



**Universidad Autónoma Metropolitana  
Iztapalapa**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD**

**MAESTRÍA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**“Actividad y glicosilación de las colinesterasas en ratones  
con hígado graso no alcohólico”**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**Maestro en Biología Experimental**

Presenta:

**Biól. Exp. Ivis Ibrahim Morales Arroyo**

**Director Dr. José Luis Gómez Olivares**  
**Asesora Interna Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**  
**Asesora Externa Dra. Karla Guadalupe Carbajal Aguilera**

**México, D.F. DICIEMBRE, 2013**



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00119

Matricula: 2113801435

ACTIVIDAD Y GLICOSILACION DE LAS COLINESTERASAS EN RATONES CON HIGADO GRASO NO ALCOHOLICO

En México, D.F., se presentaron a las 9:00 horas del día 2 del mes de diciembre del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ  
DR. HECTOR FERNANDO SERRANO  
DR. NOE SALINAS ARREORTUA  
DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA



IVIS IBRAHIM MORALES ARROYO  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: IVIS IBRAHIM MORALES ARROYO

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

*Aprobar*

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

VOCAL

DR. NOE SALINAS ARREORTUA

SECRETARIA

DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

## **COMITÉ TUTORAL**

### **DIRECTOR**

**Dr. José Luis Gómez Olivares**

Profesor Titular C

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Correo electrónico: [gool@xanum.uam.mx](mailto:gool@xanum.uam.mx)

### **ASESORA INTERNA**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**

Profesora Titular C

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo electrónico: [mcgr@xanum.uam.mx](mailto:mcgr@xanum.uam.mx)

### **ASESORA EXTERNA**

**Dra. Karla Guadalupe Carbajal Aguilera**

Laboratorio de Nutrición Experimental

Instituto Nacional de Pediatría

Secretaría de Salud

Correo electrónico: [kala\\_ca@yahoo.com](mailto:kala_ca@yahoo.com)

***La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está evaluada como posgrado de alto nivel en el programa nacional de posgrado del CONACyT.***

***Agradecimientos a CONACyT por los apoyos obtenidos en el posgrado de la 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: 266033***

*El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Biomembranas y de Bioquímica y Fisiología Celular en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la Dirección de:*

*Director: Dr. José Luis Gómez Olivares*

*Asesora interna: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz,*

*Asesora externa: Dra: Karla Guadalupe Carbajal Aguilera*

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

Los miembros del jurado designados por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Actividad y glicosilación de las colinesterasas en ratones con hígado graso no alcohólico" que presento

**Ivis Ibrahim Morales Arroyo**

El día 2 de Diciembre del 2013.

**Presidenta**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**

Profesora Titular C

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo electrónico: [mcgr@xanum.uam.mx](mailto:mcgr@xanum.uam.mx)



**Secretaria**

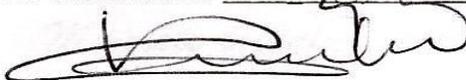
**Dra. Karla Guadalupe Carbajal Aguilera**

Laboratorio de Nutrición Experimental

Instituto Nacional de Pediatría

Secretaría de Salud

Correo electrónico: [karla\\_ca@yahoo.com](mailto:karla_ca@yahoo.com)



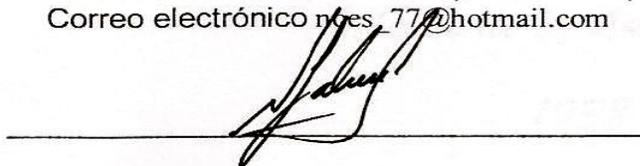
**Vocal**

**Dr. Noé Salinas Arreortua**

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Correo electrónico: [nes\\_77@hotmail.com](mailto:nes_77@hotmail.com)



**Vocal**

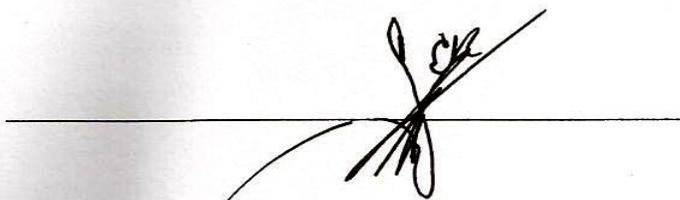
**Dr. Héctor Fernando Serrano**

Laboratorio de Biología Molecular y Regulación Endócrina

Intra-gonadal.

Depto. De Ciencias de la Salud, DCBS.UAM-I

[hser@xanum.uam.mx](mailto:hser@xanum.uam.mx)



*Este trabajo está dedicado a mi abuela:*

*Gracias por haberme abrazado confortablemente.*

*Me viste triunfar, me viste caer, me animaste*

*y me mantuviste fuerte.*

*María de la Luz Cruz Gómez*

*1938-2013*



## RESUMEN

El hígado puede contener grasa y mantener su funcionalidad, diversas lesiones también pueden aumentar la infiltración de grasa que conduce a enfermedades del hígado graso de origen no alcohólico (EHGNA). La acumulación de grasa en el hígado puede ser inducida por una dieta hipercolesterolémica, el colesterol es importante porque promueve la sensibilización de los estímulos citotóxicos.

En los mamíferos, el hígado tiene la capacidad de sintetizar colinesterasas (ChE) y es la fuente de butirilcolinesterasa que circula en el plasma. El ChE son glicoproteínas que tienen múltiples sitios para la N-glicosilación. La adición y / o reordenamiento de los azúcares es un proceso importante en la estructura tridimensional y las capacidades funcionales de las ChE.

### Objetivo

El propósito de este estudio fue estimar la actividad acetil y butirilcolinesterasa y su glicosilación en la enfermedad de hígado graso no alcohólico en ratones alimentados con una dieta alta en colesterol.

### Resultados

Una dieta alta en colesterol provoca un aumento en el colesterol y una disminución en el contenido de triacilglicerol en plasma. La actividad específica de la acetilcolinesterasa es mayor en los ratones hipercolesterolémicos (HC) en comparación con los ratones control. La actividad específica de BChE en ratones hipercolesterolémicos son significativamente más bajos en comparación con los valores estimados en el hígado de ratones control.

El perfil de glicosilación de las colinesterasas se realizó con lectinas de diferentes especificidad en el hígado, el cual fue modificado por la dieta hipercolesterolémica.

#### Conclusion

La infiltración grasa del hígado causa una alteración en la actividad y / o la estructura de ambas colinesterasas, siendo AChE el más alterado. La alteración estructural-funcional podría estar asociado con el procesamiento post-traducciona anormal. Para BChE, disminución del nivel de actividad sugiere una asociación con el síndrome metabólico, la diabetes, la hipertensión, la hiperlipidemia y / o esteatosis hepática

## **ABSTRACT**

The liver may contain fat and maintain their functionality; various injuries can also increase fat infiltration leading to fatty liver diseases of non-alcoholic origin (NAFLD). Fat liver accumulation can be induced by a hypercholesterolemic diet, cholesterol is important because it promotes awareness of cytotoxic stimuli.

In mammals, the liver has the ability to synthesize cholinesterases (ChEs) and is the source of butyrylcholinesterase circulating in the plasma.

The ChEs are glycoproteins having multiple sites for N-glycosylation. The addition and / or rearrangement of sugars is an important process in the three dimensional structure and functional capabilities of ChEs

### Objective

The purpose of this study was to estimate the acetyl- and butyrylcholinesterase activities and its glycosylation in non-alcoholic fatty liver disease in mice

### Results

A high cholesterol diet cause an increase in cholesterol and a decrease in plasma triacylglycerol content

Specific activity of acetylcholinesterase is higher in hypercholesterolemic (HC) mice compared to control mice livers

Specific activity of butyrylcholinesterase in hypercholesterolemic mice is significantly lower compared to values estimated in control mice livers.

Glycosylation profile from liver cholinesterases with different lectins specificity is modified by hypercholesterolemic diet, and did not show a time-dependent behavior.

### Conclusion

Fat liver infiltration causes an alteration in the activity and/or structure of both cholinesterases, being AChE the most altered. The structural-functional alteration could be associated to abnormal post-translational processing. For BChE, activity level decreases suggest an association with metabolic syndrome, diabetes, hypertension, hyperlipidemia and/or hepatic steatosis.

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>1a. Estructura del hígado en el ratón .....</b>	<b>15</b>
<b>1b. Hígado y sus funciones metabólicas .....</b>	<b>21</b>
<b>1c. Metabolismo hepático de los carbohidratos .....</b>	<b>22</b>
<b>1d. Metabolismo hepático de las proteínas .....</b>	<b>22</b>
<b>1e. Metabolismo hepático de los lípidos .....</b>	<b>23</b>
<b>1f. Colesterol y funciones biológicas.....</b>	<b>23</b>
<b>1f.1. Estructura y propiedades químicas del colesterol .....</b>	<b>23</b>
<b>1f.2. Localización y función tisular del colesterol .....</b>	<b>24</b>
<b>1f.3. Componente estructural de las membranas biológicas .....</b>	<b>25</b>
<b>1f.4 Regulación, síntesis y transporte de colesterol.....</b>	<b>27</b>
<b>1f.5 Regulación trascricional de los niveles de colesterol .....</b>	<b>33</b>
<b>1f.6 Transporte intracelular de colesterol .....</b>	<b>34</b>
<b>1g Hígado graso no alcohólico.....</b>	<b>37</b>
<b>1h Las propiedades generales de las colinesterasas.....</b>	<b>38</b>
<b>1h.1. Gen acetilcolinesterasa y su expresión proteica en el ratón .....</b>	<b>39</b>
<b>1h.2. Funciones clásicas y no clásicas de la proteína acetilcolinesterasa ....</b>	<b>43</b>
<b>1h.3. Gen de la butirilcolinesterasa y su expresión en el ratón .....</b>	<b>46</b>
<b>1h.4. Función colinérgica y no colinérgica de la butirilcolinesterasa .....</b>	<b>48</b>

1i Glicosilación de las colinesterasas y su implicación estructural .....	49
1i.1. Lectinas como una herramienta experimental en el estudio de la glicosilación .....	50
2. ANTECEDENTES .....	52
2a. Colinesterasas en el hígado de mamíferos .....	54
3. JUSTIFICACIÓN .....	54
4. PREGUNTA .....	57
5. HIPÓTESIS .....	57
6. OBJETIVO GENERAL .....	57
7. OBJETIVOS PARTICULARES .....	57
8. METODOLOGÍA .....	58
8a. Administración de dieta hipercolesterolémica.....	58
8b. Procedimiento de perfusión de los ratones .....	59
8c. Análisis de parámetros bioquímicos en suero de ratones .....	60
8d. Disección del hígado de ratones.....	60
8e. Método secuencial de extracción de las colinesterasas .....	60
8f. Determinación de la actividad colinesterásica .....	61
8g. Determinación del contenido de total de proteínas.....	63
8h. Método de Lowry .....	64

8i. Análisis de la glicosilación de procesamiento post-traducciona	64
8i. Análisis de la glicosilación de procesamiento post-traducciona de las colinesterasas mediante la interacción con lectinas de distinta especificidad .....	64
9. RESULTADOS.....	66
9a. Determinación de peso corporal y del hígado de ratones tratados con la dieta HC y no tratados.....	66
9b. Determinación del contenido de proteínas totales en hígado de ratón de la capa C57BL/6 alimentados con dieta hipercolesterolémica experimental .....	68
9c. Actividad colinesterásica.....	70
9d. Estudio del procesamiento post-traducciona de las colinesterasas mediante la interacción con lectinas .....	75
10. DISCUSIÓN .....	83
11. CONCLUSIONES.....	97
12 BIBLIOGRAFÍA .....	100

# 1. INTRODUCCIÓN

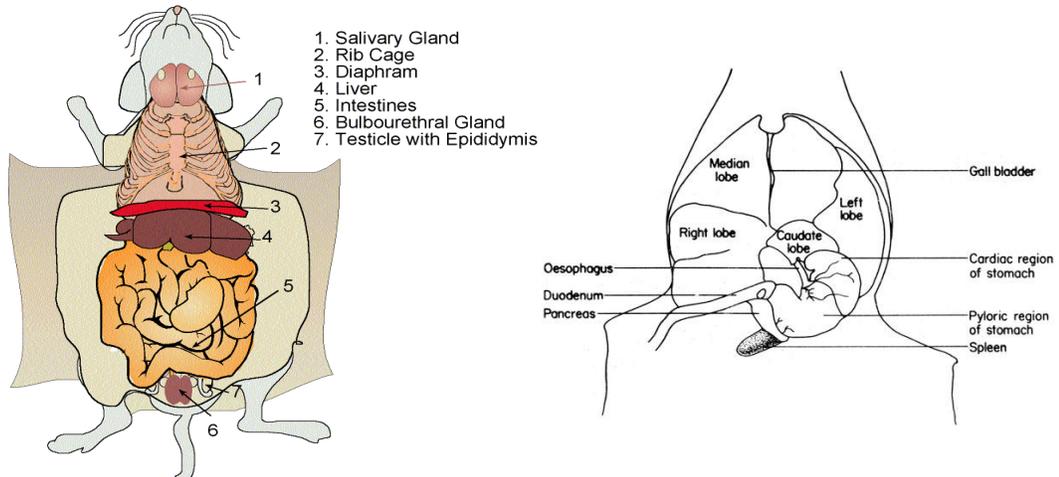
## 1a. Estructura del hígado en el ratón

El hígado del ratón pesa aproximadamente 2g, se extiende por toda la región subdiafragmática y se divide en cuatro lóbulos principales: lóbulo caudal (situado dorsal y ventral al esófago), lóbulo lateral (dividido horizontalmente en porciones anterior y posterior), lóbulo medio (subdividido en porciones de izquierda y derecha), y el lóbulo lateral izquierdo (Hedrich y Bullock, 2004), El lóbulo lateral derecho tiene un septo transversal que lo divide en dos. El lóbulo medio se localiza más ventralmente y es el lóbulo más prominente de la cavidad abdominal, es visto generalmente, desde el aspecto ventral. Sus dos alas piriformes conectadas por un estrecho istmo central están presentes bajo el lóbulo medio, y éstos producen el saco ventral de la vesícula biliar. El lóbulo izquierdo es el más grande y es un sitio frecuente de muestreo para histología. El lóbulo caudado es pequeño y tiene dos segmentos distintos en forma de oreja (Figura 1) (Martins and P. Neuhaus, 2007).

Se han realizado múltiples investigaciones sobre la organización y constituyentes celulares del hígado en los mamíferos, algunas de ellas en el hígado humano, y con una importancia sobresaliente en los animales de experimentación. (Sarema. 2006).

En las especies estudiadas se ha demostrado que el hígado está compuesto de diferentes poblaciones celulares, que incluyen: las células del parénquima, los hepatocitos, y una variedad de células no parenquimatosas residentes, como una población de macrófagos denominados células de Kupffer, células almacenadoras de

grasa conocidas como células Ito o estelares y (Wake., 2004; Kawada, 1992) células endoteliales.

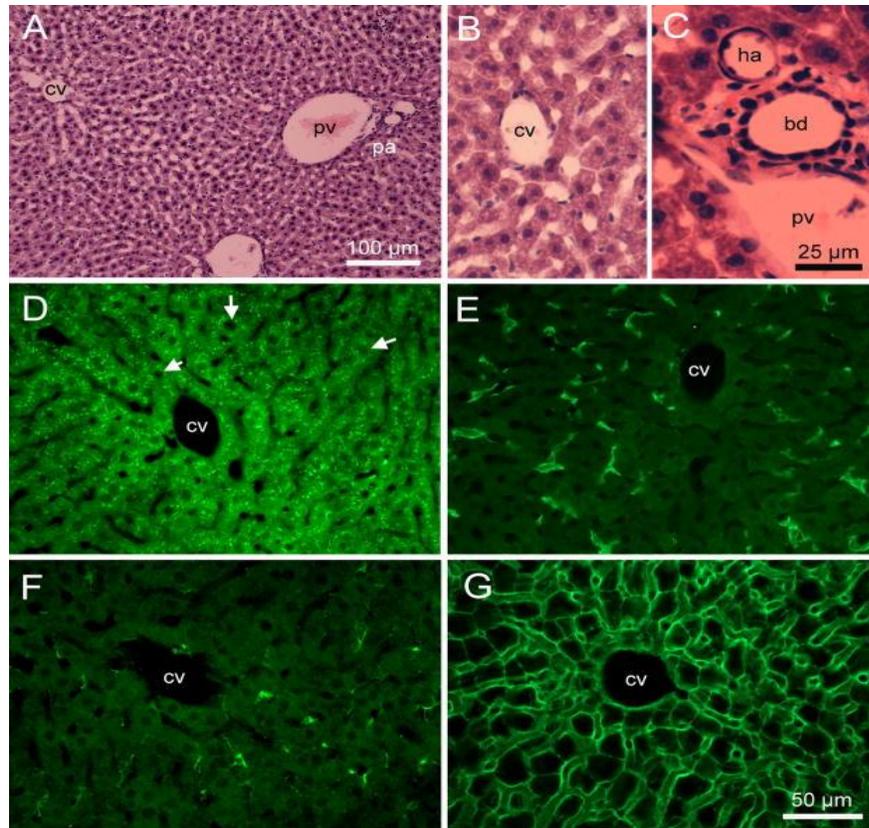


**Figura 1. La localización y la estructura anatómica del hígado en el ratón.** Lado Izquierdo: se muestra la disposición anatómica del hígado en la región abdominal del ratón. Lado derecho: se muestra la distribución de los lóbulos en el hígado de ratón.

Los ratones se han utilizado en varios estudios para resolver preguntas sobre la estructura y función del hígado. Se han empleado los análisis de cortes histológicos de hígado de ratón teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) donde se ha podido resaltar que los patrones de distribución tisular de tipos los celulares específicos, son similares a los informados en otras especies de mamíferos (Kawada, 1992; Wake, 2004; Sarema, 2006).

En los análisis histológicos de hígado de ratón, se ha logrado evidenciar una estructura lobular hepática. Se ha observado que las áreas portales muestran elementos de una tríada hepática, esto es uno o más pequeñas ramificaciones pequeñas de la vena porta, una ramificación de la vena hepática y un pequeño

conducto biliar, con vasos linfáticos y un bajo contenido de tejido conectivo (Figura 2).



**Figura 2. Los componentes celulares en el hígado de ratón. A:** Imagen de un corte teñido con H-E en campo brillante, donde se muestra la arquitectura de hígado normal y los componentes de los lóbulos en el hígado, con área portal y vénula central. **B:** Amplificación de corte teñido con H-E. **C:** Imagen de campo brillante muestra perfiles en un área portal, incluyendo la rama de la vena porta (pv), rama de la arteria hepática (ha) y un ducto pequeño biliar (bd). **D:** Inmunolocalización de albúmina en los hepatocitos, reflejando una distribución perinuclear (flechas blancas). **E:** Inmunolocalización del antígeno F4-80 en supuestas células de Kupffer. **F:** Inmunolocalización de GFAP para células Ito. **G:** Marcaje fluorescente con lectina de tomate para detectar a las células endoteliales de los capilares sinusoidales. CV: vénula central; PA: área portal; PV: portal vénula. Barra de calibración en 'A' = 100  $\mu$ m; bar en 'C' = 25 $\mu$ m; bar en 'G' = 50  $\mu$ m para 'B' y había ' - 'G'. (Imagen tomada de Baratta et al., 2009).

La presencia de vénulas centrales a lo largo de las áreas portales proporcionan una evidencia de una estructura lobular. Las células hepáticas están arregladas en placas o cordones, y se observan radiando desde las regiones de las vénulas centrales (Figura. 2A, 2B, 2D) y se extienden hacia las áreas portales. Los cordones celulares están separados por los capilares sinusoidales (Figura 2G). El tejido hepático procesado con H-E ha revelado núcleos de formas variadas. Muchas células muestran núcleos redondos grandes a ligeramente ovales.

El hígado posee la capacidad de sintetizar una gran cantidad de proteínas de secreción que participan en una amplia variedad de funciones. En los hepatocitos, el RER se encarga de la síntesis de albúmina, fibrinógeno y diversas proteínas mediadoras de reacciones inflamatorias y de la coagulación sanguínea. En el RE se da el depósito de glucógeno, conjugación de bilirrubina, esterificación de ácidos grasos, glucogenolisis, síntesis de colesterol y de ácidos biliares, metabolismo de lípidos y de sustancias liposolubles, de esteroides y de fármacos como barbitúricos, alcohol y tabaco (Baratta et al., 2009).

El Complejo de Golgi realiza el transporte de lípidos hacia el plasma, tiene actividad fosfatasa ácida catabólica, participa en el procesamiento post-traducciona l de glicoproteínas y promueve la adición de carbohidratos a las lipoproteínas. Los lisosomas presentan actividad de la fosfatasa ácida, además de poseer algunas decenas de enzimas hidrolíticas responsables del catabolismo de cuerpos extraños, elementos sanguíneos envejecidos y depositar hierro. Los peroxisomas metabolizan las purinas, los lípidos, el alcohol y el peróxido de hidrogeno, participan en la

gluconeogenesis, en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. Baratta et al., 2009)

Los macrófagos derivados de monocitos se encuentran en prácticamente todos los órganos y tejidos de los mamíferos y comprenden el sistema retículo-endotelial difuso. En el hígado, estos macrófagos se denominan células de Kupffer descritas por Von Kupffer (1898). Aunque originalmente, estas células fagocíticas probablemente se confundieron con las células estelares, que más tarde serían identificadas por Ito (1973), estudios posteriores demostraron que las células de Kupffer pueden ser identificadas por su capacidad de fagocitar sustancias trazadoras, incluyendo carbón activado, tinta de la India o microesferas de látex, y también por su inmunoreactividad al anticuerpo F4-80.

Las células de Kupffer cumplen las funciones inmunes de fagocitosis de agentes infecciosos y células tumorales, poseen la capacidad de sintetizar citocinas, eicosanoides y derivados reactivos de oxígeno (Baratta et al., 2009).

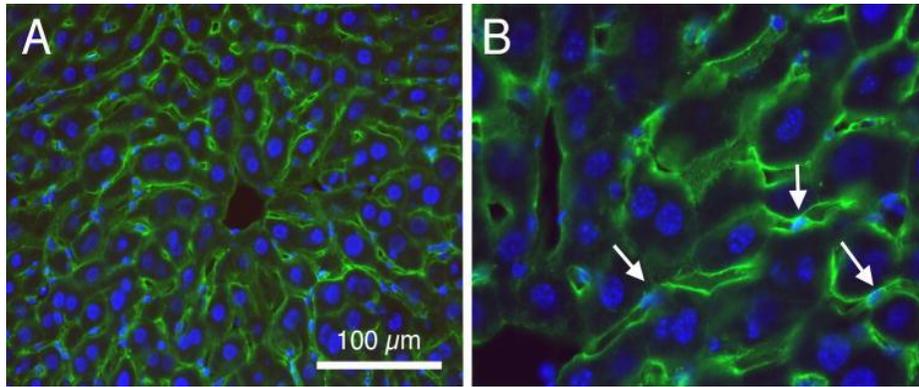
Las células estelares Ito son almacenadoras de grasa en el hígado, como identificadora específica se ha empleado la inmunoreactividad a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Friedman, 2008).

En el hígado de ratón, las estimaciones cuantitativas de éste tipo celular, indican que representan entre 10-12% de las poblaciones celulares (Baratta et al., 2009), no muestran una distribución homogénea en el hígado, un patrón consistente entre las regiones peri-portal y peri-central. A pesar de que De Bleser y colaboradores (1991),

informaron que en el hígado de rata, las células estelares se encuentran más frecuentemente distribuidas en las zonas peri-portal que en las zonas peri-central.

Entre las funciones que realizan las células estelares están; el depósito de grasa y, principalmente de vitamina A, siendo el principal almacenador de esta vitamina. Poseen la capacidad de sintetizar y modular la degradación de la matriz extracelular, produciendo colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Además de regular el flujo sanguíneo sinusoidal por su capacidad contráctil en respuesta a diversos agentes como tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandinas F<sub>2</sub>, sustancia P y endotelinas 113.

Adicionalmente, las células endoteliales se han podido identificar estructuralmente por presentar núcleos pequeños ovales, que se distinguen claramente de los núcleos grandes y redondos que son característicos de los hepatocitos. Además muestran inmunoreactividad en la superficie celular al anticuerpo anti-CD-34, con una distribución tisular en la periferia de los capilares sinusoidales (Figura 3A). En experimentos en los que a un ratón se le ha inyectado microesferas de látex (0.03 µm) marcadas con rodamina por vía intravascular, y después se realizó análisis de inmunolocalización, los cortes que se procesaron para inmunoreactividad anti-CD-34 se observó que las microesferas de látex marcaron intensamente a las células endoteliales (Figura 3B).



**Figura 3. Marcaje fluorescente específico en células endoteliales en hígado de ratón.** **A:** El co-marcaje de inmunolocalización de reactividad al anticuerpo anti-CD-34 (verde) y núcleo teñido con DAPI (azul). **B:** En la amplificación se observe tinción del núcleo de hepatocitos. Las flechas blancas señalan células endoteliales que muestran núcleos pequeños y ovales teñidos con DAPI y asociados con el marcaje positivo para CD-34.

### 1b. Hígado y sus funciones metabólicas

Es un órgano de gran importancia, recibe directamente la sangre del intestino y utiliza los nutrientes recién absorbidos para cumplir numerosas funciones metabólicas como, descomponer las grasas y utilizarlas para fabricar colesterol y bilis. Además, en el hígado se fabrican muchas de las proteínas del organismo. Este órgano también participa en la elaboración de ciertas vitaminas, almacena energía en forma de glucógeno y actúa sobre numerosas sustancias tóxicas. Puede decirse que es el centro de tratamiento de residuos tóxicos del organismo y por eso está más expuesto a sufrir efectos nocivos (Frimmer y Ziegler, 1988).

### **1c. Metabolismo hepático de los carbohidratos**

El hígado es el principal responsable de la homeostasia de los carbohidratos, consumiendo, almacenando y produciendo glucosa. Gracias a su situación anatómica, absorbe glucosa y hormonas intestinales y pancreáticas. Los carbohidratos ingeridos en la dieta en forma de polisacáridos (almidón) o como disacáridos (sacarosa, lactosa), se transforman bajo la acción de enzimas en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa, ribosa), llegan al hígado por la vena porta, siendo rápidamente absorbidos por los hepatocitos, cerca de 50% de la ingesta, para ser metabolizados.

### **1d. Metabolismo hepático de las proteínas**

Tras la alimentación, el hígado capta aminoácidos de la circulación portal y a través de transaminación los recompone en proteínas estructurales y plasmáticas (albúmina, haptoglobinas, transferrina, ceruloplasminas, alfa, beta y gamma globulinas y lipoproteínas). En la desaminación, con formación de ácidos grasos y carbohidratos, hay producción energética a través del ciclo de Krebs o por glucogénesis.

El hígado es capaz de sintetizar aminoácidos no esenciales por seis vías, que utilizan alfa-cetoácidos, para los cuales se transfiere un radical aminado durante la transaminación: oxaloacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato (ciclo de Krebs); piruvato, 3-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato (glucólisis) y ribosa 5 fosfato (pentosa fosfato).

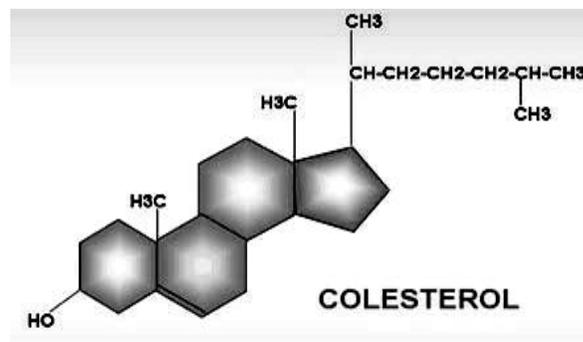
## **1e. Metabolismo hepático de los lípidos**

Por otra parte, el hígado es un órgano central en el metabolismo del colesterol corporal el único órgano capaz de secretar hacia el medio externo, vía secreción biliar cantidades significativas de colesterol, ya sea en forma libre o mediante una conversión a sales biliares. Alteraciones en la regulación de un balance metabólico llevan al desarrollo de enfermedades altamente prevalentes en nuestra población. Un importante componente del síndrome metabólico es la hipertrigliceridemia (HTG) asociada con valores bajos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) es la dislipidemia la presentación clínica más frecuente.

## **1f. Colesterol y funciones biológicas**

### **1f.1. Estructura y propiedades químicas del colesterol**

El colesterol es una molécula orgánica, que por las peculiaridades de su estructura química hace posible que participe en funciones indispensables para la célula eucarionte. Es una molécula anfipática constituida por una región polar representada por un grupo hidroxilo, y una región hidrofóbica comprendida por una cola formada por el carbociclo ciclopentanofenantreno y los sustituyentes alifáticos (Figura 4). Posee una baja solubilidad en agua ( $10^{-8}$  M), y una buena solubilidad en disolventes orgánicos. Desde el punto de su conformación, el colesterol es plano, hecho que le permite intercalarse en las bicapas lipídicas de las membranas biológicas modulando la dinámica de la membrana (Maxfiel y Tabas, 2005).



**Figura 4: La estructura química del colesterol.** Se trata de una molécula anfipática, una región hidrofílica representada por el hidroxilo, y una región hidrofóbica, constituida por el ciclopentanofenantreno y los sustituyentes alifáticos.

### 1f.2. Localización y función tisular del colesterol

El colesterol se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos y en plasma sanguíneo de los vertebrados. El contenido de colesterol entre los órganos es variable. No obstante, los tejidos que presentan un mayor contenido son el hígado, médula espinal, páncreas y cerebro. El colesterol cumple diversas funciones biológicas importantes como:

- Precursor de la vitamina D, que participa en la regulación de los niveles de calcio.
- Precursor de las hormonas sexuales: progesterona, estrógenos y testosterona
- Precursor de las hormonas corticoesteroides: cortisol y aldosterona

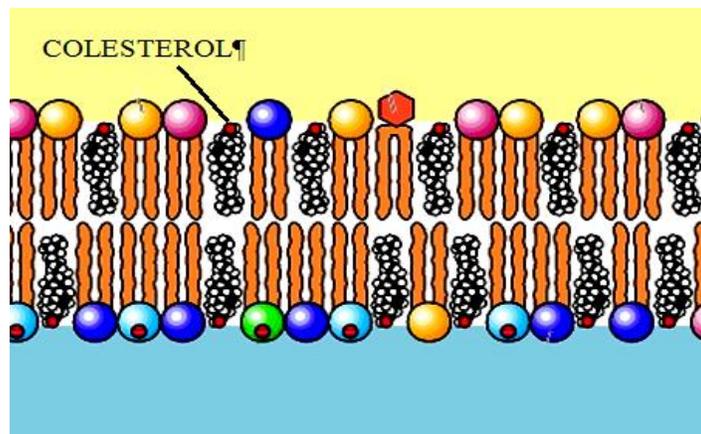
- Precursor de las sales biliares, indispensables para la absorción de grasas en el intestino.

### **1f.3. Componente estructural de las membranas biológicas**

El colesterol se localiza de manera heterogénea en la bicapa de una membrana biológica, aunque está presente en una proporción molar 1:100 con relación a los fosfolípidos (Maxfield y Wustner, 2002). En los organelos celulares, el colesterol es abundante en el Complejo de Golgi, mientras que su contenido es bajo en retículo endoplásmico y mitocondrias.

De acuerdo a su disposición en la estructura de las membranas biológicas, al ser una molécula pequeña, es capaz de ocupar los huecos entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos facilitado por la región hidrofóbica vía enlaces de tipo Van der Waals, y su región hidrofílica (el hidroxilo) interacciona con el medio acuoso (Figura 5). En las membranas biológicas, el colesterol, se relacionan con un aumento en la rigidez de la membrana, ya que los anillos de su estructura molecular interactúan con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos inmovilizándolas parcialmente, además incrementa el orden de la bicapa lipídica dejando zonas más rígidas y otras más flexibles previniendo la condensación y cristalización de los fosfolípidos, por lo que, es evidente que esta molécula regula algunas de las propiedades de la membrana, las cuales son claves para que la célula pueda realizar sus funciones.

Se ha establecido que las membranas biológicas presentan estados de dinámica moléculas, que han conducido a favorecer algunos modelos sobre la distribución de los componentes en la bicapa de una membrana, por ejemplo: El modelo del “mosaico fluido” (Singer, Nicolson. 1972), en el cual, los lípidos se disponen formando un bicapa fosfolipídica, en la cual las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos se ubican hacia el medio externo o hacia el citosol. Mientras, que las colas hidrofóbicas están dispuestas en el interior. Las proteínas se intercalan en esa bicapa de lípidos dependiendo de las interacciones con las regiones de la zona lipídica.



**Figura 5. La distribución del colesterol en las membranas biológicas de las células eucariontes.** La proporción de colesterol es elevada, aproximadamente en relación 1:100 por molécula de fosfolípido.

En otro modelo molecular, está representado por las llamadas: “balsas lipídicas” (*lipid rafts*), las cuales son dominios moleculares de la membrana plasmática, que consisten de asociaciones estables entre los esfingolípidos y el colesterol, por ello,

estos grupos forman una fase lipídica más densa que los fosfolípidos, y así constituyen zonas especiales de la membrana plasmática que funcionan como "balsas" que flotan entre el conjunto de los demás lípidos, estas balsas intervienen en gran número de funciones celulares, como pueden ser la respuesta a la invasión de patógenos, la homeostasis del colesterol, angiogénesis, transducción de señales, entre otras.

Estas balsas lipídicas miden aproximadamente 70nm de diámetro y son muy diversas y dinámicas en cuanto a composición, ya que tienen asociadas proteínas de membrana que les confieren distintas propiedades y funciones (Simons y Ehehalt, 2002). Como se ha señalado, además de la membrana plasmática, el colesterol se encuentra en organelos membranosos, como en el retículo endoplásmico, en el complejo de Golgi, en los lisosomas y en menor proporción en las membranas de las mitocondrias (Colell et al., 2003).

#### **1f.4 Regulación, síntesis y transporte de colesterol**

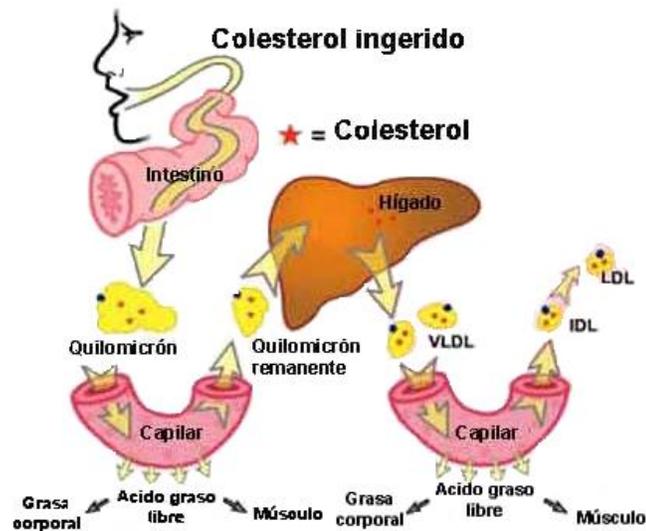
El organismo puede obtener el colesterol de dos vías diferentes:

- **Vía Exógena:** La cual se refiere a la absorción del colesterol que se ingiere junto con los alimentos de origen animal.
- **Vía Endógena:** Que es el mecanismo mediante el cual el cuerpo sintetiza *de novo* colesterol a partir de su precursor, la acetil CoA.

En condiciones normales, estas vías interactúan entre sí para mantener los niveles de colesterol dentro de un rango específico.

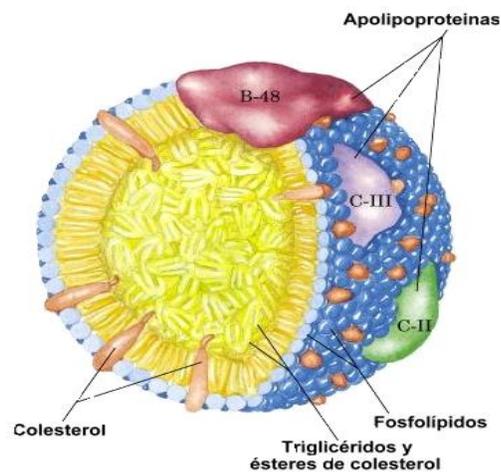
### Vía exógena del colesterol

El colesterol, que se encuentra presente en los alimentos de origen animal, es incorporado al organismo por el proceso de digestión. Una vez que las células epiteliales del tubo digestivo han absorbido los componentes lipídicos (Figura 6), estos son transportados por medio de las lipoproteínas (Kruit et al., 2006), que son complejos macromoleculares esféricos formados por un núcleo que contiene lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) y una capa externa polar de 2nm formada a su vez por apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre (Figura 7).



**Figura 6: Representación esquemática de la formación de las diferentes lipoproteínas (quilomicrones, VLDL, IDL, LDL y HDL) y su incorporación del colesterol de los alimentos hacia el organismo.**

Las apolipoproteínas que forman parte de una región hidrofílica de las lipoproteínas tienen, entre otras funciones, la de la estabilización de las moléculas de lípidos como triglicéridos, fosfolípidos, colesterol, en un entorno acuoso como es la sangre o la linfa. Actúan como una especie de detergente y también sirven como indicadores del tipo de lipoproteína de que se trata. Los receptores de lipoproteínas de la célula pueden así identificar a los diferentes tipos de lipoproteínas y dirigir y controlar su metabolismo.



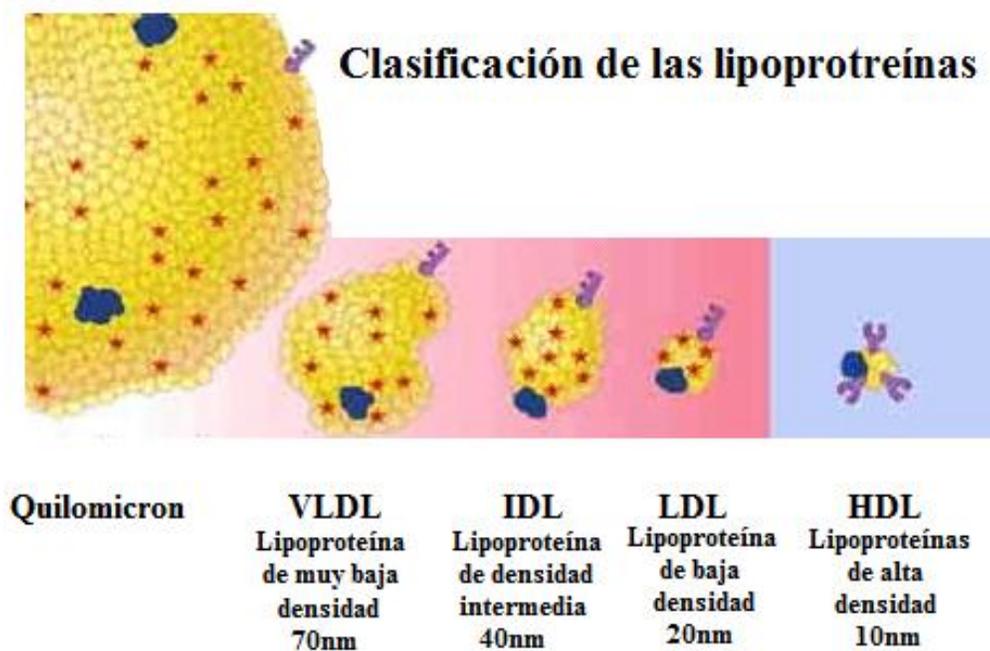
**Figura 7: La estructura de una lipoproteína.** Está constituida de un centro lipídico que contiene contenidos variables de triacilgliceroles, ácidos grasos libres, colesterol esterificado y colesterol no esterificado, y una cubierta compuesta de fosfolípidos, colesterol polipoproteínas.

Las lipoproteínas se clasifican en diferentes grupos según su densidad, a mayor densidad mayor contenido en proteínas (a mayor diámetro, mayor contenido de lípidos):

- Quilomicrones
- Lipoproteínas de muy baja densidad (**VLDL**)

- Lipoproteínas de densidad intermedia (**IDL**)
- Lipoproteínas de baja densidad (**LDL**)
- Lipoproteínas de alta densidad (**HDL**)

Cada tipo de lipoproteína tiene una composición y una proporción características de apolipoproteínas (Figura 8).



**Figura 8.** Clasificación de las diferentes lipoproteínas según su densidad.

La grasa que se incorpora a la dieta (triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol) son transportados en primer lugar en forma de los quilomicrones, que son sintetizados en las células epiteliales del intestino delgado (Figura 6 y 8) (Dietschy et al, 1993). Estos son grandes partículas esféricas que recogen desde el intestino delgado los triglicéridos, los fosfolípidos y el colesterol ingeridos en la dieta

llevándolos hacia los tejidos a través del sistema linfático (Figura 6). Están compuestos en un 90% por triglicéridos, 7% de fosfolípidos, 1% colesterol, y un 2% de proteínas especializadas, llamadas apoproteínas. Al pasar por los capilares, las lipoproteína lipasas (LPL) degradan parte de los triglicéridos, provocando un enriquecimiento progresivo del porcentaje de colesterol en las lipoproteínas remanentes, las cuales son captadas y degradadas por el hígado.

Este órgano es el responsable de secretar a las VLDL para distribuir triglicéridos y ésteres de colesterol por todo el organismo. A medida que las LPL, que se encuentran en los tejidos, van hidrolizando los triglicéridos de las VLDL, estas se hacen más pequeñas y más densas y se enriquecen de colesterol hasta convertirse en LDL (Figura 8). Las LDL se unen en los receptores de membrana, a través de los cuales son introducidas en la célula, ya en el interior, el colesterol puede ser dirigido a los diferentes organelos celulares, como son: la membrana plasmática, el retículo endoplásmico, el Complejo de Golgi, etc., además estas lipoproteínas están relacionadas con enfermedades cardíacas.

El hígado también sintetiza HDL, las cuales circulan por el organismo a través del torrente sanguíneo, recogen el exceso de colesterol desde los diferentes órganos y es transportado al hígado, esto es denominado “transporte reverso del colesterol”.

En este órgano, también tiene lugar la síntesis de las sales biliares, las cuales emulsionan las grasas ingeridas en la dieta para facilitar su metabolismo y absorción. Estas sales biliares derivan del colesterol y se acumulan en la vesícula biliar hasta

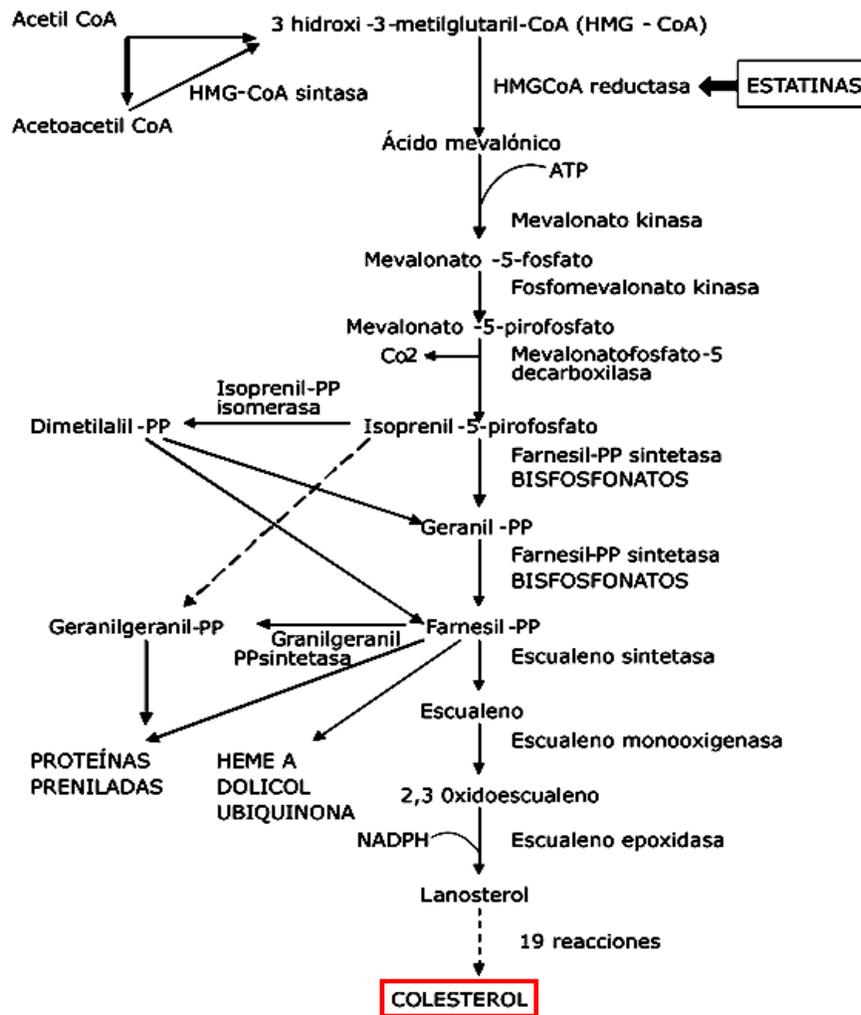
que el alimento llega al duodeno; entonces son liberadas al intestino para que ejerzan su función sobre la grasa ingerida. Gran parte de estas sales biliares son reabsorbidas por el hígado (Grundy, 1983), pero un porcentaje importante es secretado en las heces fecales, siendo esta la principal vía de eliminación del colesterol del organismo.

### **Vía endógena del colesterol**

El colesterol endógeno se sintetiza mayoritariamente en el hígado, aunque también otros tejidos pueden sintetizarlo, es sintetizado en el **RE** a través de la vía del mevalonato (Figura 9), esta síntesis incluye los siguientes pasos:

- 1- Transformación del acetyl CoA en mevalonato.
- 2- Transformación del mevalonato a escualeno mediante reacciones sucesivas de transferencia de grupos prenilo.
- 3- El escualeno se transforma en lanosterol.
- 4- El lanosterol se convierte en colesterol después de 19 reacciones sucesivas.

La enzima limitante y principal punto de control de esta vía es la HMG-CoA reductasa (Endo, 1992), la cual cataliza la conversión de HMG-CoA a mevalonato.



**Figura 9. Esquema que representa la vía endógena del metabolismo del colesterol.**

### 1f.5 Regulación transcripcional de los niveles de colesterol

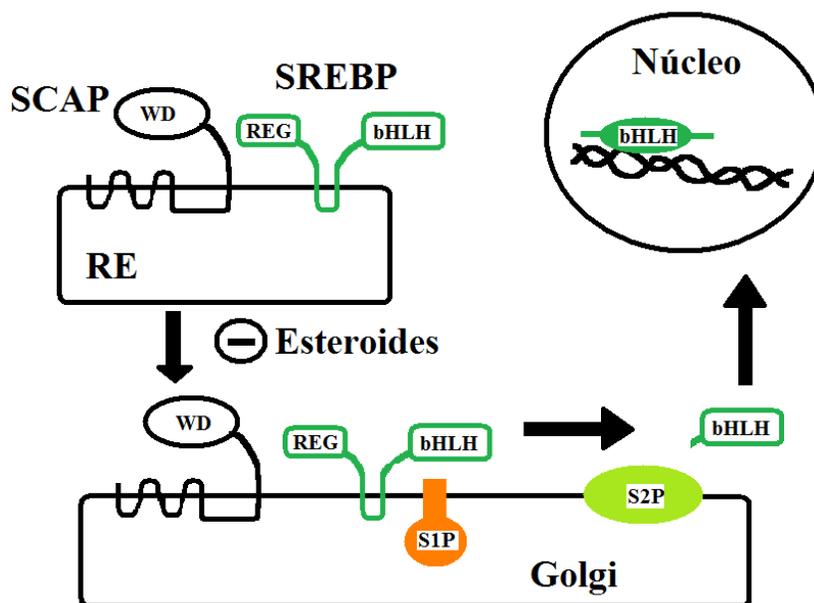
El RE, además de ser el organelo donde tiene lugar la síntesis *de novo* del colesterol es el compartimento encargado de mantener la homeostasis celular de colesterol.

La síntesis *de novo* está regulada por el colesterol presente en el RE de las células. Los factores de transcripción SREBPs (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*), son los encargados de llevar a cabo este control. SREBP-2 activa los genes

involucrados en la síntesis de colesterol mientras que SREBP-1a y SREBP-1c controlan la síntesis de ácidos grasos. Estas son proteínas transmembranales que se encuentran inactivas en el RE, en presencia de una concentración determinada de colesterol en la membrana del RE, las SREBPs se asocian con proteínas reguladoras SCAP (*SREBP-cleavage activating protein*) (Figura 10). Al disminuir la concentración de colesterol en el RE el complejo SREBP-SCAP se disocia permitiendo de SREBP migre hacia el aparato de Golgi donde es separada secuencialmente por las proteínas S1P y S2P (Goldstein et al. 2006), esto da como resultado la formación del factor de transcripción bHLH, el cual migra al núcleo de la célula para unirse a los SER (*Sterol Regulatory Elements*, por sus siglas en inglés) que son los genes “diana” del metabolismo del colesterol y de los ácidos grasos, los cuales controlan su expresión.

### **1f.6 Transporte intracelular de colesterol**

El colesterol, al ser un lípido e insoluble en agua, requiere de mecanismo específicos para su transporte dentro y fuera de la célula, este movimiento del colesterol puede seguir dos rutas, por ejemplo, puede incorporarse a las membranas de vesículas como lisosomas, endosomas, peroxisomas etc. para después fundirse con otras membranas y pasar de un compartimiento celular a otro (Maxfield and Wustner, 2002).



**Figura 10:** Esquema que representa el sistema regulador SCAP-EREBP

Cuando, el colesterol, se sintetiza *de novo* es transportado por el RER a las caveolas de la membrana plasmática, este transporte es muy dinámico, pues se sabe que renueva todo el colesterol de la membrana cada 45 min. (Lange et al, 1993), y es dependiente de ATP, al parecer este no es el único mecanismo que permite el tránsito de las vesículas, ya que al ser bloqueado el tránsito se mantiene, lo que sugiere que existe otro mecanismo que realice la misma función (Soccio y Breslow, 2004).

Este segundo mecanismo de transporte se lleva a cabo por medio de proteínas con dominios hidrofóbicos capaces de unirse y solubilizar el colesterol, estas proteínas son: StARD4, 5 y 6, y están relacionadas con StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory*

*Protein*), y se encuentran en la familia START (*StAR-related lipid transfer*). Por lo tanto, la evidencia indica, que las proteínas de la familia START se unirán a lípidos insolubles, para ser transportados a través del citosol (Miller, 2007), se cree que StARD4 es la responsable de la entrega de colesterol procedente del RE y de otros compartimentos subcelulares. Este transporte es especialmente importante en aquellas células que secretan hormonas esteroideas o, como en el caso de los hepatocitos sales biliares.

El colesterol por si solo es tóxico para la célula, por lo tanto debe de almacenarse de forma esterificada en forma de microvesículas (Maxfield y Tabas, 2005), el colesterol tiene en su molécula un grupo alcohol -OH y las proteínas tienen un grupo ácido -COOH. Cuando el colesterol en el cuerpo se presenta solo con su -OH libre sin reaccionar, entonces el colesterol es libre. Si el colesterol forma un éster (por acción de la enzima ACAT) con el grupo ácido de una proteína entonces es un colesterol esterificado. Depende del tipo de proteína (el tamaño y la densidad) al que se encuentre esterificado el colesterol para determinar si es colesterol HDL o LDL. El organelo que realiza esta esterificación es el RER.

Sin embargo, en pacientes con hígado graso no alcohólico (HGNA), estos sistemas son muy desorganizados. SREBPs actúa como reguladores de los niveles de colesterol hepático y activan los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y colesterol libre (Golstein, 2006). SREBP proteína activadora de división (SCAP) tiene un dominio de detección de colesterol que detecta los niveles de colesterol intracelular y dirige la actividad de SREBPs. Fisiológicamente, cuando los niveles de

colesterol intracelular son bajos, SREBPs se translocan primero al Complejode Golgi por SCAP y se someten a la escisión proteolítica. A continuación, las formas activadas de SREBP son liberadas y se dirigen al núcleo. Cuando los niveles de colesterol intracelular son altos, la actividad SCAP y activación SREBP se suprimen. Sin embargo, en el contexto de hígado graso no alcohólico, el mecanismo de regulación de SREBP es perturbado, incluso si los niveles intracelulares de colesterol y / o ácidos grasos son altos (Donohue, 2007).

En algunas investigaciones nutricionales, se ha sugerido que la dieta alta en grasa y en carbohidratos y baja en proteínas o dietas altas en colesterol son las principales causas de hígado graso no alcohólico (Musso et al., 2003)

### **1g Hígado graso no alcohólico**

El hígado graso no alcohólico (HGNA o NAFDL, por sus siglas en inglés) fue descrito en 1980 por Ludwig y colaboradores. Está asociado con desórdenes metabólicos de los lípidos, incluyendo hipertrigliceridemia y/o hipercolesterolemia. A la fecha, en la mayoría de los casos, el origen primario de esta patología no está totalmente comprendido. Sin embargo, se considera que es una manifestación hepática del síndrome metabólico, que está acompañado por obesidad central, resistencia a la insulina, dislipidemia y diabetes tipo 2. Algunas de las causas secundarias pueden ser las nutricionales (por ejemplo, la desnutrición, pérdida rápida de peso, cirugía de derivación gástrica), las metabólicas (lipodistrofias) y las inducidas por fármacos (glucocorticoides, metotrexate, tamoxifen) entre otras (Bellentani S. Marino, 2009).

El HGNA se define como la infiltración de grasa en más del 5% de los hepatocitos en ausencia de una ingesta crónica de alcohol y se caracteriza predominantemente por la presencia de esteatosis hepática macro-vesicular, que es un padecimiento donde hay una acumulación de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos y es visible en cortes histológicos (Freneaux, 1993; Teli, 1995), además es la alteración metabólica más frecuente a nivel hepático. La esteatosis hepática resulta de un desequilibrio entre la síntesis hepatocítica de triglicéridos a partir de ácidos grasos y de la secreción desde el hepatocito bajo la forma de lipoproteínas. (Cause, 1995)

Según el porcentaje de hepatocitos afectados por la esteatosis hepática, esta se clasifica en:

- **Leve:** < del 25% de hepatocitos afectados
- **Moderada:** de 25 a 50% de hepatocitos afectados
- **Severa:** > al 50% de los hepatocitos afectados

### **1h Propiedades generales de las colinesterasas**

El término colinesterasa (ChE) tiene un significado preciso, se denomina ChE, a aquella enzima que cataliza la hidrólisis de ésteres de colina y es sensible al efecto inhibitorio de la eserina (fisoestigmina). Las colinesterasas (ChEs) se presentan en los tres dominios (*Archaea*, *Eubacteria* y *Eucariota*) en que los que se clasifican los seres vivos.

Las colinesterasas en los vertebrados se localizan no sólo en tejidos excitables, tales como músculos y nervios, sino también en vasos sanguíneos, hígado, intestino, páncreas, timo y placenta, entre otros tejidos, y en tipos celulares tan diversos como células de las meninges y el conjunto de células sanguíneas. No se encuentran en líquidos de excreción como lágrimas, orina y sudor (Soreq y Seidman 2001).

En el organismo humano hay dos enzimas distintas que cumplen los requisitos exigidos por la definición anterior, la acetilcolinesterasa y la pseudocolinesterasa o butirilcolinesterasa.

### **1h.1. Gen acetilcolinesterasa y su expresión proteica en el ratón**

En el ratón, el gen acetilcolinesterasa (AChE, símbolo oficial) se encuentra localizado en el cromosoma 5 en la región 76.32 cM, teniendo una longitud de 7 kb en que se incluyen seis exones y cuatro intrones (Li et al., 2008). Chan y colaboradores (1999) hicieron el análisis de las secuencias reguladoras del gen AChE y determinaron algunas regiones de control en el promotor en músculo esquelético de rata. Cuando realizaron la comparación en la secuencia de nucleótidos en ésta región, encontraron una elevada similitud en la secuencia de los promotores de ratón y humano.

La expresión del gen AChE muestra tres exones constantes (E2, E3 y E4, con el E1 que no se transcribe) que codifican el péptido señal y la región N-terminal compuesta de 535 residuos de aminoácidos comunes en todas las formas moleculares de la enzima. Mientras, mediante un proceso de corte-empalme alternativo en la región 5'-no traducida y en la extremidad 3' de la región codificante, la elección de varios sitios

de poliadenilación y longitudes variables en la secuencia 3' no-traducida (Soreq et al., 1990; Getman et al., 1992;).

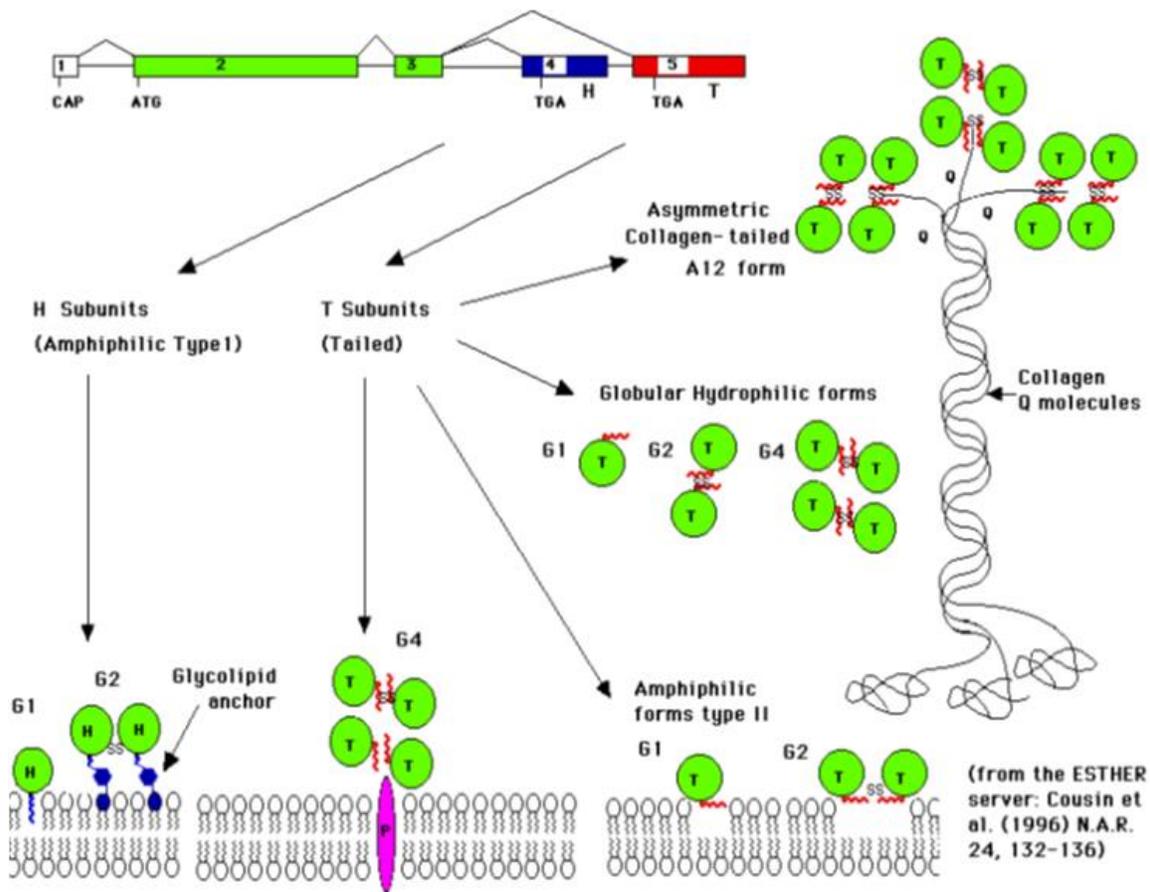
El proceso de corte-empalme alternativo genera tres tipos de transcritos con diferentes dominios C-terminal: El RNAm tipo AChE-T (tallo) o AChE-S (sináptico) está constituido por los exones E2-E3-E4 y E6 y la proteína producto genera monómeros, dímeros y tetrámeros anfifílicos ( $G_1^A$ ,  $G_2^A$  y  $G_4^A$ ), tetrámeros no anfifílicos ( $G_4^{NA}$ ), así como asociaciones hetero-oligoméricas. Si los tetrámeros se unen a una proteína transmembranal (PRiMA; "*Proline Rich Membrane Anchor*") se forman tetrámeros capaces de insertarse en las membranas (PRiMA- $G_4^A$ ) (Dori y Soreq 2006, Perrier et al., 2005, Deutsch et al., 2002) (Figura 11). Si los tetrámeros se ligan a un tallo tipo colagénico (ColQ), se generan las formas asimétricas  $A_4$ ,  $A_8$  y  $A_{12}$ , con uno, dos y tres tetrámeros, respectivamente.

El RNAm tipo AChE-H (hidrofóbico) o AChE-E (eritocito), contiene los exones E2-E3-E4-E5, que codifica a los dímeros anfifílicos Tipo I que poseen una estructura de glicofosfatidilinositol (GPI) unido covalentemente (Soreq et al., 1990; Deutsch et al., 2002).

El RNAm tipo AChE-R, no sufre corte y unión después del último exón codificador del dominio catalítico, y por tanto posee el arreglo E2-E3-E4-I4-E5-E6. El extremo C-terminal de la subunidad R consta de 30 aminoácidos adicionales y carece de residuos de Cys, por lo que, las subunidades permanecen como monómeros (Figura 11) (Grisaru et al., 1999; Sternfeld et al., 2000; Grisaru et al., 2006).

La masa de la subunidad catalítica de AChE oscila entre 70 y 80 kDa, aunque en algunas especies animales alcanza un valor superior (100-110 kDa para la AChE de cerebro de pollo) (Rotundo 1984). La homología en secuencia primaria de la proteína acetilcolinesterasa entre los mamíferos es muy alta, entre ratón y rata es de 98.3%. Entre la AChE de ratón y la proteína humana es de 89.1%, y finalmente, entre la proteína AChE de rata y la proteína humana es de 89.1% de similitud (Jbilo et al., 1994).

La proteína AChE es miembro de la familia de hidrolasas con plegado  $\alpha/\beta$ . La AChE contiene un centro activo que se encuentra al fondo de una garganta. A la entrada de la cual hay un sitio aniónico periférico que sirve como un 'landing-site' específico para la Ach. El sitio catalítico presenta una tríada catalítica conformada por Ser – His – Glu, que está alineada con 14 residuos de aminoácidos, e interacciona con el grupo cuaternario de la Ach (Quinn, 1987).



**Figura 11. La estructura del gen acetilcolinesterasa, procesamiento post-transcripcional alternativo y la generación del polimorfismo molecular.** La expresión del gen *Ache* por corte-empalme alternativo genera tres variantes de transcritos que presentan exones comunes (E2, E3, E4) conteniendo la información necesaria para producir proteínas activas catalíticamente (color verde). Las regiones génicas específicas generan las diferentes subunidades con elementos estructurales especiales; El pseudointrón (I4) (subunidades tipo R) que codifica monómeros hidrofílicos, y los exones alternativos; E5 (subunidades tipo H) anclados a membrana a través de un enlace glicofosfatidilinositol y E6 (subunidades tipo T), que codifica codifica monómeros, dímeros y tetrámeros hidrofílicos, tetrámeros hidrofóbicos anclados a la membrana por un péptido rico en prolina (**PRiMA**), y formas asimétricas compuestas por tetrámeros; uno ( $A_4$ ), dos ( $A_8$ ), tres ( $A_{12}$ ) ancladas por un tallo tipo colagénico (**ColQ**).

## **1h.2. Funciones clásicas y no clásicas de la proteína acetilcolinesterasa**

En el siglo XX, la proteína AChE se estudió ampliamente y se sustentó la idea de que participa en funciones biológicas.

Las funciones se han clasificado en:

- 1) Enzimáticas colinolíticas (hidrólisis de la Ach) –Función clásica-
- 2) Enzimáticas no -colinolíticas (v. gr., actividad arilacilamidasa) –Función no clásica-
- 3) No-enzimáticas (v. gr., adhesión, participación en el desarrollo y/o diferenciación, apoptosis, cáncer) –Función no clásica-

La función clásica de la acetilcolinesterasa (acetilcolina-acetilhidrolasa E.C. 3.1.1.7) en el sistema nervioso donde hidroliza a la acetilcolina, que es el agente transmisor del impulso nervioso desde la membrana de la neurona motora a la del músculo esquelético y, también, de la membrana presináptica a la postsináptica en las sinapsis colinérgicas.

La acetilcolina es sintetizada en la zona del axón próxima a la membrana presináptica, por la enzima colina-acetil-transferasa. Luego, es englobada en el interior de vesículas membranosas denominadas vesículas sinápticas, cada una de las cuales puede contener unas 10,000 moléculas. La llegada del impulso nervioso a la membrana presináptica genera la liberación de las vesículas sinápticas al espacio intersináptico. La acetilcolina liberada, ahora reacciona con una proteína receptora específica situada en la membrana post-sináptica, favoreciendo la apertura de un

canal catiónico, por el que entra  $\text{Na}^+$  y sale  $\text{K}^+$ . Los flujos iónicos son causa de la despolarización de la membrana post-sináptica, pasando el potencial de membrana de -75 mV a 0 mV. Si la membrana post-sináptica no recupera su potencial de membrana no podría transmitir el siguiente impulso nervioso.

La acetilcolinesterasa, situada en la membrana post-sináptica, tiene el importante papel de hidrolizar la acetilcolina, dando acetato y colina, que no interaccionan con la proteína receptora, lo que permite a la membrana post-sináptica re-polarizarse. Todos los inhibidores de la acetilcolinesterasa son venenos violentos porque bloquean la transmisión del impulso nervioso, provocando una despolarización prolongada de la membrana post-sináptica.

La acetilcolinesterasa es una enzima cuyo sustrato preferente es acetilcolina. Hidroliza mucho más lentamente los demás esteres de colina, por ejemplo, la butirilcolina, pero frente a la acetilcolina es tremendamente rápida: hidroliza 25, 000 moléculas de acetilcolina por segundo. Esta alta velocidad permite que la membrana post-sináptica pueda transmitir hasta 1, 000 impulsos por segundo.

La acetilcolinesterasa se encuentra en la sustancia gris del sistema nervioso, en los ganglios colinérgicos, en las placas neuromotoras colinérgicas, los leucocitos, los eritrocitos, los hepatocitos y otros tipos celulares no-neuronales, así como, en el plasma. Su función en los diversos compartimentos celulares parece relacionarse con un papel filtro, por el que la hidrólisis de acetilcolina circulante impidiendo que el

neurotransmisor actúe sobre los receptores muscarínicos y/o nicotínicos, y así evitando, los efectos deletéreos de los síndromes muscarínicos y nicotínicos.

A pesar de estar plenamente establecido su papel en la transmisión nerviosa y neuromuscular, existe evidencia en que se ha sustentado que la AChE cumple funciones relacionadas con la diferenciación celular, sinaptogénesis, señalización neuronal.

Hebb (1956) demostró que la distribución de colina acetil-transferasa (ChAT) se correlacionó estrechamente con la distribución de la ACh. Se podría esperar que la actividad AChE estuviera igualmente localizada con la ACh. Sin embargo, un estudio detallado de la incompatibilidad de las estructuras de AChE y ChAT-positivas en el cerebro indica que la proteína AChE sólo no puede estar funcionando para hidrolizar ACh (Eckenstein y Sofroniew, 1983). Esta fue la primera evidencia sobre las funciones no clásicas de la AChE.

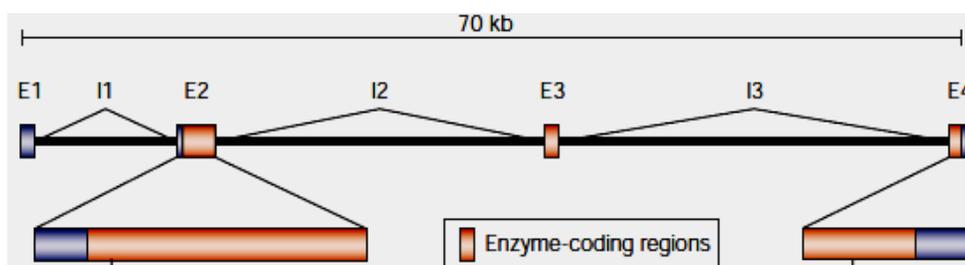
Se han detectado altos niveles de la proteína AChE en el sistema nervioso embrionario antes del período de la sinaptogénesis. La expresión embrionaria no conduce necesariamente a la expresión de la enzima en los mismos tejidos adultos.

La existencia de las múltiples isoformas proteínicas de la AChE sigue siendo incierta, sobre si la enzima cumple una sola función. Análisis de cristalografía y secuenciación de residuos de aminoácidos han identificado un grupo de enzimas relacionadas y las proteínas no catalíticas.

### 1h.3. Gen de la butirilcolinesterasa y su expresión en el ratón

En el ratón, el gen de la butirilcolinesterasa (BChE, símbolo oficial), se encuentra en el cromosoma 3 (Allderdice, et al 1991). La región genómica del gen BChE se extiende alrededor de 70 kb y está compuesto por 4 exones y 3 intrones (Arpagaus, et al1991). La subunidad catalítica está compuesta de 603 residuos de aminoácidos que representa una masa molecular de 68.5 kDa aproximadamente. La homología en secuencia primaria de la proteína butirilcolinesterasa entre los mamíferos no es tan elevada como en la acetilcolinesterasa. Por ejemplo, entre la proteína de ratón y la proteína de humano es de 80.7% (Jbilo y col., 1994).

Cabe señalar, que todas las formas moleculares de BChE derivan de un solo RNAm, por lo que no sufre un empalme alternativo (Figura 12) (Soreq, et al 1989). La proteína codificada en el mRNA de la expresión del gen BChE refleja diferentes formas moleculares incluyendo; monómeros ( $G_1$ ), dímeros ( $G_2$ ) y tetrámeros ( $G_4$ ) solubles, y en estos últimos también anclados a la membrana por el péptido hidrofóbico rico en prolina (PRiMA)



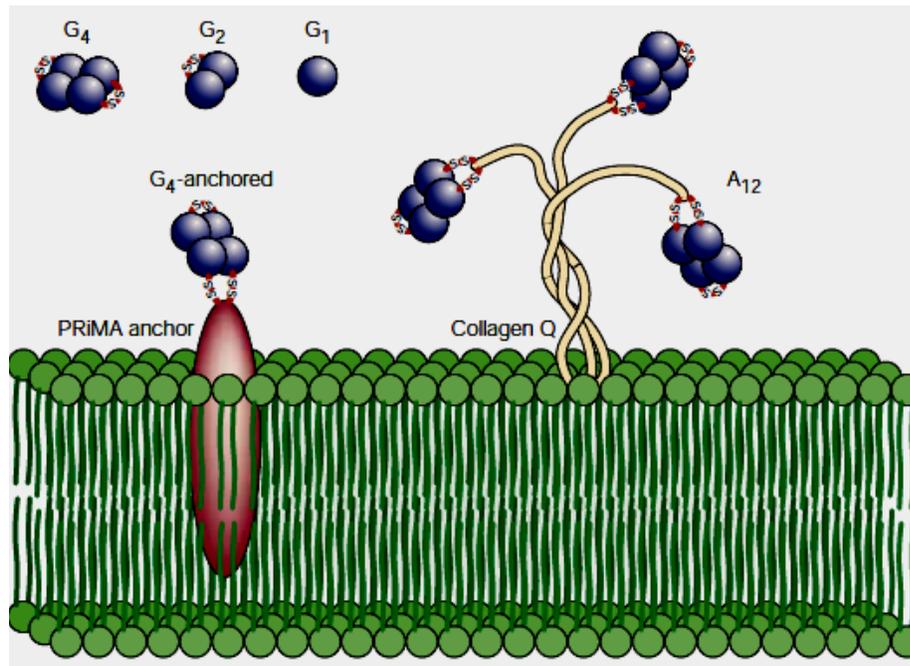
**Figura 12. Estructura del gen butirilcolinesterasa en mamíferos.**

En el ratón, el gen *Bche* se localiza en cromosoma 3, comprende una longitud de 70 kb, está compuesto por 4 exones (E1, E2, E3, E4) y 3 intrones (I1, I2, I3) (Tomado de Darvesh et al., 2003).

También, se presentan formas asimétricas ancladas a membrana por un triplete helicoidal de colágeno. Los tetrámeros anclados a este tallo de colagénico se les conocen como  $A_4$ , y se pueden incorporar de 1 a 3 tetrámeros, aunque, en general, las formas asimétricas  $A_{12}$  predominan sobre las  $A_8$  y éstas sobre las  $A_4$  (Figura 13) (Darvesh, et al 2003).

La BChE plasmática es sintetizada en el hígado (Hammer y La Du, 1968). La enzima puede detectarse tanto en los glóbulos rojos como en el citoplasma de las células hepáticas (Gürthner et al., 1963). La enzima también se encuentra en otros órganos y tejidos: materia blanca del sistema nervioso central, páncreas, corazón y mucosa intestinal. Su concentración en el suero de los individuos normales, como revelan los estudios inmunológicos, es de unos 0.9 mg/ml, lo que constituye alrededor del 0.01% de las proteínas plasmáticas totales (Surgenor, 1954).

Se ha determinado que la vida media de la enzima es aproximadamente de 12 días, a partir de experimentos de regeneración de la actividad enzimática tras la inhibición de compuestos organofosforados y de la desaparición de la actividad enzimática tras la transfusión de plasma normal a individuos con nula actividad BChE (Neitlích, 1966; Jenkins et al, 1967). Los valores normales de la actividad BChE se encuentran entre 5.9 y 13.2 UI/L (Ostergard D. 1988 y Pan Y 2009), se ha informado un aumento de la actividad de la BChE en la obesidad, diabetes, uremia, hipertiroidismo y en sujetos hiperlipidémicos (Kutty, 1994). Se ha conseguido purificarla, obteniéndose un material que exhibe 10.000 veces más actividad que un volumen equivalente de suero (Haupts et al, 1963).



**Figura 13. Polimorfismo molecular de la proteína butirilcolinesterasa en mamíferos.** Se presentan monómeros ( $G_1$ ), dímeros ( $G_2$ ) y tetrameros ( $G_4$ ) globulares hidrosolubles. También, se puede presentar en forma tetramérica anclada a la membrana a través de un péptido rico en prolina (PRiMA). Las formas asimétricas están compuestas por varios tetrameros anclados a un tallo tipo colagénico (ColQ), y se designan como  $A_4$ ,  $A_8$  y  $A_{12}$ , conteniendo uno, dos o tres tetrameros, respectivamente (Tomado de Darvesh et al., 2003).

#### 1h.4. Función colinérgica y no colinérgica de la butirilcolinesterasa

Desde el punto de vista funcional, la BChE (E. C. 3.1.1.8 acil hidrolasa) es una enzima que tiene preferencia por los ésteres de la colina con los ácidos alifáticos de más de dos carbonos. Así, hidroliza mucho más rápidamente la butirilcolina que la acetilcolina. La especificidad de sustrato de la BChE es muy amplia, hidrolizando los

esteres de la colina con los ácidos acético, propiónico, butírico y otros; benzoilcolina; succinildicolina; tioésteres de colina y otros esterres que no tienen colina como el  $\alpha$ -naftilacetato y el salicilacetato. Se ignora cuál es su sustrato fisiológico. La distinción entre las dos colinesterasas se logra claramente utilizando acetil-8-metilcolina como sustrato: la acetilcolinesterasa cataliza la hidrólisis del isómero D de esta sustancia pero no la del L; la BChE no cataliza la hidrólisis de ninguno de los dos isómeros. (Soreq, 1990)

A pesar de que hasta el momento no ha sido posible asignar a la BChE ningún papel fisiológico concreto. Puesto que hidroliza acetilcolina podría pensarse que colabora con la acetilcolinesterasa en el metabolismo de este importante neurotransmisor. Sin embargo, la mayoría de las observaciones revelan que la hidrólisis de la acetilcolina "*in vivo*" es realizada únicamente por la AChE. Puesto que la BChE hidroliza la butirilcolina y la propionilcolina mucho más rápidamente que la acetilcolina, se ha sugerido que la butirilcolina sería su sustrato fisiológico. La acetilcolinesterasa es prácticamente ineficaz frente a los dos primeros esterres.

### **1i Glicosilación de las colinesterasas y su implicación estructural**

Las colinesterasas poseen varios sitios potenciales de glicosilación, la proteína AChE en el ratón presenta tres sitios, los cuales son homólogos en su ubicación a la AChE humana. Mientras, que la proteína BChE presenta seis sitios a diferencia de los nueve sitios en la secuencia primaria de la proteína BChE. Éste último caso, está más glicosilado que el monómero de la AChE a pesar de que contienen un número

parecido de residuos de aminoácidos (alrededor de 600). El contenido de carbohidratos en un monómero llega a alcanzar un 15% en el órgano eléctrico de pez y de las membranas de eritrocito, y un 10-12% en la de cerebro de pollo (Rotundo, 1984). El nivel de glicosilación de la BChE de suero humano representa el 26% del peso de la molécula (Lockridge et al., 1988) y la de ratón 6% (Rachinsky y col., 1990).

El proceso de incorporación de carbohidratos durante la síntesis de los monómeros en ambas enzimas es específica del tejido, por lo que el tamaño de una molécula particular depende del tejido donde se produce (Treskatis y col., 1992). Hecho que se confirma, cuando se ha incubado a los monómeros de la AChE humana y bovina con N-glicosidasa, donde se ha observado una disminución en la masa molecular aparente, determinado en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Existen diversos estudios en los que se ha establecido que la glicosilación participa en la protección de las proteínas ChEs frente al ataque proteolítico (Lucas y Kreutzberg, 1985), o bien, la vida media en la circulación plasmática (Kronman et al., 1995).

### **1i.1. Lectinas como una herramienta experimental en el estudio de la glicosilación**

Las lectinas son agentes biológicos muy valiosos en la investigación de los azúcares de la membrana celular, para establecer su papel en el crecimiento y diferenciación celular, interacción de las células con su ambiente, y también en diversos procesos patológicos (Sharon y Lis, 2004). Inbar y Sachs (1969), usaron a la concavalina A

(Con A) y lectinas que reconocen manosa y glucosa, ambas lectinas aglutinaron a las células leucémicas o tumorales, pero no a las células normales, en la actualidad, existe un número alto de estudios que han demostrado la propiedad de las lectinas de distinta especificidad para aglutinar células malignas. Las lectinas también, han proporcionado evidencia sobre cómo se mueven las proteínas y glicoproteínas en una bicapa lipídica, debido a que la incubación de los linfocitos y otros tipos celulares con las lectinas, inducen la formación de parches o agregados de receptores de membrana (Mikami, 1994, Cygler, 1991).

La variabilidad estructural y complejidad de los glicanos en la membrana celular permite su participación en diversas funciones, tales como, señalización, reconocimiento y adhesión. Intervienen en funciones fisiológicas importantes, como el desarrollo embrionario, la diferenciación, el crecimiento, la inhibición por contacto, el reconocimiento célula-célula, la respuesta inmunológica del huésped, la metástasis, así como el tráfico y localización intracelular (Blomme y col., 2009). Las lectinas presentan una alta afinidad hacia las estructuras oligosacáridicas que reconocen, propiedad que es útil en la cromatografía de afinidad para purificar receptores de membrana. Con la incubación del extracto de membranas celulares con la lectina específica se producen complejos lectinas-receptor, el lavado con amortiguador salino descarta aquellas proteínas no reconocidas por las lectinas (no poseen el o los azúcares de reconocimiento), las proteínas retenidas corresponden a proteínas que poseen el azúcar que es reconocido por las lectinas, para disociar el complejo lectinas-receptor, la matriz de afinidad se lava con un exceso del

monosacárido específico, la proteína eluída corresponderá al receptor de interés (Tabla 1)

<b>Tabla 1. Algunas sustancias utilizadas en el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su clasificación hacia monosacáridos</b>		
<b>Monosacáridos</b>	<b>Lectina</b>	<b>Abreviatura</b>
<b><math>\alpha</math>-D-manosa, <math>\alpha</math>-D-glucosa</b>	<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA
<b><math>\alpha</math>-D-manosa</b>	<i>Lens culinaris</i>	LCA
<b><math>\beta</math>-galactosa</b>	<i>Ricinus communis</i>	RCA
<b>N-acetil-<math>\alpha</math>-D-galactosamina</b>	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hipogea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
<b>N-acetil-<math>\beta</math>-D-glucosamina</b>	<i>Triticum vulgare</i>	WGA
<b><math>\alpha</math>-D-fucosa</b>	<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA
	<i>Ulex europeus</i>	UEA

## 2. ANTECEDENTES

Se considera que el HGNA es el resultado de la acumulación de triglicéridos (TG) y/o colesterol (COL) y/o ácidos grasos libres (AGL) y que además pueden coexistir en la esteatosis hepática.

Se han desarrollado estrategias experimentales para inducir hígado graso en animales de laboratorio. A este respecto, se han implementado dietas experimentales con exceso de colesterol que han sido útiles en el entendimiento de la patogenia de esteatosis hepática. En el hígado de ratas que se han sometido a una dieta alta en colesterol (4%), se estableció un incremento de 10 veces en el contenido de colesterol y tres veces el contenido de triglicéridos, y como el colesterol

libre no sufrió cambios, se sugirió que el exceso de colesterol se acumuló de manera esterificada (Wu et al., 2007).

Existen informes en que se ha señalado que la acumulación del colesterol esterificado en el hígado, representa una primera agresión inducida por la dieta hipercolesterolémica (HC), y que esta situación promueve la sensibilización ante estímulos citotóxicos mediados por el TNF- $\alpha$ , sobre todo por una implicación de una disfunción mitocondrial, en donde la depleción del glutatión mitocondrial y el incremento del estado oxidante juegan un papel relevante, lo cual podría generar HGNA. (Marí et al., 2006).

Por otro lado, en animales alimentados con dietas altas en colesterol se ha determinado un aumento selectivo en el transcrito de la proteína SREBP-1c induciendo la expresión de genes lipogénicos, así como elevados índices en la lipogénesis. La proteína SREBP-1c genera factores de transcripción, necesarios para la síntesis de esteres de colesterol. (Ferré y Foufelle 2010).

Otros estudios en tejido hepático de ratón y en los hepatocitos cultivados han mostrado que la dieta HC compuesta por colesterol (2%) y colato de sodio (0.5%) por 48 horas se incrementó el contenido de colesterol ocho veces con respecto a los valores determinados en organismos controles alimentados con dieta normal para roedores. Además, se determinó una sobre-activación de la SREBP-1c, relacionándose con el aumento en el contenido de lípidos (Ferré y Foufelle 2010).

## **2a. Colinesterasas en el hígado de mamíferos**

En los mamíferos, la actividad AChE se localiza principalmente en el sistema nervioso y muscular, pero también en las células sanguíneas, hígado y placenta. El nivel de actividad y el patrón de formas moleculares de las ChEs son específicos de tejido. Como se ha señalado previamente, el hígado de vertebrados es rico en BChE (Arpagaus et al., 1991), por lo que, se ha considerado que es el sitio de origen de la enzima, debido a que la secuencia de residuos de aminoácidos la BChE hepática es idéntica a la de los monómeros del tetrámero soluble en plasma (Lockridge, 1988), y se ha propuesto que el incremento en plasma de las glicofomas de BChE ricas en fucosa tiene un valor pronóstico para identificar a los pacientes con riesgo elevado de contraer cáncer de hígado, así como para discriminar entre los pacientes que presentan cirrosis y los que padecen hepatitis crónica (Ohkura et al., 1994).

## **3. JUSTIFICACIÓN**

La esteatosis hepática no alcohólica es un padecimiento que afecta al 20-30% de la población general en varios países (Preiss et al., 2008,). En un estudio de población “urbana” realizado en distintos grupos étnicos en los Estados Unidos se informó que el 30% de los adultos norteamericanos padecen esteatosis hepática (Browning et al., 2004). Se ha calculado en ese país que 71 millones de los individuos mayores de 18 años presentan esteatosis hepática (censo 2000) y más de 7 millones, esteatohepatitis (Neuschwander-Tetri et al., 2003); la prevalencia va en aumento en los sujetos con obesidad mórbida 75-92%, mientras que en la población pediátrica es de aproximadamente 13-14%.

Según el Centro de Nutrición, Obesidad y Alteraciones Metabólicas en México, de las 1, 200 millones de personas que tienen problemas de sobrepeso y obesidad en el mundo, 80 millones son mexicanos. Datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) colocan a México en el segundo lugar entre los países con mayor índice de obesidad en su población con el 30%, superado únicamente por Estados Unidos con el 33.8%. Según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año mueren por lo menos 2.8 millones de adultos a causa de enfermedades asociadas a este padecimiento.

Por otra parte, la Secretaría de Salud considera que en México esos padecimientos han aumentado en todas las edades, regiones y grupos socioeconómicos, lo que nos ha llevado a ocupar el segundo lugar en el mundo en obesidad en adultos, y el cuarto en la infantil, ya que actualmente la obesidad es un problema de salud en México, hay más de 4 millones de niños que sufren de sobrepeso y obesidad, esto significa que 1 de cada 5 niños en México tiene problemas de sobrepeso, ocupando el 4 lugar en obesidad infantil, únicamente superado por Grecia, Italia y Estados Unidos.

Este problema sigue como hasta ahora, en 20 años traerá como consecuencias serios problemas de salud, así como económicos, ya que la obesidad no solo trae como consecuencia hígado graso no alcohólico sino una serie de problemas como: cáncer de seno, cáncer de colón, cirrosis, hepatomegalia, gastritis, gota, reflujo gastroesofágico, diabetes mellitus, depresión, trastornos de discos cervicales, ansiedad, hipertensión, infertilidad, trastornos en rodillas, osteoartritis, trastornos de sueño, entre otras.

La actividad de la BChE plasmática se correlaciona positivamente con el peso y el IMC (índice de masa corporal), (Alcántara et al., 2003), esto demuestra que los individuos con una elevada actividad de BChE tienden a ser obesos y la síntesis de BChE aumenta en los individuos con ganancia en peso corporal, lo que sugiere que la actividad de BChE es importante en el equilibrio del balance energético.

En ratones nulos-BChE se ha observado que mostraron valores menores en el IMC y en el peso corporal comparados con ratones de tipo silvestre después de ser sometidos a una dieta con un 11% de grasa, lo que se ha propuesto un papel de la BChE en la utilización de grasas (Li et al., 2008). Por otra parte, algunos polimorfismos de un solo nucleótido en el gen humano BuChE (3q26.1-q26.2) se han asociado con el IMC (Furtado-Alle et al, 2008).

Iwasaki y colaboradores (2007), investigaron la asociación de la BChE, en suero de pacientes sanos y obesos con diabetes mellitus tipo 2, donde midieron diversos parámetros: adiposidad, resistencia a la insulina y el perfil lipídico sérico, el cual incluía: triglicéridos, HDL, LDL, en pacientes japoneses. Este estudio mostro que, la actividad en suero de la BChE se correlacionaba positivamente con diversos índices de adiposidad incluyendo el perímetro de la cintura, la grasa visceral y grasa subcutánea, el índice de masa corporal así como los triglicéridos, HDL y LDL tanto en sujetos obesos. Además observaron que la actividad de BChE en suero se correlaciona de manera positiva con el grado de esteatosis hepática no alcohólica, así como con los niveles de adiposidad y la acumulación de grasa. (Iwasaki, 2007).

Finalmente, cabe señalar que se ha establecido que la BChE, interviene en la maduración de la grelina y el neuropéptido Y, que forman parte de las hormonas relacionadas en el control de la saciedad y el apetito (De Vriese et al., 2004).

#### **4. PREGUNTA**

¿Cuáles son los posibles cambios en la actividad y glicosilación que pueden sufrir las colinesterasas en el proceso de hipercolesterolemia hepática en ratones?

#### **5. HIPÓTESIS**

Si las colinesterasas están involucradas en la biosíntesis de lípidos, entonces al presentarse alteraciones en la síntesis y degradación de los lípidos en un modelo de hipercolesterolemia la actividad y glicosilación de las colinesterasas se verá alterada.

#### **6. OBJETIVO GENERAL**

Establecer los cambios en la actividad y glicosilación de las colinesterasas en ratones hipercolesterolémicos que presentan esteatosis hepática.

#### **7. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Determinar la actividad de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa extraída de hígado de ratones que presentan esteatosis hepática (Hígado graso).
- 2.- determinar el nivel de glicosilación de las colinesterasas en el hígado de ratones con esteatosis hepática (Hígado graso).

## 8. METODOLOGÍA

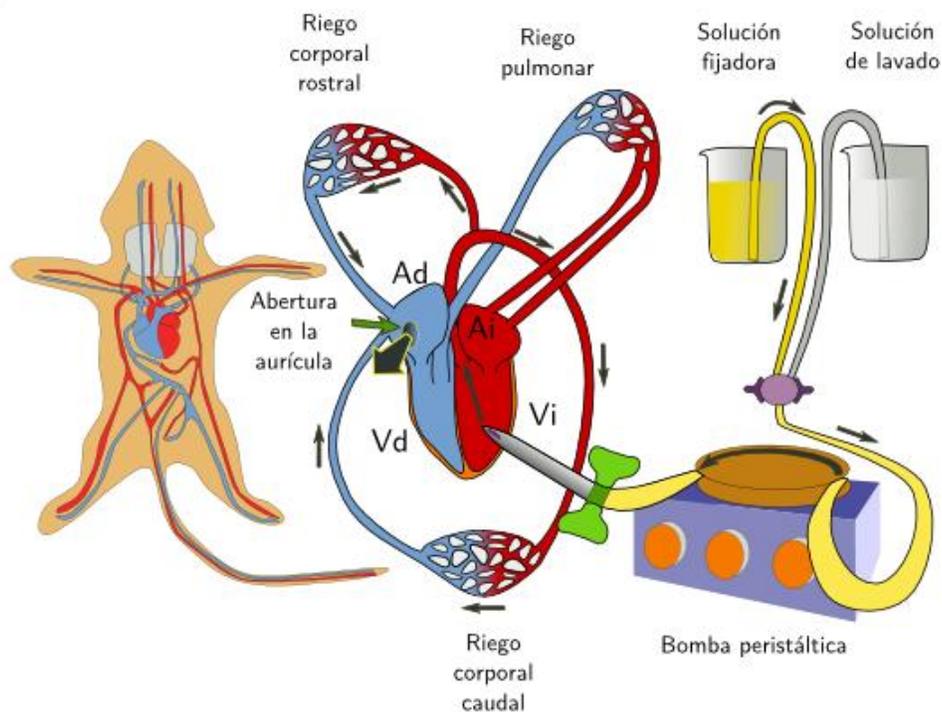
### 8a. Administración de dieta hipercolesterolémica

Los ratones C57BL/6 se consideraron clínicamente sanos al nacer y fueron criados en el banco genético de la (Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio) UPEAL –Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Estos animales, antes de su adquisición, se mantuvieron en condiciones de libre de patógenos con macroambiente con filtros HEPA y con una temperatura de entre 19 y 23°C, humedad relativa de 45 a 55% y entre 15 y 18 vca/h, control luz oscuridad 12:12 y ruido < 85 db. El encamado era autoclaveado y se alimentaron *ad libitum* con alimento de importación de Purina Lab Diet formula 5001 y agua ozonada y baja en sales.

Los ratones de machos de 8 semanas edad se transportaron al laboratorio donde fueron habituados por 20 días en las nuevas condiciones del laboratorio, durante ese tiempo fueron alimentados con la dieta Harlan 2018S para roedores y agua purificada, estos se administró *ad libitum* al finalizar el período de habituación, se procedió a dejarlos en ayuno por 12 horas previo a la administración de la dieta hipercolesterolémica (HC), la cual estuvo compuesta por 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio. La administración se realizó durante 2, 15 y 30 días (n=3 por grupo). En el caso de los ratones control se dejaron en ayuno por 12 horas, y posteriormente, se mantuvieron *ad libitum* a la dieta Harlan 2018S y acceso al agua. El consumo de alimento y agua, así como, el aumento en el peso corporal del animal se midieron durante todo el experimento en ambos grupos de ratones.

## 8b. Procedimiento de perfusión de los ratones

Para eliminar fuentes contaminantes (plasma, glóbulos rojos y glóbulos blancos) que pudieran interferir en una adecuada estimación de la actividad colinesterásica, se realizó la perfusión introduciendo una aguja de calibre de 0.4 mm x 13 mm a través de la vena cava superior, empleando como medio de perfusión, una solución salina conteniendo NaCl 154 mM y EDTA 5.4 mM ajustada a pH 7.4. Con la ayuda de una bomba peristáltica, a un flujo aproximado de 0.8 ml/min por muestra de órgano. (Figura 14)



**Fig. 14: Perfusión del ratón con solución salina de NaCl**, ya que las células hematopoyéticas presentan actividad colinesterásica y podría interferir con la medición de la actividad del hígado.

### **8c. Análisis de parámetros bioquímicos en suero de ratones**

De cada ratón se extrajo el volumen de 0.5ml de sangre por vía seno orbital, en tubos Eppendorf heparinizados. Para separar el plasma y los componentes celulares, la sangre colectada se centrifugó a 3,500 rpm por 15 min. Posteriormente, se estimaron los contenidos totales de colesterol y triglicéridos utilizando tiras para Reflotron (Roche, Francia).

### **8d. Disección del hígado de ratones**

Se registraron peso corporal del ratón y después de la perfusión la del hígado por cada animal control y experimental. Se extrajo el hígado de la cavidad abdominal y se fraccionó para su análisis.

### **8e. Método secuencial de extracción de las colinesterasas**

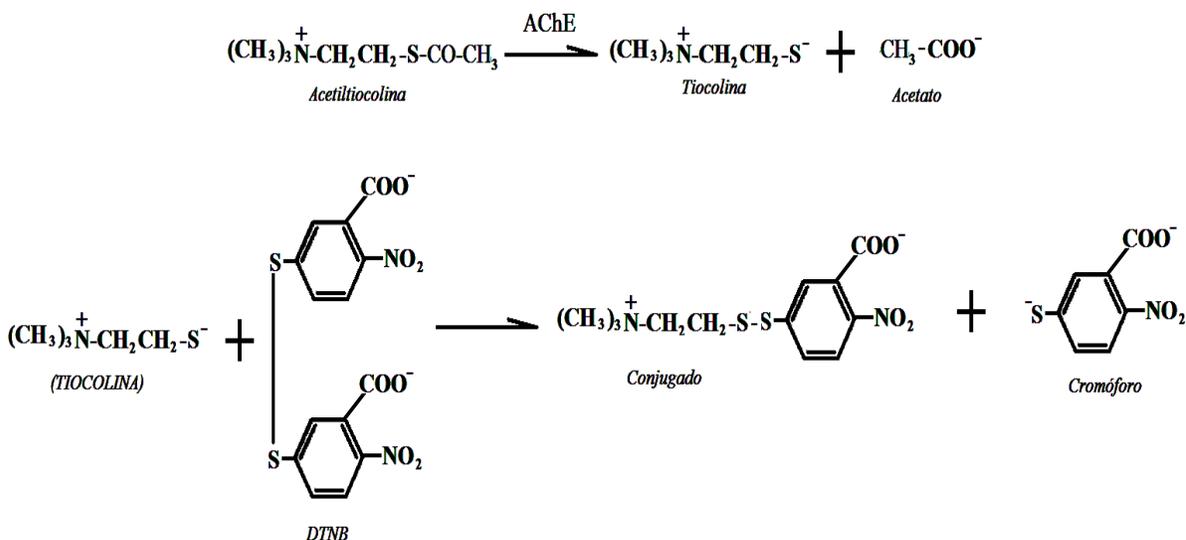
Para la extracción de las colinesterasas de hígado se empleó la relación 1g de peso de órgano(Lóbulo medio del hígado): volumen de amortiguador de extracción (1:10 P/V). Las muestras se homogeneizaron en amortiguador HEPES salino (HEPES 15 mM, NaCl 1 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 3 mM, pH 7.5), con una mezcla de antiproteasas (leupeptina 20 µg, pepstatina 10 µg, benzamidina 1 mM y aprotinina 20 U). El homogenado inicial se centrifugó a 100, 000 x g durante 1h a 4 °C en una centrifuga XL-90 Optima (Beckman, E.U.A. para separar a las ChEs solubles o débilmente unida a las membranas. Tras recoger el sobrenadante 1 (S<sub>1</sub> proteínas débilmente unidas a la membrana), el precipitado se homogeneizó en amortiguador HEPES salino conteniendo Triton X-100 al 1% (P/V), estas suspensiones se

centrifugaron bajo las mismas condiciones para obtener la enzima ligada a las membranas en el sobrenadante 2 (S<sub>2</sub> proteínas fuertemente unidas a la membrana).

#### **8f. Determinación de la actividad colinesterásica**

Las actividades AChE y BChE se estimaron por el método de Ellman y colaboradores (1961) que se basa en empleo de los tio-análogos de los sustratos naturales, la acetiltiocolina (ATch) para la actividad AChE y butiriltiocolina (BuTch) para la actividad BChE. Asimismo, se usaron inhibidores selectivos: iso-OMPA para inhibir a la actividad AChE y BW284C51 para inhibir a la actividad BuChE (Austin y Berry, 1953). En este método se aprovechó la capacidad del cromógeno DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) para oxidar los grupos tioles libres de reactivos o proteínas. Las ChEs hidrolizan los correspondientes ésteres de la tiocolina liberando tiocolina y acetato (o butirato, según sea al caso) (Figura 15). La tiocolina reacciona rápidamente con el DTNB produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato, el cual presenta un color amarillo intenso y un máximo de absorbancia a 412nm.

Este método tiene el inconveniente de la interferencia producida por los grupos tioles libres presentes en las proteínas de las muestras. Estos grupos reaccionan con el DTNB proporcionando un cambio de absorbancia que no corresponde a la hidrólisis del sustrato. Para evitar este problema, la muestra se incubó con la mezcla conteniendo el DTNB (Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico) antes de añadir el sustrato, para valorar previamente los grupos tioles.



**Figura 15. Fundamento de la medida de actividad acetilcolinesterasa por el método colorimétrico de Ellman y colaboradores (1961).**

La actividad enzimática colinesterasa se expresa en  $\mu\text{moles}$  de sustrato hidrolizados por hora y por mililitro de muestra, que se calculó al multiplicar el aumento proporcional de la absorbancia por minuto, por un factor que resulta del cociente del volumen total por el volumen de muestra, expresados en mililitros, multiplicado por 60 y 1000, los cuales son factores de conversión, divididos entre el coeficiente de extinción molar,  $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

La actividad específica para cada colinesterasa es referida como U/mg de proteína se obtuvo en cada muestra de las proteínas débilmente unidas a membrana y proteínas fuertemente unidas a la membrana a partir del cociente de la actividad en U/ml y el contenido total de proteína en mg/ml de los extractos  $S_1$  y  $S_2$ .

## **8g. Determinación del contenido de total de proteínas**

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

Para valorar la proteína, se elaboraron dos rectas patrón a partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 5  $\mu\text{g}/10\text{mL}$  y otra de 28.2  $\mu\text{g}/10\text{mL}$ . Se repitieron los volúmenes de 0, 2, 4, 8, 10  $\mu\text{L}$  y se completaran a 10  $\mu\text{L}$  con agua desionizada. Los volúmenes de muestra, los cuales fueron diluidos a 1:10, fueron de 10  $\mu\text{L}$ . Cada muestra se preparó por tetraplicado. Se agregaron a las muestras 200 $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford, esperando 10 min para leer la absorbancia a 595 nm de longitud de onda.

Para corroborar los resultados de la determinación en el contenido de proteínas realizo otra prueba por el método del Lowry.

## **8h. Método de Lowry**

El método de Lowry se basa en la reacción del reactivo de Folin con determinados aminoácidos de las proteínas para dar una coloración, este método supone dos reacciones, primero la formación de un complejo de estructura plano-cuadrada entre el enlace peptídico de las proteínas y el cobre (Reacción de Biuret), y una segunda reacción de óxido reducción reactivo de Folin (ácido fosfomolibdico-fosfotúngtico) por el complejo de cobre-proteínas, en particular, por los grupos aromáticos de los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptófano. Esta segunda reacción ayuda a intensificar el color obtenido de acuerdo a la concentración de proteínas en la muestra, y se lee en espectrofotómetro a 590-720 nm de longitud de onda.

## **8i. Análisis de la glicosilación de procesamiento post-traduccional de las colinesterasas mediante la interacción con lectinas de distinta especificidad**

Las lectinas se han utilizado ampliamente en la purificación de receptores celulares glicosilados, son capaces de reconocer carbohidratos con una alta especificidad, lo que ha permitido su utilización como modelos para estudiar la interacción carbohidrato-proteína. Por lo que, la naturaleza de los azúcares terminales presentes en las glicoproteínas pueden ser usados como una estrategia experimental. En este trabajo se emplearon las siguientes lectinas: *Concanavalina ensiformis* (Con A-sefarosa), *Lens culinaris* (LCA-sefarosa) y *Triticum vulgare* (WGA-agarosa).

Los extractos individuales de las proteínas débilmente unidas a membrana y proteínas fuertemente unidas a la membrana se mezclaron con cada lectina en una relación de 2 volúmenes de muestra por 1 volumen de matriz de octil cefarosa, y se

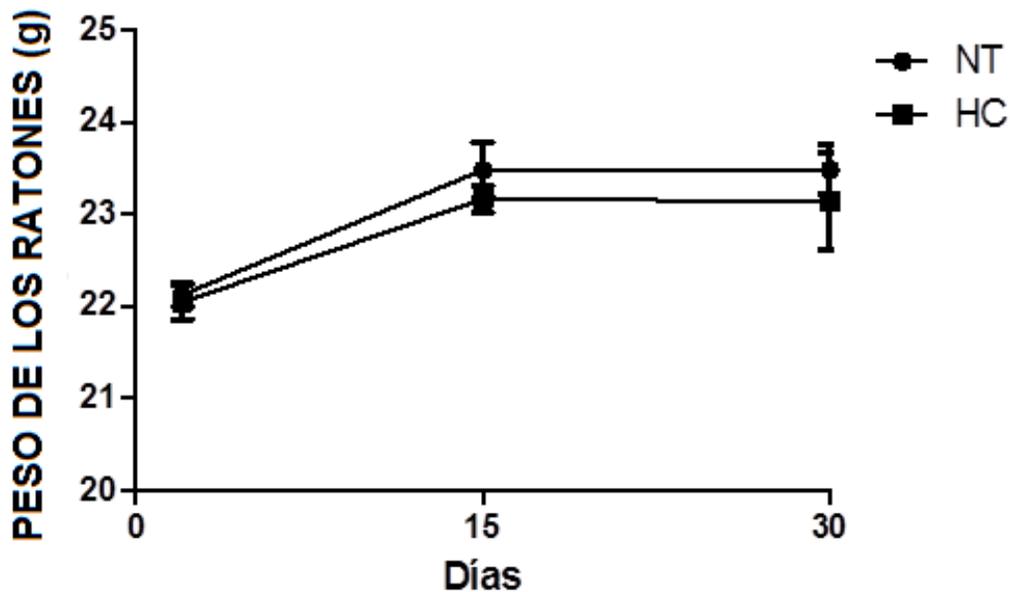
incubaron con las lectinas correspondientes inmovilizadas durante 18 horas a 4 °C, en agitación constante. Los complejos lectina-colinesterasa se separaron por centrifugación a 10, 000 X g por 5 min en una microfuga Eppendorf (E.U.A.), y luego, se determinaron las actividades AChE y BChE en los sobrenadantes por triplicado.

La actividad estimada en el control de unión inespecífica (matriz sefarosa-4B) se consideró como cero de interacción. El porcentaje de interacción en cada lectina se calculó mediante el cociente de la actividad del control y la estimada en los sobrenadantes, tras la interacción con las lectinas.

## 9. RESULTADOS

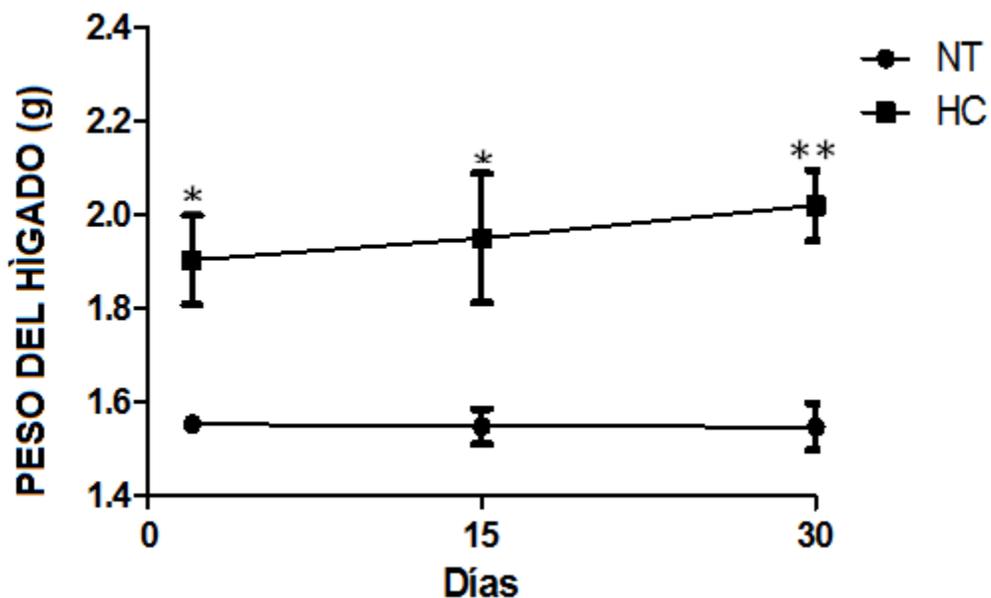
### 9a. Determinación de peso corporal y del hígado de ratones tratados con la dieta HC y no tratados.

Los ratones tratados con una dieta hipercolesterolémica (HC) (2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio), no mostraron diferencias en el aumento de peso corporal en relación a los ratones alimentados con una dieta balanceada (Chow) (Figura 16). Este comportamiento, parece estar relacionado a que la dieta experimental empleada en este estudio, no representa una dieta hipercalórica, por lo que, no debería promover un aumento en el peso corporal de los ratones.



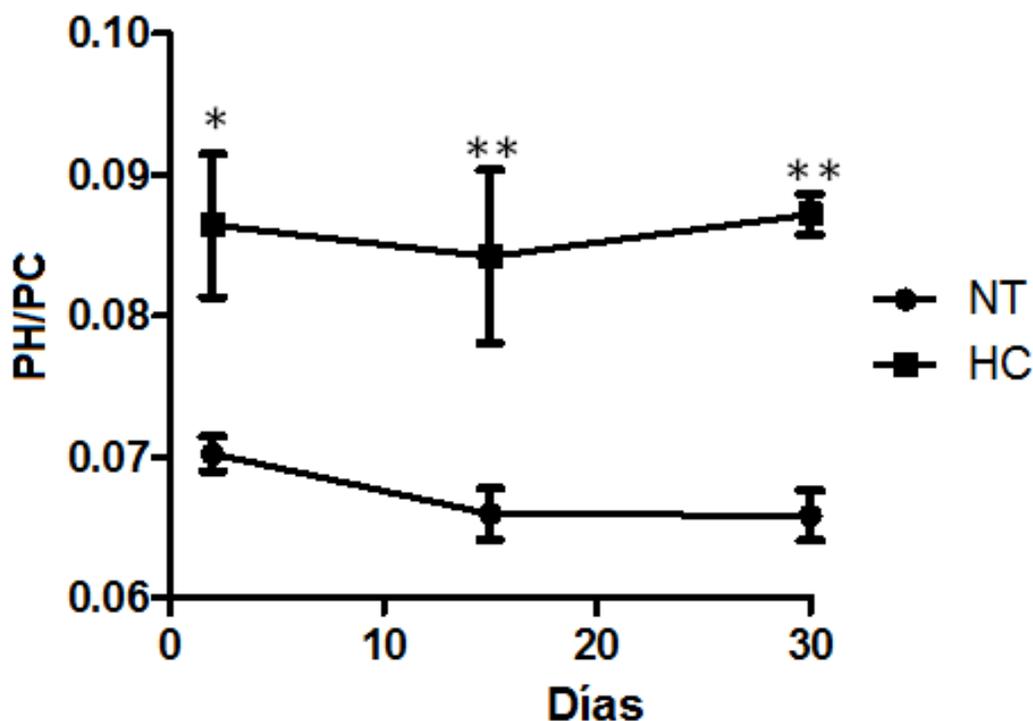
**Figura 16. Relación de peso de los ratones de ambos grupos.** Los ratones no tratados (NT) y los alimentados con dieta hipercolesterolémica (HC), en los grupos de 2, 15 y 30 días (n=3). No se observaron diferencias significativas

La comparación del peso del hígado entre los roedores que se sometieron a la dieta hipercolesterolémica mostró un aumento significativo en relación a los ratones alimentados con la dieta normal, desde los dos días de tratamiento, manteniéndose hasta los 30 días. (Figura 17).



**Figura 17. Relación de peso de hígado de NT y HC en los grupos de 2, 15 y 30 días (n=3).** Se aplicó una ANOVA de dos vías con análisis de Bonferroni con un  $P < 0.05$  (\*) para los grupos de 2 y 15 días, y para los ratones de 30 días fue la  $p < 0.01$  (\*\*).

Esta diferencia se corroboró cuando se calculó el cociente porcentual del hígado entre el peso corporal para cada ratón en ambos grupos de estudio (Figura 18).



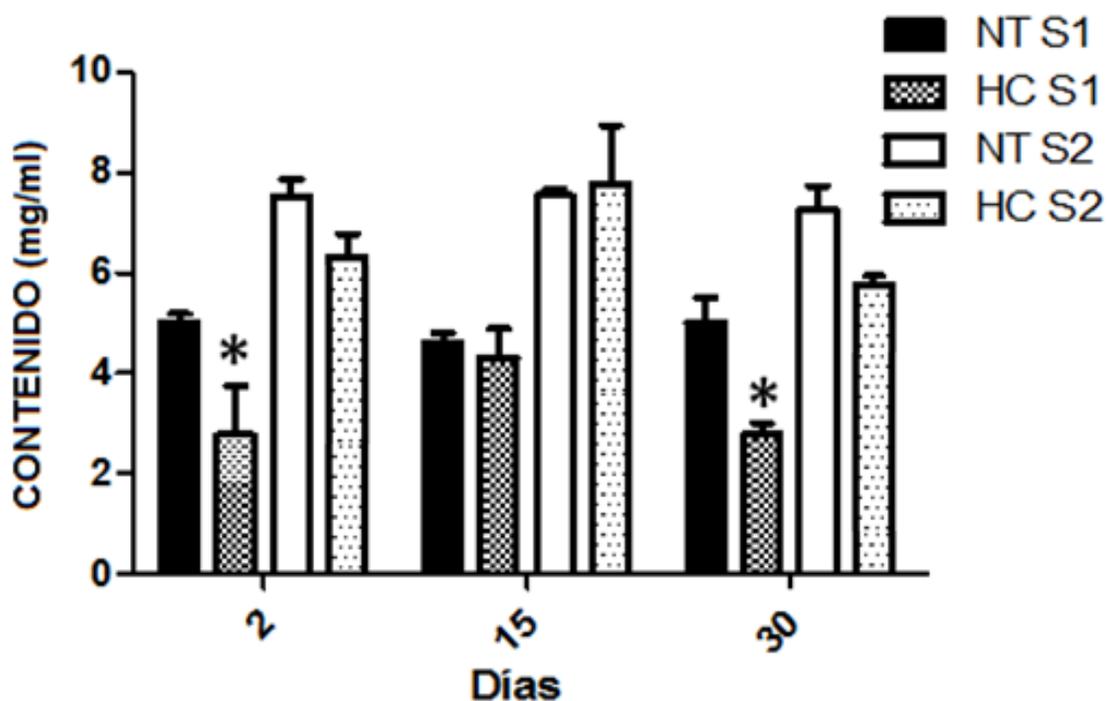
i

**Figura 18.** Comparación en el cociente de pesocorporal del ratón contra el peso del hígado entre los grupos de ratones NT y HC y a los 2, 7 y 15 días (n =3 por grupo). Se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías con análisis de Bonferroni con un  $p < 0.05$ . para los 2 días (\*), y para 15 días y 30 días, una  $p < 0.01$  (\*\*).

### 9b. Determinación del contenido de proteínas totales en hígado de ratón de la capa C57BL/6 alimentados con dieta hipercolesterolémica experimental

En las figuras 19 y 20 se observa una disminución significativa en el contenido de proteínas totales entre los ratones HC de 2 y 30 días con respecto a NT; esto podría deberse a que, en el caso del daño a los 2 días, las células hepáticas al recibir el daño, responden ante este, a los 15 días se observa un proceso de adaptación de las células hepáticas, pero a los 30 días, cuando el daño comienza a ser mayor, el descenso en las proteínas totales se vuelve a notar, esto podría deberse a que el

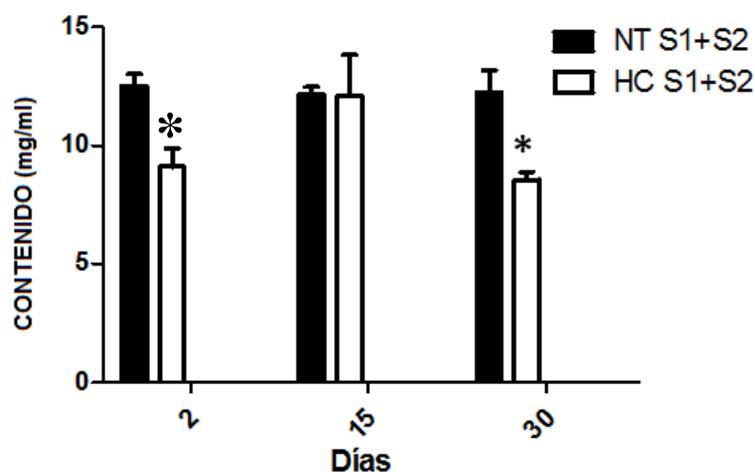
daño al hígado sea crónico y por lo tanto existe una menor producción de enzimas en las células hepáticas dañadas o lesionadas.



**Figura 19: Contenido de proteínas totales (mg/ml) en las fracciones correspondientes a S1 y S2.** La solubilización se realizó con buffer salino de alta fuerza iónica sin detergente para (S1) y con detergente *Triton X-100* para la fracción (S2), para cada uno de los hígados de ratón: No tratados (NT) en los tiempos 2, 15 y 30 días al igual que los que consumieron la dieta hipercolesterolémica (HC). Se aplicó una ANOVA de dos vías con análisis de Bonferroni con un  $p < 0.05$  (\*)

Aquellas hepatopatías con presencia de tejido hepático con atrofia como la hipercolesterolemia, producen disminución de la concentración de proteínas

plasmáticas, en especial hipoalbuminemia ya que se disminuye la síntesis de albúmina. Las alteraciones de la funcionalidad hepática pueden darse con curso agudo o crónico.



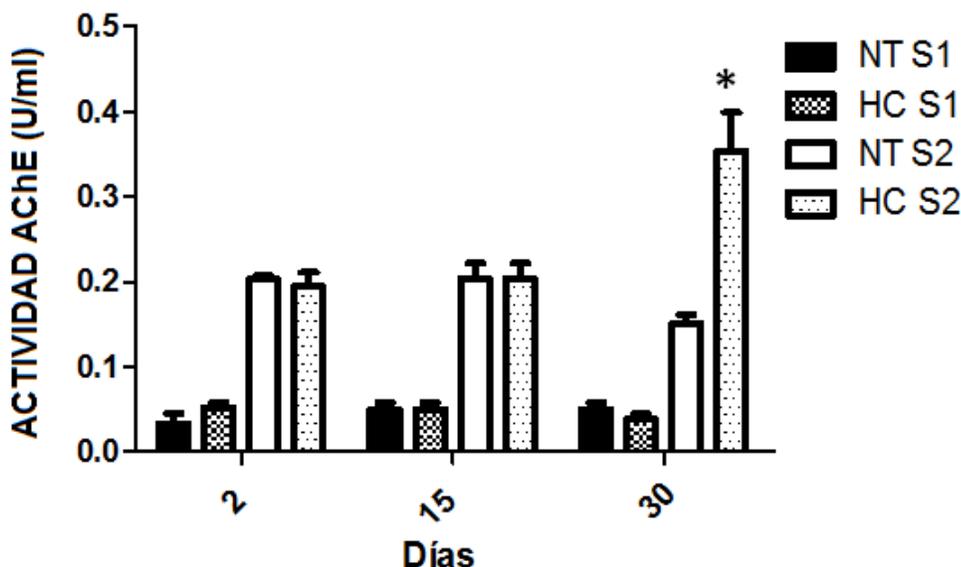
**Figura No.20 Comparación de la suma de proteínas totales en las fracciones (S1+S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente *Triton X-100*. De los ratones no tratados (NT) y con dieta hipercolesterolémica (HC) a los días 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo. Se aplico una ANOVA de dos vías con análisis de Bonferroni con un  $p < 0.05$  (\*).**

### 9c. Actividad colinesterásica

Al analizar la actividad colinesterásica extraída por un método secuencial (apartado 8e del Métodos) primero sin detergente (proteínas débilmente unidas a membrana)

La actividad acetilcolinesterasa de los hígados de ratones alimentados con dieta HC mostró valores similares a los ratones NT durante los días 2 y 15 en ambas fracciones. No obstante, a los 30 días de tratamiento, se observó un aumento significativo en la fracción extraída con amortiguador salino conteniendo detergente

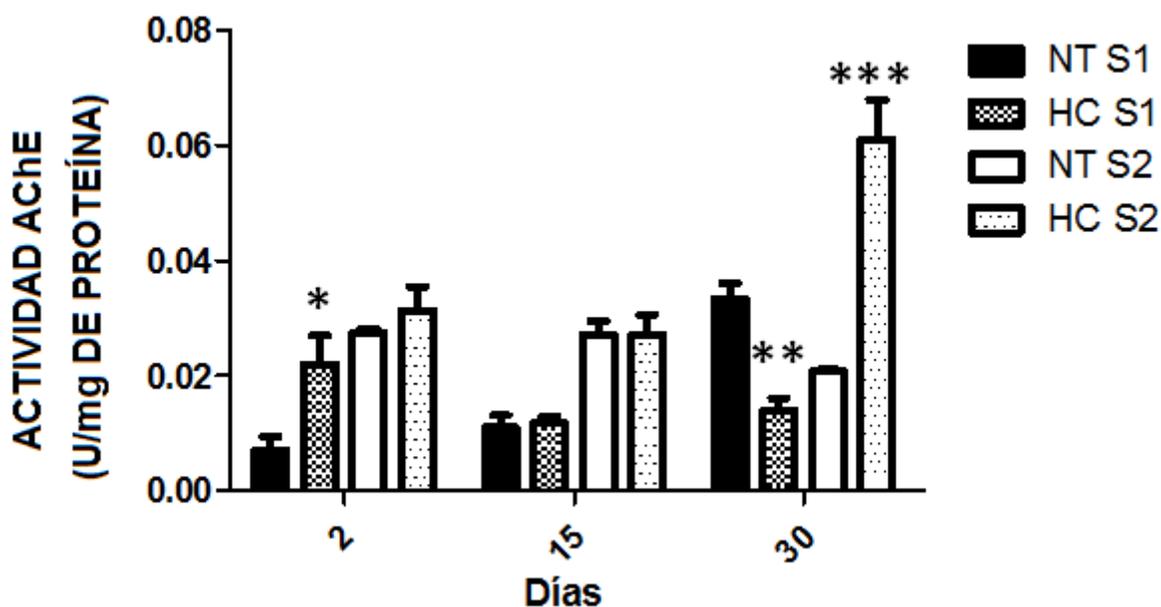
(representan las formas enzimáticas fuertemente unidas a membrana), así como una aparente disminución en la actividad extraída con amortiguador salino sin detergente (Figura 21).



**Figura 21: Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) expresada en (u/ml), los ratones no tratados (NT) y alimentados con dieta hipercolesterolémica (HC) a los días 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo. De las fracciones (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente Triton X-100. Se aplico una ANOVA de dos vías con análisis de Bonferroni con un  $P < 0.05$  (\*).**

Al analizar la actividad específica AChE en U/mg, (Figura 22) solo se encontraron diferencias significativas en los hígados de 2 y 30 días. En el caso de los 2 días de tratamiento se observa una diferencia significativa en las proteínas unidas débilmente unidas a la membrana (proteínas débilmente unidas a membrana) de los ratones alimentados con la dieta HC en comparación con los controles. La otra diferencia se observó a los 30 días de tratamiento, en este caso, hubo una disminución en las

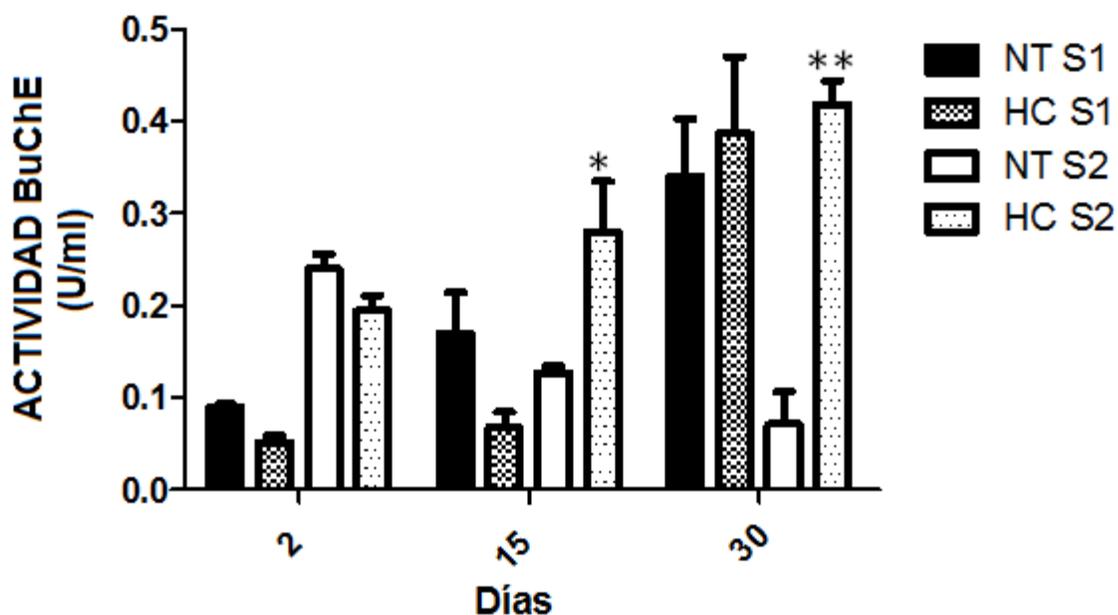
proteínas unidas débilmente unidas a la membrana (proteínas débilmente unidas a membrana) de los ratones tratados con la dieta HC; pero, caso contrario, se observa un aumento en las proteínas fuertemente unidas a la membrana (fuertemente unidas a la membrana) de los ratones tratados con la dieta hipercolesterolémica.



**Figura. 22: Actividad específica AChE expresada (U/mg).** De los ratones no tratado (NT) y de los alimentados con dieta hipercolesterolémica (HC) a los días 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo. En las fracciones (S1 y S2). Se aplicó una ANOVA de dos vías con análisis de Bonferroni con un  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*)

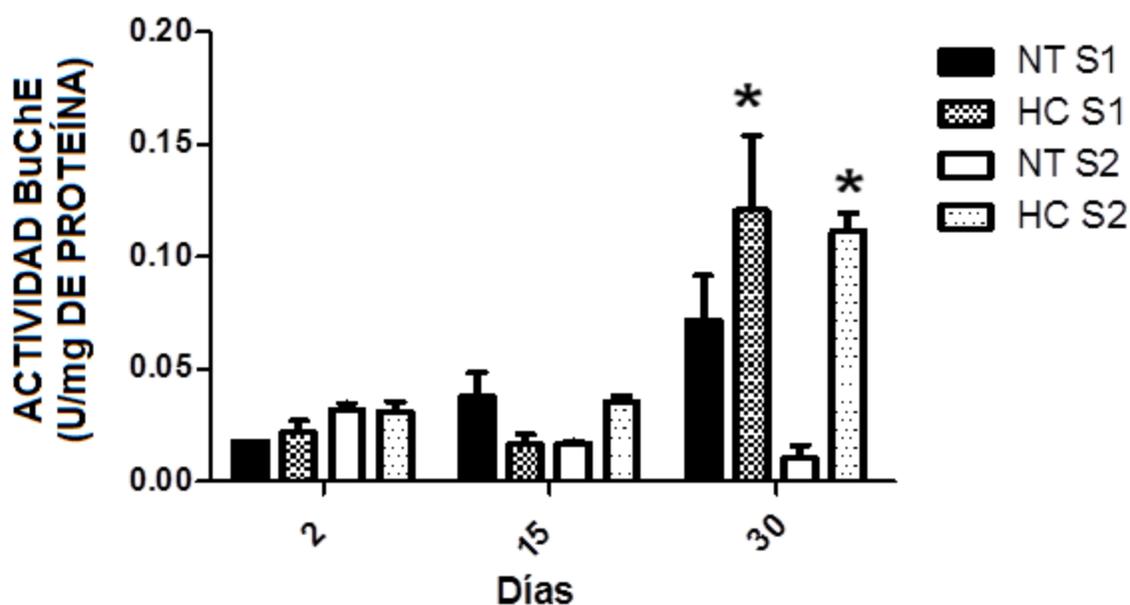
Al analizar la actividad de la butirilcolinesterasa, se observó una disminución en las U/ml en la fracción proteínas débilmente unidas a membrana de los ratones tratados con la dieta HC a los 2 y 15 días sin ser significativa, no así en las fracciones proteínas fuertemente unidas a la membrana de los ratones tratados con la dieta HC

en los días 15 y 30, las cuales tuvieron aumentos significativos con respecto a sus controles (Figura 23). Esto concuerda con la AChE, ya que al igual, a los ratones tratados a los 30 días con la dita, también hubo un aumento en las **U/ml**. (figura 21).



**Figura 23: Actividad butirilcolinesterasa (BChE) expresado en U/ml** de la extracción secuencial de **BChE** en los hígados de ratones no tratados (**NT**) y los alimentados con dieta hipercolesterolémica (**HC**) a los días 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo. De las fracciones (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente Triton X-100. Se aplico una ANOVA de dos vías con panálisis de Bonferroni con un  $p < 0.05$  (\*) y  $P < 0.001$  (\*\*)

Al medir la actividad de la BChE en U/mg, observamos un incremento estadísticamente significativo los ratones tratados con la dieta HC, a los 30 días, tanto en las fracción de las proteínas débilmente unidas a membrana como las proteínas fuertemente unidas a la membrana, en los demás días de tratamiento no encontramos diferencias significativas. (Figura 24)



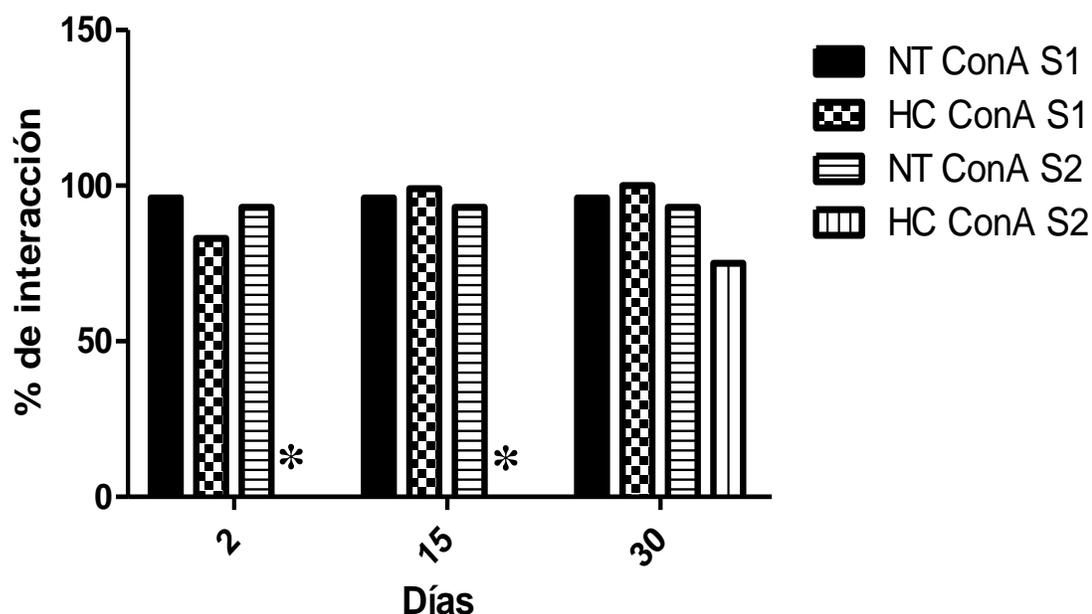
**Grafica 24: Actividad específica de butirilcolinesterasa expresada en (U/mg) de hígado de ratón alimentado con dieta hipercolesterolémica (HC) y dieta normal (NT) de la extracción secuencial de los grupos a los días 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo. De las fracciones (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente Triton X-100. Se aplico una ANOVA de dos vías con análisis de Bonferroni con un  $p < 0.05$  (\*)**

#### **9d. Estudio del procesamiento post-traducciona de las colinesterasas mediante la interacción con lectinas**

Las lectinas representan una herramienta útil en análisis del perfil glicoproteico de las proteínas, que en el caso de este trabajo se consideró un buen indicador del estado del procesamiento post-traducciona, tanto AChE como BuChE en el hígado.

Las lectinas (Con-A, LCA y WGA) indican el paso de las enzimas por el retículo endoplásmico rugoso (RER) y las cisternas del complejo de Golgi, ambas enzimas (AChE y BChE) habrán incorporado cantidades variables de manosa, la cual es reconocida por la lectina Con-A, manosas con centros de fucosa que es reconocida por la lectina LCA y N-acetilglucosamina o ácido siálico la cual es reconocida por la lectina WGA.

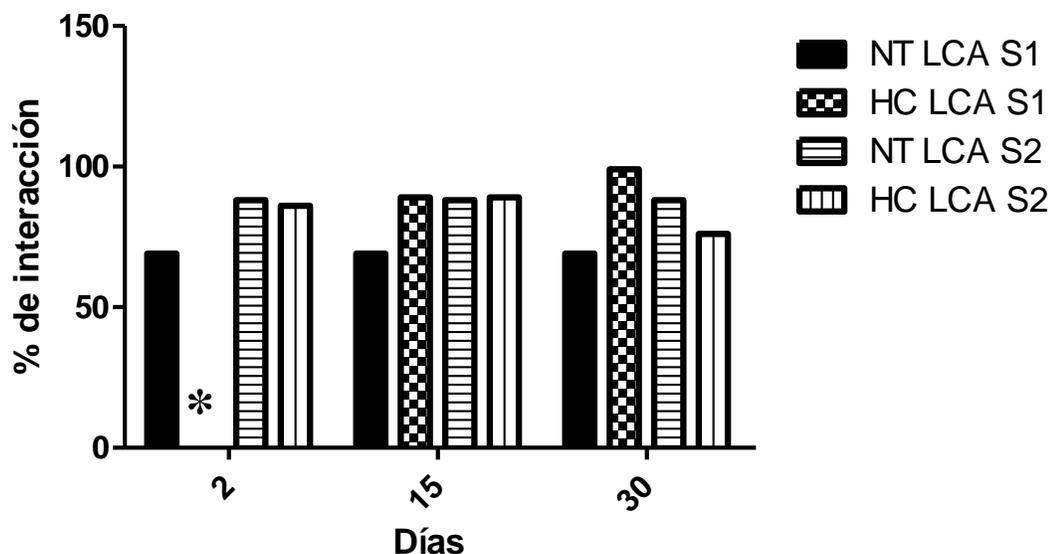
En primera instancia, en las especies enzimáticas de AChE, se determinaron los niveles de incorporación de manosa a través de la interacción con la lectina de *Concanavalina ensiformis* (Con A), donde se observó una elevada interacción con la lectina (90-95%) en los distintos tiempos de análisis, no siendo estadísticamente distintas en las fracciones S1 entre ambos grupos de ratones. No obstante, en el caso de las fracciones fuertemente unidas a membrana, se observó en los ratones alimentados con dieta HC una escasa interacción en los 2 y 15 días de tratamiento, no observándose diferencia a los 30 días de tratamiento (Figura 25).,



**Figura 25: Porcentaje de interacción de la acetilcolinesterasa con lectina de alta especificidad Concanavalina (Con-A) y la acetilcolinesterasa extraída los hígado de ratón alimentado con dieta hipercolesterolémica (HC) y dieta normal (NT) de la extracción secuencial para obtención de (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente triton X-100 de los grupos de 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo. No se encontraron diferencias significativas.**

Siguiendo la misma estrategia experimental, se determinaron en las especies enzimáticas AChE de hígado, los niveles de incorporación de manosa asociados a centros de fucosa mediante la interacción con la lectina de *Lens culinaris* (LCA), donde se observó un elevado porcentaje interacción (75-95%) en los distintos tiempos de análisis, La comparación en los niveles de interacción en la fracción débilmente unida a membrana mostró diferencias estadísticas en los distintos tiempos de tratamiento. Mientras, que en el caso de las fracciones fuertemente

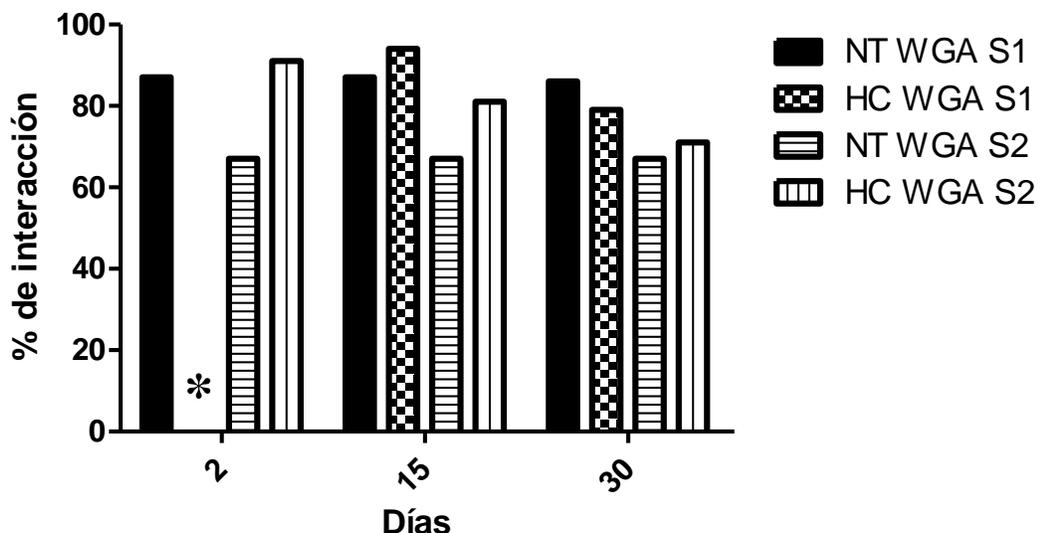
unidas a membrana no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos grupos de ratones (Figura 26).



**Figura 26: Porcentaje de interacción de la acetilcolinesterasa con lectina de *Lens culinaris* (LCA) y la acetilcolinesterasa (AChE) extraída del hígado de ratón alimentado con dieta hipercolesterolémica (HC) y dieta normal (NT) de la extracción secuencial para obtención de (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza iónica sin y con detergente de los dos grupos a los 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo.**

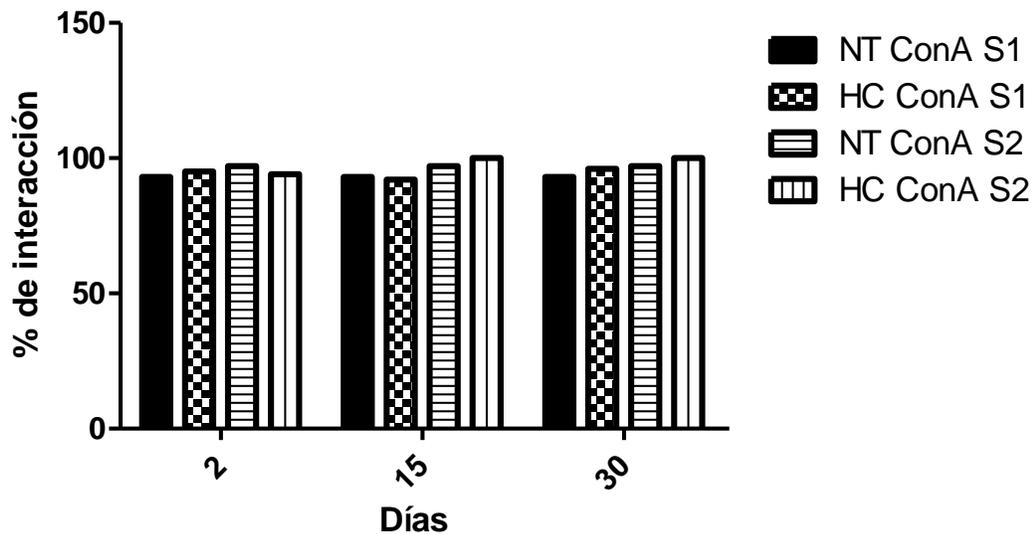
Por último, de la incorporación de N-acetilglucosamina o galactosa en las especies enzimáticas AChE estimada a través de la interacción con la lectina de *Triticum vulgare* (WGA) mostró que un elevado nivel de interacción en los ratones bajo tratamiento con la dieta HC y en ratones sanos. La valoración en las fracciones débilmente unidas a membrana mostró diferencias significativas al día 2 de tratamiento, donde se observó una nula interacción en los ratones alimentados con dieta HC. Mientras, que en caso de las fracciones fuertemente unidas a membrana

se observó una tendencia a mayor presencia en los ratones alimentados con dieta HC de formas enzimáticas que incorporaron N-acetilglucosamina y/o galactosa, no siendo estadísticamente diferente (Figura 27).



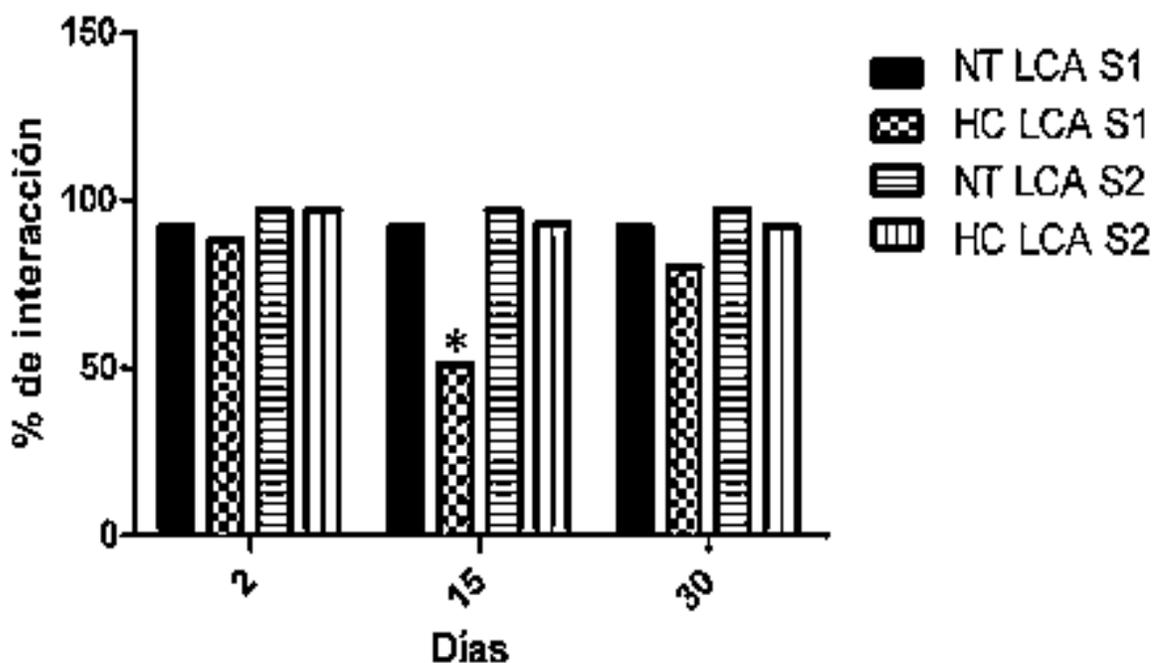
**Figura 27: Porcentaje de interacción de la acetilcolinesterasa con lectina de alta especificidad (WGA) y la acetilcolinesterasa extraída los hígado de ratón alimentado con dieta hipercolesterolémica (HC) y dieta normal (NT) de la extracción secuencial para obtención de (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente de los dos grupos a los 2, 15 y 30 días. Con una n=3 por cada grupo.**

Cuando se estimó el nivel de incorporación de azúcares en las especies enzimáticas de BuChE, se encontró que en ambos grupos de animales mostraron elevados niveles de presencia de la manosa, evidenciada como elevados niveles de interacción con la lectina Con-A. Asimismo, no hubo diferencias estadísticas entre ambos grupos de ratones (Figura 28).



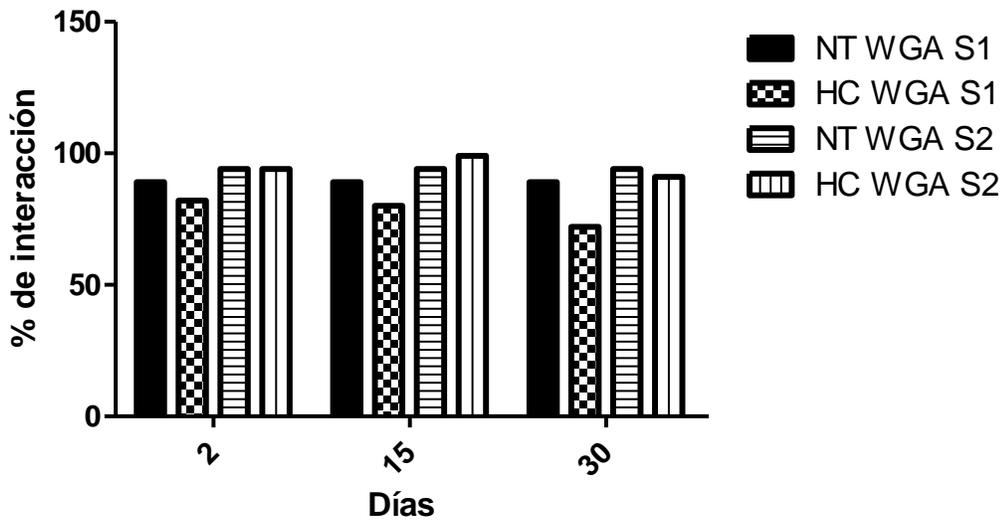
**Figura 28: Porcentaje de interacción de las especies enzimáticas butirilcolinesterasa con la lectina de *Concanavalia ensiformis* (Con-A) y la butirilcolinesterasa (BChE) extraída los hígado de ratón alimentado con dieta hipercolesterolémica (HC) y dieta normal (NT) de la extracción secuencial para obtención de (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente de los dos grupos a los 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo. No hay diferencia significativa.**

Al estimar la presencia de manosa asociada centros de fucosa a través de la interacción con aglutinina de *Lens culinaris* (LCA), se observó que hubo elevados niveles de interacción (80-90%) en las fracciones analizadas. Se encontró una menor interacción en la fracción débilmente unida a membrana en los ratones a los 15 días de tratamiento, que fue estadísticamente diferente a los valores determinados en los ratones control. En los demás tiempos del tratamiento, no se observaron diferencias significativas (Figura 29).

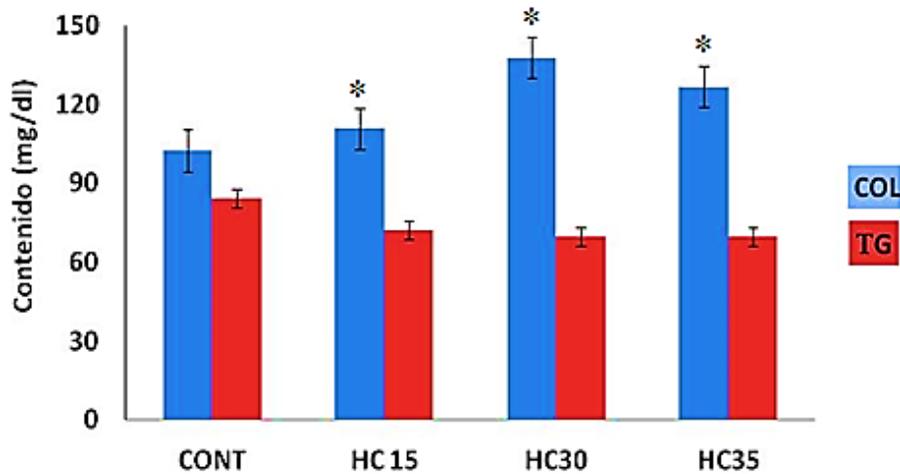


**Figura 29: Porcentaje de interacción con lectina de alta especificidad (LCA) con la butirilcolinesterasa extraída los hígado de ratón alimentado con dieta hipercolesterolémica (HC) y dieta normal (NT) de la extracción secuencial para obtención de (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente de los dos grupos a los 2, 15 y 30 días. Con una N=3 por cada grupo. Existe diferencias significativas entre los grupos hc s1 y los nt s2, con una  $p < 0.05$  (\*).**

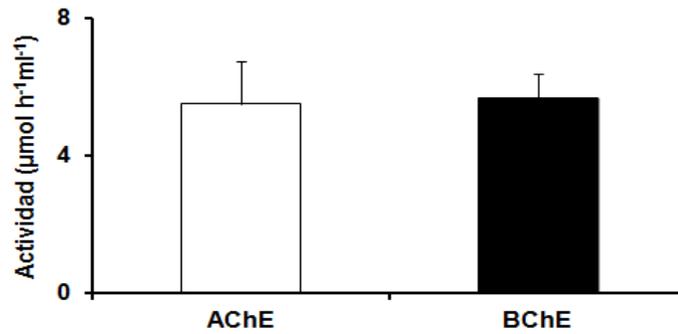
El nivel de presencia de N-acetilglucosamina o galactosa en las especies enzimáticas BChE fue alto en ambos grupos de ratones, Esto lo reflejaron los niveles de interacción entre 70-80% con la lectina de *Triticum vulgare* (WGA). Al realizar la comparación en los porcentajes de interacción en los distintos tiempos de tratamiento de dieta HC, se encontró una disminución en N-actilglucosamina y/o ácido siálico en los ratones control en comparación con los valores de interacción constantes en los ratones alimentados experimentalmente (Figura 30).



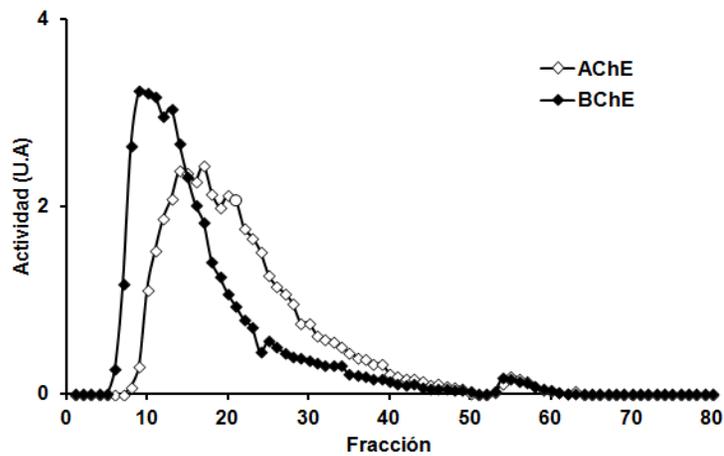
**Figura 30: Porcentaje de interacción con lectina de alta especificidad (WGA) con la butirilcolinesterasa extraída los hígado de ratón alimentado con dieta hipercolesterolémica (HC) y dieta normal (NT) de la extracción secuencial para obtención de (S1 y S2) solubilizadas con buffer salino de alta fuerza ionica sin y con detergente de los dos grupos a los 2, 15 y 30 días. Con una n=3 por cada grupo.**



**Figura 31. La dieta hipercolesterolémica en ratones C67BL/6 provocó alteraciones en los contenidos plasmáticos de triglicéridos y/o colesterol.  $P < 0.05$  (\*). Los valores representan en promedio y desviación estándar de tres a siete ratones. Los valores promedio se compararon por la prueba de ANOVA de dos vías con análisis de Bonferroni con un  $P < 0.05$  (\*).**



**Figura 32. Comparación de las actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en plasma de ratones C57BL/6** previo al tratamiento con la dieta hipercolesterolemica. Las actividades se estimaron por el método de Ellman y colaboradores (1961). Acetilcolinesterasa, **AChE**. Butirilcolinesterasa (**BChE**). (n=30)



**Figura 33. Perfil cromatográfico de las colinesterasas del plasma de ratón C57BL/6 en una matriz hidrofóbica de octil-sefarosa.** En una columna de 10 X 0.5 cm se colocaron 5 mL de la matriz de octil-sefarosa, se equilibraron con 20 volúmenes de la solución salina de extracción sin detergente. Se realizó la mezcla de 30 muestras de plasma, y se pasó un mililitro por la columna a una velocidad de 1 ml/min- Para eluir a las fracciones hidrofílicas se empleó el amortiguador de equilibrio, (se colectaron 40 fracciones) y para separar especies enzimáticas hidrofóbicas se empleó amortiguador Hepes 10 mM conteniendo 2% Triton X-100 (P/V) (Se colectaron 40 fracciones). Se estimaron las actividades acetil- (**AChE**) y butirilcolinesterasa (**BChE**) por el método de Ellman en placa de microtitulación.

## 10. DISCUSIÓN

El contenido de lípidos hepáticos puede ser modificado por la composición de los macronutrientes de la dieta a través de la modulación de la captura, en la lipogénesis, oxidación y secreción de los lípidos. Para la realización de este estudio se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6, que se alimentaron *ad libitum* con una dieta hipercolesterolémica (HC), que en el alimento balanceado contenía en 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio. El consumo de la dieta experimental, no produjo en éstos ratones un aumento en el peso corporal distinto que en los animales alimentados con la dieta balanceada normal (Figura 16).

No obstante, en las figuras 17 y 18, se observó un aumento en el peso del hígado en los ratones alimentados con la dieta HC experimental que podría deberse a un aumento en la incorporación y/o depósito del colesterol en éste tejido. En estudios previos en ratones alimentados con dietas HC, se ha observado un incremento en el colesterol hepático de hasta 8 veces con respecto a ratones alimentados con una dieta balanceada (chow) (Wu et al., 2007, Nuño, 2011). También, se ha informado que los ratones expuestos a una dieta HC a partir de los 7 días de exposición (Nuño, 2011), mostraron un hígado de mayor tamaño en comparación los ratones alimentados con la dieta chow, siendo evidente una diferencia en 0.5 g de peso a los 30 días (Figura 18).

Otra alternativa en el incremento en la relación porcentual entre el peso del hígado y el peso corporal se podría deber a una hipertrofia de las células del parénquima hepático, seguramente para compensar los requerimientos metabólicos necesarios

para contrarrestar el incremento de los lípidos y el colesterol en el hígado. (Nuño, 2011).

Por otro lado, el componente adicional en la dieta HC experimental es el ácido cólico que representa a una sal biliar, que favoreció la emulsificación del exceso de colesterol en la dieta para facilitar su absorción. El hígado posee la capacidad de producir sales biliares que se acumulan en la vesícula biliar hasta que el alimento llega al duodeno; entonces son liberadas al intestino para que ejerzan su función sobre la grasa ingerida. Gran parte de estas sales biliares son reabsorbidas por el hígado (Grundy, 1983), pero un porcentaje importante es secretado en las heces fecales, siendo esta la principal vía de eliminación del colesterol del organismo.

Los resultados previos son una evidencia acerca de los efectos de la dieta HC experimental sobre aspectos fisiológicos del hígado de ratón. Como se muestra en la figura 31, la dieta HC experimental provocó alteraciones en el contenido de triglicéridos y colesterol en el suero de los ratones.

El hígado es el órgano responsable de secretar a las VLDL para distribuir triglicéridos y ésteres de colesterol por todo el organismo. A medida que las lipoproteína lipasa que se encuentran en los tejidos, van hidrolizando los triglicéridos de las VLDL, estas se hacen más pequeñas y más densas y se enriquecen de colesterol hasta convertirse en LDL. Las cuales se unen en los receptores de membrana, a través de los cuales son introducidas en la célula, ya en el interior, el colesterol puede ser dirigido a los diferentes organelos celulares, como son: la membrana plasmática, el

retículo endoplásmico, el complejo de Golgi. Este hecho confirma que la dislipidemia es característico en el HGNA.

Previo al análisis de la actividad enzimática en las fracciones del hígado, se consideró indispensable realizar una perfusión para descartar la presencia de las proteínas contenidas y las actividades acetil y butirilcolinesterasa en los eritrocitos, linfocitos y plasma (Figura 33), y facilitará una estimación fiable de la actividad de las colinesterasas propias del hígado.

Los resultados en la determinación del contenido de proteínas totales (S1+S2) en hígado de ratón mostraron que los ratones alimentados con la dieta HC presentaron un menor contenido de proteínas desde el segundo día, haciéndose estadísticamente significativa a los 30 días del tratamiento (Figura 20), Siendo la fracción S<sub>1</sub>, extraída usando amortiguador con fuerza iónica y sin detergente (representando proteínas débilmente unidas a la membrana) en la que se la dieta HC experimental repercutió negativamente.

Una interpretación a ésta observación se podría relacionar con el hecho de que existe evidencia acerca de que la mitocondria, es el principal organelo que se ve afectado por una dieta alta en colesterol. Debido a que los altos niveles de éste lípido provocan estrés oxidante y por lo tanto, una concentración mayor de especies reactivas de oxígeno, que provocan un daño en el hepatocito (Gutiérrez-Ruiz et al., 2012, Marí et al., 2006). Por lo que, se podría generar un incremento en las proteínas relacionadas con el estrés oxidante, como la catalasa o la superóxido dismutasa. El

incremento de la expresión de estas proteínas antioxidantes representa un mecanismo de hepatoprotección, el cual se ve reflejado en la disminución notable, a los 30 días de tratamiento con la dieta HC, de otras proteínas. Mientras, que a los 15 días de tratamiento, no se observaron diferencias, esto podría deberse a que los ratones expuestos a la dieta HC las células hepáticas transcurren por un estado de adaptación.

Otra interpretación sobre la disminución en el contenido de proteínas totales se podría relacionar con el hecho de que los ratones alimentados con dieta HC experimental cursen por una insuficiencia hepática aguda que ocurre cuando se produce daño masivo del hígado, y se compromete al menos el 70% de la masa hepática funcional, esto produce alteración de una o más funciones hepáticas, por ejemplo el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas o la síntesis de proteínas plasmáticas (Guyton, 1993) esto podría verse reflejado en una disminución en el contenido de proteínas plasmáticas extraídas con fuerza iónica, por ejemplo la hipoalbuminemia (Figura 19).

El nivel de actividad y el patrón de especies enzimáticas de las ChEs son específicos de especie y tejido. En los mamíferos, la actividad AChE se localiza principalmente en el sistema nervioso (Deutsch et al., 2002, Dori y Soreq, 2006, Perrier et al., 2005) y muscular, pero también en las células sanguíneas y placenta (Deutsch et al., 2002, Gómez et al., 2003, Perrier et al., 2005, Dori y Soreq, 2006).

Se ha establecido que el hígado intacto, en cultivos primarios o líneas celulares derivadas de hígado de mamíferos poseen la capacidad de sintetizar AChE (Schuman y Hunter, 1986; Bermisone et al., 1989; Gómez et al., 2000; Ruano et al., 2000, García-Ayllón et al., Askar et al., 2011, 2006, 2012). En la figura 21, se mostraron los cambios en la actividad acetilcolinesterasa respecto al volumen (U/ml) en el hígado de ratones alimentados con dieta HC, fueron más drásticos en la fracción de las proteínas fuertemente unidas a la membrana (especies enzimáticas fuertemente unidas a la membrana). Se ha descrito este comportamiento en la actividad AChE de la fracción unida a membrana de rata expuesta de manera crónica al etanol (Ruano et al., 2000).

Asimismo, en el análisis de los niveles de la actividad AChE en hígado de ratas cirróticas por ligado del ducto biliar después de tres semanas, se ha observado una disminución en un 50% en la actividad comparada con la actividad extraída de hígado de ratas control-simuladas de operación (no-ligadas). La disminución se relacionó con una pérdida de la forma tetramérica de la AChE (García-Ayllón et al., 2006). Sin embargo, en un estudio en hígado humano cirrótico no se determinaron cambios en la actividad respecto a controles sanos. Pero si se informaron cambios significativos en los niveles de proteína y en sus mensajeros para la AChE (García-Ayllón et al., 2012).

Por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida, se han detectado varias esterasas en hígado de roedores (Kaneko et al., 1972). Los valores de actividad específica estimados en ratones control de la cepa C57BL/6 (0.4 U/g tejido) fueron similares a los valores estimados en otras estirpes de ratón, 129Sv ( $0.35 \pm 0.03$  U/g

tejido) (Li et al., 2000) y en hígado de rata (Perelman y Brandan, 1989; Perelman et al., 1990). El análisis de la actividad específica acetilcolinesterasa en hígado de ratones alimentados con dieta HC experimental (Figura 22) mostró diferencias significativas a 2 y 30 días de tratamiento, siendo distinta en ambos casos. Mientras que a los dos días, se observó un aumento significativo en las especies enzimáticas débilmente unidas a la membrana (fracción S1) de los ratones alimentados con la dieta HC en comparación con los ratones controles. A los 30 días de tratamiento con dieta HC, se observó una disminución en las proteínas unidas débilmente unidas a la membrana (fracción S1) y un aumento en las proteínas fuertemente unidas a la membrana (fracción S2) en comparación con los ratones control. Este comportamiento parece reflejar el hecho de que el HGNA en comparación con la cirrosis es un estado agudo y reversible de una patología hepática.

Asimismo, parece reflejar un efecto diferencial sobre la síntesis de proteína. En el día 2 de tratamiento con la dieta HC repercute de manera positiva en la síntesis de proteínas débilmente unidas a membrana, entre las que se incluirían formas moleculares de la AChE con carácter hidrofílico.

Se podría esperar que la disminución en el contenido de proteínas totales favorezca valores mayores de actividad específica AChE en la fracción de las proteínas débilmente unidas a membrana al día dos de tratamiento. En tanto, que al día 30 de tratamiento con la dieta HC, las proteínas hidrosolubles disminuyen de manera considerable, pero no repercutieron sobre los valores calculados de la actividad específica AChE.

Respeto de los dos párrafos anteriores, para establecer la disminución en las formas hidrofílicas, sería necesario realizar el análisis de formas moleculares por la centrifugación diferencial de gradientes de densidad sacarosa, o bien, determinar el nivel de los transcritos AChE que sustentan la actividad acetilcolinesterasa con carácter hidrofílico.

Como se ha descrito, en los ratones C57BL/6 la administración de la dieta HC experimental provocó cambios en la actividad acetilcolinesterasa en hígado que pueden tener repercusiones a nivel fisiológico. A) Participar como un filtro hidrolítico a la llegada de la acetilcolina circulante en sangre, impidiendo el acceso a los receptores muscarínicos y/o nicotínicos, y así impedir sus efectos negativos. A este respecto, en hígado de ratón y rata se ha establecido la presencia de monómeros y dímeros de AChE anclados por un enlace glicofosfatidilinositol (Perelman et al., 1990; Gómez et al., 2000) que son abundantes en dominios de membrana plasmática denominados “balsas lipídicas” de los hepatocitos y células sinusoidales (Pol et al., 1999). B) Relacionado con el papel de filtro, las evidencias señalan que en el hígado normal cada compartimento de célula precursora hepática (HPC), conocidas como células ovas es rodeado por un cierto número de hepatocitos, que inhiben la unión de la acetilcolina a los receptores muscarínicos tipo-3 ubicados sobre las HCP. Cuando ocurre una pérdida y alteración en la proliferación de los hepatocitos la actividad colinesterásica disminuye proporcionalmente a la severidad en la pérdida de los hepatocitos. Esto facilita que la acetilcolina ejerza sus efectos tróficos sobre los HPC, en tanto, la biomasa de los hepatocitos se restaura

(Cassiman, et al 2002). Lo anterior, se relaciona con el elevado nivel de irrigación sanguínea que presenta el hígado.

Adicionalmente, se sabe que el hígado graso representa una progresión hacia al desarrollo de la cirrosis y en casos extremos es posible que degenera a hepatocarcinoma. La actividad específica AChE se vio alterada de manera positiva desde los dos días de tratamiento, y al igual que en las proteínas totales, se observó un proceso adaptativo a los 15 días de tratamiento con la dieta HC, y al llegar a los 30 días nuevamente se evidenció un aumento en la actividad AChE. Estos resultados podrían relacionarse a que el HGNA, en sus estadios tempranos probablemente refleje daño tisular ocasionado por el estrés oxidante y el exceso de colesterol en los hepatocitos (Gutiérrez-Ruiz, 2012).

Probablemente la actividad de la AChE se pueda utilizar como un indicador para detectar carcinomas hepáticos (Zhao et al., 2011) La posibilidad de que la AChE participa en el desarrollo de nódulos cancerosos requiere más investigación (García-Ayllón et al., 2012).

Los niveles séricos de actividad de BChE han sido ampliamente utilizados como una prueba de la función hepática. Sólo unos pocos estudios con un bajo número de pacientes se han evaluado los niveles de colinesterasa en el hígado humano (George, 1981, Manoharan et al., 2007). Como se mostró, la actividad BChE extraída de hígado de ratones tratados con la dieta HC fue superior en la fracción S2 (fuertemente unidas a membrana) estadísticamente a los días 15 y 30 (Figura 23)

(U/ml), y a los 30 días de tratamiento en ambas fracciones que la estimada en ratones control.

El mecanismo molecular por el que se sustenta la participación de la actividad BChE en el metabolismo lipídico; a) Interactúa de manera directa o a través de una acción sinérgica con esterasa de colesterol. Hecho que sustenta en las correlaciones significativas entre la actividad de la BChE y los niveles de triglicéridos, colesterol-HDL y colesterol-LDL (Kutty y Payne, 1994; Valle et al., 2006; Alcantara et al., 2005), b) Regula en la degradación de butirilcolina, un intermediario del metabolismo lipídico, A este respecto, se ha demostrado que existe una estrecha relación entre BChE sérica, colesterol y triglicéridos (Randell, 2005). En estudios experimentales durante el engorde de cerdos, se observó un aumento en la actividad BChE, se consideró que probablemente se debía a una respuesta adaptativa de la síntesis hepática de ésta enzima en el metabolismo lipídico (Randell, 2005) asociación entre la actividad BChE sérica con la enzima lecitina-colesterol acil-transferasa, cuyos valores fueron inferiores a los normales en la enfermedad hepática y más altos en la hipertrigliceridemia endógena y, también se correlacionó positivamente con el colesterol sérico y los triglicéridos, por lo tanto, se ha sugerido que ambas enzimas hepáticas pueden ser inducidas por un recambio intensificado en los lípidos y las lipoproteínas séricos. (Cucuianu, 1978)

Teniendo en cuenta, lo anterior nuestros resultados representan una evidencia sobre la participación de la actividad BChE sobre el metabolismo de los lípidos en la condición de HGNA generada por el tratamiento con una dieta experimental HC.

Siendo probablemente las formas fuertemente unidas a membrana (S2) de la BChE residentes en las células hepáticas, las posibles responsables de participar en el metabolismo de los lípidos en el hígado.

Con base en los resultados en la actividad BChE en las fracciones débilmente unidas a membrana (S1), se puede considerar que la dieta experimental HC, también se vieron alteradas. Esto con base en las siguientes observaciones. A los 30 días de tratamiento se observó un efecto negativo significativo en el contenido de proteínas hepáticas (Figura 19), y en los días 2 y 30 de tratamiento. Teniendo en cuenta, a) La estimación de la actividad BChE se ha usado como una prueba de la función hepática o como un índice de la síntesis de proteínas (Faye, 1988), b) Por su carácter hidrodinámico hidrofílico, las especies enzimáticas que componen la fracción S1, serán parte de la actividad BChE plasmática (Figura 32 y Figura 33), c) se ha sugerido que el contenido de la proteína BChE en plasma es dependiente de la función hepática normal y el adecuado suministro de aminoácidos (Lockridge, 1988).

Algunas funciones alternativas de la BChE: a) Proteger a la actividad AChE de la inhibición por exceso de la acetilcolina, debido a que la BChE, no es inhibida, Al hidrolizar al neurotransmisor impide efectos deletéreos en las uniones neuromusculares y en otros sitios colinérgicos (Neville et al., 1990; Soreq, et al., 1992), b) Control de los niveles de colina y acetilcolina plasmáticos, c) Hidrolizar los ésteres de colina tóxicos que se originan del metabolismo de los lípidos (Clitherow et al., 1963), d) Estabilización de lipoproteína- $\beta$  cuando BChE interactúa con el sitio fosfocolina de la fosfatidilcolina de la lipoproteína, e) Influir en la presión sanguínea,

porque la acetilcolina induce la vasodilatación por estimular la liberación de óxido nítrico vía los receptores muscarínicos endoteliales (Valle, 2008), g) Hidrolizar a fármacos, como la aspirina, succinilcolina. Éste último relajante muscular cuando se administra a pacientes deficientes en la actividad BuChE son paralizados por 2h debido a que no hidrolizan al relajante, a diferencia de sujetos normales, cuyo efecto dura entre 3 a 5 minutos.(Lockridge, 1990; Ostergaard et al., 2000).

Las colinesterasas son glicoproteínas que durante su procesamiento post-traducciona se les incorpora cuando exponen un residuo de asparagina (sitio potencial de glicosilación) un oligosacárido rico en manosa en el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER). El oligosacárido contiene en su base, dos residuos de N-acetilglucosamina, luego nueve residuos de manosa y tres residuos de glucosa, la composición del oligosacárido se modifica entre el RER y el Complejo de Golgi.

Para que una proteína abandone el RER requiere que se hayan eliminado dos o tres glucosas por acción de las glucosidasas I y II, y además cuatro manosas por actividad de manosidasas. El glicotipo de exportación debe contener: dos N-acetilglucosamina, cinco manosas, una o sin glucosa. Las colinesterasas se desplazan en vesículas de transporte del RER al Complejo de Golgi.

La funcionalidad enzimática compartamentalizada de éste último facilita la adición o eliminación de azúcares, en las cisternas Cis (cara de formación) y medias. La eliminación de residuos de manosa ocurre en las regiones Cis y media, facilitada por las manosidasa I y manosidasa II. Como se muestra para las especies enzimáticas

AChE (Figura 25) y BChE (Figura 28), la lectina de Con-A permitió establecer diferencias en la incorporación y/o modificación en la presencia de los residuos de manosa. Los resultados en los ratones alimentados experimentalmente con dieta HC evidencian que se indujo una glicosilación aberrante reflejada por una nula interacción con la lectina Con-A. Los resultados parecen señalar la ausencia de residuos de manosa expuestos, razón por la que no se determinaron valores de interacción (Figura 25). Mientras, que en el caso de la presencia de residuos de manosa en las especies enzimáticas BChE, se observa que el tratamiento con una dieta rica en colesterol, no modificó en patrón de incorporación y/o modificación (Figura 28).

El análisis de la incorporación de residuos de manosa asociados a centros de fucosa en las especies enzimáticas AChE extraídas sin detergente de hígado de ratones alimentados experimentalmente con dieta HC mostró un doble efecto: al día dos, provocó una nula presencia, y a los días 15 y 30, ya que indujo una mayor presencia. Este comportamiento podría relacionarse con un efecto diferencial en las glicosiltransferasas específicas.

En el caso de la incorporación de los residuos de N-acetilglucosamina ocurre en las cisternas media del complejo de Golgi catalizada por la enzima N-acetilglucosaminotrasferasa I y el ácido siálico se incorpora a la enzima en la red trans-Golgi ocurre la adición de la ácido siálico por la  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Jiménez y Merchant 2003). En la fracción débilmente unida a membrana (S1) de los ratones alimentados con dieta experimental HC fue evidente una tendencia a una menor

interacción con la lectina de *Triticum vulgare*. Este comportamiento puede tener varias consideraciones: a) El hígado es el órgano productor de la actividad BChE plasmática, la fracción de las proteínas débilmente unidas a membrana (S1) podría representar a éste tipo de especies enzimática, b) La abundancia de formas tetraméricas en plasma y su bajo contenido en el hígado, se ha sugerido que después de su ensamblado, éstas especies enzimáticas son secretadas rápidamente, mientras que, las especies ligeras (fracción fuertemente unidas a membrana –S2-, se mantienen asociadas a membranas internas en las células hepáticas (Gómez et al., 2000), c) estudios de mutagenesis dirigida han evidenciado que cuando se suprime(n) algún(os) sitio(s) potencial(es) de glicosilación la vida media de la enzima en circulación es menor. En especies enzimáticas sin ácido siálico incorporado se reduce aún más la vida media circulatoria. Por lo que, una menor tendencia en la incorporación de ácido siálico podría relacionarse con una alteración en la vida media de enzima débilmente unida a membrana producida en el hígado (Kronman et al., 1995). Lo anterior abre la posibilidad de definir si se trata de residuos de N-acetilglucosamina o ácido siálico, las fracciones S1 y/o S2 se incubarían con sialidasa que podrían volver a incubarse con la lectina específica y compararse con los datos originales.

Pero en el caso de la interacción con la aglutinina LCA, se observó que solo controles parece presentaron manosas con centro de fucosa. El patrón de interacción señaló que los ratones alimentados con la dieta hipercolesterolémica parece que no hubo incorporación de este carbohidrato. Al igual que los que interactuaron con la

aglutinina WGA, donde solo los controles mostraron ácido siálico y/o N-acetilglucosamina que fueron reconocidas por esta lectina. (Figuras 26 y 27)

Debido al elevado grado de irrigación sanguínea que presenta el hígado. García-Ayllón y colaboradores (2006) señalan que la disminución en los niveles de AChE sérica y los patrones de glicosilación en ratas cirróticas, pueden ser usados como marcadores de cirrosis hepática. Se ha propuesto que el incremento en plasma de las glicofomas de BChE ricas en fucosa tiene un valor pronóstico para identificar a los pacientes con riesgo elevado de contraer cáncer de hígado, así como para discriminar entre los pacientes que presentan cirrosis y los que padecen hepatitis crónica (Ohkura et al., 1994).

## 11. CONCLUSIONES

La dieta hipercolesterolémica produjo una disminución en el contenido de proteínas totales (S1+S2) en hígado de ratón desde el segundo día de tratamiento, haciéndose estadísticamente significativa a los 30 días. La fracción de las proteínas débilmente unidas a membrana (S1), extraída usando amortiguador con fuerza iónica y sin detergente (representando proteínas débilmente unidas a la membrana) en la que se la dieta **HC** experimental repercutió negativamente.

### **Actividad acetilcolinesterasa:**

La infiltración grasa en el hígado causó cambios en la actividad acetilcolinesterasa respecto al volumen (U/ml) en el hígado de ratones alimentados con dieta HC, fueron más drásticos en la fracción de las proteínas fuertemente unidas a la membrana (S2) (especies enzimáticas fuertemente unidas a la membrana).

En el caso de la actividad específica (U/mg) se observó un aumento significativo en las especies enzimáticas débilmente unidas a la membrana (fracción S1) de los ratones alimentados con la dieta HC en comparación con los ratones controles. A los 30 días de tratamiento con la dieta HC, se determinó una disminución en las proteínas unidas débilmente unidas a la membrana (fracción S1) y un aumento en las proteínas fuertemente unidas a la membrana (fracción S2) en comparación con los ratones control.

## **Actividad butirilcolinesterasa**

La actividad BChE extraída de hígado de ratones tratados con la dieta HC fue superior en la fracción que representó a las formas enzimáticas fuertemente unidas a membrana a los 15 y 30 días, y a los 30 días de tratamiento en ambas fracciones (S1 y S2). Los resultados parecen señalar que las especies enzimáticas de la BChE fuertemente unidas que representarían las residentes en las células hepáticas, son las posibles responsables de participar en el metabolismo de los lípidos en el hígado. No obstante, con base en los resultados en la actividad BChE en las fracciones débilmente unidas a membrana (S1), se puede considerar que la dieta experimental HC, también se vieron alteradas. A los 30 días de tratamiento se observó un efecto negativo significativo en el contenido de proteínas hepáticas.

La actividad y/o estructura de ambos tipos de colinesterasas, presento cambios, esto sugiere que la esteatosis hepática puede relacionarse con la actividad de ambas colinesterasas, siendo la AChE más susceptible.

La alteración estructura-función podría estar asociado con el procesamiento post-traducciona l anormal. En el caso de BChE, el cambio en la actividad sugiere una asociación con el síndrome metabólico, la diabetes, la hipertensión, la hiperlipidemia y/o esteatosis hepática.

La administración de la dieta HC indujo cambios en la incorporación de manosa (Con-A) y fucosa asociada a manosa (LCA) que podrían influir en la estructura

tridimensional y/o funcionalidad de las colinesterasas (AChE y BChE), y esto podía verse reflejado en los cambios en la actividad de las colinesterasas.

Los resultados del análisis de la glicosilación mostraron:

- a) El proceso de incorporación y/o modificación de los residuos de manosa es específico en cada colinesterasa
- b) En las formas enzimáticas AChE de los ratones alimentados experimentalmente con dieta HC se alteró la incorporación y/o modificación de los residuos de manosa según se desprende de la comparación de los porcentajes de interacción la lectina de *Concanavalia ensiformis*.
- c) En las especies enzimáticas AChE de los ratones alimentados con la dieta HC se modificó la incorporación de manosa asociada a centros de fucosa.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara VM, Oliveira LC, Réa RR, Suplicy HL and Chautard-Freire-Maia EA (2003). Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. *Int. J. Obes.* 7: 1557-1564.
- Alcantara VM, Oliveira LC, Rea RR, Suplicy HL, Chautard- Freire-Maia EA. (2005). Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43: 285–288.
- Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpine PJ. (1991). The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics.* 11: 452–454.
- Arpagaus M, Chatonnet A, Masson P, Newton M, Vaugan TA, Bartels CF, Nogueira Cp, La Du BN, Lockridge O. (1991). Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. *J. Biol. Chem.* 266: 6966-6974.
- Askar KA, Kudi AC, Moody AJ. (2011). Purification of soluble acetylcholinesterase from sheep liver by affinity chromatography. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165: 336-346.
- Austin L. y Berry W.K. (1953). Two selective inhibitors of cholinesterase. *Biochem. J.* 54: 695-700.
- Baratta JL, Ngo A, Lopez B, Kasabwalla N, Longmuir KJ, Robertson RT. (2009). Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative

immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem. Cell. Biol.* 131:713–726

- Bellentani S, Marino M. (2009). Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann. Hepatol.* 8: S4 - S8.
- Bermisone P, Katz E, Napp M, Azcurra J. (1989). Acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase activities in rat liver: subcellular localization, molecular forms, and some extraction properties. *Biochem. Cell. Biol.* 67: 817-822.
- Blomme, B., Van Steenkiste, C., Callewaert, N. y Van Vlierberghe, H. (2009). alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J. Hepatol.* 50: 592–603.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbings R. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 40: 1387–95
- Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, Desmet V, Denef C, Roskams T. (2002). The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am. J. Pathol.* 161: 521-530.
- Cause X, Gargot D, Michenet P. (1995). Stéatoses hépatiques. *Premiere partie: steatosesm acrovesiculaires.* *Gastroenterol. Clin. Biol.* 19: 50-56.
- Clitherow J.W, Mitchad M., Harper N.J. (1963). The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature.* 199: 1000-1001.

- Colell A, Garcia-Ruiz C, Luis JM, Coll O, Mari M, and Fernandez-Checa JC. (2003). Colesteron impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem* 278, 33928-33935.
- Cucuianu M, Opincaru A, Tapalagă D. (1978). Similar behaviour of lecithin:cholesterol acyltransferase and pseudocholinesterase in liver disease and hyperlipoproteinemia. *Clin. Chim. Acta.* 85: 73–97.
- Cucuianu M, Popescu TA, Haragus A. (1968). Pseudocholinesterase in obese and hyperlipidaemic subjects. *Clin. Chim. Acta.* 22:151–155.
- Cucuianu M, Popescu TA, Opincaru A, Haragus S. (1975). Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmine in various types of hyperlipoproteinaemia. *Clin. Chim. Acta.* 59: 19–27.
- Cygler M, Rose D R y Bundle D R (1991). Recognition of a cell-surface Oligosaccharide of pathogenic Salmonella by an antibody Fab Fragment. *Science* 253: 442-445.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. (2003). Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 131-138.
- De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P and Delporte C (2004). Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: Identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 145:4997-5005
- Deutsch VR, Pick M, Perry C, Grisaru D, Hemo Y, Golan-Hadari D, Grant A, Eldor A, Soreq H. (2002). The stress-associated acetylcholinesterase variant

AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Exp. Hematol.* 10: 1153-1161.

- Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid. Res.* 34: 1637-1659.
- Donohue TM. (2007). Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J. Gastroenterol.* 13: 4974-4978.
- Dori A, Soreq H. (2006). ARP, the cleavable C-terminal peptide of "readthrough" acetylcholinesterase, promotes neuronal development and plasticity. *J. Mol. Neurosci.* 28: 247-55.
- Eckenstein F. and Sofroniew M.V. (1983). Identification of central cholinergic neurons containing both choline acetyltransferase and acetylcholinesterase and of central neurons containing only acetylcholinesterase. *J. Neurosci.* 3: 2286-2291.
- Faye SA. (1988). Investigation on plasma cholinesterase in man and animals using succinylcholine as the substrate. Tesis doctoral. The University of Leeds. 169 pp.
- Ferré P, Foufelle F. (2010). Hepatic steatosis: a role for *de novo* lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes. Metab.* 2: 83-92.

- Freneaux E, Pessayre D. (1993). Stéatoses. phospholipidoses et lesions pseudo-alcooliques sépatiqués' origine medicamenteuse. Gastroenterol. Clin. Biol. 17: H36-H43.
- Friedman S. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol. Rev.* 88: 125–172
- Frimmer M, Ziegler K, Kessler H, Haupt A. (1988). Azidobenzamido-008, a new photosensitive substrate for the 'multispecific bile acid transporter' of hepatocytes: evidence for a common transport system for bile acids and cyclostatins in basolateral membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 945: 263-272.
- Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR and Chautard-Freire-Maia EA (2008). Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chem. Biol. Interact.* 175: 115-118.
- García-Ayllón M, Millán C, Serra-Basante C, Bataller R, Sáez Valero J. (2012). Readthrough Acetylcholinesterase Is Increased in Human Liver Cirrhosis. *PLoS One.* 7: e44598.
- García-Ayllón MS, Silveyra MX, Candela A, Compañ A, Clària J, Jover R, Pérez-Mateo M, Felipe V, Martínez S, Galcerán J, Sáez-Valero J. (2006). Changes in liver and plasma acetylcholinesterase in rats with cirrhosis induced by bile duct ligation. *Hepatology.* 43: 444-453.

- George ST, Balasubramanian AS (1981). Los acylamidases arilo y su relación con las colinesterasas en el suero humano, eritrocitos y el hígado. *Eur. J. Biochem.* 121: 177-186
- Getman D, Eubanks J, Camp S, Evans G, Taylor P. (1992). The human gene encoding AChE is located on the long arm of chromosome 7. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 170–177
- Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T y Sharon N (1980). What should be called a lectin? *Nature.* 66: 285-286.
- Goldstein JL, DeBose-Boyd, R. A. and Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 124: 35–46,
- Golstein JL. DeBose-Boyd RA. and Brown MS. (2006). Protein sensor for membrane sterols. *Cell.* 124, 35-46.
- Gómez JL, García-Ayllón MS, Campoy FJ, Vidal CJ. (2000). Muscular dystrophy alters the processing of light acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase forms in liver of lama2(dy) mice. *J. Neurosci. Res.* 67: 134 145.
- Gómez-Olivares JL, Vidal Moreno CJ. (2003). Los monómeros que forman los dímeros de la acetilcolinesterasa de eritrocito de ratón están glicosados de manera distinta. *Ciencia en la Frontera.* 2: 11 – 20
- Grisar D, Pick M, Perry C, Sklan EH, Almog R, Goldberg I, Naparstek E, Lessing JB, Soreq H, Deutsch V. (2006). Hydrolytic and nonenzymatic

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

- Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. Eur. J. Biochem. 264: 672-686.
- Grundy SM. (1983). Absorption and metabolism of dietary cholesterol. Annu Rev. Nutr. 3: 71-96.
- Gürtner, T., Krentzberg, G., Doenicke, A. (1963). Comparative studies on cholinesterase activities in serum and liver cells. Acta Anaesth. Señad. 7: 89-93.
- Gutierrez-Ruiz M.C., Domingues-Pérez M., Rodríguez-González S., Niño-Lambarri N., Licona-Retana C., Gómez-Quiroz L. (2012). La dieta alta en colesterol altera el proceso reparador del factor de crecimiento de hepatocitos. Gaceta Médica de México. 148: 236-242.
- Guyton C. A. Tratado de Fisiología Médica. Novena edición. Editorial Panamericana. México, (1997). PP. 846 - 855, 1146-1149.
- Guyton A. (1992). Tratado de Fisiología Médica. Interamericana de España.
- Hammer GS, La Du BN. (1968). Evidence for the liver being the source of human pseudocholinesterase. Pharmacologist. 10: 202, (1968).
- Haupts VD, Heide, K, Zwisler O, Schwick HG. (1963). Isolierung und physikalischchemische charakterisierung der cholinesterase ans human serum. Blut. 14: 65-69.

- Hedrich HJ, Bullock G. (2004). The Laboratory Mouse. (Hedrich, ed). 573 pp. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0044598>
- Iwasaki T, Masato Y, Atsushi N, Yasuo T. (2007). Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Int. Med.*
- Jain R, Kutty KM, Huang S, Kean K. (1983). Pseudocholinesterase high density lipoprotein cholesterol ratio in serum of normal persons and of hyperlipoproteinemics. *Clin Chem.* 129: 1031–1033.
- Jbilo O, L'hermite Y, Talesa V, Toutant JP, Chatonnet A. (1994). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase expression in adult rabbit tissues and during development. *Eur. J. Biochem.* 225: 115 – 124.
- Jenkins, T., Balinsky, T., Patient, D. W. Cholinesterase in plasma: first reported absence in the Bantu, half life determination. *Science.* 156, 1748 (1967).
- Jiménez García LF, Merchant Larios H. (2003). *Biología celular y molecular.* 1ª. Edición. Ed. Prentice Hall. México. 431, 457-459 pp.
- Kaneko A, Dempo K, Onoe T. (1972). Heterogeneity of esterases and cell types in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 284: 128-135.
- Kawada N, Klein H, Decker K. (1992). Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem. J.* 285: 367-371.

- Kronman C, Velan B, Marcus D, Ordentlich A, Reuveny S, Shafferman A. (1995). Involvement of oligomerization, N-glycosylation and sialylation in the clearance of cholinesterases from the circulation. *Biochem J.* 311: 959–967.
- Kruit JK, Groen AK, van Berker TJ, and Kuipers F. (2006) Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 12: 6429-6439.
- Kutty KM, Payne RH. (1994). Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. *J Clin Lab Anal.* 8: 247–250.
- Lange Y, Strebel F and Steck TL. (1993). Role of the plasma membrane in cholesterol esterification in rat hepatoma cell. *J. Biol. Chem.* 2687: 13838-13843.
- Lehtonen A, Marniemi J, Ingberg M, Maatela J, Alanen E, Niittymaski K. (1986). Levels of serum lipids, apolipoproteins A-1 and B, and pseudocholinesterase activity and their discriminative value in patients with coronary by-pass operation. *Atherosclerosis.* 59: 215–221.
- Li B, Duysen EG and Lockridge O (2008). The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. *Chem. Biol. Interact.* 175: 88-91.
- Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond M, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O. (2000). Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Neurochem.* 75: 1320-1331.

- Lockridge O (1990). Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther* 47:35–60.
- Lockridge O. (1988). Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*. 9:125-128.
- Lucas CA, Kreutzberg GW. (1985). Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures. I. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin. *Neuroscience*. 14: 349-360.
- Manoharan I, Boopathy R, Darvesh S, Lockridge O (2007). Un informe médico de salud en las personas con la butirilcolinesterasa en silencio en la comunidad Vysya de la India. *Clin. Chim. Acta*. 378: 128-135.
- Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballería J, Fernández A, Enrich C, Fernández-Checa JC, García-Ruiz C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism*. 4: 185-198.
- Martins PN, Neuhaus P. (2007). Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int*. 27: 384–292.
- Maxfield FR, Tabas I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 438: 612-621.
- Maxfield FR, Wustner D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest*. 110: 891-898.

- Mikami B, Degano M, Hebre EJ, Sacchetini JC. (1994). A crystal structure of soybean  $\alpha$ -amylase reacted with maltose and maltal: Active site components and their apparent roles in catalysis. *Biochemistry* 33: 7779-7787.
- Miller WL. (2007) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1771, 663-676.
- Musso G, Gambino R, De Michieli F. (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 37: 909–916.
- Neitlich, H. W. Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance: a genetic variant. *J. Clin. Invest.* 45, 380 (1966).
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH .- Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD single topic conference *Hepatology* 2003;37:1202 -19
- Neville LF, Gnatt A, Padan R, Seidman S, Soreq H. (1990). Anionic site interactions in human butyrylcholinesterase disrupted by two single point mutations. *J. Biol. Chem.* 265:20735-20738.
- Nuño LN. (2011). Estudio de la regeneración hepática bajo una dieta hipercolesterolémica. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Ohkura T, Hada T, Higashino K, Ohue T, Kochibe N, Koide N, Yamashita K. (1994). Increase of fucosylated serum cholinesterase in relation to high risk groups for hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 54:55-61.

- Ostergaard D, Viby-Mogensen J, Hanel HK, Skovgaard LT. (1988). Half-life of plasma cholinesterase. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 32: 266–269.
- Pan Y, Muzyka JL, Zhan CG. (2009). Model of human butyrylcholinesterase tetramer by homology modeling and dynamics simulation. *J. Phys. Chem.* 113: 6543–6552.
- Perelman A, Abeijon C, Hirschberg CB, Inestrosa NC, Brandan E. (1990). Differential association and distribution of acetyl- and butyrylcholinesterase within rat liver subcellular organelles. *J. Biol. Chem.* 265: 214–220.
- Perelman A, Brandan E. (1989). Different membrane-bound forms of acetylcholinesterase are present at the cell surface of hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 182: 203–207.
- Perrier NA, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G, Massoulie J. (2005). The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *J. Neurochem.* 94: 629-638.
- Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C. (1999). The “early-sorting” endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21). *Hepatology.* 29: 1848–1857.

- Preiss D, Sattar N. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations Clin. Sci. (Lond). 115: 141-150.
- Quinn DM. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. Chem. Rev. 87: 955-979
- Rachinsky TL, Camp S, Li Y, Newton M, Taylor P. (1990). Molecular cloning of mouse acetylcholinesterase: tissue distribution of alternatively spliced mRNA species. Neuron 5: 317-327.
- Randell EW, MS Mathews, Zhang H, Seraj JS, Sun G. (2005). Relationship suero Pseudocolinesterasa y síndrome metabólico. Clin. Biochem. 38: 799–805.
- Rotundo RL. (1984). Purification and properties of the membrane-bound form of acetylcholinesterase from chickenbrain. Evidence for two distinct polypeptide chains. J. Biol. Chem. 259: 13186-13194.
- Ruano MJ, Sánchez-Martín MM, (2000). Alonso JM, Hueso P. Changes of acetylcholinesterase activity in brain areas and liver of sucrose- and ethanol-fed rats. Neurochem. Res. 25: 461-470.
- Sarema. M., Znidarka R., Macías. M. by Rey R. (2006). Liver stellate cells: their importance in normal and pathological conditions. Gastroenterol Hepatol.;Pp. 29(2):93-101.

- Schuman RF, Hunter KW. (1986). Secretion of acetylcholinesterase by a mouse hepatocyte X rat liver cell hybrid culture. *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 22: 670-676.
- Sharon, N, Lis, H. (2004). History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 14: 53R–62R.
- Simons K, Ehehalt R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597-603.
- Singer SJ, Nicolson GL. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175, 720-731.
- Soccio RE, Breslow FW. (2004). Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb .Vasc. Biol.* 24: 1150-1160.
- Soreq H, Ben Aziz R, Prody CA, Seidman S, Gnatt A, Neville L, Lieman-Hurwitz J, Lev-Lehman E, Ginzberg D, Lipidot-Lifson Y, Zakut H. (1990) Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C rich attenuating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9688-9692
- Soreq H, Gnatt A, Loewenstein Y, Neville LF. (1992). Excavations into the active-site gorge of cholinesterases. *Trends Biochem. Sci.* 9:353-8.
- Soreq H, Seidman S. (2001). Acetylcholinesterase: new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 294–302.

- Soreq H, Seidman S, Dreyfus PA, Zevin-Sonki D, Zakut H. (1989). Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholinesterase in microinjected *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 264: 10680-10613.
- Sternfeld M, Shoham S, Klein O, Flores-Flores C, Evron T, Idelson GH, Kitsberg D, Patrick JW, Soreq H. (2000). Excess "read-through" acetylcholinesterase attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 15: 8647-8652.
- Sugimoto T., Yamashita, S. Ishigami M. (2002). Decreased microsomal triglyceride transfer protein activity contributes to initiation of alcoholic liver steatosis in rats. *J. Hepatol.* 36: 157–162.
- Surgenor DM, Ellis D. (1954). Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. Plasma Cholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 6049–6051.
- Teli MR, James O, Burt A, Bennett M, Day C. (1995). The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology.* 22: 137-149.
- Treskatis S, Ebert C, Y Layer, P.G. (1992). Butyrylcholinesterase from chicken brain is smaller than that from serum: its purification, glycosylation and membrane association. *J. Neurochem.* 58: 2236-2247.
- Valle A, O'Connor DT, Taylor P, Zhu G, Montgomery GW, Slagboom PE. (2006). Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. *Clin. Chem.* 52: 1014–1020.

- Valle AM, Radić Z, Rana BK, Whitfield JB, O'Connor DT, Martin NG, et al. The cholinesterases: analysis by pharmacogenomics in man. *Chem Biol Interact.* (2008). 175:343–5
- Wake K. (2004). Karl Wilhelm Kupffer and his contributions to modern Hepatology. *Comp. Hepatol.* 3: 3-6.
- Wu CC, Wang YM, Lu LS, Sun CW, Lu CW, Tsai MT, Yang CC. (2007). Tissue birefringence of hypercholesterolemic rat liver measured with polarization-sensitive optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* 12: p.064022.
- Zelcer N, Tontonoz P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling, *J. Clin. Invest.* 116: 607–614.
- Zhao Y, Wang X, Wang T, Hu X, X Hui, Yan M, Gao Q, Chen T, Li J, Yao M, Wan D, Gu J, Fan J, He X. (2011). Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization. *Hepatology* 53: 493-503.