

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**

**ESPECIALIDAD EN CIENCIAS AMBIENTALES**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

***CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL  
DE LA PARAOXONASA 1 (PON1) DE HUMANO EN CÉLULAS DE  
HEPATOCARCINOMA HUMANO (HEPG2)***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. NÉSTOR PONCE RUIZ**

**DIRECTORA: DRA. IRMA MARTHA MEDINA DÍAZ  
CODIRECTOR: DR. GUILLERMO ELIZONDO AZUELA**

TEPIC NAYARIT, MARZO DE 2015



Tepic, Nayarit a 17 de Febrero de 2015.

DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES  
CORDINADOR DEL POSGRADO CBAP

PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que la tesis de la estudiante de maestría Néstor Ponce Ruiz "Caracterización de la regulación transcripcional de la Paraoxonasa 1 (PON 1) de humano en células de hepatocarcinoma humano (HepG2)", ha sido revisada y aprobada en contenido y formato. Por lo que consideramos que el estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Irma Martha Medina Díaz  
Dr. Guillermo Elizondo Azuela  
Dra. Aurora Elizabeth Rojas Garcia  
Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco  
Dra. Yvel Yvette Bernal Hernández

Ccp. Archivo/IMMD



CBAP/019/15

Xalisco, Nayarit., 24 de febrero de 2015

**Ing. Alfredo González Jáuregui**  
**Director de Administración Escolar**  
**P r e s e n t e.**

Con base al oficio de fecha 17 de febrero de 2015, enviados por los CC. **Dra. Irma Martha Medina Díaz, Dr. Guillermo Elizondo Azuela, Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco y Dra. Yael Yvette Bernal Hernández**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza al **C. Néstor Ponce Ruíz**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, me despido de usted y reciba un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"Por lo Nuestro a lo Universal"**



**Dr. J. Diego García Paredes**  
**Coordinador del posgrado**

POSGRADO EN  
 CIENCIAS BIOLÓGICO  
 AGROPECUARIAS

Expediente.

href.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental (CEMIC 03) de la Universidad Autónoma de Nayarit, con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de proyecto 000000000054224. Bajo la dirección de la Dra. Irma Martha Medina Díaz y en codirección del Dr. Guillermo Elizondo Azuela.

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre María del Rosario Ruiz Díaz y a toda mi familia, por todo el cariño y el apoyo incondicional a lo largo de este gran proyecto. Muchas gracias.

A la Dra. Irma Martha Medina Díaz por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por todo su apoyo, tiempo, enseñanzas y sus consejos, además de su paciencia. Muchas gracias.

A las Dras. Aurora Elizabeth Rojas García, Briscia Socorro Barrón Vivanco, María de Lourdes Robledo Marengo, Yael Yvette Bernal Hernández; por todo su apoyo, enseñanzas y por sus consejos durante la realización de este proyecto. Muchas gracias.

Al Dr. Guillermo Elizondo Azuela del CINVESTAV del IPN unidad Zacatenco del Distrito Federal, por todo el apoyo y tiempo brindado en la realización y revisión del presente trabajo, además de sus consejos. Muchas gracias.

A María Asunción Cabañas y Carmen Martínez del CINVESTAV del IPN unidad Zacatenco del Distrito Federal, por todo su apoyo y tiempo brindado en la realización de este trabajo, además de ser unas excelentes personas. Muchas gracias.

Al Dr. Xavier Comoul de la Facultad de Ciencias Básicas y Médicas de la Universidad de Paris Descartes (Francia) por la donación del vector pGL3-PON1. Muchas gracias.

A las auxiliares del laboratorio Mayra del Carmen y Sandra Amézcuca, por apoyarme en todo lo necesario durante la realización del presente trabajo, por sus consejos. Muchas gracias.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Guille, Frank, Carlos Alberto, Alma, Pako, Yael, Abelardo, Johanna, Ilse, Lucy, Rigo, Gladys, Faby y Paty; gracias por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio y hacer placentero el recorrido durante todo este trayecto, además de ser unas excelentes personas. Muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo, muchas gracias.

## DEDICATORIA

A mi madre María del Rosario Ruiz Díaz; el pilar en el que sostiene la familia, por ser madre y padre a la vez, eres una persona a la que admiro mucho; gracias por todo tu cariño, todo el apoyo y dedicación de tu parte para mi desarrollo tanto personal como profesional; porque cada logro conseguido es gracias a ti, y son tuyos también. Además de ser mi ejemplo a seguir, porque me has enseñado tantas cosas; como que todo es posible con esfuerzo y dedicación. Muchas gracias.

A mis hermanos Lizbeth y Carlos por todo su cariño, por estar siempre ahí cuando los necesito, en apoyarme en este largo trayecto de mi realización profesional, por todos esos buenos y malos momentos compartidos; sobre todo los buenos. Muchas Gracias.

A mis hermanos German y Manuel, por sus consejos y todo su apoyo durante todo mi trayecto de formación personal y profesional. Muchas gracias.

A mis sobrinas Isabella y Destiny Rose, por ser unas lindas personas y por contagiar de su alegría con tan solo una sonrisa de su parte. Muchas gracias.

"Para ser exitoso no tienes que hacer cosas extraordinarias, has cosas ordinarias extraordinariamente bien"

***Alejandro Schnarch kirberg***



## RESUMEN

La paraoxonasa 1 (PON1) humana es una A-esterasa dependiente de calcio, sintetizada principalmente en hígado y secretada a la circulación sanguínea asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL). PON1 actúa como una molécula antioxidante en el metabolismo de lípidos evitando su oxidación y en la detoxificación de una gran variedad de sustratos entre los que se incluyen los plaguicidas organofosforados. La variabilidad en los niveles y actividad de PON1, han sido atribuidas principalmente a polimorfismos en el gen, la dieta, estados patológicos y fisiológicos, estilo de vida y xenobióticos. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de PON1 han sido poco estudiados. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la regulación transcripcional de la PON1 humana en células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Se llevó a cabo un análisis *in silico* de la región promotora de PON1 para determinar elementos de respuesta (ER) a receptores nucleares (NR). Mediante PCR en tiempo real, se evaluó el efecto de algunos de los ligandos de los NR identificados en el análisis *in silico* sobre los niveles de mRNA de genes blancos regulados por los NR y PON1; y se determinó la actividad arilesterasa (ARE) de PON1. Los resultados obtenidos, mostraron ER a NR de pregnenolona (PXR), glucocorticoides (GR), ácido retinoico (RXR) y el receptor activador de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ) con al menos un 95% de homología. Los tratamientos con 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (ligando del receptor de aril hidrocarburos (AhR)), rifampicina (ligando de PXR), dexametasona (ligando de GR) y fenofibrato (ligando de PPAR) incrementaron de manera significativa los niveles de mRNA de PON1 a las 24 y 48 horas, así como la actividad ARE de PON1 a las 24, 48 y 72 horas. Los tratamientos con actinomicina D disminuyeron significativamente la inducción de mRNA de PON1 ejercida por los diferentes ligandos, lo cual sugiere que la inducción de mRNA de PON1 por estos ligandos es a nivel transcripcional. En conclusión, PON1 es regulada a nivel transcripcional a través de un mecanismo que involucra la activación del AhR, PXR y GR.

## ABSTRACT

Human paraoxonase 1 (PON1) is an A-esterase calcium-dependent synthesized in the liver and secreted into the plasma associated with high-density lipoproteins (HDL). PON1 acts as an antioxidant molecule in lipid metabolism preventing lipid oxidation; it also detoxifies a wide range of substrate including organophosphate compounds. The variability of serum levels and activity has been mainly attributed to gene polymorphisms, diet, pathological and physiological status, lifestyle, and xenobiotics. However, the molecular mechanisms involved in transcriptional regulation of PON1 have been little studied. The aim of this study was to characterize the transcriptional regulation of human PON1 in human hepatoma cells (HepG2). *In silico* analysis was performed on the promoter region of PON1 to determine response elements (ER) of nuclear receptors (NR). Through Real-time PCR, the effect of specific NR ligands in the *in silico* analysis on mRNA levels of target genes regulated by NR and PON1 was evaluated; as well as, on the ARE activity of PON1. The results obtained from the *in silico* analysis showed ER of NR to pregnenolone (PXR), glucocorticoids (GR), retinoic acid (RXR) and peroxisomes proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) with 95% homology. Treatments with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand), rifampicin (PXR ligand), dexamethasone (GR ligand) and fenofibrate (PPAR ligand) increased significantly mRNA levels of PON1 at 24 and 48 hours; as well as, ARE activity of PON1 at 24, 48 and 72 hours. Actinomycin D treatments decreased significantly mRNA of PON1 induction exerted by different ligands, suggesting that the induction of PON1's mRNA is at transcriptional level. In conclusion, PON1 is regulated by a mechanism that involves activation of the AhR and nuclear receptors PXR and GR.

## Índice general

<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>Índice de tablas</b> .....	xi
<b>Índice de figuras</b> .....	xii
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Paraoxonasa (PON).....	1
1.2 Paraoxonasa 1 (PON1).....	1
1.3 Factores que modifican la actividad y expresión de PON1.....	2
1.3.1 Polimorfismos.....	2
1.3.2 Estados patológicos y fisiológicos.....	3
1.3.3 Hábitos, dieta y fármacos.....	3
1.4 Regulación transcripcional de PON1.....	5
1.5 Regulación de la expresión génica por receptores nucleares.....	6
1.6 Modelo celular HepG2.....	7
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	9
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	9

<b>4. OBJETIVOS</b> .....	10
4.1 General.....	10
4.2 Específicos.....	10
<b>5. MÉTODOS</b> .....	11
5.1 Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del gen <i>PON1</i> .....	11
5.2 Cultivo celular HepG2.....	11
5.3 Exposición de cultivos celulares HepG2 a 2, 3, 7, 8 tetraclorodibenzo-(p)-dioxina, rifampicina, dexametasona y fenofibrato.....	12
5.4 Extracción de RNA.....	13
5.5 Determinación de la concentración, integridad y pureza del RNA...	14
5.6 Síntesis de cDNA.....	16
5.7 Determinación de los niveles de mRNA de CYP1A1, CYP3A4 y PON1.....	17
5.8 Determinación de la actividad arilesterasa (ARE) de PON1.....	19
5.8.1 Preparación de extractos celulares.....	20
5.8.2 Determinación de proteína total (Método de Lowry).....	21
5.9 Clonación de la región promotora del gen <i>PON1</i> .....	22
5.9.1 Transformación de bacterias.....	23
5.9.2 Purificación del plásmido (MINI PREP).....	24

5.9.3 Purificación del plásmido Midipreps (KIT CONCERT).....	25
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>26</b>
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
7.1 Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del gen <i>PON1</i> .....	27
7.2 Efecto del TCDD, RIF, DEX y FEN sobre los niveles de mRNA de CYP1A1, CYP3A4 y <i>PON1</i> .....	28
7.3 Efecto del TCDD, RIF, DEX y FEN sobre la actividad ARE de <i>PON1</i> .....	32
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>39</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>40</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de primers y sondas para los genes <i>PON1</i> , <i>CYP1A1</i> y <i>CYP3A4</i> .....	19
<b>Tabla 2.</b> Preparación de diluciones del estándar de BSA.....	23

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de regulación de genes a través de receptores nucleares.....	7
<b>Figura 2.</b> Integridad del RNA.....	15
<b>Figura 3.</b> Síntesis de cDNA.....	16
<b>Figura 4.</b> Principio de acción de sondas TaqMan.....	18
<b>Figura 5.</b> Esquema de la reacción de Lowry para la determinación de proteína total.....	22
<b>Figura 6.</b> Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del gen <i>PON1</i> .....	27
<b>Figura 7.</b> Efecto del TCDD sobre la expresión de CYP1A1 a las 24 (a) y 48 (b) horas.....	29
<b>Figura 8.</b> Efecto de la RIF y DEX sobre la expresión de CYP3A4 a las 24 (a) y 48 (b) horas.....	30
<b>Figura 9.</b> Efecto del TCDD, RIF, DEX y FEN sobre la expresión de PON1 a las 24 (a) y 48 (b) horas.....	31
<b>Figura 10.</b> Inhibición de la síntesis de mRNA de PON1 mediante actinomicina D.....	33
<b>Figura 11.</b> Efecto del TCDD, RIF, DEX y FEN sobre la actividad arilesterasa (ARE) de PON1a las 24 (a), 48 (b) y 72 (c) horas.....	34
<b>Figura 12.</b> Posibles mecanismos moleculares de regulación del gen <i>PON1</i> a través de receptores nucleares.....	37

## Lista de abreviaturas

<b>3-MC</b>	3-metilcolantreno
<b>ActD</b>	Actinomicina D
<b>AhR</b>	Receptor para aril hidrocarburos
<b>ARE</b>	Actividad de arilesterasa
<b>BaP</b>	Benzo [a] Pireno
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sérica
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>DEPC</b>	Diethylpirocarbonato
<b>DEX</b>	Dexametasona
<b>DMEM</b>	Medio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfatado
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ER</b>	Elemento de respuesta
<b>FEN</b>	Fenofibrato
<b>GR</b>	Receptor a glucocorticoides
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HepG2</b>	Células de hepatocarcinoma humano
<b>HuH7</b>	Células de hemocromatosis humana
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MDR1</b>	Proteína de resistencia a múltifarmacos
<b>MRP2</b>	Proteína asociada a resistencia a múltifarmacos
<b>NR</b>	Receptor nuclear
<b>PPAR</b>	Receptor activador de peroxisomas
<b>PMA</b>	Acetato fenilmercúrico



<b>POFs</b>	Plaguicidas organofosforados
<b>PON</b>	Paraoxonasa
<b>PXR</b>	Receptor X para pregnenolona
<b>RIF</b>	Rifampicina
<b>RXR</b>	Receptor X para retinóides
<b>SAA</b>	Amilasa A sérica
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TBE</b>	Tris-ácido bórico-EDTA
<b>TCDD</b>	2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
<b>TF</b>	Factor de transcripción
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>VDR</b>	Receptor para vitamina D
<b>XRE</b>	Elemento de respuesta a xenobióticos

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Paraoxonasa (PON)

Las paraoxonasas (PON) son proteínas de aproximadamente 334 aminoácidos con una masa molecular de 43 kDa, dependientes de calcio y contienen en su sitio activo un grupo sulfidrilo (-SH); el cual hace que puedan ser inhibidas por EDTA, iones metálicos (cobre y bario), mercuriales como acetato fenilmercúrico (PMA) y paracloromercuribenzoato. Las PON catalizan la hidrólisis de un amplio rango de sustratos entre los que se encuentran ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos, carbonatos cíclicos, lactonas y plaguicidas organofosforados (POFs) (Casarett y Doull., 2008; Prakash y col., 2010).

Los genes que codifican para la PON en humano están localizados en el brazo largo del cromosoma 7, en el cual se incluyen tres miembros; PON1, PON2 y PON3. PON1 y PON3 se expresan predominantemente en hígado y son secretadas en la sangre. Mientras que PON2 es una enzima intracelular que no es detectable en la sangre, pero se expresa ampliamente en un gran número de tejidos incluyendo el cerebro, hígado, riñón y testículos (Camps y col., 2011; Sang-Yong y col., 2011).

### 1.2 Paraoxonasa 1 (PON1)

PON1 es una A-esterasa dependiente de calcio sintetizada en hígado, es secretada al plasma asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDLs) y tiene un papel importante como molécula antioxidante en el metabolismo de lípidos evitando su oxidación (Martínez y col., 2010). PON1 hidroliza un amplio espectro de sustratos, dentro de los cuales se encuentran; POFs (oxón de clorpirifos, paraoxón y diazoxón), lactonas, neurotoxinas (somán y sarín) y ésteres aromáticos (fenilacetato). Sólo PON1 es capaz de hidrolizar a los oxones provenientes de la biotransformación de POFs (Prakash y col., 2010; Ticozzi y col., 2010; Costa y col., 2011).

La variabilidad de los niveles en suero y actividad de PON1 en humanos y animales, se ha atribuido principalmente a polimorfismos presentes en el gen. Así también a estados patológicos y fisiológicos, estrés oxidativo, dieta, estilo de vida y xenobióticos (Martínez y col., 2010; Costa y col., 2011). Por lo tanto, los niveles de PON1 en suero están determinados significativamente por el estado de la expresión del gen en hígado (Fuhrman, 2012).

### **1.3 Factores que modifican la actividad y expresión de PON1**

#### **1.3.1 Polimorfismos**

Existen dos polimorfismos conocidos en la región codificante de PON1 que modifican su actividad. Estos polimorfismos se caracterizan por la sustitución de un aminoácido; glutamina por arginina en la posición 192 (Q192R) y la sustitución de leucina por metionina en la posición 55 (L55M) (Adkins y col., 1993; Humbert y col., 1993). El polimorfismo Q192R, no afecta la concentración de proteína; sin embargo, las actividades de PON1 (paraoxonasa, arilesterasa (ARE) y lactonasa) son ampliamente influenciadas por estos polimorfismos (Leviev y col., 2000). Niveles altos de actividad paraoxonasa y ARE fueron encontrados en individuos que poseen los genotipos RR y LL; mientras que individuos con genotipo QQ, tienen niveles de actividad lactonasa altos. Sin embargo, otros estudios reportan alta actividad ARE en individuos con el genotipo QQ (Brophy y col., 2001; Rainwater y col., 2009).

Así también, estos polimorfismos parecen tener un impacto en la asociación de PON1 a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), así como, en funciones antioxidantes de la misma. La asociación de PON1 a las HDL en individuos homocigotos Q192Q y L55L parece ser el más eficiente y confiere protección en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Sin embargo, en individuos heterocigotos Q192R se observa una reducción en la afinidad de asociación de PON1 con las HDL (Mackness y col., 1998; Gaidukov y col., 2006).

Por otro lado; se han reportado cinco polimorfismos en la región promotora del gen *PON1*, localizados dentro de las primeras 1000 pares de bases río arriba de la región codificante (-909, -832, -162, -126, -108). El polimorfismo más dominante dentro de la región promotora de *PON1* es el T(-108)C; y es en esta posición, donde se ha encontrado un sitio potencial de unión para el factor de transcripción Sp1 (Brophy y col. 2001; Deakin y col. 2003a). También, el polimorfismo C(-108)C ha sido hasta el momento el único con el que se ha encontrado una asociación con un incremento en la concentración en suero y actividad de *PON1*. En experimentos *in vitro* a través del uso de vectores reporteros, se demostró un aumento en la actividad luciferasa relacionada a este genotipo, lo que sugiere una sobre regulación en la expresión de *PON1* relacionada al mismo (Suehiro y col., 2000; Deakin y col. 2003a).

### **1.3.2 Estados patológicos y fisiológicos**

La alteración en los niveles de *PON1* en la circulación ha sido relacionada con una gran variedad de enfermedades que involucran el estrés oxidativo, entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes y falla renal crónica (Costa y col., 2005; Camps y col., 2009). Así mismo, estudios en células hepáticas demostraron que citosinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  e interleucina 6, disminuyen la expresión de *PON1* y de la apolipoproteína A (apoA-I) mediante la inhibición del receptor de proliferación de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ) (Han y col., 2006). Así mismo, se ha demostrado que la *PON1* es regulada e inactivada por el estrés oxidativo (Aviram y col., 1999; Aviram y col 2000; Jaouad y col., 2003).

### **1.3.3 Hábitos, dieta y fármacos**

El impacto de los hábitos alimenticios diarios, estilo de vida, actividad física y hábitos nocivos como el tabaquismo sobre la actividad y expresión de *PON1* han sido

demostrados. Respecto a los hábitos nocivos, como el fumar, se ha observado una disminución en la actividad de PON1 y un aumento en el estrés oxidativo. Así también; se ha observado que el riesgo de infarto al miocardio incrementa en fumadores portadores del genotipo Q192Q de PON1 (Solaky col., 2005; Isik y col., 2007; Haj y col., 2010).

También, se ha demostrado que el consumo de alcohol influye sobre los niveles de expresión y actividad de PON1 (Précourt y col., 2011). En un estudio en individuos con bajo consumo de alcohol (etanol), se observó una actividad de PON1 395% más alta con respecto al grupo control. Sin embargo, en individuos con un alto consumo de alcohol, la actividad de PON1 se encontró disminuida en el 45% con respecto al grupo control. Interesantemente, la expresión de mRNA de PON1 se incrementó en un 59% en los individuos con bajo consumo de alcohol, mientras que los de alto consumo disminuyó en un 51% (Rao y col., 2003).

Por otro lado, la composición lipídica de la dieta modula en gran medida constituyentes de lipoproteínas e influye considerablemente en el estado de PON1. El efecto de diversas grasas de la dieta sobre el estado de PON1 ha sido evaluado en roedores. En estudios realizados con ratones nulos para receptores de LDL y sometidos a dietas aterogénica a corto plazo, no se observaron cambios significativos en la expresión de PON1; sin embargo, la masa y la actividad de PON1 disminuyeron significativamente (Hedrick y col., 2000; Kudchodkar y col., 2000).

Moléculas antioxidantes han sido también evaluadas debido a su capacidad de prevenir la pérdida de actividad de PON1 (Belleville, 2002). Un estudio realizado en deportistas mostró que el suplemento con vitamina E, previene la reducción de la actividad de PON1 sérica inducida por el ejercicio (Tsakiris y col., 2009). De igual forma, se ha reportado una relación en la ingesta de vitamina C y E con el incremento de la actividad de PON1 en sujetos caucásicos (Jarvik y col., 2002). A su vez, una dieta rica en compuestos polifenólicos está relacionada con un aumento tanto en la expresión como en la actividad de PON1 (Gouédard y col., 2004).

En modelos *in vitro* (células de hemocromatosis humana (HuH7)) también se ha demostrado que la quercetina, flavona, catequina y naringenina son capaces de incrementar la expresión y actividad de PON1 (Gouédard y col., 2004).

En células de hepatocarcinoma humano (HepG2) se observó que la simvastatina, pitavastatina, atorvastatina (fármacos hipolipemiantes) fueron capaces de incrementar la actividad de PON1 (Deakin y col., 2003b; Ota y col., 2005). Por otro lado, la exposición de células HuH7 al ácido fenofibrato, la forma activa del fenofibrato (FEN), ha demostrado ser capaz de incrementar tanto la actividad como los niveles de mRNA de PON1 (Gouédard y col., 2003).

Por otro lado, estudios *in vivo* sobre la regulación de PON1 donde se involucran fármacos, particularmente compuestos para el tratamiento del colesterol y triglicéridos como las estatinas y fibratos, se ha observado que estos fármacos son capaces de incrementar la actividad de la PON1 sérica (Mirdamadi y col., 2008).

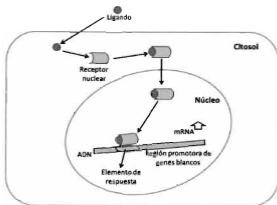
#### **1.4 Regulación transcripcional del gen *PON1***

Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión del gen *PON1* hepática, han sido poco explorados (Fuhrman, 2012). Estudios realizados en células HuH7 demostraron que el FEN, compuesto usado para el tratamiento del colesterol y triglicéridos, es capaz de incrementar la expresión y actividad de PON1 por un mecanismo que posiblemente involucre la activación del receptor activador de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ) (Gouédard y col., 2003). Así también, Gouédard y col. (2004) demostraron en la misma línea celular que compuestos polifenólicos procedentes de la dieta como naringenina, catequina y quercetina, son capaces de incrementar los niveles de mRNA, actividad del promotor y actividad ARE de PON1, a través de un mecanismo que involucra la activación del receptor para aril hidrocarburos (AhR). De forma similar, estudios realizados por Khateeb y col. (2010) en células HuH7 demostraron que el ácido gálico presente en jugo de granada, es

capaz de incrementar la actividad ARE y los niveles de mRNA de PON1 en un proceso que involucra la activación del receptor PPAR $\gamma$ . Así mismo, se ha demostrado que las estatinas activan la transcripción de PON1 a través de PPAR $\gamma$  vía cascada de fosforilación por proteína cinasa C (PKC) y adenosinmonofosfato cíclico (Camps y col., 2011). También se ha descrito que el resveratrol, un compuesto polifenólico presente en las uvas y el vino, es capaz de incrementar la expresión de PON1 en cultivos de hepatocitos primarios de humanos y en células HuH7, a través de la activación del AhR y la interacción del mismo con un elemento de respuesta (ER) no convencional presente en la región promotora del gen *PON1* (Gouédard y col., 2004).

### **1.5 Regulación de la expresión génica por receptores nucleares**

La regulación transcripcional de la mayoría de los genes esta mediada a través de receptores nucleares (NR), los cuales son una familia de factores de transcripción (TFs) que ejercen papeles críticos en casi todos los aspectos del desarrollo, metabolismo y fisiología de los mamíferos. Estos receptores actúan mediante la unión a secuencias cortas del ADN llamadas ER, que activan o reprimen la expresión de una serie de genes blancos. Los NR son clasificados en dos tipos; los de tipo I son aquellos que requieren unirse a su ligando específico (esteroides, progesterona, entre otros) para poder unirse al ADN; mientras que los de tipo II, pueden estar unidos al ADN sin la necesidad de la interacción con su ligando específico y actúan como represores transcripcionales (Figura 1) (Bagamasbad y Denver, 2011; Zhang y col., 2011).



**Figura 1.** Mecanismo de regulación de genes a través de NR (Bagamasbad y Denver, 2011; Zhang y col., 2011).

Los NR comprenden una familia de 48 factores de transcripción en humanos y 49 en ratones. La estructura de los NR está caracterizada por un dominio de unión al ADN basado en dedos de zinc y por un dominio de unión a ligandos. Más de la tercera parte de los 48 miembros son blancos de drogas terapéuticas actuales, y 20 de los 200 fármacos más recetados son ligandos de NRs. Evidencias genéticas han demostrado el importante papel que tienen los NRs en numerosos procesos fisiológicos, fisiopatológicos y en la regulación de la expresión de genes de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (Zhao y col., 2014).

### 1.6 Modelo celular HepG2

Las células HepG2 son una línea celular inmortalizada derivada del tejido de hígado de un joven caucásico de 15 años de edad con hepatocarcinoma celular



diferenciado. Debido a su morfología y alto grado de diferenciación *in vitro*, además de conservar la mayoría las funciones de un hepatocito normal, representan un sistema para el estudio de mecanismos moleculares del metabolismo del hígado, toxicidad, genotoxicidad y carcinogénesis, así como la regulación transcripcional de genes por xenobióticos y moléculas endógenas. En particular, las células HepG2 retienen la expresión y las actividades de la mayoría de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos de fase I y II. En comparación con los demás modelos celulares, las HepG2 han sido ampliamente estudiadas y se ha caracterizado mayoritariamente los genes expresados, incluyendo enzimas de fase I y II, así como factores de transcripción (Choiy col., 2009; Baiy col., 2014; Liebel y col., 2015).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La PON1 tiene un papel antioxidante muy importante a nivel fisiológico, además también está implicada en la detoxificación de una gran variedad de xenobióticos, dentro de los cuales se incluyen los plaguicidas organofosforados. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de la PON1 han sido poco estudiados. Analizar las secuencias presentes en la región promotora del gen *PON1* y caracterizar la activación de ésta es de gran importancia, ya que ayudará a entender y a explicar los mecanismos a través de los cuales algunos xenobióticos y moléculas endógenas pueden modular la expresión de dicho gen. Modificaciones a nivel transcripcional de la PON1 pueden alterar la biotransformación de todos sus sustratos, lo que pudiera conllevar al desarrollo de diversas enfermedades.

## 3. HIPÓTESIS

Los receptores nucleares de tipo I son capaces de modular la expresión de PON1 en células HepG2.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Caracterizar la regulación transcripcional de la PON1 de humano en células HepG2.

### 4.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis *in silico* de la región promotora del gen *PON1* para determinar los posibles elementos de respuesta para receptores nucleares de tipo I.
- Determinar el efecto de ligandos específicos para los receptores nucleares tipo I y otros receptores nucleares identificados en el análisis *in silico* sobre los niveles de mensajeros de PON1 en células HepG2.
- Clonar el promotor del gen *PON1* para caracterizar la transactivación y la interacción de receptores nucleares sobre el mismo.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Análisis *in silico* de la región promotora del gen *PON1*

Para realizar el análisis *in silico*, la secuencia del promotor del gen *PON1* disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF051133.1>, se analizó en las bases de datos Transcriptional Factor Search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) y ALLGGEN PROMO ([http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)). A partir de este análisis se identificaron los posibles elementos de respuesta para NR de tipo I y II.

### 5.2 Cultivo celular HepG2

#### Reactivos

- Medio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen)
- Suero fetal bovino (SFB) (ATCC)
- Aminoácidos no esenciales (Invitrogen)
- L- glutamina (Invitrogen)
- Antibióticos y antimicóticos (Invitrogen)
- Tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Invitrogen)

#### Procedimiento

Células de hepatocarcinoma humano (HepG2) obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection) se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de L-glutamina y 1% de antibióticos-antimicóticos. El cultivo celular se mantuvo en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37 °C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico. Cuando los cultivos alcanzaron 100% de confluencia celular se realizó la cosecha y fueron sembrados nuevamente. El

proceso consistió en eliminar el medio de cultivo e incubar las células con 2 mL de tripsina 0,25%-EDTA a 37 °C durante 5 minutos, transcurrido este tiempo, los frascos se sacudieron suavemente para permitir que las células se despegaran completamente. Posteriormente se agregaron 8 mL de medio DMEM, se homogeneizó y las células se colocaron en placas nuevas y se incubaron nuevamente a 37 °C.

### **5.3 Exposición de cultivos celulares HepG2 a 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-(p)-dioxina, rifampicina, dexametasona y fenofibrato.**

#### Reactivos

- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich)
- 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (AccuStandard)
- Rifampicina (RIF) (Sigma Aldrich)
- Dexametasona (DEX) (Sigma Aldrich)
- Fenofibrato (FEN) (Sigma Aldrich)

#### Procedimiento

En placas de 12 pozos se colocaron  $1 \times 10^6$  células/pozo y se dejaron crecer hasta alcanzar 90% de confluencia celular. Posteriormente, se realizaron los tratamientos con TCDD 10 nM, RIF 10  $\mu$ M, DEX 10  $\mu$ M y FEN 250  $\mu$ M durante 24 y 48 horas. La concentración de los ligandos fue renovada a las 24 horas en el caso del tratamiento de 48 horas.

Como control negativo se usaron cultivos celulares HepG2 tratados con DMSO al 0,05%. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. Transcurrido el tiempo de cada tratamiento se realizó la extracción del RNA total.

## 5.4 Extracción de RNA

### Fundamento

El trizol es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidinio que al ser homogeneizado con los cultivos celulares, provoca la ruptura de la membrana celular y disuelve los componentes celulares. Este efecto es generado por el isotiocianato de guanidinio el cual desnaturaliza las proteínas e inhibe las ribonucleasas. Cuando se agrega el cloroformo seguido de una centrifugación la solución se separa en dos fases: una acuosa y otra orgánica. En la acuosa se encuentra el RNA, el cual es precipitado mediante la adición de alcohol isopropílico (Chomczynsky y Sacchi, 1987).

### Reactivos

- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo (Sigma Aldrich)
- Alcohol isopropílico (J.T. Baker)
- Etanol al 70% (Sigma Aldrich)
- Agua dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma Aldrich)

### Procedimiento

Se retiró el medio de los cultivos celulares tratados con los diferentes ligandos y se les adicionó 1 mL de trizol. Se homogeneizó con ayuda de una pipeta hasta provocar la lisis total de las células. El homogenizado fue transferido a un tubo eppendorf, donde se le añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo y se agitó fuertemente durante 15 segundos. Posteriormente, se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,200 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Se extrajo la fase acuosa (fase superior) cuidando de no tocar la interfase para evitar contaminar el RNA y se colocó en un tubo eppendorf estéril al cual se le añadieron 500  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló suavemente por inversión (el isopropanol precipita el RNA, debido a que forma puentes de hidrógeno con el agua). El tubo se incubó durante 10-

minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,200 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Se añadió 1 mL de etanol al 70% (diluido en agua DEPC), se centrifugó a 8,500 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante tratando de que el pellet quedara lo más seco posible. El pellet se resuspendió en 20 µL de agua DEPC y el RNA fue almacenado a -70 °C para su uso posterior.

## 5.5 Determinación de la concentración, integridad y pureza del RNA

### Reactivos

- Agarosa ultrapura (Invitrogen)
- Bromuro de etidio (0.5 µg/mL) (BIO-RAD)
- Buffer de carga:
  - Azul de bromofenol 3.6 mM (Research Organics)
  - Xilencianol 3.6 mM (Research Organics)
  - Glicerol 3% (usb)
- Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 10X
  - Trizma base 0.05 M (Sigma Aldrich)
  - Ácido bórico 0.05 M (Research Organics),
  - EDTA 0.5 M pH 8.0 (Sigma Aldrich)

Una vez obtenido el RNA se procedió a determinar la concentración y pureza del mismo. Para la cuantificación; se utilizó un NanoDrop 2000 Thermo Scientific. A 2 µL de RNA total se midió su absorbancia a 260 nm contra un blanco de agua destilada. Una unidad de densidad óptica (DO) a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA.

La pureza se determinó mediante la relación de las lecturas de absorbancias a 260 y 280 nm. Se considera que las preparaciones puras de RNA tienen una relación de DO 260/280 nm entre 1.8 y 2 (Ausubel y col. 2005). La concentración de RNA total se determinó con la siguiente fórmula:

$$RNA (\mu g/\mu L) = \frac{D.O. (260 nm) \times 40 (\text{factor de corrección}) \times \text{factor de dilución}}{1000}$$

La integridad del RNA se verificó a través de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. 1 g de agarosa ultrapura se disolvió en 99 mL de buffer TBE 1X en un microondas hasta completa homogeneidad, se dejó enfriar y se agregó 5  $\mu$ L de bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL). El gel se colocó en cámara de electroforesis y se dejó polimerizar durante 30 minutos, posteriormente se agregó a la cámara de electroforesis buffer TBE 1X para cubrir el gel y se colocó 1  $\mu$ L de RNA total con buffer de carga. La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts durante 20 minutos. Una vez terminada la electroforesis el gel se observó en un transiluminador de luz UV (Accesolab) para verificar la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal.

En la Figura 2 se muestra un gel representativo de las muestras de RNA total extraídas de los tratamientos con TCDD, RIF, DEX y FEN. Las bandas que se observan corresponden a las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal, lo que indica la integridad del RNA.



**Figura 2.** Integridad del RNA. Gel de agarosa al 1% con 1 $\mu$ L de RNA teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL) observado en un transiluminador UV.



## 5.6 Síntesis de cDNA

### Fundamento

Todos los RNAs mensajeros contienen en el extremo 3' una cola de poli (A), la cual hibrida con el oligonucleótido de dT (OligodT) que actúa como cebador para la transcriptasa inversa y cataliza la síntesis de cDNA en presencia de los cuatro desoxinucleótido trifosforados (dNTP). El cDNA de cadena simple se libera del híbrido cDNA-mRNA mediante desnaturalización por calor (Devlin, 2004) (Figura 3)

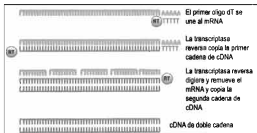


Figura 3. Síntesis de cDNA (Griffin y Griffin, 2004).

### Reactivos

- Oligo (dT) (500 mg/mL) (Invitrogen)
- dNTPs (10 mM) (Invitrogen)
- Ditioneitol (DTT) (0.1 M) (Promega)
- Buffer 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3) (Invitrogen)
- Transcriptasa reversa (RT SuperScript II) (Invitrogen)
- Agua libre de RNAsas (Gibco)
- RNA total

### Procedimiento

La síntesis de cDNA se realizó en tubos eppendorf de 0.2 mL. La mezcla de reacción contenía 1 µL de oligo (dT), 2 µg de RNA total y agua libre de RNAsas para un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó a 65 °C por 5 minutos, transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción colocándola en hielo y se añadieron 1µL de DTT, 4 µL de buffer 5X, 1 µL de dNTPs y 1µL de agua destilada estéril (o RNAsa OUT), se mezcló por pipeteo suavemente y se incubó a 42 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se adicionaron 0.5 µL (100 U) de transcriptasa reversa (RT SuperScript II), se agitó por pipeteo suavemente y se incubó a 42 °C durante 50 minutos. Finalmente la reacción se inactivo a 70 °C durante 15 minutos y los cDNAs se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

## **5.7 Determinación de los niveles de mRNA de CYP1A1, CYP3A4 y PON1**

### Fundamento

El principio de acción de las sondas TaqMan se basa en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET); cuando la sonda está intacta la proximidad del fluorocromo al quencher produce la supresión de la fluorescencia reportera. Una vez que la Taq polimerasa empieza a sintetizar la hebra de DNA complementario, desplaza el extremo 5' de la sonda que es degradado por la actividad 5'-3' nucleasa de la enzima Taq polimerasa. En este proceso se libera el fluoróforo del medio y deja libre al quencher, lo que ocasiona un aumento de la fluorescencia detectada (Cultek, 2006) (Figura 4).

### Reactivos

- Master Mix (Applied Biosystems)
- Sondas CYP1A1, CYP3A4 y PON1 (Applied Biosystems)
- cDNA
- Agua estéril

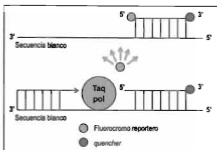


Figura 4. Principio de acción de sondas TaqMan (Bustin, 2000).

#### Procedimiento

Los niveles de mRNA del citocromo P450 1A1 (CYP1A1), P450 3A4 (CYP3A4) y PON1 se determinaron mediante PCR en tiempo real, para lo cual se utilizó el equipo StepOne de Applied Biosystem y sondas Taqman específicas para cada gen (Tabla 1). Cada reacción consistió en una mezcla de 7.5  $\mu$ L de Master Mix, 6.1  $\mu$ L de agua libre de DNAsas/RNAsas, 0.4  $\mu$ L de sonda Taqman y 1  $\mu$ L de cDNA. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo; 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C. Los niveles de mRNA de los genes de CYP1A1 y CYP3A4 se utilizaron como controles positivos de regulación por los receptores AhR, PXR y GR, respectivamente.

Los resultados obtenidos fueron analizados por el método comparativo de  $\Delta$ Ct entre los genes PON1, CYP1A1, CYP3A4 y el gen endógeno GAPDH (Livak y Schmittgen, 2001).

**Tabla 1.** Secuencia de primers y sondas para los genes *PON1*, *CYP1A1* y *CYP3A4*.

Nombre del gen	Secuencia de primer/sonda
<i>CYP1A1</i>	Sonda (FAM) TTTAATGTTTGTACACACAACATCCT
<i>CYP3A4</i>	Sonda (FAM) ATTTTGTCTACCATAAGGGCTTTT
<i>PON1</i>	Sentido GGTGGCAGAAGGATTTGATTTTGC Antisentido ACATGAATCTTATATGAGCCAGCAACT Sonda (FAM) CCGATGGCAAGTATG

## 5.8 Determinación de la actividad arilesterasa (ARE) de *PON1*

### Reactivos

- Buffer ARE

Tris-HCl (100 mM) (Promega)..... 7.878 g

CaCl<sub>2</sub> (1 mM) (J.T. Baker)..... 0.05549 g

Disolver en 400 mL de agua inyectable. Ajustar a pH 8.0 y aforar a 500 mL.

- Fenilacetato (10 mM) (Sigma Aldrich)
- Agua inyectable (PISA)
- Solución salina de fosfatos (PBS) (1X)

NaCl (J.T. Baker)..... 8 g

KCl (J.T. Baker)..... 0.2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J.T. Baker)..... 1.44 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J.T. Baker)..... 0.24 g

Disolver en 600 mL de agua destilada y ajustar a pH 7.5. Esterilizar 20 minutos a 15 lb de presión.

### Procedimiento

La actividad ARE se determinó de acuerdo al método propuesto por Daekin y col. (2001), con modificaciones. Transcurridos los tiempos (24, 48 y 72 h) de tratamiento con los diferentes ligandos, se procedió a retirar el medio de los cultivos celulares HepG2. Las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se incubaron durante 10 minutos con 900  $\mu\text{L}$  de buffer ARE y 100  $\mu\text{L}$  de fenilacetato 10 mM en las placas de cultivo. Se recuperó el sobrenadante y se monitoreo la hidrólisis del fenilacetato mediante el cambio de absorbancia a 270 nm por 5 minutos en intervalos de 1 minuto. Como blanco de reacción se empleó el Buffer ARE más fenilacetato 10 mM para medir la hidrólisis espontánea del fenilacetato. La actividad ARE fue calculada usando el coeficiente de extinción del fenol ( $\epsilon=1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Una unidad de actividad ARE de PON1 es definida como 1 nmol de fenol hidrolizado por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad ARE se corrigió por el contenido de proteína total.

### **5.8.1 Preparación de extractos celulares**

#### Reactivos

- Solución C
  - Glicerol 20% (usb)..... 20 mL
  - Tris-HCl (100 mM) (Promega)..... 1.575 g
  - DTT (1 mM) (Promega)..... 0.0154 g
  - PMSF (200 mM) (Sigma Aldrich)..... 1  $\mu\text{L}$

Disolver en 100 mL de agua destilada estéril. Agregar el PMSF al final.

#### Procedimiento

Una vez determinada la actividad ARE de PON1, las células fueron despegadas mediante raspado con cepillo en 1 mL de solución C. Se homogeneizaron, se colocaron en tubos eppendorf y se sonicaron durante 1 minuto para provocar la lisis celular. Posteriormente, se centrifugó a 13, 000 rpm durante 3 horas a 4 °C. Una vez

transcurrido el tiempo de centrifugación, se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf y se almacenó a -70 °C para su uso posterior.

### 5.8.2 Determinación de proteína total (método de Lowry)

#### Fundamento

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas y la intensidad de color es proporcional a la concentración de proteínas. El método consta de dos etapas: 1) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas. El cobre actúa como un catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Lowry y col., 1951) (Figura 5).

#### Reactivos

- Kit (Modified Lowry Protein Assay) (Thermo Scientific)
- Agua destilada

#### Procedimiento

Se prepararon diluciones seriadas a partir de un estándar de albumina bovina sérica (BSA) (2 mg/mL) de acuerdo a la tabla 2.

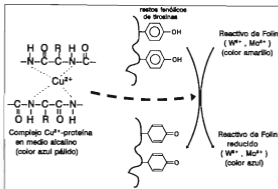


Figura 5. Esquema de reacción de Lowry para la determinación de proteína total (Lowry y col., 1951).

En placas de 96 pozos se colocaron 40  $\mu\text{L}$  de cada dilución y muestra (extracto celular) y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Lowry modificado. La placa se agitó por 30 segundos, se cubrió y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu 1X (reactivo Folin-Ciocalteu 2X (2N) 1:1 en agua destilada). Se agitó la placa por 30 segundos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación se midió la absorbancia a 750 nm en un lector de placas ( $\mu\text{QuantBiotek}$ ). La concentración de proteínas de las muestras problemas se calculó a partir de la curva estándar de BSA.

### 5.9 Clonación de la región promotora del gen *PON1*

El vector pGL3-PON1 fue donado por el Dr. Xavier Comoul de la Facultad de Ciencias Básicas y Médicas de la Universidad de Paris Descartes (Francia). El cual se clonó usando el kit de clonación One shot chemically *E. coli* de invitrogen.

**Tabla 2.** Preparación de diluciones del estándar de BSA.

Vial	Volumen del diluyente (Agua destilada estéril)	Volumen BSA	Concentración final de BSA
A	125 µL	375 µL Stock	1500 µg/mL
B	312.5 µL	312.5 µL Stock	1000 µg/mL
C	155 µL	155 µL del vial A	750 µg/mL
D	312.5 µL	312.5 µL del vial B	500 µg/mL
E	312.5 µL	312.5 µL del vial D	250 µg/mL
F	312.5 µL	312.5 µL del vial E	125 µg/mL
G	400 µL	312.5 µL del vial F	25 µg/mL
I	500 µL	0	0 µg/mL = Blanco

### 5.9.1 Transformación de bacterias

#### Reactivos

##### 1. Preparación de placas de agar

- Triptona (BD DIFCO)..... 2.5 g
- Extracto de levadura (usb)..... 1.25 g
- Agar bacteriológico (usb)..... 3.75 g

Disolver en 100 mL de agua destilada y ajustar a pH 7.5, aforar a un volumen de 250 mL. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb de presión. Cuando la solución este entre 40-50 °C adicionar ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL y colocar en placas de cultivo.

##### 2. Preparación de medio LB

- Extracto de levadura (usb)..... 1.5 g
- NaCl (J.T. Baker)..... 1.5 g
- Triptona (BD DIFCO)..... 3.0 g



Disolver en 600 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL. Colocar en matraces de 250 mL y esterilizar durante 20 minutos a 15 lb de presión.

### Procedimiento

La transformación de bacterias se realizó mediante el Kit de clonación One shot chemically *E. coli* de invitrogen como se describe a continuación. Se adicionaron 2  $\mu$ L de vector pGL3-PON1 o pRL a un vial de bacterias competentes, se mezcló y se incubó 30 minutos en hielo. Posteriormente se incubó a 42 °C por 30 segundos y durante 2 minutos en hielo. Se agregaron 250  $\mu$ L de medio LB y se incubó 1 hora a 37 °C a 225 rpm. Se diseminó todo el tubo en una placa de agar con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y se incubó toda la noche a 37 °C. Se verificaron las placas para ver si hubo crecimiento de colonias, se seleccionaron 5 colonias y picaron con un palillo estéril e incubaron en 4 mL de medio LB que contenía ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g/mL durante toda la noche a 37 °C en agitación constante de 225 rpm.

## 5.9.2 Purificación del plásmido (MINI PREP)

### Reactivos

#### 1. Buffer TE

- Tris-HCl (100 mM) (Promega).... 11.0292 g
- EDTA (1 mM) (Sigma Aldrich)... 260.568 mg

Disolver en 500 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.4 y aforar a 700 mL.

#### 2. Buffer TENS

- Buffer TE..... 200 mL
- NaOH (SEALAB)..... 1 g
- SDS 20% (Promega)..... 6.25 mL

Aforar a 300 mL con buffer TE.

### **3. Acetato de Sodio 3 M (usb)**

Disolver 49.22 g de acetato de sodio en 100 mL de agua destilada y aforar a 200 mL.

### **4. Etanol al 100% (J.T. Baker)**

#### Procedimiento

La purificación del plásmido se llevó a cabo mediante el método descrito por Medina Díaz y col. (2005): Se colocaron 1.5 mL de cada uno de los tubos cultivados que presentaron turbidez (transformación de bacterias) en tubos eppendorf y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 segundos. Se decantó el sobrenadante, se adicionaron 300  $\mu$ L de buffer TENS, se agitó en vortex y se le adicionaron 150  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M y nuevamente se agitó en vortex. Se centrifugaron las mezclas durante 2 minutos a 13,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio. Se le adicionaron 900  $\mu$ L de etanol al 100% y se incubó en hielo seco durante 20 minutos. Se descongelaron las mezclas y se centrifugaron durante 2 minutos a 13,000 rpm, se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente y se le adicionaron de 20  $\mu$ L de buffer TE. 2  $\mu$ L de la muestra se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la presencia del plásmido.

#### **5.9.3 Purificación del plásmido Midipreps (KIT CONCERT)**

##### Reactivos

- Pure Link (HiPure Plasmid Midiprep kit) (Invitrogen Life Technologies)
- Isopropanol (J.T. Baker)

### Procedimiento

De los cultivos (transformación de bacterias) que incorporaron el plásmido (MINI PREPS) 150 µL de estos se colocaron en 150 mL de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL y se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación constante a 225 rpm.

La purificación del DNA plasmidico se realizó mediante el kit CONCERT de Invitrogen de la siguiente forma: Se equilibró la columna con 10 mL de buffer de equilibrio. El cultivo se transfirió a tubos falcón de 50 mL, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 4 mL de buffer de resuspensión el cual contenía RNasa A y se homogenizó por pipeteo repetido, el homogenizado se transfirió a un tubo de 15 mL. Se agregaron 4 mL de buffer de lisis y se mezcló por inversión suavemente 5 veces e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (se observó viscosidad en el tubo). Se agregaron 4 mL de buffer de precipitación, se mezcló por inversión, se centrifugó a 8,000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a la columna previamente equilibrada y se dejó drenar por gravedad. Se lavó la columna 2 veces con 10 mL de buffer de lavado y se dejó drenar por gravedad. La columna se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 5 mL de buffer de elusión para eluir el DNA y se dejó drenar por gravedad (no forzar la columna). Se agregaron 3.5 mL de isopropanol al DNA eluido, se homogenizó por inversión, se centrifugó a 14,000 rpm durante 40 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 530 µL de etanol al 70% a la pastilla, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet al aire libre durante 10 minutos y se resuspendió en 28 µL de buffer TE. La concentración de DNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del programa STATA versión 8.0 (Stata Corp LP, College Station, Texas, USA) utilizando la prueba estadística de U-Mann Whitney. El criterio de significancia fue \* $p < 0.05$  para todos los estudios.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Análisis *in silico* de la región promotora del gen *PON1*

Con la finalidad de identificar posibles elementos de ER a NR en la región 5' del gen *PON1* se realizó un estudio *in silico*. Se identificaron 12 posibles ER para NR. Un sitio de unión para el receptor a pregnenolona (PXR), ocho para el receptor de glucocorticoides (GR), uno para el receptor a vitamina D (VDR) y uno para el receptor al ácido X retinoico (RXR); todos con un porcentaje de homología del 95% (Figura 6).

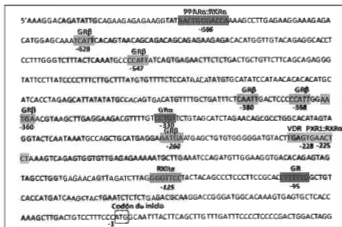


Figura 6. Análisis *in silico* de la región 5' del gen *PON1* realizado en las bases de datos TFsearch y ALLGEN PROMO con un porcentaje del 95% de homología.

Estos resultados, sugieren que los receptores GR, PXR, VDR y RXR podrían unirse a estos ER y regular la transcripción del gen *PON1*.

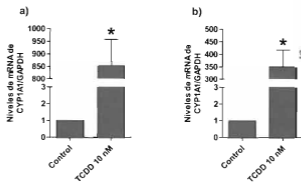
Uno de los primeros trabajos sobre la investigación de ER para NR presentes en la región promotora del gen *PON1* fue llevado a cabo por Schrader y Rimbach (2011). En este se realizó un análisis *in silico* de la región promotora de *PON1* mediante el software MatInspector (<http://www.genomatix.de>). Los resultados mostraron posibles sitios de unión para los NR PPAR y AhR, así como para el factor general de transcripción Sp1. Sin embargo, el porcentaje de homología considerado en los ER fue de 80% y no encontraron ER para PXR, VDR, RXR y GR. Esto podría deberse a que la base de datos empleada por estos autores, no contiene las secuencias para los ER de estos NR. Así tampoco, evaluaron el efecto de los ligandos de los receptores AhR y PPAR sobre la expresión de *PON1*.

Por otro lado, Gouédard y col. (2004) sugieren que la región promotora de *PON1* contiene un ER a xenobióticos (XRE) no clásico (GCGGG) el cual presenta un 80% de homología con respecto al XRE clásico (GCGTG), de la secuencia de unión conocida para el AhR.

## **7.2 Efecto del TCDD, RIF, DEX y FEN sobre los niveles de mRNA de CYP1A1, CYP3A4 y PON1**

Se evaluó la posible regulación transcripcional del gen *PON1* a través de los NR PXR, GR y AhR. Se determinaron los niveles de mRNA del CYP1A1 como control positivo de regulación a través del receptor AhR; y del CYP3A4, gen regulado por los receptores PXR y GR. Como control endógeno de expresión se empleó al gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*).

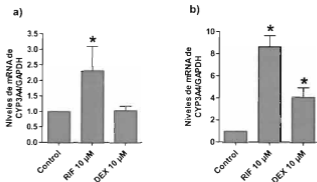
En la Figura 7 se muestra los resultados de los tratamientos con TCDD a 10 nM. Los niveles de mRNA de CYP1A1 se incrementaron significativamente tanto a las 24 (850 veces) (Figura 7a) como a las 48 horas (350 veces) (Figura 7b).



**Figura 7.** Efecto del TCDD sobre los niveles de mRNA del CYP1A1. Cultivos celulares HepG2 fueron tratados con TCDD y DMSO al 0.5% (control) por a) 24 horas y b) 48 horas. Como control endógeno de expresión se utilizó a GAPDH. Los resultados representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por triplicado (\* $p < 0.05$ ).

Una vez que se demostró la activación de los receptores AhR, PXR y GR a través de la expresión de sus genes blancos, se procedió a determinar los niveles de mRNA de PON1. En la Figura 9, se muestran los resultados del efecto de los tratamientos con TCDD 10 nM, RIF 10  $\mu$ M, DEX 10  $\mu$ M y FEN 250  $\mu$ M, los cuales causaron un incremento de manera significativa, sobre los niveles de mRNA de PON1a las 24 (a) y 48 (b) horas con respecto al control. Con un máximo de inducción a las 24 horas para RIF (16 veces), seguido por DEX (9 veces), FEN (4.5 veces) y TCDD (3 veces)

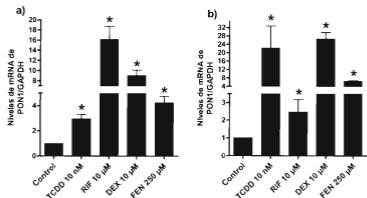
(Figura 9a). A las 48 horas la máxima inducción se observó para los tratamientos con DEX (28 veces), seguido de TCDD (22 veces), FEN (8 veces) y RIF (2.5 veces) (figura 9b).



**Figura 8.** Efecto de la RIF y DEX sobre los niveles de mRNA del CYP3A4. Cultivos celulares HepG2 fueron tratados con TCDD y DMSO al 0.5% (control) por a) 24 horas y b) 48 horas. Como control endógeno de expresión se utilizó a GAPDH. Los resultados representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por triplicado (\* $p < 0.05$ ).

Los efectos de algunas moléculas endógenas y xenobióticos son comúnmente explicados por la afinidad a receptores (Coumoul y col., 2002; Lemaire y col., 2004). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demostraron que ligandos de receptores como TCDD, RIF, DEX y FEN fueron capaces de incrementar los niveles de mRNA de PON1. Sin embargo, el incremento observado en los niveles de mRNA de PON1 por TCDD es menor comparado con los niveles de mRNA de CYP1A1 (gen blanco para el receptor Ah). Estos resultados son similares a los reportados por Gouédard y col. (2004) en células HuH7 tratadas con compuestos polifenólicos (quercetina, naringenina y flavona), 3-metilcolantreno (3-MC), benzo [a] pireno (BaP)

y TCDD sobre los niveles mRNA de PON1 comparados con CYP1A1. Así también, Guyot y col. (2011), en esa misma línea celular, demostraron que el efecto del TCDD sobre la inducción de PON1 fue menor comparado con el observado para CYP1A1.



**Figura 9.** Efecto del TCDD, RIF, DEX y FEN sobre los niveles de mRNA de PON1. Cultivos celulares HepG2 fueron tratados con TCDD, RIF, DEX, FEN y DMSO al 0.5% (control) por a) 24 horas y b) 48 horas. Como control endógeno de expresión se utilizó a GAPDH. Los resultados representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por triplicado (\* $p < 0.05$ ).

Los mecanismos de acción a través de los cuales el TCDD incrementa la expresión de CYP1A1 son ampliamente conocidos, y su elevada inducción por esta dioxina se debe a que el promotor de este gen contiene 6 XRE (Mimura y Fujii-Kuriyama, 2003). A diferencia del promotor del CYP1A1, el promotor de la PON1 solo contiene al menos un XRE no clásico para el receptor Ah (Gouédard y col., 2004). Al respecto, Gouédard y col. (2004) demostraron la unión del AhR-TCDD en las posiciones -126 a -106 de la región promotora del gen *PON1* y también observaron que la intensidad de interacción de proteína-ligando-ER fue más fuerte en la secuencia del promotor

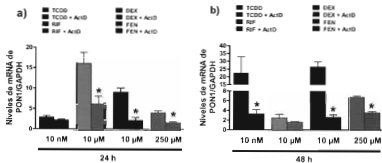


de CYP1A1, por lo que el efecto a nivel transcripcional puede deberse a la diferencia en la secuencia consenso de unión entre esos dos ER.

Para evaluar si el efecto del incremento en los niveles de mRNA de PON1 ejercido por los diferentes ligandos (TCDD, RIF, DEX y FEN) era llevado a cabo a nivel transcripcional, cultivos celulares HepG2 fueron pretratados con actinomicina D (ActD) 10 µg/mL durante 10 minutos, seguido por la adición de TCDD 10 nM, RIF 10 µM, DEX 10 µM y FEN 250 µM. Los resultados muestran que la inducción de PON1 por TCDD, RIF, DEX y FEN disminuye alrededor del 50% por los pretratamientos con ActD a las 24 horas (Figura 10a), y en 60% a las 48 horas (Figura 10b). Estos resultados sugieren que la inducción de mRNA de PON1 por estos ligandos es a nivel transcripcional.

### **7.3 Efecto del TCDD, RIF, DEX y FEN sobre la actividad ARE de la PON1**

Se evaluó la actividad ARE extracelular de la PON1 para determinar si el incremento en los niveles de mRNA de PON1 ejercidos por TCDD, RIF, DEX y FEN se reflejaba en un aumento de la misma. Los resultados muestran que los tratamientos con TCDD, RIF, DEX y FEN incrementaron la actividad ARE de PON1 de manera significativa tanto a las 24 (Figura 11a), 48 (Figura 11b) y 72 horas (Figura 11c) de tratamiento con respecto al control. Con un máximo de incremento a las 24 horas ejercido por FEN (5.7 veces), seguido por RIF (3,2 veces), TCDD (2.8 veces) y DEX (2,2 veces). Mientras que a las 48 horas el mayor incremento fue ejercido por TCDD (2,4 veces), seguido de DEX (1.6 veces), FEN (1.5 veces) y RIF (1.4 veces). Así mismo, el mayor incremento a las 72 horas fue ejercido por TCDD (2,2 veces), y en menor proporción por FEN (1.8 veces), RIF (1.7 veces) y DEX (1.5 veces).



**Figura 10.** Inhibición de la inducción de mRNA de PON1 mediante ActD. Cultivos celulares HepG2 fueron pretratados durante 10 minutos con ActD y DMSO al 0.5% (control) seguido de la adición de TCDD, RIF, DEX, FEN por a) 24 horas y b) 48 horas. Como control endógeno de expresión se utilizó a GAPDH. Los resultados representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por triplicado (\* $p < 0.05$ ).

Algunos estudios realizados en la línea celular HuH7, demostraron que tanto el FEN (250  $\mu$ M) y el TCDD (10 nM) incrementan la actividad ARE de la PON1 alrededor de un 50% con respecto al control; y este incremento estuvo relacionado con el aumento en la expresión de PON1 (Gouédard y col., 2003; 2004). Estos resultados están acorde a los obtenidos en el presente trabajo, lo cual indica que estos compuestos son capaces de estimular la expresión y actividad de la PON1.

Los mecanismos de la regulación transcripcional del gen *PON1* son un área activa de investigación, debido a su papel antioxidante de las lipoproteínas y en las reacciones de desintoxicación. El estudio de los mecanismos sobre su regulación, permite la comprensión de cómo moléculas endógenas y exógenas podrían modular la expresión de este gen y conducir al desarrollo de ciertas enfermedades. Por lo que, el papel que pudiera jugar la PON1 en la susceptibilidad al desarrollo de

enfermedades y protección contra agentes tóxicos, está determinado por factores que alteren la expresión y actividad de la misma (Costa y col., 2011).

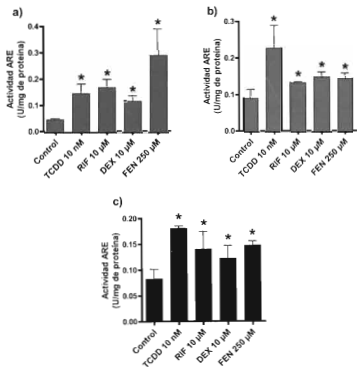


Figura 11. Efecto del TCDD, Rif, DEX y FEN sobre la actividad arylesterasa (ARE) de la PON1 corregida por proteína total a las 24 (a), 48 (b) y 72 (c) horas de tratamiento. Los resultados representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por triplicado (\* $p < 0.05$ ).

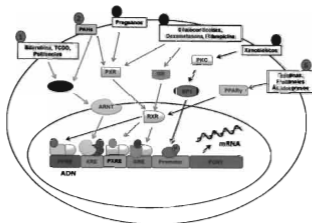
Los resultados del presente trabajo demostraron, por primera vez, un aumento en la transcripción de *PON1* por ligandos de PXR y GR; y esta inducción fue inhibida por ActD, lo que indica que la síntesis de novo de mRNA es el principal mecanismo de la inducción. Así mismo, se demostró que el incremento en los niveles de mRNA de *PON1* se ven reflejados en un aumento en la actividad ARE de la *PON1* a los diferentes tiempos evaluados. Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual estos ligandos modulan la expresión de *PON1* es aún desconocido.

El receptor PXR ha pasado de ser un receptor huérfano a un sensor de xenobióticos y un posible blanco de fármacos (Orans y col., 2005). El PXR se expresa principalmente en el hígado y es activado por una variedad de ligandos estructuralmente distintos que son conocidos por inducir la expresión de varios genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de xenobióticos (CYP450s, UDP-glucuroniltransferasas, glutatión S transferasas, carboxilesterasas y deshidrogenasas) (Medina-Díaz y col., 2005; Orans y col., 2005) incluyendo la proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1) (Geick y col., 2001; Synoldy col., 2001), proteína 2 asociada a resistencia a múltiples fármacos (MRP2) (Dussaulty col., 2001; Kasty col., 2002) y el polipéptido transportador de aniones orgánicos 2 (Staudinger y col., 2001). El PXR es también activado por una variedad de ligandos endógenos (hormonas, ácidos biliares y vitaminas). En respuesta a ácidos biliares y oxiesteroles, el PXR regula la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de ácidos biliares, tales como el CYP7A, *Oatp2*, y 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintetasas (Pascussi y col., 2001; Matsunaga y col., 2012; Luckert y col., 2013). Los resultados del análisis *in silico* de la región promotora de *PON1* mostraron posibles elementos de respuesta para este receptor, y los tratamientos con RIF y DEX incrementaron la expresión de la *PON1*. Estos resultados sugieren fuertemente la participación del PXR en la regulación transcripcional del gen *PON1*. Por otra parte, el SR 12813, un fármaco para el tratamiento del colesterol, ha demostrado eficientemente la activación del PXR humano y de conejo (Luckert y col., 2013). Así, el PXR podría ser otro importante y eficiente regulador de la expresión de la *PON1*.

La DEX, un agonista del receptor GR, incrementa la inducción de CYP3A4 a través del PXR. La expresión de mRNA del PXR en respuesta a DEX es concentración y tiempo dependiente, sugiriendo la existencia de una interferencia funcional en la señalización entre GR y PXR (Pascussi y col., 2001). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, mostraron que los tratamientos con DEX y RIF fueron capaces de incrementar los niveles de mRNA de la PON1 de una manera tiempo-dependiente. Indicando la posible participación de este receptor en la regulación del gen *PON1*. Sin embargo, una interferencia en la ruta GR/PXR/sistema de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, puede producirse entre ellos durante la vía de metabolismo de xenobióticos.

Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios en el laboratorio para dilucidar el mecanismo por el cual la RIF y DEX inducen la transcripción de *PON1*, a través de los GR y PXR.

Sobre la base de los resultados obtenidos y de acuerdo a la literatura, se proponen los siguientes mecanismos moleculares de regulación que pudieran explicar la modulación positiva del gen *PON1* mediante los receptores identificados en este trabajo (Figura 12).



**Figura 12.** Posibles mecanismos moleculares de regulación del gen *PON1* a través de NR. (1) Modulación por bilirrubina, TCDD y polifenoles a través del AhR el cual dimeriza con la proteína translocadora de aril hidrocarburos (ARNT) para interactuar con ER (XRE) dentro de la región promotora del gen *PON1*; (2) Modulación por hidrocarburos policíclicos aromáticos a través de AhR-ARNT y PXR-RXR mediante la interacción en secuencias (XRE, PXRE) dentro de la región promotora del gen *PON1*; (3) Modulación mediante la activación de PXR por pregnanos; (4) Modulación por glucocorticoides, dexametasona y rifampicina a través de PXR y GR; (5) Modulación por xenobióticos a través de activación de cascada de fosforilación mediante la proteína cinasa C (PKC) del factor general de transcripción Sp1, el cual se une a secuencias ricas en citosinas (-108) dentro de la región promotora del gen *PON1*; (6) Modulación mediante estatinas, polifenoles y ácidos grasos a través de la activación de PPAR $\gamma$  (Gouffard y col., 2004; Zimmerman y col., 2009; Ari y col., 2010; Katheeb y col., 2010; Guyot y col., 2011; Matsunaga y col., 2012; Luckert y col., 2013).

## 8. CONCLUSIONES

- Este estudio sugiere mecanismos moleculares en la regulación de la transcripción de PON1 a través de un proceso que implica la activación de los receptores PXR y GR.
- Debido a que la PON1 constituye una diana farmacológica prometedora para la prevención de enfermedades cardiovasculares e intoxicación por plaguicidas, modificaciones a nivel transcripcional de la PON1 pudieran tener un impacto significativo sobre la actividad de esta enzima en el suero. Por lo que es importante entender y profundizar en los mecanismos moleculares a través del cual se podría regular este gen.

## 9. PERSPECTIVAS

- Determinar la interacción y la transactivación de la región promotora del gen *PON1* a través de los receptores nucleares PXR y GR mediante vectores reporteros (actividad luciferasa) en células HepG2.
- Determinar la interacción de los receptores PXR y GR en la región promotora del gen *PON1* mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA) en células HepG2.



## 10. REFERENCIAS

- Adkins S., Gan K.N., Modyt M., La Du B.N. (1993). Molecular Basis for the Polymorphic Forms of Human Serum Paraoxonase/Arylesterase: Glutamine or Arginine at Position 191, for the Respective A or B Allozymes. *The American Journal of Human Genetics*. 52:3; 598-608.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.A., Smith J.A., Struhl K. (2005). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, Vol. 1-4.
- Aviram M., Hardak E., Vaya J., Mahmood S., Milo S., Hoffman A., Billecke S., Draganov D., Rosenblat M. (2000). Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*. 30; 2510-2517.
- Aviram M., Rosenblat M., Billecke S., Erogul J., Sorenson R., Bisgaier C.L., Newton R.S., La Du B. (1999). Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:7-8; 829-904.
- Bagamasbad P., Denver J.R. (2011). Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. *General and Comparative Endocrinology*. 170; 3-17.
- Bai Y., Xue Y., Xie X., Yu T., Zhu Y., Ge Q., Lu Z. (2014). The RNA expression signature of the HepG2 cell line as determined by the integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles. *Gene*. 548; 91-100.
- Belleville J. (2002). The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition*. 18:2; 173-7.
- Brophy V.H., Hastings M.D., Clendenning J.B., Richter R.J., Jarvik G.P., Furlong C.E. (2001). Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics*. 11:1; 77-84.

- Brophy V.H., Jampsa R.L., Clendenning J.B., McKinstry L.A., Jarvik G.P., Furlong C.E. (2001). Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *The American Journal of Human Genetics*. 68:6; 1428-1436.
- Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25; 169-193.
- Camps J., Marsillach J., Joven J. (2009). The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 46:2; 83-106.
- Camps J., Garcia-Heredia A., Rull A., Alonso-Villaverde C., Aragonés G., Beltrán-Debón R., Rodríguez-Gallegos E., Joven J. (2011). PPARs in regulation of paraoxonases: control of oxidative stress and inflammation pathway. *Hindawi Publishing Corporation*. 2011; 1-10.
- Casarett and Doull (2008). *Toxicology: the basic science of poisons*. Ed. McGraw-Hill, United Estate of America, 180 pp.
- Choi S., Sainz B. Jr., Corcoran P., Uprichard S., Jeong H. (2009). Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica*. 39:3; 205-217.
- Chomczynsky P. and Sacchi N. (1987). Single-Step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-choloroform extraction. *Annual Biochemistry*. 162; 156-159.
- Costa L.G., Giordano G., Furlong C.E. (2011). Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: The hunt goes on. *Biochemical Pharmacology*. 81; 337-344.
- Costa L.G., Vitalone A., Cole T.B., Furlong C.E. (2005). Modulation of paraoxonase 1 (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*. 69; 541-550.
- Coumoul X., Diry M., Barouki R. (2002). PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochemical Pharmacology*. 64; 1513-1519.

- Cultek (2006). Protocol y técnicas. PCR en tiempo real. Disponible en: <http://www.cultek.com/info/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>. Consultada el 8 de diciembre de 2014.
- Deakin S., Leviev I., Gomaraschi M., Calabresi L., Franceschini G., James R.W. (2001). Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:6; 4301-4308.
- Deakin S., Leviev I., Brulhart-Meynet M.C., James R.W. (2003a). Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position - 107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochemical Journal*. 372, 643-649.
- Deakin S., Leviev I., Guernier S., James R.W. (2003b). Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 23:11; 2083-2089.
- Devlin T.M. (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España. 1216 pp.
- Dussaulty I., Lin M., Hollister K., Wang E.H., Synold T. W., Forman B.M. (2001). Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 33309-33312.
- Fuhrman B. (2012). Regulation of hepatic paraoxonase-1 expression *Journal of Lipids*. 2012; 1-5.
- Gaidukov L., Rosenblat M., Aviram M., Tawfik D.S. (2006). The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *Journal of Lipids Research*. 47:11; 2492-2502.
- Geick A., Eichelbaum M. Burk O. (2001). Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *The Journal of Biological Chemistry*. 276; 14581-14587.
- Gouédard C., Koum-Besson N., Barouki R., Morel Y. (2003). Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON1 by fenofibrate and statins. *Molecular Pharmacology*. 63; 945-956.

- Gouédard C., Barouki R., and Morel Y. (2004). Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology*. 24:12; 5209-5222.
- Gouédard C., Barouki R., Morel Y. (2004). Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 24:12; 2376-2383.
- Griffin H.G., Griffin A.M. (1994). *PCR Technology: Current Innovations*. CRC Press Inc. United State of America. pp. 63-64.
- Guyot E., Coumoul X., Chasse J.F., Khallouki F., Savouret J.F., Poirot M., Barouki R. (2011). Identification of a new stilbene-derived inducer of paraoxonase 1 and ligand of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical Pharmacology*. 83; 627-632.
- Haj M.D., Ezzaher A., Araoud M., Neffati F., Douki W., Najjar M.F. (2010). Paraoxonase 1 (PON1) activity and lipid parameters in Tunisian smokers. *Annales de Biologie Clinique*. 68:2; 143-147.
- Han C.Y., Chiba T., Campbell J.S., Fausto N., Chaisson M., Orasanu G., Plutzky J., Chait A. (2006). Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus apolipoprotein A-I and paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 26:1806-1813.
- Hedrick C.C., Hassan K., Hough G.P., Yoo J.H., Simzar S., Quinto C.R., Kim S.M., Dooley A., Langi S., Hama S.Y., Navab M., Witztum J.L., Fogelman A.M. (2000). Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 20:8; 1914-1952.
- Humbert R., Adler D.A., Disteché C.M., Hassett C., Omiecinski C.J., Furlong C.E. (1993). The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genetics*. 3; 73-76.
- Isik B., Ceylan A., Isik R. (2007). Oxidative stress in smokers and non-smokers. *Inhalation Toxicology*. 19:9; 767-769.

- Jaouad L, Milochevitch C, Khalil A. (2003). PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radical Research*. 37:1; 77-83.
- Jarvik G.P., Tsai N.T., McKinstry L.A., Wani R., Brophy V.H., Richter R.J., Schellenberg G.D., Heagerty P.J., Hatsukami T.S., Furlong C.E. (2002). Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 22:8; 1329-1333.
- Kasty H.R., Goodwin B., Tarr P.T., Jones S.A., Anisfeld A.M., Stoltz C.M., Tontonoz P., Kliewer S., Willson T.M., Edwards P.A. (2002). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 277; 2906-2915.
- Khateeb J., Gantman A., Kreitenberg A.J., Aviram M., Fuhrman B. (2010). Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: A role for PPAR- $\gamma$  pathway. *Atherosclerosis*. 208; 119-125.
- Kudchodkar B.J., Lacko A.G., Dory L., Fungwe T.V. (2000). Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *The Journal of Nutrition*. 130:10; 2427-2433.
- Kurum Y., Suehiro T., Ikeda Y., Hashimoto K. (2003). Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but is upregulated by interleukin-6. *Life Sciences*. 73; 2807-2815.
- Lemaire G., de Sousa G., Rahmani R. (2004). A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochemical Pharmacology*. 68; 2347-2358.
- Levieu I., James R.W. (2000). Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 20:2; 516-521.

- Liebel S., de Oliveira Ribeiro C.A., de Magalhães V.F., da Silva R.C., Rossi S.C., Randi M.A., FilipakNeto F. (2015). Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). *Toxicology in Vitro*. 29; 479–488.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCt. *Method*. 25; 402-408.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Biological Chemistry*. 193; 265-275.
- Luckert C., Ehlers A., Buhrke T., Seidel A., Lampen A., Hessel S. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR. *Toxicology Letters*. 222; 180-188.
- Mackness B., Mackness M.I., Arrol S., Turkie W., Durrington P.N. (1998). Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FebsLetters*. 423; 57-60.
- Martínez C., Molina J. A., Alonso-Navarro H., Jiménez-Jiménez F. J., Agundez J. AG., García-Martín E. (2010). Two common nonsynonymous paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and brain astrocytoma and meningioma. *Biomedical Central Neurology*. 10; 71.
- Matsunaga T., Maruyama M., Matsubara T., Nagata K., Yamazoe Y., Ohmori S. (2012). Mechanism of CYP3A4 induction by glucocorticoids in human fetal liver cells. *Drug, Metabolism and Pharmacokinetic*. 27; 653-657.
- Medina-Díaz I.M., Arteaga-Illán G., Bermudez de León M., Cisneros B., Sierra-Santoyo A., Vega L., Gonzalez F.J., Elizondo G. (2005). Pregnane X receptor-dependent induction of the CYP3A4 gene by  $\alpha$ ,  $p'$ -1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis ( $p$ -chlorophenyl) ethane. *Drug Metabolism and Disposition*. 35; 95–102.
- Mimura J., Fujii-Kuriyama Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1619; 263– 268.
- Mirdamadi H.Z., Sztanek F., Derdak Z., Seres I., Harangi M., Paragh G. (2008). The human paraoxonase-1 phenotype modifies the effect of statins on

- paraoxonase activity and lipid parameters. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 66:3; 366- 374.
- Orans J., Teotico D.G. and Redinbo M.R. (2005). The nuclear xenobiotic receptor pregnane x receptor: Recent insights and new challengers. *Molecular Endocrinology*. 19; 2891-2900.
- Ota K., Suehiro T., Anii K., Ikeda Y., Kumon Y., Osaki F., Hashimoto K. (2005). Effect of pitavastatin on transactivation of human serum paraoxonase 1 gene. *Metabolism*. 54; 142-150.
- Pascussi J.M., Drocourt L., Gerbal-Chaloin S., Fabre J.M., Maurel P., Vilarem M.J. (2001). Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. *The European Journal of Biochemical*. 268; 6346-6357.
- Prakash M., Phani N. M., Kavya R., Supriya M. (2010). Paraoxonase: Its antiatherogenic role in chronic renal failure. *Indian Journal of Nephrology*. 20:1; 9-14.
- Rainwater D.L., Rutherford S., Dyer T.D., Rainwater E.D., Cole S.A., VandeBerg J.L., Almasy L., Blangero J., MacCluer J.W., Mahaney M.C. (2009). Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity (Edinb)*. 102:2; 147-154.
- Rao M.N., Marmillot P., Gong M., Palmer D.A., Seeff L.B., Strader D.B., Lakshman M.R. (2003). Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism*. 52:10; 1287-1294.
- Sang-Yong E., Yun-Sik K., Chung-Jong L., Chul-Ho L., Yong-Dae K., Heom K. (2011). Effects of intronic and exonic polymorphisms of paraoxonase 1 (PON1) gene on serum PON1 activity in a Korean population. *The Korean Academy of Medical Sciences*. 26; 720-725.
- Schrader C. and Rimbach G. (2011). Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Current Medicinal Chemistry*. 18; 5624-5643.
- Solak Z.A., Kabaroğlu C., Cok G., Parıldar Z., Bayindir U., Ozmen D., Bayindir O. (2005). Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. *Clinical and Experimental Medicine*. 5:3; 99-105.

- Staudinger J.L., Goodwin B., Jones S.A., Hawkins-Brown D., MacKenzie K.I., LaTour A., Liu Y., Klaassen C.D., Brown K.K., Reinhard J., Willson T.M., Koller B.H., Kliewer S.A. (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America*. 98; 3369–3374.
- Stocker R. and Keane J.F. (2005). New insights on oxidative stress in the artery wall. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3:8; 1825-1834.
- Suehiro T., Nakamura T., Inoue M., Shiinoki T., Ikeda Y., Kumon Y., Shindo M., Tanaka H., Hashimoto K. (2000). A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis*. 150:2; 295-298.
- Synoldy T.W., Dussault I., Forman B.M. (2001). The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine*. 7; 584-590.
- Ticozzi N., LeClerc A.L., Keagle P., Glass J.D., Willis A.M., Blitterswijk M.v., Bosco D.A., Rodriguez L.I., Gellera C., Ratti A., Taroni F., Mckenna-Yasek D.M., Sapp P.C., Silani V., Furlong C.E., Brown Jr R.H., Landers J.E. (2010). Paraoxonase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Neurology*. 68:1; 102-107.
- Tsakiris S., Karikas G.A., Parthimos T., Tsakiris T., Bakogiannis C., Schulpis K.H. (2009). Alpha-tocopherol supplementation prevents the exercise-induced reduction of serum paraoxonase 1/arylesterase activities in healthy individuals. *European Journal of Clinical Nutrition*. 63:2; 215-221.
- Zhang Y., Hagedorn C.H., Wang L. (2011). Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1812:8; 893-908.
- Zhao X., Cho H., Yu R.T., Atkins A.R., Downes M., Evans R.M. (2014). Nuclear receptors rock around the clock. *EMBO Reports*. 15; 518–528.
- Zimmermann C., van Waterschoot R. A.B., Harmsen S., Maier A.H., Gutmann H., Schinkel A.H. (2009). Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocyte. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 36; 565–571.