



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EXPRESIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA EN LINFOCITOS
T HUMANOS NORMALES Y EN CÉLULAS LEUCÉMICAS**

Tesis para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental

Presenta:

BIÓL. EXP. LUIS ANTONIO FLORES LÓPEZ

Comité Tutorial

Dr. Héctor Fernando Serrano (Director)

Dr. José Luis Gómez Olivares (Asesor interno)

Dra. Rocío Salceda Sacanelles (Asesor externo)

México, D.F.

Abril de 2008

Comité Tutorial

DIRECTOR

Dr. Héctor Fernando Serrano

Profesor Titular

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Email: hser@xanum.uam.mx

ASESOR INTERNO

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Email: gomez_olivares_jose_luis@hotmail.com

ASESOR EXTERNO

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Profesor Titular

Instituto de Fisiología Celular
Departamento de Neurociencias
Universidad Nacional Autónoma de México.

Email: rsalceda@ifc.unam.mx

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

Se agradece al CONACYT por los apoyos obtenidos al posgrado de Maestría en Biología Experimental, con número de registro UAM-I: 309-0 y con clave: C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca con número de registro 198493.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada EXPRESIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA EN LINFOCITOS T HUMANOS NORMALES Y EN CÉLULAS LEUCÉMICAS con fecha del 18 de abril del 2008.

(Presidente)

Dr. José Luis Gómez Olivares
Dpto. de Ciencias de la Salud, UAM-I

(Secretaria)

Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

(Vocal)

Dra. Patricia Pérez Vera
Instituto Nacional de Pediatría

(Vocal)

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés
Facultad de Estudios Superiores, Iztacala

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Biomembranas, Biología Molecular y Regulación Endocrina de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la Dirección del Dr. Héctor Fernando Serrano, del Laboratorio de Biología Molecular y Regulación Endocrina de la UAM Iztapalapa, y con la asesoría del Dr. José Luis Gómez Olivares del Laboratorio de Biomembranas y de la Dra. Rocío Salceda Sacanelles del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. A todos ellos un profundo agradecimiento por su atención y dedicación constantes, fundamentales para la realización de este trabajo.

A la memoria de mi madre Guadalupe,
a mi padre Antonio,
a mis hermanas,
a mi sobrino.

Agradecimientos

A mi familia, en especial a mis padres que me enseñaron que si se quiere ser alguien en la vida sólo se logra con esfuerzo y dedicación.

A mis amigos y primos que siempre me han dado ánimos y apoyo dentro y fuera de la escuela.

A mis amigos y compañeros de la Maestría en Biología Experimental: Nadia, Karla, Gerardo, Gloria, Mario, Oreth y Martha, por los momentos alegres compartidos.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biomembranas: por su amistad y cooperación incondicionales

A la Dra. Mina Konigsberg Fainstein, la Dra. Norma García Guerrero y al M. en B. E. Armando Luna López del Laboratorio de Bioenergética por la ayuda que me proporcionaron a lo largo del proyecto.

Al Dr. Pablo Damián Matzumura, Leticia y Erika del Laboratorio de Biología Molecular.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés y a la Dra. Myriam Rodríguez Sosa de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Patricia Pérez Vera del Instituto Nacional de Pediatría, por el apoyo que me brindo en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Nayali Alejandra López Balderas del Departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por facilitarnos la línea celular Jurkat.

A todos mis maestros, en especial a la Dra. Leonor Rodríguez Cruz y al M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez, que me transmitieron sus conocimientos y que fueron de gran ayuda en mi trabajo de investigación.

A todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis.

El sabio no dice nunca todo lo que piensa, pero siempre piensa todo lo que dice.
(Aristóteles 384-322 A.C.)

La ciencia humana consiste más en destruir errores que en descubrir verdades.
(Sócrates 470-399 A.C.)

El genio se compone del dos por ciento de talento y del 98 por ciento de perseverante
aplicación.
(Ludwig Van Beethoven 1770-1827)

Sólo la propia y personal experiencia hace al hombre sabio.
(Sigmund Freud 1856-1939)

Abreviaturas más empleadas

A₄, A₈, A₁₂:	Formas asimétricas de la acetilcolinesterasa
ACh:	Acetilcolina
AChE:	Acetilcolinesterasa (acetilcolina acetilhidrolasa, EC 3.1.1.7)
mAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
nAChR	Receptor muscarínico de acetilcolina
AE:	Actividad específica (U/mg)
ATCh:	Acetil-tiocolina
ATP:	5'-Adenosina trifosfato
C:	Catalasa
ChE:	Colinesterasa
Con A:	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>)
ChAT:	Acetilcolina transferasa
C-terminal:	Carboxilo terminal en un polipéptido
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario
DTNB:	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA:	Ácido etilenglicol-bis-(aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
F:	Fosfatasa alcalina (cuando se emplea como marcador en los análisis de sedimentación)
FA:	Fosfatasa alcalina
G₁, G₂, G₄:	Formas globulares de la acetilcolinesterasa
G^A:	Molécula globular anfifílica de la acetilcolinesterasa
G^H:	Molécula globular hidrofílica de acetilcolinesterasa
g:	Unidades de gravedad "g"
GFI:	Enlace glicosilfosfatidilinositol
HEPES:	Ácido N-(2-hidroximetil) piperazina-N'-2-etanosulfónico
Iso-OMPA:	Tetraisopropilpirofosforamida
kb:	Kilobases
kDa:	Kilodaltones

LCA:	Agglutinina de lenteja (Lectina de <i>Lens culinaris</i>)
NAcGluc:	N-acetil-D-glucosamina
NaCl:	Cloruro de sodio
N-terminal:	Amino terminal de un polipéptido
pb:	Pares de bases
pNPP:	Fosfato de para-nitrofenilo
p/v:	Relación peso/volumen
RCA:	Agglutinina de ricino (Lectina de <i>Ricinus communis</i>)
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA:	Ácido ribonucleico
RNA_m:	Ácido ribonucleico tipo mensajero
rpm:	Revoluciones por minuto
S:	Unidad Svedberg de coeficiente de sedimentación
S₁:	Sobrenadante obtenido con elevada fuerza iónica
S₂:	Sobrenadante obtenido con Triton X-100 o Brij 96
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis desnaturalizante con SDS, en gel de poliacrilamida
THS:	Amortiguador Hepes salino (Hepes 15 mM, NaCl 1 M, MgCl ₂ 50 mM; pH 7,5)
TST:	Amortiguador Hepes salino con Triton X-100
Tris:	Tris (hidroximetil)-aminometano
TX-100	Triton X-100
U:	Cantidad de enzima capaz de hidrolizar un μmol de sustrato por hora a 37°C
WGA:	Lectina de germen de trigo (<i>Triticum vulgare</i>)

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza al neurotransmisor acetilcolina tras su liberación en las sinapsis colinérgicas. El papel biológico de la AChE no está limitado a la transmisión colinérgica, en tejidos no neuronales se ha detectado actividad acetilcolinesterásica. La AChE se presenta en formas globulares como monómeros, dímeros y tetrámeros unidos o no a otros elementos estructurales y en formas asimétricas como tetrámeros, octámeros y dodecámeros unidos a un tallo colágeno. Las formas moleculares se generan a partir de un gen de 7 Kb, localizado en el cromosoma 7 de humano en la región q22, el cual da origen a tres transcritos. El RNAm con los exones E2-E3-E4-E6 genera subunidades T. El RNAm con E2-E3-E4-E5 genera las subunidades H. En mamíferos se han identificado transcritos R conformados por E2-E3-E4-E5. Es importante conocer cómo se regula la expresión del gen AChE y las formas moleculares que codifica en estados patológicos de proliferación celular (leucemias). Para ello se realizó el análisis de la expresión génica de la acetilcolinesterasa en linfocitos T humanos normales y en células T leucémicas.

METODOLOGÍA

Se obtuvo sangre periférica de personas sanas, de la cual los leucocitos se aislaron por gradiente de densidad. Los linfocitos T se purificaron con un anticuerpo dirigido contra CD3 adsorbido a perlas magnéticas. El nivel de pureza de linfocitos T se determinó por citometría de flujo usando anti-CD3-PerCP. Para el análisis de AChE en células leucémicas T se utilizó la línea celular T Jurkat E6-1. Para analizar la expresión de la AChE humana se diseñaron primers específicos para los transcritos AChE-H, AChE-T y AChE-R y se determinó su nivel de expresión en ambos tipos celulares por RT-PCR. La AChE de linfocitos T y células Jurkat se extrajo sin y con Triton X-100. La actividad de AChE se midió por el método de Ellman y el contenido de proteínas por el procedimiento propuesto por Bradford. La glicosilación de AChE se estableció usando lectinas de diferente especificidad. Las formas moleculares de la AChE se determinaron por el análisis de sedimentación en gradientes de sacarosa.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El análisis de citometría de flujo de los linfocitos T mostró un nivel de pureza del 97%. La expresión del gen AChE mostró que los transcritos en linfocitos T normales correspondieron al tipo AChE-H. En tanto que, en las células leucémicas se detectaron transcritos AChE-H y AChE-T. En linfocitos T normales la actividad específica AChE fue semejante en fracciones S₁ y S₂. Mientras que, en células leucémicas la fracción S₂ presenta menor actividad que S₁, lo que indica que existe mayor AChE no ligada o débilmente ligada a la membrana en células leucémicas. La AChE presente en los linfocitos T mostró incorporación de glucosa (33%), manosa (66%), ácido siálico o galactosa (75%) y N-acetil-glucosamina (63%), este hecho resalta su maduración post-traducciona. En el caso de la enzima en células leucémicas, alrededor de un 66% presentó glucosa, un 72% incorporó manosa, un 67% presentó galactosa o ácido siálico y un 67% con N-acetil-glucosamina, señalando una alteración en la maduración post-traducciona en las células leucémicas. El análisis de formas moleculares confirmó que los transcritos AChE-H se encargaron de la síntesis de dímeros (5.2S) y monómeros (3.5S) anclados a la membrana plasmática por un enlace glicofosfatidilinositol). En las células leucémicas los transcritos AChE-T producen tetrámeros hidrofílicos (10.6S), lo cual demostró una alteración de la expresión del gen AChE en tales células.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Acetylcholinesterase (AChE) hydrolyzes acetylcholine (ACh) after its release in the cholinergic synapses. Their biological role is not limited to cholinergic transmission, since it has been also detected in non-neuronal tissues. AChE shows globular forms like monomers, dimers and tetramers with or without structural elements, and asymmetrical forms like tetramers, octamers and dodecamers bound with a collagenic tail. All these molecular forms are generated from a 7 Kb gene located in the q22 region of chromosome 7 in humans that are processed into one of three different transcripts. RNAs containing exons E2-E3-E4-E6 generate T subunits where's those made of E2-E3-E4-E5, generate H subunits. In mammals has been identified R transcripts formed by E2-E3-E4-I4-E5. It is important to know how it regulates gene expression AChE and molecular forms which are codified in pathological states of cell proliferation (leukemia). We made an analysis of the expression of the acetylcholinesterase gene in normal human T lymphocytes and leukemic T-cells.

METHODOLOGY

Peripheral blood was collected from healthy people; leukocytes were isolated by density gradients. The T lymphocytes were purified with anti-CD3 adsorbed to magnetic beads. The purified cells were determined by flow cytometry using anti-CD3-PerCP. The cell line T Jurkat E6-1 was used for the analysis of AChE in leukemic T cells. Specific primers were designed for each transcript of AChE human (AChE-H, AChE-T and AChE-R) and the transcripts expression was determined in both cell types by RT-PCR. The AChE of lymphocytes T and Jurkat cells were solubilised without and with Triton X-100. The activity of AChE was measured by the Ellman method and the protein content was measured by the Bradford procedure. The AChE glycosylation was established using lectins with different specificity. The molecular forms of AChE were determined by the sedimentation analysis in sucrose gradients.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The analysis of flow cytometry has founded a purity of 97% in T lymphocytes. In normal T lymphocytes the specific activity of the fractions S_1 and S_2 was very similar. While in leukemic cells the fraction S_2 presents less activity that S_1 , this indicated that exist more AChE unbound or weakly bound to the membrane in leukemic cells.

The transcripts identified in normal T lymphocytes were AChE-H, while in leukemic cells the transcripts detected were AChE-H and AChE-T. The AChE present in T lymphocytes showed incorporation of glucose (33%), manose (66%), scialic acid or galactose (75%) and N-acetylglucosamine (63%), this fact underlines its post-traduccional maturation. In the case of AChE in leukemic cells, around a 66% present glucose, a 72% present manose, a 67% present galactose or scialic acid and 67% present N- acetylglucosamine, indicating an alteration in the post-traduccional maturation of the enzyme in leukemic cells. Molecular forms identified in normal T lymphocytes were amphiphilic dimers (5.2S) and monomers (3.5S) anchored to the plasma membrane by a glycosilphosphatidilinositol structure, while in leukemic giving rise to hydrophilic tetramers (10.6S) of AChE, this shows an alteration of AChE gene expression in this cells.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	15
1.1	La acetilcolinesterasa y su función biológica	15
1.2	Funciones enzimáticas no colinérgicas alternativas de la acetilcolinesterasa	15
1.3	Formas moleculares de la acetilcolinesterasa	16
1.4	Formas moleculares asimétricas y globulares	17
1.5	Glicosilación de la acetilcolinesterasa	17
1.6	Genética de la acetilcolinesterasa	19
1.7	Efecto de los plaguicidas sobre el proceso catalítico de la acetilcolinesterasa y sus efectos fisiológicos	22
1.8	La exposición a los plaguicidas y la incidencia de cáncer	25
1.9	Niveles de la actividad acetilcolinesterasa en diversos tipos de cáncer	26
1.10	Leucemia	27
1.10.1	Leucemia y sus tipos principales	27
1.10.2	Leucemia linfoide aguda	29
1.10.3	Leucemia linfoide aguda de linaje T	30
2	JUSTIFICACIÓN	31
3	OBJETIVO GENERAL	32
3.1	OBJETIVOS PARTICULARES	32
4	HIPÓTESIS	32
5	DISEÑO EXPERIMENTAL	33
5.1	Obtención de muestras de sangre periférica y aislamiento de leucocitos	33
5.2	Conteo y viabilidad celular usando azul de tripano	33
5.3	Separación magnética de linfocitos T	34
5.4	Análisis de células T marcadas con CD3-PerCP por citometría de flujo	36
5.5	Cultivo de línea celular Jurkat E6-1	38
5.6	Aislamiento de RNA por el método de Trizol	39
5.7	Determinación de la expresión de los transcritos de AChE (H, R y T) por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	41
5.7.1	Diseño de primers y RT-PCR de un paso	42
5.7.2	RT/PCR en dos pasos	44
5.8	Solubilización de la acetilcolinesterasa usando amortiguadores con diferente fuerza iónica	46
5.8.1	Solubilización de la acetilcolinesterasa	46
5.8.2	Solubilización de proteínas de membrana con Triton X-100	46

5.9	Estimación de la actividad de la acetilcolinesterasa	48
5.9.1	Medida de la actividad acetilcolinesterásica en espectrofotómetro	48
5.9.2	Medida de la actividad acetilcolinesterásica en placas de microvaloración	49
5.10	Determinación del contenido de proteínas en extractos de linfocitos T normales y de la línea celular leucémica Jurkat E6-1	50
5.11	Determinación de las formas moleculares de AChE en células normales y Jurkat E6-1	51
5.11.1	Preparación de los gradientes de sacarosa	51
5.11.2	Medida de actividad de las enzimas marcadoras	52
5.11.3	Cálculo del coeficiente de sedimentación	53
5.12	Determinación del procesamiento post-traducciona de AChE en linfocitos T normales y en la línea celular leucémica Jurkat E6-1	53
5.13	Análisis Estadístico	54
6	RESULTADOS	55
6.1	Separación de leucocitos por gradientes de densidad con linfograd y determinación de la cantidad celular aislada y viabilidad.	55
6.2	Separación de linfocitos T por separación magnética y determinación de la cantidad celular aislada y su viabilidad.	55
6.3	Análisis de pureza de linfocitos T por citometría de flujo.	56
6.4	Cultivo de línea celular Jurkat E6-1	57
6.5	Análisis de marcaje CD3+ en células Jurkat por citometría de flujo.	57
6.6	Extracción de RNA y RT-PCR de un solo paso	58
6.7	RT/PCR en dos pasos y PCR semicuantitativa	60
6.8	Determinación de la actividad AChE en linfocitos T normales y células Jurkat	63
6.9	Glicosilación de la AChE en linfocitos T y células Jurkat	65
6.10	Formas moleculares de AChE en linfocitos T y células Jurkat	68
7	DISCUSIÓN	70
8	CONCLUSIONES	77
9	BIBLIOGRAFÍA	78

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La acetilcolinesterasa y su función biológica

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima que hidroliza rápidamente al neurotransmisor acetilcolina (ACh) tras su liberación en las sinapsis colinérgicas, finalizando la transmisión del impulso nervioso, permitiendo un control temporal preciso de la contracción muscular (Soreq y Seidman, 2001).

El papel enzimático clásico de la AChE es la hidrólisis de ACh. Sin embargo, el papel biológico de AChE no está limitado a la transmisión colinérgica. Lo anterior se basa en los altos niveles de esta enzima presentes en tejidos no neuronales, como es el caso de las células sanguíneas; eritrocitos, linfocitos y megacariocitos. Se ha sugerido que la elevada presencia de la enzima puede funcionar como filtro regulador de los altos niveles de ACh circulante. El análisis de la actividad colinesterásica (ChE) en diversos tejidos de mamíferos han llevado a establecer que la enzima está presente en todos los tejidos y fluidos, excepto las lágrimas, la orina y el sudor, pero se desconoce el significado de su gran distribución (Soreq y Seidman, 2001).

A nivel mundial la estructura y funciones de AChE han sido objeto de diversas investigaciones. No obstante, aún quedan muchas preguntas sin resolver. Tanto en su mecanismo de acción, los procesos de síntesis y su transporte a través de los compartimentos celulares. Por otro lado, también se desconoce el significado fisiológico del variado polimorfismo molecular de la AChE, así como su papel en la proliferación y diferenciación celular y su posible participación en otras actividades biológicas (Soreq y Seidman, 2001; Onganer y col., 2006).

1.2 Funciones enzimáticas no colinérgicas alternativas de la acetilcolinesterasa

Dado que la AChE se encuentra en tejidos cuya función no depende de ésteres de colina, se ha sugerido que esta enzima realiza funciones no relacionadas con la transmisión sináptica. La presencia de AChE en la membrana de eritrocitos, linfocitos y

otras células sanguíneas no ha podido ser correlacionada con funciones específicas. Algo similar ocurre en el sistema nervioso, en donde neuronas no colinérgicas poseen actividad AChE y su liberación en ciertas circunstancias al espacio extracelular plantea una incógnita respecto a la función que desempeña. La expresión del gen de la AChE en las etapas tempranas de la embriogénesis indica una posible acción morfogenética (Appleyard, 1992). Se ha propuesto que AChE puede asociarse con proteínas como β -neurexina y neurotactina de tal forma que muestra propiedades de adhesión celular (Soreq y Seidman, 2001).

La AChE puede hidrolizar otros sustratos no asociados a la transmisión neuronal sináptica u otros procesos fisiológicos específicos, como ocurre con el ácido acetilsalicílico y sus derivados neutros (Masson y col., 1998). También puede hidrolizar sustancia P y actuar sobre encefalinas y sus precursores. Basándose en este último proceso, se ha propuesto que la AChE participa en la maduración y degradación de neuropéptidos (Goebel y Pourcho, 1992). Además de la actividad sobre la sustancia P, existen evidencias experimentales que indican que la AChE tiene actividad peptidásica. Se ha encontrado actividad tríptica y exopeptidásica en preparaciones purificadas de AChE de electroplaca de anguila y en suero fetal bovino (Checler y col., 1994).

1.3 Formas moleculares de la acetilcolinesterasa

La AChE tiene diversas formas moleculares que proceden de diferentes estadios del procesamiento de una misma estructura original compleja. Se distinguen entre ellas en la estructura cuaternaria, solubilidad, interacciones iónicas o hidrofóbicas, parámetros hidrodinámicos, composición y secuencia de carbohidratos (Soreq y Seidman, 2001).

De acuerdo a la forma en que se asocian los diferentes componentes de los complejos, se han denominado como formas homoméricas cuando sólo presentan subunidades catalíticas, para distinguirlas de las heteroméricas, que contienen subunidades estructurales que incluyen estructuras tipo colagénico (Q) o subunidades hidrofóbicas (P) (Bon y col., 1976; Massoulié y col., 1993).

1.4 Formas moleculares asimétricas y globulares

La AChE se presenta en seis tipos estructurales de asociación cuaternaria. Las formas globulares (**G**) que pueden ser monómeros (G_1), dímeros (G_2) y tetrameros (G_4) con una subunidad catalítica de unos 75 kDa. Las formas asimétricas (**A**) contienen uno (A_4), dos (A_8) o tres tetrameros (A_{12}), asociados a un tallo de naturaleza semejante al colágeno. En esta nomenclatura, el subíndice señala el número de subunidades catalíticas que conforma cada molécula (Vigny y col., 1979). En la **Figura 1** se muestra la diversidad estructural de la AChE.

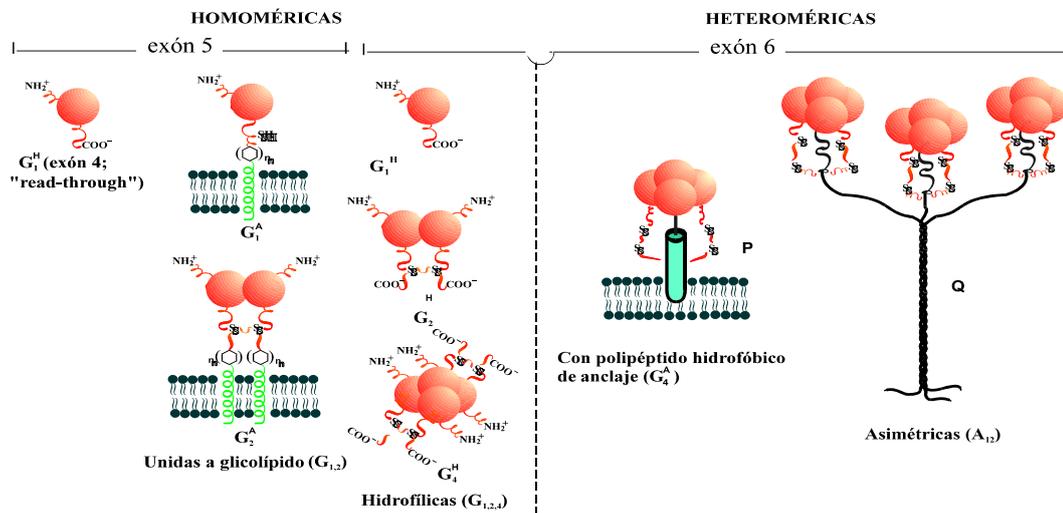


Figura 1. Formas moleculares de AChE. En primera instancia, se clasifican en formas asimétricas (**A**) y globulares (**G**). Las formas asimétricas en general son heteroméricas, que poseen una subunidad de anclaje no catalítica semejante al colágeno (Q). Las moléculas globulares pueden ser heteroméricas u homoméricas. Las primeras contienen una proteína no enzimática, como las G_4 asociadas con el polipéptido hidrofóbico (P); las homoméricas sólo poseen subunidades enzimáticas que se asocian para formar dímeros o tetrameros. Las formas globulares pueden ser hidrofílicas (G^H) o anfifílicas (G^A). Hay dos clases de dímeros y monómeros anfifílicos (Tipo I y II). Las moléculas anfifílicas Tipo I tienen un glicolípido unido, mientras que la naturaleza del dominio hidrofóbico de las formas anfifílicas Tipo II se desconoce. En la figura se señalan los exones que generan el polimorfismo molecular de la AChE (Tomado de Taylor y Radic, 1994).

1.5 Glicosilación de la acetilcolinesterasa

Los restos de carbohidratos presentes en las glicoproteínas pueden estar unidos covalentemente a las cadenas peptídicas a través de dos tipos de enlaces glicosídicos. Los enlaces O glicosídicos que se establecen entre la N acetil D galactosamina (NAcGal) de la cadena lateral del oligosacárido y el átomo de oxígeno de un resto de

Ser o Thr. El otro tipo de enlace corresponde a los denominados N glicosídicos que ocurre entre la N acetil D glucosamina (NAcGlu) aportada por el oligosacárido y el nitrógeno amido de un resto de Asn del polipéptido (Rudd y Dwek, 1997).

En los oligosacáridos con uniones N glicosídicas se presenta un "núcleo pentasacárido" común, constituido por tres manosas y dos restos NAcGlu. Los restantes azúcares se unen a este núcleo, lo que da lugar a la gran variedad de estructuras oligosacarídicas que se encuentran en las glicoproteínas (Froede y Wilson, 1970).

Los oligosacáridos preformados se incorporan a restos de asparagina de determinadas secuencias polipeptídicas, esta transferencia ocurre en el retículo endoplasmático rugoso (RER), y se produce en los sitios potenciales o actuales de glicosilación que siempre se encuentran en la secuencia consenso característica: Asn-X-Ser/Thr. Esta secuencia es común en todas las proteínas N-glicosiladas, donde X indica cualquier aminoácido distinto de prolina o aspartato (Schumacher y col., 1986).

La incorporación de residuos de carbohidratos en la estructura de la AChE es específica del tejido, por lo que la masa molecular aparente de una enzima dependerá del tejido donde se produzca. Se ha sugerido que la N-glicosilación podría ejercer algún control sobre otras funciones, incluidas la protección frente al ataque proteolítico, o bien, el mantenimiento de la AChE en la circulación plasmática (Rudd y col., 1997).

Se han venido empleando diversas lectinas por su capacidad de unirse a los carbohidratos de las colinesterasas para purificar la enzima a partir de diferentes tejidos (Zanetta y col., 1981). Además, las lectinas permiten conocer los procesos moleculares implicados en la síntesis, ensamblado y procesamiento de las formas múltiples de AChE.

En la **Tabla 1** se muestra una lista con diversas lectinas, así como la especificidad de cada una hacia determinados oligosacáridos. Estas glicoproteínas están implicadas en numerosos procesos biológicos, incluyendo el reconocimiento celular y la adhesión. Por tanto, son útiles para investigar el significado biológico de los carbohidratos.

Tabla 1. Diversas lectinas y su especificidad por monosacáridos

Fuente	Especificidad	
	Monosacárido	Oligosacárido
<i>Arachis hypogea</i> (PNA)	Galactosa penúltima o terminal	Gal-(β 1,3)-NAcGal
<i>Canavalia ensiformis</i> (Con A)	α -D-manosa (interna o externa) o α -D-Glucosa	
<i>Lens culinaris</i> (LCA)	α -D-Manosa	Fuc(α 1,6)NAcGlu- (β 1,4)-NAcGlu-Man ₃
<i>Ricinus communis</i> I (RCA-I)	Galactosa penúltima o terminal	D-gal-(β 1,4)-NAcGlu
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	NAcGlu interna o terminal, ácido siálico terminal	NAcGlu- β 4NAcGlu- β 4Glu
<i>Ulex europeus</i> I (UEA)	α -L-Fucosa terminal	

1.6 Genética de la acetilcolinesterasa

La complejidad estructural de la AChE humana no se debe a una gran diversidad de genes que la codifique. Por el contrario, el único gen tiene un tamaño de 7 kb y se localiza en la región q22 del cromosoma 7. Se ha considerado que por sólo haber una copia del gen AChE, es de esperar que los elementos que regulan su expresión respondan a factores activadores específicos en ciertos tejidos y tipos celulares (Getman y col., 1992).

El promotor de AChE incluye una región proximal de 600 pb que es esencial para la expresión del gen de AChE. El promotor incluye motivos consenso para el factor asociado a leucemia AML1/Runx1, y c-fos, un factor de transcripción conocido por regular la expresión del gen de AChE bajo estrés. También, se presenta una región intensificadora (enhancer) distal del promotor de AChE localizada 17 kb corriente arriba del inicio de transcripción de AChE, incluye sitios de unión a HNF3 (factor nuclear de hepatocito 3), un elemento de respuesta a glucocorticoide (GRE) y sitios de unión para NF- κ B, *c-fos* y C/EBP. El control transcripcional de AChE depende también de un intensificador interno ubicado dentro del primer intrón, que contiene sitios de unión para AP1, NF- κ B, GATA-3 y STAT (Grisaru y col., 2006; Perry y col., 2002; Soreq y Seidman, 2001).

En la **figura 2** se muestra un diagrama estructural del gen y los distintos transcritos de RNAm que codifican a la AChE en humanos. La estructura primaria de la subunidad catalítica madura de AChE contiene un importante dominio común de 543 aminoácidos (más del 95% del total), seguido de una región C-terminal variable. Todos los RNAm citoplasmáticos de AChE poseen los exones E2 al E4, que generan la secuencia codificadora invariable con toda la información necesaria para ser traducida en una proteína activa catalítica. El ensamblado alternativo de los exones E5 y E6 hacia el extremo 3', proporciona subunidades de AChE que difieren en el carácter anfifílico o hidrofílico y, por tanto, en su capacidad de asociarse con las membranas celulares (Soreq y col., 1990). Se puede considerar que las subunidades de AChE proceden de la transcripción de varios RNAm, generados por la unión de exones comunes (E2-E4) y variables (I4, E5 o E6).

El RNAm tipo AChE-T, a veces denominado AChE-S (de *sináptico*) debido a que es el transcrito principal en cerebro y músculo, es ensamblado con los exones E2-E3-E4 y E6. La variante de transcrito AChE-T produce monómeros, dímeros y tetrámeros anfifílicos (G_1^A , G_2^A y G_4^A), tetrámeros no anfifílicos (G_4^{NA}), así como asociaciones hetero-oligoméricas con colágeno (ColQ), conformando estructuralmente a las formas asimétricas con tallo colagénico (A_4 , A_8 y A_{12} , que contienen, uno, dos y tres tetrámeros, respectivamente), o con la proteína transmembranal (PRiMA; *Proline Rich*

Membrane Anchor), constituyendo tetrámeros unidos a membrana (PRiMA-G₄^A) (Dori y Soreq, 2006; Perrier y col., 2005; Deutsch y col., 2002).

Las formas de AChE A₄, A₈ y A₁₂ juegan un papel esencial de filtro de exceso de acetilcolina en las uniones neuromusculares. En tanto, que las formas G₁^A, G₂^A, G₄^A, G₄^{NA} y PRiMA-G₄^A representan las formas funcionalmente principales de esta enzima en el sistema nervioso central donde hidrolizan a la acetilcolina durante la transmisión nerviosa (Dori y Soreq, 2006; Perrier y col., 2005; Deutsch y col., 2002).

El RNAm tipo AChE-H (de *hidrofóbica*), conteniendo los exones E2-E3-E4-E5, que genera las subunidades H (con restos hidrofóbicos del *enlace glicofosfatidilinositol, GPI*) que forman los dímeros anfifílicos Tipo I (Soreq y col., 1990). Esta forma está presente en la membrana de las células sanguíneas (principalmente en los eritrocitos y las plaquetas). Se ha propuesto que puede jugar un papel de salvaguarda ayudando a hidrolizar a la ACh que podría difundirse en la corriente sanguínea (Pick y col., 2004; Deutsch y col., 2002).

En la raya eléctrica *Torpedo californica* y en mamíferos como la rata y el humano, se han identificado transcritos AChE-R (del inglés “*read-through*”) que no sufren corte y unión después del último exón codificador del dominio catalítico, y por tanto poseen el arreglo E2-E3-E4-I4-E5. El extremo C-terminal de la subunidad R consta de 30 aminoácidos y carece de Cys por lo que las subunidades permanecen como monómeros (Grisaru y col., 1999). Esta variante es expresada en células embrionarias, y es inducida además en células maduras de un individuo expuesto a estrés psicológico y a una inhibición prolongada de la AChE (Meshorer y col., 2002; Perrier y col., 2005).

Se ha reportado que la enzima ACHE-R juega un papel importante en el sistema inmunológico, particularmente controlando respuestas autoinmunes, como la miastenia gravis, una enfermedad neuromuscular autoinmune y crónica caracterizada por grados variables de debilidad de los músculos esqueléticos (voluntarios) del cuerpo. También se ha mostrado que esta variante juega un papel activo en la proliferación y diferenciación en el sistema hematopoyético y puede estar asociado a su respuesta al

estrés (Sternfeld y col., 2000; Deutsch y col., 2002). Por otra parte, se ha reportado recientemente que la sobreexpresión de AChE-R está asociada a un incremento en la apoptosis de células germinales en ratones (Mor y col., 2008).

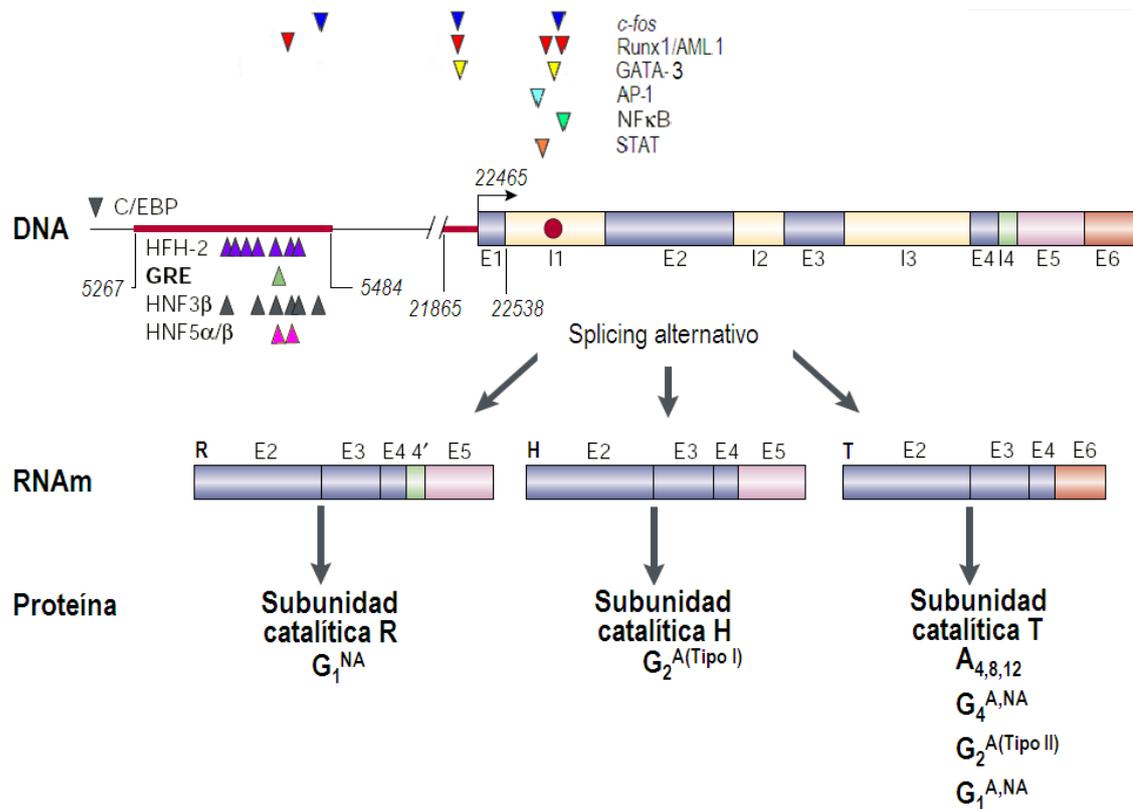


Figura 2. Esquema de la estructura del gen de la acetilcolinesterasa humana. El gen de AChE presenta un promotor proximal (línea roja adyacente a E1), una región enhancer distal (línea roja más distal) que es rica en secuencias reguladoras, y el intrón 1 (I1) contiene una secuencia enhancer indicada 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 una subunidad activa, 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 y Seidman, 2001)

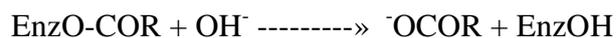
1.7 Efecto de los plaguicidas sobre el proceso catalítico de la acetilcolinesterasa y sus efectos fisiológicos

La AChE hidroliza acetilcolina (ACh) generando acetato y colina, alrededor de 25000 moléculas de ACh se transforman en cada centro activo por segundo y esta capacidad, junto con el bajo valor de la Km (50-100 μM), hace que su eficiencia hidrolítica sólo sea superada por la catalasa, consiguiendo un estado de máxima perfección catalítica (Main, 1979).

La comprensión de los detalles del mecanismo de acción de la AChE se considera importante, desde el punto de vista teórico y práctico, por ser uno de los objetivos de numerosos plaguicidas y gases nerviosos (Padilla, 1995). A nivel práctico se podrían diseñar agentes plaguicidas que afecten selectivamente al sistema nervioso de insectos indeseables y que no tengan un impacto negativo en la cadena trófica.

Por otro lado, con el mecanismo de acción de los agentes anticolinesterásicos plenamente establecido se podrán obtener antídotos eficaces en casos de envenenamiento, accidental o inducido por organofosforados. La AChE está incluida en el grupo de las serín-hidrolasas, debido a que presenta en el sitio activo una tríada catalítica conformada por los residuos de histidina-serina-ácido glutámico (Padilla, 1995). La reacción catalítica se ajusta al siguiente esquema (Schwarz y col., 1995)

(1)



La hidrólisis de un éster de colina (ChOCOR) por las colinesterasas (EnzOH) transcurre en dos etapas; en la primera, la enzima se une al sustrato produciendo un intermedio acil-enzima (EnzO-COR) ya que el grupo acilo queda unido de modo covalente a la serina del centro activo. En la segunda etapa se libera el grupo acilo.

(2)



Los esquemas 1 y 2 son útiles para expresar la base molecular de la toxicidad por organofosforados (Schwarz y col., 1995), la cual se debe a la fosforilación de la serina (²⁰⁰Ser) catalítica, pues se forma un enlace covalente que se hidroliza lentamente o no lo hace en absoluto. De ahí el carácter irreversible de la unión y la fuerte toxicidad de los organofosforados (OP). La inactivación de la AChE por parte de los OP provoca un aumento en los niveles de ACh por lo que se puede unir repetidamente a diferentes receptores con la consecuente apertura de diferentes canales que lleva a una excitación nerviosa continua que puede provocar la parálisis nerviosa (Schwarz y col., 1995).

El OP se puede disociar del centro activo con un compuesto nucleófilo potente, como una oxima B. Los organosulfonatos y carbamatos son también inhibidores irreversibles de la AChE, aunque de menor eficiencia que los OP, ya que la vida media de la enzima sulfonilada o carbamilada es menor a la de la enzima fosforilada (Lu y col, 2001).

Los OP son altamente tóxicos para los mamíferos; estas sustancias se emplean para controlar plagas que atacan a los cultivos, al ganado o durante el transporte y almacenamiento de productos agropecuarios. Los OP más usados son: paratión, diclorvos, diazinon, dimetoato y malatión (Stopford, 1990; Lu y col., 2001).

La absorción de los OP es rápida a través de la piel y el tracto gastrointestinal. En algunos pesticidas OP los efectos iniciales de una intoxicación son evidentes pocos segundos después del contacto. Los principales síntomas son sudoración excesiva y gesticulaciones, si el contacto ha sido dérmico; rigidez respiratoria y secreciones bronquiales si el contacto se ha producido por inhalación; náusea y vómitos si éste fue por ingestión (Lu y col, 2001)

Se ha visto que los OP afectan las respuestas inmunes incluyendo efectos sobre la producción de anticuerpos, de IL-2, proliferación de las células T disminución de las células CD5, e incremento de las células CD26 y autoanticuerpos. Sin embargo aún faltan muchos efectos de los OP sobre las células T por explicar (Li y Kawada, 2006).

Al igual que los plaguicidas OP, los carbamatos son altamente tóxicos para los mamíferos, e inactivan de manera similar a la AChE. Entre los carbamatos conocidos están: propoxur (Baygón), carbaryl (Kevin) y aldicarb (Tremik). El mecanismo de acción de los carbamatos es similar al de los OP. Los síntomas a una exposición aguda a carbamatos consisten en náusea, vómitos, incremento en la sudoración y salivación, visión borrosa, debilidad muscular, espasmos y en casos graves convulsiones (Stopford, 1990).

1.8 La exposición a los plaguicidas y la incidencia de cáncer

La exposición ocupacional o no ocupacional a los compuestos OP se ha asociado a varios tipos de cáncer incluida la leucemia (Brown y col., 1990). El uso de malation se ha asociado con cáncer de mama. Las ratas tratadas con malatión desarrollan con más frecuencia tumores mamarios incluso 28 meses después del tratamiento. Aparentemente, esto se debe a cambios en el epitelio de las glándulas mamarias, que finalmente degeneran en procesos de cáncer; dichas alteraciones ocurren a nivel del sistema nervioso por incremento de la estimulación colinérgica (Cabello y col., 2001). También, el malatión se ha asociado con el aumento del riesgo de linfoma no Hodgkin y leucemia, y se tienen evidencias de mutagenicidad en estudios de laboratorio (Cantor y col., 1992; Kruk y Aboul, 2003)

Los carbamatos también están relacionados con la formación de distintos tipos de cáncer. Por ejemplo el carbofurán es un insecticida de tipo carbamato utilizado en distintos cultivos destinados a la alimentación. En personas encargadas de aplicar pesticida en Iowa y Carolina del Norte el riesgo de cáncer de pulmón fue 3 veces superior en operarios con exposiciones superiores a 109 días respecto de aquellos con exposiciones menores a 9 días. Además, este comportamiento presentó un patrón dosis-respuesta importante, destacando tanto el número de días de uso por año, así como la cantidad de años totales de exposición (Zheng y col., 2001).

La exposición a otro carbamato carcinogénico, Carbaryl (Sevin), está asociado al desarrollo de tumores en cerebro en niños y linfomas de tipo no Hodgkin. Algunos compuestos derivados del carbaryl, como el 1-naftol y el Nitrosocarbaryl son considerados como mutagénicos. También es capaz de formar compuestos nitrosos cancerígenos que inducen tumores en el estómago (Zheng y col., 2001).

1.9 Niveles de la actividad acetilcolinesterasa en diversos tipos de cáncer

La anormalidad del gen de AChE se ha observado en algunos tumores. Existe la pérdida de heterocigosidad en la región 7q22 (región donde se localiza el gen de AChE) en cánceres de ovario, de mama, de próstata, de hígado, y en algunos tipos de leucemias mieloides (Fisher y col., 1998; Zeng y col., 1999; Neville y col., 2001). En general se ha observado que los tumores cerebrales y no cerebrales presentan una alteración de la actividad colinesterásica. En meningiomas y gliomas la relación de los niveles AChE varía en dichos tumores, siendo independiente del grado de malignidad. Los glioblastomas muestran niveles bajos de AChE en comparación a los meningiomas y neuroblastomas que contienen niveles superiores (Saéz-Valero y col., 1996; Vidal, 2005).

En el proceso de megacariocitopoyesis anormal y cáncer de ovario, el crecimiento de las células neoplásicas se ha visto asociado con la elevación de la actividad de la AChE así como con la amplificación de sus genes (Soreq y col., 1992). Las pruebas con oncogenes han demostrado la amplificación del gen de AChE y su sobreexpresión en estados precancerígenos, como la policitemia vera. Por otro lado se ha observado que la quimioterapia aplicada a tumores de diverso origen conduce a un aumento de la actividad de la AChE en plasma (Zakut y col., 1990).

Los cambios tanto en actividad, expresión y amplificación génica de la AChE en los carcinomas abren la posibilidad de emplearla como un marcador del proceso cancerígeno. Es posible, incluso, que su expresión esté relacionada con la causa primaria de algunos tipos de cáncer que implica a las células del sistema hematopoyético y juegue un papel directo o indirecto en el progreso clínico del mismo. En este tenor, se ha demostrado que el uso de polinucleótidos antisentido contra AChE produce cambios importantes en la hematopoyesis, disminuyendo la apoptosis y aumentando la supervivencia de las células sanguíneas. Utilizando este principio, cabe la posibilidad de que se altere la proliferación y diferenciación de las células, ya sea normales o neoplásicas, a través de la manipulación de la expresión del gen de la AChE (Lev-Lehman y col., 1994).

En el cáncer de mama y de pulmón se ha constatado que la actividad enzimática AChE y su glicosilación se encuentran alterados. Entre células de mama normales (MCF10A) y tumorales (MCF7A) se han encontrado diferencias significativas en la relación formas activas/ inactivas. Los datos indican que en tejidos neoplásicos existe una mayor expresión de la AChE. Las formas activas e inactivas no difieren en su tamaño según se desprende de los experimentos en que se empleó inmunodetección, lo que sugiere que ambas formas han completado su procesamiento postraducciona (Grisaru y col., 1999; Ruiz-Espejo y col., 2002; Martínez-Moreno y col., 2006). Dada la información disponible sobre la AChE en tejidos cancerosos sabemos que aún faltan por hacer investigaciones para clarificar los mecanismos moleculares por los cuales la AChE puede participar en el cáncer (Vidal, 2005).

1.10 Leucemia

1.10.1 Leucemia y sus tipos principales

La leucemia es una neoplasia de células hematopoyéticas que afecta una estirpe celular en particular y conlleva a su proliferación y expansión. La acumulación de las células leucémicas se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posteriormente de la invasión a la sangre periférica y a otros tejidos. Los análisis de sangre comunes, como el recuento completo de células sanguíneas, pueden proporcionar la primera prueba de leucemia. El número total de glóbulos blancos puede ser bajo, normal o elevado, pero la cantidad de glóbulos rojos y plaquetas casi siempre es baja. Lo más importante es que al examinar al microscopio las muestras de sangre se observan glóbulos blancos muy inmaduros (blastos). Puesto que normalmente no se observan blastos en la sangre, su presencia es suficiente para diagnosticar leucemia. Sin embargo, casi siempre se realiza una aspiración de médula ósea para confirmar el diagnóstico y determinar el tipo de leucemia (Kersey, 1997). En cuanto a su etiopatogenia, se han descrito factores que predisponen a su desarrollo como la exposición a radiaciones ionizantes, fármacos mielotóxicos como la fenilbutazona, cloranfenicol y compuestos citostáticos, virus y además se ha asociado con factores hereditarios y cromosómicos como los síndromes de Down, Turner y la anemia de Fanconi (Woessner y Florensa, 2001).

Existen cuatro tipos principales de leucemia: aguda *versus* crónica, y linfocítica *versus* mielógena o mieloide. El término *aguda* significa "de rápido desarrollo". Aunque las células crecen rápidamente, no pueden madurar de forma adecuada. El término *crónica* se refiere a una condición en la que las células parecen ser maduras, pero no son completamente normales. Éstas se mantienen viables por mayor tiempo y causan una acumulación de glóbulos blancos. Los términos linfocítica y mieloide se refieren a dos tipos de células diferentes, a partir de las cuales se originan las leucemias. Las leucemias linfocíticas se desarrollan a partir de los linfocitos de la médula ósea. La leucemia mielógena (a veces llamada *mielocítica*) se desarrolla a partir de granulocitos o monocitos (Kersey, 1997).

Aunque tanto en niños como en adultos se pueden desarrollar leucemias, algunos tipos son más frecuentes en un grupo de edades que en otro. La mayoría de los casos de leucemia infantil son del tipo agudo. El único tipo de leucemia crónica detectado en niños es la leucemia mielógena crónica, y es muy poco frecuente. La **Tabla 2** muestra los cuatro tipos principales de leucemia, así como la distribución de los mismos entre niños y adultos (Kersey, 1997).

Tabla 2. Tipos principales de leucemias.	
<p>Leucemia linfocítica aguda</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Afecta a niños y adultos ▪ Más frecuente en niños ▪ Representa cerca del 80% de todos los casos de leucemia infantil 	<p>Leucemia mielógena aguda</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Afecta a niños y adultos ▪ Representa el 80% de los casos de leucemias agudas en adultos y cerca del 20% de los casos de leucemia infantil
<p>Leucemia linfocítica crónica</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Afecta a adultos ▪ Representa cerca del 30% de todas las leucemias 	<p>Leucemia mielógena crónica</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Afecta principalmente a adultos; muy poco frecuente en niños ▪ Representa el 15% de todas las leucemias

1.10.2 Leucemia linfoide aguda

La leucemia linfoide (linfocítica) aguda, también conocida como leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un tipo de cáncer, en el cual la médula ósea produce linfocitos de manera no regulada. La leucemia linfática aguda es el cáncer más frecuente en los niños, abarca el 25 por ciento de todos los cánceres en niños menores de 15 años. Generalmente afecta a los niños entre los 3 y los 5 años de edad pero también se presenta en los adolescentes y, con menos frecuencia, en los adultos. Su incidencia anual es de 3 por cada 100 000 niños y es predominante en varones. En la LLA los linfocitos también se denominan linfoblastos o células leucémicas (Woessner y Florensa, 2001).

En México el cáncer infantil es la segunda causa de muerte en menores de cuatro a 15 años de edad. De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, fue la causa de muerte de dos mil 651 niños en el año 2005. Con respecto a la incidencia, la leucemia linfoide aguda es la neoplasia más frecuente entre los niños mexicanos enfermos de cáncer ya que representa el 34.5% de todos los tipos de cáncer en esta edad (Rizo-Ríos y col., 2005).

En los casos de LLA, los linfocitos en desarrollo no maduran y por consiguiente su número se incrementa significativamente. Los linfocitos pueden desplazar otras células circulantes en la sangre y la médula ósea. Si la médula ósea no produce suficientes glóbulos rojos para transportar oxígeno, se puede padecer anemia. Si la cantidad de plaquetas es insuficiente para que la sangre se coagule normalmente, se pueden padecer hemorragias o contusiones fácilmente. Los blastos leucémicos proliferan rápidamente y se diseminan en el flujo sanguíneo y se transportan al hígado, al bazo, a los ganglios linfáticos, al cerebro, a los riñones y a los órganos reproductores, donde continúan creciendo y dividiéndose. Pueden irritar la membrana que recubre el cerebro, causando meningitis y pueden causar insuficiencia hepática y renal y dañar otros órganos (Finch y col., 1977; Woessner y Florensa, 2001).

1.10.3 Leucemia linfoide aguda de linaje T

Los dos principales tipos de leucemia linfoide aguda son la leucemia linfoide aguda de precursores de células B (LLA-B) y la leucemia linfoide aguda de precursores de células T (LLA T). De estos dos tipos, la LLA T ocupa cerca del 20% de los casos de leucemia linfoide aguda (Uckun y col., 1996).

Las células relacionadas a LLA T expresan antígenos de diferenciación que son encontrados normalmente en precursores de linfocitos a diferentes estados de maduración. Los antígenos de diferenciación celular CD7 y CD3 caracterizan el inmunofenotipo de la LLA de linaje T. Todos los linfoblastos de la LLA T, expresan el antígeno de superficie CD7 y los citoplasmáticos CD3, CD2, CD5, CD6, CD45 y TDT. Entre el 40 y 45% de los linfoblastos T pueden expresar CD10 y CD21 (Uckun y col., 1998).

La etiología de la LLA T no es del todo conocida pero se ha sugerido que es de naturaleza multifactorial encontrándose influencia de factores ambientales como la radiación ionizante, la exposición a sustancias químicas, plaguicidas, drogas y agentes alquilantes. Finalmente, la LLA T se ha asociado con el contacto previo con los virus linfotrópicos de células T humanas tipos I y II (HTLV-I y HTLV-II) (Franchini, 1995; Rolo y col., 1997).

La LLA T es de pronóstico adverso, es decir que la mayoría de los pacientes que la presentan tienen una respuesta limitada o nula a los diferentes tratamientos, y en consecuencia sufren recaídas. Las cuentas de leucocitos por encima de los 50,000/mm³ y la invasión del sistema nervioso central, están relacionados con la LLA T (Cui y col., 2004).

2 JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, no se conoce plenamente la relación entre el cáncer y la expresión de la AChE. Por lo que es importante explorar modelos de estudio que revelen nueva información acerca de la relación de esta enzima con los procesos de alteración de la proliferación celular. En primera instancia nuestro interés es determinar el nivel al que la expresión de la AChE se encuentra alterada, esto con el fin de tener un punto de referencia que permitirá realizar futuros estudios encaminados al control de la expresión e inhibición de esta enzima en células normales y compararlas con las células cancerosas. Los estudios que se realizaron en este proyecto tuvieron como finalidad obtener una comparación de la expresión de la AChE entre linfocitos T normales y una línea celular linfoide de la serie T (línea celular Jurkat E6-1). Estas células presentan los marcadores de superficie CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, y el receptor TCR alpha/beta y producen IL-2 cuando son estimuladas. Esta línea celular se ha usado para determinar el mecanismo de susceptibilidad para drogas y radiación anti-cáncer, y frecuentemente se ha utilizado en estudios inmunológicos (Azad y col., 1997).

3 OBJETIVO GENERAL

- Determinar las diferencias en la expresión de la acetilcolinesterasa en linfocitos T normales y en células leucémicas.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de los transcritos de la AChE en linfocitos T humanos normales y en células leucémicas
- Estimar la actividad de la AChE en extractos obtenidos con o sin detergentes en linfocitos T normales y en células leucémicas
- Establecer el procesamiento post-traducciona (glicosilación) de la AChE en linfocitos T normales y en células leucémicas mediante la interacción con lectinas.
- Conocer el proceso de ensamblado de la AChE estableciendo las formas moleculares presentes en linfocitos T normales y en células leucémicas usando gradientes de densidad de sacarosa

4 HIPÓTESIS

- Si la expresión del gen AChE se ve afectada en células leucémicas, entonces se esperaría encontrar diferencias tanto a nivel de expresión de transcritos como en la traducción de la AChE, ensamblado y maduración en relación a los linfocitos T normales.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Obtención de muestras de sangre periférica y aislamiento de leucocitos

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de humanos clínicamente sanos (n=10) usando tubos de ensayo al vacío conteniendo ácido-etilendiamino-tetraacético (EDTA) como anticoagulante (Vacutainer, Beckton Dickinson). Los leucocitos se aislaron usando gradientes de densidad con Linfograd (Microlab, México) centrifugando a 300xg por 20 minutos.

Se recuperó la fracción correspondiente a los leucocitos localizada inmediatamente por debajo del plasma. Se lavó 2 veces utilizando una solución de PBS pH 7.2 con albumina de bovino (Sigma E.U.A.) al 0.5%. Posteriormente se concentró la muestra de leucocitos por centrifugación y se resuspendió en 1 mL de PBS. A partir de esta muestra se determinó la viabilidad y cantidad celular utilizando el método de exclusión del azul de tripano (Microlab-México).

5.2 Conteo y viabilidad celular usando azul de tripano

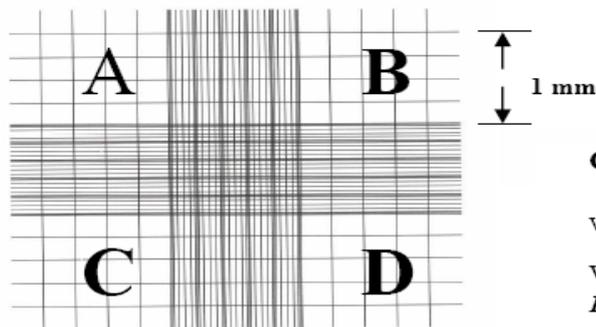
La viabilidad celular se evaluó con el método de exclusión del azul de tripano. El azul de tripano es una amina orgánica, con una carga negativa neta que no penetra al interior de las células que presentan sus membranas intactas, mientras que las células dañadas rápidamente lo incorporan al citoplasma; es probable que la exclusión de la amina sea un proceso de membrana dependiente de energía (Freshney, 1987).

Procedimiento

1. Se añadieron 100 μ L de la suspensión celular recogida previamente en tubos eppendorf y 100 μ L de azul de tripano; se mezclaron bien y se incubaron 3 minutos. (Nota: A tiempos muy largos de exposición al colorante pueden hacer que las células vivas pueden captar este colorante).

2. Recuento celular en la cámara de Neubauer. Para ello se colocó el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y se añadió una pequeña cantidad de la mezcla de células y azul de tripano (relación 1:1) sobre los surcos de llenado verificando que por capilaridad las células se distribuyeran aleatoriamente. Una vez enfocadas las cuadrículas se contaron las células que hay en los recuadros divididos en 16 cuadrículas (ver esquema: recuadros A, B, C y D).

Amplificación de una cámara del hemocitómetro



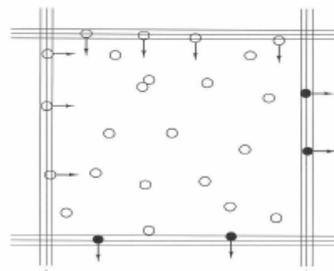
Conjunto de 16 cuadrículas (1)

Volumen de recuento = 1 mm x 1 mm x 0,1 mm

$$V = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3$$

Factor de la cámara = 10^4

Diagrama que indica las células que deben ser contadas



○ Célula que debe ser contada

● Célula que no debe ser contada

3. La media aritmética de los 4 recuentos efectuados (A, B, C y D), multiplicada por el factor de la cámara (10000) y por el factor de dilución (2) representa la concentración de células en la muestra (Nº células / mL).

5.3 Separación magnética de linfocitos T

Para la separación magnética de los linfocitos T se utilizó anticuerpo anti-CD3 asociado a perlas magnéticas (CD3 MicroBeads). El antígeno de diferenciación CD3 es expresado en todas las células T y es asociado al receptor de células T (Schlossman y

col., 1995). Del 70-80% de los linfocitos de sangre periférica en humanos y del 65-85% de los timocitos son CD3⁺. El protocolo para separación magnética es el siguiente:

Para el marcaje magnético fue necesario trabajar rápido manteniendo las células en frío y usando soluciones en las mismas condiciones. Para conseguir un rendimiento óptimo se removieron los agregados celulares que pudieran bloquear la columna.

- Se centrifugó la suspensión de leucocitos totales a 300xg por 10 minutos y se retiró completamente el sobrenadante.
- El paquete celular fue resuspendido en 80 µL de amortiguador PBS pH 7.2 por cada 10⁷ células totales.
- Se adicionaron 20 µL de CD3 MicroBeads por cada 10⁷ células totales y se incubó por 15 minutos de 4-8 °C.
- Se adicionaron 10 µL de CD3-PerCP (anticuerpo asociado a fluorocromo para su posterior análisis por citometría de flujo) y se incubó 15 minutos de 4-8 °C.
- Las células fueron lavadas adicionando 1-2 mL de amortiguador PBS pH 7.2 por 10⁷ células y se centrifugaron a 300xg por 10 minutos y se les retiró completamente el sobrenadante.
- Por último las células se resuspendieron en 500 µL de amortiguador y se protegieron de la luz hasta ser analizadas en el citómetro de flujo.

La separación magnética se realizó utilizando columnas MS para un máximo número de células totales de 2x10⁸ (MACs[®]), estas columnas están específicamente diseñadas para generar un fuerte campo magnético y mantiene una óptima viabilidad y función celular. La columna MS se acopla a un magneto que presenta la suficiente fuerza magnética para retener las células y permite realizar los lavados que eliminen a las células no marcadas (**Figura 3**).

Procedimiento para la separación magnética:

- Se colocó la columna en el campo magnético del separador MACs.
- Se preparó la columna con 500 µL de amortiguador PBS pH 7.2.
- Se aplicó la suspensión celular dentro de la columna.

- Se colectaron las células no marcadas y se lavó la columna tres veces con 500 μ L de amortiguador PBS por lavado (dejando que se vaciara totalmente la columna por cada lavado).
- La columna fue removida del separador y se colocó en un lugar indicado para coleccionar y se agregó 1 mL de amortiguador PBS en la columna para recoger las células marcadas.

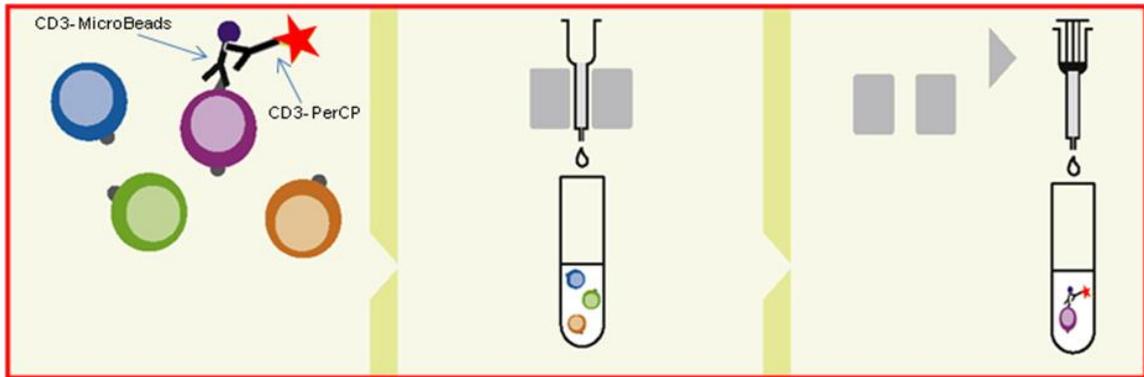


Figura 3. Separación magnética de linfocitos T. La suspensión celular con los linfocitos T marcados magnéticamente se pasó a través de una columna acoplada a un campo magnético, donde después de una serie de lavados se retiró la columna del campo magnético y se obtuvo una fracción purificada de linfocitos T.

Para determinar la pureza de la fracción de linfocitos T obtenida se realizó el análisis por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-CD3 conjugado con el fluorocromo PerCP. Asimismo, se realizó un conteo y viabilidad de los linfocitos T aislados.

5.4 Análisis de células T marcadas con CD3-PerCP por citometría de flujo

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos impulsos son convertidos en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula como su tamaño, complejidad y características antigénicas (Givan., 2001).

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos: señales de dispersión y señales de fluorescencia. En las señales de dispersión, este efecto resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula. En los citómetros de flujo se miden dos fracciones de dispersión: A) la luz dispersada en ángulo cónico pequeño (0-10°) que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter) que es una medida proporcional al tamaño de la célula que produce la dispersión y B) la luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter) que es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la célula (Owens y Loken., 1995).

En las señales de fluorescencia se utilizan fluorocromos, moléculas químicas que absorben la energía de una determinada longitud de onda y emiten a otra mayor, pero de menor energía. Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante. Debido a que parte de la energía se utiliza para la absorción, la luz emitida es de menor energía que la luz de excitación, es decir la longitud de onda emitida es mayor (Owens y Loken., 1995).

La unión de un colorante fluorescente a una célula es denominada marcaje o tinción. Este marcaje puede ser no específico, como cuando se utiliza isotiocianato de fluoresceína (FITC) para determinar el contenido total de proteínas de unas células. Existen tinciones menos generales, pero sin ser altamente específicas, podríamos decir de especificidad intermedia, como el yoduro de propidio (PI) que se une principalmente a cadenas dobles de ácidos nucleicos. El marcaje más específico que se utiliza es el que se realiza con un anticuerpo monoclonal conjugado con un fluorocromo, en este caso se marcan únicamente determinantes antigénicos específicos, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula (Recktenwald., 1993).

Los fluorocromos más usados en citometría deben ser excitables dentro de los rangos de seguridad. La longitud de onda habitual en la mayoría de los citómetros de flujo es de 480nm. En nuestro caso utilizamos el fluorocromo PerCP (complejo proteína peridina-clorofila) asociado al anticuerpo monoclonal anti-CD3 (CD3-PerCP), el marcaje celular con CD3-PerCP se describió en el inciso 5.3. El PerCP posee un máximo de absorbancia de 490 nm cercano a la longitud de onda del láser de argón y proporciona una fluorescencia adecuada para ser detectada a 675 nm (Givan., 2001).

5.5 Cultivo de línea celular Jurkat E6-1

Para el análisis de expresión génica de la acetilcolinesterasa en células leucémicas se empleó la línea celular Jurkat E6-1 proveniente de una leucemia aguda de linfocitos T que fue donada por el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las células Jurkat T se mantuvieron en medio RPMI 1640 (GibcoBRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (GibcoBRL), 2 mM glutamina (GibcoBRL) y antibióticos (100 U/ml penicilina; 100 µg/ml estreptomina) (GibcoBRL) más 2 mM piruvato sódico (GibcoBRL). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO₂ en frasco de cultivo Roux de 25 ó 75 cm², según las necesidades.

Cuando las células llegaban a condiciones de saturación se procedía a subcultivar para asegurar su crecimiento exponencial. El subcultivo celular permite controlar la densidad del inoculo inicial que nos asegure que trabajamos en condiciones de crecimiento óptimas para la línea celular.

Procedimiento para subcultivo celular:

- 1) Contar el número total de células del cultivo.
- 2) Pipetear el volumen de cultivo que asegure un subcultivo en fase exponencial de crecimiento.
- 3) Centrifugar durante 5 minutos a 200xg.

- 4) Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 15 mL de medio de cultivo suplementado y atemperado previamente a 37 °C.
- 5) Depositar las células en cajas de cultivo.
- 6) Guardar el frasco dentro de una incubadora y controlar el crecimiento celular para mantener un crecimiento exponencial.

5.6 Aislamiento de RNA por el método de Trizol

Se han desarrollado diferentes estrategias para aislar el RNAm o al menos el RNA total que contiene un tejido. Algunos de ellos hacen uso de las propiedades de compuestos orgánicos para desnaturalizar a las proteínas que degradan el RNA mediante la deshidratación como ocurre con la mezcla de fenol y cloroformo, otras utilizan inhibidores específicos de las RNAsas como sería el macaloide, inhibidor de RNAsas extraído de placenta, o dietilpirocarbonato (DEPC) o bien, agentes desnaturalizantes de proteínas como sucede con las sales de guanidina a concentraciones superiores a 2M.

El trabajo con RNA debe realizarse con cuidado y en un ambiente libre de enzimas que lo puedan degradar debido a que las RNAsas son capaces de readquirir totalmente su actividad aún después de varios ciclos de esterilización por autoclave.

El desarrollo de un reactivo que integra tanto agentes orgánicos, sales y solventes capaces de desnaturalizar a las RNAsas y que además sea estable, permite que con un mínimo de equipamiento pueda aislarse este ácido nucleico. Es conveniente que tanto el material como las soluciones que se utilicen en el aislamiento de RNA estén tratados con DEPC. CUIDADO: El DEPC es un agente carcinogénico que se descompone fácilmente en medio húmedo.

Procedimiento

A una muestra de 10^7 células depositada en tubo eppendorf de 1.5 mL se le agregó 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Ca). La muestra se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la disociación completa de las nucleoproteínas. Luego se

agregaron 0.2 mL de cloroformo. Se tapó el tubo firmemente y se agitó vigorosamente por 15 segundos, después se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 12000xg por 15 minutos a 8 °C. Al término de la centrifugación, se separó la muestra en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa transparente. La fase inferior contiene membranas extracelulares, polisacáridos, proteínas y DNA de alto peso molecular mientras que el RNA permanece exclusivamente en el sobrenadante.

Para obtener el RNA se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se precipitó el RNA agregando 0.5 mL de alcohol isopropílico. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12000xg durante 10 minutos a 8 °C. El RNA no siempre es visible pero forma un paquete gelatinoso y delgado en las paredes y el fondo del tubo.

Se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado una vez con 1 mL de Etanol al 75%. Se mezcló en vortex y se centrifugó a 7500xg por 5 minutos a 8 °C. (Nota: Si es necesario el RNA se puede almacenar en Etanol 75% por una semana en congelador comercial a 8 °C o por un año en congelador a -20°C).

Se retiró el sobrenadante y se secó el precipitado por evaporación por 10 minutos evitando que se secase completamente dado que esto disminuye su solubilización. Se disolvió parcialmente el RNA en 100 µL de agua libre de RNAsas pasando varias veces la suspensión por la punta de la pipeta e incubándola a 55 °C por 10 minutos. Se determinó la absorbancia a A_{260} y A_{280} . Normalmente, estas suspensiones tienen cocientes inferiores a 1.6 aproximadamente, que determinan que el RNA no está degradado y que presenta un alto grado de pureza. Se determinó la concentración de RNA utilizando la fórmula:

$$[\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}] = (A_{260}) * (\text{factor de dilución}) * (40)$$

5.7 Determinación de la expresión de los transcritos de AChE (H, R y T) por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La técnica de RT-PCR consiste en la transcripción inversa del RNAm para la posterior amplificación de forma exponencial de secuencias específicas de DNA complementario (cDNA) a través de síntesis enzimática. Este cDNA se desnaturaliza mediante calor en dos cadenas sencillas para que puedan asociarse por complementariedad de bases los iniciadores o “primers” a los lugares específicos de cada una de las cadenas separadas. Finalmente, la acción de una DNA polimerasa termoestable permite que estos iniciadores se extiendan hasta completar la secuencia que le sirve de molde (**Figura 4**). Este proceso se realiza múltiples veces para obtenerse un número de copias exponencial de la cadena original de cDNA (MacPherson y Moller, 2000)

El análisis de la expresión de uno o varios genes brinda una posibilidad de evaluar el estado de un tejido, principalmente a través de la amplificación por acción cíclica de una DNA polimerasa termoestable. De la misma manera, a partir del RNAm que se someta a retrotranscripción se puede clonar un gen o un fragmento particular para poder ser utilizado posteriormente como sonda o indicador de un estado particular del tejido.

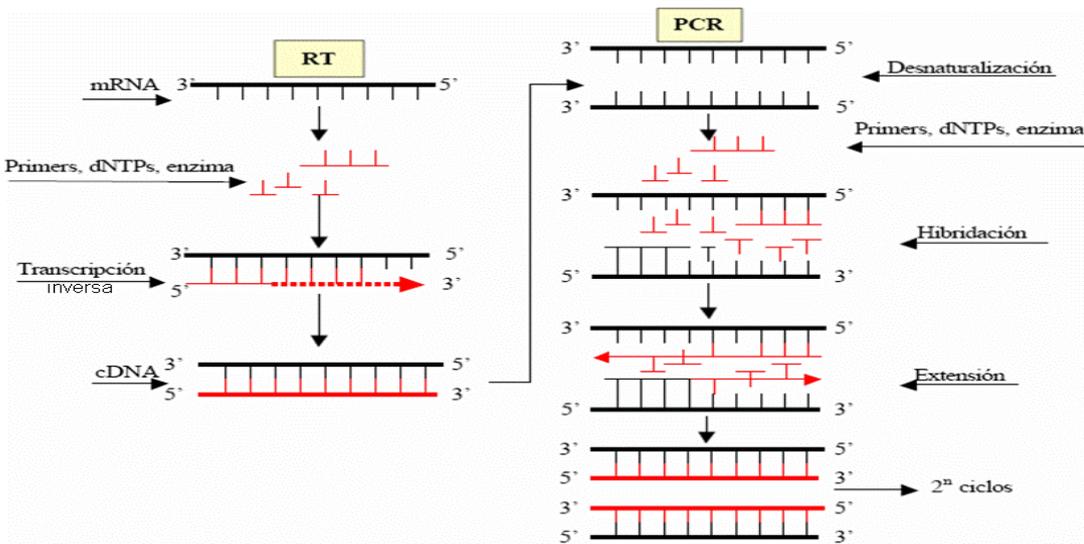


Figura 4. Esquema de la RT-PCR. La Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA (tanto RNAm como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado.

Conceptualmente, el proceso implica dos reacciones que pueden ser secuenciales. En la primera, el RNAm es reconocido por una DNA polimerasa dependiente de RNA, coloquialmente conocida como transcriptasa reversa. El producto de esta reacción posteriormente es sometido a PCR. Actualmente es posible hacer ambas reacciones utilizando enzimas cuya temperatura óptima permite secuencialmente inactivar a las transcriptasas reversas y activar a la DNA polimerasa a temperaturas subóptimas aprovechando su capacidad termoestable. Esta estrategia se encuentra con la mezcla de retro transcriptasas Omniscript y Sensiscript aunada a la variante Hotstart Taq polimerasa. Las enzimas Omniscript y Sensiscript son enzimas heterodiméricas expresadas en *Escherichia coli* mientras que la Taq polimerasa es una variante de 94 kDa de la enzima nativa expresada también en E. coli.

5.7.1 Diseño de primers y RT-PCR de un paso

Para el diseño de los primers se utilizó el programa OligoPerfect™ Designer de Invitrogen, E.U.A. (<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>) y con la secuencia del RNAm de AChE para cada variante. Las secuencias de los pares de primers utilizados se muestran en la **Tabla 3** con sus características de Tm y de tamaño del producto amplificado (amplicón).

Tabla 3. Primers diseñados para las variantes de splicing de AChE de humano.		
Para AChE H (E4-E5) Forward TCTCGAAACTACACGGCAGA Reverse TGAGGAGGAAGGGAGCACTA	Tm 63.5 63.8	Tamaño del amplicón 487 pb para AChE H 574 pb para AChE R
Para AChE T (E4-E6) Forward TCTCGAAACTACACGGCAGA Reverse GCCCAGCCCTGAAATAAATAG	63.5 63.3	444 pb
Para AChE R (E4-I4) Forward TCTCGAAACTACACGGCAGA Reverse GGGGAGAAGAGAGGGGTTAC	63.5 59.1	333 pb

Para la RT-PCR de un solo paso se utilizó el kit One-Step RT-PCR de Qiagen que presenta las siguientes componentes:

- Amortiguador 5x Qiagen
- Mezcla de dNTP 40 mM
- Solución 5x Q
- Enzyme mix (mezcla de polimerasas)

La solución 5x Q contiene 25 mM de MgCl₂ y DMSO como componentes primordiales. En la mayoría de los casos, la adición de esta solución aumenta la eficiencia de la reacción. Sin embargo, ocasionalmente brinda resultados contrarios ya sea aumentando la amplificación inespecífica o incluso disminuyendo la cantidad del amplicón deseado. Es aconsejable que para la amplificación inicial, se corran muestras con y sin solución 5x Q. Se descongelaron los componentes del kit One Step RT-PCR de Qiagen y fueron colocados en hielo. Para la RT-PCR se utilizó una mezcla de todos los componentes en un tubo de PCR a un volumen final de 25 µL como indica la **Tabla 4**:

Tabla 4. Preparación de la reacción para RT-PCR de un paso

Componente	Volumen (µL)
Amortiguador 5x Qiagen	5
Primer forward (0.6 µM)	3
Primer reverse (0.6 µM)	3
Mezcla de dNTP 40 mM	1
Solución 5x Q	5
Mezcla de enzimas	1
Muestra de RNA (1.5 µg)	hasta 7
Llevar a un volumen final de 25 µL con agua libre de RNasas	

Se preparó una mezcla maestra para una cantidad grande de reacciones utilizando las cantidades expresadas en la tabla de arriba. En esta etapa no se agregó ni RNA ni primers, esto se hace posteriormente individualmente. Se homogeneizaron las soluciones por resuspensión con la micropipeta. Se calculó un 10% adicional del volumen requerido para compensar los errores introducidos por la eficiencia de los diferentes instrumentos.

Primeramente, se hizo una titulación utilizando diferentes cantidades de RNA (0.5-2.0 µg de RNA) para determinar la cantidad necesaria de RNA para tener una buena amplificación. Las posteriores reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando la cantidad óptima de RNA obtenida por la titulación. Las muestras se colocaron en el termociclador con el siguiente programa:

Paso 1, reacción de retrotranscripción (RT)	50 °C	30 min.
Paso 2, desnaturalización inicial, inactivación de la reacción de RT	95 °C	15 min.
Paso 3, desnaturalización del ciclo	94 °C	1 min.
Paso 4, alineamiento	50 °C	1 min.
Paso 5, elongación	72 °C	1 min.
Regresar al paso 3 por 39 ciclos		
Paso 6, elongación final	72 °C	10 min.

Al terminar la amplificación, los fragmentos de DNA amplificados se resolvieron en un gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio. Alternativamente, la reacción de amplificación puede almacenarse a 4 °C por 16 horas o a -20 °C hasta que se resuelva.

5.7.2 RT/PCR en dos pasos

En este método se realizó por separado la reacción de síntesis de la cadena de cDNA utilizando como molde el RNA (RT), donde posteriormente la primera cadena de cDNA sintetizada se utilizó como molde en una PCR.

Procedimiento para la síntesis de la primera hebra de cDNA utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis kit de Fermentas:

1. Se preparó la siguiente mezcla de reacción en un tubo de PCR en hielo:

RNA total (5µg)	Variable
Oligo(dT)18 primer (0.5µg/µL)	1 µL
Agua tratada con DEPC	Llevar a 11 µL

Se mezcló y centrifugó por 5 segundos en una microcentrífuga.

2. Se incubó la mezcla a 70 °C por 5 minutos, y se colocó en hielo y se centrifugó 5 segundos.
3. Se colocó el tubo en hielo y se agregaron los siguientes componentes en el orden indicado:

Amortiguador de reacción 5x	4 µL
Inhibidor de RNAsas RiboLock™ (20 U/µL)	1 µL
Mezcla 10 mM de dNTP	2 µL

Se mezcló y centrifugó por 5 segundos en una microcentrífuga.

4. La mezcla se incubó a 37 °C por 5 minutos
5. Se adicionaron 2 µL de la transcriptasa reversa M-MuLV (20 u/µL) quedando un volumen final de 20 µL.
6. La mezcla se incubó a 37 °C por 60 minutos.
7. La reacción se detuvo calentando a 70 °C por 10 minutos y se colocó en hielo.
La primera hebra de cDNA sintetizada puede ser usada directamente para amplificación por PCR.

Protocolo para PCR con Taq DNA Polymerase de Fermentas:

La **Tabla 5** muestra la forma de preparar la mezcla de reacción de amplificación. Al igual que en la reacción de retrotranscripción, para evitar los errores de pipeteo se realizó una mezcla maestra conteniendo agua, amortiguador, dNTPs, primers y Taq DNA polimerasa en un solo tubo, a partir del cual se distribuyeron las alícuotas en tubos individuales. El MgCl₂ y el cDNA fueron posteriormente añadidos.

Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para PCR

Reactivo	Concentración final	Para 50 µL de reacción
Agua libre de nucleasas	-	Llevar a 50 µL
Amortiguador 10X <i>Taq</i>	1X	5 µL
Mezcla de dNTP 2 mM	0.2 mM de cada uno	5 µL
Primer I	0.6µM	6 µL
Primer II	0.6µM	6 µL
<i>Taq</i> DNA Polymerase	1.25 u/50 µL	0.5 µL
25 mM MgCl ₂	1-4mM	variable
cDNA	1 µg	variable

* Tabla para la selección del volumen de solución de 25 mM MgCl₂:

Concentración final (mM)	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0	2.5	3.0	4.0
Volumen de 25 mM MgCl ₂ (μL)	2	2.5	3	3.5	4	5	6	8

5.8 Solubilización de la acetilcolinesterasa usando amortiguadores con diferente fuerza iónica

5.8.1 Solubilización de la acetilcolinesterasa

Las formas asimétricas y globulares de AChE difieren en sus interacciones moleculares y, por tanto, en las condiciones de solubilización. Podemos decir que las formas de AChE pueden clasificarse en hidrofílicas e hidrofóbicas dependiendo de la facilidad de solubilización. En general, la mayoría de las formas asimétricas son hidrofílicas y solubles en medios de alta fuerza iónica, aunque con tendencia a la agregación en amortiguadores de baja concentración de sales (Rosenberry y Richardson, 1977).

En cuanto a las formas globulares, algunas son totalmente hidrosolubles, como la G₄ hidrofílica de líquido cefalorraquídeo humano o del plasma de ratón (García-Ayllón y col., 1999). Entre las formas globulares de membrana, unas requieren detergentes para su extracción y otras son solubles en amortiguadores de baja fuerza iónica, aunque necesitan detergente para mantenerse estables en disolución (Massoulié y Bon, 1982). A estas últimas moléculas se las denomina anfifílicas, ya que requieren detergente para su solubilización, o para permanecer activas y/o solubles en disolución.

5.8.2 Solubilización de proteínas de membrana con Triton X-100

Algunas proteínas de membrana pueden solubilizarse con compuestos quelantes, cambios en la fuerza iónica o pH, agentes caotrópicos o por digestión enzimática. Por lo general, estos agentes no son capaces de solubilizar las proteínas que están fuertemente unidas a la matriz fosfolipídica, por lo que hay que recurrir a detergentes.

Uno de los detergentes más usados para solubilizar proteínas de membrana es el Triton X-100. Es un detergente no iónico que no desnatura las proteínas; es incapaz de

deshacer las interacciones proteína-proteína, de modo que la estructura cuaternaria queda intacta, aún a concentraciones altas de Triton X-100. Este hecho es fundamental cuando se pretende estudiar la organización estructural de proteínas oligoméricas como son las formas moleculares de AChE. El Triton X-100 es el detergente más empleado para solubilizar la AChE de numerosos tejidos (Sánchez-Chávez y col., 1995).

Dadas las diferencias en la solubilización de las distintas formas moleculares de AChE, el procedimiento óptimo para solubilizar todos los componentes moleculares consiste en la aplicación de un método en dos etapas; en la primera se extraen las formas asimétricas, con medios de alta fuerza iónica, y después las formas unidas a la membrana, con Triton X-100 (Stieger y Brodbeck, 1985).

Procedimiento

Para realizar la extracción de AChE de linfocitos T aislados y de células Jurkat se pesaron los paquetes celulares de cada tipo celular y se homogeneizó cada uno con amortiguador Hepes salino (Hepes 15 mM, NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 3 mM, pH 7.5), conteniendo un coctel de antiproteasas compuesto por leupeptina (20 µg), pepstatina (10 µg), benzamidina (1 mM) y aprotinina (20 U), al 10% de peso de tejido/volumen de amortiguador (p/v), en un Polytron con rotor PTA 10TS. El tiempo de homogeneizado fue de 1.5 minutos, repartidos en 3 intervalos de 30 segundos y descanso de 1 minuto, la homogeneización se llevó a cabo a velocidad media.

El homogenado (H) se centrifugó a 100000xg (35 000 rpm) en un rotor Beckman Ti 60 por 1 h a 4 °C, para separar la AChE soluble en las células o débilmente unida a las membranas. Las centrifugaciones se realizaron empleando un rotor Beckman y una centrífuga Beckman XL-90 Optima. Tras recoger los primeros sobrenadantes (S₁), los precipitados se homogeneizaron con amortiguador Hepes salino, en el mismo volumen y bajo condiciones idénticas, pero conteniendo ahora, además de las antiproteasas, Triton X-100 al 1% p/v. Estas suspensiones se centrifugaron para obtener la enzima ligada a las membranas en los segundos sobrenadantes (S₂).

5.9 Estimación de la actividad de la acetilcolinesterasa

La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se valoró mediante el método espectrofotométrico de Ellman (Ellman y col., 1961), utilizando el tioanálogo del sustrato natural, la acetiltiocolina (ATCh). En este método se aprovecha la capacidad del cromógeno ácido ditiobenzóico (DTNB) para oxidar los grupos tioles libres. Aunque la especificidad de la AChE hacia su sustrato específico es elevada, es conveniente usar inhibidores selectivos. Por ello, la estimación de la actividad AChE se realizó en presencia de Iso-OMPA, inhibidor relativamente selectivo para la BuChE (Ruiz-Espejo y col., 2002).

La AChE hidroliza los ésteres de la acetiltiocolina liberando acetato y la propia tiocolina, que reacciona rápidamente con el DTNB produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato. Este anión presenta un color amarillo intenso y un máximo de absorbancia a 412 nm, lo que facilita su medida en espectrofotómetro (Ruiz-Espejo y col., 2002).

5.9.1 Medida de la actividad acetilcolinesterásica en espectrofotómetro

La medida de AChE en espectrofotómetro se realizó por espectrofotometría, a 37 °C. El medio de reacción contenía amortiguador fosfato 100 mM, pH 8.0 con DTNB 0.33 mM, 1 mM, yoduro de acetiltiocolina y el inhibidor Iso-OMPA 50 µM (Sáez-Valero y col., 1993).

Para las valoraciones se usaron cubetas de cuarzo de 1.5 mL en las que se depositaron, secuencialmente y siempre en el mismo orden, la disolución de DTNB, el inhibidor de BuChE y la muestra (generalmente 25 µL), hasta completar un volumen de 1 mL. Tras agitar la cubeta, se incubó para que el DTNB reaccione con los grupos tioles de la muestra. El tiempo de incubación fue de 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se comprobó que la absorbancia a 412 nm se mantuviera constante, y entonces se añadieron 25 µL del sustrato para iniciar la reacción; se agitó y se registró la

absorbancia a 412 nm (A_{412}) frente a una cubeta "blanco" que contenía todos los reactivos excepto la muestra sustituyendo su volumen por amortiguador fosfato.

5.9.2 Medida de la actividad acetilcolinesterásica en placas de microvaloración

El método de Ellman fue adaptado a un microensayo y para ello se utilizaron placas de material plástico transparente (Nunc), con 96 pocillos de 400 μL y con fondo plano (Campoy y col., 1992).

Las concentraciones de los reactivos (sustrato, inhibidor de BuChE y DTNB) fueron las mismas de la valoración en cubeta, pero ahora el amortiguador fosfato se ajustó a pH de 7.5. De este modo, para un volumen final de 275 μL , se depositaron en los pocillos 25 μL de muestra, 200 μL de medio de reacción (amortiguador fosfato 100 mM conteniendo DTNB 0.39 mM y el inhibidor de BuChE), y finalmente 25 μL de sustrato (a la concentración de 11 mM). Cuando la actividad enzimática fue muy baja, se midió con 100 μL de muestra, modificando adecuadamente los volúmenes y concentraciones de los reactivos para mantener las condiciones de la reacción.

Antes de añadir el sustrato, se incubó la muestra con los reactivos durante 15 min para eliminar las interferencias del DTNB con los grupos tioles de las proteínas. El cambio de absorbancia, debido a la hidrólisis espontánea del sustrato, se valoró en varios pocillos "blancos" (la primera columna) a los que se les añadió amortiguador fosfato, en lugar de muestra. La reacción se inició con la adición del sustrato, e inmediatamente después se realizó una lectura de la placa, a tiempo cero, seguida de varias lecturas a diferentes tiempos, mientras se desarrolló la reacción. La duración del ensayo dependió según la actividad de la muestra, buscando siempre que los incrementos de absorbancia fueran constantes al comparar los intervalos temporales, es decir asegurándose de que el cambio de absorbancia fuera lineal con el tiempo.

Los cambios de absorbancia se registraron en un lector de placas, leyendo a 405 nm. Finalmente, se determinó el aumento de absorbancia por minuto y se restó el de la hidrólisis espontánea del sustrato (pocillos "blancos"). La actividad enzimática se

expresó en unidades arbitrarias (U.A.), de modo que una unidad arbitraria representa un aumento en A_{405} de 0.001 por min y por cada μL de muestra, a temperatura ambiente y en las condiciones de ensayo.

El método del microensayo presenta varias ventajas respecto a la medida en cubeta. La enzima se valora con una mejor relación muestra/reactivos y a tiempos mayores. Además, se reduce el tiempo invertido en los experimentos, pudiéndose procesar hasta 600 muestras diarias. Por otra parte, se ahorran muestra y reactivos, por el menor volumen de reacción.

5.10 Determinación del contenido de proteínas en extractos de linfocitos T normales y de la línea celular leucémica Jurkat E6-1

La determinación del contenido de proteínas se realizó por el método de Bradford. Este es un ensayo de unión proteína-colorante basado en el cambio de color de un colorante en respuesta a varias concentraciones de proteína. Este es un método de determinación de proteínas que implica la unión de Azul Brillante de Coomasie G-250 con los residuos de Arg y en menor grado con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe de la proteína (Bradford, 1976).

La unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, se basa en la observación de que el Azul Brillante de Coomasie G-250 existe en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando se une el colorante a la proteína.

Para valorar proteínas con este método, se elaboraron dos rectas patrón. A partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 5 $\mu\text{g}/10\text{ mL}$ y otra de 28.2 $\mu\text{g}/10\text{ mL}$ se repartieron los volúmenes de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μL y se completaron a 10 μL con agua bidestilada. Los volúmenes de muestra (de dilución 1:10) fueron de 10 μL . Cada muestra se preparó como mínimo, por triplicado. Se agregó a las muestras 200 μL del reactivo de Bradford esperando 5 minutos para leer a 595 nm.

5.11 Determinación de las formas moleculares de AChE en células normales y en la línea celular leucémica Jurkat E6-1

La aplicación del análisis de sedimentación permitió separar e identificar las distintas formas moleculares de AChE en las muestras. Para ello se sometieron los extractos a centrifugación en gradientes continuos de densidad de sacarosa (5-20%). Cada componente se identificó por su coeficiente de sedimentación (S). Los coeficientes se determinaron según el método de Martin y Ames (1961), comparando la distancia recorrida por la proteína problema con la de proteínas estándares de coeficiente de sedimentación conocido.

5.11.1 Preparación de los gradientes de sacarosa

Los gradientes continuos se elaboraron a partir de dos disoluciones de sacarosa de diferente concentración (5% y 20% p/v), preparadas en amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.0, con NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM y Triton X-100 (0.5%). Para formar el gradiente se empleó un sistema de vasos comunicantes. En cada vaso se depositaron 5 mL de cada una de las disoluciones de partida. El vaso que contiene sacarosa concentrada tiene en su base una salida que se conecta a un tubo de goma, que se ajusta a una bomba peristáltica (BioRad, EUA), y cuyo extremo final desemboca en el tubo de centrifuga (polialómero de Beckman) de 12 ml de capacidad. Al abrir la llave que comunica ambos vasos, se acciona el funcionamiento de la bomba peristáltica. El gradiente se forma a medida que pasa la disolución diluida hacia el vaso de la concentrada. El flujo de salida se controló con la bomba peristáltica.

La centrifugación de las muestras en gradientes con sacarosa y Triton X-100, sirvió para obtener una primera información acerca del carácter hidrofílico o anfifílico de cada uno de los componentes moleculares de AChE. En el caso de moléculas con carácter anfifílico, el detergente se une a los dominios hidrofóbicos de las proteínas, lo que afecta a su migración en el gradiente, y por tanto a su coeficiente de sedimentación. Por el contrario, la migración de las moléculas hidrofílicas será la misma, independientemente de la adición de detergentes (Sáez-Valero y col., 1993).

Las proteínas utilizadas como estándares de sedimentación fueron: catalasa de hígado bovino (11.4S) y fosfatasa de intestino bovino (6.1S). Una vez depositado un volumen de muestra (0.3-1.0 mL) sobre la superficie de los gradientes, se centrifugaron los tubos a 100000xg, 18 h a 4 °C, en un rotor basculante SW41Ti (Beckman E.U.A.). Después de la centrifugación, los tubos se perforaron cuidadosamente por su base y se recogieron fracciones con la ayuda de una bomba peristáltica (Wilson E.U.A.) y un colector de fracciones (Pharmacia E.U.A.). Por cada tubo de 12 ml, se obtuvieron de 37-40 fracciones de unos 260 µl aproximadamente que se almacenaron a -20 °C hasta el momento de valorar la actividad AChE en cada fracción, conservándose después a la misma temperatura.

5.11.2 Medida de actividad de las enzimas marcadoras

Las enzimas estándares se disolvieron, por separado, en NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 a las siguientes concentraciones: 15 mg/mL para la catalasa de hígado bovino (Sigma, EUA) y 20 mg/mL para la fosfatasa alcalina de hígado bovino (Sigma, EUA). Después de la centrifugación, se identificaron las fracciones con la máxima actividad de las enzimas marcadoras:

La **catalasa** descompone el peróxido de hidrógeno, dando agua y oxígeno molecular. El H_2O_2 absorbe en la región del ultravioleta a 240 nm ($\epsilon = 41 M^{-1}cm^{-1}$). Poco antes de valorar la actividad de esta enzima, se preparó un medio de reacción que contenía peróxido de hidrógeno 18 mM en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.0. En una cubeta de cuarzo se añadió 1 mL de medio de reacción y 5-10 µL de muestra, se agitó y se midió la disminución de absorbancia a 240 nm en un espectrofotómetro a temperatura ambiente (Chance y Herbert, 1950).

La **fosfatasa alcalina** hidroliza el p-nitrofenilfosfato (pNPP), a pH alcalino, produciendo fosfato y p-nitrofenol, que absorbe a 405 nm ($\epsilon=18,2 M^{-1} cm^{-1}$). La mezcla de reacción con pNPP 0.75 mM, se preparó mezclando 200 µL de pNPP 38 mM con 10 mL de amortiguador dietanolamina 100 mM, pH 9.8. La medida de la actividad se realizó en placas de microvaloración (Nunc), empleando el modo dual de longitud de

onda, 405 nm y 650 nm, para medir el incremento de absorbancia ($A_{405} - A_{650}$) en cada uno de los pocillos, que contenía la mezcla de reacción (250 μL) y la muestra (10 μL) (Garen y Levinthal, 1960). Aunque la enzima requiere Mg^{2+} para su actividad (Mössner y col., 1980), no fue necesario añadir el catión al ensayo porque el amortiguador del gradiente de sacarosa contiene MgCl_2 50 mM, de modo que la concentración final de Mg^{2+} en la medida será de 1 mM.

5.11.3 Cálculo del coeficiente de sedimentación

Una vez determinadas las actividades AChE y las de las enzimas de referencia, se calculó el coeficiente de sedimentación de las formas moleculares de la AChE (Martin y Ames, 1961), expresado en unidades Svedberg (S). El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$S_{\text{proteína problema}} = \frac{(N_t - N_p)}{(N_t - N_e)} \times S_{20, \text{ w proteína estándar}}$$

donde N_t corresponde al número total de fracciones recogidas del gradiente, N_p es la fracción en la que la actividad de la forma molecular de AChE es máxima y N_e es la fracción con la mayor actividad de la proteína de referencia. En cada caso, se eligió la proteína estándar más próxima en el gradiente a la forma molecular cuyo coeficiente de sedimentación se deseaba conocer.

5.12 Determinación del procesamiento post-traducciona l de AChE en linfocitos T normales y en la línea celular leucémica Jurkat E6-1

La naturaleza de los azúcares terminales en las glicoproteínas puede conocerse empleando lectinas con distinta especificidad. En estos ensayos se utilizó el método propuesto por Cabezas-Herrera y colaboradores (1994). La AChE se incubó con lectina ligada a una matriz de carbohidratos insoluble. Los complejos enzima-lectinas producidos por su interacción se precipitaron mediante centrifugación, y posteriormente, se determinaron las actividades AChE en el sobrenadante. Las lectinas

empleadas fueron: Lectina de *Concanavalia ensiformis* (ConA-Sepharose) que reconoce D-glucosa o D-manosa, lectina de *Lens culinaris* (LCA-sepharose) que reconoce D-manosa unida a centros de fucosilación, lectina de *Triticum vulgare* (WGA-Sepharose) que reconoce N-acetil-glucosamina y lectina de *Ricinus communis* (RCA-Sepharose) que reconoce galactosa o ácido siálico, todas inmovilizadas a una matriz. El control de enzima de unión inespecífica a la matriz inerte fue Sepharose-4B.

Se mezclaron 0.5 mL de las muestras de AChE obtenidas de células T normales y de la línea celular Jurkat con 0.5 mL de Sepharosa-4B en suspensión (usada como control), Con A-Sepharosa, LCA-Sepharosa, WGA-Agarosa o RCA-Agarosa y se incubaron durante 16 horas en agitación constante a 4 °C. Durante la incubación, la lectina se une a las glicoproteínas formándose complejos pesados de gel-lectina-proteína.

La precipitación de la enzima que interaccionó con la aglutinina correspondiente se realizó centrifugando las mezclas 10000xg durante 10 min a 4 °C en una microcentrífuga (Beckman-11). Se recogieron 450 µl del sobrenadante, tratando de no recoger precipitado. Se midió la actividad AChE de los sobrenadantes después de la interacción, esto nos indica la actividad recuperada de los perfiles llevados a cabo con la muestra conteniendo la enzima que no se ligó con la lectina.

Los resultados de interacción se expresaron como porcentaje de actividad AChE retenida por las lectinas, respecto a la actividad total del sobrenadante del experimento control, en el que las muestras se incubaron con la Sepharosa-4B desprovista de lectinas. La actividad medida en las muestras control se consideró el 0% de interacción.

5.13 Análisis Estadístico

Los valores promedio y varianzas (n=3 por grupo) para la actividad solubilizada, contenido de proteínas, interacción con lectinas, proporción de cada forma molecular, obtenidos en los linfocitos normales y células leucémicas se comparó por la prueba de U Mann-Whitney para establecer posible diferencia estadística.

6 RESULTADOS

6.1 Separación de leucocitos por gradientes de densidad con linfograd y determinación de la cantidad celular aislada y viabilidad.

Se partió de muestras de sangre (12 mL) obtenidas con anticoagulante EDTA, de diferentes individuos (n=10) de entre 25 y 42 años, clínicamente sanos y que no consumían medicamentos. Los leucocitos se aislaron a partir de un gradiente de densidad con linfograd. En la **Tabla 6** se puede observar el promedio de leucocitos aislados a partir de una muestra de sangre de 12 mL fue de $71.3 \times 10^6 \pm 0.89$, así mismo se muestra el porcentaje de viabilidad fue del 100%.

6.2 Separación de linfocitos T por separación magnética y determinación de la cantidad celular aislada y su viabilidad.

Los linfocitos T fueron magnéticamente marcados con CD3 MicroBeads (MACs) y se realizó la separación magnética en una columna MACs. Finalmente se determinó el porcentaje de viabilidad y se cuantificó el número de células purificadas utilizando azul de tripano, en la **Tabla 6** se muestra el promedio (n=10) de la cantidad y el porcentaje de viabilidad después de la separación magnética de linfocitos T. Como se observa en la **Tabla 6** el promedio de linfocitos T aislados es de $10.2 \times 10^6 \pm 1.12$ y cuya viabilidad estuvo siempre cerca del 100%.

Tabla 6. Aislamiento de leucocitos y purificación de linfocitos T		
Fuente	Número de células / mL (n=10)	Viabilidad (n=10)
Leucocitos	$71.3 \times 10^6 \pm 0.89$	100%
Linfocitos T	$10.2 \times 10^6 \pm 1.12$	100%

A partir de un volumen de sangre de 12 mL de 10 muestras diferentes se realizó la separación de leucocitos totales a partir de los cuales se purificaron los linfocitos T por separación magnética. En esta tabla se aprecian los valores del promedio y desviación estándar del contenido celular obtenido en cada fase de la separación así como del porcentaje de viabilidad correspondiente.

6.3 Análisis de pureza de linfocitos T por citometría de flujo.

El nivel de pureza de la población de linfocitos T aislados se estableció por citometría de flujo. En la **Figura 5** se muestra un análisis tipo de citometría de flujo antes y después de la separación magnética de los linfocitos T donde se observa que se obtuvo un rendimiento del 95-100%.

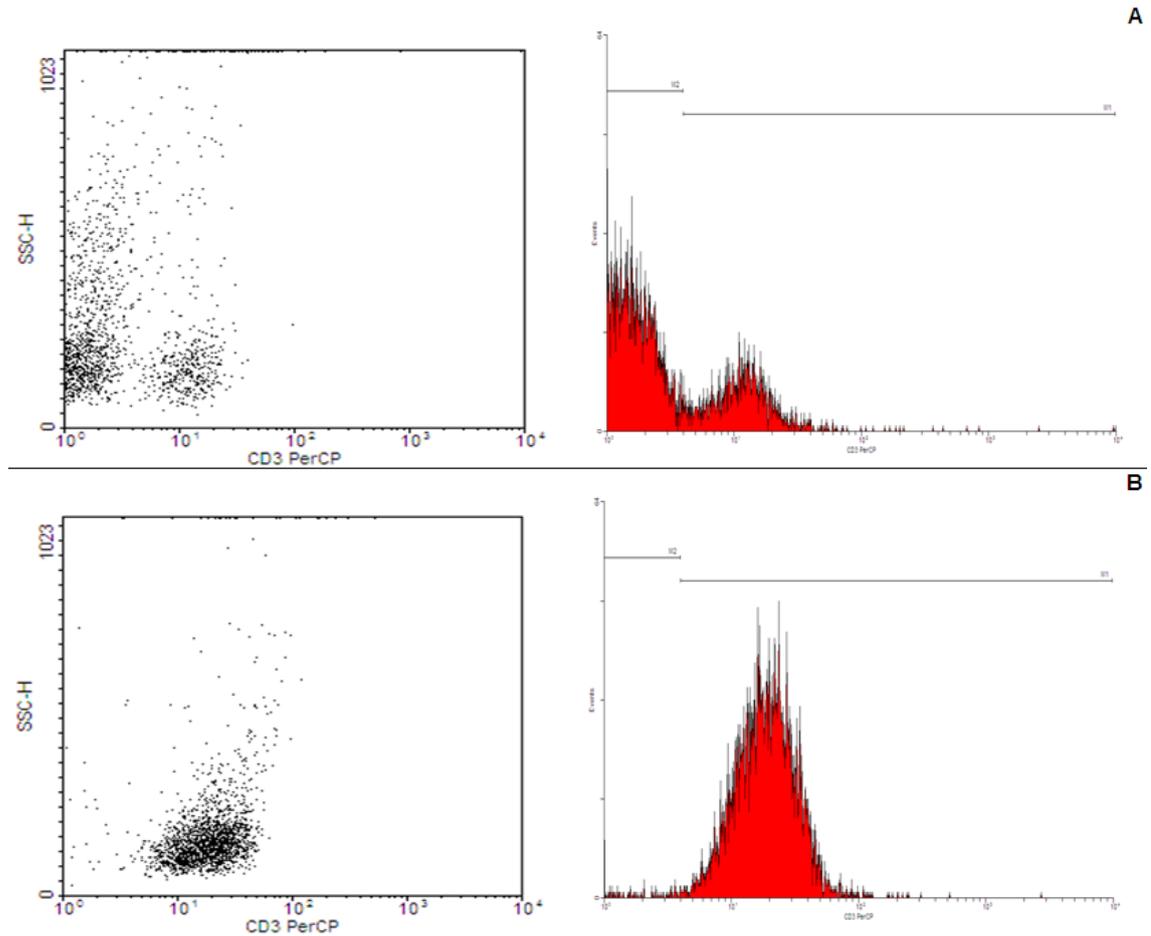


Figura 5: Análisis por citometría de flujo de linfocitos T aislados marcados con CD3-PerCP. Los resultados por citometría de flujo que se muestran aquí corresponden al análisis de la separación de linfocitos T. A) Representa una muestra de los leucocitos totales antes de la separación magnética ya marcados con el fluorocromo CD3-PerCP. B) Representa los linfocitos T aislados en este caso el porcentaje de pureza correspondió al 98.36%.

Aproximadamente el 25% de los leucocitos totales comprende a los linfocitos positivos al marcador de superficie CD3+. El porcentaje promedio de las 10 muestras analizadas por citometría de flujo fue de $97.21\% \pm 1.99$. Esto señala que el proceso de purificación celular proporcionó un buen rendimiento.

6.4 Cultivo de línea celular Jurkat E6-1

La línea celular Jurkat E6-1 fue crecida en medio RPMI 1640 suplementado. Estas células presentaron un tiempo de duplicación menor a 24 horas y tendían a formar agregados en forma de racimos de uvas, la concentración a la que se mantuvieron en el cultivo fue de 10^6 células/mL, supervisando los parámetros del cultivo de viabilidad y número celular cada tercer día. Para el análisis molecular fue suficiente con varias muestras de 10^7 células crecidas en frascos de cultivo Roux de 25 cm^2 . En el caso del análisis bioquímico fue necesario el crecimiento de células en frascos de cultivo Roux de 75 cm^2 , para así poder obtener el paquete celular suficiente para dicho ensayo.

6.5 Análisis de marcaje CD3+ en células Jurkat por citometría de flujo.

Las células Jurkat fueron marcadas con CD3-PerCP para poder determinar mediante citometría de flujo el porcentaje de células CD3+. Los datos obtenidos muestran que un 84.89% las células Jurkat fueron CD3+, la **Figura 6** corresponde a un análisis realizado por citometría de flujo a una muestra de células Jurkat marcadas con CD3-PerCP.

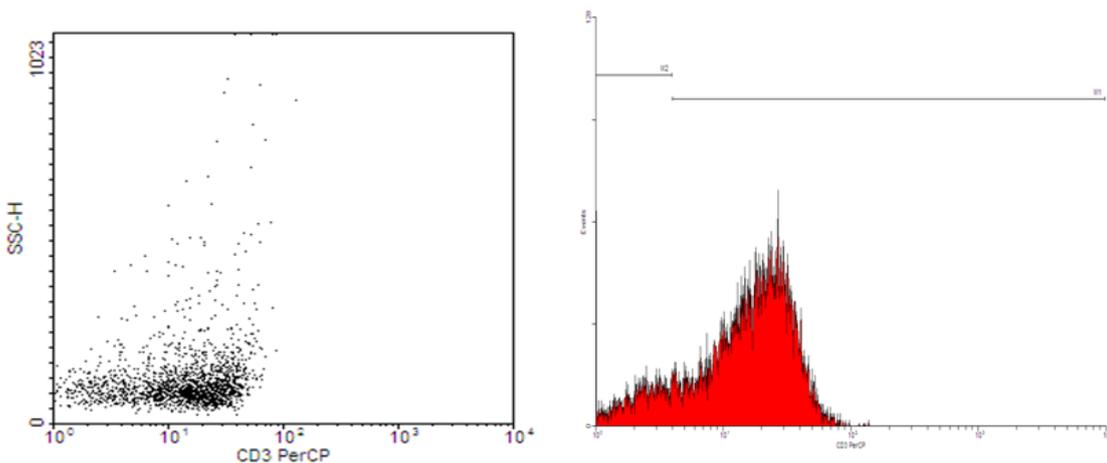


Figura 6: Citometría de flujo con PerCP en células Jurkat. Se muestra el análisis por citometría de flujo con células Jurkat marcadas con CD3-PerCP, en este caso el porcentaje obtenido de células Jurkat CD3+ fue cercano al 85%.

6.6 Extracción de RNA y RT-PCR de un solo paso

Se realizó la extracción del RNA total a partir de linfocitos T y células Jurkat a una densidad de 10^7 células con la técnica de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Ca). La pureza del RNA extraído se evaluó con el cociente de absorbancia 260nm/280nm que tuvo un valor promedio de 1.6 en las muestras de linfocitos T, indicando un adecuado grado de pureza del RNA extraído.

Para la determinación de los transcritos de AChE expresados en linfocitos T se utilizó el kit One-step RT-PCR (Qiagen). Se utilizaron diferentes cantidades de RNA (0.5, 1, 1.5 y 2 μg de RNA de la primera muestra de linfocitos T obtenidos) para hacer una titulación en la RT-PCR y poder determinar la concentración óptima RNA necesaria para obtener una buena amplificación.

Los geles obtenidos de las titulaciones de RNA con los tres diferentes juegos de *primers* se muestran en la **Figura 7**. Los fragmentos de amplificación mostraron que sólo hubo un producto amplificado utilizando los primers correspondientes al transcrito AChE-H. Estos resultados señalan la expresión del transcrito AChE-H encargado de la síntesis de la forma molecular de AChE del tipo de dímero anfífilico anclado a la membrana plasmática de los linfocitos T (Bartha y col., 1987; Pick y col., 2004).

Teniendo en cuenta que la concentración óptima para la amplificación fue 1.5 μg de RNA. Las cinco muestras restantes se amplificaron bajo estas condiciones. Los productos de las amplificaciones se resolvieron en un gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g/mL}$, estos se muestran en la **Figura 8**.

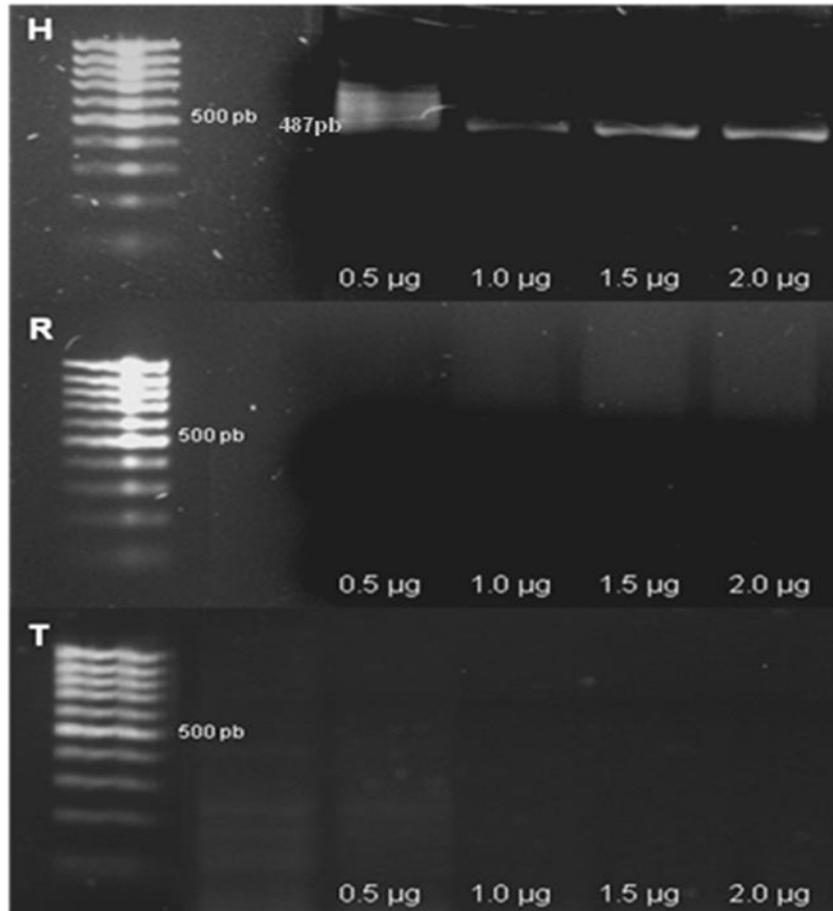


Figura 7: Revelado de los productos de amplificación usando los transcritos para la AChE humana. Se utilizaron distintos volúmenes de la muestra de RNA (0.5-2 µg) obtenido a partir de linfocitos T por el método de Trizol. Se observa que sólo hubo producto de amplificación para el transcrito AChE-H, el producto amplificado en AChE-H es de aproximadamente 487 pb. También se puede observar que una baja cantidad de RNA (menor a 1.5 µg) resulta en un amplificado pobre que sería difícil de analizar.

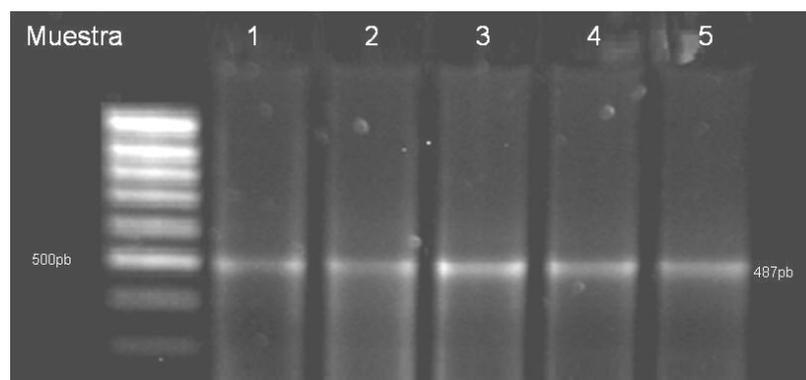


Figura 8: Revelado de los productos de amplificación correspondientes a AChE-H de cinco muestras diferentes. En esta figura se pueden apreciar los amplificados resultantes de la RT-PCR de cinco muestras de RNA (1.5 µg de RNA por muestra) obtenidas de linfocitos T aislados, igual que en la titulación de RNA no hay presencia de los otros dos transcritos solo de AChE-H (únicamente mostrado aquí), los amplificados tienen un tamaño aproximado de 487 pb.

En el caso de la expresión de los transcritos de AChE en las células leucémicas Jurkat en la RT-PCR de un solo paso se utilizaron 1.5 µg de RNA por reacción al igual que con las muestras de los linfocitos T. La **Figura 9** muestra los transcritos detectados en células leucémicas Jurkat que son correspondientes a AChE-H y AChE-T, este último no es detectado en los linfocitos T normales.

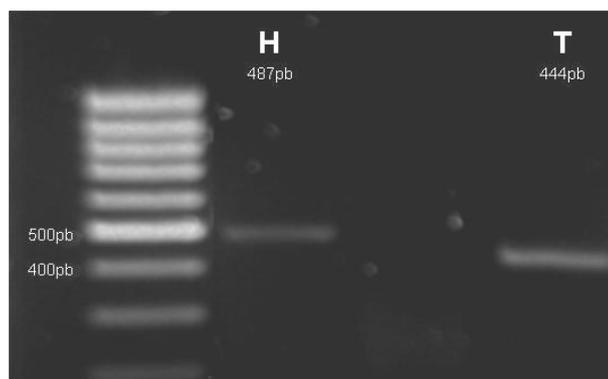


Figura 9: Transcritos de acetilcolinesterasa expresados por las células Jurkat. Se puede observar que los amplificadores resultantes de la RT-PCR de una muestra de RNA (1.5 µg) obtenidas de células Jurkat se detectan dos transcritos, el de AChE-H (487 pb) y AChE-T (444 pb), este último no está presente en linfocitos T. El transcrito AChE-R no es detectado en estas células por RT-PCR.

6.7 RT/PCR en dos pasos y PCR semicuantitativa

Para confirmar que los transcritos detectados por la amplificación por RT-PCR en un paso eran reales, se decidió amplificar los transcritos expresados por una RT/PCR en dos pasos. Para lo cual, nuevamente se procedió a extraer el RNA de células Jurkat y linfocitos T normales en las condiciones descritas anteriormente. Las muestras de RNA extraído presentaron un valor promedio de 1.6 en el cociente 260nm/280nm demostrando un buen grado de integridad del RNA extraído.

A partir de las muestras obtenidas se determinó la expresión de los transcritos de AChE mediante la técnica de RT/PCR en dos pasos, sintetizando en primera instancia la cadena de cDNA y siendo esta el molde para la detección de los transcritos de AChE presentes por amplificación mediante PCR. Para esto primero se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento y de concentración de MgCl₂ para conseguir la temperatura y concentración de MgCl₂ adecuadas para una amplificación óptima.

El siguiente programa resulto el adecuado para la amplificación utilizando una concentración de MgCl₂ de 2 mM

Paso 1	95 °C	3 min.
Paso 2	94 °C	1 min.
Paso 3	55 °C	1 min.
Paso 4	72 °C	1 min.
Regresar al paso 2 por 39 ciclos		
Paso 6	72 °C	10 min.

A partir de los resultados anteriores se procedió a la detección de transcritos de AChE en las células leucémicas Jurkat tomadas a diferentes tiempos de cultivo (48, 72 y 96 horas). Los fragmentos amplificados obtenidos correspondieron a AChE-H y AChE-T, este último no está presente en los linfocitos T normales (**Figura 10**).

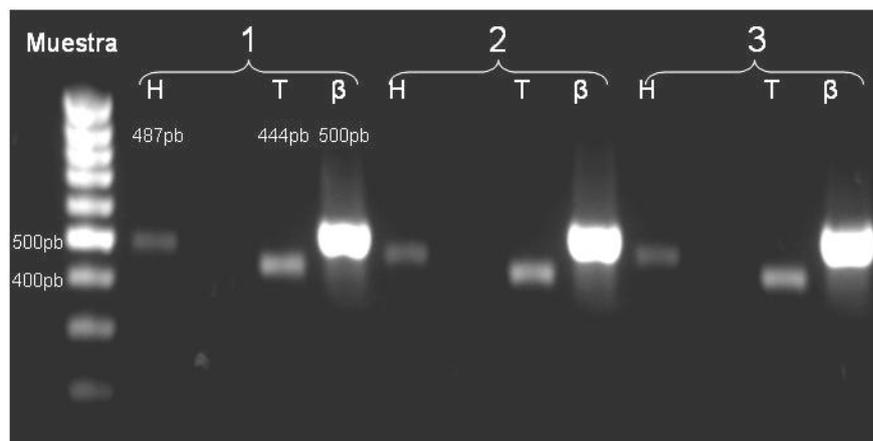


Figura 10. Transcritos de AChE amplificados en células leucémicas Jurkat E6-1. Los transcritos detectados corresponden a AChE-H (487 pb) y AChE-T (444 pb), AChE-R no es detectado aquí. Para normalizar las muestras se utilizó el control interno de β-actina (500 pb), para que de esta forma el experimento de PCR fuera semicuantitativo.

Para realizar un análisis por PCR semicuantitativa se aplico el mismo método en muestras de linfocitos T normales. En la **Figura 11** se muestra la detección de las variantes de transcritos de AChE presentes en linfocitos T con su correspondiente control interno de β-actina. Con estos datos posteriormente se pudo realizar un análisis comparativo de la expresión de AChE en linfocitos T y células leucémicas.

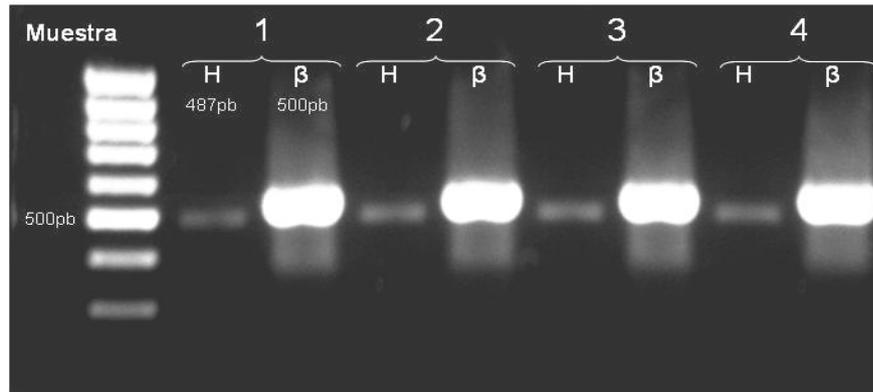


Figura 11. Amplificados de los transcritos de AChE en linfocitos T normales de 4 muestras. Se obtuvieron muestras de 4 personas para realizar los análisis de expresión de AChE en linfocitos T normales mediante PCR semicuantitativa, utilizando el control interno de β -actina, en esta imagen se presenta el único amplificado detectado en linfocitos T correspondiente a la variante AChE-H (487 pb) y su correspondiente control de β -actina (500 pb) por individuo.

En el análisis comparativo de la expresión de AChE en ambos tipos celulares se emplea la expresión del control β -actina como control de expresión constitutiva. La **Figura 12** muestra los productos de amplificación de los transcritos alternativos de AChE detectados en linfocitos T normales y células Jurkat, y usando un control positivo para AChE-R que da un producto de 574 pb usando el mismo juego de primers para AChE-H obtenido de una muestra de células HepG2.

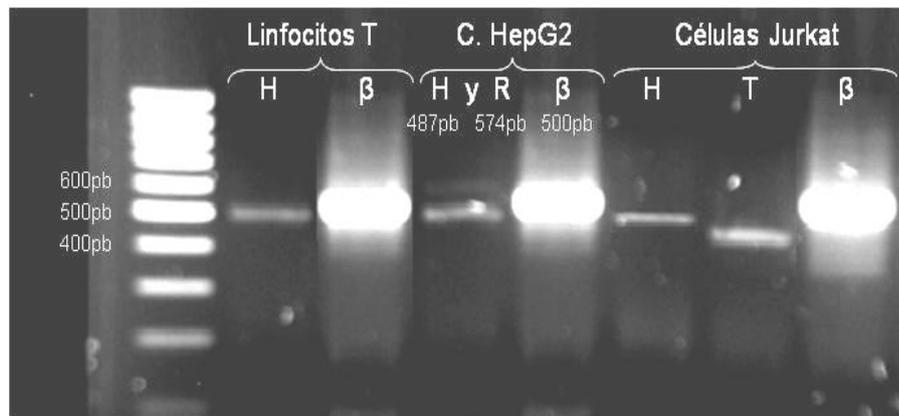


Figura 12. Amplificados de los transcritos de AChE en linfocitos T normales y células leucémicas. En esta imagen se puede observar una comparación de la expresión de AChE en linfocitos T normales y células leucémicas, en el caso de los linfocitos T normales solo se detectan transcritos AChE-H (487 pb), pero en el caso de las células leucémicas existe la presencia de transcritos AChE-H (487 pb) y AChE-T (444 pb) lo cual indica una alteración de la expresión de AChE en las células transformadas. En esta imagen se añade un control positivo que presenta expresión de AChE-H (487 pb) y AChE-R (574 pb) en una misma reacción obtenido a partir de una muestra de células HepG2 y también se incluyen los controles internos de β -actina para cada tipo celular.

Con los datos descritos sobre la expresión de transcritos se realizaron los análisis de densitometría para poder obtener el valor de intensidad de cada banda, obteniendo un promedio de las cantidades de intensidad de los controles de β -actina y así establecer el índice de intensidad relativa de cada banda de los amplificadores correspondientes de AChE en cada muestra (**Tabla 7**)

Tabla 7. Intensidad relativa de isoformas de splicing del RNAm para AChE humana			
Célula	H	R	T
Linfocito T normal	0.2326 \pm 0.0102	ND	ND
Jurkat E6-1	0.1909 \pm 0.0050	ND	0.4638 \pm 0.0058
HepG2	0.2615 \pm 0.0308	0.0657 \pm 0.0128	-

Los valores representan los promedios y desviaciones estándar respectivas de cuatro datos obtenidos de análisis por densitometría en las muestras de linfocitos T normales (n=4), células Jurkat (n=3) y células HepG2 (n=2), estas últimas empleadas como control positivo de expresión de AChE-R. Las reacciones de RT/PCR se normalizaron utilizando un control de β -actina expresado en cada tipo de célula con un valor promedio de 206.39 \pm 3.5756. La expresión del transcrito AChE-H es significativamente mayor en linfocitos T normales que en las células Jurkat (U de Mann-Whitney, p<0.05).

6.8 Determinación de la actividad AChE en linfocitos T normales y células Jurkat

Teniendo en cuenta que para el análisis bioquímico, se requería una cantidad mayor de células fue necesario usar una unidad de sangre (aproximadamente 500 mL de sangre total) donada por una persona sana de 23 años de edad que no presentaba algún tipo de enfermedad en los últimos tres meses y que no consumía medicamentos. Los linfocitos T se aislaron usando el mismo procedimiento empleado para el análisis molecular obteniendo un paquete celular con un peso aproximado de 300 mg (439 x 10⁶ células).

Para la extracción de AChE de células Jurkat previamente se realizó el cultivo de la línea celular en frascos de Roux de 75 cm² con el fin de obtener la cantidad suficiente de células.

Las células fueron concentradas por centrifugación y se les retiró el sobrenadante determinando por último el peso del botón celular obtenido, un paquete de células Jurkat con un peso aproximado de 300 mg (440×10^6 células) fue utilizado para la extracción de AChE.

A partir de los linfocitos T y las células Jurkat concentradas (300 mg por cada tipo celular) se extrajo la AChE no ligada o débilmente ligada a la membrana (fracción S_1) y la AChE fuertemente ligada a la membrana (fracción S_2). La actividad de AChE se midió en espectrofotómetro por el método de Ellman y colaboradores (1961), y el contenido de proteína por el método de Bradford (1976). En todos los casos las determinaciones se realizaron por triplicado. Posteriormente se obtuvo la actividad específica de AChE en unidades por miligramo de proteína (U/mg) a partir del cociente de actividad/proteína.

Los datos obtenidos de la determinación de la actividad de AChE en extractos S_1 y S_2 correspondientes a los linfocitos T muestran que los extractos presentan la misma actividad AChE. Estos resultados señalan que a nivel de proteína existe casi la misma proporción de AChE débilmente y fuertemente unida a la membrana en el caso de los linfocitos T humanos.

Los resultados obtenidos a partir de la extracción de AChE en células Jurkat muestran que la actividad AChE es mayor en la fracción S_1 que en S_2 , lo cual indica que la fracción de AChE soluble o débilmente unida a la membrana celular es mayor que la que está fuertemente unida a la membrana celular.

En la **Tabla 8** se muestran los resultados de contenido de proteína, actividad AChE y actividad específica AChE obtenidos de los extractos S_1 y S_2 de linfocitos T normales y las células Jurkat.

Tabla 8. Actividad acetilcolinesterásica en linfocitos T y células Jurkat			
	Proteína (mg/mL)	AChE (U/mL)	A.E. AChE (U/mg)
Linfocitos T			
S ₁	1.96 ± 0.0035	0.216 ± 0.0849	0.1101 ± 0.0433
S ₂	2.22 ± 0.0049	0.294 ± 0.0255	0.1323 ± 0.0115
Células Jurkat			
S ₁	4.86 ± 0.0045	0.287 ± 0.0312	0.0590 ± 0.0064
S ₂	2.50 ± 0.0164	0.088 ± 0.0000	0.0353 ± 0.0000

Se representan los promedios y desviaciones estándar del contenido de proteína, actividad de AChE por volumen y actividad específica de la enzima obtenida a partir de la solubilización de AChE en muestras de linfocitos T (n=3) y de células Jurkat (n=3) con amortiguador Hepes salino (fracción S₁) y con amortiguador Hepes salino con Triton X-100 (fracción S₂). Se puede apreciar que la actividad de AChE en S₁ y S₂ es muy parecida en linfocitos T (U de Mann-Whitney, p<0.05), pero en el caso de las células Jurkat la fracción S₁ presenta mayor actividad AChE que la fracción S₂. La AE AChE de S₁ y S₂ en células Jurkat es menor que en los linfocitos T normales.

6.9 Glicosilación de la AChE en linfocitos T y células Jurkat

Se mezclaron 0.5 mL de la muestra S₁+S₂ de cada tipo celular con 0.25 mL de Sepharosa-4B, Con A, LCA, WGA o RCA y se incubaron durante 16 horas en agitación constante a 4 °C. Durante la incubación, las glicoproteínas se unieron a la lectina formándose complejos pesados de gel-lectina-proteína. Después de la precipitación de la lectina con la proteína unida se recogieron 450 µl del sobrenadante. Se midió la actividad AChE y el contenido de proteína de los sobrenadantes. A partir de los datos obtenidos de actividad AChE de los sobrenadantes de cada lectina se calculó el porcentaje de interacción tomando como control de 100% de no interacción a la Sepharose-4B.

El análisis de la interacción con lectinas revela el proceso de maduración por el que pasan las glicoproteínas. En el porcentaje de interacción con lectinas se muestra que alrededor de un 33% de la AChE de linfocitos T presenta glucosa (ConA), un 66% presenta manosa (LCA), un 75% presenta galactosa o ácido siálico (RCA) y un 63% presenta N-acetil-glucosamina (WGA) (**Figura 13**).

Con respecto al patrón de glicosilación que presenta la AChE en las células leucémicas Jurkat se puede ver que la interacción de la muestra con cada lectina es superior al 50%, donde alrededor de un 66% de la AChE presente en las células Jurkat presenta glucosa (Con A), un 72% presenta manosa (LCA), un 67% presenta galactosa o ácido siálico (RCA) y un 67% presenta N-acetil-glucosamina (WGA).

La diferencia en el nivel de glicosilación de AChE entre los linfocitos T y las células T leucémicas señala que en el estado neoplásico se modifica el proceso de maduración de la AChE. En la **Figura 13** se muestra el patrón de glicosilación en columnas de ambos tipos celulares.

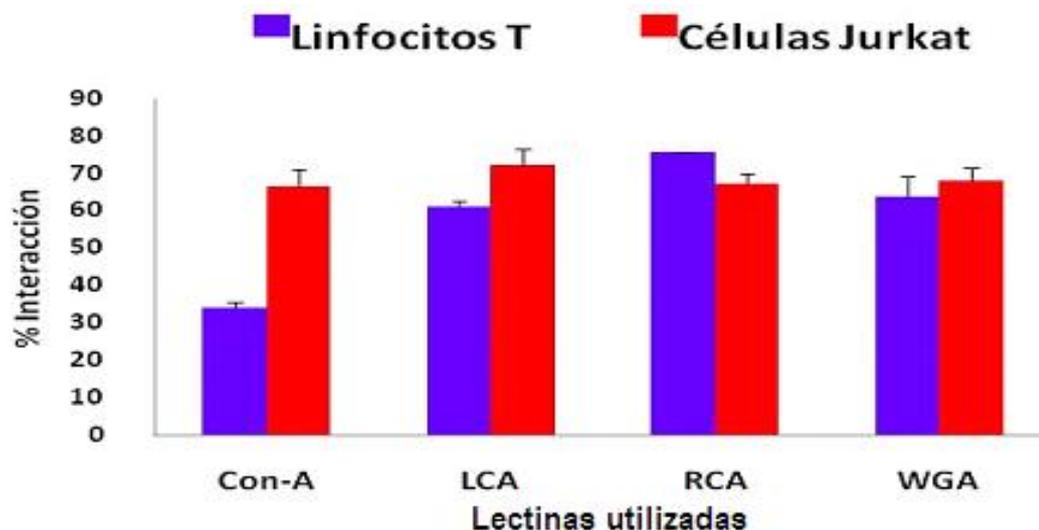


Figura 13. Interacción de la mezcla S1+S2 de linfocitos T normales y células Jurkat con lectinas de diferente especificidad. Podemos observar las diferencias que presenta el grado de glicosilación de la AChE entre los linfocitos T normales y las células leucémicas Jurkat. En células Jurkat la AChE presenta mayor cantidad de residuos de glucosa (ConA) y manosa (LCA) en su estructura, y menor cantidad de residuos de galactosa o ácido siálico (RCA). No hay diferencia significativa en la N-acetil-glucosamina (WGA) presente en ambos tipos celulares ($p < 0.05$).

Los porcentajes de glicosilación obtenidos se resumen en la **Tabla 9**, existen variaciones de glicosilación entre ambos tipos celulares, lo que probaría que también hay una alteración de la expresión de AChE en una célula transformada en relación a una célula normal.

Tabla 9. Interacción de AChE con lectinas en linfocitos T y células Jurkat				
Muestra	Con A	LCA	RCA	WGA
Linfocito T	33.78±1.91	60.81±1.91	75.67±0.00	63.51±5.73
Célula Jurkat	66.35±4.85	72.34±4.22	67.12±2.77	67.74±3.47

Se presentan los porcentajes obtenidos de interacción de AChE en linfocitos T normales (n=3) y células Jurkat (n=3) con diferentes lectinas. Se puede apreciar diferencia en la interacción con Con-A, LCA y RCA entre la AChE de ambos tipos celulares, indicando que en células Jurkat la AChE presenta mayor cantidad (el doble) de residuos de glucosa en su estructura, también presenta mayor cantidad de residuos de manosa y presenta menor cantidad de residuos de galactosa o ácido siálico, no hay diferencia significativa en la cantidad de residuos de N-acetil-glucosamina presente en ambos tipos celulares (p<0.05).

Para comprobar los porcentajes de interacción de AChE obtenidos se usó la actividad específica. Como se muestra en la **Figura 14**, existió una concordancia de los datos obtenidos del porcentaje de interacción con lectinas y los de actividad específica AChE que representan la porción de AChE que no interaccionó con las lectinas.

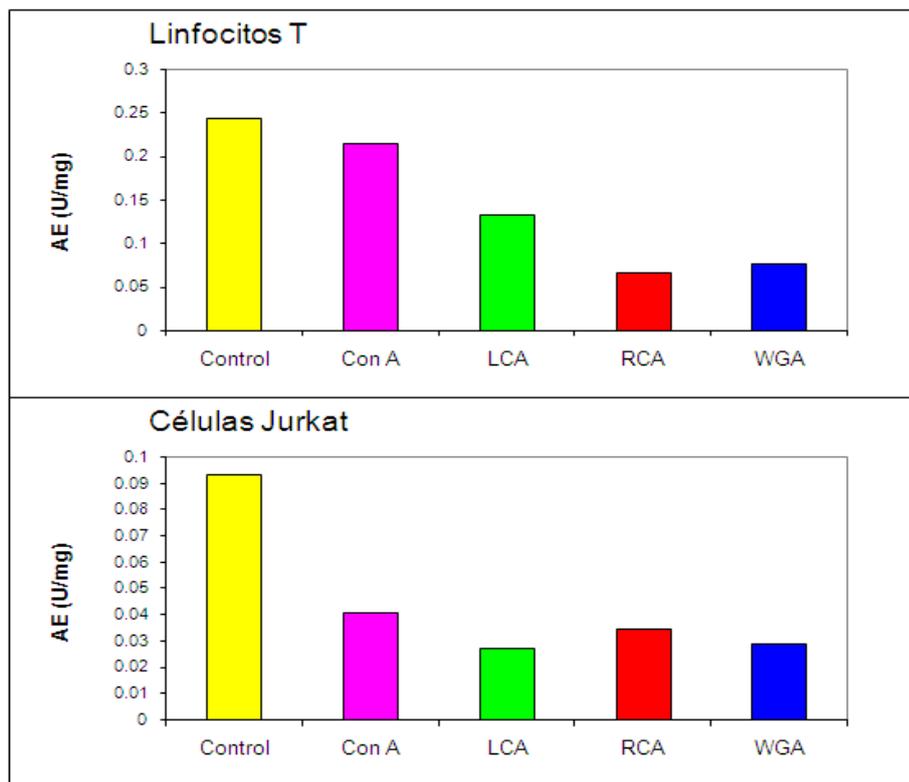


Figura 14. Actividad específica AChE de S_1+S_2 con lectinas. Para corroborar el porcentaje de interacción obtenido a partir del control de Sephrose-4B, se determinó la actividad específica en las porciones no retenidas por las lectinas de las fracciones de linfocitos T y células Jurkat. Se observa un patrón muy parecido de actividad específica AChE de lo no retenido con el porcentaje de AChE retenida correspondiente a cada célula.

6.10 Formas moleculares de AChE en linfocitos T y células Jurkat

Para determinar las formas moleculares de la AChE presentes en linfocitos T y células Jurkat (a partir de las muestras S_1+S_2) se utilizaron gradientes continuos de sacarosa (del 5 al 20% p/v) y se emplearon como marcadores de sedimentación la catalasa (11.4S) y la fosfatasa alcalina (6.1S).

Los datos obtenidos correspondientes a los linfocitos T muestran que hay presencia de formas moleculares de AChE que poseen coeficientes de sedimentación de 5.2S y 3.5S que coinciden con valores informados previamente para los dímeros anfifílicos (G_2^A , 5.2S) y monómeros anfifílicos (G_1^A , 3.5S) de AChE (Toutant y col., 1990; Sine y Caye-Vaugien, 1984). En la **Figura 15** se muestra el gradiente de densidad y las formas moleculares de AChE presentes en linfocitos T normales.

En el caso del análisis por sedimentación correspondiente a las células Jurkat se encontró la presencia de formas moleculares de AChE correspondientes a dímeros anfifílicos (G_2^A , 5.2S), monómeros anfifílicos (G_1^A , 3.5S) y tetrameros hidrofílicos (G_4^H , 10.6S). Estos últimos son sintetizados a partir del transcrito AChE-T con lo cual se comprueba la presencia de esta variante de splicing en los estudios hechos por RT/PCR (Massoulié y col., 2005). En la **Figura 16** se pueden apreciar las formas moleculares de AChE presentes en células Jurkat.

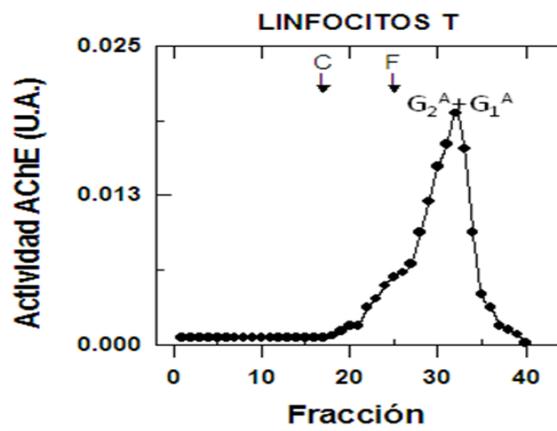


Figura 15. Análisis de formas moleculares de la AChE en linfocitos T normales obtenido por gradiente de densidad de sacarosa. Las formas moleculares correspondieron a G_2^A (5.2S) y G_1^A (3.5S), dímeros y monómeros anfifílicos. Los coeficientes de sedimentación de las formas moleculares de AChE se calcularon usando a la fosfatasa alcalina (6.1S, F) y catalasa (11.4S, C) como marcadores de sedimentación.

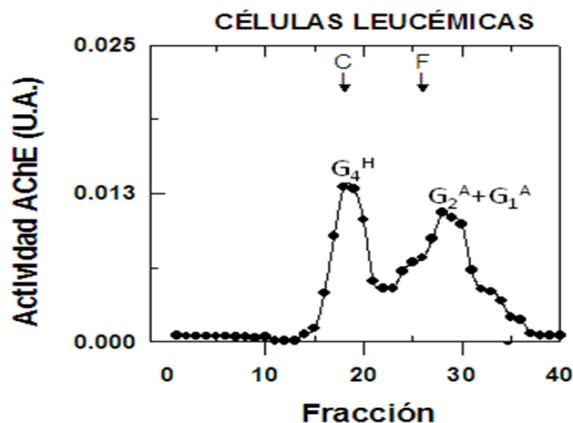


Figura 16. Análisis de formas moleculares de AChE en células leucémicas Jurkat. En el perfil se observan formas moleculares correspondientes a tetrameros hidrofílicos (G_4^H , 10.6S), dímeros anfifílicos (G_2^A , 5.2S) y monómeros anfifílicos (G_1^A , 3.5S). Las enzimas marcadoras para calcular el coeficiente de sedimentación fueron catalasa (11.4S, C) y fosfatasa alcalina (6.1S, F).

7 DISCUSIÓN

El aislamiento de linfocitos T por inmuno-separación magnética proporcionó un alto rendimiento de pureza ($97.21\% \pm 1.99$). El estudio por citometría de flujo fue una herramienta que permitió determinar el grado de pureza de los linfocitos T aislados, y aseguró que los análisis de expresión de AChE se realizaron específicamente sobre linfocitos T.

El empleo de anticuerpos dirigidos hacia el marcador de superficie CD3+ como parámetro para identificar a los linfocitos T se basa en que el antígeno de diferenciación CD3 es expresado por timocitos y células T maduras. Debido a esto el antígeno CD3 ha sido utilizado como un marcador temprano de la diferenciación de la célula T. CD3 está compuesto de 5 cadenas de polipéptidos; gamma, delta, epsilon, zeta y eta. La cadena zeta existe como un homodímero o un heterodímero con la cadena eta. El epitopo reconocido por CD3 MicroBeads está localizado en la cadena CD3 ϵ . CD3 MicroBeads ha sido utilizado para la selección positiva de las células T de sangre periférica, de cultivos celulares o de tejidos tumorales y linfoides. Las células aisladas han sido utilizadas para estudios como la infección por VIH, la citotoxicidad y la activación de las células T, las señales de transducción y la expresión de marcadores de superficie (Lorenzen y col., 1999; Pitti y col., 1998).

A partir de los linfocitos T purificados y de la línea celular leucémica Jurkat E6-1, se procedió a realizar el análisis de la expresión del gen AChE mediante RT-PCR. En el caso de los linfocitos T se pudieron detectar sólo transcritos AChE-H, y no se detectó la presencia de transcritos AChE-T o AChE-R. Informes previos en células de sangre periférica, incluyendo linfocitos y eritrocitos, han demostrado la presencia del transcrito AChE-H. Este transcrito es el responsable de la síntesis de las formas moleculares de AChE de dímeros y monómeros anfífilicos (G_2^A , G_1^A) anclados a la membrana plasmática por un enlace glicosilfosfatidilinositol (Pick y col., 2004).

En contraste, el análisis de los transcritos de AChE en células leucémicas Jurkat por RT/PCR permitió detectar transcritos AChE-H y la variante AChE-T, lo cual demuestra una alteración de la expresión del gen AChE en esta línea celular.

En estudios recientes realizados con microarreglos se ha observado, en células neuronales semi-diferenciadas P19, que una sobreexpresión de transcritos AChE-T esta asociada con un alto nivel de expresión de genes relacionados con la remoción alternativa de intrones como SC35, SRp20 y el factor de splicing CLK1, y de genes anti-apoptóticos como Bcl-2. Por otro lado se observa un bajo nivel en la expresión de genes pro-apoptóticos como Apaf-1 y Fas (Ben y col., 2006). En células Jurkat el transcrito AChE-T probablemente este participando en la proliferación celular regulando la expresión de agentes anti-apoptóticos y permitiendo que la célula sobreviva.

Los datos obtenidos en este trabajo revelan que las células Jurkat presentan una alteración en la actividad AChE, con respecto a los linfocitos T normales. Esto conduce a una notable disminución de la actividad específica de AChE en las células Jurkat con respecto a las células de referencia, relacionado en parte a un incremento en el contenido de proteínas.

En otros trabajos también se ha informado una menor actividad acetilcolinesterásica en células cancerosas con respecto a las células normales, es el caso del carcinoma de colon y cáncer de mama en nódulos linfáticos (Ruiz-Espejo y col., 2003; Montenegro y col., 2005). En el caso de los tumores en pulmón, la actividad de AChE disminuye con el aumento en la malignidad, que se ha relacionado con un incremento en los niveles de ACh en estas células (Martínez-Moreno y col., 2006). Soreq y colaboradores (1994) demostraron que la inhibición de la expresión del gen de AChE mediada, por un oligonucleótido antisentido, induce la expansión de progenitores hematopoyéticos.

Por otro lado, existe evidencia epidemiológica y estudios en ratas donde se ha observado que muchos pesticidas que son fuertes inhibidores de la AChE son carcinogénicos. Por mucho tiempo se ha sugerido que el empleo agrícola de insecticidas organofosforados están asociados con la generación de linfoma no Hodgkin y leucemia (Dich y col., 1997). Aunque el mecanismo molecular no es conocido, se ha mostrado que la exposición prolongada de pesticidas organofosforados en ratas puede inducir tumores en la glándula mamaria (Cabello y col., 2001).

Existen evidencias que afirman que la función de los linfocitos no sólo es regulada por el sistema de citocinas, sino que puede ser regulada por un sistema colinérgico linfoide independiente de los nervios colinérgicos. Los linfocitos expresan muchos de los componentes encontrados en el sistema nervioso, incluyendo a la acetilcolina, colina acetiltransferasa (ChAT), transportador de colina de alta afinidad, receptores muscarínicos y nicotínicos de ACh (mAChRs y nAChRs, respectivamente), y la acetilcolinesterasa (Kawashima y Fujii, 2004).

Se ha observado que al estimular los linfocitos T con fitohemaglutinina se activa el sistema colinérgico linfoide, como lo demuestra el aumento de la síntesis y liberación de ACh, y el incremento en la expresión de ChAT y los receptores de ACh. Se ha reportado que la ACh y los agonistas para mAChRs y nAChRs activan una variedad de efectos funcionales y bioquímicos en los linfocitos dentro de estos se pueden mencionar: el incremento en la fluidez de la membrana, la activación en la síntesis de inositol trifosfato (IP₃), el aumento en la expresión del gen *c-fos*, la activación de la síntesis de DNA, la activación de la síntesis de RNA y la activación de la proliferación celular. Estos descubrimientos apoyan firmemente que la ACh sintetizada y liberada desde los linfocitos T puede actuar regulando su función (Fujii, 2004; Kawashima y Fujii, 2003; Kawashima y Fujii, 2004).

La disminución de la actividad AChE puede dar lugar al incremento en el contenido de ACh presente en la célula al no ser hidrolizada. En el caso de las células leucémicas vemos que la actividad específica de AChE es mucho menor en comparación con la de los linfocitos T normales. Se ha reportado que los niveles de acetilcolina presentes en linfocitos T son mucho menores que los presentes en células Jurkat (Kawashima y Fujii, 2004), con lo cual se podría deducir, que al existir una deficiencia de hidrólisis de ACh por la disminución de la actividad específica de la AChE en las células leucémicas se produce un incremento de niveles de ACh, que conduce al incremento en la regulación de las funciones controladas por el sistema linfoide colinérgico incluyendo la activación en la proliferación celular (Kawashima y Fujii, 2003). En la **Figura 17** se muestra un modelo por el que se trata de explicar la inducción de la proliferación celular a través de los niveles de la ACh.

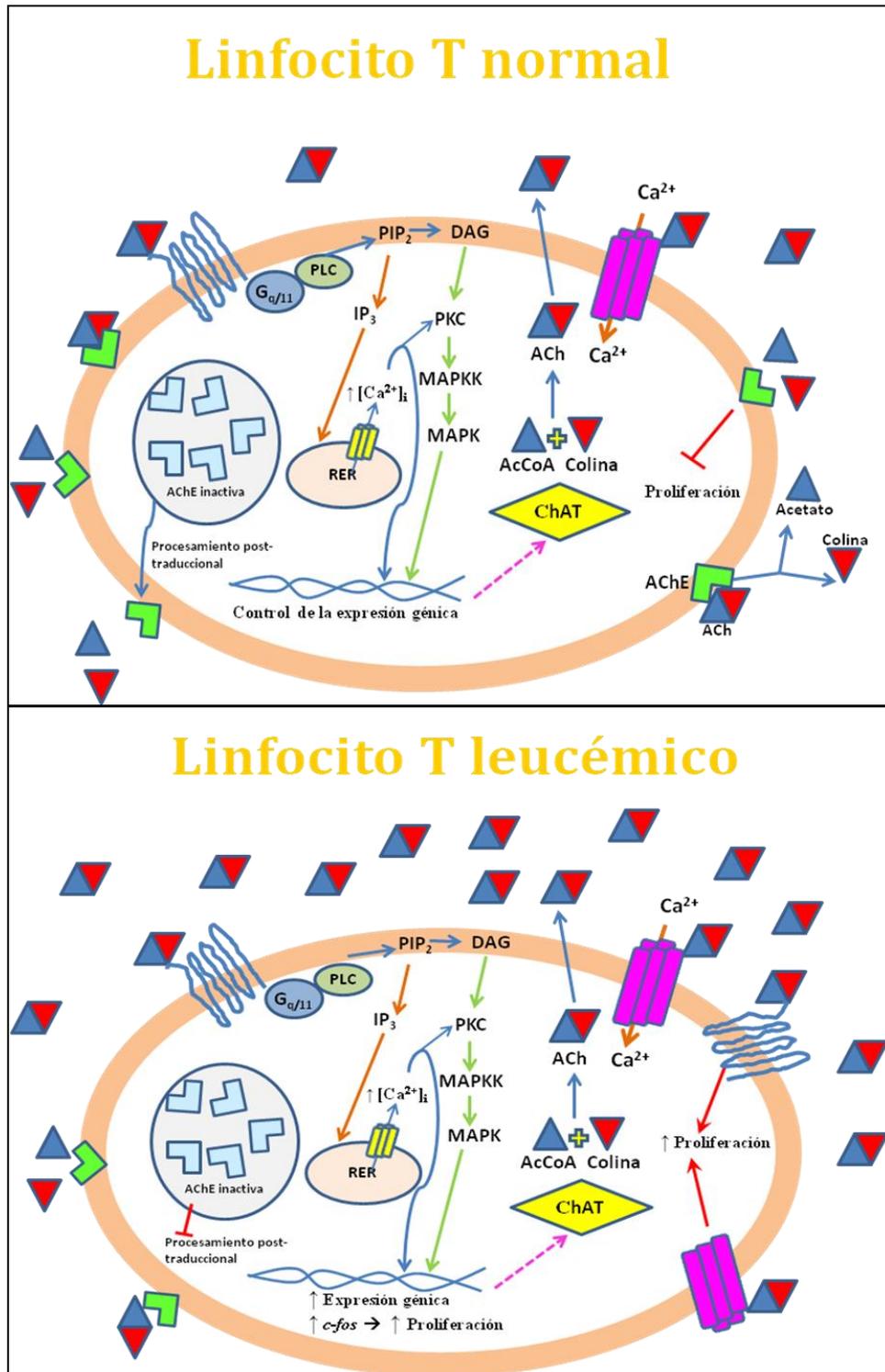


Figura 17. Modelo de la proliferación celular inducida por la acetilcolina. En la célula normal, la presencia de AChE hidroliza de manera eficaz el exceso de ACh regulando así su función. Mientras, que en la célula cancerosa, ocurre una alteración en el control colinérgico que conduce a una deficiencia en la hidrólisis de ACh por parte de la AChE que conlleva a un aumento en los niveles de ACh que sobreestiman los receptores nicotínicos y muscarínicos provocando la sobreactivación de la fosfolipasa C (PLC) y permitiendo el incremento en la concentración de calcio intracelular que provoca un aumento en la regulación de la expresión de *c-fos* que activa la proliferación celular.

Otro punto a resaltar es que en células leucémicas la AChE extraída con detergente presenta menor actividad con respecto a la extraída sin utilizar detergente, siendo que en linfocitos T normales la actividad de esta enzima es similar en ambas fracciones, lo que indica que existe mayor AChE no ligada o débilmente ligada a la membrana celular en células leucémicas.

El análisis de sedimentación de formas moleculares de AChE en linfocitos T mostró la presencia de formas moleculares correspondientes a dímeros y monómeros anfifílicos (G_2^A y G_1^A), los cuales están anclados a la membrana por GFI. Estos se originan a través de la expresión de los transcritos AChE-H (Massoulié y col., 2005; Pick y col., 2004). Esto comprueba la expresión de transcrito AChE-H detectada en este tipo celular.

Por otra parte, el análisis de sedimentación de formas moleculares de AChE en las células Jurkat mostró la presencia de dímeros y monómeros anfifílicos (G_2^A y G_1^A) y además tetrámeros hidrofílicos (G_4^H). Las formas moleculares encontradas en células Jurkat se confirmaron con la presencia de los transcritos AChE-H encargados de la síntesis de las formas AChE G_2^A y G_1^A , así como de expresión de transcritos AChE-T a partir de los cuales se da origen a la forma molecular de AChE G_4^H (Massoulié y col., 2005).

Algunos estudios muestran cambios en el ensamblado de las formas moleculares de la AChE en tejidos, en muchos de estos casos el ensamblado de la enzima cambia de manera tal, que las formas moleculares que se presentaban ya no se detectan, o se encuentran nuevas formas moleculares que normalmente las células no expresarían y de las cuales se desconoce la función que presentan en ese tipo celular (Montenegro y col., 2005).

En el caso de las células Jurkat, la célula tendería a contrarrestar los altos niveles de ACh y habría una alteración en su expresión de modo que se podrían sintetizar formas moleculares alternativas más eficientes de esta enzima como es el caso de los tetrámeros, lo que explicaría la detección de transcritos AChE-T y las formas moleculares de tetrámeros hidrofílicos en las células leucémicas.

En muchos estados patológicos inclusive el grado de alteración de la AChE se ve afectado a nivel de maduración post-traducciona, esto se ha podido evidenciar por la alteración que llega a presentar esta enzima en su patrón de glicosilación. (Martínez-Moreno y col., 2006; Ruiz-Espejo y col., 2002). Una herramienta útil para analizar alteraciones en el patrón de glicosilación de las proteínas en estados alterados de proliferación celular es mediante el empleo de las lectinas (Velan y col., 1993; Zanetta y col., 1981).

La interacción de extractos S1+S2 con lectinas de diferente especificidad mostró que la AChE aislada de linfocitos T presentó incorporación de glucosa (33%), manosa (66%), ácido siálico o galactosa (75%) y N-acetilglucosamina (63%) (**Figura 13**). En el caso de la AChE en células leucémicas, alrededor de un 66% presenta glucosa, un 72% presenta manosa, un 67% presenta galactosa o ácido siálico y un 67% presenta N-acetilglucosamina (**Figura 13**). La comparación de los patrones de glicosilación de la AChE en linfocitos T y células Jurkat mostró que existieron diferencias, lo que indica que la maduración de la AChE desde el retículo endoplasmático rugoso y las diferentes lamelas del aparato de Golgi se alteró en la línea celular leucémica.

Los estudios realizados aquí muestran que el contenido y composición de AChE están considerablemente alterados en las células leucémicas Jurkat, desde el cambio en el patrón de expresión de transcritos, pasando por la disminución en la actividad específica AChE, las diferencias en el procesamiento de los glicanos y la alteración en el ensamblado de las formas moleculares. Que abren la vía para explorar la posible participación de AChE en la proliferación y diferenciación de células linfoides.

En cuanto a la expresión de transcritos de AChE en tipos celulares transformados. Se ha observado que la variante AChE-R es expresada en células embrionarias y tumorales, y además es inducida en células maduras en respuesta a estrés y a una inhibición prolongada de la AChE (Kaufer y col., 1998; Meshorer y col., 2002; Perrier y col., 2005). Se ha mostrado que esta variante juega un papel activo en la proliferación y diferenciación en el sistema hematopoyético la cual puede promover la expansión mielopoyética y la trombopoyesis (Sternfeld y col., 2000; Deutsch y col., 2002).

En las células leucémicas Jurkat no fue detectada esta variante por lo que probablemente esta línea celular no exprese AChE-R, o la exprese en cantidades no detectables para el sistema de RT-PCR o en condiciones de cultivo diferentes a las utilizadas en este trabajo. Aún así, definitivamente hay marcadas diferencias en cuanto a la expresión de AChE entre células normales y células leucémicas.

La posible participación de AChE en el crecimiento, la apoptosis y la proliferación celular está actualmente bajo investigación, con lo que se espera que eventualmente nos pueda permitir el desarrollo de nuevas propuestas de terapia contra el cáncer. Cabe mencionar también que los futuros estudios de la expresión de AChE con muestras de pacientes con leucemia podrían permitir utilizar a la AChE como un medio de detección de leucemia.

8 CONCLUSIONES

- 1.- Los linfocitos T normales expresaron transcritos AChE-H, mientras que las células leucémicas Jurkat mostraron la expresión de transcritos AChE-H y AChE-T.
- 2.- Las células T normales y transformadas mostraron actividad AChE detectable, siendo mayor en los linfocitos T normales que en las células leucémicas Jurkat.
- 3.- Las células leucémicas mostraron diferente patrón de glicosilación de la AChE señalando una alteración en la maduración post-traducciona.
- 4.- Los linfocitos T normales generan dímeros y monómeros anfifílicos de AChE a partir de la expresión del transcrito AChE-H.
- 5.- Las células Jurkat generaron dímeros y monómeros anfifílicos a partir de la expresión del transcrito AChE-H y tetrameros hidrofílicos a partir de la expresión del transcrito AChE-T.
- 6.- En general, se puede considerar que en el estado alterado de proliferación ocurre una desregulación de la expresión del gen de la AChE que se ve reflejado en variaciones en el tipo de transcritos y sus respectivas formas moleculares.

9 BIBLIOGRAFÍA

- **Appleyard, M.E.** (1992). Secreted acetylcholinésterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci.* **15**: 485-490.
- **Azad, N., LaPaglia, N., Kirsteins, L., Uddin, S., Steiner, J., Williams, D.W., Lawrence, A.M. and Emanuele, N.V.** (1997) Jurkat cell proliferative activity is increased by luteinizing hormone-releasing hormone. *J Endocrinol.* **153**: 241-9.
- **Bartha, E., Rakonczay, Z., Kasa, P., Hollan, S. and Gyevai, A.** (1987). Molecular form of human lymphocyte membrane-bound acetylcholinésterase. *Life Sci.* **41**:1853-60
- **Ben-Ari, S., Toiber, D., Sas, A.S., Soreq, H. and Ben-Shaul, Y.** (2006). Modulated splicing-associated gene expression in P19 cells expressing distinct acetylcholinésterase splice variants. *J Neurochem.* **1**: 24-34
- **Bon, S., Huet, M., Lemonnier, M., Rieger, F. and Massoulié, J.** (1976). Molecular forms of *Electrophorus* acetylcholinésterase: molecular weight and composition. *Eur. J. Biochem.* **68**: 523-530.
- **Bradford, M.M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, **72**:248-254.
- **Brown, L.M., Blair, A., Gibson, R., Everett, G.D., Cantor, K.P., Schuman, L.M., Burmeister, L.F., Van Lier, S.F. and Dick, F.** (1990) Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* **50**: 6585-6591.
- **Cabello, G., Valenzuela, M., Vilaxa, A., Duran, V., Rudolph, I., Hrepic, N. and Calaf, G.** (2001) A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinésterase inhibition. *Environmental Health Perspectives.* **5**: 471-479.
- **Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M.T., Campoy, F.J. and Vidal, C.J.** (1994). G₄ forms of acetylcholinésterase and butyrylcholinésterase in normal and dystrophic mouse muscle differ in their interaction with *Ricinus communis* agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* **1225**: 283-288.
- **Campoy, F.J., Cabezas-Herrera, J. and Vidal, C.J.** (1992). Interaction of acetylcholinésterase with *Lens culinaris* agglutinin reveals differences in glycosylation of molecular forms in sarcoplasmic reticulum membrane subfractions. *J. Neurosci. Res.* **33**: 568-578.
- **Cantor K.P., Blair A. and Everett G.** (1992) Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* **52**: 2447-2455.
- **Chance, B. and Herbert, D.** (1950). Catalases and peroxidases. XIV. Enzyme-substrate compounds of bacterial catalase and peroxidases. *Biochem. J.* **46**: 402-414.

- **Checler, F., Grassi, J. and Vincent, J.P.** (1994). Cholinésterases display genuine arylacylamidase activity but are totally devoid of intrinsic peptidase activities. *J. Neurochem.* **62**: 756-763.
- **Cui, J.W., Wang, J., He, K., Jin, B.F., Wang, H.X., Li, W., Kang, L.H., Hu, M.R., Li, H.Y., Yu, M., Shen, B.F., Wang, G.J. and Zhang, X.M.** (2004) Proteomic analysis of human acute leukemia cells: insight into their classification. *Clin. Cancer Res.* **10**: 6887-6896.
- **Deutsch, V.R., Pick, M., Perry, C., Grisaru, D., Hemo, Y., Golan-Hadari, D., Grant, A., Eldor, A. and Soreq, H.** (2002). The stress-associated acetylcholinésterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Exp Hematol.* **10**: 1153-61.
- **Dich, J., Zahm, S.H., Hanberg, A. and Adami, H.O.** (1997) Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control* **8**: 420-443
- **Dori, A. y Soreq, H.** (2006). ARP, the cleavable C-terminal peptide of "readthrough" acetylcholinésterase, promotes neuronal development and plasticity. *J Mol Neurosci.* **28**: 247-55.
- **Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J. and Featherstone, R.M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinésterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
- **Finch, C.A., Harper, L.A. and Cook, J.D.** (1977). Kinetics of the formed elements of human blood. *Blood.* **50**: 699-705.
- **Fischer, K., Brown, J., Scherer, S.W., Schramm, P., Stewart, J., Fugazza, G., Pascheberg, U., Peter, W., Tsui, L.C., Lichter, P., Zhang, X., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J.P., He, H., Jin, Q., Guo, L., Alemany, M., Zhang, L. and Shi, Y.** (1998). Delineation of genomic regions in chromosome band 7q22 commonly deleted in myeloid leukemias. *Recent Results Cancer Res.* **144**: 46-52
- **Franchini G.** (1995). Molecular mechanisms of human T-cell leukaemia lymphotropic virus type I infection. *Blood.* **86**: 3619-3639.
- **Freshney, R. I.** (1987) Culture of animal cells: A manual of basic technique. Alan R. Liss, Inc., New York. 117
- **Froede, H.C. and Wilson, I.B.** (1970). Cholinésterases. En: *The enzymes.* pp 87-114. Edit. por Boyer, P.D. Academic Press, New York.
- **Fujii, T.** (2004). An independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its roles in regulation of immune function. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* **3**: 179-88.
- **García-Ayllón, M.S., Gómez, J.L. and Vidal, J.C.** (1999). Amphiphilic properties of acetylcholinésterase monomers in mouse plasma. *Neurosci. Lett* **265**: 211-214.

- **Garen, A. and Levinthal, C.** (1960). Fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **38**: 470-483.
- **Getman, D., Eubanks, J., Camp, S., Evans, G. and Taylor, P.** (1992). The human gene encoding AChE is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet* **51**: 170–177.
- **Givan, A.** (2001). Flow Cytometry: First Principles. *New York: Wiley-Liss.* 273p.
- **Goebel, D.J. and Pourcho, R.G.** (1992). Hydrolysis of substance P in the rabbit retina. 1. Involvement of acetylcholine and acetylcholinesterase: an *in vivo* study. *Neuropeptides* **21**: 21-33.
- **Grisaru, D., Pick, M., Perry, C., Sklan, E.H., Almog, R., Goldberg, I., Naparstek, E., Lessing, J.B., Soreq, H. and Deutsch, V.** (2006). Hydrolytic and nonenzymatic functions of acetylcholinesterase comodulate hemopoietic stress responses. *J Immunol.* **1**: 27-35.
- **Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D. and Soreq, H.** (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* **264**: 672–686.
- **Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S. and Soreq, H.** (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature.* **393**: 373-377.
- **Kawashima, K. and Fujii, T.** (2004). Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci.* **9**: 2063-85.
- **Kawashima, K. and Fujii, T.** (2003). The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci.* **19**: 2101-9.
- **Kersey, J.H.** (1997). Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood.* **90**: 4243-4251.
- **Kruk, J. and Aboul-Enein H.Y.** (2003) Occupational physical activity and the risk of breast cancer. *Cancer Detection Prevention.* **27**: 187-192.
- **Lev-Lehman, E., Ginzberg, D., Honreich, G., Erlich, G., Meshorer, A., Eckstein, F., Soreq, H. and Zakut, H.** (1994). Antisense inhibition of acetylcholinesterase gene expression cause transient hematopoietic alterations *in vivo*. *Gene Ther.* **2**: 1-9.
- **Li, Q. and Kawada, T.** (2006). The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells. *Cell Mol Immunol.* **3**: 171-178
- **Lorenzen, D.R., Düx, F., Wölk, U., Tsirpouchtsidis, A., Haas, G. and Meyer, T.F.** (1999). Immunoglobulin A1 Protease, an Exoenzyme of Pathogenic Neisseriae, Is a Potent Inducer of Proinflammatory Cytokines. *J. Exp. Med.* **190**: 1049–1058

- **Lu, C., Knutson, D.E., Fisker-Andersen, J. and Fenske, R.A.** (2001). Biological Monitoring of Organophosphorus Pesticide Exposure among Pre-School Children in the Seattle Metropolitan Area, *Environmental Health Perspectives*. **109**: 299-303.
- **Main, A.R.** (1979). Mode of action of anticholinésterases. *Pharmac. Ther.* **6**: 579-628.
- **Martin, R.G. and Ames, B.N.** (1961). A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes. Applications to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* **236**: 1372-1379.
- **Martínez-Moreno, P., Nieto-Ceron, S., Torres-Lanzas, J., Ruiz-Espejo, F., Tovar-Zapata, I., Martínez-Hernandez, P., Rodríguez-Lopez, J.N., Vidal, C.J. and Cabezas-Herrera, J.** (2006). Cholinésterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. *Carcinogenesis*. **3**: 429-36.
- **Masson, P., Froment, M.T., Fortier, P.L., Visicchio, J.E., Bartels, C.F. and Lockridge, O.** (1998). Butyrylcholinésterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged éster, and aspirin-related neutral ésters. *Biochim. Biophys Acta* **1387**: 41-52.
- **Massoulié, J., Bon, S., Perrier, N., Falasca, C.** (2005). The C-terminal peptides of acetylcholinésterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact.* **158**: 3-14.
- **Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. and Vallette, F.M.** (1993). Molecular and cellular biology of cholinésterases. *Prog. Neurobiol.* **41**: 31-91.
- **Massoulié, J. and Bon, S.** (1982). The molecular forms of cholinésterases and acetylcholinésterase in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **5**: 57-106.
- **Meshorer, E., Erb, C., Gazit, R., Pavlovsky, L., Kaufer, D., Friedman, A., Glick, D., Ben-Arie, N. and Soreq, H.** (2002). Alternative splicing and neuritic RNAm translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science* **295**: 508-512.
- **MacPherson, M.J. and Moller, S.G.** (2000) *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- **Montenegro, M.F., Nieto-Cerón, S., Ruiz-Espejo, F., Páez de la Cadena, M., Rodríguez-Berrocal, F.J. and Vidal, C.J.** (2005). Cholinésterase activity and enzyme components in healthy and cancerous human colorectal sections. *Chem Biol Interact.* **158**: 429-30.
- **Mössner, E., Boll, M. and Pfeleiderer, G.** (1980). Purification of human and bovine alkaline phosphatases by affinity chromatography. *Z. Physiol. Chem.* **361**: 543-549.
- **Mor, I., Sklan, E.H., Podoly, E., Pick, M., Kirschner, M., Yogev, L., Itach, S.B., Schreiber, L., Geyer, B., Mor, T., Grisaru, D. and Soreq H.** (2008). Acetylcholinésterase-R increases germ cell apoptosis but enhances sperm motility. *J Cell Mol Med.*

- **Neville, P.J., Thomas, N. and 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**: 345-349
- **Onganer, P.U., Djamgoz, M.B., Whyte, K. and Greenfield, S.A.** (2006). An acetylcholinesterase-derived peptide inhibits endocytic membrane activity in a human metastatic breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta.* **3**: 415-20
- **Owens, M.A., Loken, M.R.** (1995). Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice. *New York: Wiley-Liss.* 288p.
- **Padilla, S.** (1995). Regulatory and research issues related to cholinesterase inhibitor. *Toxicology.* **102**: 215-220.
- **Perrier, N.A., Salani, M., Falasca, C., Bon, S., Augusti-Tocco, G. and Massoulie, J.** (2005). The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *J Neurochem.* **94**: 629-38.
- **Perry, C., Sklan, E.H., Birikh, K., Shapira, M., Trejo, L., Eldor, A. and Soreq, H.** (2002). Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors. *Oncogene.* **55**: 8428-41
- **Pick, M., Flores-Flores, C., Grisaru, D., Shochata, S., Deutschb, V. and Soreq H.** (2004). Blood-cell-specific acetylcholinesterase splice variations under changing stimuli. *Int. J. Devl Neuroscience.* **22**: 523-531
- **Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., Godowski, P.J., Wood, W.I., Gurney, A.L., Hillan, K.J., Cohen, R.L., Goddard, A.D., Botstein, D. and Ashkenazi, A.** (1998). Genomic Amplification of a Decoy Receptor for Fas Ligand in Lung and Colon Cancer. *Nature* **396**: 699–703. [517]
- **Recktenwald, D.J.** (1993). Introduction to Flow Cytometry: Principles, Fluorochromes, Instrument Set-Up, Calibration. *J Hematotherapy* **2(3)**: 387-94.
- **Rizo-Ríos, P., Sánchez-Cervantes, F., González-Rivera, A., Betancourt-Cravioto, M., Meneses-García, A. y Mohar, A.** (2005). Mortalidad por leucemias en menores de 20 años: México 1998-2002. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **62**: 9-18.
- **Rolo, F., Blanco, M., M, Jorge., Caballero, A. y Díaz, H.** (1997) Confirmación de la presencia en Cuba del virus linfotrópico tipo I de las células T humanas mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop.* **49**: 204-208.
- **Rosenberry, T.L. and Richardson, J.M.** (1977). Structure of 18S and 14S acetylcholinesterase. Identification of collagen-like subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits. *Biochemistry* **16**: 3550-3558.
- **Rudd, P.M. and Dwek, R.A.** (1997). Glycosylation and 3D structure of proteins. *Clin Rev. Biochem. Mol. Biol.* **32**: 1-100.

- **Ruiz-Espejo, F., Cabezas-Herrera, J., Illana, J., Campoy, F.J., Muñoz-Delgado, E. and Vidal, C.J.** (2003). Breast cancer metastasis alters acetylcholinésterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. *Breast Cancer Research and Treatment* **80**: 105–114.
- **Ruiz-Espejo, F., Cabezas-Herrera, J., Illana, J., Campoy, F.J. and Vidal, C.J.** (2002). Cholinésterase activity and acetylcholinésterase glycosylation are altered in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **1**: 11-22.
- **Sáez-Valero, J. and Vidal, C.J.** (1996). Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinésterase in human meningioma. *Biochim. Biophys. Acta* **1317**: 210-218.
- **Sáez-Valero, J., Tornel, P.L., Muñoz-Delgado, E. and Vidal, C.J.** (1993). Amphiphilic and hydrophilic forms of acetyl- and butyrylcholinésterase in human brain. *J. Neurosci. Res.* **35**: 678-689.
- **Sánchez-Chávez, G., Vidal, C.J. and Salceda, R.** (1995). Acetyl- and butyrylcholinésterase activities in the rat retina and retinal pigment epithelium. *J. Neurosci. Res.* **41**: 655-662.
- **Schlossman, S., L. Boumsell, and W. Gilks.** (1995). Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York.
- **Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S.S., Friedmann, T. and Taylor, P.** (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinésterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* **319**: 407-409.
- **Schwarz, M., Glick, D., Loewenstein, Y. and Soreq, H.** (1995). Engineering of human cholinésterase explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmac. Ther.* **67**: 283-322.
- **Sine, J.P. and Caye-Vaugien, C.** (1984). Properties and characterization of soluble forms of lymphocyte acetylcholinésterase from an ox. *Biochimie.* **66**: 203-14.
- **Soreq, H. and Seidman, S.** (2001). Acetylcholinésterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* **4**: 294–302.
- **Soreq, H., Patinkin, D., Lev-Lehman, E., Grifman, M., Ginzberg, D., Eckstein, F. and Zakut, H.** (1994). Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinésterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7907-7911
- **Soreq, H., Ehrlich, G., Lapidot-Lifson, Y., Gnatt, A., Neville, L., Ben-Aziz, R., Seidman, S., Ginzberg, D. and Zakut, H.** (1992). Amplification and mutagenesis of the acetylcholinésterase and butyrylcholinésterase genes in primary human tumors. En: *Gene amplification in mammalian cells*, pg. 417-428. Edit. por R.E. Kellern. Marcel Dekker Inc., New York.

- **Soreq, H., Ben Aziz, R., Prody, C.A., Seidman, S., Gnatt, A., Neville, L., Lieman-Hurwitz, J., Lev-Lehman, E., Ginzberg, D., Lipidot-Lifson, Y. and Zakut, H.** (1990) Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinésterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**: 9688-9692.
- **Sternfeld, M., Shoham, S., Klein, O., Flores-Flores, C., Evron, T., Idelson, G.H., Kitsberg, D., Patrick, J.W. and Soreq, H.** (2000). Excess "read-through" acetylcholinésterase attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates. *Proc Natl Acad Sci USA*. **15**: 8647-52.
- **Stieger, S. and Brodbeck, U.** (1985). Amphiphilic detergent-soluble acetylcholinésterase from *Torpedo marmorata*: characterization and conversion by proteolysis to in hydrophilic form. *J. Neurochem.* **44**: 48-56.
- **Stopford, W.** (1990). Industrial Toxicology: Safety and health applications in the workplace. 11 (The toxic effects of pesticides) *Ed. Phillop L. Williams and James L. Burson.*
- **Taylor, P. and Radic, Z.** (1994). The cholinésterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**: 281-320.
- **Toutant, JP., Richards, MK., Krall, J.A. and Rosenberry, T.L.** (1990). Molecular forms of acetylcholinésterase in two sublines of human erythroleukemia K562 cells. Sensitivity or resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C and biosynthesis. *Eur J Biochem.* **1**: 31-8.
- **Uckun, F.M., Sensel, M.G., Waddick, K.G., Sun, L., Steinherz, P.G., Trigg, M.E., Heerema, N.A., Sather, H.N., Reaman, G.H. and Gaynon, P.S.** (1998) Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **91**: 735-746.
- **Uckun, F., Reaman, G., Steinherz, P., Arthur, D., Sather, H., Trigg, M., Tubergen, D. and Gaynon, P.** (1996) Improved outcome for children with T-lineage acute lymphoblastic leukemia after contemporary chemotherapy: A children's cancer group study. *Leuk Lymphoma* **24**: 57
- **Velan, B., Kronman, C., Ordentlich, A., Flashner, Y., Leitner, M., Cohen, S. and Shafferman, A.** (1993). N-glycosylation of human acetylcholinésterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochem. J.* **296**: 649-656.
- **Vidal, C.J.** (2005). Expression of cholinésterases in brain and non-brain tumours. *Chem Biol Interact.* **15**;157-158:227-232.
- **Vigny, M., Bon, S., Massoulié, J. and Gisiger, V.** (1979). The subunit structure of mammalian acetylcholinésterase: catalytic subunits, dissociating effect of proteolysis and disulfide reduction on the polymeric forms. *J. Neurochem.* **33**: 559-565.
- **Woessner, S. and Florensa, L.** (2001): Introducción al estudio de las leucemias agudas. Clasificación descripción de las variedades. Formas especiales. Sana-Sabrafen J, Besses C, Vives J.L. Hemtología clínica. 4ªEd. Pag 345-365.

- **Zakut, H., Ehrlich, G., Ayalon, A., Prody, C.A., Malinger, G., Seidman, S., Ginzberg, D., Kehlenbach, R. and Soreq, H.** (1990). Acetylcholinésterase and butyrylcholinésterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. *J. Clin. Invest.* **86**: 900-908.
- **Zanetta, J.P., Rakonczay, Z., Reeber, A., Kása, P. and Vicendon, G.** (1981). Antibodies against the membrane-bound acetylcholinésterase from adult rat brain. *FEBS Lett.* **129**: 293-296.
- **Zeng, W.R., Watson, P., Lin, J., Jothy, S., Lidereau, R., Park, M. and Nepveu, A.** (1999). Refined mapping of the region of loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 7 in human breast cancer defines the location of a second tumor suppressor gene at 7q22 in the region of the CUTL1 gene. *Oncogene.* **18**: 2015-2021
- **Zheng, T., Zahm, S.H., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Zhang, Y. and Blair, A.** (2001). Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-Hodgkin lymphoma. *J Occup Environ Med.* **7**: 641–649.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada EXPRESIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA EN LINFOCITOS T HUMANOS NORMALES Y EN CÉLULAS LEUCÉMICAS con fecha del 18 de abril del 2008.



(Presidente)

Dr. José Luis Gómez Olivares
Dpto. de Ciencias de la Salud, UAM-I



(Secretaria)

Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Instituto de Fisiología Celular, UNAM



(Vocal)

Dra. Patricia Pérez Vera
Instituto Nacional de Pediatría



(Vocal)

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés
Facultad de Estudios Superiores, Iztacala