



**Universitat de les
Illes Balears**
Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Efectos de las hormonas ováricas sobre la actividad y niveles de la paraoxonasa 1 en hígado y aorta de rata

Mediha Ahmedova Hadzhiyumerova
Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2012-13

DNI de l'alumne: X07919171-H

Treball tutelat per Ana María Proenza Arenas
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

L'autor autoritza l'accés públic a aquest Treball de Fi de Grau.

Paraules clau del treball:

Paraoxonasa 1, aterosclerosis, dimorfismo sexual, ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol, hígado, aorta

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
Paraoxonasas	7
Características generales de la Paraoxonasa 1	7
Factores que modulan la actividad Paraoxonasa 1	8
Papel fisiológico de la Paraoxonasa 1	9
Enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis	10
Papel protector de la PON1 en la aterosclerosis	10
<i>OxLDL: uno de los factores de riesgo más importantes para la aterogénesis</i>	10
<i>La PON1 contribuye a las funciones anti-ateroscleróticas de HDL</i>	11
Receptor SR-BI y su importancia	14
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Materiales	15
Animales y tratamiento.....	16
Preparación de las muestras de aorta	17
Western blot de aorta y suero.....	17
PCR en tiempo real de hígado	19
Actividad enzimática	21
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22
Parámetros biométricos	22
Efectos del tratamiento sobre los niveles de PON1 en suero	23
Efectos del tratamiento sobre los niveles de PON1 en aorta	24
Efectos del tratamiento sobre los niveles del ARNm de PON1 en hígado	25
Efectos del tratamiento sobre la actividad PON1 en aorta.....	25
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN	29
AGRADECIMIENTOS	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
E2: 17 β -estradiol
Hcy: homocisteína tiolactona
HDL: lipoproteína de alta densidad
THS: terapia hormonal sustitutiva
LDL: lipoproteína de baja densidad
OVA: ratas ovariectomizadas
oxLDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas
PON: paraoxonasa
PON1: paraoxonasa 1
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
SR-BI: receptor scavenger tipo B-I
VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN

La PON1 es un enzima dependiente de calcio que se sintetiza en el hígado y que se incorpora a la circulación asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) gracias a la acción del receptor hepático scavenger tipo B-I (SR-BI). El principal papel fisiológico de la PON1 se relaciona con las propiedades anti-oxidantes y anti-aterogénicas, por lo que se ha implicado en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias, en particular la aterosclerosis. Nuestro objetivo principal es determinar si la existencia de dimorfismo sexual en la respuesta de la PON1, que ya ha sido determinado en estudios previos, puede atribuirse a las hormonas ováricas y examinar si los resultados son consistentes con las claras diferencias de género observadas en la incidencia de aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares. Para ello se determinaron los niveles de ARNm de la PON1 en hígado, los niveles proteicos en aorta y suero y la actividad en aorta, utilizando 4 grupos experimentales de ratas (control machos, control hembras, ovariectomizadas y ovariectomizadas tratadas con 17β -estradiol). Los niveles de la PON1 determinados fueron significativamente diferentes entre hembras y machos en aorta pero no en suero. Por otro lado, los distintos tratamientos de las hembras no llegaron a mostrar diferencias significativas ni en aorta ni en suero, cosa que nos puede conducir a pensar que las hormonas ováricas, y más en concreto el estradiol, no tendrían un efecto marcado sobre los niveles proteicos de la PON1 en estos tejidos. En cuanto a los niveles de ARNm en el hígado no se observaron diferencias significativas entre ningún grupo experimental. Estos resultados nos están indicando que las diferencias entre géneros no se deberían a los niveles de ARNm de la PON1. Posiblemente, en el dimorfismo en los niveles de PON1 entre machos y hembras tendrían un papel importante modificaciones post-traduccionales del ARNm y/u otros factores implicados (otras hormonas tanto femeninas como masculinas u otros factores que se asocian a la PON1).

PON1 is a calcium-dependent enzyme which is synthesized in the liver and is incorporated into the circulation associated with high density lipoproteins (HDL) through the action of hepatic scavenger receptor type BI (SR-BI). The primary physiological role of PON1 is implicated with the anti-oxidant and anti-atherogenic characteristics, so it has been implicated in the pathogenesis of several inflammatory diseases, in particular atherosclerosis. Our main objective is to determine whether the existence of sexual dimorphism in the response of PON1, which has already been determined in previous studies, can be attributed to ovarian hormones and examine

whether the results are consistent with the clear gender differences in the incidence of atherosclerosis and cardiovascular diseases. For that, we determined mRNA levels of PON1 in liver, protein levels in aorta and serum, and aortic activity. We used 4 experimental groups of rats (control males, control females, ovariectomized and ovariectomized treated with 17β -estradiol). PON1 levels obtained were significantly different between males and females in aorta but not in serum. Furthermore, the different treatments of the females not reached show significant differences either in serum or aorta, which can lead us to think that ovarian hormones, more particularly estradiol, would have not a marked effect on the protein levels of PON1 in these tissues. As to the mRNA levels in the liver were not observed any significant difference among experimental group. These results indicate that the differences between genders would not be caused by mRNA levels of PON1. Possibly in the dimorphism in the levels of PON1 between males and females have important paper the post-translational modifications of mRNA and/or other factors involved (other female and male hormones, or other factors which are associated with the PON1).

INTRODUCCIÓN

Paraoxonasas

Las paraoxonasas (PON) fueron descubiertas inicialmente como enzimas que hidrolizan compuestos organofosforados tóxicos exógenos como paraoxón, oxon, gas sarín y compuestos similares^{1,2}. Su propia denominación refleja la capacidad de hidrolizar paraoxón. Actualmente se conocen tres miembros de la familia PON: paraoxonasa 1 (PON1), paraoxonasa 2 (PON2), y paraoxonasa 3 (PON3), que son codificadas por tres genes separados en el brazo largo del cromosoma 7 en humanos (**Figura 1**) y 6 en ratones^{1,2,3,4,5,6}. Los tres miembros de la familia comparten una alta homología estructural pero se ha visto que se expresan en diferentes tejidos⁷.

Diferentes estudios han sugerido que tienen la capacidad de proteger las células del estrés oxidativo considerándolas como anti-aterogénicas, por lo que, han sido implicados en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias, en particular la aterosclerosis^{3,5}.

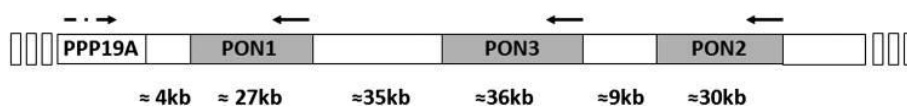


Figura 1: Mapa genético de la familia de genes PON en humanos. Adaptada de Litvinov, D. et al., 2012

Entre estas, la PON1 es el miembro mejor estudiado y caracterizado de la familia. Incluso su actividad anti-aterogénica se considera como la más importante.

Características generales de la Paraoxonasa 1

La PON1, descrita en 1946 por A. Mazur, es un enzima dependiente de calcio que se sintetiza en el hígado y que se incorpora a la circulación asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) gracias a la acción del receptor hepático scavenger tipo B-I (SR-BI). Tiene la capacidad de hidrolizar una amplia gama de sustratos como lactonas, tiolactonas, carbonatos cíclicos, compuestos organofosforados, entre otros^{5,7,8}. A pesar de que se conocen muchos sustratos que pueden ser hidrolizados por la PON1 todavía no están determinados con certeza los

sustratos biológicamente relevantes. Posiblemente, el enzima cumpla varios papeles con más de un sustrato^{1,2,7}.

De modo que se dice que la PON1 es un enzima promiscua ya que se han revelado actividades como esterasa y lactonasa además de organofosfatasa^{2,3}. Hoy en día la PON1 se clasifica como arildialquilfosfatasa (E.C.3.1.8.1) por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular⁵.

Estructuralmente se trata de una glicoproteína de 355 aminoácidos con una masa molecular aproximadamente de 43 kDa. La proteína madura contiene una zona hidrófoba en la región N-terminal que media la asociación de la PON1 con las HDL mediante la interacción PON1-ApoA^{1,2, 3,9,10,11}. Este enzima permanece altamente conservada en los mamíferos, pero está ausente en los peces, aves, e invertebrados, tales como artrópodos⁴. Se ha especulado que la PON1 posee dos sitios catalíticos, uno que se requiere para la actividad hidrolítica y otro que es necesario para la actividad antioxidante¹.

En los seres humanos la PON1 se expresa principalmente en el hígado a pesar de que también se puede expresar en bajos niveles por el riñón y colon (**Figura 2**)^{1,2,3}.



Figura2: Distribución tisular del ARNm de la PON1. Adoptada de Litvinov, D. et al., 2012

Aunque el hígado es el principal tejido que expresa la PON1, su asociación con las HDL circulantes permite su presencia en múltiples tejidos que no expresan la PON1². En este sentido, el mecanismo propuesto por el cual PON1 sería liberada implica el SR-BI, ya que este receptor de las HDL permite la asociación transitoria de las HDL con la membrana de hepatocitos sin la internalización o la destrucción de estas lipoproteínas¹².

Factores que modulan la actividad Paraoxonasa 1

La actividad PON1 es sensible a una gran variedad de situaciones fisiológicas y patológicas, tales como la dieta, fumar y el entorno hormonal, entre otros^{7,8,11,13}. Hay estudios que han informado que el género también influye en la actividad PON1⁸.

En cuanto a las diferencias entre géneros, se ha observado mayor actividad de PON1 en mujeres⁷. Otros estudios mostraron una disminución significativa de la actividad PON1 en mujeres postmenopáusicas de forma natural en comparación con mujeres premenopáusicas y se ha observado que la terapia hormonal sustitutiva (THS) con progesterona y estradiol aumenta la actividad paraoxonasa en suero en mujeres sanas^{14,15,16}.

Papel fisiológico de la Paraoxonasa 1

El principal papel fisiológico de la PON1 se relaciona con las propiedades antioxidantes y anti-aterogénicas de este enzima. En diferentes estudios in vitro se ha demostrado que la PON1 inhibe la acumulación de peróxidos de lípidos en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y protege la partícula de HDL de la oxidación conservando su integridad funcional^{6,8,13}.

Además permite disminuir el estado oxidativo de macrófagos, estimula la salida de colesterol de los macrófagos, disminuye el estado oxidativo en las lesiones ateroscleróticas, y atenúa el desarrollo de la aterosclerosis⁶. La PON1 también ayuda en la eliminación de permite eliminar las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) y protege contra la modificación proteica por N-homocisteinilación hidrolizando la homocisteína tiolactona (Hcy). Hcy puede promover la aterogénesis mediante la inducción de alteraciones aterogénicas de las células endoteliales vasculares y células musculares lisas, ya sea por la toxicidad directa o por homocisteinilación de proteínas intracelulares¹.

Estas propiedades antioxidantes de la PON1 se han asociado con la capacidad de la enzima para disminuir el estrés oxidativo en las lesiones ateroscleróticas y para atenuar el desarrollo de la aterosclerosis, asociándose, por tanto, a los efectos beneficiosos o ateroprotectores de las HDL^{2,3}. Como existe una relación inversa entre el riesgo de presentar arteriosclerosis y la concentración de HDL, la hipótesis evidente es que la PON1 podría proteger del desarrollo de arteriosclerosis degradando los lípidos oxidados de las LDL y disminuyendo, por tanto, la respuesta inflamatoria¹⁷.

Además de estar directamente relacionada con la aterosclerosis y la enfermedad coronaria, la PON1 también desempeña un papel en muchas otras enfermedades, probablemente a causa de sus múltiples capacidades enzimáticas. Muchas de estas enfermedades también pueden contribuir a la aterogénesis y la

enfermedad coronaria. Se ha asociado con Diabetes mellitus, síndrome metabólico, obesidad, envejecimiento y muchos tipos de cáncer. Además se ha involucrado en algunos tipos de trastornos neurológicos, tales como el autismo, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, entre otros¹.

Enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la acumulación de colesterol en macrófagos y la formación de células espumosas en la íntima arterial¹⁸.

Las enfermedades cardiovasculares y sobretodo la aterosclerosis se consideran como la principal causa de mortalidad a nivel mundial^{1,6,19}. Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que 17,1 millones de personas murieron de enfermedades cardiovasculares en 2004¹⁹. Estos datos indican que las enfermedades cardiovasculares se han convertido en uno de los problemas de salud más graves en el presente y futuro previsible. De manera que, es muy necesario el desarrollo de nuevas estrategias efectivas para el tratamiento de la aterosclerosis en base a una mejor comprensión de los factores que contribuyen.

Una de las características más llamativas de esta epidemia es que en su mayor parte, con independencia del país, la incidencia de la mayoría de las formas de las enfermedades cardiovasculares es menor en las mujeres premenopáusicas que en los hombres de la misma edad. Este patrón se pierde rápidamente después de la menopausia. Este hecho ha llevado a los científicos a creer que las hormonas sexuales juegan un papel importante en la determinación de la susceptibilidad a las enfermedades cardiovasculares y de la existencia de dimorfismo sexual en este tipo de patologías¹⁹.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la baja actividad PON1 se asocia con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares^{6,20}. La idea de que la PON1 podría ser un objetivo para el tratamiento de la aterosclerosis ha impulsado algo de luz sobre este problema¹.

Papel protector de la PON1 en la aterosclerosis

OxLDL: uno de los factores de riesgo más importantes para la aterogénesis

Los niveles elevados de lipoproteínas aterogénicas, principalmente LDL, son una de las características en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. La mitad de los ácidos grasos en el interior de LDL son ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Estos suelen estar protegidos contra el ataque de los radicales libres y la oxidación por α -tocoferoles y otros antioxidantes pero cuando se produce un desequilibrio en los niveles de antioxidantes y/o la cantidad de PUFA, las LDL se oxidan. Esta oxidación provoca cambios en la estructura de las LDL y disminuye su afinidad por el receptor de LDL del hígado por lo que se van acumulando en la circulación¹.

Las oxLDL juegan un papel importante en la lesión endotelial. En primer lugar, las oxLDL son tóxicas para las células. Se ha visto que aumento de los niveles de oxLDL pueden causar la degeneración de células endoteliales, necrosis, y el desprendimiento de la pared de la aorta. Además, las oxLDL también puede inducir reordenamientos del citoesqueleto¹.

La PON1 contribuye a las funciones anti-ateroscleróticas de HDL

Por otra parte se ha demostrado que los niveles de HDL están inversamente relacionados con el desarrollo de la aterosclerosis. Se ha informado que cada aumento de 1 mg/dl en las HDL está asociado con una disminución de hasta 3% en el riesgo de eventos cardiovasculares adversos¹.

Las HDL ejercen su efecto protector a través de múltiples mecanismos. El primer mecanismo propuesto es que las HDL facilitan el transporte inverso de colesterol, a través del cual el colesterol libre producido por las células y los tejidos periféricos se transfiere al hígado, donde se convierte en metabolitos de esterol y luego se excreta en la bilis¹.

Además, las HDL ejercen efectos protectores mediante la reducción de la inflamación sistémica y local. Este proceso se debe principalmente por la protección de la oxidación de las LDL, lo que impide el reclutamiento y la migración de las células inflamatorias a la pared arterial. El hecho de que las HDL son capaces de reducir la oxidación de las LDL se ha demostrado in vitro en diversos modelos experimentales. La reducción de los niveles de oxLDL atenúan el ciclo vicioso aterogénico procedente de la oxidación de LDLs¹.

Los efectos antiaterogénicos y antioxidantes de las HDL deben atribuirse a las proteínas asociadas a estas lipoproteínas como apoA I, lecitina colesterol aciltransferasa y PON1, entre otros¹⁰. De estas proteínas, la PON1 es la que contribuye significativamente más a la actividad antioxidante de las HDL, ya que muchos de los metabolitos oxidados pueden ser degradados por la PON1 gracias a sus actividades enzimáticas¹.

Se ha demostrado que la PON1 desempeña papeles en el metabolismo de los lípidos. La capacidad de PON1 para evitar la oxidación de las LDL y HDL por una variedad de factores pro-oxidantes se ha demostrado en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*¹.

La evidencia más robusta del papel de la PON1 en la hidrólisis de oxLDL proviene de estudios de los ratones knock-out. Gracias a estos estudios se demostró, por primera vez, que la proteína PON1 exhibe funciones antioxidantes y antiaterogénico *in vivo*. Se observó que los ratones knock-out para la PON1 desarrollaron aterosclerosis cuando se alimentaron con una dieta aterogénica, y los niveles de las HDL no pudieron impedir la oxidación de las LDL. Así se estableció claramente el potencial anti-oxidante y anti-inflamatorio de la PON1 *in vivo*, mostrando su potencial papel en la prevención de la aterosclerosis³.

Se observó que la PON1 también reduce la quimiotaxis de monocitos y la adhesión a las células endoteliales. Además de la prevención de la oxidación de LDL, la PON1 también puede promover el flujo de colesterol. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la PON1 afecte a la eficacia de la transferencia de lípidos entre el colesterol HDL y el colesterol LDL. También se ha demostrado que la PON1 juega un papel en la protección contra las endotoxinas bacterianas, estabilizando así las membranas celulares durante la exposición aguda o crónica a los agentes oxidantes y los radicales libres que desafían la permeabilidad selectiva de la membrana. Todas estas funciones bioquímicas contribuyen al efecto protector de la PON1 en el desarrollo de la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares¹.

Aun más interesante es un reciente estudio de Deakin et al. en el cual se mostró que la PON1 no es un componente fijo de HDL ya que puede ejercer su función de protección fuera del entorno de las lipoproteínas. Esto se debe a la posibilidad de transferir la PON1 desde las HDL a la cara externa de la membrana plasmática de las células en una forma enzimáticamente activa que confiere protección contra el estrés oxidativo²¹.

Cabe destacar que la función antiaterogénica de PON1 no se restringe solamente a la inhibición de la oxidación de las LDL. En humanos, la actividad de homocisteína tiolactonasa de la PON1 se correlaciona inversamente con la concentración de Hcy que está fuertemente asociada con la enfermedad vascular. La Hcy es un metabolito reactivo que causa la N-homocisteinilación de proteína a través de la formación de enlaces amida con residuos de lisina de proteínas. Esta N-homocisteinilación impide o altera la función de proteínas. De modo que la PON1 protege contra este proceso ya que posee la actividad homocisteína tiolactonasa¹.

A continuación se propone una figura (**Figura 3**) que resume diferentes mecanismos que se han propuesto para el desarrollo de la aterosclerosis. En esta misma figura se indican las acciones beneficiosas de la PON1 y PON2 frente a este proceso aterogénico.

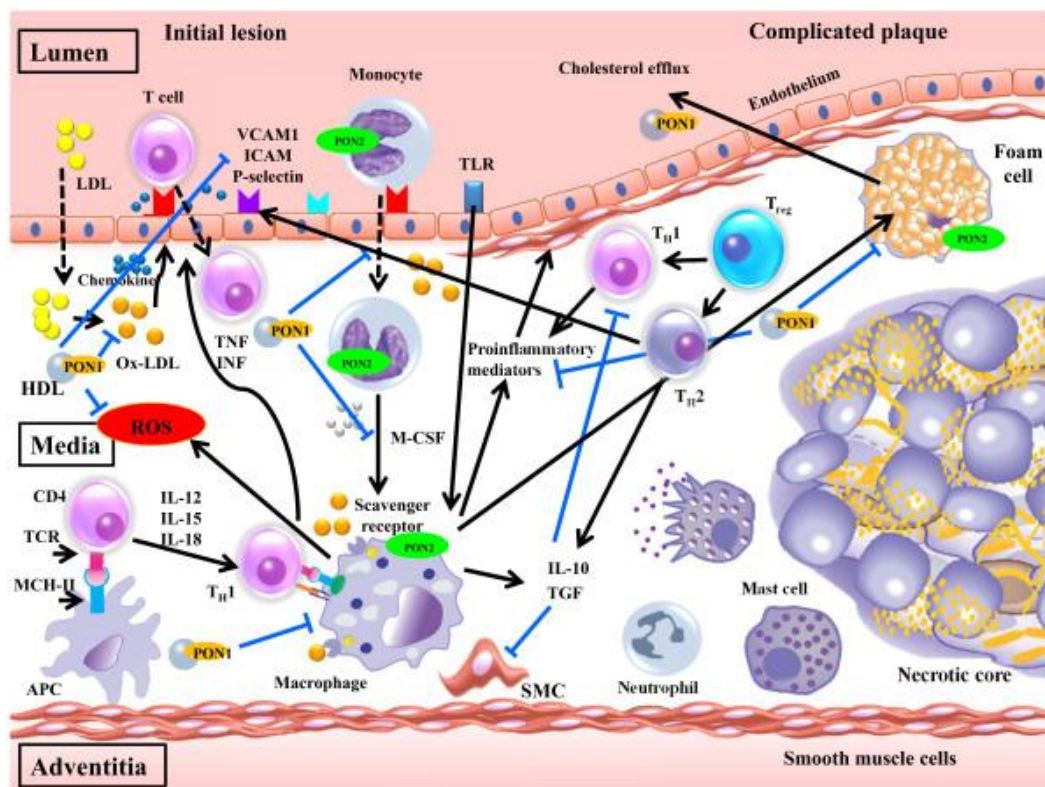


Figura 3: Mecanismo propuesto para el desarrollo de la aterosclerosis y las funciones de PON1 frente la aterosclerosis. Adaptada de Farid, A. S. et al., 2012

Receptor SR-BI y su importancia

El SR-BI es una glicoproteína de la superficie celular que se unen a un amplio espectro de ligandos. Además de unirse a las HDL se une a LDL y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). El SR-BI es altamente expresado en los tejidos del hígado y su función es facilitar el flujo de colesterol de las células en los tejidos periféricos a las HDL^{22,23}. Además del hígado, el receptor SR-BI también se expresa por las células dentro de la pared arterial, incluyendo las células endoteliales, células musculares lisas y los macrófagos. Al menos en los macrófagos se ha implicado en el flujo bidireccional de colesterol y fosfolípidos entre las HDL y la membrana de la célula²³.

Su unión a un amplio espectro de ligandos puede ser facilitada por dos sitios de unión diferentes en el dominio extracelular del SR-BI, un sitio de unión para el HDL y un sitio de unión para las LDL²³.

También se han proporcionado evidencias que sugieren que el SR-BI es el principal factor decisivo para la adquisición de PON1 por las HDL. Este descubrimiento tiene implicaciones sobre el papel que puede desempeñar el receptor en la determinación de la actividad de la PON1 en suero y, por tanto, la capacidad antioxidante de las HDL. Todo esto indica la importancia del receptor SR-BI en el metabolismo y función de las HDL²⁴.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Este trabajo fin de grado encaja dentro de una línea de investigación más amplia centrada en el estudio de las bases moleculares que se relacionan con el proceso aterogénico. En esta línea destaca la PON1 por su función en la eliminación de los peróxidos lipídicos de las LDL y HDL y, en consecuencia, por su importante papel en la protección frente a la aterosclerosis. Muchos estudios de la PON se han centrado en los polimorfismos pero relativamente pocos han estudiado la relación entre los niveles de PON1 o su actividad y el riesgo para la enfermedad cardiovascular²⁵.

Nuestro objetivo concretamente es analizar si los niveles de PON1 se encuentran modulados por las hormonas sexuales femeninas como el estradiol. Por tal de caracterizar este objetivo se utilizaron modelos animales de ovariectomía que permiten mayor flexibilidad metodológica. Más en concreto se utilizan ratas jóvenes,

macho y hembras, ovariectomizadas (OVA) y ovariectomizadas tratadas con 17β -estradiol (OVA+E2) para determinar los niveles de ARN mensajero de la PON1 en hígado y sus niveles proteicos en aorta y suero. Además también se determinó la actividad PON en aorta.

Así el objetivo principal es determinar si la existencia de dimorfismo sexual en la respuesta de la PON1, que ya ha sido determinado en estudios previos, puede atribuirse a las hormonas ováricas y examinar si los resultados son consistentes con las claras diferencias de género observadas en la incidencia de aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares.

Para alcanzar este objetivo las tareas previas incluían actualizar los antecedentes bibliográficos sobre la PON1 y poner a punto de la metodología necesaria para medir la actividad PON1, los niveles de la proteína y del ARN mensajero de este enzima, en muestras de aorta e hígado de ratas macho, hembra, OVA y OVA+E2. Este punto es de gran importancia ya que poner a punto la metodología es una parte muy importante en la investigación científica. Además cabe destacar que hasta el momento, por lo que nos consta, no se han realizado estudios de la PON1 en aorta. De manera que somos pioneros en poner a punto la metodología para medir la actividad y los niveles proteicos en este tejido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las secuencias de oligonucleótidos (primers, el LightCycler® 480 SYBR Green I Máster para la PCR en tiempo real y el reactivo de aislamiento Tripure® fueron comprados de Roche Diagnostics (Basel, Suiza). Los productos químicos para la RT-PCR fueron comprados de Applied Biosystems (Lincoln, CA, EE.UU.).

Los anticuerpos fueron suministrados por Santa Cruz de Biotecnología (Santa Cruz, CA, EE.UU.) (anti-PON1 y anti-tubulina, Ref. Sc 59646 y Sc 5286, respectivamente). Los reactivos de quimioluminiscencia para el análisis del Western Blot fueron suministrados por Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.).

El sustrato para la medición de la actividad de PON1 (dietil p-nitrofenil fosfato o paraoxón) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.).

Otros productos químicos de rutina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), Panreac (Barcelona, España), Pronadisa (Madrid, España) y Roche Diagnostics. La dieta de piensos control (A04) se obtuvo de Panlab (Barcelona, España).

Animales y tratamiento

Los animales utilizados, ratas Wistar de ambos sexos, de cinco semanas de edad y ratas ovariectomizadas (OVA) emparejados por edad, se obtuvieron de Charles River (Barcelona, España). La ovariectomía consiste en la extirpación de los ovarios de manera que estas ratas serán deficientes en las hormonas ováricas.

Los animales se mantuvieron en cuarentena durante 10 días y luego se alojaron dos por jaula a 22 °C con ciclo de luz-oscuridad de 12 h, libre acceso al agua y la dieta estándar de pienso. A las diez semanas de edad, las ratas OVA se dividieron en dos grupos experimentales. Uno de estos grupos de OVA se trató con 17 β -estradiol (E2) (OVX + E2). El tratamiento consistió en inyectar 10 μ g/kg/48h de E2 subcutáneamente que se disolvió en 0,1 ml de aceite de maíz como vehículo. Este tratamiento OVA + E2 se administró a las ratas 4 semanas antes del sacrificio para determinar los efectos de la administración de E2 en los animales ovariectomizadas. En paralelo el resto de ratas OVA, que no se inyectaron con E2, se trataron sólo con el vehículo (aceite de maíz).

Las ratas se sacrificaron por decapitación a las 14 semanas de edad, después de un período de 12 h de ayuno. Se recogieron, pesaron y congelaron a -80°C los tejidos hígado y aorta hasta su análisis posterior. Los tejidos extraídos se limpiaron, previamente a la congelación, con solución salina (NaCl 0,9%).

Estos mismos animales fueron utilizados en otro experimento del grupo de investigación Metabolismo Energético y Nutrición del departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud de la Universidad de las Islas Baleares²⁶.

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices generales aprobadas por el comité de ética institucional de la Universidad de Islas Baleares y la normativa de la UE (2003/65/CE y 86/609/CEE).

Preparación de las muestras de aorta

La aorta se homogeneizó en 1 ml de tampón STE por cada 0,1 g de tejido (sacarosa 250 mM, 5 mM de Tris-HCl y 2 mM de EGTA, pH 7,4) junto con inhibidores de proteasas y fosfatasas (leupeptina 10 μ M, estatina 10 μ M, PMSF 0,1 mM y 0,2 mM ortovanadato) utilizando el Freezer/Mill[®] 6770 de la compañía SPEX SamplePrep (Metuchen, NJ, EE.UU). El Freezer/Mill[®] utiliza un sistema de imanes para disgregar el tejido completamente obteniendo al final una muestra pulverizada. El programa que se empleó consistió en tres ciclos que se engloban en una primera fase de pre-enfriamiento de 10 minutos, una segunda fase de agitación de 2 minutos, una tercera fase de descanso de 2 minutos y por último una fase de enfriamiento de 2 minutos. La fuerza de agitación utilizada era de 10 CPS (10 impactos por segundo). Se eligió este sistema de homogeneización porque utilizando un dispensador de aspas (Polytron) no se obtenían buenos resultados. El homogeneizado se congeló (-20 °C) para el posterior análisis de la actividad enzimática y Western blot.

Previo al Western blot se cuantificó la proteína total de la aorta por el método de Bradford (reactivo de Bradford (etanol 96%, Goomasie brillant blue G-250, H₃PO₄ 85%, H₂O bidestilada) y BSA 0,1%)²⁷. El método se basa en la interacción del colorante Goomasie brillant blue G-250 con las proteínas. Dicha interacción crea un complejo con absorción máxima a 595nm de longitud de onda que se sigue espectrofotométricamente en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Tek Instruments, VT, EE.UU.). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

Western blot de aorta y suero

Cantidades iguales de proteína de aorta (25 μ g) se separaron en geles SDS-PAGE de 10% y posteriormente se realizó una electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa para realizar finalmente un positivado inmunológico con dos anticuerpos (anticuerpo primario anti-PON1 de mouse y anticuerpo secundario anti-mouse).

Las muestras se prepararon con tampón de carga (Tris-HCl 0,25 M, SDS 10%, Glicerol 40%, azul de bromofenol 0,1%) completado con β -mercaptoetanol al 10% en una relación 1:3. Seguidamente las muestras se cargaron en geles al 10% y se realizó la separación de las proteínas mediante una electroforesis a 200V. A continuación se

procedió a realizar la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa 0,2µm de Trans-Blot®Turbo™ Transfer Pack de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.).

Tras la electrotransferencia la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 5% de leche en polvo en PBS-Tween overnight con la finalidad de disminuir las uniones inespecíficas del anticuerpo. Para el positivado inmunológico se utilizó como anticuerpo primario una dilución 1:500 anti-PON1 de mouse con Ref. Sc 59646 (Santa Cruz, CA, EE.UU.) y como anticuerpo secundario una dilución 1:20 000 anti-mouse. Por otra parte se utilizó como housekeeping la tubulina. En este caso se utilizó como anticuerpo primario una dilución 1:1 000 anti- α -tubulina de Mouse con Ref. Sc 5286 (Santa Cruz, CA, EE.UU.) y como anticuerpo secundario una dilución 1:5 000 anti-mouse.

El revelado se realizó utilizando un kit de quimioluminiscencia Immunostar Western (Bio-Rad, Hercules CA, EE.UU.) Las bandas fueron capturadas utilizando el sistema XRS ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules CA, EE.UU.). Los pesos moleculares aparentes de la PON1 (43 kDa) y la tubulina (55 kDa) se estimaron utilizando marcadores de masa molecular de proteínas. La cuantificación se realizó con el software Quantity One® (Bio-Rad, Hercules CA, EE.UU.)

Para el western blot de suero se siguió el mismo procedimiento que en el caso del western blot en aorta. La única diferencia fue que se cargó el mismo volumen de suero (7 µL). Se cargó en función de volumen ya que la concentración de proteína en suero es muy parecida entre muestras.

Para comprobar que las transferencias electroforéticas han sido correctas, tanto para el western blot de la aorta como del suero, se hizo una tinción de los geles con una solución de tinción que contiene Coomassie Blue 0,1%, metanol 50% y ácido acético 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se destiñeron los geles utilizando una solución de distinción que esta compuesta por metanol 50% y ácido acético 10% y se comprueba que no haya bandas. Se comprobó una correcta transferencia ya que no se habían quedado bandas en los geles.

Cabe destacar que finalmente el housekeeping de la tubulina no se aplicó ya que sus niveles variaban de tal manera que presentaban un perfil parecido al del tratamiento. Es decir los niveles de tubulina no eran muy constantes y incluso variaban entre los diferentes tratamiento de manera similar a como lo hacia la proteína estudiada (PON1). Concluimos que este caso el housekeeping de la tubulina no era el

más apropiado. Por estos motivos finalmente el housekeeping no se reflejó a la hora de determinar el efecto del tratamiento sobre los niveles de la PON1.

PCR en tiempo real de hígado

El ARN celular total fue aislado de las muestras de hígado mediante el uso de un reactivo de aislamiento Tripure® de acuerdo con el protocolo del fabricante (Roche Diagnostics). Además de aislar el ARN, el aislamiento con el reactivo Tripure permite separar el ADN y las proteínas a partir de la misma muestra.

Se peso entre 50-100 mg de hígado y se homogeneizó en 1 mL de Tripure con un dispensador de aspas T10 basic Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania). Para la extracción del ARN total, además el Tripure, se utilizó isopropanol, etanol 75%, y H₂O libre de RNasa. Se realizaron varias centrifugaciones y incubaciones a temperatura ambiente para obtener finalmente el ARN total. A continuación se cuantifico el ARN y se analizó su pureza utilizando BioSpec-nano de la compañía Shimadzu (**Tabla 1**).

	Machos		Hembras	
	Control	Control	OVA	OVA+E2
ARN (mg/g)	16,68 ± 0,56	23,68 ± 0,81	16,93 ± 1,71	18,92 ± 0,72
OD260/280	2,33 ± 0,01	2,34 ± 0,01	2,37 ± 0,01	2,37 ± 0,01

Tabla 1: Cuantificación del ARN total y pureza

Un microgramo del ARN total se transcribió de forma inversa a cDNA, a 42 ° C durante 1 h con 25 U de MuLV RT. El volumen final de 10µL de mezcla de reacción de RT contiene 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 9,0), 50 mmoles/L de KCl, 0.1% de Triton X-100, 2,5 mmol/L de MgCl₂, 2.5 µmol/L de random hexamers, 10 U de inhibidor de RNasa y 500 µmol/L de cada dNTP. Las muestras de cDNA se diluyeron 1/10 con H₂O libre de RNasa, y las alícuotas se congelaron a -20 °C hasta que se llevaron a cabo las PCR.

La PCR en tiempo real se realizó utilizando la tecnología de detección de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics). Cada reacción contenía 5 µL de mix del kit SyBrGreen (Roche Diagnostics), 0,374 µL de cada primer específico (reverse y forward). 1,752 µL de H₂O libre de RNasa y 2,5 µL de la dilución de cDNA en un volumen final de 10 µL.

Las secuencias de los primers utilizados para la PCR en tiempo real fueron 5'-tgggcctgtcatggtccaatggtg-3' y 5'-ttatccacaagggtgtcaaagctgag-3' para la PON1 y 5'-

gaggtgaaattcttggaccgg-3' y 5'-cgaacctccgactttcgttct-3' para el ARN 18S ribosómico, que se utilizó como housekeeping, de TIB MOLBIOL (Berlin, Alemania) (Tabla 2).

El programa de amplificación fue el siguiente: una etapa de preincubación para la desnaturalización del molde de cDNA a 95 °C durante 5 minutos; seguido por 40 ciclos que constaban de una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos, una etapa de hibridación (annealing) a 60 °C durante 10 segundos y, por último, una etapa de extensión a 72 °C durante 12 segundos; finalmente un ciclo de frío a 40 °C durante 10 segundos (Tabla 2).

Por otro lado también se determinó la eficiencia de las PCR en tiempo real realizando un banco de diluciones del producto del PCR tanto para la PON1 como para el 18S. Con el banco de diluciones se realiza otra PCR en tiempo real, de la misma manera que se explicó anteriormente, y se ajusta el crossing point (Cp) respecto a la concentración de la dilución. De esta manera se obtiene una línea recta, la pendiente de la cual nos da la eficiencia de nuestra PCR en tiempo real. La eficacia debe calcularse para validar el protocolo de PCR. Este parámetro lo que nos permite valorar la capacidad del protocolo de PCR diseñado de duplicar la cantidad de ADNc molde disponible en cada ciclo, y se expresa en porcentaje. Las eficiencias para la PCR en tiempo real de la PON1 y el 18S fueron 1,98 y 1,69, respectivamente. Por otro lado las temperaturas de fusión (Tm) de la PON1 y el 18S fueron 80 °C y 79 °C, respectivamente (Tabla 2).

Los tamaños de los productos de las PCR se determinaron utilizando la herramienta NCBI, BLAST y la secuencia de los primers. Los tamaños de los productos de las PCR fueron 246 pb para PON1 y 93 pb para el 18S (Tabla 2).

Gen	Primer Forward (5'-3') Primer Reverse (5'-3')	Temperatura de desnaturalización °C (tiempo en s)	Temperatura de hibridación °C (tiempo en s)	Temperatura de extensión °C (tiempo en s)	Eficiencia	Tm	Longitud de producto
PON1	tggcctgtcatggtccaatgttg ttatccacaagggtgtcaaagctgag	95 (10)	60 (10)	72 (12)	1,98	80	246
18S	gaggtgaaattcttggaccgg cgaacctccgactttcgttct	95 (10)	60 (10)	72 (12)	1,98	79	93

Tabla 3: Primers y condiciones utilizados en la PCR en tiempo real

Los productos de la PCR en tiempo real se cargaron en un gel de agarosa al 1,5% para comprobar que realmente se había amplificado sólo un fragmento. Este gel además de agarosa lleva 1% de bromuro de etidio. Se cargan las muestras preparadas con sample buffer (glicerol y azul de bromofenol) junto con un marcador de 100pb y se corre la electroforesis durante 30-45 minutos a 80V constantes. Finalmente se realiza la captura en ChemiDoc® (Bio-Rad, Hercules CA, EE.UU.) mediante un filtro de fluorescencia. Los resultados tanto para los productos de la PCR de la PON1 como del 18S indicaron la amplificación de un único fragmento (**Figura 4**).

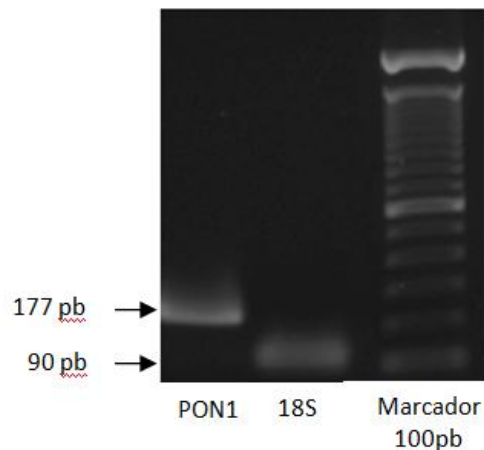


Figura 4: Comprobación de la amplificación de una banda única de los productos de PCR de la PON1 y 18S en gel de agarosa

Actividad enzimática

La actividad paraoxonasa (EC 3.1.1.2) se analizó en muestras de aorta e hígado en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Tek Instruments, VT, EE.UU.). La actividad paraoxonasa se analizó mediante la medición de la velocidad de hidrólisis de paraoxón (dietil p-nitrofenil fosfato)²⁸.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como medias \pm S.E.M de 6 animales por grupo. Los valores de Ct de la PCR en tiempo real se analizaron teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción utilizando el software estándar GenEx (MultiDAnalises, Suecia).

Las comparaciones entre los grupos experimentales se realizaron mediante la prueba T de Student. El nivel considerado estadísticamente significativo se fijó en $P < 0,05$. Para realizar todos los análisis estadísticos se utilizó Microsoft Excel 2007.

RESULTADOS

Parámetros biométricos

La ovariectomía indujo un aumento en el peso corporal de 33% en comparación con el control de las ratas hembra. La suplementación con E2 condujo a una disminución en el peso corporal en un 8% en relación con las ratas OVA, aunque este valor se mantuvo mayor que el de los controles. Estas mismas diferencias ya se habían encatrado en otro estudio con los mismos animales por el grupo de Metabolismo Energético y Nutrición de la UIB²⁶. Por otro lado prácticamente no se observaron diferencias en cuanto al peso del hígado y la aorta entre las diferentes ratas hembras. Los controles macho presentan tanto peso corporal como del hígado y aorta mayor en comparación con las hembras (Tabla 3).

El contenido de proteína total de la aorta presenta ligeras variaciones entre los diferentes grupos experimentales. Las ratas hembras control son las que presentan mayor contenido proteico. Con la ovariectomía el contenido proteico disminuyó en un 16% y con la suplantación con E2 disminuyeron un 15% en relación con las ratas OVA. Por otro lado el contenido proteico de la aorta de los controles macho es 25% menor en comparación con los controles hembra (Tabla 3).

	Machos		Hembras	
	Control	Control	OVA	OVA+E2
Peso corporal (g)	363,86 ± 14,42	198,70 ± 3,21	264,67 ± 6,50	243,83 ± 5,51
Peso hígado (g)	9,48 ± 0,34	5,23 ± 0,09	5,34 ± 0,23	5,11 ± 0,30
Peso aorta (g)	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Proteína aorta (mg/g)	17,86 ± 2,03	24,10 ± 4,73	20,03 ± 3,59	17,03 ± 1,60

Tabla 3: Parámetros biométricos. Los valores se expresan como la media ± S.E.M de 6 animales por grupo.

Efectos del tratamiento sobre los niveles de PON1 en suero

El contenido de PON1 en suero se midió en todos los grupos experimentales: control macho, control hembra, OVA y OVA+E2.

Los niveles de PON1 en suero (**Figura 5**) fueron mayores en ratas hembras respecto a las ratas macho. En cuanto a los niveles de PON1 de las ratas control hembra y OVA fueron mayores que las de ratas macho pero las diferencias no fueron significativas. A diferencia de éstos las ratas OVA+E2 sí presentaron diferencias significativas en comparación con el control macho. Por otro lado prácticamente no hubo diferencias en los niveles de PON1 sérica entre los tres grupos de hembras y estas fueron no significativas, cosa que nos estaría indicando que ni el tratamiento con 17β -estradiol ni la ovariectomía afectan a los niveles séricos de la PON1 de una manera relevante.

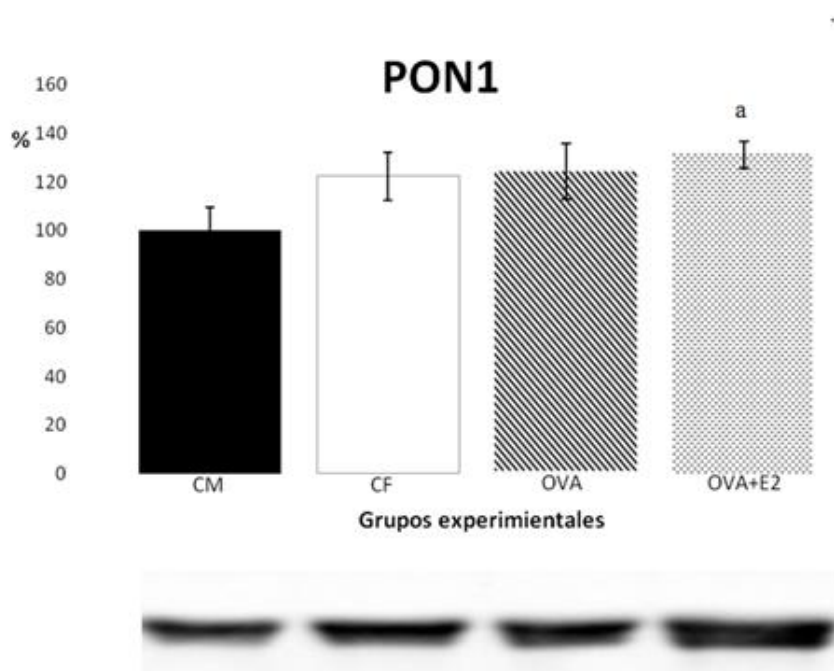


Figura 5: Efecto de las hormonas ováricas sobre los niveles de PON1 en suero (CM: ratas macho control; CF: ratas hembra control; OVA: ratas ovariectomizadas; OVA+E2: ratas ovariectomizadas tratadas con 17β -estradiol). Los niveles de proteína se expresan como porcentaje de unidades arbitrarias. Los niveles de las ratas macho control se establecieron como 100%. Los datos representan la media \pm SEM de 6 animales por grupo. t-Test ($p < 0.05$): la letra (a) como superíndice indica diferencias significativas con el CM.

Efectos del tratamiento sobre los niveles de PON1 en aorta

El contenido de PON1 también se midió en todos los grupos experimentales en aorta.

En este caso los niveles de PON1 en aorta (**Figura 6**) también fueron superiores en ratas hembras en comparación con las ratas macho. En cuanto a las niveles superiores de PON1 en las ratas control hembra y OVA+E2 en comparación con las ratas control macho mostraban diferencias significativas. Por otro lado las ratas OVA presentaron niveles más elevados de PON1 en comparación con las ratas control macho pero estos no llegaban a ser significativos. En cuanto a las diferencias entre los tres grupos de hembra prácticamente no fueron observadas dichas diferencias y la comparación estadística resulto no significativa. Esto nos estaría indicando, igual que en el caso del suero, que ni el tratamiento con 17β -estradiol ni la ovariectomía tienen efectos marcados sobre los niveles de la PON1 en aorta.

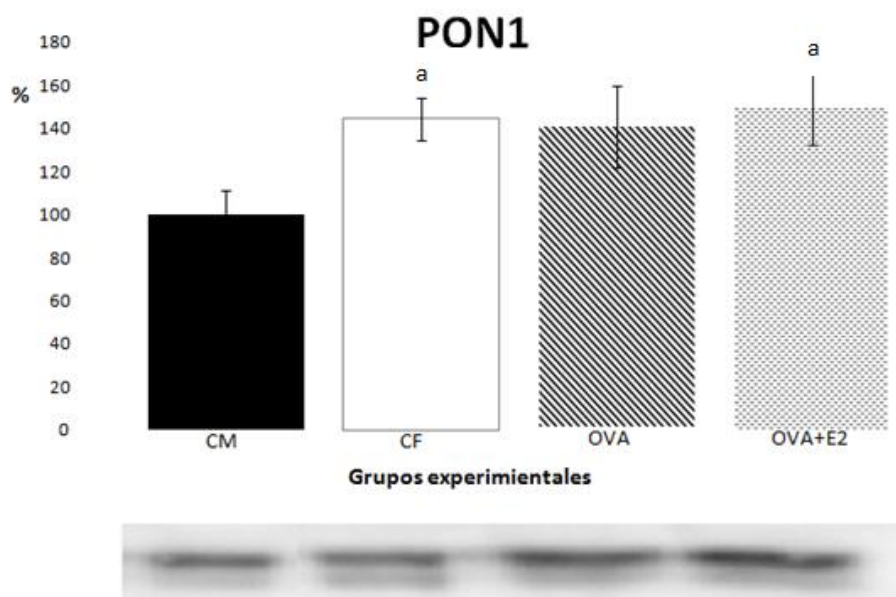


Figura 6: Efecto de las hormonas ováricas sobre los niveles de PON1 en aorta (CM: ratas macho control; CF: ratas hembra control; OVA: ratas ovariectomizadas; OVA+E2: ratas ovariectomizadas tratadas con 17β -estradiol). Los niveles de proteína se expresan como porcentaje de unidades arbitrarias. Los niveles de las ratas macho control se establecieron como 100%. Los datos representan la media \pm SEM de 6 (OVA) y 5 (CM, CF, OVA+2) animales por grupo. t-Test ($p < 0.05$): la letra (a) como superíndice indica diferencias significativas con el CM.

Efectos del tratamiento sobre los niveles del ARNm de PON1 en hígado

Los niveles de ARNm de la PON1 en hígado (**Figura 7**) fueron superiores en las ratas control macho en comparación con las ratas hembra aunque las diferencias no alcanzaron a ser significativas. Por otro lado entre los grupos de hembras se observaron poca diferencia en los niveles del ARNm de la PON1 y tampoco se mostraron diferencias significativas. Cabe destacar pero que el error (S.E.M) observado en todos los grupos fue muy grande. Estos resultados estarían indicando que los niveles de ARNm en el hígado para la PON1 no se modificaron significativamente ni por el género ni por el tratamiento de las hembras.

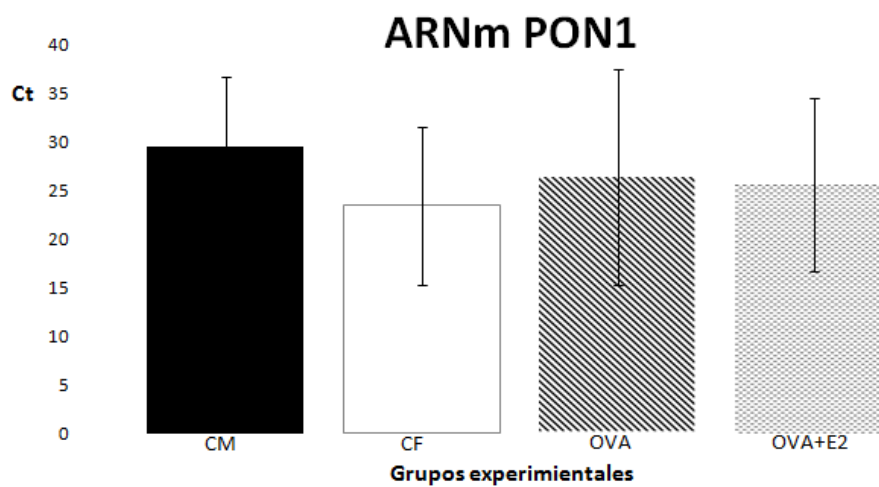


Figura 7: Efecto de las hormonas ováricas sobre los niveles del ARNm de la PON1 en hígado (CM: ratas macho control; CF: ratas hembra control; OVA: ratas ovariectomizadas; OVA+E2: ratas ovariectomizadas tratadas con 17β -estradiol). Los niveles de ARNm se expresan como Ct. GenEx software estándar se utilizó para analizar los valores de Ct. Los datos representan la media \pm SEM de 6 animales por grupo. t-Test ($p < 0.05$): no se mostraron diferencias significativas entre ningún grupo experimental.

Efectos del tratamiento sobre la actividad PON1 en aorta

La actividad paraoxonasa de la PON1 se midió en las muestras de aorta de las ratas según el método explicado anteriormente, pero esta actividad no fue detectada.

La aterosclerosis es la causa principal de la enfermedad arterial coronaria y se está convirtiendo en la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo²⁹. En diferentes estudios se ha demostrado que la PON1 previene el desarrollo de la aterosclerosis en gran medida por la reducción del estrés oxidativo en la circulación y por la prevención de formación de células espumosas de macrófagos^{1, 2, 29}. Tanto la incidencia de la aterosclerosis como los niveles de PON1 presentan un dimorfismo sexual^{19, 28} por lo que se hace interesante el estudio y la relación entre este dimorfismo en los niveles de la PON1 y la incidencia de aterosclerosis.

Una de las diferencias claras entre machos y hembras son las hormonas sexuales por lo que es factible pensar que estas hormonas podrían tener algún papel en el dimorfismo de los niveles de la PON1. En nuestro caso se analizó el papel que podrían tener las hormonas sexuales femeninas sobre los niveles de la PON1 en diferentes tejidos.

Para empezar se estudiaron los niveles circulantes de la PON1 ya que se sabe que este enzima circula asociada a las HDL en suero^{1, 13}. En cuanto al estudio de los niveles proteicos de la PON1 en suero (**Figura 5**) obtuvimos resultados que indican niveles superiores de PON1 en las ratas hembras en comparación con las ratas macho. Fijándonos más en los diferentes tratamientos entre las ratas hembras prácticamente no se observaron diferencias en los niveles de PON1 en suero. Estos resultados nos estarían indicando que en el dimorfismo sexual en los niveles de PON1 en suero no estarían implicadas de una manera significativa las hormonas ováricas y más en concreto el estradiol. Los niveles de PON1 en suero han sido muy investigados y en muchos estudios se ha determinado el dimorfismo entre los géneros²⁸, observando mayores niveles en hembras. Esta tendencia también fue determinada en nuestro estudio aunque en nuestro caso los niveles superiores de PON1 en ratas hembras control no llegaban a ser significativas en relación a las ratas control macho. En cuanto a estudios que comparen los niveles de PON1 en suero en ratas hembras, OVA y/o OVA+E2 no fueron encontrados.

También realizamos un estudio a niveles de aorta ya que este sería uno de los tejidos muy importantes a la hora de hablar de las enfermedades cardiovascular y más en concreto la aterosclerosis. Por lo que nos consta el presente estudio muestra la

primera evidencia de niveles proteicos de PON1 en aorta. Este hallazgo es muy importante ya que la formación de placas de ateroma en este tejido es un factor desencadenante de la aterosclerosis. Observar la presencia de la PON1 en este tejido se relacionaría directamente con los efectos beneficiosos que tendría esta enzima en la formación de las placas de ateroma. Los resultados de los niveles proteicos de la PON1 en la aorta (**Figura 6**) indicaron niveles superiores en hembras en comparación con los machos. En este caso las diferencias entre control macho y control hembra llegaban a ser significativas. Por otro lado los diferentes tratamientos de las hembras igual que en el caso de los niveles circulantes no mostraban gran diferencia. Estos resultados también nos estarían indicando que las hormonas ováricas y más en concreto el estradiol parecen no tener un efecto en los niveles de esta enzima a niveles de aorta. Como hemos comentado ya, no hemos encontrado otros estudios sobre los niveles de PON1 en aorta por lo que no podemos hacer comparaciones con resultados de otros autores que nos ayuden a valorar nuestros resultados.

Podemos observar de los resultados en aorta y suero que el perfil de los niveles de la PON1 en los dos tejidos es muy similar. Estos resultados nos indican que la PON1 circulante puede ir depositándose en la aorta de manera similar entre los géneros. Por otro lado los resultados mencionados anteriormente en aorta y suero apuntan que el dimorfismo sexual entre el género no se debería a las hormonas femeninas como estradiol. A pesar que los resultados nos apunten que el estradiol no tendría efecto en el dimorfismo sexual de la PON1 no quiere decir que no pueda haber otras hormonas sexuales femeninas implicadas en dicho dimorfismo. También hay que tener en cuenta que posiblemente el estradiol no tenga efecto directo sobre los niveles de PON1 pero no se excluye que intervenga de otra manera más indirecta, por ejemplo estimulando otros factores que se asocian a la PON1⁸. Se ha postulado que el E2 puede inducir la expresión de una proteína asociada a PON1 que al unirse al enzima aumente su actividad mediante la estabilización de una conformación catalíticamente activa⁸. Si este modelo es cierto este factor que se asocie a la PON1 puede ayudar a mantenerla activa en la superficie celular de los hepatocitos hasta que es recogida por las HDL y este factor estabilizante puede permanecer asociado con PON1 después de la desorción para aumentar su actividad en suero. Como factores moduladores se han propuesto la apoA-1³⁰ y la proteína "Human Phosphate Binding Protein"³¹ que al parecer permiten estabilizar la PON1. En el estudio in vitro de Ahmad et al. también se ha indicado que los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) pueden tener un impacto positivo en la actividad PON1 en suero y proporcionar así una mayor protección de la aterosclerosis⁸. Por otro lado hay que tener en cuenta que en el

dimorfismo en los niveles de la PON1 pueden estar implicadas también hormonas sexuales masculinas, que en este trabajo no se estudiaron.

Los niveles encontrados en suero y aorta deberían reflejar los niveles del mensajero sintetizados de este enzima. Por este motivo se midieron los niveles de ARNm de la PON1 en hígado (**Figura 7**) ya que este enzima se sintetiza principalmente en el hígado. A sorpresa nuestra en este caso los niveles de ARNm no presentaban diferencias significativas entre macho y hembras y no se observaba el dimorfismo sexual que observamos en el caso del suero y la aorta. . En cuanto a los diferentes tratamientos de las hembras prácticamente no se mostraron diferencias en los niveles de ARNm de la PON1. Estos resultados nos sorprendieron ya que no coincidían con los resultados que obtuvimos en suero y aorta. Lo que estábamos esperando al observar unos niveles superiores de PON1 tanto en suero como en aorta en las ratas hembras era también niveles superiores en el mensajero en estas ratas. Diferentes estudios en animales o in vitro que han mostrado claramente un efecto positivo del género femenino en los niveles o la actividad de PON1 en suero no han llegado a aclarar si esto el efecto era directo sobre la expresión del gen de la PON1 o la actividad, o si era a través de algún otro mecanismo indirecto⁸. Incluso en un estudio in vitro se observó un aumento de la actividad de PON1 por tratamiento con E2 pero no se observaron niveles superiores de ARNm⁸. Estos resultados también son consistentes con estudios en ratas en vivo^{32,33}. Estos estudios nos indican que las diferencias a nivel circulante de la PON1 no tienen porque deberse a diferencias en el mensajero de esta enzima. Aun así, no hay que dejar de mencionar que los resultados que hemos obtenido podrían deberse a algún error metodológico y en este caso podemos destacar que obtuvimos una desviación entre los datos bastante altas.

En el estudio de Ahmad et al. in vitro se indicó que el tiramiento con estradiol tenía efectos sobre la actividad de la PON1 pero no afectaba ni al ARNm ni a los niveles de la PON1⁸. En nuestro trabajo in vivo también observamos que el estradiol no tiene efectos marcados sobre los niveles proteicos y el ARNm de la PON1. Sería interesante tener la actividad de la PON1 para ver si esta varía con el tratamiento y ver si los resultados se ajustan a los que se han obtenido en el estudio de Ahmad et al.. En nuestro objetivo estaba previsto la determinación de la actividad PON1 en aorta pero a la hora de hacerlo no llegamos a determinar actividad PON1 en este tejido. Posiblemente esto se debía a algún error metodológico que no llegamos a resolver.

De esta manera aunque en un principio parecía que el estradiol no tendría un efecto sobre la PON1 parece que esta hormona estaría implicada más bien en la actividad específica o la estabilidad de PON1 en la superficie celular. Cualquiera de estas actividades podría ser explicada a través de la inducción de modificaciones post-traduccionales de la proteína PON1 o a través de la inducción de factores que se asocia con PON1⁸. Anteriormente ya se mencionaron algunos de los factores que se asocian a la PON1 y permiten mayor estabilidad de esta. Entre estos factores esta la apoA-I y proteína “Human Phosphate Binding Protein”. En cuanto a la apoA-1 en un estudio de Leonid Gaidukov se demostró que induce un aumento dramático en la estabilidad de la PON1 y en la actividad lactonasa³⁰. En este mismo estudio se vio que la apoE tenía una menor capacidad para estabilizar PON1 y para inducir sus funciones anti-aterogénicas. En otro estudio realizado por Daniel Rochu et al. se descubrió que una proteína denominada “Human Phosphate Binding Protein” mostraba una tendencia firme a asociarse con la PON1 y permitía estabilizar la conformación activa de la PON1³¹. En este estudio se vio que la ausencia de esta proteína favorecía la homo-oligomerización de la PON1. Por otro lado en este estudio se vio que la PON1 presentaba mayor estabilización térmica al estar asociada a esta proteína ya que se disminuía la tasa de desnaturalización³¹.

No hay que olvidar que como se ha mencionado anteriormente puede haber otras hormonas o factores implicados en el dimorfismo de la PON1. En un estudio de bin Ali et al. se mostró que ratones macho aumentaban un 170% los niveles de ARNm de PON1 después de la castración³⁴. Estos resultados nos indican que las hormonas masculinas también estarían implicadas en el dimorfismo sexual de los niveles de PON1 y que para entender mejor este dimorfismo debería hacerse un estudio más amplio de las hormonas sexuales tanto femeninas como masculinas. Además en este mismo estudio se indicó que la ovariectomía no tuvo efecto sobre el ARNm de la PON-1 en ratones³⁴ hembra cosa que coincide con nuestros resultados.

CONCLUSIÓN

En este estudio hemos concluido que las hormonas ováricas y más en concreto el estradiol no estarían implicadas de una manera directa en dimorfismo sexual de los niveles de PON1. Pero estos resultados no descartan la participación de esta hormona en el dimorfismo de la PON1 ya que según diversos estudios parece que ejercería sus

efectos a nivel de modificaciones post-traduccionales de la proteína PON1 o a través de la inducción de factores que se asocia con PON1

AGRADECIMIENTOS

En pocas palabras quería mostrar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado y han hecho posible la realización de este trabajo fin de grado.

En primer lugar quería dar las gracias a mi tutora Ana María Proenza Arenas y a Isabel Galmes Pascual, Marco Bauzá Thorbrügge, Miquel Sbert Roig por toda la ayuda inapreciable y dedicación que me han aportado durante estos meses.

También tengo que agradecerles a mis compañeras de clase, junto con las que hemos trabajado durante estos meses en la realización de los trabajos fin de grado, por el apoyo que me han demostrado. Entre ellas, Melania Raquel Martínez Cignoni, Natalia Frau Cañellas y Margalida Puigròs Serra.

Finalmente quería mencionar aquellos que desde fuera del laboratorio me han estado apoyando y merecen una especial mención: Laura Martín Pozo, Daniela Alejandra Medina Chávez, María del Carmen Morán Martínez y sobre todo a mi familia que me han ayudado a seguir adelante a pesar de todas las dificultades.

Gracias a todos!

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. She, Z. G.; Chen, H. Z.; Yan, Y.; Li, H.; Liu, D. P., The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* **2012**, *16* (6), 597-632.
2. Litvinov, D.; Mahini, H.; Garelnabi, M., Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *N Am J Med Sci* **2012**, *4* (11), 523-32.
3. Farid, A. S.; Horii, Y., Modulation of paraoxonases during infectious diseases and its potential impact on atherosclerosis. *Lipids Health Dis* **2012**, *11*, 92.
4. Durrington, P. N.; Mackness, B.; Mackness, M. I., Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2001**, *21* (4), 473-80.
5. Mackness, M.; Mackness, B., Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets* **2013**.
6. Fuhrman, B., Regulation of hepatic paraoxonase-1 expression. *J Lipids* **2012**, *2012*, 684010.
7. Fridman, O.; Fuchs, A. G.; Porcile, R.; Morales, A. V.; Gariglio, L. O., [Paraoxonase: its multiple functions and pharmacological regulation]. *Arch Cardiol Mex* **2011**, *81* (3), 251-60.
8. Ahmad, S.; Scott, J. E., Estradiol enhances cell-associated paraoxonase 1 (PON1) activity in vitro without altering PON1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *397* (3), 441-6.
9. Thomàs-Moyà, E.; Gianotti, M.; Proenza, A. M.; Lladó, I., Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. *Mol Med* **2007**, *13* (3-4), 203-9.
10. Karakurt Aritürk, O.; Ureten, K.; Sarı, M.; Yazihan, N.; Ermiş, E.; Ergüder, I., Relationship of paraoxonase-1, malondialdehyde and mean platelet volume with markers of atherosclerosis in familial Mediterranean fever: an observational study. *Anadolu Kardiyol Derg* **2013**.
11. Gungor, O.; Kircelli, F.; Toz, H., Paraoxonase 1, atherosclerosis and arterial stiffness in renal patients. *Int Urol Nephrol* **2013**, *45* (2), 441-7.
12. Thomàs-Moyà, E.; Gianotti, M.; Proenza, A. M.; Lladó, I., The age-related paraoxonase 1 response is altered by long-term caloric restriction in male and female rats. *J Lipid Res* **2006**, *47* (9), 2042-8.
13. Thomàs-Moyà, E.; Nadal-Casellas, A.; Gianotti, M.; Lladó, I.; Proenza, A. M., Time-dependent modulation of rat serum paraoxonase 1 activity by fasting. *Pflugers Arch* **2007**, *453* (6), 831-7.
14. Topçuoğlu, A.; Uzun, H.; Aydın, S.; Kahraman, N.; Vehid, S.; Zeybek, G.; Topçuoğlu, D., The effect of hormone replacement therapy on oxidized low density lipoprotein levels and paraoxonase activity in postmenopausal women. *Tohoku J Exp Med* **2005**, *205* (1), 79-86.
15. Kumru, S.; Aydın, S.; Aras, A.; Gursu, M. F.; Gulcu, F., Effects of surgical menopause and estrogen replacement therapy on serum paraoxonase activity and plasma malondialdehyde concentration. *Gynecol Obstet Invest* **2005**, *59* (2), 108-12.
16. Sutherland, W. H.; Manning, P. J.; de Jong, S. A.; Allum, A. R.; Jones, S. D.; Williams, S. M., Hormone-replacement therapy increases serum paraoxonase arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. *Metabolism* **2001**, *50* (3), 319-24.
17. Camps, J. J. y. J., Paraoxonasa-1 y arteriosclerosis: al disminuir la oxidación se reduce la respuesta inflamatoria *Clin Invest Arterioscl* 2007, p 3.
18. Aharoni, S.; Aviram, M.; Fuhrman, B., Paraoxonase 1 (PON1) reduces macrophage inflammatory responses. *Atherosclerosis* **2013**, *228* (2), 353-61.
19. Bubb, K. J.; Khambata, R. S.; Ahluwalia, A., Sexual dimorphism in rodent models of hypertension and atherosclerosis. *Br J Pharmacol* **2012**, *167* (2), 298-312.
20. Khateeb, J.; Kiyani, Y.; Aviram, M.; Tkachuk, S.; Dumler, I.; Fuhrman, B., Urokinase-type plasminogen activator downregulates paraoxonase 1 expression in hepatocytes by stimulating

peroxisome proliferator-activated receptor- γ nuclear export. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2012**, *32* (2), 449-58.

21. Deakin, S. P.; Bioletto, S.; Bochaton-Piallat, M. L.; James, R. W., HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **2011**, *50* (1), 102-9.

22. Röhrl, C.; Fruhwürth, S.; Schreier, S. M.; Lohninger, A.; Dolischka, A.; Hüttinger, M.; Zemann, N.; Hermann, M.; Strobl, W.; Stangl, H., Scavenger receptor, Class B, Type I provides an alternative means for beta-VLDL uptake independent of the LDL receptor in tissue culture. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1801* (2), 198-204.

23. Van Eck, M.; Twisk, J.; Hoekstra, M.; Van Rij, B. T.; Van der Lans, C. A.; Bos, I. S.; Kruijt, J. K.; Kuipers, F.; Van Berkel, T. J., Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver. *J Biol Chem* **2003**, *278* (26), 23699-705.

24. James, R. W.; Brulhart-Meynet, M. C.; Singh, A. K.; Riederer, B.; Seidler, U.; Out, R.; Van Berkel, T. J.; Deakin, S., The scavenger receptor class B, type I is a primary determinant of paraoxonase-1 association with high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2010**, *30* (11), 2121-7.

25. Richter, R. J.; Jarvik, G. P.; Furlong, C. E., Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure. *Adv Exp Med Biol* **2010**, *660*, 29-35.

26. Amengual-Cladera, E.; Lladó, I.; Gianotti, M.; Proenza, A. M., Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17 β -estradiol replacement. *Steroids* **2012**, *77* (6), 659-65.

27. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-54.

28. Thomàs-Moyà, E.; Gianotti, M.; Lladó, I.; Proenza, A. M., Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. *J Nutr Biochem* **2006**, *17* (3), 197-203.

29. Wang, F.; Xue, J.; Wang, D.; Wang, X.; Lu, S.; Tan, M., Treatment of atherosclerosis by transplantation of bone endothelial progenitor cells over-expressed paraoxonase-1 gene by recombinant adeno-associated virus in rat. *Biol Pharm Bull* **2010**, *33* (11), 1806-13.

30. Gaidukov, L.; Viji, R. I.; Yacobson, S.; Rosenblat, M.; Aviram, M.; Tawfik, D. S., ApoE induces serum paraoxonase PON1 activity and stability similar to ApoA-I. *Biochemistry* **2010**, *49* (3), 532-8.

31. Rochu, D.; Renault, F.; Cléry-Barraud, C.; Chabrière, E.; Masson, P., Stability of highly purified human paraoxonase (PON1): association with human phosphate binding protein (HPBP) is essential for preserving its active conformation(s). *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1774* (7), 874-83.

32. Thomàs-Moyà, E.; Gómez-Pérez, Y.; Fiol, M.; Gianotti, M.; Lladó, I.; Proenza, A. M., Gender related differences in paraoxonase 1 response to high-fat diet-induced oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)* **2008**, *16* (10), 2232-8.

33. Kiranoglu, S.; Sinan, S.; Gencer, N.; Köckar, F.; Arslan, O., In vivo effects of oral contraceptives on paraoxonase, catalase and carbonic anhydrase enzyme activities on mouse. *Biol Pharm Bull* **2007**, *30* (6), 1048-51.

34. bin Ali, A.; Zhang, Q.; Lim, Y. K.; Fang, D.; Retnam, L.; Lim, S. K., Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med* **2003**, *34* (7), 824-9.

