 células/cm² las células ocuparon el 100% del plato de cultivo, mientras que a 47×10^3 células/cm² las células tenían espacio para continuar proliferando.

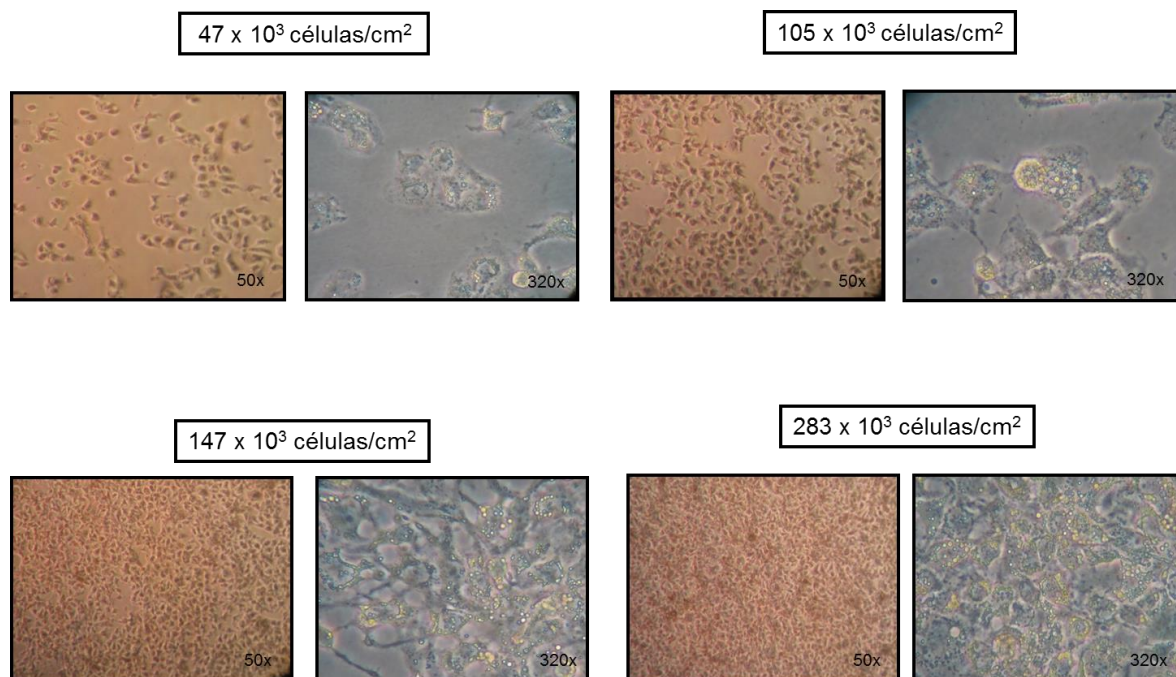


Figura 4. Morfología de distintas densidades de cultivos de células huh-7. Las células son fotografiadas antes de utilizarlas para la extracción de proteínas totales. Las células se sembraron

en medio Williams al 10 % con FBS y se dejaron adherir al plato de cultivo durante 24 hrs. Después se realizó la extracción de proteínas totales.

Evaluamos el contenido de AChE por Western blot, observándose que los niveles de la proteína AChE se incrementaron a una densidad celular alta (Figura 5). En la figura 5A se observa cómo la intensidad de la banda de 68 KDa (AChE) aumenta con la densidad celular. El análisis por densitometría reveló que el incremento solo ocurrió a elevada densidad celular, es decir a un 100% de confluencia (figura 5B).

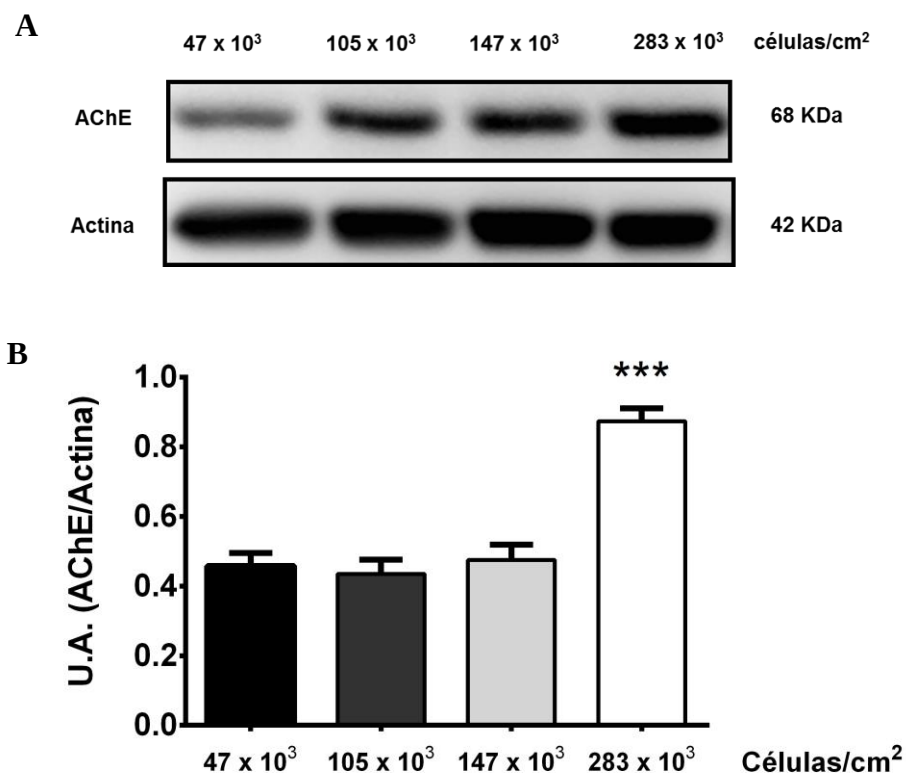


Figura 5. Niveles de la proteína AChE a diferentes densidades en células Huh-7. **A:** Western blot de la AChE en extractos de células Huh-7. Se aisló proteínas de muestras de células sembradas a las siguientes densidades celulares: 47 x 10³ células/cm², 105 x 10³ células/cm², 147 x 10³ células/cm², 283 x 10³ células/cm². Se presenta una imagen representativa. **B:** Análisis

por densitometría de la acetilcolinesterasa. Las bandas se cuantificaron utilizando un fotodocumentador Gel Logia 1500 (Kodak). Como control de normalización se utilizó a la actina. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a $***P < 0.0001$.

A partir de estos resultados, se decidió elegir emplear la densidad de 47×10^3 células/cm² y 283×10^3 células/cm² y siendo denominadas como LD y HD, respectivamente (low density and high density). A continuación, se evaluó si estos cambios tenían lugar en medio Williams sin y con FBS al 10% (V/V). Los resultados obtenidos mostraron que el suero de crecimiento no afectó en la síntesis la acetilcolinesterasa, es decir, el efecto observado previamente, respecto a un aumento, fue debido a la alta densidad celular (Figura 6A y 6B). Lo anterior indicó que cuando la proliferación celular se ve inhibida por contacto (HD), la proteína AChE incrementaba su síntesis de manera significativa, tanto en células Huh-7 (Figura 6A y 6B), como en las células HepG2 (Figura 6C y 6D). Esta observación fue muy relevante, porque puede suponer que la AChE podía estar participando en regular la progresión del ciclo celular.

Luego de establecer cambios en la síntesis de la proteína AChE, se estimó la actividad enzimática en ambas condiciones de cultivo, tanto en presencia de suero como sin él. Los niveles de actividad enzimática de la acetilcolinesterasa fueron significativamente mayores en los cultivos LD que en los cultivos HD, tanto en las células Huh-7 (Figura 7A y 7B), como en las células HepG2 (Figura 7C), observación totalmente opuesta con la síntesis de la proteína, por lo que, podríamos suponer que en los cultivos HD, la proteína catalíticamente activa está

sufriendo modificaciones que podrían repercutir en su actividad. Observación que cobra interés en la posibilidad de que se están favoreciendo las funciones alternativas, sobre las funciones catalíticas. Estos cambios se atribuyen a las condiciones de cultivo (HD) más que a la adición del SFB. Los cambios opuestos en la síntesis de la proteína AChE y en la actividad enzimática, conforme a la densidad celular, señalan en cuidado que se debe de tener al usar los linajes celulares para probar los efectos de los productos naturales, productos químicos y las condiciones de cultivo en la expresión y actividad enzimática de la AChE.

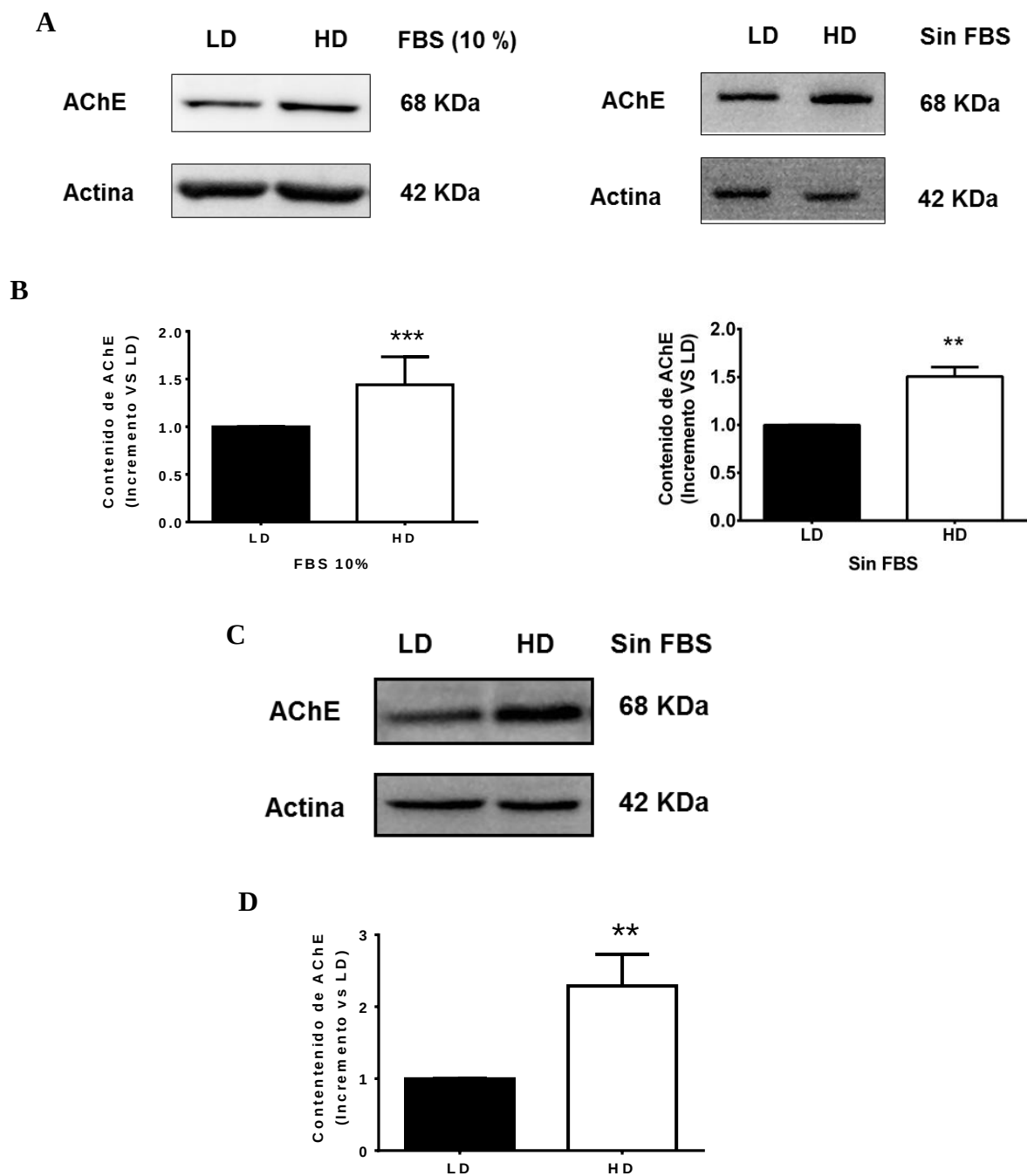


Figura 6. Patrón de expresión de la acetilcolinesterasa con dos diferentes densidades en células Huh-7. A: Western blot de la acetilcolinesterasa (AChE) en extractos de células Huh-7. Se aisló proteínas de muestras de los cultivos celulares a baja confluencia (LD) y a alta confluencia (HD). Se presenta una imagen representativa. **B:** Análisis por densitometría de la acetilcolinesterasa. Las bandas se cuantificaron utilizando un fotodocumentador Gel Logia 1500

(Kodak). Como control de normalización se utilizó a la actina. **C:** Western blot de la acetilcolinesterasa (AChE) en extractos de células HepG2. Se aisló proteínas de muestras de los cultivos celulares a baja confluencia (LD) y alta confluencia (HD). **D:** Análisis por densitometría de la acetilcolinesterasa. Las bandas se cuantificaron utilizando un fotodocumentador Gel Logia 1500 (Kodak). Como control de normalización se utilizó a la actina. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a $**P < 0.001$ y $***P < 0.0001$.

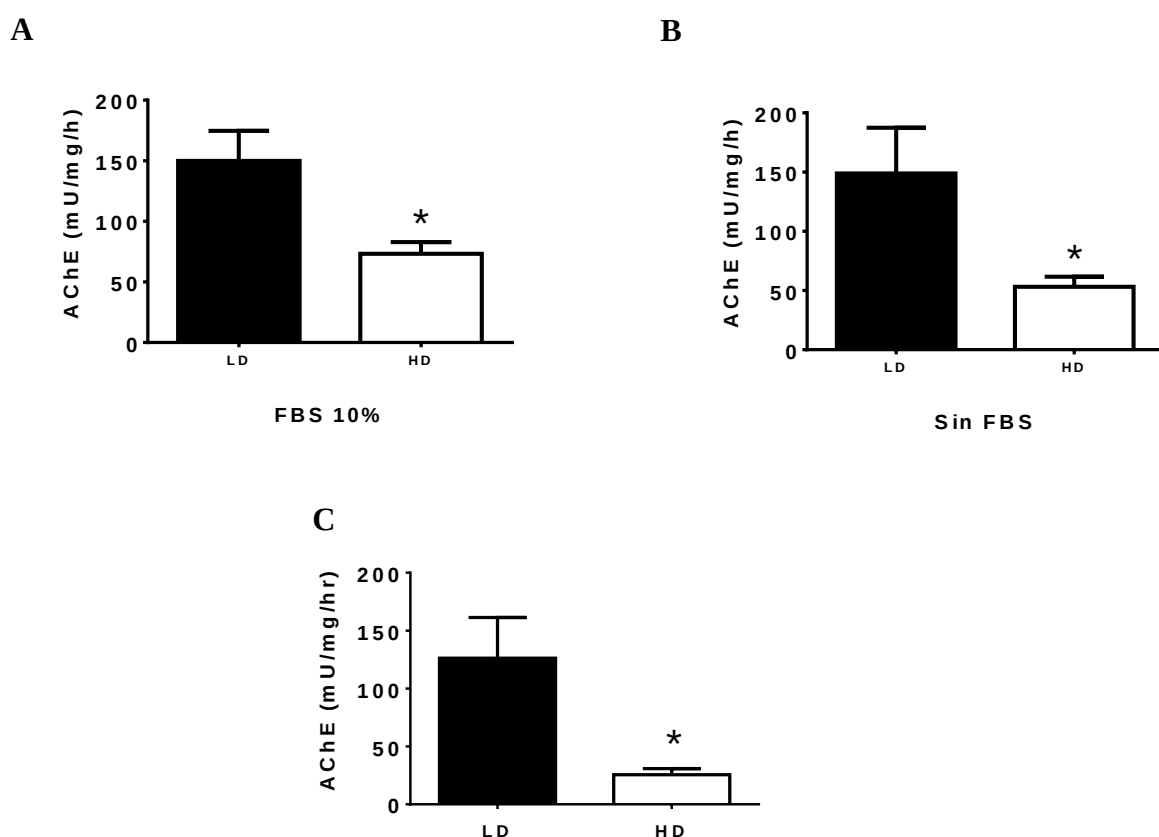


Figura 7. Análisis de la actividad específica de la acetilcolinesterasa en células a dos densidades celulares. De la extracción de proteínas totales para el estudio de western blot, se realizó el ensayo de la actividad enzimática para la acetilcolinesterasa por el método de Ellman, utilizando un inhibidor específico para BuChE. **A:** En el eje Y se expone la actividad enzimática de AChE expresada en miliunidades por miligramo de proteína total (mU/mg) y en el eje X se exponen las densidades celulares utilizadas de la línea Huh-7 con FBS. **B:** En el eje Y figura la actividad de la AChE en mU/mg y en el eje X las densidades de células Huh-7 sin FBS. **C:** El eje Y informa de

la actividad de la AChE en mU/mg; en el eje X se exponen las densidades de células HepG2. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a $*P < 0.05$.

Existen evidencias que sustentan la participación de la AChE en la progresión del ciclo celular, por lo que se decidió explorar la posible influencia de esta proteína en la proliferación de las células Huh-7 y HepG2. Para ello, se evaluaron los niveles de proteína de varios reguladores del ciclo celular en las líneas Huh-7 y HepG2 cultivadas a LD y HD (Figura 8).

Los resultados de la inmunodetección revelaron que en la condición HD, el contenido de ciclina D1 se redujo, los niveles de p27 aumentaron y la proteína p21 no presentó cambios significativos. También se redujo el nivel de la proteína p53. Esto tanto en células Huh-7 (Figura 8A y 8B) como en células HepG2 (Figura 8C y 8D); aunque la invariabilidad de la ciclina D1 (Figura 8C), cuyo nivel disminuyó en las células Huh-7 (Figura 8A) y la fuerte disminución de la proteína ciclina A en células HepG2 (Figura 8C) revelaron diferencias en la regulación del ciclo en ambos tipos celulares. Sin embargo, el hecho más importante, desde el punto de vista colinérgico, fue la observación de cambios paralelos en la cantidad de la proteína AChE y en los reguladores del ciclo celular, los cuales mostraron un aumento en los niveles de las proteínas AChE y p27 y disminución en los niveles de actividad de la AChE y las proteínas ciclina D1 o ciclina A, los cuales apoyan la idea de que en los cultivos de las células Huh-7 y HepG2 a HD, la AChE contribuye a la regulación del ciclo celular.

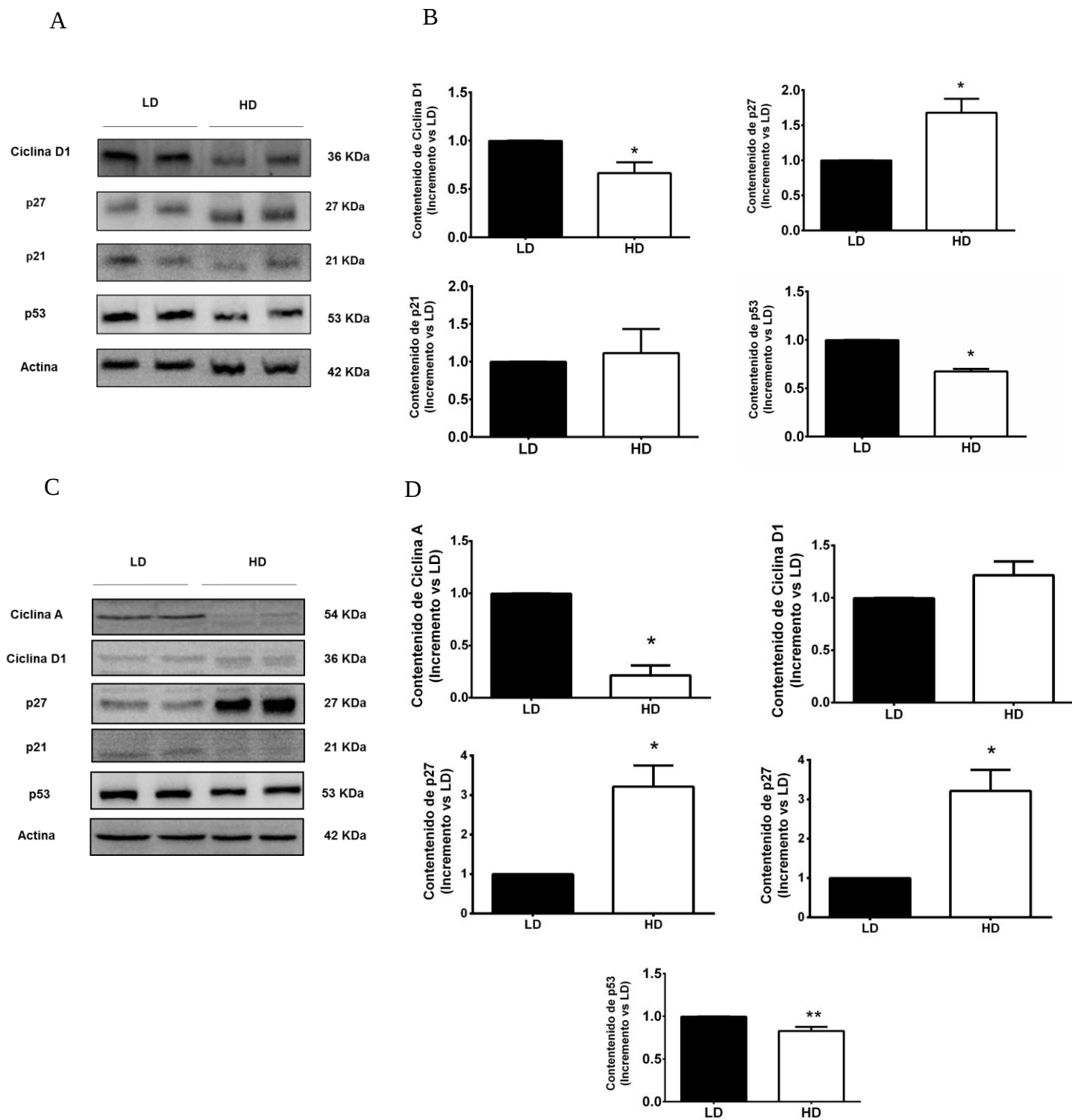


Figura 8. Patrón de expresión de algunas de las proteínas que participan en el ciclo celular.

A: Western blot de ciclina A, Ciclina D1, p27, p21 y p53 en extractos de células Huh-7. Se aisló proteínas de muestras de células sembradas a LD y HD. **B:** Análisis por densitometría de las proteínas Ciclina D1, p27, p21 y p53. Las bandas se cuantificaron con un fotodocumentador Gel

Logia 1500 (Kodak). Para la normalización se utilizó a la actina. **C:** Western blot de Ciclina A, Ciclina D1, p27 y p21 en células HepG2 en cultivos a LD y HD. **D:** Análisis por densitometría de las proteínas Ciclina A, Ciclina D1, p27 y p21. Las bandas se cuantificaron utilizando un fotodocumentador Gel Logia 1500 (Kodak). Como control de normalización se utilizó a la actina. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a $*P < 0.05$.

Para averiguar si la proteína AChE tenía una participación importante en la proliferación celular, se evaluó si la inhibición de su actividad tenía efectos sobre este proceso. El inhibidor utilizado fue el Bw284c51 (Bw), el cual es impermeable a la membrana plasmática, entonces el efecto del químico solo ocurría sobre la AChE que se encuentra en la membrana plasmática y no la que se encuentra en el citosol o en el núcleo (Santos et al., 2007). Se analizaron tiempos 0, 24, 48 y 72 horas, a la concentración de 10 μ M de Bw. La proliferación celular se incrementó significativamente a las 72 horas (Figura 9A). Este aumento observado cuando las células llegaron a una alta confluencia a las 72 horas de cultivo, sustenta la relación que existe entre la caída en la actividad de la AChE (y el incremento concurrente de la disponibilidad de ACh) y el aumento en la tasa de proliferación celular. Si bien, ya se ha demostrado que las células Huh-7 poseen la capacidad de producir ACh, se realizó un ensayo de proliferación celular para evaluar el efecto mitogénico de este neurotransmisor. Se empleó una concentración de 0.1 μ M de ACh. Los resultados mostraron que la tasa de proliferación celular incrementó significativamente a las 72 horas de exposición, indicando que éste neurotransmisor promovió positivamente el ciclo celular (Figura 9B). Al comparar los resultados sobre la proliferación celular, se observó que el Bw tuvo un mayor

efecto en la proliferación celular comparada con la estimada por la exposición a la ACh, indicando que la falta de la actividad de la AChE es relevante para el efecto mitogénico de la ACh. Por último, la idea de un vínculo entre los niveles de ACh y los reguladores del ciclo celular se vio reforzada por el aumento significativo en los niveles de síntesis de ciclina D1 en células cultivadas con 10 μ M de Bw durante 48h (Figura 9C).

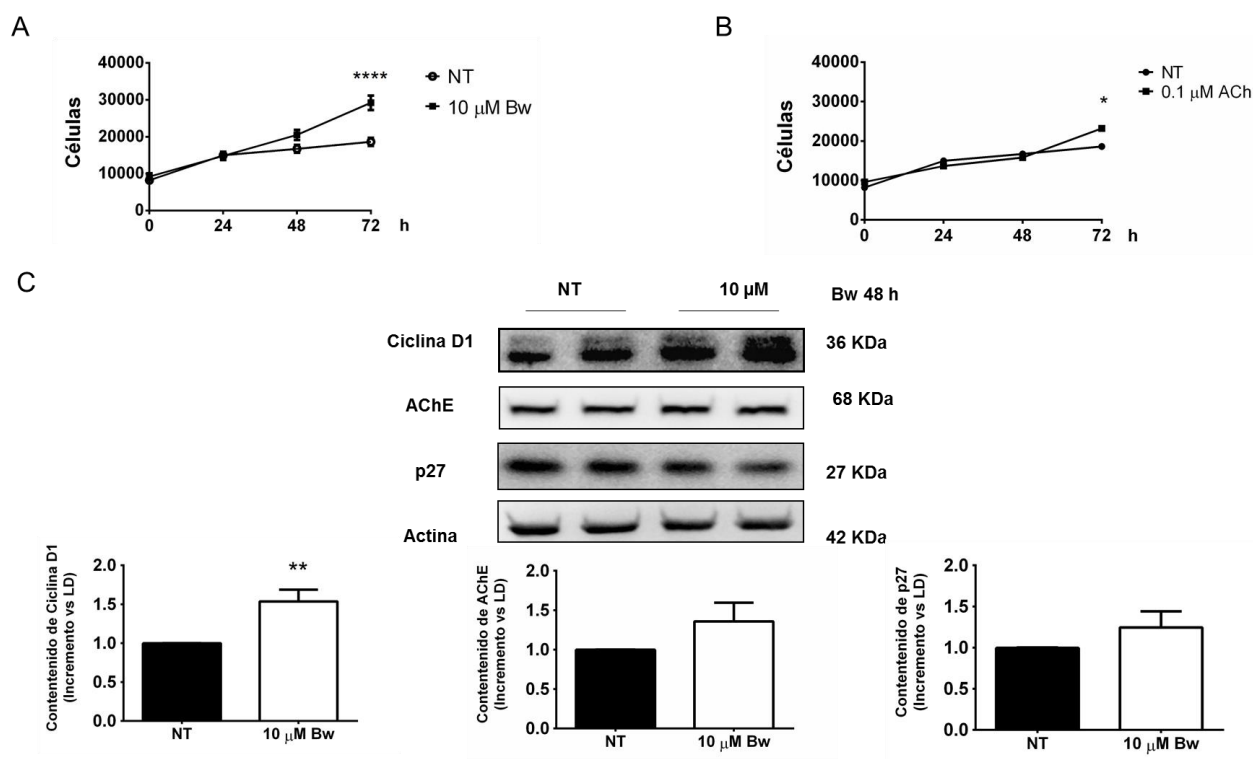


Figura 9. Tasa de proliferación celular de la línea Huh-7, expuesta a 10 μ M del inhibidor de AChE BW284c51. A: Las células fueron sembradas en medio Williams sin suero de crecimiento. Se utilizó la concentración de Bw de 10 μ M, la cual fue agregada al medio de cultivo. Los datos representan cuatro experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. **B:** Las células fueron sembradas en medio Williams sin suero de crecimiento. Se añadió ACh de 0.1 μ M al medio de cultivo. Los datos representan cuatro experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. **C:** Western blot de ciclina D1, p27 y AChE en extractos de células Huh-7. Se realizó el análisis por densitometría de las proteínas ciclina D1, p27 y AChE. Las bandas se cuantificaron utilizando

un fotodocumentador Gel Logia 1500 (Kodak). Como control de normalización se utilizó a la actina. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a *P < 0.01 vs NT a las 72 horas, **P < 0.001 y ****P < 0.0001 vs NT a las 72 horas.

Como se observó que a la concentración de 10 μ M de Bw hubo un incremento en la proliferación celular, se utilizó esta misma concentración para establecer si había cambios en la formación de esferoides. Se utilizaron 10 μ M de ACh, teniendo en cuenta que la ACh promueve el ciclo celular y además inhibe los procesos de apoptosis. Nuestros datos mostraron que hubo un aumento en la formación de esferoides con la exposición a Bw y con la combinación de Bw-ACh. Por lo que la inhibición de la actividad de la AChE causó un incremento significativo en el número de esferoides (Figura 10). Este incremento podría deberse al aumento en las concentraciones de ACh, ya que al inhibir a la AChE y exponer a las células con ACh, aumenta de manera muy significativa la formación de esferoides. Estas evidencias sustentan que la AChE juega un papel importante en la regulación de los niveles de ACh en órganos no colinérgicos, regulando la función mitogénica de la ACh.

Hecho que se confirmó cuando se estimó la actividad de la AChE en un tumor de hígado, donde se observó una muy baja actividad enzimática y menor marcaje de la AChE por medio de inmunohistoquímica (Figura 11), apoyando fuertemente la capacidad anti-tumorigénica propuesta para la AChE, relacionada con su capacidad para disminuir rápidamente los niveles de ACh en la zona de los receptores muscarínicos y nicotínicos.

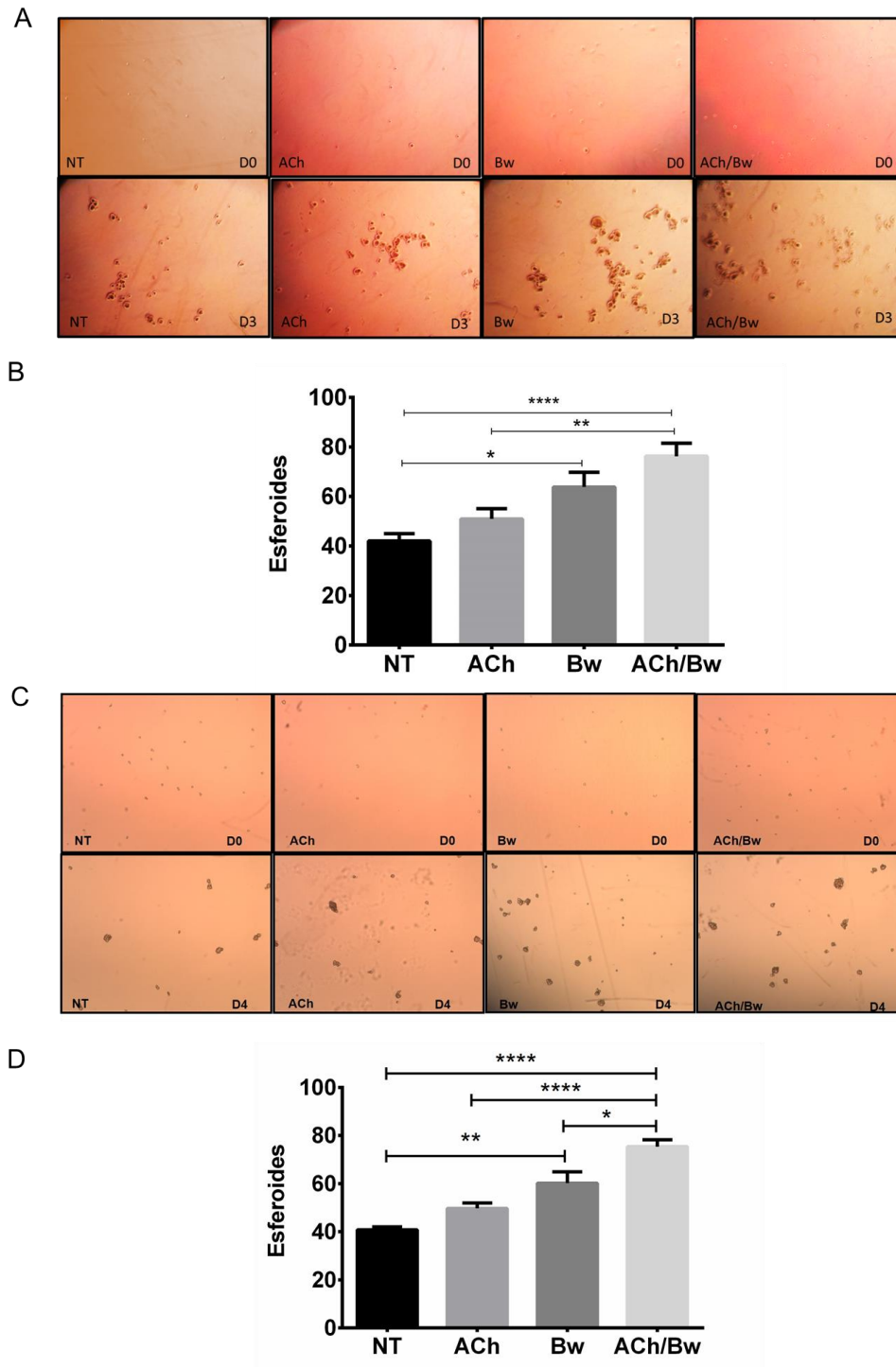


Figura 10. Impacto de Bw en la formación de esferoides. 1250 células de Huh-7 o HepG2 fueron sembraron en placas de baja adherencia suplementadas con 10% de FBS, 5 ng / ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 5 ng / ml del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

Se incluyeron además Bw (10 μ M) y/o ACh (10 μ M) también se incluyeron. Los experimentos fueron seguidos durante cuatro días. Aquí se presentan imágenes representativas de al menos cuatro experimentos independientes de las células Huh-7 **(A)** ó células HepG2 **(C)**. Las gráficas con el número de esferoides formados en las células Huh-7 **(B)** y en las células HepG2 **(D)**. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a * $p \leq 0,05$ vs NT o Bw, ** $p \leq 0,001$ vs NT o ACh, o **** $p \leq 0,0001$ vs NT o ACh.

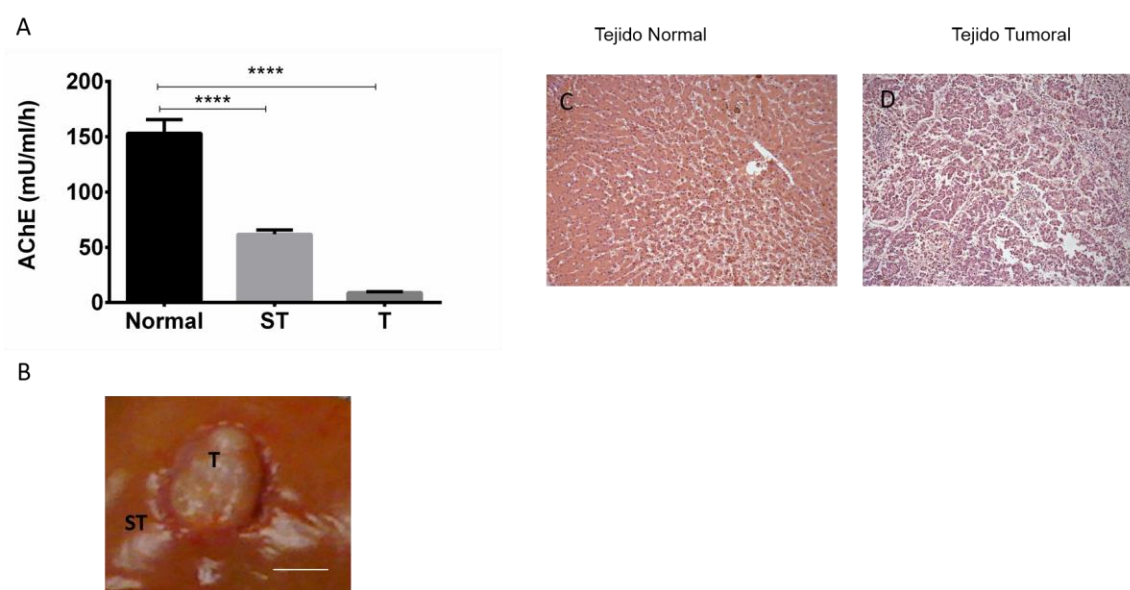


Figura 11. Análisis de la acetilcolinesterasa en tejido hepático humano control y en tumor hepático. **A:** Se realizó el ensayo de la actividad enzimática para la acetilcolinesterasa por el método de Ellman utilizando un inhibidor específico para BuChE. En el eje Y se expone la actividad enzimática de AChE expresada en mU/ml/h y en el eje X se exponen las zonas de tejido hepático analizadas. NT representa una N de 5 muestras hepáticas control con tres repeticiones. El tejido circundante (ST) como el tejido tumoral (T) representa una N con seis repeticiones cada uno. **B:** Imagen de uno de los tumores utilizados para este estudio. Tinción de inmunohistoquímica de

AChE en la zona normal, **C**, y en la zona del tumor, **D**. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes. Las diferencias se encontraron significativas a **** $P < 0.0001$

DISCUSIÓN

Existen evidencias que sugieren que la AChE puede tener actividad anti-tumoral (Lu, Zhang, Zhang, Wu, & Zhang, 2013; Xu et al., 2014), la cual podría deberse a cambios inducidos por el cáncer, relacionados con los niveles de actividad enzimática o los niveles de síntesis de la proteína. A este respecto, se ha observado que la AChE participa en procesos celulares como en el arresto del ciclo celular (Layer et al., 2013; Xiang et al., 2008) y en los procesos de apoptosis (Park et al., 2008; Park et al., 2004; J. Y. Zhang et al., 2008), evidencias que apoyan firmemente la capacidad anti-tumoral de la AChE. Por otro lado, se ha reportado que el sustrato de la AChE, la ACh, funciona como un regulador clave de sobrevivencia, diferenciación y proliferación celular (Shen et al., 2013), haciendo pensar que la AChE juega un papel importante en la regulación de tales procesos, a través del control de la disponibilidad de la ACh. Si bien, la ACh se ha considerado por muchos años como un neurotransmisor, recientemente se ha establecido la capacidad de sintetizar y secretar la ACh por parte de varias líneas celulares, incluyendo las Huh-7 y las HepG2 (Xu et al., 2014; Zhao et al., 2011), siendo notable en el HCC, el hecho de que los niveles fueron inversamente correlacionados con el contenido de la actividad enzimática de la AChE (Zhao et al., 2011). Estas evidencias sustentan la idea de una relación causal entre la caída de la actividad AChE, aumento en las concentraciones de ACh y la proliferación

observada no solo en HCC (Zhao et al., 2011), sino también en otros tipos de tumores (Nie et al., 2013; Resende et al., 2008; Wessler et al., 2003).

Como modelo para estudiar los efectos de los cambios en la actividad de AChE sobre la proliferación de las células tumorales y/o cancerosas en el hígado, se utilizó la línea de carcinoma hepatocelular Huh-7, cuyo fenotipo maligno y alta tasa de supervivencia la confirma como un modelo ideal para probar drogas terapéuticas prometedoras (Lee et al., 2011; Lee et al., 2014).

Si bien el cultivo en monocapa no es un modelo ideal para estudiar los cambios en la expresión y síntesis de las proteínas relacionadas con el desarrollo y/o mantenimiento del cáncer, debido a que la arquitectura macroscópica y microscópica de los tumores muestran que las uniones entre células son muy estrechas perdiendo toda arquitectura tisular (una característica que probablemente altera la expresión de muchas proteínas), fenómeno que no se puede observar y estudiar fielmente en los cultivos en monocapa, pero sí pueden facilitar establecer los cambios en la expresión de las proteínas de acuerdo a la densidad celular. Estos cambios en la modificación en la expresión de las proteínas observado en los tumores, parecen estar relacionados específicamente con un aumento en la resistencia a los inductores de la apoptosis y necrosis en las células malignas y pueden ser estudiados en cultivos en monocapa.

Aunque las bases moleculares para explicar estos cambios en la expresión de las proteínas no han sido aclarados aún, se sugiere que tiene que ver con eventos epigenéticos, principalmente en el caso del HCC (Raggi et al., 2014). La sobrevivencia mostrada en los tumores malignos nos hace suponer que la

densidad celular es un factor clave a la hora de examinar los cambios inducidos por el cáncer en la expresión de las proteínas.

En relación a lo anterior, los resultados obtenidos muestran que en los cultivos HD en ambas líneas celulares presentaron altos niveles de la proteína AChE (Figura 5 y 6) y una disminución en los niveles de actividad enzimática de la AChE (Figura 7), asociando esta baja en la actividad de la AChE con el cáncer hepático. En este sentido, la disminución en la actividad enzimática apoya la idea de una relación con el crecimiento de las líneas celulares cancerosas.

En el contexto del cáncer, la AChE podría estar implicada en la formación y/o progresión de un tumor, ya que en varios tipos de tumores se ha observado una disminución en los niveles de actividad enzimática (Garcia-Ayllon et al., 2001; Martinez-Lopez de Castro et al., 2008; Martinez-Moreno et al., 2006; Montenegro et al., 2006; Munoz-Delgado et al., 2010; Vidal, 2005; Zhao et al., 2011). Aunque, la disminución en la actividad de la AChE que observamos en los cultivos a HD parezca una contradicción con los niveles de síntesis de la misma, este fenómeno podría deberse a la incapacidad de las células transformadas de sintetizar AChE catalíticamente activa, ya sea relacionadas a alteraciones a nivel del gen de la AChE, como los observados en algunos tipos de cáncer (Bernardi et al., 2010; Fischer et al., 1998) o por alteraciones en la glicosilación de las proteínas. Respecto a esto último, se han presentado anomalías en la glicosilación en tejidos cancerosos hepáticos (Blomme, Van Steenkiste, Callewaert, & Van Vlierberghe, 2009; Yamamoto, Sumikawa, Hada, Higashino, & Yamamura, 1981), observándose alteraciones en la glicosilación de la AChE en células Huh-7 (Hada et al., 1987; Matsuzaki, Iwamura, Itakura, & Katsunuma, 1980), las cuales podrían

alterar su actividad enzimática, pero no su síntesis (Massoulie et al., 1993). Por otro lado, la capacidad de la AChE de interaccionar con las proteínas cinasa asociada a ciclina G, aurora cinasa (Toiber, Greenberg, & Soreq, 2009), caveolina-1, citocromo c y Apaf-1 (Park et al., 2008; Park et al., 2004), posiblemente a través del sitio anicónico periférico (PAS, por sus siglas en inglés) (Johnson & Moore, 1999), el cual se encuentra cerca del sitio catalítico, plantea la posibilidad de que las proteínas puedan obstaculizar el acceso del sustrato a la triada catalítica de la AChE, provocando la caída en la actividad de esta proteína. Estas posibilidades podrían explicar el aumento en la síntesis y caída de la actividad enzimática de la AChE en cultivos HD.

Por lo que respecta al cáncer hepático maligno y aunque existan evidencias de que la AChE funciona como un supresor de tumores en el hígado (Nie et al., 2013; Park et al., 2008; Raggi et al., 2014), las bases moleculares de la acción de esta proteína es poco conocida, especialmente porque su expresión hepática aparentemente cambia mucho en diferentes condiciones (Wang et al., 2008). Los resultados aquí presentados confirman la contribución de la AChE al crecimiento del HCC y apoyan un enlace hasta ahora no presentado entre los niveles de actividad de la AChE y los niveles de expresión de ciclina D1. Así mismo las evidencias muestran que a alta densidad celular hubo un aumento en el contenido tanto de la proteína AChE como de la proteína p27, el cual es un inhibidor del ciclo celular (Figura 6 y 8), junto con una disminución en los niveles de ciclina D1, sugiriendo que la AChE puede estar directamente involucrada en el control del ciclo celular, ya que presenta un comportamiento similar a la proteína p27.

Con base en lo anterior, se ha señalado la importancia de la densidad como factor en el control de la propagación celular en condiciones de cultivo. A una densidad celular alta se ha establecido que el crecimiento celular se ve inhibido por contacto, asociado a una modificación en las proteínas que controlan el ciclo celular, observándose disminución en los niveles de síntesis de las ciclinas e incremento en los niveles de los inhibidores del ciclo celular (Bar, Cohen-Noyman, Geiger, & Oren, 2004; Min et al., 2012). De acuerdo en la similitud en el patrón de expresión de la proteína AChE y la proteína p27 en células cultivadas a HD, podríamos sugerir que la AChE participa en la regulación del ciclo celular. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de la AChE conduce a la disminución de la proliferación celular (Layer et al., 2013; Xiang et al., 2008) y los efectos anti-tumorales (Xu et al., 2014), lo que abre la posibilidad de una participación directa de esta proteína en el control del ciclo celular.

El mecanismo de inhibición del ciclo celular por parte de la AChE podría deberse a su gran capacidad para interaccionar con proteínas. Mediante el análisis de secuencia de aminoácidos, se revelaron sitios consensos de interacción de la AChE con otras proteínas, dentro de las cuales se encontraron sitios de reconocimiento para las ciclinas, por lo que es posible que la AChE puede interaccionar con estas proteínas evitando que realicen su función en el ciclo celular (Toiber et al., 2009). Aunque esta función es atribuida a la proteína N-terminal extendida de la AChE (N-AChE), se ha observado que el hígado exhibe altos niveles del transcrito de la AChE conteniendo el exón E1e, el cual de acuerdo a la Dra. Soreq y colaboradores, genera el N-terminal extendido de AChE-R, AChE-H y AChE-T (Meshorer & Soreq, 2006).

Por otro lado, uno de los puntos más importantes a resaltar son los niveles altos de ACh medidos en muestras de HCC (Wang et al., 2008), que muy posiblemente surgen de unos niveles de actividad de la AChE muy bajos, un fenómeno que se confirmó en los hallazgos mostrados en la figura 11. Podemos observar que los niveles de actividad enzimática de la AChE disminuyen conforme nos acercamos a la zona del tumor, lo cual fue confirmado por medio de inmunohistoquímica, en la cual se observa una disminución en el marcaje de la AChE, relacionándose muy bien con la actividad enzimática. Los resultados muestran que la AChE podría tener un papel importante en la progresión de los tumores hepáticos, lo cual tienen una coincidencia con las observaciones del grupo del Dr. Zhao (Zhao et al., 2011), por lo que las observaciones mencionadas abrieron la pregunta a contestar de si los niveles enzimáticos de esta proteína juegan un papel importante en la progresión del cáncer hepático.

Es importante notar que en los cultivos celulares que fueron expuestos al inhibidor Bw, hubo una mayor tasa de proliferación celular que en aquellos en los cuales solo fueron incubados con ACh (Figura 9A y 9B), lo que sugiere que en las condiciones que imitan a las células tumorales, los cambios del fenotipo conducen a una caída en la actividad de la AChE, que le confiere a la célula mayor capacidad proliferativa, la cual se agrava cuando solo se le agrega el Bw, lo que posiblemente lleva a una sobreactivación colinérgica y aumento en la tasa de división celular. Los resultados de la figura 9C que muestran una asociación de la actividad de la AChE con los niveles de ciclina D1, coinciden con las evidencias proporcionadas por el grupo del Dr. Zhao. Ellos informaron que las vías de ERK 1/2 y Akt se activan en líneas de HCC a través de la ACh, de modo que cuando la

actividad de la AChE incrementa, el grado de activación de estas vías y los niveles de la ciclina D1 disminuyen (Zhao et al., 2011). Nuestros resultados muestran que la caída en la actividad de la AChE es seguido por un aumento en los niveles de ciclina D1 (Figura 9C) y un aumento en la proliferación celular (Figura 9A), como también se pudo establecer con el aumento en el número de esferoides (Figura 10), los cuales confirman y extienden los resultados del Dr. Zhao. Por lo que las modificaciones que pudiera sufrir la AChE, causadas por las mutaciones en su gen y/o por aberraciones en la glicosilación, pudieran causar alteraciones en la actividad enzimática, favoreciendo así la progresión y/o agresividad de los tumores hepáticos.

Nuestra propuesta indica que la AChE se comporta como un supresor de tumores y puede ser utilizado como un marcador de pronóstico para el HCC: Cuanto menor actividad de la AChE, más altos serán los niveles de ACh, lo cual podría traer como consecuencia un tumor más agresivo y un mayor riesgo de mal pronóstico (Zhao et al., 2011). Algunos informes apoyan fuertemente una relación entre los bajos niveles de actividad de la AChE, la proliferación celular y la formación de tumores. Por ejemplo, el grupo del Dr. Calaf reportó que la inhibición de la AChE por administración de fisostigmina en ratas, fue capaz de provocar la carcinogénesis en la glándula del epitelio mamario de rata (Calaf, Parra, & Garrido, 2007). Lo cual confirma que los niveles de actividad enzimática juegan un papel muy importante en el control de la proliferación celular mediada por la ACh. Una de las limitantes de los cultivos en monocapa es la capacidad que tienen de inhibirse por contacto, por lo que sacar conclusiones certeras en cuanto a la participación de la AChE en la proliferación celular lo hace un modelo limitante.

Para contrarrestar esa limitación, se realizó el ensayo de formación de esferoides. Dicho modelo *in vitro* para el estudio del cáncer, es bien aceptado por la comunidad científica, ya que se utiliza para el análisis y la búsqueda de marcadores moleculares, estudios de fármacos anti-cancerígenos y cambios en la expresión de proteínas claves que promueven una mayor o menor tumorigenicidad (Cao et al., 2011; Menrad et al., 2010). Cuando se evaluó la formación de esferoides en cultivos celulares en presencia de Bw y ACh, se observó de manera clara un aumento en el número de esferoides formados, el cual presentó un apoyo adicional para el efecto de supresor de tumores de la AChE (Figura 10). Cabe señalar que la inhibición de la AChE por la exposición a Bw causó un aumento tanto en la proliferación celular (Figura 9) como en el número de esferoides formados (Figura 10). Estos resultados demuestran la capacidad que tiene la AChE de ser un actor importante en la tumorigenicidad, estableciéndose así que la AChE de membrana es un regulador importante de la progresión del cáncer hepático.

Nuestros resultados proporcionan un sustento a la función supresora de tumores propuesta para la AChE, destacando su importancia para disminuir los niveles de ACh y por este medio ralentizar los efectos mitogénicos de este neurotransmisor. Sin embargo, sigue existiendo la posibilidad de que la AChE sea capaz de controlar la proliferación celular de una manera directa. A este respecto, se ha observado que la forma molecular AChE-sináptica participa como una DNAsa en el proceso de la apoptosis. Los eventos incluyen una expresión sobre-regulada, la translocación nuclear, la unión al ADN y la digestión del ADN cromosómico, que

constituyen el mecanismo por el cual la AChE-sináptica media la apoptosis celular (Sanchez-Osuna & Yuste, 2015).

Las evidencias acumuladas indican que la actividad de la AChE en el cáncer de hígado puede ser considerada como un objetivo fiable para estrategias terapéuticas debido a la capacidad aquí demostrada de la AChE para desacelerar el crecimiento del HCC.

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo revelan la capacidad anti-tumoral de la AChE.

- a) Se estableció que los niveles de actividad de la AChE disminuyeron en células sembradas al 100% de confluencia, lo que coincide con lo observado en tumores hepáticos. Razón por la cual se consideraría que la AChE participa de manera importante (al perder su capacidad catalítica) en la formación de los tumores hepáticos, donde el crecimiento celular es descontrolado, desordenado y las uniones celulares son muy estrechas.
- b) Se demostró que la AChE tuvo patrones de expresión similares a la proteína p27, lo cual sugiere que la proteína AChE podría participar directamente en el arresto celular al interaccionar con proteínas que promuevan el ciclo celular, como lo son las ciclinas.
- c) Se demostró que la actividad enzimática de la AChE fue inversamente proporcional con los niveles de la proteína ciclina D1, lo cual sustenta firmemente la participación de la proteína AChE en la regulación del ciclo celular vía el sistema no-colinérgico.

d) Se demostró que la proteína AChE puede controlar los niveles de ACh y de esta manera controlar los efectos mitogénicos de esta molécula, los cuales se han demostrado que se encuentran incrementados en HCC (Figura 12).

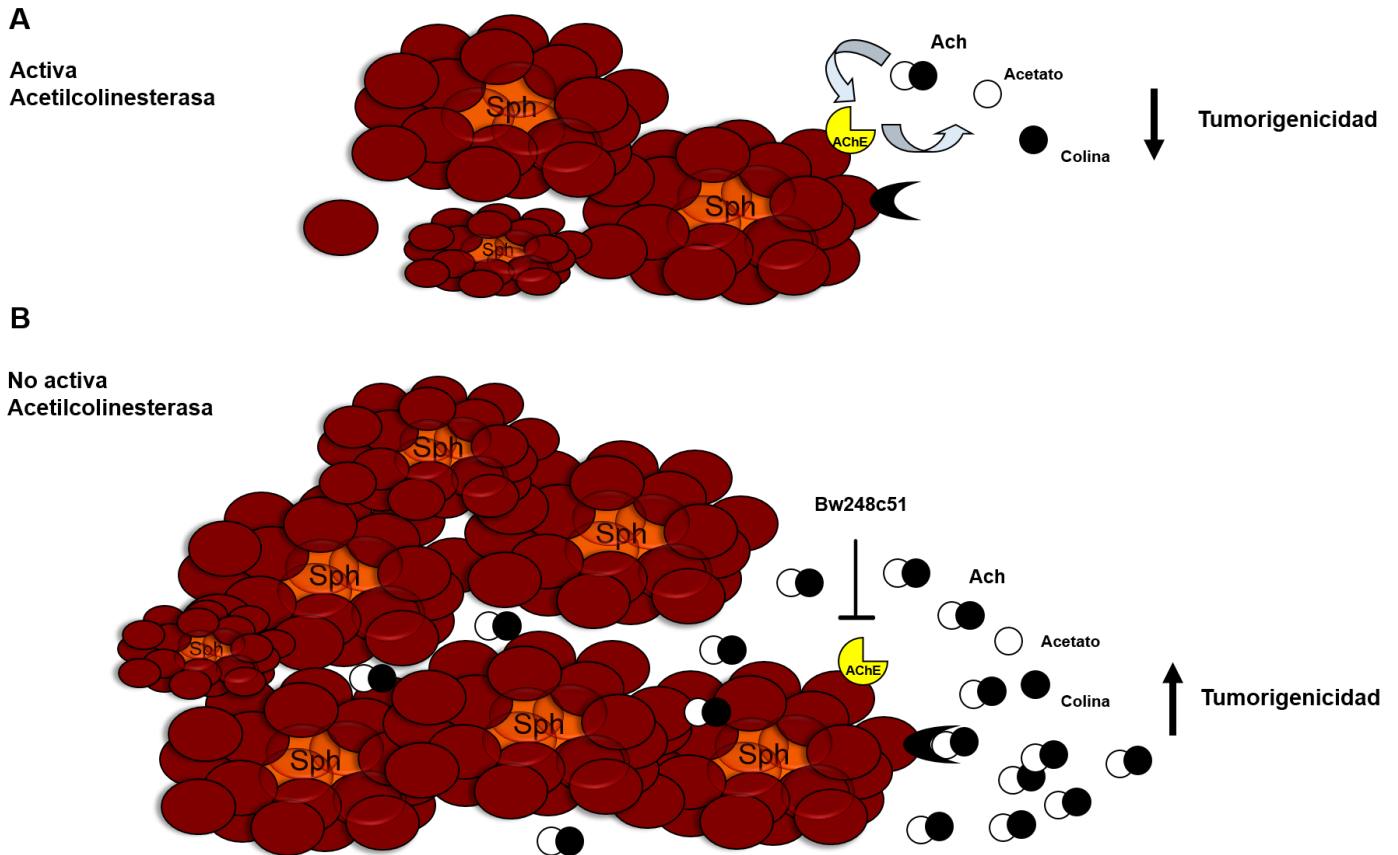


Figura 12. Diagrama que representa la participación de la AChE en la tumorigenicidad. La AChE es una proteína muy importante en la regulación de los niveles de ACh en órganos y células neurales y no neurales, ya que este neurotransmisor promueve proliferación celular a través de los receptores muscarínicos y nicotínicos. **A:** En condiciones normales, la AChE controla los niveles de ACh hidrolizando a este neurotransmisor e impidiendo que éste llegue a los receptores, por lo que el número de esferoides es controlado, disminuyendo así la tumorigenicidad. **B:** Cuando la AChE es inhibida químicamente (BW248c51 inhibidor impermeable de la AChE que reside en la

membrana plasmática), los niveles de ACh incrementan significativamente por la capacidad de las células cancerosas de sintetizarlo y por la escasa actividad enzimática de la AChE, por lo que este neurotransmisor llega a los receptores blancos, promoviendo proliferación celular, la cual se ve reflejado en el aumento en el número de esferoides formados, aumentando así la tumorigenicidad.

PERSPECTIVAS

Evaluar si la AChE interacciona con proteínas que promueven el ciclo celular, como por ejemplo las ciclinas, para demostrar en qué etapa del ciclo celular es donde podría estar participando en la regulación de este proceso.

Sabiendo que ACh es un agente que promueve proliferación celular, estudiar si este transmisor inhibe la expresión de la AChE vía receptores muscarínicos y nicotínicos.

Demostrar en un modelo de carcinogénesis hepática si los niveles altos de ACh se presentan como consecuencia de la baja actividad enzimática de la AChE, o si son los altos niveles de ACh los que reprimen la expresión y/o actividad de la AChE.

REFERENCIAS

- Arpagaus, M., Chatonnet, A., Masson, P., Newton, M., Vaughan, T. A., Bartels, C. F., . . . Lockridge, O. (1991). Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. *J Biol Chem*, 266(11), 6966-6974.
- Bar, J., Cohen-Noyman, E., Geiger, B., & Oren, M. (2004). Attenuation of the p53 response to DNA damage by high cell density. *Oncogene*, 23(12), 2128-2137. doi: 10.1038/sj.onc.1207325
- Bernardi, C. C., Ribeiro Ede, S., Cavalli, I. J., Chautard-Freire-Maia, E. A., & Souza, R. L. (2010). Amplification and deletion of the ACHE and BCHE cholinesterase genes in sporadic breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 197(2), 158-165. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2009.10.011
- Berninsone, P., Katz, E., Napp, M., & Azcurra, J. (1989). Acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase activities in rat liver: subcellular localization, molecular forms, and some extraction properties. *Biochem Cell Biol*, 67(11-12), 817-822.

- Blomme, B., Van Steenkiste, C., Callewaert, N., & Van Vlierberghe, H. (2009). Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J Hepatol*, 50(3), 592-603. doi: 10.1016/j.jhep.2008.12.010
- Blum, H. E., & Spangenberg, H. C. (2007). Hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Iran Med*, 10(3), 361-371. doi: 07103/AIM.0015
- Bon, S., & Massoulie, J. (1997). Quaternary associations of acetylcholinesterase. I. Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail. *J Biol Chem*, 272(5), 3007-3015.
- Brown, S. S., Kalow, W., Pilz, W., Whittaker, M., & Woronick, C. L. (1981). The plasma cholinesterases: a new perspective. *Adv Clin Chem*, 22, 1-123.
- Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M. T., Campoy, F. J., & Vidal, C. J. (1994). G4 forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse muscle differ in their interaction with Ricinus communis agglutinin. *Biochim Biophys Acta*, 1225(3), 283-288.
- Calaf, G. M., Parra, E., & Garrido, F. (2007). Cell proliferation and tumor formation induced by eserine, an acetylcholinesterase inhibitor, in rat mammary gland. *Oncol Rep*, 17(1), 25-33.
- Cao, L., Zhou, Y., Zhai, B., Liao, J., Xu, W., Zhang, R., . . . Yin, Z. (2011). Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol*, 11, 71. doi: 10.1186/1471-230X-11-71
- Cassiman, D., Libbrecht, L., Sinelli, N., Desmet, V., Denef, C., & Roskams, T. (2002). The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am J Pathol*, 161(2), 521-530. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64208-3
- Castillo-Gonzalez, A. C., Nieto-Ceron, S., Pelegrin-Hernandez, J. P., Montenegro, M. F., Noguera, J. A., Lopez-Moreno, M. F., . . . Cabezas-Herrera, J. (2015). Dysregulated cholinergic network as a novel biomarker of poor prognostic in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 15(1), 385. doi: 10.1186/s12885-015-1402-y
- Castillo-Gonzalez, A. C., Pelegrin-Hernandez, J. P., Nieto-Ceron, S., Pinero Madrona, A., Noguera, J. A., Lopez-Moreno, M. F., . . . Cabezas-Herrera, J. (2015). Unbalanced acetylcholinesterase activity in larynx squamous cell carcinoma. *Int Immunopharmacol*. doi: 10.1016/j.intimp.2015.05.011
- Coussen, F., Ayon, A., Le Goff, A., Leroy, J., Massoulie, J., & Bon, S. (2001). Addition of a glycoposphatidylinositol to acetylcholinesterase. Processing, degradation, and secretion. *J Biol Chem*, 276(30), 27881-27892. doi: 10.1074/jbc.M010817200
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
- Farazi, P. A., & DePinho, R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*, 6(9), 674-687. doi: 10.1038/nrc1934
- Fischer, K., Brown, J., Scherer, S. W., Schramm, P., Stewart, J., Fugazza, G., . . . Dohner, H. (1998). Delineation of genomic regions in chromosome band 7q22 commonly deleted in myeloid leukemias. *Recent Results Cancer Res*, 144, 46-52.
- Forner, A., Llovet, J. M., & Bruix, J. (2012). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 379(9822), 1245-1255. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61347-0

- Garcia-Ayllon, M. S., Millan, C., Serra-Basante, C., Bataller, R., & Saez-Valero, J. (2012). Readthrough acetylcholinesterase is increased in human liver cirrhosis. *PLoS One*, 7(9), e44598. doi: 10.1371/journal.pone.0044598
- Garcia-Ayllon, M. S., Saez-Valero, J., Munoz-Delgado, E., & Vidal, C. J. (2001). Identification of hybrid cholinesterase forms consisting of acetyl- and butyrylcholinesterase subunits in human glioma. *Neuroscience*, 107(2), 199-208.
- Garcia-Ayllon, M. S., Silveyra, M. X., Candela, A., Compan, A., Claria, J., Jover, R., . . . Saez-Valero, J. (2006). Changes in liver and plasma acetylcholinesterase in rats with cirrhosis induced by bile duct ligation. *Hepatology*, 43(3), 444-453. doi: 10.1002/hep.21071
- Getman, D. K., Eubanks, J. H., Camp, S., Evans, G. A., & Taylor, P. (1992). The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet*, 51(1), 170-177.
- Hada, T., Yamamoto, T., Imanishi, H., Takahashi, S., Amuro, Y., Higashino, K., & Sato, J. (1987). Novel cholinesterase expression in the HuH-7 cell line. *Tumour Biol*, 8(1), 3-8.
- Horiuchi, Y., Kimura, R., Kato, N., Fujii, T., Seki, M., Endo, T., . . . Kawashima, K. (2003). Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci*, 72(15), 1745-1756.
- Jing, P., Jin, Q., Wu, J., & Zhang, X. J. (2008). GSK3beta mediates the induced expression of synaptic acetylcholinesterase during apoptosis. *J Neurochem*, 104(2), 409-419. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04975.x
- Johnson, G., & Moore, S. W. (1999). The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. *Biochem Biophys Res Commun*, 258(3), 758-762. doi: 10.1006/bbrc.1999.0705
- Kaneko, A., Dempo, K., & Onoe, T. (1972). Heterogeneity of esterases and cell types in rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 284(1), 128-135.
- Kaposi-Novak, P., Lee, J. S., Gomez-Quiroz, L., Coulouarn, C., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2006). Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*, 116(6), 1582-1595. doi: 10.1172/JCI27236
- Layer, P. G., Klaczinski, J., Salfelder, A., Sperling, L. E., Thangaraj, G., Tuschl, C., & Vogel-Hopker, A. (2013). Cholinesterases in development: AChE as a firewall to inhibit cell proliferation and support differentiation. *Chem Biol Interact*, 203(1), 269-276. doi: 10.1016/j.cbi.2012.09.014
- Lee, Y. H., Judge, A. D., Seo, D., Kitade, M., Gomez-Quiroz, L. E., Ishikawa, T., . . . Thorgeirsson, S. S. (2011). Molecular targeting of CSN5 in human hepatocellular carcinoma: a mechanism of therapeutic response. *Oncogene*, 30(40), 4175-4184. doi: 10.1038/onc.2011.126
- Lee, Y. H., Seo, D., Choi, K. J., Andersen, J. B., Won, M. A., Kitade, M., . . . Thorgeirsson, S. S. (2014). Antitumor effects in hepatocarcinoma of isoform-selective inhibition of HDAC2. *Cancer Res*, 74(17), 4752-4761. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3531
- Lindenboim, L., Pinkas-Kramarski, R., Sokolovsky, M., & Stein, R. (1995). Activation of muscarinic receptors inhibits apoptosis in PC12M1 cells. *J Neurochem*, 64(6), 2491-2499.
- Lockridge, O. (1988). Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*, 9(4), 125-128. doi: 10.1002/bies.950090406

- Lu, L., Zhang, X., Zhang, B., Wu, J., & Zhang, X. (2013). Synaptic acetylcholinesterase targeted by microRNA-212 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(11), 2530-2540. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.007
- Lucas, C. A., & Kreutzberg, G. W. (1985). Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures.--1. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin. *Neuroscience*, 14(1), 349-360.
- Martinez-Lopez de Castro, A., Nieto-Ceron, S., Aurelio, P. C., Galbis-Martinez, L., Latour-Perez, J., Torres-Lanzas, J., . . . Cabezas-Herrera, J. (2008). Cancer-associated differences in acetylcholinesterase activity in bronchial aspirates from patients with lung cancer. *Clin Sci (Lond)*, 115(8), 245-253. doi: 10.1042/CS20070393
- Martinez-Moreno, P., Nieto-Ceron, S., Torres-Lanzas, J., Ruiz-Espejo, F., Tovar-Zapata, I., Martinez-Hernandez, P., . . . Cabezas-Herrera, J. (2006). Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. *Carcinogenesis*, 27(3), 429-436. doi: 10.1093/carcin/bgi250
- Massoulie, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11(3), 130-143. doi: 65054
- Massoulie, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N., & Simon, S. (1998). Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *J Physiol Paris*, 92(3-4), 183-190.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41(1), 31-91.
- Matsuzaki, S., Iwamura, K., Itakura, M., & Katsunuma, T. (1980). Abnormalities of serum cholinesterase isozyme in liver cirrhosis and hepatoma (Part II). *Gastroenterol Jpn*, 15(6), 543-549.
- Mendez-Sanchez, N., Garcia-Villegas, E., Merino-Zeferino, B., Ochoa-Cruz, S., Villa, A. R., Madrigal, H., . . . Uribe, M. (2010). Liver diseases in Mexico and their associated mortality trends from 2000 to 2007: A retrospective study of the nation and the federal states. *Ann Hepatol*, 9(4), 428-438.
- Menrad, H., Werno, C., Schmid, T., Copanaki, E., Deller, T., Dehne, N., & Brune, B. (2010). Roles of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) versus HIF-2alpha in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology*, 51(6), 2183-2192. doi: 10.1002/hep.23597
- Meshorer, E., & Soreq, H. (2006). Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci*, 29(4), 216-224. doi: 10.1016/j.tins.2006.02.005
- Min, J., Wang, X., Tong, Y., Li, X., Tao, D., Hu, J., . . . Gong, J. (2012). Expression of cyclins in high-density cultured cells and in vivo tumor cells. *Cytometry A*, 81(10), 874-882. doi: 10.1002/cyto.a.22105
- Montenegro, M. F., Nieto-Ceron, S., Cabezas-Herrera, J., Munoz-Delgado, E., Campoy, F. J., & Vidal, C. J. (2014). Most acetylcholinesterase activity of non-nervous tissues and cells arises from the AChE-H transcript. *J Mol Neurosci*, 53(3), 429-435. doi: 10.1007/s12031-013-0172-8
- Montenegro, M. F., Ruiz-Espejo, F., Campoy, F. J., Munoz-Delgado, E., de la Cadena, M. P., Rodriguez-Berrocal, F. J., & Vidal, C. J. (2006). Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. *Cell Mol Life Sci*, 63(18), 2175-2182. doi: 10.1007/s00018-006-6231-3

- Munoz-Delgado, E., Montenegro, M. F., Campoy, F. J., Moral-Naranjo, M. T., Cabezas-Herrera, J., Kovacs, G., & Vidal, C. J. (2010). Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types. *FEBS J*, 277(21), 4519-4529. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07861.x
- Neville, P. J., Thomas, N., & Campbell, I. G. (2001). Loss of heterozygosity at 7q22 and mutation analysis of the CDP gene in human epithelial ovarian tumors. *Int J Cancer*, 91(3), 345-349.
- Nie, H., Cao, Q., Zhu, L., Gong, Y., Gu, J., & He, Z. (2013). Acetylcholine acts on androgen receptor to promote the migration and invasion but inhibit the apoptosis of human hepatocarcinoma. *PLoS One*, 8(4), e61678. doi: 10.1371/journal.pone.0061678
- Ohkura, T., Hada, T., Higashino, K., Ohue, T., Kochibe, N., Koide, N., & Yamashita, K. (1994). Increase of fucosylated serum cholinesterase in relation to high risk groups for hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 54(1), 55-61.
- Park, S. E., Jeong, S. H., Yee, S. B., Kim, T. H., Soung, Y. H., Ha, N. C., . . . Yoo, Y. H. (2008). Interactions of acetylcholinesterase with caveolin-1 and subsequently with cytochrome c are required for apoptosome formation. *Carcinogenesis*, 29(4), 729-737. doi: 10.1093/carcin/bgn036
- Park, S. E., Kim, N. D., & Yoo, Y. H. (2004). Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res*, 64(8), 2652-2655.
- Perelman, A., & Brandan, E. (1989). Different membrane-bound forms of acetylcholinesterase are present at the cell surface of hepatocytes. *Eur J Biochem*, 182(1), 203-207.
- Perrier, A. L., Massoulie, J., & Krejci, E. (2002). PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*, 33(2), 275-285.
- Raggi, C., Factor, V. M., Seo, D., Holczbauer, A., Gillen, M. C., Marquardt, J. U., . . . Thorgeirsson, S. S. (2014). Epigenetic reprogramming modulates malignant properties of human liver cancer. *Hepatology*, 59(6), 2251-2262. doi: 10.1002/hep.27026
- Resende, R. R., Alves, A. S., Britto, L. R., & Ulrich, H. (2008). Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 314(7), 1429-1443. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.01.003
- Rotundo, R. L., Thomas, K., Porter-Jordan, K., Benson, R. J., Fernandez-Valle, C., & Fine, R. E. (1989). Intracellular transport, sorting, and turnover of acetylcholinesterase. Evidence for an endoglycosidase H-sensitive form in Golgi apparatus, sarcoplasmic reticulum, and clathrin-coated vesicles and its rapid degradation by a non-lysosomal mechanism. *J Biol Chem*, 264(6), 3146-3152.
- Saez-Valero, J., Sberna, G., McLean, C. A., & Small, D. H. (1999). Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 72(4), 1600-1608.
- Sanchez-Osuna, M., & Yuste, V. J. (2015). AChE for DNA degradation. *Cell Res*, 25(6), 653-654. doi: 10.1038/cr.2015.52
- Santos, S. C., Vala, I., Miguel, C., Barata, J. T., Garcao, P., Agostinho, P., . . . Saldanha, C. (2007). Expression and subcellular localization of a novel nuclear acetylcholinesterase protein. *J Biol Chem*, 282(35), 25597-25603. doi: 10.1074/jbc.M700569200

- Schuman, R. F., Brimfield, A. A., & Hunter, K. W. (1984). A micro-method for the detection of butyrylcholinesterase secreted by hepatocytes in vitro. *Biosci Rep*, 4(2), 149-154.
- Shen, J. X., Qin, D., Wang, H., Wu, C., Shi, F. D., & Wu, J. (2013). Roles of nicotinic acetylcholine receptors in stem cell survival/apoptosis, proliferation and differentiation. *Curr Mol Med*, 13(9), 1455-1464.
- Soreq, H., Ben-Aziz, R., Prody, C. A., Seidman, S., Gnatt, A., Neville, L., . . . et al. (1990). Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(24), 9688-9692.
- Soreq, H., Patinkin, D., Lev-Lehman, E., Grifman, M., Ginzberg, D., Eckstein, F., & Zakut, H. (1994). Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(17), 7907-7911.
- Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*, 2(4), 294-302. doi: 10.1038/35067589
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., & Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
- Toiber, D., Greenberg, D. S., & Soreq, H. (2009). Pro-apoptotic protein-protein interactions of the extended N-AChE terminus. *J Neural Transm*, 116(11), 1435-1442. doi: 10.1007/s00702-009-0249-2
- Tornel, P. L., Saez-Valero, J., & Vidal, C. J. (1992). Ricinus communis agglutinin I reacting and non-reacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett*, 145(1), 59-62.
- 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. *Biochem J*, 296 (Pt 3), 649-656.
- Verslype, C., Van Cutsem, E., Dicato, M., Arber, N., Berlin, J. D., Cunningham, D., . . . van de Velde, C. (2009). The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2008. *Ann Oncol*, 20 Suppl 7, vii1-vii6. doi: 10.1093/annonc/mdp281
- Vidal, C. J. (2005). Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. *Chem Biol Interact*, 157-158, 227-232. doi: 10.1016/j.cbi.2005.10.035
- Wang, Y., Wang, T., Shi, X., Wan, D., Zhang, P., He, X., . . . Xu, G. (2008). Analysis of acetylcholine, choline and butyrobetaine in human liver tissues by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 47(4-5), 870-875. doi: 10.1016/j.jpba.2008.02.022
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., & Racke, K. (1998). Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther*, 77(1), 59-79.
- Wessler, I., Reinheimer, T., Kilbinger, H., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., Saloga, J., & Knop, J. (2003). Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *Life Sci*, 72(18-19), 2169-2172.

- Xiang, A. C., Xie, J., & Zhang, X. J. (2008). Acetylcholinesterase in intestinal cell differentiation involves G2/M cell cycle arrest. *Cell Mol Life Sci*, 65(11), 1768-1779. doi: 10.1007/s00018-008-8016-3
- Xu, H., Shen, Z., Xiao, J., Yang, Y., Huang, W., Zhou, Z., . . . Chu, L. (2014). Acetylcholinesterase overexpression mediated by oncolytic adenovirus exhibited potent anti-tumor effect. *BMC Cancer*, 14, 668. doi: 10.1186/1471-2407-14-668
- Yamamoto, H., Sumikawa, K., Hada, T., Higashino, K., & Yamamura, Y. (1981). gamma-Glutamyltransferase from human hepatoma tissue in comparison with normal liver enzyme. *Clin Chim Acta*, 111(2-3), 229-237.
- Yan, G. M., Lin, S. Z., Irwin, R. P., & Paul, S. M. (1995). Activation of muscarinic cholinergic receptors blocks apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol*, 47(2), 248-257.
- Ye, W., Gong, X., Xie, J., Wu, J., Zhang, X., Ouyang, Q., . . . Zhang, X. (2010). AChE deficiency or inhibition decreases apoptosis and p53 expression and protects renal function after ischemia/reperfusion. *Apoptosis*, 15(4), 474-487. doi: 10.1007/s10495-009-0438-3
- Zhang, J. Y., Jiang, H., Gao, W., Wu, J., Peng, K., Shi, Y. F., & Zhang, X. J. (2008). The JNK/AP1/ATF2 pathway is involved in H₂O₂-induced acetylcholinesterase expression during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 65(9), 1435-1445. doi: 10.1007/s00018-008-8047-9
- Zhang, X. J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J. P., He, H. Y., Jin, Q. H., . . . Shi, Y. F. (2002). Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ*, 9(8), 790-800. doi: 10.1038/sj.cdd.4401034
- Zhao, Y., Wang, X., Wang, T., Hu, X., Hui, X., Yan, M., . . . He, X. (2011). Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization. *Hepatology*, 53(2), 493-503. doi: 10.1002/hep.24079