

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Efecto de la administración de distintos ácidos grasos en la expresión de *PON1*, *PON2*, *PON3* y *PCYOX1* en la línea celular HepG2

Effect of the administration of different fatty acids on *PON1*, *PON2*, *PON3* and *PCYOX1* expression in HepG2 cells

AUTOR:

Mario Chavanel Moreno

DIRECTORES:

María Ángeles Navarro Ferrando

Luis Vicente Herrera Marcos

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Curso 2016-2017 – Grado en Biotecnología



Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular y Celular

Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Dra. M^a Ángeles Navarro Ferrando, Profesora Ayudante Doctor y D. Luis Vicente Herrera Marcos, Investigador DGA, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que D. Mario Chavanel Moreno ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo correspondiente a su Trabajo Fin de Grado titulado **“Efecto de la administración de distintos ácidos grasos en la expresión de PON1, PON2, PON3 Y PCYOX1 en la línea celular HepG2”** y que este se ajusta a los criterios que marcan la normativa y la Guía Docente correspondiente.

Zaragoza, 27 de noviembre de 2017

Fdo. Ángeles Navarro Ferrando

Fdo. Luis Vicente Herrera Marcos

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
Abstract.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Paraoxonasas.....	2
Prenilcisteína oxidasa 1.....	3
Ácidos grasos.....	4
Ácido palmítico.....	4
Ácido oleico.....	4
Ácido esteárico.....	5
Piruvato.....	6
Línea celular HepG2.....	6
Especies reactivas de oxígeno.....	6
OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Línea celular HepG2.....	7
Preparación y administración de los medios experimentales.....	8
Medida de las especies reactivas de oxígeno mediante un ensayo con diclorofluoresceína.....	9
Extracción y purificación del RNA.....	10
Retrotranscripción.....	11
Optimización de cebadores.....	12
PCR cuantitativa en tiempo real o <i>Real-Time</i> PCR.....	12
Análisis estadístico de poblaciones.....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
Efecto de los distintos ácidos grasos en el nivel de oxidación intracelular y del medio de cultivo.....	14
Discusión de los resultados.....	16
Efecto de los distintos ácidos grasos en la expresión génica de <i>PON1</i> , <i>PON2</i> , <i>PON3</i> y <i>PCYOX1</i> en HepG2.....	17
Discusión de los resultados.....	18
<i>PON1</i>	18
<i>PON3</i>	18
<i>PCYOX1</i>	19
CONCLUSIONES.....	20
PROYECTO FUTURO.....	21
BIBLIOGRAFÍA.....	22
ANEXO 1.....	25

ABREVIATURAS

- PON: paraoxonasa
- HDL: lipoproteínas de alta densidad
- LDL: lipoproteínas de baja densidad
- MM-LDL: lipoproteínas de baja densidad moderadamente oxidadas
- PCYOX1: prenilcisteína oxidasa 1
- VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- PBS: tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffered saline*
- DCF: 2', 7'-diclorofluoresceína
- mRNA: RNA mensajero
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real

RESUMEN

Las proteínas son susceptibles a un gran abanico de modificaciones post-traduccionales, siendo las más frecuentes glicosilaciones o fosforilaciones, pero existen otras que no por ser menos habituales son menos importantes, como las acilaciones. Ocurre de forma fisiológica, pero también pueden deberse a otros factores como la alimentación.

Las paraoxonasas son una familia de proteínas con propiedades antioxidantes, fundamentalmente sintetizadas en el hígado, de las que se sabe que su expresión y actividad cambia según la dieta, principalmente con los ácidos grasos. Por ejemplo, la administración de ácidos grasos ω -3 en ratas disminuye la actividad de PON1 y el zumo de granada aumenta la expresión génica y proteica de PON2 en macrófagos [1]. Siguiendo esta misma línea, este estudio está dirigido a comprobar si estos cambios se deben a la generación de daño oxidativo durante el metabolismo o a una previa modificación de proteínas por parte de componentes de la dieta, como acilaciones de ácidos grasos. Este trabajo busca discernir si se trata de una situación u otra.

Para ello se estudiaron las especies reactivas de oxígeno generadas tras la administración de distintos ácidos grasos: ácido palmítico, oleico y esteárico en HepG2 y se cuantificó la expresión génica a nivel de mRNA de *PON1*, *PON2* y *PON3*, además de un gen prooxidante, *PCYOX1*. Se utilizaron dos controles como situación referencia: un control ayuno y un control que mantenía condiciones isoenergéticas mediante la adición de piruvato.

En los resultados se observaron diferencias entre las distintas condiciones experimentales, en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la expresión génica de *PON1*, *PON3* y *PCYOX1*.

ABSTRACT

Proteins are susceptible to a wide range of post-translational modifications, with glycosylation or phosphorylation being the more common. There are also others, less frequent, but as important as these, like acylation. This happens physiologically, but it can be caused by some external factors like diet too.

Paraoxonases are a family of proteins with antioxidant attributes, synthesized mainly in liver. It is well known that its expression and activity change depending on diet, fatty acids especially. For example, the administration of ω -3 fatty acids in rat is capable of lowering PON1's enzymatic activity, and pomegranate juice enhances gene and protein expression of macrophage's PON2 [1]. Following this line, this investigation is lead to prove if these changes are due to generation of oxidative damage during metabolism or due to a prior protein modification done by diet components, like acylation.

To get that, reactive oxygen species generated after incubation with fatty acids (palmitic, oleic and stearic) were studied in HepG2 and *PON1*, *PON2*, *PON3* and *PCYOX1* gene expression was evaluated. Two control situations were used as reference: a fasting control and a pyruvate control in isoenergetic conditions.

In results, differences between experimental conditions were observed: in reactive oxygen species and in gene expression.

ANTECEDENTES

Paraoxonasas

Las paraoxonasas son una familia de enzimas propias de los mamíferos que se encuentran codificadas en el *cluster* de genes PON, localizado en el cromosoma 7q21.3-22.1. Este contiene los tres genes que codifican las tres enzimas de la familia descritas hasta la fecha, *PON1*, *PON2* y *PON3*, correspondiendo a las paraoxonasas 1, 2 y 3 respectivamente [2]. Todas ellas tienen en común que son capaces de hidrolizar ésteres, pudiendo así hidrolizar organofosfatos o el factor de activación de las plaquetas [3], impedir la oxidación de lipoproteínas, inhibir la biosíntesis de colesterol en macrófagos o demorar el desarrollo de aterosclerosis, entre otras funciones. Sin embargo, aunque todas las paraoxonasas sean capaces de catalizar tanto la hidrólisis como la condensación de enlaces tipo éster para un amplio rango de sustratos, la especificidad de sustrato y actividad catalítica varían entre ellas. Además, otra diferencia la encontramos en su localización ya que *PON1* y *PON3* son proteínas asociadas a lipoproteínas y por ello se encontrarán en suero normalmente, pero *PON2* es una enzima intracelular. [3]

Todas ellas están relacionadas con los ácidos grasos y la oxidación que su metabolismo produce [4]. La generación de este daño oxidativo no se conoce del todo bien, pero los últimos modelos proponen que puede deberse al ratio de electrones entrando en la cadena respiratoria vía FADH_2 o NADH (moles FADH_2 /moles NADH). Durante el catabolismo de la glucosa el ratio es bajo (0,2) mientras que para los ácidos grasos es elevado (0,5). Esto se justifica por la competencia por la ubiquinona entre el metabolismo de ácidos grasos (sustrato de la ubiquinona oxidoreductasa) y de la glucosa, lo que dificulta su disponibilidad para el Complejo I mitocondrial, la mayor fuente de radicales de oxígeno [5].

Con el fin de evitar daño oxidativo, la célula despliega mecanismos de defensa. Uno de los objetivos de este ámbito científico -y de este trabajo- es comprobar si estos mecanismos se ponen en marcha desde el momento en el que el ácido graso entra en la célula, regulando por ejemplo la actividad de proteínas mediante acilación o si se espera a que aparezca el daño oxidativo. Entre estos mecanismos se incluyen las paraoxonasas. Su capacidad antioxidante está estrechamente relacionada con evitar o

revertir la oxidación en LDL y se ha demostrado que metabolizan muy eficientemente derivados de la oxidación de ácidos grasos comunes. Por ello se cree que este tipo de moléculas podrían ser sustratos endógenos las paraoxonasas. [6]

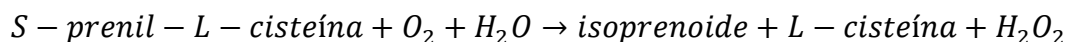
La enzima PON1 es de la que más información se conoce a día de hoy. Se sabe con certeza que es una esterasa asociada a HDL que detoxifica organofosfatos en el hígado y que protege a las LDL de modificaciones oxidativas. Es sintetizada principalmente por el hígado, donde mejor se conoce su función. No obstante, también se ha demostrado su actividad en riñón, cerebro y pulmón. Por otra parte, la disminución de los niveles de PON1 en suero es indicativa de daño hepático y también podría indicar la presencia de aterosclerosis, vasculitis o daño hepático crónico. Por esta razón PON1 podría tener interés como marcador biológico en sangre. [7]

Otro miembro de la familia es PON2, que como ya se ha mencionado anteriormente, es la única paraoxonasa exclusivamente intracelular de las tres. Algunas acciones que PON2 realiza son: prevenir la peroxidación de lípidos de las LDL, revertir la oxidación de las LDL moderadamente oxidadas (MM-LDL) e inhibir la habilidad de las MM-LDL para inducir la quimiotaxis de monocitos [8]. Por ello parece ser que PON2 tiene propiedades antioxidantes similares a las de PON1 y PON3.

Por último, PON3 tiene unas características similares a las de PON1, diferenciándose en su sustrato: PON1 se encarga de hidrolizar casi exclusivamente todos los organofosfatos que entran en el organismo, mientras que medicamentos de alto peso molecular como la lovastatina o la espironolactona son hidrolizados solamente por PON3. [6]

Prenilcisteína oxidasa 1

La enzima prenilcisteína oxidasa 1 también se conoce como prenilcisteína liasa o PCYOX1. Se encuentra codificada por el gen *PCYOX1*, cuya localización cromosómica es 2p13.3 [10]. La proteína generada es una oxidasa dependiente de FAD que cataliza la degradación de prenilcisteína a cisteína libre, un isoprenoide hidrofóbico y una molécula de H₂O₂, mediante la siguiente reacción [11] [12]:



Como se puede observar, PCYOX1 es capaz de influir sobre el estado oxidativo de las células; es capaz de retirar oxígeno en forma molecular, pero al mismo tiempo produce peróxido de hidrógeno, una especie reactiva de oxígeno. No existen muchos estudios que hablen de capacidad de producir daño oxidativo por parte de PCYOX1, la mayoría se centran en su importancia en el metabolismo de las prenilcisteínas. No obstante, en algunos sí que aparece dicho efecto: en estudios recientes se ha llegado a sugerir que podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de aterosclerosis, ya que la enzima se encuentra asociada a VLDL y LDL secretadas por los hepatocitos y en el lisosoma, y ella por sí sola es capaz de generar H₂O₂, que produce gran daño oxidativo. [13] [14]

Se ha visto que la dieta es capaz de influir en el estado oxidativo de las lipoproteínas, como la dieta mediterránea, que estimula la expresión de genes antioxidantes como *PON1* desde el hígado e inhibe la expresión de genes prooxidantes. Los ácidos grasos incluidos en esta dieta son capaces de modular la actividad de PON1, actuando como activadores o inhibidores, como los ácidos grasos insaturados [1]. Se desconoce los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta regulación, pudiendo ser: regulación génica, epigenética, post-transcripcional o post-traducciona por medio de acilaciones proteicas. De la misma manera que una modificación post-traducciona de PON1 es la glicosilación, la acilación por efecto de ácidos grasos procedentes de la ingesta también podría ser capaz de regular su expresión. [9]

Ácidos grasos

ÁCIDO PALMÍTICO

El ácido palmítico, también llamado ácido *n*-hexadecanoico [15], es el ácido graso saturado más abundante en microorganismos, plantas y animales. Su esqueleto molecular está compuesto por 16 carbonos unidos entre sí mediante enlaces simples (16:0). Además, a pH neutro el ácido palmítico pasa a ser palmitato, ya que el grupo carboxilo se ioniza. [15]

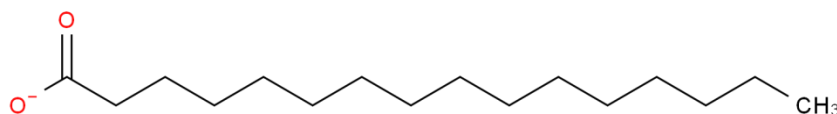


Figura 1. Ácido palmítico en forma de palmitato; este nombre le fue otorgado por Edmond Frémy al descubrirlo en el aceite de palma [16]

En los mamíferos es un ácido graso de especial importancia debido a que un exceso de glúcidos se transformará en palmitato. Otra razón por la que adquiere una tremenda importancia hoy en día es su uso abusivo en la alimentación humana. Desde hace años se conoce que el aceite de palma -cuyo componente mayoritario es el ácido palmítico- es consumido de manera abusiva resultando perjudicial para la salud, afectando principalmente al sistema cardiovascular [17], ya que aumenta el nivel de LDL en sangre [17], genera resistencia a la insulina, inducción de la apoptosis [18], aumenta el grado y la velocidad de metástasis de tumores, etc. [19]

ÁCIDO OLEICO

El ácido oleico también se conoce como ácido *cis*-9-octadecenoico [15]. Se trata de un ácido graso monoinsaturado omega-9 de 18 carbonos (18:1[Δ⁹]) [20]. A pH 7 su grupo carboxilo se encuentra ionizado y la molécula recibe el nombre de oleato. [15]

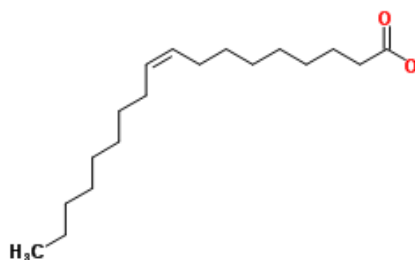


Figura 2. Molécula de ácido oleico en su forma ionizada, el oleato

Es el ácido graso con mayor presencia en el tejido adiposo de seres humanos y el segundo más abundante en el resto de tejidos, solamente superado por el ácido palmítico. [21]

Se trata de un ácido graso importante en la dieta. Entre sus beneficios destaca la capacidad de inducir la síntesis y acumulación de triglicéridos, lo cual protege eficazmente contra la lipotoxicidad, mientras que el palmitato no se incorpora bien a los triglicéridos y provoca apoptosis de la célula. Además, el ácido oleico es capaz de dirigir el palmitato hacia las reservas de triglicéridos para facilitar su incorporación, evitando de esta manera la apoptosis provocada por este [18]. La ingesta de ácidos grasos monoinsaturados provoca un descenso del colesterol LDL en sangre y un aumento del colesterol HDL. [22]

ÁCIDO ESTEÁRICO

El ácido esteárico o ácido *n*-octadecanoico es un ácido graso saturado compuesto por 18 carbonos, todos ellos unidos por enlaces simples (18:0). Lo encontramos en su forma ionizada de estearato a pH neutro. [15]

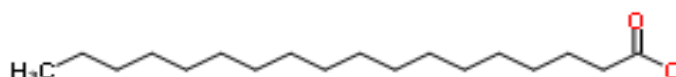


Figura 3. Molécula de estearato, uno de los ácidos grasos saturados más comunes

El origen de la palabra estearato lo encontramos en la palabra griega *stear*, que significa “grasa dura”.

Así como en los dos casos anteriores, es un componente importante de la industria alimentaria, encontrado sobre todo en la manteca de cerdo. También se han investigado sus efectos en el organismo; recientemente se vio que, en comparación con otros ácidos grasos saturados, el esteárico producía unos niveles de LDL menores y era menos propenso a formar ésteres de colesterol. [23]

Piruvato

El piruvato es la base conjugada del cetoácido más simple de todos, el ácido pirúvico. Se trata de un metabolito clave en los procesos metabólicos de los eucariotas [24]. Aparece en rutas tan importantes como la glucólisis, la gluconeogénesis o la síntesis de ácidos grasos, entre otras. Por esta razón, es un buen metabolito para utilizar como control.

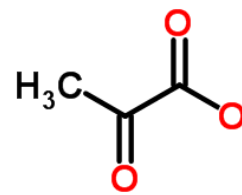


Figura 4. Molécula de piruvato

Línea celular HepG2

La línea celular HepG2 deriva de una biopsia de hígado de un niño caucásico que padecía hepatoblastoma. Fue aislada en el año 1980 por Aden y Knowles [25]. Se trata de un modelo de estudio *in vitro* ampliamente utilizado debido a que conserva gran parte de las funciones celulares de los hepatocitos humanos sanos. Ejemplos de dichas funciones son la expresión de receptores de superficie específicos y la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas. Entre sus usos destacan el estudio del tráfico proteico y lipídico a nivel intracelular y la evaluación de compuestos que puedan afectar positiva o negativamente al metabolismo hepático. [26]

Las células de esta línea poseen un crecimiento tipo epitelial, son adherentes y tienen morfología aplastada. Además, se caracterizan por tener un retículo endoplasmático y un aparato de Golgi muy desarrollados. Por último, su crecimiento se da en monocapas que se superponen conforme aumenta la confluencia. [27]

Especies reactivas de oxígeno

Durante la fosforilación oxidativa, en la mitocondria se producen especies reactivas de oxígeno, ROS por sus siglas en inglés. Los pasos clave de la cadena transportadora de electrones que influyen en este proceso son dos: durante el paso de electrones desde el ubiquinol al Complejo III y en el paso de electrones de los Complejos I y II a la ubiquinona. Durante ambos sucesos puede pasarse un electrón al oxígeno molecular, generando así un radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). Este radical conduce a la formación de otro, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), aún más reactivo. [15]

Debido a esto, se pueden estudiar las ROS como un indicativo de que las células están poniendo en marcha su maquinaria metabólica. Por ejemplo, si en un estudio se tratan células con diferentes metabolitos energéticos a concentraciones isoenergéticas y se observan diferencias, podremos deducir que tales diferencias no se deben a su consumo como fuente de energía, sino que surgen de otros procesos bioquímicos, como las regulaciones post-traduccionales de proteínas (acetilaciones, acilaciones...).

Así mismo, si tras el mismo tratamiento no se observan diferencias en la producción de ROS, pero si a nivel transcripcional de determinados genes, podremos deducir que

estos genes se estimulan más por un determinado metabolito que por otro y que esto no es fruto de su consumo a nivel mitocondrial. Quedaría por dilucidar qué ruta bioquímica conlleva a dicho estímulo.

OBJETIVOS

En este proyecto como objetivo general se plantea el estudio de la respuesta dada por parte de células HepG2 tratadas bajo diferentes condiciones dietéticas. Los objetivos parciales fueron:

1. Discernir a qué tiempos los ácidos grasos logran crear diferencias en la producción de ROS en HepG2.
2. Averiguar si el tratamiento con ácidos grasos consigue estimular o inhibir la expresión génica de *PON1*, *PON2*, *PON3* y *PCYOX1*.
3. Dilucidar si las diferencias en la expresión de dichos genes, en el caso de que existan, es previa a que aparezca la oxidación o posterior.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular HepG2

Las células HepG2 se mantuvieron en atmósfera humidificada con una concentración de CO₂ del 5 %, a 37 °C, en frascos de cultivo de 25 cm². Se crecieron en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific), suplementado con 10 % de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales al 1 %, penicilina (1000 U/mL) al 1 %, estreptomicina (1000 µg/mL) al 1 % y anfotericina (250 U/mL) al 1 %.

Los pasajes se realizaron utilizando tripsina 0,25 % - EDTA 1 mM, cuando la confluencia del cultivo se aproximaba al 100 %. En primer lugar se retiró el medio mediante una bomba de vacío, después se lavó con tampón PBS para retirar el suero fetal bovino restante, ya que este inhibe la acción de la tripsina. Tras ello, se añadió la tripsina necesaria y se incubó durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadió 5 mL de medio de cultivo para resuspender correctamente las células ya separadas del plástico, y esta mezcla se transfirió a un tubo cónico Falcon de 15 mL que se centrifugó a 3900 g durante 5 minutos. Con el *pellet* ya situado en el fondo cónico del tubo, se retiró el sobrenadante y se añadió 5 mL de medio de cultivo para resuspenderlo. Según el experimento a realizar, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (extracción de RNA) o 96 pocillos (ensayo de la diclorofluoresceína), a una confluencia aproximada del 20 %.

El manejo de las células se realizó siempre en el interior de una campana de flujo laminar.

Preparación y administración de los medios experimentales

Fueron 5 las condiciones experimentales: control en ayunas, control con piruvato, administración de palmitato, oleato y estearato. Se realizaron incubaciones de 3, 6, 24 y 48 horas para cada condición, con una N=8.

Los experimentos se llevaron a cabo previa incubación de 36 horas con un medio de arresto, que establecía condiciones de ayuno, cuya composición fue: DMEM 1,5 g/L glucosa⁺, 2 % de glutamina, 0,4 % de suero fetal bovino y 1 % de antibiótico.

La dosis elegida para cada condición experimental surgió de una prueba previa para determinar un límite de toxicidad, tras la cual se decidió utilizar 200 μ M para el ácido palmítico, el ácido graso más tóxico de todos, y concentraciones isoenergéticas para el resto de ácidos grasos y el piruvato.

La adición de ácidos grasos se hizo en condiciones isoenergéticas en vez de equimolares con el objetivo de normalizar su producción energética y poder explorar sus efectos a través de las acilaciones proteicas en la expresión de las paraoxonasas y *PCYOX1*. Por ejemplo, cada molécula de palmitato genera un balance de 106 de ATP tras la activación del ácido graso, la β -oxidación y el ciclo de Krebs. Si la concentración que usamos de palmitato es de 200 μ M, las del resto deberán ser proporcionales a esta teniendo en cuenta el balance energético de cada metabolito. Estos datos quedan reflejados en la siguiente tabla:

Compuesto	Balance ATP	Concentración utilizada
Palmitato	106	200 μ M
Oleato	118,5	180 μ M
Estearato	120	177 μ M
Piruvato	12,5	1,7 mM

Tabla 1. Concentración utilizada de cada compuesto para que las condiciones energéticas fueran similares entre condiciones. Los ATP generados se calculan teniendo en cuenta que 1 NADH+H⁺ equivale a 2,5 ATP y 1 FADH₂ equivale a 1,5 ATP

Para disolver los ácidos grasos en el medio de cultivo hubo que saponificarlos, para lo que se utilizó NaOH 1 M. Los ácidos grasos se encontraban disueltos en etanol a una concentración 100 mM, por lo que si se pusieron 30 μ L de ácido graso, de NaOH correspondía 3 μ L. Como a temperatura ambiente los ácidos grasos saturados precipitan, no se pueden pipetear bien, y por ello fue necesario calentar las disoluciones en un baño térmico a 50 °C. Se resuspendió el precipitado y seguidamente se procedió a pipetear la cantidad necesaria, que se depositó sobre el NaOH. Este proceso requirió cierta velocidad, pues los ácidos grasos tienden a precipitar tan pronto como vuelven a la temperatura ambiente.

A continuación se procedió a evaporar el etanol bajo corriente de nitrógeno (a fin de evitar la oxidación de los ácidos grasos) en el baño térmico a 50 °C. Cuando se evaporó todo el etanol, el resultado fue un precipitado de color blanco, el ácido graso saponificado. Después fue importante tapar estas preparaciones e introducir las en el congelador para así alejarlas de la luz y el oxígeno. Se conservaron de este modo hasta que se les adicionó el medio de cultivo vehículo. Este almacenamiento nunca fue superior a 24 h.

Tras las 36 horas de ayuno, se prepararon y añadieron los medios de cultivo, resultantes de mezclar el ácido graso saponificado con medio vehículo, compuesto por un 5 % de albúmina, 1 % de antibiótico, 2 % de glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, todo disuelto en medio DMEM glucosa. Además, se prepararon dos medios que se utilizaron como control: medio vehículo sin añadidos y medio vehículo con piruvato.

Antes del comienzo del experimento se retiró el medio de arresto con una bomba de vacío y se lavaron los pocillos con PBS. A continuación se añadió el medio correspondiente a cada pocillo.

Medida de las especies reactivas de oxígeno mediante un ensayo con diclorofluoresceína

La diclorofluoresceína (DCF) es un compuesto que puede ser utilizado como sonda fluorescente. Es fácilmente internalizada por las células y cuando se oxida emite fluorescencia, lo que permite cuantificar el peróxido de hidrógeno y el daño oxidativo celulares. [28]

Se siguieron dos protocolos diferentes, uno para estimar las ROS intracelulares y otro para medir las ROS en el medio de cultivo. Por esta razón, lo primero que se hizo fue tomar con una micropipeta 100 µL de medio de cada pocillo y trasvasarlo a otro pocillo sin células. El medio restante fue absorbido mediante una bomba de vacío y se desechó.

Procedimiento para las células:

Tras retirar el medio sobrante, se realizó un lavado con PBS, se aspiró y seguidamente se añadieron 100 µL/pocillo de DCF (disolución *stock* a 0,002 g/mL, disuelta en metanol y almacenada a -80 °C), a una concentración final de 20 µM.

Procedimiento para los medios:

A los 100 µL de medio que se recogieron por pocillo, hubo que añadirles 25 µL de azida de concentración final 0,12 % (se encarga de acelerar la reacción al disparar el estrés oxidativo) y 25 µL de DCF diluida a partir de una disolución *stock* a 500 µM para que quedara a 20 µM.

Por último, las placas se llevaron a la estufa a 37 °C y se hicieron medidas de la fluorescencia en intervalos de media hora durante un total de 4 horas. Estas

mediciones se realizaron en un lector de placas SPECTROstar Omega (BMG Labtech), que excitó la DCF a una longitud de onda de 485 nm y captó su emisión a 520 nm.

Tras la recogida de datos se calculó la media aritmética de todos los pocillos de para cada una de las condiciones y esto se representó gráficamente, como veremos más adelante en el apartado “Resultados y discusión”.

Extracción y purificación del RNA

Para la extracción y purificación del RNA de las muestras se siguió el protocolo del kit comercial “*Quick-RNA MiniPrep*” (Zymo Research). En primer lugar, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se añadieron 600 µL de RNA Lysis Buffer por pocillo. Con dicho volumen se lisaron las células y el contenido del pocillo fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.

El siguiente paso fue centrifugar el lisado celular 1 minuto a 13500 g. El sobrenadante fue transferido a un filtro Spin-Awat Filter dentro de un tubo colector (ambos incluidos en el kit) y se volvió a centrifugar. El filtro se desechó y se continuó con lo que lo había atravesado. Después se añadió etanol puro en proporción 1:1 y se transfirió a un filtro Zymo-Spin IICG Column, incluido en el kit, también dentro de un tubo colector. Esto se centrifugó durante 30 segundos a 13500 g y se desechó la fracción que había pasado a través del filtro. Para eliminar restos de DNA, se hizo un tratamiento con DNasa, incluido en el protocolo

Seguidamente se adicionaron 400 µL de RNA Prep Buffer del kit a la columna y se centrifugó a 13500 g y 30 segundos. A continuación se repitió esto último pero con 700 µL de RNA Wash Buffer en lugar de RNA Prep Buffer. Luego se añadieron 400 µL más de RNA Wash Buffer y se llevó a la centrífuga por 2 minutos a 13500 g para asegurarse de que la muestra quedaba completamente lavada.

En último lugar, la columna se posicionó en el Eppendorf sobre el que se deseaba recoger el RNA purificado. Se añadió 50 µL de DNase/RNase Free Water, provista en el kit y se centrifugó 30 segundos a 13500 g. Después se repitió esto último.

Para evaluar el grado de pureza y la concentración del RNA obtenido se utilizó el equipo SPECTROstar Nano (BMG Labtech) para medir la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda. Gracias al ratio A260/A280 podemos obtener un dato con el que hacernos una idea de la calidad de la purificación de RNA. La absorbancia a 280 nm se corresponde con el máximo de absorbancia de los aminoácidos aromáticos, por lo que con este ratio A260/A280 estaremos comprobando la pureza respecto a contaminaciones de proteínas, pero no con respecto a DNA. El ratio debe encontrarse entre 1,75 y 2 para calificar como buena la muestra.

La integridad del RNA obtenido se comprobó mediante electroforesis. Se cargaron las muestras de RNA en un gel de agarosa (UltraPure Agarose, Invitrogen) al 1 % y se dejaron 20 minutos tras aplicar una corriente eléctrica de 90 V. El gel se visualizó en un transiluminador GelDoc XR (BioRad). Si el RNA está íntegro, esperamos observar

tres bandas por carril, las correspondientes al RNA ribosómico 18S y 28S y los RNAs de menor tamaño (RNA mensajero, etc.).

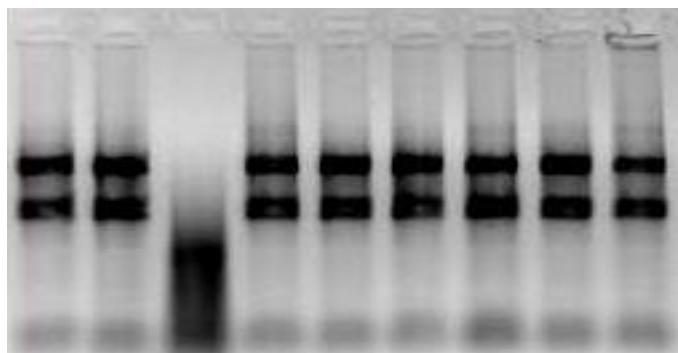


Figura 5. Electroforesis en gel de RNA total. En casi todos los carriles se aprecian las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S a excepción del tercer carril, donde observamos el patrón característico de una muestra de RNA degradada.

Retrotranscripción

Cuando se tuvo el RNA extraído y se confirmó que se podía trabajar con él, se procedió a realizar la retrotranscripción de las muestras. Para ello, utilizamos el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific).

De cada muestra se tomaron 0,5 µg de RNA y a esto se le añadió 1 µL de *Random Hexamer Primer*, una mezcla ya preparada de hexanucleótidos monocatenarios aleatorios que actuarán como cebadores durante la retrotranscripción, ya que hibridan en secuencias al azar. Además de estos dos componentes, se añadió agua libre de RNasas hasta alcanzar los 11 µL de volumen final. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 5 minutos en un termociclador S1000 ThermalCycler (Biorad) para conseguir desnaturalizar el RNA y que los cebadores hibridasen en las secuencias correspondientes.

Tras esto, se añadieron a la muestra 9 µL de una mezcla de reacción compuesta por 4 µL de 5X Reaction Buffer, 1 µL de RiboLock 20 U/µL (un inhibidor de RNasas), 2 µL de dNTP Mix 10 mM y 2 µL de retrotranscriptasa o transcriptasa reversa M-MuLV (20 U/µL), todo ello incluido en el kit. Inmediatamente después se llevó al mismo termociclador donde se programó la secuencia de tiempo y temperatura que la muestra debía seguir; en este caso el programa fue:

- 1º. Incubación a 25 °C durante 5 minutos
- 2º. Aumento de la temperatura hasta 37 °C e incubación de 1 hora
- 3º. Aumento de la temperatura hasta 70 °C y mantenerlos 5 minutos
- 4º. Descenso rápido hasta 4 °C durante tiempo indefinido para mejorar la conservación de la muestra

Cuando acabó este proceso, en los tubos Eppendorf teníamos los cDNAs de los RNAs extraídos de las células sometidas a las distintas condiciones.

Optimización de cebadores

En el caso de los genes *TBP* y *PON3* hubo que llevar a cabo un proceso de optimización de la concentración a la que se iban a incluir los cebadores durante la PCR a tiempo real, ya que se diseñaron *de novo*.

Para ver la capacidad de amplificación de nuestras muestras, se hizo un *pool* de las muestras con los cDNAs y sus respectivas diluciones 1:1, 1:10 y 1:100. Con muestra de estos tres *pools* se hizo una PCR para los dos genes.

Las reacciones se llevaron a cabo en una placa de 48 pocillos MicroAmp Fast Optical 48-Well (Applied Biosystems) y utilizando el termociclador StepOne Real-Time PCR System. El programa de ciclos seguido por las muestras fue el mismo que el descrito en el apartado posterior "PCR cuantitativa en tiempo real o *Real-Time PCR*".

Se procedió al análisis de los datos de PCR: se calculó la media de los dos C_T obtenidos para cada una de las tres diluciones. Luego, se representó gráficamente este dato frente al logaritmo de la cantidad de cDNA en cada dilución, 25 ng para la 1:1, 2,5 ng para la 1:10 y 0,25 ng para la 1:100. De la recta de ajuste hallamos la pendiente, lo nos permitió tener un valor numérico para el rendimiento de los cebadores utilizando la fórmula:

$$\text{Rendimiento} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

Si este dato se encuentra entre el 90 % y el 110 %, la concentración de cebadores es adecuada para trabajar.

PCR cuantitativa en tiempo real o *Real-Time PCR*

Una vez sintetizado el cDNA, este pudo usarse como material genético molde en una Real-Time PCR para analizar la expresión génica diferencial de los genes *PON1*, *PON2*, *PON3* Y *PCYOX1*.

La PCR a tiempo real se basa en el uso de fluoróforos capaces de intercalarse en la cadena de DNA y emitir fluorescencia, la cual será mayor cuantas más copias del fragmento en el que se intercalan haya en el medio de reacción. En este caso, el fluoróforo utilizado fue SYBRGreen, molécula capaz de intercalarse en la doble hebra del DNA y emitir fluorescencia cuando esta se desnaturaliza por culpa de los ciclos de calentamiento y enfriamiento de la muestra. Para poder cuantificar la expresión de los genes de estudio debemos poder compararlo con un gen referencia, un gen que se expresa de forma basal y su expresión no varía en las condiciones de estudio. Esto es lo que se conoce como un *housekeeping*. En este trabajo utilizamos dos *housekeeping*: el gen *PPIB*, que codifica para la ciclofilina B, y el gen *TBP*, que codifica *TATA-box binding protein* o proteína de unión a caja TATA.

Para la realización de la PCR se utilizaron placas de 96 pocillos MicroAmp Fast Optical 96-Well (Applied Biosystems). Se cargó 1 μL de cDNA de cada muestra por duplicado y un control negativo, también por duplicado. Después, a cada pocillo se añadieron 11,5 μL de una mezcla de reacción. Dicho mix estaba compuesto por: 6,25 μL de SYBR

Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), cantidades variables de cebadores según la concentración que se quisiera utilizar -lo cual dependía del gen con el que estuviésemos tratando (ver Anexo 1)- y una cantidad de agua libre de DNA hasta completar el volumen. La suma total de estos volúmenes tenía que resultar 11,5 μ L, como se ha mencionado antes.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System, el cual está programado para realizar el siguiente proceso:

- 1º. 95 °C durante 20 segundos para activar reactivos y desnaturalizar las cadenas de cDNA
- 2º. 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C, aunque esta temperatura es susceptible de modificación según los cebadores utilizados

Al finalizar las más de dos horas que dura el proceso, se realizó una curva de *melting* por cada pocillo, la cual nos permitió valorar si la muestra había amplificado correctamente o si por el contrario había más de un pico en la gráfica, lo que indicaría más de un producto de amplificación (cosa que no debe ocurrir en nuestro caso).

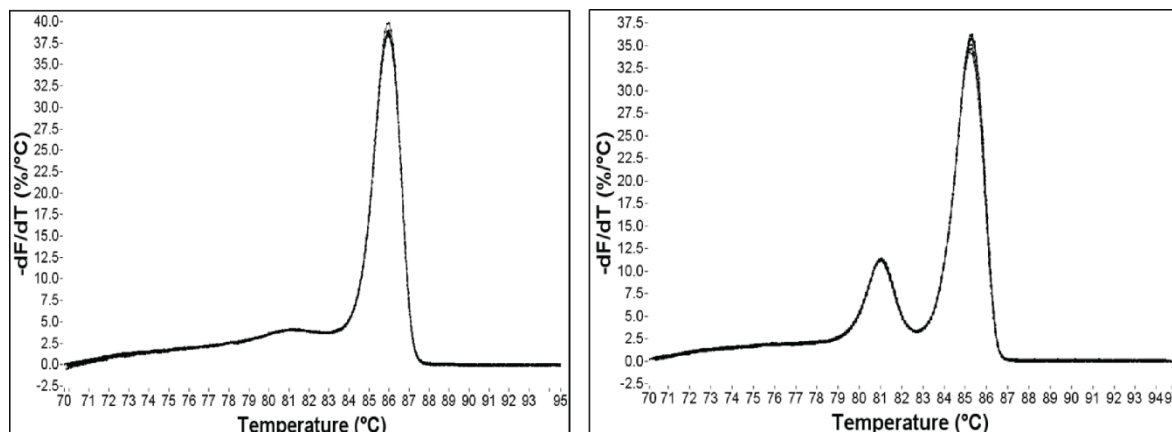


Figura 6. Curvas de *melting*. En la imagen izquierda, la PCR se ha desarrollado normalmente y habrá un producto de amplificación. En el caso de la derecha, aparece un amplificado extra a una temperatura diferente a la deseada, por lo que el resultado serán dos productos de PCR.

Además de la curva de *melting*, el sistema StepOne también proporcionó los datos correspondientes al C_T de cada pocillo de la placa, o lo que es lo mismo, el ciclo en el que la emisión de fluorescencia supera el umbral de detección y alcanza la suficiente intensidad como para ser detectada por el termociclador. Este valor es el que más tarde nos permitió determinar cuantitativamente la expresión diferencial de cada gen.

A continuación, los datos se importaron a un ordenador para trabajar con ellos,

Como las muestras se hicieron por duplicado, se tuvo que calcular la media y la desviación estándar y comprobar que no había habido problemas en ninguna muestra ni duplicado. Luego, se comprobó que el gen control no cambiara en las condiciones de estudio mediante un análisis estadístico entre grupos. Después, con la media del C_T de cada muestra, se calculó el valor ΔC_T (C_T gen de estudio - C_T gen *housekeeping*). El siguiente paso fue normalizar los valores de ΔC_T , para lo que se calculó la media de

este valor para el grupo control, y se restó a todas las muestras el valor ΔC_T del grupo control, con lo que obtuvimos un $\Delta\Delta C_T$ por muestra. Para representar los datos de forma que pudiesen compararse se calculó un nuevo valor: la potencia $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Análisis estadístico de poblaciones

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 7.03, en el que se realizaron los test one-way ANOVA y test de Dunnett. El primero se utilizó para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de tres o más grupos no relacionados entre sí. El test compara las medias aritméticas y se cuestiona la hipótesis nula, la cual defiende que todas las medias de las poblaciones son iguales. Al concluir el test, se podrá rechazar o no dicha hipótesis. Antes de empezar el test se pueden personalizar algunos parámetros, siendo uno de ellos un valor α , el nivel de significación, que normalmente se establece en 0,05. Si el valor P otorgado por el test es menor que α , 0,05 en este caso, entonces podremos afirmar con un 95 % de seguridad que aparecen diferencias significativas entre las poblaciones con las que tratamos.

No obstante, este test no sirve para saber entre qué condiciones aparecen las diferencias significativas. Es por ello que llevamos a cabo la segunda prueba, el test de Dunnett. Este test compara cada condición con un control y otorga un valor P que también deberá ser menor que 0,05 para asumir las diferencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los distintos ácidos grasos en el nivel de oxidación intracelular y del medio de cultivo

Uno de los objetivos del estudio fue discernir a qué tiempos los ácidos grasos lograban generar diferencias en la producción de ROS en HepG2. Por ello, se sometieron por separado células y medios de cultivo a una medida de las ROS utilizando el compuesto diclorofluoresceína.

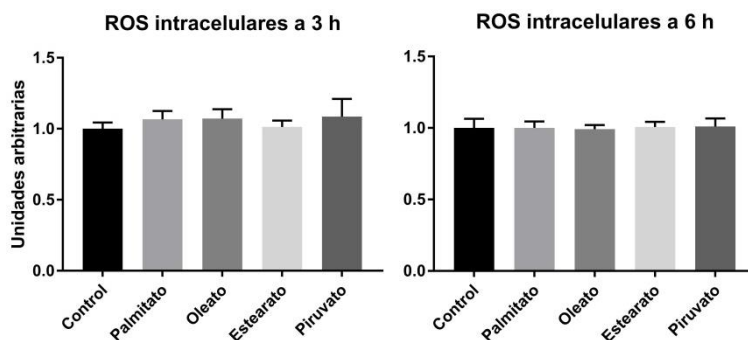


Figura 7. Efecto de la administración de los distintos ácidos grasos en los niveles de ROS tras 3 y 6 h de incubación. Los datos representados están tomados pasadas 4 h de incubación con DCF. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test one-way ANOVA, que nos indicó si era necesario aplicar también el test de Dunnett. Estos gráficos están realizados en el programa GraphPad Prism versión 7.03

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos casos, por lo que se pasó a aumentar los tiempos de incubación con los ácidos grasos, a 24 y 48 h.

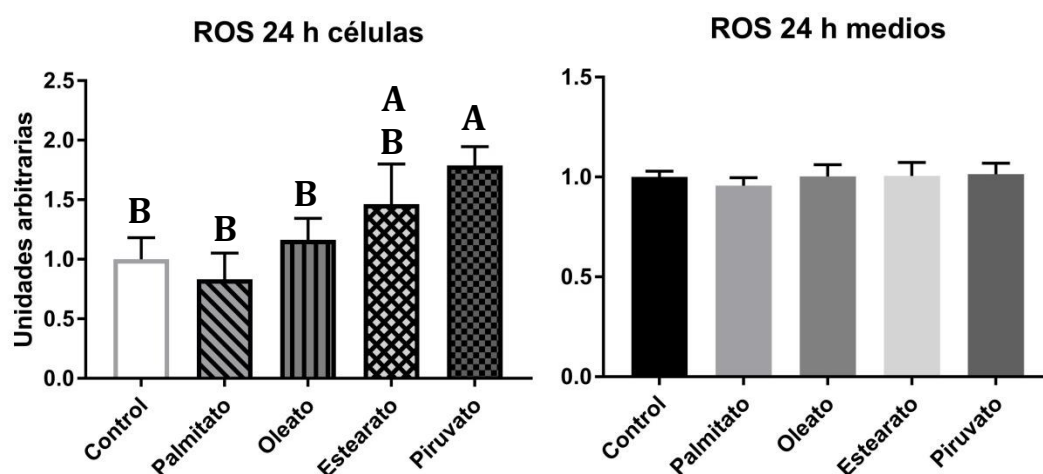


Figura 8. Efecto de la administración de los distintos ácidos grasos en los niveles de ROS intracelulares y en el medio de cultivo tras 24 h de incubación. Los datos representados están tomados pasadas 4 h de incubación con DCF. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test one-way ANOVA y el test de Dunnett (A: $P < 0,05$ vs control; B: $P < 0,05$ vs piruvato). Estos gráficos están realizados en el programa GraphPad Prism versión 7.03

En la medida de las ROS intracelulares para 24 h de incubación con ácidos grasos se obtuvieron diferencias significativas entre control ayuno y estearato y entre control ayuno y control piruvato. Para oleato y palmitato no se observan diferencias significativas respecto al control ayuno. También hubo diferencias significativas en todas las condiciones experimentales al comparar con el control piruvato.

En la gráfica de ROS en medios de cultivo (Figura 8) no se apreciaron variaciones significativas entre condiciones.

Respecto al experimento de las 48 horas:

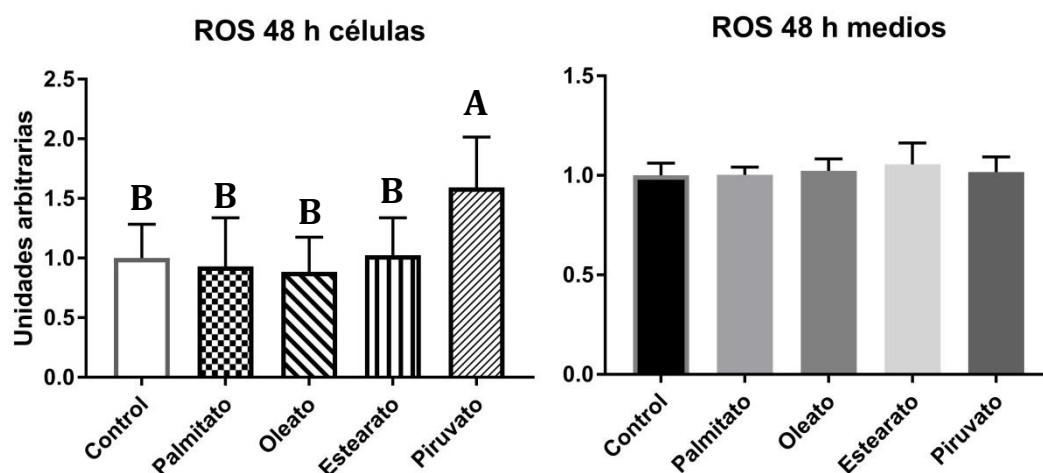


Figura 9. Efecto de la administración de los distintos componentes en los niveles de ROS intracelulares y en el medio de cultivo tras 48 h de incubación, normalizados respecto al control ayuno en función del tiempo. Los datos representados están tomados pasadas 4 h de incubación con DCF y expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por los test one-way ANOVA y Dunnett (A: $P < 0,05$ vs control; B: $P < 0,05$ vs piruvato)

Los resultados obtenidos a 48 h siguen con la dinámica del experimento de las 24h, con la diferencia de que aquí el estearato no presenta el aumento anteriormente observado. Respecto al control ayuno solo presenta diferencias significativas el control piruvato, pero entre piruvato y los ácidos grasos se observan diferencias significativas en todos ellos.

En los medios de cultivo no hay diferencias significativas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La respuesta a nivel celular tras 24 h de incubación se trata de un resultado inesperado. *A priori* esperábamos que el palmitato se comportase como el tratamiento más dañino de todos los explorados en el presente trabajo. Sin embargo, presenta una tendencia a disminuir de las ROS intracelulares. Una idea que explicaría esto es que la célula esté tan preparada para hacer frente al palmitato que posea un mecanismo defensivo de acción rápida capaz de neutralizar la gran cantidad de ROS que se generan durante su procesamiento y que se estimule únicamente mediante palmitoilización. Esto explicaría por qué los niveles de ROS para oleato, estearato y piruvato son mayores, al carecer de esta hipotética regulación.

Respecto a los medios de cultivo tras 24 h de incubación, todas las poblaciones eran muy similares, lo cual podría deberse a dos cosas principalmente: o bien las ROS no se externalizan al medio o bien el método no funcionó. El procedimiento de la DCF descrito para los medios de cultivo se trata de una adaptación del de la detección de ROS en LDL. Por este motivo, quizás no podamos tomar estos resultados como válidos. Habría que probar diferentes condiciones de la técnica para ir perfeccionándolo hasta llegar a un procedimiento fiable y adecuado.

Una hipótesis que explique los elevados niveles de ROS en el control piruvato tras la incubación de 48 horas es que una dosis de piruvato como la utilizada tenga potencial suficiente como para seguir generando estrés oxidativo en la célula durante muchas horas. No obstante, no parece la idea más plausible ya que el piruvato se metaboliza rápidamente. Otra opción es que los ácidos grasos provoquen una respuesta frente a ROS lenta, siendo la más lenta la del estearato y por eso a las 24 horas su nivel de ROS era mayor. Si el piruvato por sí solo no fuese capaz de desencadenar esta respuesta, las ROS se producirían constantemente y se neutralizarían lentamente; pero si los ácidos grasos al metabolizarse producen la puesta en marcha de mecanismos de defensa de la célula, cuando comience a generarse el estrés oxidativo en la mitocondria podría ser neutralizado rápidamente. Puede que sea esto lo que estamos viendo y por eso parezca que los ácidos grasos no generan ROS, cuando lo que está pasando realmente es que han sido neutralizadas debido a respuestas celulares. Para dar respuesta a esta incógnita se deberían disminuir las condiciones de tiempos de incubación y buscar una situación intermedia entre la incubación de 6 h y 24 h.

En los medios de cultivo tras incubación durante 48 h se observó lo mismo que para 24 h. Como en su caso, podría deberse a que los niveles de ROS no estén disparados o que el procedimiento utilizado no sea válido.

Las primeras pruebas con DCF se hicieron tras 3 y 6 horas de incubación pero no se observaron diferencias entre condiciones. Y quizás, 24 y 48 horas sean tiempos demasiado largos, dado que al comparar entre las figuras 8 y 9, se ve que los niveles de ROS están elevados para el estearato en la Figura 8, pero no en la Figura 9, tras 12 h más de incubación. Por eso, podría ser que la Figura 8 fuese una situación equivalente para palmitato y oleato. Ya habrían ejercido su regulación y los niveles de ROS descenderían hasta alcanzar los del control. Para salir de dudas, una incubación más corta, a 12 horas, para comparar con la de 24 es el siguiente paso que se debería dar en este experimento.

Como las PON no son las únicas protecciones frente a ROS de las células, habría que explorar otros genes involucrados y sus proteínas, como por ejemplo la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa.

Efecto de los distintos ácidos grasos en la expresión génica de *PON1*, *PON2*, *PON3* y *PCYOX1* en HepG2

Las células fueron tratadas con los medios experimentales correspondientes y tras extraer y retrotranscribir el RNA se procedió al análisis de la expresión de *PON1*, *PON2*, *PON3* y *PCYOX1* tras 6 h de incubación en cada condición experimental. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 10.

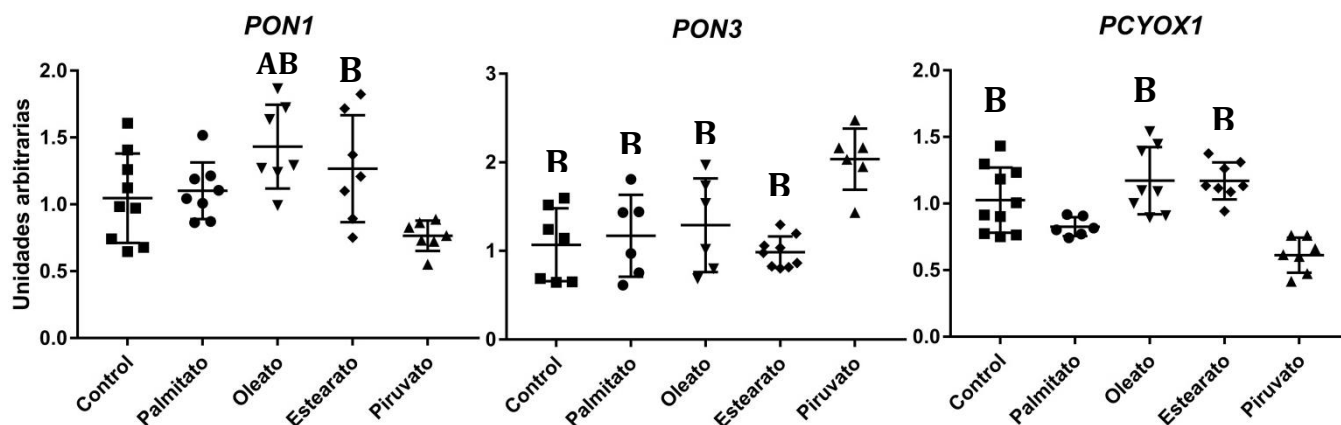


Figura 10. Efecto de la administración de los distintos componentes en la expresión a nivel de mRNA de *PON1*, *PON3* y *PCYOX1* en HepG2 tras 6 horas de incubación. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por los test one-way ANOVA y Dunnett (A: $P < 0,05$ vs control; B: $P < 0,05$ vs piruvato).

La PCR del gen *PON2* no se logró poner a punto; al realizar la PCR correspondiente, no se obtuvo ningún producto de amplificación. Por ello no se pudo estudiar su expresión génica.

En la Figura 10 se observan diferencias significativas:

- Para *PON1*: entre control ayuno y oleato, entre control piruvato y oleato y entre control piruvato y estearato.
- Para *PON3*: entre control piruvato y el resto de condiciones.
- Para *PCYOX1*: entre control piruvato y control ayuno, oleato y estearato.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

PON1

Como se observa en la Figura 10, la expresión de *PON1* es significativamente mayor tras 6 h de incubación de las células HepG2 con oleato si lo comparamos con los dos grupos control.

Cabría esperar que *PON1* estuviese menos expresado en las condiciones de más daño oxidativo (estearato y piruvato). Sin embargo, una sobreexpresión del gen tampoco implica un descenso en las ROS, ya que intervienen muchos factores sobre la proteína, siendo uno de ellos las post-traduccionales. El resultado observado se podría justificar a través de un estudio del año 2010 en el que se observó una posible relación entre la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico, y un aumento de la concentración de HDL en sangre [22]. Por otra parte sabemos que paraoxonasa 1 es una esterasa asociada a HDL [7]. En este hipotético caso, el oleato estimularía la síntesis de HDL para su liberación al torrente sanguíneo, provocando un aumento de la síntesis de proteínas asociadas a estas partículas, como *PON1*, y por tanto su expresión génica.

Respecto estearato, tal y como se puede observar en la gráfica, hay un aumento significativo en la expresión de *PON1* respecto al control piruvato, lo cual podría deberse a acilaciones post-traduccionales específicas que el palmitato no puede realizar. Este aumento no se refleja en los niveles de ROS, ya que tras la incubación 24 h con este ácido graso el nivel de ROS intracelular es de los más elevados.

Lo ideal sería continuar estudiando *PON1* mediante proteómica, realizando un Western Blot para comprobar la presencia de la proteína en la célula. En caso afirmativo, incluso se podría estudiar su actividad enzimática.

PON2

La ausencia de producto de PCR pudo deberse a una concentración baja del mRNA, a un mal funcionamiento de los cebadores, a que el gen no se transcriba en HepG2... Para saber si hay proteína, se debería llevar a cabo un Western Blot con *PON2* como diana.

PON3

Para el caso de *PON3*, se observaron diferencias significativas entre el control piruvato y cada una de las otras condiciones. Esto puede deberse a que la expresión de este gen se encuentre estimulada por acetilaciones, mientras que las acilaciones

proteicas no lo regulen. Acetilaciones en factores de transcripción podrían activarlos y promover la síntesis de mRNA de *PON3*, reflejando el resultado de la Figura 10.

Probablemente la tendencia a aumentar (no significativamente) su expresión respecto al control de ayuno observada en los grupos palmitato y oleato sea debido a la conversión de estos ácidos grasos a acetil-CoA, y que sea este el que esté aumentando su expresión.

Otra posibilidad es que el piruvato, al ser una molécula que se transforma directamente en acetil-CoA y este entra en la mitocondria para seguir su oxidación en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, provoque un aumento del metabolismo oxidativo de la mitocondria. Esto aumenta a su vez el estrés oxidativo en la matriz mitocondrial y por tanto la célula toma medidas para contrarrestarlo, pudiendo ser una de ellas incentivar la transcripción de *PON3*.

Dado que los experimentos se llevaron a cabo en condiciones isoenergéticas (a nivel de ATP producido) nos lleva a plantearnos por qué el piruvato estimula significativamente la transcripción de *PON3* pero el palmitato no, si la célula obtiene la misma energía a partir de ellos. La clave puede estar en un matiz, la velocidad con la que lo hace. Mientras que el piruvato es transformado por el complejo piruvato deshidrogenasa en una molécula de acetil-CoA, que entra en la cascada metabólica y acabará produciendo la energía de la célula -y el estrés oxidativo-, con los ácidos grasos no es todo tan sencillo. Ellos, una vez están en la mitocondria, han de sufrir varias rondas de β -oxidación que los irán transformando poco a poco en acetil-CoA, por lo que se necesita más tiempo y se hace de manera mucho más gradual que con el piruvato. Es una razón que podría explicar por qué en las condiciones palmitato, oleato y estearato no se aprecia un aumento tan grande de la expresión de *PON3*, ni siquiera llega a ser significativo respecto al control de ayuno.

Con esta justificación, lo primero que habría que cambiar son los tiempos de incubación de las células en los medios con los ácidos grasos. Quizá 6 horas no sean suficientes para detectar cambios metabólicos significativos con las moléculas del tamaño que estamos tratando. Por eso, si se continuara el experimento habría que alargar estos tiempos, por lo menos hasta las 8 o incluso 12 horas. También podría probarse a aumentar las concentraciones de los ácidos grasos en el medio de cultivo, siempre manteniéndose por debajo de la toxicidad del piruvato.

Sería necesario realizar un Western Blot del lisado celular para *PON3*. Así podría averiguarse si realmente el aumento de la expresión de *PON3* a nivel de mRNA observado en la gráfica se traduce en mayor cantidad de proteína en el caso del piruvato y serviría para obtener más datos en los casos de los ácidos grasos.

PCYOX1

Para *PCYOX1* se observaron diferencias significativas entre el control piruvato y oleato, estearato y control ayuno. Estas pueden deberse a que su transcripción se inhiba por acetilaciones y o que las acilaciones proteicas la estimulen.

Esta vez ocurre al revés que con *PON3*. La administración de piruvato provoca una disminución en la expresión génica de *PCYOX1*. Como el papel que juega este gen a nivel oxidativo es teóricamente el contrario a los genes de las paraoxonasas, parece bastante lógico que ocurra lo contrario al caso anterior. La generación de estrés oxidativo en la célula por culpa de la administración de piruvato es probable que inhiba otras rutas metabólicas generadoras de ROS, como mecanismo de defensa de la propia célula.

Como en el caso anterior, es posible que los tiempos no sean suficientes como para ver cambios en la regulación del metabolismo o incluso que las concentraciones de ácidos grasos sean demasiado bajas como para notar diferencias respecto a la condición control ayuno. Por este motivo, se han de continuar los experimentos variando los tiempos de incubación y aumentando las concentraciones de ácidos grasos en los medios de cultivo. También, como en los dos casos anteriores, estudiar la proteína aportaría muchos más datos que serían de una gran utilidad.

Se han planteado los problemas que han podido evitar observar diferencias significativas para cada uno de los tres genes, pero también es posible que simplemente la célula no muestre respuesta a las condiciones impuestas y la expresión de estos genes sea muy similar a la del control, mostrando pequeñas diferencias fisiológicas.

CONCLUSIONES

Como conclusiones de los ensayos realizados en este trabajo se pueden citar:

- 1- Tras 24 h de incubación de las células HepG2 con ácido esteárico a concentración 177 μM y piruvato 1,7 mM, se generan niveles de especies reactivas de oxígeno intracelulares significativamente mayores en comparación con el grupo control ayuno. Sin embargo, a 48 h de incubación únicamente es el piruvato el que provoca niveles de especies reactivas de oxígeno intracelulares significativamente mayores frente al grupo control ayuno.
- 2- La incubación durante 24 h de las células HepG2 con los distintos ácidos grasos y con el piruvato no produjeron ningún cambio a nivel oxidativo en el medio celular, comparado con el grupo control ayuno.
- 3- La expresión de *PON1* fue significativamente mayor a nivel de mRNA tras 6 h de incubación de las células HepG2 con oleato a concentración 180 μM si se compara con el grupo control en ayunas.
- 4- La expresión de *PON3* fue significativamente mayor a nivel de mRNA tras 6 h de incubación de células HepG2 con piruvato a concentración 1,7 mM si se compara con el resto de grupos.

- 5- Tras 6 h de incubación de las células HepG2 con piruvato 1,7 mM se observó una disminución significativa en la expresión de *PCYOX1* a nivel mRNA si lo comparamos con el grupo control ayuno.

As a conclusion:

- 1- After 24 h incubation of HepG2 cells with stearic acid at 177 μ M and pyruvate at 1,7 mM, reactive oxygen species are generated significantly in greater amount within the cell, if compared to the fasting control group. However, after 48 h incubation only pyruvate cause reactive oxygen species levels significantly greater than fasting control.
- 2- Incubation of 24 h of HepG2 cells with fatty acids and pyruvate did not cause any significant change to reactive oxygen species in culture media.
- 3- *PON1* expression was significantly higher after 6 h incubation of HepG2 cells with oleate at 180 μ M if compared to the fasting control.
- 4- *PON3* expression was significantly higher after 6 h incubation of HepG2 cells with pyruvate at 1,7 mM compared to the rest of groups.
- 5- After 6 h incubation of HepG2 cells with 1,7 mM pyruvate, a significantly lower *PCYOX1* expression was observed if compared to fasting control.

PROYECTO FUTURO

Continuar con los estudios que conciernen a *PON1*, *PON3* y *PCYOX1* sería lo mejor. Habría que analizar la proteína para comprobar si realmente el aumento en la expresión del gen se manifiesta en forma de aumento de la concentración de proteína en la célula, y no solo como mRNA. Un Western Blot sería el próximo paso a seguir para obtener conclusiones más definidas. No solamente presencia, también se podría estudiar su actividad.

Además, una condición a añadir en un proyecto futuro sería un nuevo medio control, con glucosa, respetando las condiciones isoenergéticas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. M. Lou-Bonafonte, C. Gabás-Rivera, M. A. Navarro y J. Osada, «PON1 and Mediterranean Diet,» *Nutrients*, vol. 7, nº 6, pp. 4068-4092, 6 2015.
- [2] H.-L. Li, D.-P. Liu y C.-C. Liang, «Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases,» *Journal of Molecular Medicine*, vol. 81, nº 12, pp. 766-779, 12 2003.
- [3] P. M. Erlich, K. L. Lunetta, L. A. Cupples, C. R. Abraham, R. C. Green, C. T. Baldwin y L. A. Farrer, «Serum paraoxonase activity is associated with variants in the PON gene cluster and risk of Alzheimer disease,» *Neurobiology of Aging*, vol. 33, nº 5, pp. 1015.e7-1015.e23, 5 2012.
- [4] J. M. Lou-Bonafonte, C. Gabás-Rivera, M. A. Navarro y J. Osada, «The Search for Dietary Supplements to Elevate or Activate Circulating Paraoxonases,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, nº 2, p. 416, 2 2017.
- [5] D. Speijer, G. R. Manjeri y R. Szklarczyk, «How to deal with oxygen radicals stemming from mitochondrial fatty acid oxidation,» *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 369, nº 1646, p. 20130446, 5 7 2014.
- [6] D. I. Draganov, J. F. Teiber, A. Speelman, Y. Osawa, R. Sunahara y B. N. La Du, «Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities,» *Journal of lipid research*, vol. 46, nº 6, pp. 1239-47, 1 6 2005.
- [7] J. Ozer, M. Ratner, M. Shaw, W. Bailey y S. Schomaker, «The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity,» *Toxicology*, vol. 245, nº 3, pp. 194 - 205, 2008.
- [8] C. J. Ng, D. J. Wadleigh, A. Gangopadhyay, S. Hama, V. R. Grijalva, M. Navab, A. M. Fogelman y S. T. Reddy, «Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein,» *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, nº 48, pp. 44444-9, 30 11 2001.
- [9] «Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1451, nº 1, pp. 1-16, 12 8 1999.
- [10] «PCYOX1,» [En línea]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PCYOX1>.
- [11] J. A. Digits, H.-J. Pyun, R. M. Coates y P. J. Casey, «Stereospecificity and kinetic mechanism of human prenylcysteine lyase, an unusual thioether oxidase,» *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, nº 43, pp. 41086-93, 25 10 2002.
- [12] W. R. Tschantz, L. Zhang y P. J. Casey, «Cloning, expression, and cellular localization of a human prenylcysteine lyase,» *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, nº 50, pp. 35802-8, 10 12 1999.
- [13] H.-Y. Sun, S.-F. Chen, M.-D. Lai, T.-T. Chang, T.-L. Chen, P.-Y. Li, D.-B. Shieh y K.-C. Young, «Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density

- lipoproteins,» *Clinica Chimica Acta*, vol. 411, nº 5-6, pp. 336-344, 3 2010.
- [14] C. Banfi, M. Brioschi, S. Barcella, R. Wait, S. Begum, S. Galli, A. Rizzi y E. Tremoli, «Proteomic analysis of human low-density lipoprotein reveals the presence of prenylcysteine lyase, a hydrogen peroxide-generating enzyme,» *PROTEOMICS*, vol. 9, nº 5, pp. 1344-1352, 1 3 2009.
- [15] D. Nelson y M. Cox, *Lehninger: Principios de Bioquímica*, 13 ed., OMEGA, 2014, p. 745.
- [16] E. Frémy, «Memoire sur les produits de la saponification de l'huile de palme,» *Journal de Pharmacie et de Chimie*, vol. XII, nº 757, 1842.
- [17] A. Ness, «Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series 916. Report of a Joint WHO/FSA Expert Consultation,» *International Journal of Epidemiology*, vol. 33, nº 4, pp. 914-915, 1 8 2004.
- [18] L. L. Listenberger, X. Han, S. E. Lewis, S. Cases, R. V. Farese, D. S. Ory y J. E. Schaffer, «Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, nº 6, pp. 3077-82, 18 3 2003.
- [19] G. Pascual, A. Avgustinova, S. Mejetta, M. Martín, A. Castellanos, C. S.-O. Attolini, A. Berenguer, N. Prats, A. Toll, J. A. Hueto, C. Bescós, L. Di Croce y S. A. Benitah, «Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36,» *Nature*, vol. 541, p. 41, 7 12 2016.
- [20] The Merck Index, The Royal Society of Chemistry, 2013.
- [21] M. G. Kokatnur, M. C. Oalman, W. D. Johnson, G. T. Malcom y J. P. Strong, «Fatty acid composition of human adipose tissue from two anatomical sites in a biracial community,» *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 32, nº 2, pp. 2198-2205, 1979.
- [22] D. J. A. Jenkins, L. Chiavaroli, J. M. W. Wong, C. Kendall, G. F. Lewis, E. Vidgen, P. W. Connelly, L. A. Leiter, R. G. Josse y B. Lamarche, «Adding monounsaturated fatty acids to a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods in hypercholesterolemia,» *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, vol. 182, nº 18, pp. 1961-1967, 14 12 2010.
- [23] J. E. Hunter, J. Zhang y P. M. Kris-Etherton, «Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review,» *The American journal of clinical nutrition*, vol. 91, nº 1, pp. 46-63, 1 1 2010.
- [24] L. R. Gray, S. C. Tompkins y E. B. Taylor, «Regulation of pyruvate metabolism and human disease,» *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 71, nº 14, pp. 2577-2604, 2014.
- [25] B. Knowles y D. Aden, «Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor». 1983.
- [26] S. N. Hart, Y. Li, K. Nakamoto, E.-a. Subileau, D. Steen y X.-b. Zhong, «A Comparison of Whole Genome Gene Expression Profiles of HepaRG Cells and HepG2 Cells to Primary Human Hepatocytes and Human Liver Tissues,» *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 38, nº 6, pp. 988-994, 6 2010.

- [27] M. Kurano, N. Iso-O, M. Hara, N. Ishizaka, K. Moriya, K. Koike y K. Tsukamoto, «LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL,» *Lipids in Health and Disease*, vol. 10, p. 134, 2011.
- [28] C. P. Lebel, H. Ischiropoulos y S. C. Bondys, «Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress,» *Chem. Res. Toxicol*, vol. 5, pp. 227-231, 1992.

ANEXO 1

En la siguiente tabla se incluyen las secuencias de los cebadores utilizados en la PCR *Real-Time*:

GEN		CÓDIGO DE ACCESO	SECUENCIA	AMPLICÓN	POSICIÓN	CONCENTRACIÓN	RENDIMIENTO
<i>TBP</i>	PrD	NM_003194.4	TGCTGCGGTAATCATGAGGA	116	Exón 5	250	92 %
	PrR		TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC			200	
<i>PON1</i>	PrD	NM_000446.5	CTGATTGCGCTCACCTCTT	239	Exón 1-4	100	105 %
	PrR		CCAGGACTGTTGGGGTTGAA			100	
<i>PON2</i>	PrD	NM_000305.2	CACCATCGAGCCGGGAAG	215	Exón 1-2	/	/
	PrR		ATCAGGTGGCAGTGTGGAAG			/	
<i>PON3</i>	PrD	NM_000940.2	CCTGTCCTTAGTCGGGGAGA	267	Exón 1-4	200	99 %
	PrR		ATTTCTAGCGCTTGTGCCCT			200	
<i>PCYOX1</i>	PrD	NM_016297.3	GGCCACTCCGTTGAATCGAA	389	Exón 6	100	91 %
	PrR		CCGGGGGCTTATAGTGAGGA			100	
<i>PPIB</i>	PrD	NM_000942.4	GGAGATGGCACAGGAGGAA	71	Exón 3	100	97 %
	PrR		TAGTGCTTCAGCTTGAAGTTCTCAT			100	