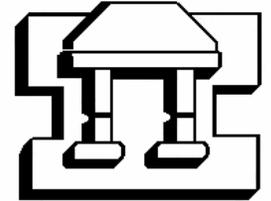




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA



# **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MUTACIÓN CYP3A4\*1B SOBRE LA EXPRESIÓN DEL CYP3A4”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO  
PRESENTA:**

**GEORGINA ARTEAGA ILLÁN**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. GUILLERMO ELIZONDO AZUELA**

Los Reyes Iztacala, Agosto de 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tenemos en nuestra vida a 3 mejores amigos...

Los primeros son la familia y amigos, pero a la hora de nuestra muerte, ellos nos dicen hasta pronto...

El segundo lugar lo tiene el dinero, a todos nos gusta poseerlo, gastarlo, regalarlo, pero a la hora de nuestra muerte, desaparece y simplemente nos dice adiós...

El tercero y más importante de todos son las "**OBRAS BUENAS**" que hicimos durante nuestra vida... *ellas son las únicas que nos acompañarán en nuestra muerte...*

# DEDICATORIA

A mis Padres

Sonia y Manuel: por el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida que me ha permitido llegar hasta donde el día de hoy estoy llegando, gracias por esas noches en vela, por los buenos y malos momentos que me han convertido en la mujer que hoy soy, por sus ejemplos y enseñanzas, y sobre todo por darme la vida. Espero no defraudar la confianza que en mi han depositado. Los amo.

Al amor de mi vida

Octavio: mi mejor amigo, con quien he disfrutado el placer de realizar esta tesis, y al que le agradezco enormemente estar a mi lado y poder compartir juntos tantas cosas. Te amo.

A mis Hermanos

Manuel, Karla, Eva, Ramón e Isabel: quienes son parte de mi vida y a los que amo muchísimo.

A mi abuelita

Bety: quien ha estado conmigo siempre y a la que le agradezco toda la dedicación y ayuda. Te amo mucho.

A mis Abuelos, tíos, primos y sobrinos: con todo mi cariño.

A mi familia política: por permitirme quererlos. En especial a la pequeña Zoë (bombón) quien es una bendición de Dios.

A Cecilia y Roberto: parte fundamental de mi familia.

A mis hermanas y madre adoptivas

Mary, Getze y Natalia: con todo mi amor y esperando tenerlas siempre conmigo.

A mis amigos incondicionales

Guillermo M. S. (Memo), Mauricio, Mariana, Karla, Maribel, Yasbel, Magnolia, Alfredo, Roberto, Ricardo, Angie, Male, Marianita Villavicencio, Miguel Ángel Villavicencio y Joaquín: quienes son parte importante de mi vida.

A Dios: por permitirme llegar hasta aquí y comenzar a cumplir mis más grandes sueños, por darme una familia maravillosa, por permitirme tener excelentes amigos y por darme la oportunidad de conocer el amor a través de Octavio.

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Guillermo Elizondo Azuela: por la oportunidad de poder realizar mi tesis en su laboratorio bajo su dirección, la confianza depositada en mi que espero no haber defraudado, el apoyo y la amistad que durante todo este tiempo me brindó.

M. en C. María de Jesús Laura Castañeda Partida: por su amistad y valiosos comentarios en la revisión de este trabajo.

M. en C. Elías Piedra Ibarra: porque gracias a él, hoy estoy enamorada de la Biología Molecular, por su amistad y apoyo en la revisión de esta tesis.

Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza: porque me enseñó a ver la Biología desde una perspectiva diferente, por las tardes de conferencias que amenizaba con café, por los comentarios, revisión de este trabajo y su amistad.

Dr. Sergio Vaca Pacheco: por el tiempo que me dedicó durante mi estancia en la carrera, por ser el fundador de LA COLMENA y hacer que el trabajo ahí realizado tuviera un valor más que académico, por los momentos de poesía y sones, por la confianza que siempre demostró en mi junto con su paciencia, por todos y cada uno de los consejos, por la revisión de este trabajo de tesis, por el ejemplo de vida que me dio y sobre todo la amistad que espero perdure por siempre. Muchas gracias, y recuerda **"la que te quede más cerca"**.

Dr. S. Manuel Arteaga Martínez (mi padre): por que gracias a el, estoy dedicada a la actividad más maravillosa "la ciencia", por sus sabios comentarios, por su apoyo constante y por ser un ejemplo a seguir.

Dra. Libia Vega Loyo: por el apoyo, orientación, amistad y uso de su laboratorio durante el tiempo de realización de esta tesis.

Sr. Alfredo Alvarado: por su apoyo técnico y amistad brindada.

Dr. Arnulfo Albores Medina, Dra. Betzabeth Quintanilla Vega, Dra. Emma S. Calderón Aranda, todos profesores de la Sección Externa de Toxicología del CINVESTAV: por su orientación y autorización para utilizar las instalaciones y equipos de sus laboratorios.

Dr. Javier Camacho, Dr. Alberto Olivares Reyes, Dr. Bulmaro Cisneros, Dr. Fernando Navarro: por la orientación y ayuda prestada durante la realización de este trabajo.

M. en C. Mario A. Bermúdez de León: por su ayuda y valiosos comentarios.

M. en C. Carlos Cruz Cruz y Biol. Héctor Mauricio Suárez Gómez: por su ayuda y orientación en la realización de la secuenciación automática.

M. en C. Rodolfo Cárdenas Reygadas: por ser un profesor excepcional, por el ánimo que en todo momento me brindó, por la orientación, apoyo y sobre todo la amistad que me ha demostrado siempre. Es imposible olvidar **"que se cae el abuelo"**.

Sra. María del Carmen Pérez Peña Zamora y Sra. Celia Trujillo Bullón: porque antes que nada son mis amigas, por su buen humor ante la vida y sobre todo por la **magnífica e inigualable** labor que realizan en la Jefatura de la Carrera de Biología de la FES Iztacala.

M. en C. Susana Robles Montijo: por todos y cada uno de los momentos que compartimos, por los consejos y motivación que siempre me dio y sobre todo su amistad que me ha brindado en todo momento.

Dr. Sergio Cházaro Olvera: por la amistad que durante el poco tiempo de conocernos no me ha negado, por la confianza que ha depositado en mí y el apoyo que me ha prestado siempre.

Biol. Roberto Rico Montiel: Por las conferencias plenarias que me dio la oportunidad de escuchar durante sus clases, por su amor a la Biología, por sus sabios consejos y por su amistad.

A mis profesores Agustín Vargas, Antonio Muñoz (Toño), Diego Arenas, Diodoro Sánchez, Eduardo Barrera, Josefina Vázquez, Martha Fregoso, Rafael Quintanar y Regina Sánchez: ya que contribuyeron enormemente en mi desarrollo académico y en el hecho de que hoy este terminando una de las etapas más maravillosas de mi vida.

Biol. Octavio Patricio García González: por todas y cada una de las cosas en las que me ha ayudado, por su tiempo y sobre todo por su amistad.

Biol. Mauricio Herrera Cuadra: por ser uno de mis mejores amigos, por su incondicionalidad, su ayuda, comprensión, motivación y apoyo.

Biol. Karla M. Abaddie Bisogno: por su apoyo, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, y sobre todo por permitirme conocerla y ser una de mis mejores amigas.

Biol. Mariana Castillo Vellanoweth: por ser una de mis mejores amigas, por la ayuda incondicional que en todo momento muestra y por todas y cada una de las cosas que compartimos.

Biol. Adriana Montserrat Espinosa y Biol. Montserrat Santiago: por amistad y los bellos momentos que me permitieron compartir con ellas.

Biol. Alelí Mendoza Sandoval y Biol. Rebeca Salcedo Ríos: por ser parte sumamente importante de mi vida, por la amistad que me mostraron y que se que aunque ya no estamos juntas la tendremos presente.

Biol. Jorge Cruz, Biol. Francisco D. López, Biol. Miguel A. Sánchez, Biol. Omar A. Espinoza, Biol. Rigoberto Romualdo y Biol. Valentín Martínez: por el apoyo y amistad que me han brindado.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, M. en C. Irma Martha Medina, M. en C. Guadalupe Ponce y M. en C. Martha Guadalupe Sosa: por los momentos agradables que compartimos en el laboratorio 11, su valiosísima ayuda y orientación que permitieron que este trabajo este hoy terminado.

A mis compañeros de la Sección Externa de Toxicología del CINVESTAV, Aurora, Ania, Fabiola, Leonor, Raúl y Mary: por su apoyo y ayuda.

A los que hicieron que mi estancia en el CINVESTAV fuera mucho más agradable y placentera, por permitirme conocerlos y compartir muy bellos momentos: Ana, Balam, Erika, Fabiola (Fab) Gerson, José Luis y Mónica

Sra. Ma. Cristina Torres García: por el apoyo secretarial en el CINVESTAV.

Dra. Ma. Isabel García-Peláez: por la amistad que durante este tiempo me ha brindado, por sus valiosos comentarios y tiempo dedicado.

Al CONACYT por el apoyo para realizar el presente estudio a través del proyecto I35285-N

A la Sección Externa de Toxicología del CINVESTAV: por permitirme realizar mi tesis de licenciatura, el apoyo y confianza que me brindaron durante este tiempo.

Al CINVESTAV: por la posibilidad de poder efectuar mi trabajo de tesis en este centro.

A mi "*alma mater*" la Universidad Nacional Autónoma de México: por darme la oportunidad de pertenecer a esta casa de estudios desde la preparatoria y consentirlo hasta la universidad, por la confianza que en mi depositó, por todos los momentos que me dio oportunidad de vivir en ella y permitirme ser parte de los egresados de la **Máxima Casa de Estudios, la UNAM**.

A Guillermo Martínez Sosa: por ser uno de mis mejores amigos con quien he compartido grandes momentos y al que con unas pocas palabras no podría agradecerle todo lo que ha hecho por mí.

A Lic. Ma. Del Angel Bonnabel (witch) y Lic. Guillermina Vargas: por ser unas amigas incondicionales, por los consejos y ayuda que durante el tiempo de conocernos me han brindado.

Lic. Roberto Fuentes, Ing. Ricardo Fuentes (Jarrito) y familia: no tengo palabras para agradecerles todo lo que me han ayudado, los momentos que hemos compartido y la amistad que me han brindado siempre.

A Maribel, Y. Gabriela, Magnolia y Alfredo: pues gracias a ustedes he crecido académica y moralmente, gracias por la amistad que siempre me han brindado.

A todas y aquellas personas que directa e indirectamente me han ayudado en todas las etapas de mi vida.

Y por último y no por ello menos importante (por el contrario)

A Octavio: quien es parte invaluable e indescriptible en la realización de este trabajo de tesis que hoy llega a su fin.

# INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Citocromos P450

1.2. Subfamilia 3A

1.3. CYP3A4

1.3.1. Localización, estructura génica, regulación y polimorfismos

1.3.1.1 Variante CYP3A4\*1B

1.4. Cáncer de Próstata

## 2. JUSTIFICACIÓN

## 3. HIPÓTESIS

## 4. OBJETIVO GENERAL

4.1. Objetivos particulares

## 5. EXTRATEGIA EXPERIMENTAL

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.2. Amplificación del promotor del CYP3A4

6.3. Integridad del DNA

6.4. Clonación del fragmento -1,200

6.5. Transformación celular

- 6.6. Análisis de clonas positivas
- 6.7. Obtención de DNA plasmídico por lisis alcalina (minipreps)
- 6.8. Digestión del DNA
- 6.9. Verificación de los tamaños del DNA
- 6.10. Obtención del DNA plasmídico ultrapuro
- 6.11. Construcción del vector reportero
- 6.12. Secuenciación del vector pCAT-3A4\*1A
- 6.13. Mutagénesis dirigida
- 6.14. Transfección en células Hepa I.
  - 6.14.1. Cultivos celulares
  - 6.14.2. Transfección con fosfato de calcio
- 6.15. Obtención de extractos celulares
- 6.16. Ensayo de  $\beta$ -galactosidasa
- 6.17. Ensayo CAT
  - 6.17.1. Cromatografía capa fina (TLC)

## 7. RESULTADOS

- 7.1. Clonación de la región promotora del CYP3A4
- 7.2. Construcción del vector reportero pCAT-3A4\*1A
- 7.3. Construcción del vector reportero pCAT-3A4\*1B
- 7.4. Actividad del promotor, variantes \*1A y \*1B del CYP3A4

## 8. DISCUSIÓN

## 9. BIBLIOGRAFÍA

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP-3	Activador de proteína 3
BAC	Cromosoma Artificial de Bacteria
BSA	Albúmina sérica bobina
BTE	Elemento básico de transcripción
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CP-1	Proteína de unión CCAAT
CYP450	Citocromo P450
DHT	Dihidrotestosterona
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxi-nucleótido trifosfatado
EDTA	Ácido tetra acético (etilendinitrilo)
ER	Receptor para estrógenos
ERE	Elemento de respuesta del receptor de estrógenos
Est	Estradiol
fmol	fentomol
g	Gramo
Glu	Glucocorticoide
GR	Receptor para glucocorticoides
h	Hora

H <sub>2</sub> O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HLFaSE	Elemento específico p450HFLa
HNF-4	Factor nuclear hepático 4
HNF-5	Factor nuclear hepático 5
hPXR	Receptor huérfano para 16- $\alpha$ -pregnolona
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
INEGI	Instituto Nacional de Geografía e Informática
IPTG	Isopropil- $\beta$ -d-tiogalactopiranoside
Kb	Kilo base
KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio
LB	Luria-Bertani
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro
M	Molar
mg	Miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro

mM	Milimolar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dibásico de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NFSE	Elemento específico para la nifedipina
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
Oct-1	Octámero de unión de proteína
OPNG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranoside
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfato
pCAT-3A4*1A	Vector reportero pCAT ligado al promotor de la variante silvestre del CYP3A4*1A
pCAT-3A4*1B	Vector reportero pCAT ligado al promotor de la variante silvestre del CYP3A4*1B
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Receptor para la progesterona
PR/GR	Receptor de progesterona y glucocorticoides
PRE/GRE	Elemento de respuesta para el receptor de progesterona y el receptor de glucocorticoides
Prg	Progesterona

PXR	El receptor X para la pregnonalona
PXRE	Elemento de respuesta del PXR
Rif	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
TLC	Cromatografía de capa fina
Tris base	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano hidrociorado
volts	Voltios
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -d-galactoside
°C	Grados celsius

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Árbol filogenético de los CYP450
- Figura 2. Localización del CYP450 en la membrana del retículo endoplásmico
- Figura 3. Organización génica del CYP3A4
- Figura 4. Secuencias promotoras y transcripcionales del CYP3A4
- Figura 5. Posible papel del CYP3A4 en el desarrollo de cáncer de próstata.
- Figura 6. Amplificación del fragmento -1,200 pb del promotor del CYP3A4
- Figura 7. Aislamiento del DNA plasmídico p3A4
- Figura 8. Digestión del DNA plasmídico p3A4.
- Figura 9. Obtención del plásmido p3A4 ultrapuro
- Figura 10. Secuenciación del plásmido p3A4\*1A
- Figura 11. Purificación del vector pCAT basic y la región promotora -1,200 pb del gen CYP3A4.
- Figura 12. Purificación del vector pCAT-3A4\*1A y digestión del vector pCAT-3A4\*1A
- Figura 13. Digestión del DNA plasmídico p3A4\*1B ultrapuro
- Figura 14. Secuenciación del plásmido p3A4\*1B
- Figura 15. Purificación del vector pCAT basic y la región promotora -1,200 pb del gen CYP3A4\*1B.

Figura 16. Digestión pCAT-3A4\*1B.

Figura 17. Actividad relativa de CAT de los vectores reporteros pCAT-3A4\*1A y pCAT-3A4\*1B.

## Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Variantes alélicas asociadas a un cambio en la actividad catalítica del CYP3A4	10
Tabla 2. Frecuencias alélicas del CYP3A4*1B en diferentes poblaciones	11
Tabla 3. Actividad Relativa de CAT normalizada con $\beta$ -galactosidasa.	47

## 1. INTRODUCCIÓN

La evolución de las especies ha estado marcada por diversos factores de tipo químico. Esto ha ocasionado respuestas que pueden variar desde la adaptación hasta la muerte. En los últimos 150 años, miles de compuestos, productos de la actividad antropogénica, han sido liberados a la biosfera, lo que ha puesto en riesgo la supervivencia de todas las estructuras vitales. Debido a lo anterior los organismos están expuestos, cada vez más, a un mayor número de sustancias químicas, ya sea de origen artificial o natural.

Los compuestos químicos pueden ser de naturaleza endógena (prostaglandinas, ácidos grasos, esteroides, etc.) o exógenos (medicamentos, cosméticos, alimentos y contaminantes ambientales). Estos últimos, denominados xenobióticos, ingresan al organismo a través de la vía oral, cutánea o aérea; la mayoría son liposolubles y requieren de ser convertidos a moléculas hidrosolubles para poder ser excretados.

Previo a la eliminación de los xenobióticos se requiere de un proceso conocido como biotransformación. Este proceso es el conjunto de rutas metabólicas (entre otras) por medio de las cuales los organismos incrementan la polaridad de un agente químico. De esta manera se reduce el tiempo de exposición a xenobióticos y se evita o disminuye la acumulación de estos compuestos en los organismos.

La biotransformación puede darse en cualquiera de los tejidos corporales, pero existen órganos con una función metabólica predominante, como lo son el hígado, los pulmones, el intestino y los riñones.

Aunque generalmente la biotransformación conlleva a la detoxificación, en algunos casos, este proceso da como resultado la producción de un metabolito más tóxico que el compuesto parental, es decir, sufre un proceso de bio-activación. Si estos metabolitos se acumulan y vencen las defensas del organismo entonces pueden producir un daño que se manifieste como un efecto tóxico y genotóxico.

La biotransformación se lleva a cabo por dos tipos de reacciones, las reacciones de Fase I y de Fase II. Las reacciones de Fase I metabolizan los xenobióticos convirtiéndolos en metabolitos reactivos mediante reacciones de reducción, oxidación e hidrólisis. Las reacciones de Fase I son llevadas a cabo, entre otros, por un sistema enzimático de gran funcionalidad y amplia acción, conocido como citocromo P-450 (CYP450). Los metabolitos productos de reacciones de Fase I, son sustratos de las enzimas de Fase II. Las reacciones de Fase II conjugan a los compuestos parentales o a los metabolitos, al ceder un grupo funcional polar al xenobiótico o metabolito. Estos son conjugados con sulfato inorgánico, aminoácidos, ácido glucorónico o glutatión. Las reacciones de conjugación facilitan y aumentan la eliminación de los xenobióticos.

## **1.1. Citocromos P450**

El sistema enzimático CYP450 es una superfamilia de hemoproteínas con un grupo prostético (un grupo hemo unido a un tiolato) idéntico para todas las enzimas (Nebert y Gonzalez, 1987). Se les denomina citocromos P-450 debido a que estas proteínas producen un pico de absorción a 450 nm.

Las múltiples formas del CYP450 (isoenzimas) representan uno de los más importantes sistemas de defensa que poseen las especies.

La superfamilia de CYP450 se ha encontrado presente en bacterias, levaduras, plantas y animales. Con base en comparaciones simultáneas en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos y a pesar de las dificultades que se tienen para estimar la divergencia de los CYP450 debida a recombinaciones, transposiciones y conversión de genes, se desarrolló un árbol filogenético (Figura 1) que proporciona una estructura para el estudio acerca de la evolución de los genes del CYP450 (Gonzalez y Nebert 1990).

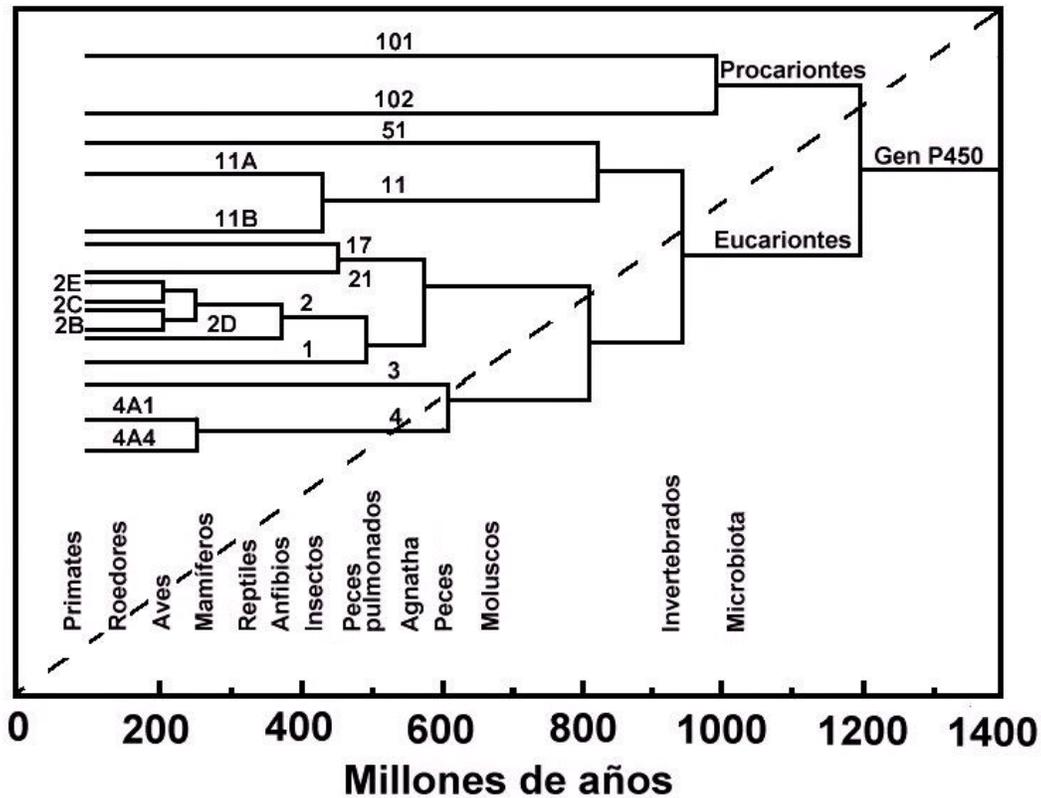


Figura 1. Versión abreviada del árbol filogenético de los CYP450 comparado con una escala de tiempo evolutivo (Lewis, 1996, modificado por nosotros).

En la mayoría de los mamíferos, estas enzimas están localizadas principalmente en el retículo endoplásmico liso (Figura 2). Se encuentran distribuidas en diversos órganos y tejidos como el hígado, intestino, pulmón, riñón y testículo, entre otros.

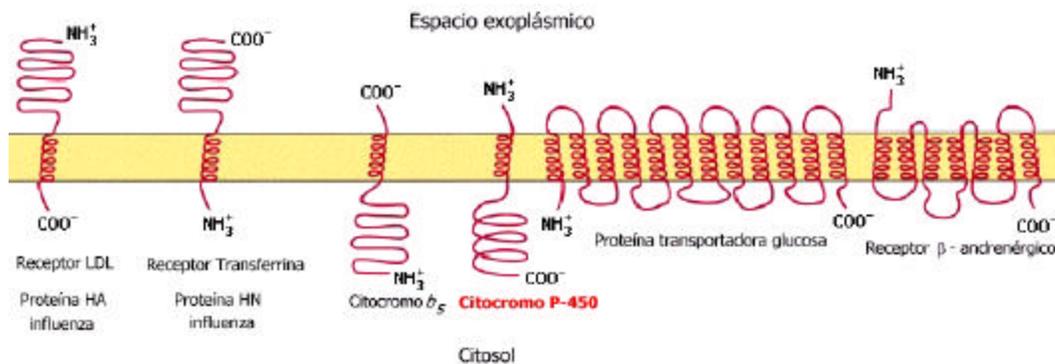


Figura 2. Localización del CYP450 en la membrana del retículo endoplásmico.

El sistema de clasificación para esta superfamilia de isoenzimas está basado en la similitud en la secuencia de aminoácidos (Nelson *et al.*, 1996), agrupando las isoenzimas dentro de familias (miembros con 40% de similitud) y subfamilias (miembros con un 55% de semejanza). Los citocromos se nombran con la raíz CYP seguida de un número arábigo que denota a la familia, una letra que indica la subfamilia y otro número arábigo que designa a la isoforma. Otra clasificación, la cual está basada en la funcionalidad, divide a los CYP450 en dos grupos, los implicados en la síntesis de esteroides y ácidos biliares y aquellos que están involucrados en el metabolismo de xenobióticos (Gonzalez, 1992).

Los humanos presentan 18 familias de CYP450 y 43 subfamilias, de las cuales las que se expresan principalmente en el humano son: 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2J, 3A, 4B, 5A Y 8A. De estas subfamilias las mejor caracterizadas y con mayor importancia toxicológica y farmacológica son: CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E y CYP3A. Las isoformas que destacan por su importancia en el metabolismo de xeno y endobióticos son el CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 (Calderón, 2000).

## **1.2. Subfamilia CYP3A**

El hígado es el órgano que realiza la biotransformación de la mayoría de los xenobióticos, además de contener la mayor concentración de CYP450. De estos, la subfamilia más abundante es la CYP3A que consta de cuatro miembros

funcionales: CYP3A4, CYP3A5 3A43 y CYP3A7. Esta última es una enzima fetal, ya que solamente se expresa durante esta etapa de desarrollo (Shimada *et al.*, 1994).

### **1.3. CYP3A4**

El CYP3A4 se expresa solamente en humanos, representa alrededor del 50% del total de CYP450 en el hígado (Shimada *et al.*, 1994) y aproximadamente el 70% en el epitelio intestinal (Kolars *et al.*, 1994; Mckinnon *et al.*, 1995).

El CYP3A4 participa en el metabolismo de más del 50% de todos los fármacos de uso terapéutico actual (Maurel, 1996). Esta enzima no exhibe aparente selectividad estructural por algún sustrato y es capaz de oxidar moléculas tan diversas como son esteroides, antibióticos, ciclosporinas, alcaloides, hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre otros. El CYP3A4 está involucrado en la bioactivación de drogas anticancerígenas y de procarcinógenos ambientales, incluyendo el benzo[*a*]pireno y otros derivados de hidrodioles de hidrocarburos aromáticos policíclicos y micotoxinas carcinógenas (Li *et al.*, 1995). Así mismo, lleva a cabo la biotransformación de moléculas que juegan un papel relevante en la regulación fisiológica a través de la 2 $\beta$ -, 6 $\beta$ - y 15 $\beta$  hidroxilación de la testosterona (Yamazaki, *et al* 1997) y de la 16 $\alpha$ -hidroxilación del estradiol (Yamazaki, *et al* 1998).

### 1.3.1. Localización, estructura génica, regulación y polimorfismos

En CYP3A4 fue secuenciado por Hashimoto *et al* (1993). Tiene una longitud de 27 Kb, está localizado en el cromosoma 7q22.1 y está compuesto de 13 exones y 12 intrones (Itoh *et al.*, 1992). Su estructura y distribución de exones se muestra en la figura 3.

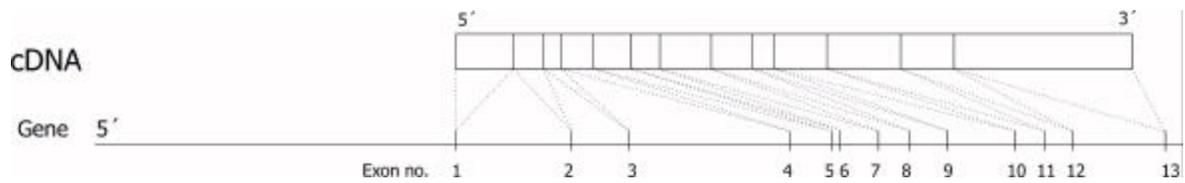


Figura 3. Organización génica del CYP3A4. (Hashimoto *et al.*, 1993).

El CYP3A4 está regulado transcripcionalmente por una gran variedad de hormonas, incluyendo glucocorticoides y la hormona del crecimiento (Schuetz *et al.*, 1993 y Liddle *et al.*, 1998). Los xenobióticos también participan en la regulación de la expresión del CYP3A4, entre estos se encuentran el fenobarbital, clotrimazol, rifampicina y vitamina D, entre otros (Daujat *et al.*, 1991; Schuetz *et al.*, 1993 y Kocarek *et al.*, 1995 y Elizondo *et al.*, 2003).

Algunas de estas moléculas actúan mediante su interacción con sus respectivos receptores nucleares, formando un complejo que se une a sitios específicos del promotor del gen CYP3A4 (elementos de respuesta) induciendo su transcripción.

Si bien la secuencia de nucleótidos de la región 5´ del CYP3A4 ha sido elucidada, aún se están evaluando los mecanismos moleculares que definen la transcripción de este gen. En la región 5´ se localizan importantes secuencias promotoras, como la caja TATA y el elemento básico de transcripción (BTE), el cual se ha reportado que existe en la región proximal de la caja TATA en diversos genes que codifican para la superfamilia CYP450 (Yanagida *et al.*, 1990). Se han localizado, además, otras secuencias transcripcionales a las que se unen factores de transcripción como el octámero de unión de proteína (Oct-1) (Sturm *et al.*, 1988); la proteína de unión CCAAT (CP-1) (Chodosh *et al.*, 1988); el receptor para estrógenos (ER), el receptor de progesterona y glucocorticoides (PR/GR) (Beato, 1989); P53 (Kern *et al.*, 1991); el activador de proteína 3 (AP-3) (Chiu *et al.*, 1987); el factor nuclear hepático 4 (HNF-4) (Sladek *et al.*, 1990), el factor nuclear hepático 5 (HNF-5) (Grange *et al.*, 1991) y más recientemente el receptor X para la pregnonalona (PXR) (Kliewer *et al.*, 1998). Otra secuencia necesarias para la transcripción es el elemento específico P450HFLa (HLFaSE) (Itoh *et al.*, 1992) (Figura 4).

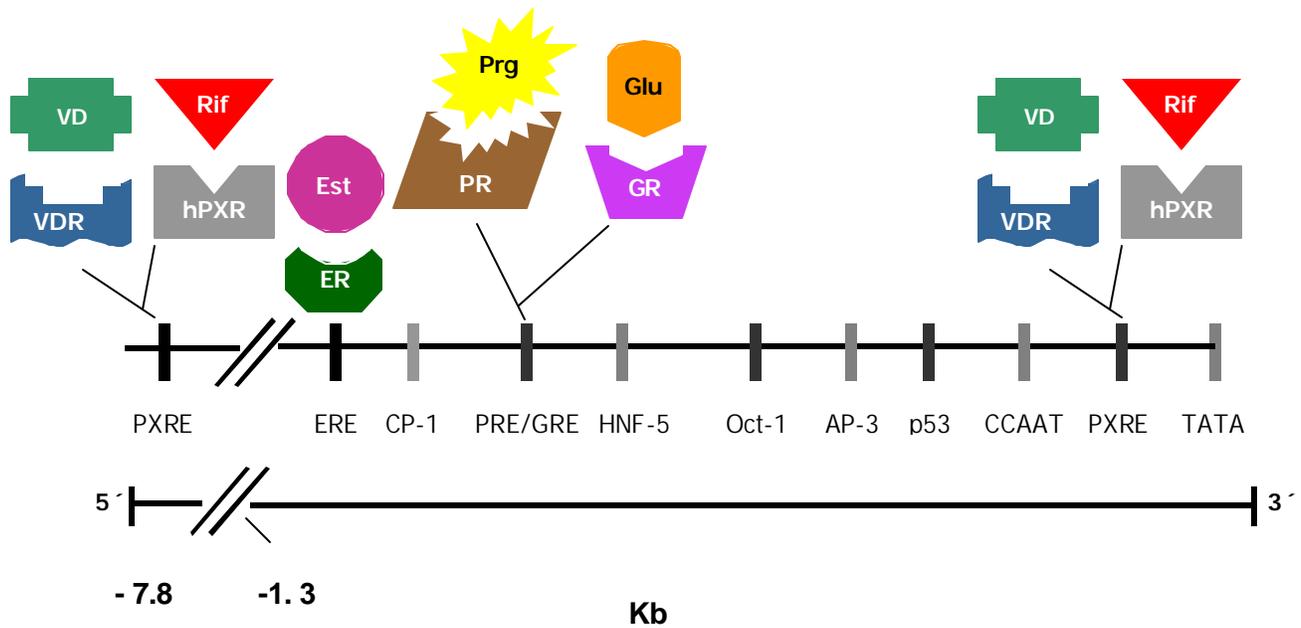


Figura 4. Secuencias promotoras y transcripcionales del CYP3A4. VDR (elemento de respuesta de la vitamina D); VD (vitamina D); PXRE (elemento de respuesta del receptor para 16- $\alpha$ -pregnonalona); hPXR (receptor huérfano para 16- $\alpha$ -pregnonalona); Rif (rifampicina); ERE (elemento de respuesta del receptor de estrógenos); ER (receptor para estrógenos); Est (estradiol); CP-1 (proteína de unión CCAAT); PRE/GRE (elemento de respuesta para el receptor de progesterona y el receptor de glucocorticoides); PR (receptor para la progesterona); Prg (progesterona); GR (receptor para glucocorticoides); Glu (glucocorticoide); HNF-5 (factor nuclear hepático 5); Oct-1 (octámero de unión de proteína); AP-3 (activador de proteína 3);

Por otro lado, se ha observado una amplia variabilidad interindividual en las actividades enzimáticas del CYP3A4, tanto *in vivo* como *in vitro* (Murray y Reydi, 1990; Boobis, 1992). Dicha variabilidad se refleja en el metabolismo de xenobióticos por exposiciones terapéuticas, ocupacionales o alimenticias. Además de los factores ambientales, uno de los principales factores que pueden contribuir a la variabilidad es el polimorfismo genético (Jounaidi *et al.*, 1996). Aunque se han reportado diversas variantes alélicas del CYP3A4 solo seis, localizadas en la región codificante del gen, se han asociado con un cambio en la actividad catalítica (Tabla 1).

Tabla 1 Variantes alélicas asociadas a un cambio en la actividad catalítica del CYP3A4.

VARIANTE ALÉLICA	CAMBIO	EFEECTO
CYP3A4*1	-----	Variante silvestre (Gonzalez <i>et al.</i> , 1988)
CYP3A4*2	S222P (exón 7)	Disminución en la actividad del CYP3A4 mediada por su capacidad de oxidar nifedipina (Sata <i>et al.</i> , 2000)
CYP3A4*4	I118V (exón 5)	Disminución en el metabolismo del cortisol (6 $\beta$ -hydroxycortisol) (Hsieh <i>et al.</i> , 2001).
CYP3A4*5	P218R (exón 7)	Disminución en el metabolismo del cortisol (6 $\beta$ -hydroxycortisol) (Hsieh <i>et al.</i> , 2001).
CYP3A4*6	831 Ins R (exón 9)	Disminución en el metabolismo del cortisol (6 $\beta$ -hydroxycortisol) (Hsieh <i>et al.</i> , 2001).
CYP3A4*17	F189S (exón 7)	Disminución en el metabolismo de la testosterona y plaguicidas organofosforados (Chlorpyrifos) (Dai <i>et al.</i> , 2001).
CYP3A4*18	L293P (exón 10)	Aumento en el metabolismo de la testosterona y plaguicidas organofosforados (Chlorpyrifos) (Dai <i>et al.</i> , 2001).

### 1.3.1.1. Variante CYP3A4\*1B

La variante alélica CYP3A4\*1B consiste en un cambio de nucleótido de adenina a guanina en la región NFSE (elemento específico para la nifedipina) localizada en el promotor del gen CYP3A4 (Rebbeck *et al.*, 1998 y Sata *et al.*, 2000). La presencia de esta variante alélica ha sido reportada en diferentes poblaciones (Tabla 2).

Tabla 2 Frecuencias alélicas del CYP3A4\*1B en diferentes poblaciones.

POBLACIÓN	Frecuencia alélica		n
	CYP3A4*1A	CYP3A4*1B	
Afro-americanos (Walker <i>et al.</i> , 1998)	0.47	0.53	140
Caucásicos-americanos (Walker <i>et al.</i> , 1998)	0.96	0.04	264
Afro-americanos (Ball <i>et al.</i> , 1999)	0.45	0.55	372
Afro-americanos (Ball <i>et al.</i> , 1999)	0.33	0.67	180
Afro-americanos (Paris <i>et al.</i> , 1999)	0.45	0.55	232
Caucásicos-americanos (Ball <i>et al.</i> , 1999)	0.96	0.04	546
Caucásicos-americanos (Ball <i>et al.</i> , 1999)	0.91	0.09	376
Caucásicos-americanos (Paris <i>et al.</i> , 1999)	0.91	0.09	234
Hispano-americanos (Paris <i>et al.</i> , 1999)	0.89	0.11	242
Asiáticos-americanos (Ball <i>et al.</i> , 1999)	1.00	0.00	154
Asiáticos-americanos (Ball <i>et al.</i> , 1999)	1.00	0.00	156
Asiáticos-americanos (Paris <i>et al.</i> , 1999)	1.00	0.00	160
Ghaneses (Tayeb <i>et al.</i> , 2000)	0.31	0.69	200
Escoceses (Tayeb <i>et al.</i> , 2000)	0.95	0.05	202
Saudi-árabes (Tayeb <i>et al.</i> , 2000)	0.91	0.09	202
Afro-americanos (Sata <i>et al.</i> , 2000)	0.34	0.66	150
Caucásicos-americanos (Sata <i>et al.</i> , 2000)	0.96	0.04	118
Asiáticos-americanos (Sata <i>et al.</i> , 2000)	1.00	0.00	118

Esta variante ha sido muy estudiada debido a que se le ha asociado con cáncer de próstata. En un estudio realizado en pacientes con cáncer de próstata se observaron altos niveles de testosterona y una alta frecuencia alélica de la variante CYP3A4\*1B en comparación con el grupo control (Rebeck *et al.*, 1998). Por otro lado, la población afro-americana presentan la mayor predisposición a manifestar cáncer de próstata. Esta población, además, presenta la variante CYP3A4\*1B con una frecuencia cercana al 60%. Los caucásicos portan este alelo con una frecuencia del 6%, mientras que los asiáticos, quienes tienen la menor incidencia de cáncer de próstata, no la presentan (Tayeb *et al.*, 2000; Sata *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 1999; Paris *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1998).

Recientemente nuestro grupo de investigación realizó un estudio piloto en donde evaluó por medio de la técnica de los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) la frecuencia de esta variante alélica en 69 individuos mexicanos, encontrando que está presente en el 5.79% de los alelos estudiados, lo que nos indica que la población mexicana estudiada presenta una frecuencia similar a la encontrada en caucásicos en otros estudios.

Se postula que la presencia del alelo mutado puede provocar una reducción en la expresión del CYP3A4 y por lo tanto una disminución en el metabolismo de la testosterona. Debido a lo anterior y a que se ha demostrado una correlación positiva entre los niveles altos de testosterona y la susceptibilidad a desarrollar cáncer de próstata, es posible que la presencia de esta variante alélica contribuya al desarrollo de dicha neoplasia (Figura 5). Sin embargo, aún no se ha determinado si la variante CYP3A4\*1B afecta los niveles de expresión del CYP3A4.

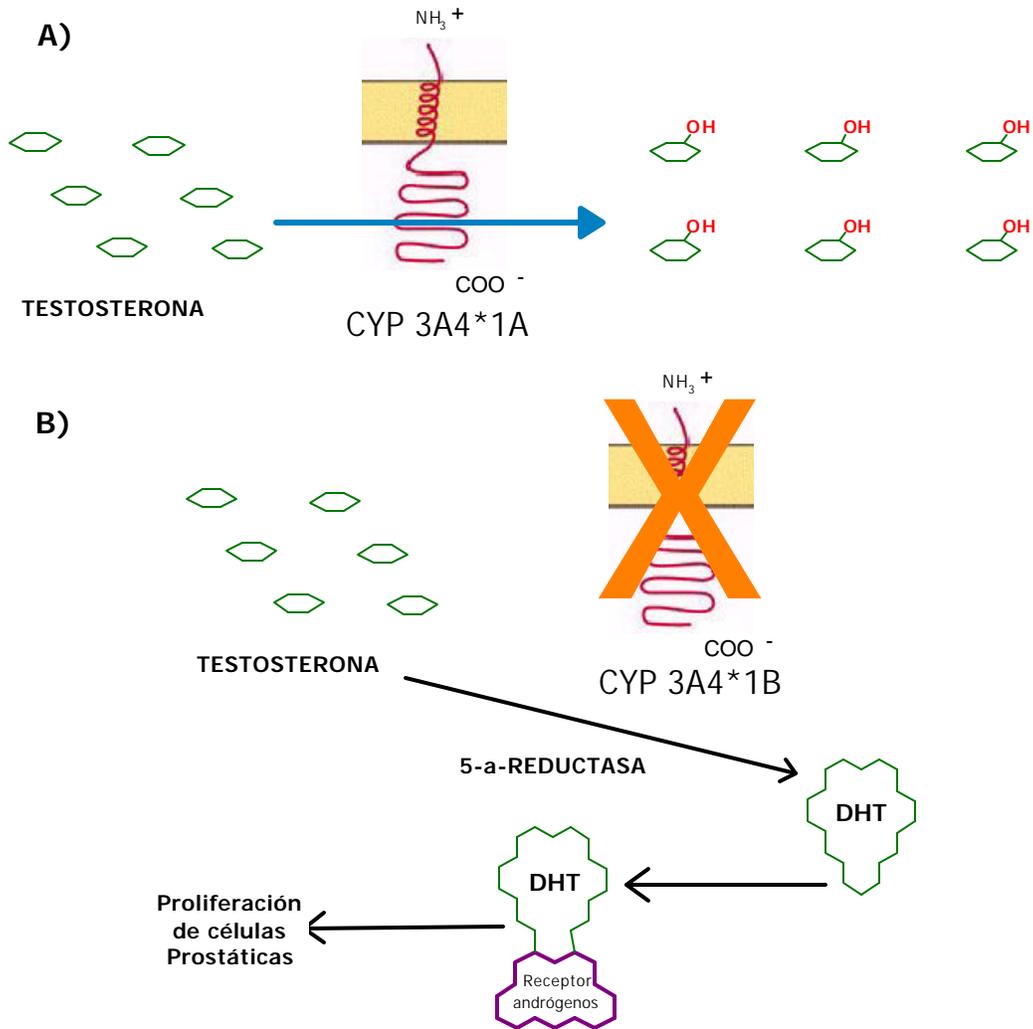


Figura 5. Posible papel del CYP3A4 en el desarrollo de c3ncer de pr3stata. A) La variante silvestre CYP3A4\*1A inactiva a la testosterona al hidroxilarla, evitando que esta sea sustrato de la 5 $\alpha$ -reductasa. B) La variante CYP3A4\*1B no se expresa, por lo que la testosterona no es inactivada, permitiendo que se forme su metabolito, la dihidrotestosterona (DHT), el cual activa al receptor para andr3genos promoviendo la proliferaci3n de c3lulas prost3ticas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La etiología de cáncer de próstata (al igual que con la mayoría de los tumores malignos) permanece desconocida. Se le han asociado diversos factores de riesgo entre los que destacan la edad, dieta, predisposición genética, cambios hormonales, etc. Por lo tanto, esta neoplasia tiene características que hacen complicado su diagnóstico precoz. Debido a lo anterior es importante encontrar biomarcadores de susceptibilidad individual para esta patología.

Por otra parte se ha asociado la presencia de cáncer de próstata con la variante alélica CYP3A4\*1B, sin embargo no se ha estudiado si esta variante provoca un cambio en la transcripción del gen.

### **3. HIPÓTESIS**

La variante CYP3A4\*1B, localizada en la región conocida como NFSE en el promotor del gen CYP3A4, da como resultado una disminución de la expresión génica del CYP3A4.

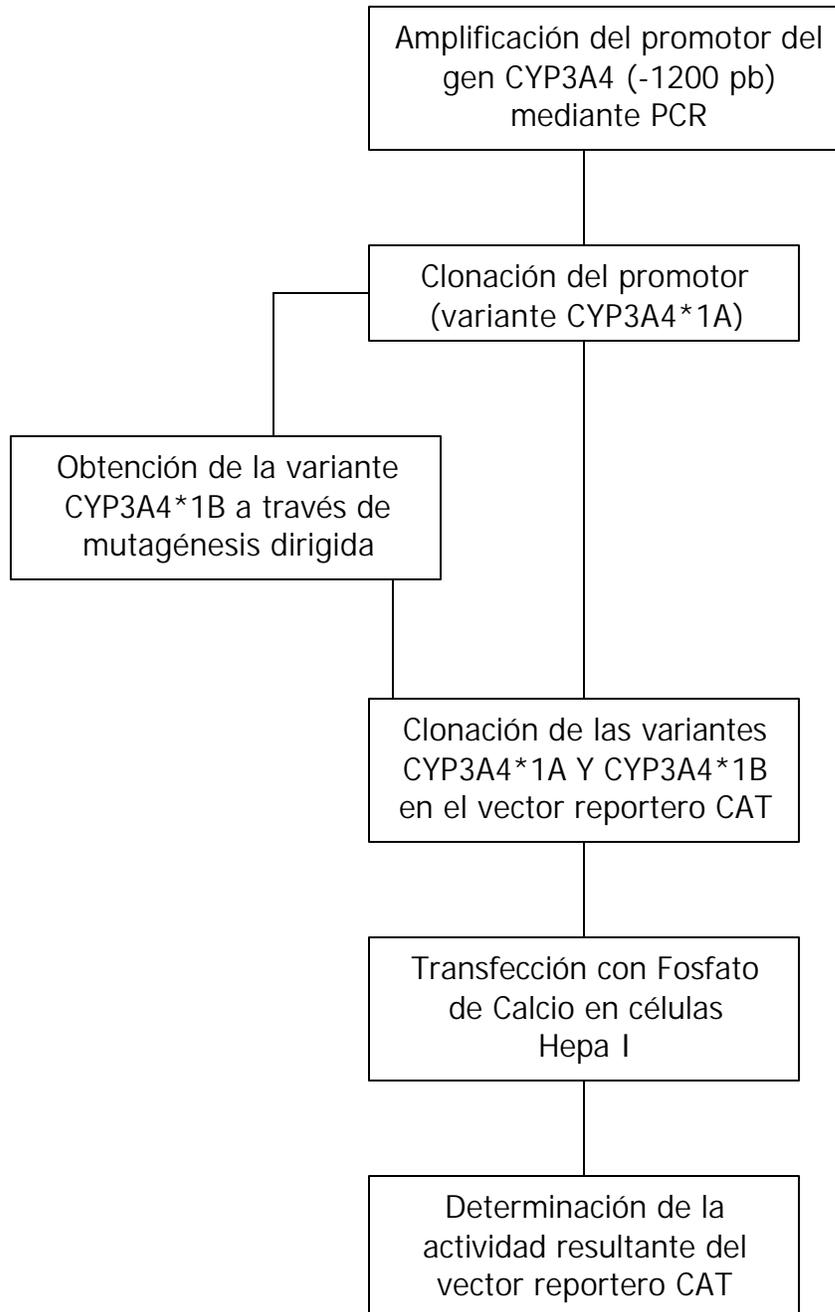
#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la mutación observada en la región NFSE (cambio de A — G en la posición -290) afecta la expresión basal del CYP3A4.

##### **4.1. Objetivos particulares**

1. Realizar transfección celular del vector reportero con el promotor de la variante silvestre CYP3A4\*1A en la línea celular Hepa I.
2. Realizar transfección celular del vector reportero con el promotor de la variante alélica CYP3A4\*1B en la línea celular Hepa I.
3. Comparar los niveles de expresión del CYP3A4\*1A y CYP3A4\*1B en células Hepa I.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Materiales

Se obtuvieron de Acumedia Manufacturers Inc (Baltimore, Maryland): extracto de levadura y agar bacteriológico.

De Applied biosystem (Foster City, CA): Big Dye.

De ATCC (Rockville, MD): línea celular Hepa I.

De Bristol (México D.F.): ampicilina.

Genome System Inc. (St. Louis, MO): BAC D7-90

De Gibco BRL (Rockville, Maryland): suero fetal de bovino, tripsina, EDTA, medio mínimo esencial modificado (DMEM), L-glutamina, antimicóticos y antibióticos.

De Invitrogen (Carlsbad, California): triptona, agarosa, kit Concert, Kit TOPO TA cloning y ligasa T4.

De J.T. Baker (Xalostoc, México): cloruro de calcio, HEPES, metanol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, hidróxido de sodio, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio, ácido clorhídrico, ácido bórico, cloroformo, glicerol, isopropanol, acetato de sodio, tris-HCl y etanol.

De New England Biolabs (Beverly, MA): enzimas XhoI y HindIII.

De Promega (Madison, Wisconsin): SDS y el vector pCAT basic.

De Qiagen (Clifton, Hill): Kit QUIAquick.

De Sigma Chemical, Co. (St Louis, MO):  $\beta$ -mercaptoetanol, DMSO, bromuro de etidio y trizma base.

De Stratagene (Cedar Creek, TX): Kit de mutagénesis dirigida.

## 6.2. Amplificación del promotor del CYP3A4

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se amplificó el promotor (-1,200 pb) del gen del CYP3A4. Se utilizó como DNA molde el contenido en la clona BAC (Bacterial Artificial Chromosome) D7-90 previamente caracterizada y que contiene la región promotora y los 13 exónes del gen CYP3A4 (Sata *et al*; 2000). Debido a que los sitios de restricción para la inserción de DNA en el vector reportero, entre otros, se encuentran los sitios reconocidos por XhoI y HindIII, los oligonucleótidos que se diseñaron fueron flanqueados por dichas secuencias de reconocimiento. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las siguientes: 3A4F1-XHO 5´-CTCCTCGAGCTGGCTATCTGGGCAGCTGTTCTTCTCT-3´ (sentido) y 3A4R1-HIND 5´-CTCAAGCTTCTCTCCTCTGAGTCTTCCTTTCAGCTCT-3´ (antisentido). Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

TEMPERATURA	TIEMPO	N°. CICLOS
95°C	5 MINUTOS	1
95°C	1 MINUTO	33
55°C	1 MINUTO	
72°C	1.5 MINUTOS	
72°C	6 MINUTOS	1
4°C	Hasta su utilización	

### **6.3. Integridad del DNA**

Una vez terminada la amplificación, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% disuelta por calentamiento en amortiguador estéril 1X TBE (Tris - base 0.05M, ácido bórico 0.05 M y EDTA 0.5 M). Una vez disuelta, se agregaron 2  $\mu$ l de bromuro de etidio (10  $\mu$ g/ml). Se cargaron 5  $\mu$ l de muestra por pozo y se corrió la electroforesis dentro de una cámara horizontal durante 30 min a 100 volts. El DNA se visualizó mediante el uso de luz UV en un transiluminador.

### **6.4. Clonación del fragmento**

Se procedió a clonar el fragmento -1200 pb obtenido en la reacción de PCR, con el kit TOPO TA Cloning. Se mezclaron 4  $\mu$ l del producto de PCR, 1  $\mu$ l de la solución SALT (NaCl 1.2 M y MgCl<sub>2</sub> 0.06 M) y 1  $\mu$ l de vector TOPO. Se mezcló y se dejó incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la transformación.

### **6.5. Transformación celular**

La transformación se realizó según el protocolo del kit TOPO TA Cloning. Se tomaron 2  $\mu$ l de la mezcla de clonación los cuales se depositaron en un vial de células competentes TOP10F<sup>'</sup> de *Escherichia coli* y se mezcló suavemente. Se enfrió en hielo durante 30 minutos, posteriormente se sometió a choque térmico a 42°C durante 45 segundos y en hielo durante 2 minutos. Se le adicionaron 250  $\mu$ l de medio SOC estéril (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl

2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM y glucosa 20 mM) y se incubó en agitación a 200 rpm a 37°C durante 1 h. Se tomaron 50 µl del cultivo y se espatuló en una caja petri con agar bacteriológico estéril (triptona 1%, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1% y agar bacteriológico 1.5%) suplementada con ampicilina 100 µg/ml, solución X-Gal 40 mg/ml y solución IPTG 100 mM (la ampicilina se le agregó cuando el agar bacteriológico se encontraba a ~55°C, posteriormente se depositaron en cada caja 40 ml y se dejó solidificar. Las soluciones X-Gal e IPTG se adicionaron a la caja con agar solidificado 30 minutos antes de espatular). La caja se dejó incubando durante 16 horas a 37°C.

#### **6.6. Análisis de clonas positivas**

Para el análisis de las clonas se procedió a cultivar 5 colonias blancas, depositándolas en un tubo de polipropileno de 15 ml el cual contenía 4.5 ml de medio Luria-Bertani (LB) estéril (triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Se incubó a 200 rpm durante 16 horas a 37°C.

#### **6.7. Obtención de DNA plasmídico por lisis alcalina (minipreps)**

Se siguió el protocolo propuesto por Zhou y col. (1990) el cual es una modificación al procedimiento de lisis alcalina descrita por Sambrook (1989).

Se centrifugaron 1.5 ml de cada cultivo celular durante 10 segundos a 13,000 rpm. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con el

sobrenadante restante. Se adicionaron 300  $\mu\text{l}$  de buffer TENS (NaOH 0.1 N y SDS 0.5 % disueltos en buffer TE), se mezcló con vórtex, se adicionaron 150  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y nuevamente se agitó con vórtex. La suspensión obtenida se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm. El sobrenadante fue transferido a microtubos que contenían 900  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto (previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) y se enfrió durante 20 minutos en hielo seco (el enfriamiento en hielo seco fue una modificación que nosotros realizamos para eficientar el aislamiento del DNA). Transcurrido este tiempo se descongeló y se centrifugó 2 min a 13,000 rpm. Las pastillas obtenidas fueron lavadas dos veces con etanol al 70 %. Se dejaron secar las muestras y finalmente cada pastilla fue resuspendida en 30  $\mu\text{l}$  de buffer TE. Posteriormente se evaluó la integridad del DNA obtenido por minipreps por medio de electroforesis en gel de agarosa.

### **6.8. Digestión del DNA**

Para verificar que las clonas aisladas contenían el fragmento de DNA esperado, se realizó una digestión del DNA con enzimas de restricción.

En un microtubo de 1.5 ml se mezclaron 3  $\mu\text{l}$  XhoI, 3  $\mu\text{l}$  HindIII, 0.4  $\mu\text{l}$  de albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés), 4  $\mu\text{l}$  Buffer II, 24.6  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O y 5  $\mu\text{l}$  de DNA. Se dejó incubando durante 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

## **6.9. Verificación de los tamaños del DNA**

Para verificar que los tamaños de los fragmentos del DNA correspondieran a los esperados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% como anteriormente se describió.

## **6.10. Obtención del DNA plasmídico ultrapuro (midipreps)**

Se seleccionaron los tubos que contenía las clonas positivas y se crecieron en 100 ml de LB con 100 µg/ml ampicilina durante 16 horas a 37°C a 225 rpm. De estos cultivos se separaron alícuotas de 500 µl y se mezclaron con 500 µl de glicerol estéril al 80% en viales de 1 ml los cuales fueron congelados a -70°C. El resto del cultivo fue utilizado para la obtención de DNA plasmídico ultrapuro (midipreps) con el KIT Concert. Brevemente, se agregaron 10 ml de buffer E4 a cada columna (para equilibrarlas) permitiendo que este descendiera por gravedad. Los cultivos celulares fueron centrifugados en tubos de 50 ml a 3,000 rpm durante 10 min. Se resuspendió la pastilla obtenida en 4 ml de buffer de suspensión celular que contenía RNAasa (buffer E1). Posteriormente se agregaron 4 ml de solución de lisis celular (buffer E2) y se mezcló 5 veces por inversión. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min, transcurrido este tiempo se agregaron 4 ml de buffer de neutralización (E3) y se mezcló inmediatamente 5 veces por inversión. Se centrifugó a 10,000 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos y el sobrenadante fue depositado en la columna, permitiendo que el líquido descendiera por gravedad. La columna se lavó dos veces con el buffer de lavado

(E5). La columna fue depositada sobre un tubo limpio y se le adicionaron 5 ml de buffer de elución (E6), permitiendo que descendiera por gravedad. Al eluído se le adicionaron 3.5 ml de isopropanol y se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C. La pastilla obtenida fue lavada con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. Finalmente se lavó, se centrifugó dos veces más y se dejó secar la pastilla por 15 min. El DNA fue disuelto en buffer TE y se conservó a - 20°C.

### **6.11. Construcción del vector reportero**

Para la construcción de un vector reportero que contuviera a la región -1200 pb del promotor del CYP3A4, se utilizó el vector reporte pCAT3 basic (Promega). Tanto el vector pCAT3 basic como el plásmido que contenía la región -1200 pb del promotor del CYP3A4, fueron digeridos con XhoI y HindIII. Los productos de digestión se corrieron en una electroforesis y se purificaron del gel tanto el vector pCAT3 basic linearizado como el fragmento -1200 pb, con el KIT QUIAquick. Las bandas deseadas se cortaron del gel con una navaja. Cada fragmento del gel se depositó en un microtubo de 1.5 ml pesado previamente. Se obtuvieron los pesos de los fragmentos de agarosa que contenían cada banda y se le adicionaron 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel. Se incubó a 50°C por 10 minutos agitando con vórtex cada 2 minutos hasta que el gel se disolvió completamente. A cada tubo se le adicionó un volumen de isopropanol por volumen de gel y se mezcló suavemente. Se colocó la columna en el tubo colector

y se adicionó la mezcla anterior. Se centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto y el sobrenadante fue desechado. Posteriormente se adicionaron 750  $\mu$ l de buffer PE a cada columna y se les dejó incubando durante 5 min. Transcurrido este tiempo se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante un min y se desechó el sobrenadante. Se volvió a centrifugar con las condiciones anteriormente descritas. La columna fue colocada sobre un microtubo limpio y se agregó en el centro de cada una 30  $\mu$ l de buffer EB dejando reposar un min. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto y se recuperó el eluído, el cual contenía los fragmentos de DNA purificados.

La integridad del DNA purificado se evaluó por electroforesis ángel de agarosa al 1%.

La concentración de pCATbasic y -1200 pb se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

La ligación del fragmento -1200 pb con el vector pCATbasic se llevó a cabo en un microtubo estéril donde se mezclaron 4  $\mu$ l de buffer de reacción ligasa 5X, 30 fmol de vector, 90 fmol de inserto, 1 $\mu$ l de ligasa T4 y agua inyectable para un volumen final de 20  $\mu$ l. Se mezcló de forma suave y se centrifugó brevemente. Se dejó incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. De este producto de la ligación (pCAT-3A4\*1A) se utilizaron 2  $\mu$ l para realizar transformación de células

competentes. La obtención, concentración y verificación de la integridad del vector reportero pCAT-3A4\*1A se llevó a cabo como se indica anteriormente.

### 6.12. Secuenciación del vector pCAT-3A4\*1A

Para verificar que el vector pCAT-3A4\*1A contenía la región -1200 pb sin alteraciones, se secuenció. Debido a que el tamaño del gen es muy grande y que el marco de lectura fiel que nos proporciona el secuenciador automático es de ~800 pb, se utilizaron 4 oligonucleótidos para diferentes que nos dieron la secuencia completa del gen del CYP3A4. Por lo tanto se realizaron 4 reacciones en el termociclador utilizando para cada reacción un oligonucleótido diferente, localizados en diferentes regiones del fragmento, siendo estos: sentido 3A4F1-XHO 5´-CTCCTCGAGCTGGCTATCTGGGCAGCTGTTCTCTTCTCT-3´, sentido 3A4/3B 5´-CTCTGTCTGTCTGGGTTTGG-3´, antisentido 3A4/2B 5´-CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTC-3´ y antisentido 3A4R1-HIND 5´-CTCAAGCTTCTCTCTCCTCTGAGTCTTCCTTTCAGCTCT-3´. La mezcla de reacción contenía 500 ng de molde, 20 pico moles de oligonucleótido, 8 µl de Big Dye, aforada a un volumen final de 20 µl con agua inyectable. La mezcla de reacción se mezcló bien y se centrifugó brevemente. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes:

TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
96°C	30 segundos	25
50°C	15 segundos	
60°C	4 minutos	

Una vez que terminó la reacción en el termociclador, se guardó a 4°C hasta su purificación en las columnas Centrisep. Para ello, se agregaron 800 µl de agua inyectable a las columnas, se mezcló bien y se dejó reposar por 2 h. Transcurrido este tiempo se permitió que el agua saliera de la columna (de 200 a 300 µl) y se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 min. El producto obtenido en la reacción en el termociclador fue centrifugado brevemente y se adicionó en el centro de la columna. Se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min y se concentró en una centrifuga de vacío (Speed back) por 30 min. Los tubos fueron conservados a -20°C hasta su análisis por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM 310.

Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia del promotor del CYP3A4 publicada en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list\\_uids=219569&dopt=GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=219569&dopt=GenBank).

### **6.13. Mutagénesis dirigida**

Para obtener la variante alélica CYP3A4\*1B se realizó un ensayo de mutagénesis dirigida con el kit de mutagénesis sitio dirigida de Stratagene. Se utilizaron 2 oligonucleótidos que contenían la mutación: P3A4F/MD sentido cuya secuencia es 5´ - GAGACAAGGGCAAGGGAGAGGCGATTT-AATAG -3´ y el antisentido P3A4R/MD 5´ - CTATTAAATCGCCTCTCCCTTGCCCTTG-TCTC. El cambio de base se muestra en

negrita y subrayado. Se utilizó como molde al plásmido p3A4. Las condiciones de la reacción se muestran a continuación:

La mezcla de reacción contenía:

Buffer 10X	5.0 $\mu$ l
Oligonucleótido R	125 ng
Oligonucleótido F	125 ng
dNTP	1.0 $\mu$ l
DNA	10 ng
DNA polimerasa Pfu Turbo	1.0 $\mu$ l
Agua Inyectable	Volumen final 50 $\mu$ l

La reacción se catalizó en el termociclador siguiendo los parámetros establecidos en el kit:

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
95°C	30 segundos	1
95°C	30 segundos	12
55°C	60 segundos	
68°C	10 minutos	
4°C	5 minutos	1

Una vez que terminada la reacción en el termociclador, se procedió a realizar la digestión del molde, para lo cual se le adicionó 1 $\mu$ l de la enzima de restricción DpnI directamente a los tubos de reacción. Se mezcló suavemente, se centrifugó un min a 13,000 rpm y se dejó incubando una hora a 37°C.

El producto se transformó en células competentes, se purificó, se verificó la calidad y se insertó en el vector reportero pCAT basic para así obtener el vector reportero pCAT-3A4\*1B.

Se secuenció el vector pCAT-3A4\*1B para verificar que contenía la región -1200 pb sin alteraciones con el cambio nucleotídico A—G.

## **6.14. Transfección en células Hepa I**

### **6.14.1. Cultivos celulares**

Para realizar la transfección se utilizaron cultivos de una línea celular transformada derivada de hepatocarcinoma de ratón denominada Hepa I. Las células Hepa I se incubaron en Medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) estéril suplementado (1% L-glutamina, 1% antibióticos y antimicóticos [10, 000 unidades/ml de penicilina G sódica, 1000 µg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina] y 10% suero fetal bovino inactivado) y se mantuvieron en cajas de cultivo de 100 mm de diámetro a 37°C en una incubadora (Forma Scientific) con atmósfera de humedad al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Una vez que los cultivos alcanzaron confluencia, se eliminó el medio de cultivo y se incubaron a 37°C con 2 ml de Tripsina-EDTA (0.25%-1mM) por 5 min. Las cajas se sacudieron durante 15 segundos para despegar por completo las células, inmediatamente la suspensión celular se depositó en tubos de polipropileno de 15 ml y se centrifugaron a 1,000 rpm durante 3 min. La pastilla celular se resuspendió en medio de cultivo DMEM estéril suplementado para realizar resiembra o en medio de congelación (Dimetil Sulfóxido [DMSO] al 5% y medio DMEM suplementado al 95%) para su almacenamiento.

### 6.14.2. Transfección con fosfato de calcio

Cuatro horas antes de realizar la transfección se cambió el medio DMEM de cultivos celulares que se encontraban entre un 50-60% de confluencia. Las células se transfectaron con el vector de expresión  $\beta$ -galactosidasa (como control de la eficiencia de transfección) y los vectores reporteros pCAT-3A4\*1A o pCAT-3A4\*1B. Se transfectaron 12 cajas las cuales se dividieron en 4 grupos como a continuación se describen:

GRUPO	No. CAJAS	VECTOR	CONCENTRACIÓN
1	3	$\beta$ -galactosidasa	1 $\mu$ g
2	3	$\beta$ -galactosidasa	1 $\mu$ g
		pCAT	2 $\mu$ g
3	3	$\beta$ -galactosidasa	1 $\mu$ g
		PCAT-3A4*1A	2 $\mu$ g
4	3	$\beta$ -galactosidasa	1 $\mu$ g
		PCAT-3A4*1B	2 $\mu$ g

En microtubos estériles de 1.5 ml se depositaron las cantidades necesarias de los vectores correspondientes y en tubos de polipropileno estériles de 14 ml se depositaron 500  $\mu$ l de la solución HN2X estéril (HEPES a 50 mM, NaCl a 280 mM y fosfato de sodio dibásico a 175 mM. Se ajustó el pH a 7.09) con cuidado de no burbujear. A cada microtubo se le adicionaron 500  $\mu$ l de cloruro de calcio estéril al 0.5 M por goteo y se resuspendieron suavemente. El contenido de los microtubos se adicionó a los tubos de 14 ml por goteo mientras se burbujeaba la solución HN2X. Los tubos fueron agitados con vórtex y se dejó precipitar durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se homogeneizó el contenido de

los tubos con una pipeta. Las cajas fueron sacadas de la incubadora y se les agregó, por goteo, el contenido de los tubos correspondientes. Los cultivos se incubaron por 16 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, el medio fue cambiado y se dejaron incubando hasta completar 48 horas post-transfección.

#### **6.15. Obtención de extractos nucleares**

Una vez que transcurrieron 48 horas después de iniciada la transfección, el medio fue eliminado y las células se lavaron con 6 ml de PBS 1X pH 7.4 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM. El pH se ajustó con HCl) frío. El PBS fue desechado y las células se rasparon, se resuspendieron en 6 ml de PBS 1X frío y se transfirieron a tubos de polipropileno de 15 ml. Los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 1,500 rpm a 4°C, el sobrenadante fue desechado y la pastilla se resuspendió en 1 ml de buffer 1 (Tris 0.25 M pH 7.8) frío. Esta solución se transfirió a microtubos y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla fue resuspendida en 120 µl del buffer 1. Se tomaron alícuotas de 30 µl para el ensayo de β-galactosidasa y el resto del extracto se almacenó a -80°C para su posterior uso.

#### **6.16. Ensayo de β-galactosidasa**

Las alícuotas para el ensayo de la β-galactosidasa se incubaron en hielo seco durante 5 min. Posteriormente se transfirieron a un baño a 37°C por 5 min. El choque térmico se repitió 8 veces más. Una vez terminado dicho procedimiento, se

adicionó a cada tubo 30  $\mu\text{l}$  del buffer 2X  $\beta$ -gal estéril ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  120 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  80 mM y  $\text{MgCl}_2$  2 mM). Cuando la solución se encontraba fría se adicionaron 69  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol 14.4 M y 1.33 mg/ml o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranoside [OPNG]) y se mezcló bien. Se incubaron los tubos a 37°C durante 3 horas, al término de esto se midieron las absorbancias de los tubos a 420 nm en un lector de ELISA.

### **6.17. ENSAYO DE CAT**

Los extractos nucleares almacenados a -70°C se descongelaron a 37°C por 5 min y posteriormente se incubaron en hielo seco durante 5 min. Esta operación se repitió 8 veces más. Los microtubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C. Los tubos fueron incubados durante 10 min a 65°C, posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes fueron transferidos a microtubos limpios. A cada microtubo se le adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de Acetil CoA 8 mM y 0.4  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -Cloramfenicol y se incubaron a 37°C durante una h. Transcurrido este tiempo se le adicionaron a cada tubo 600  $\mu\text{l}$  de acetato de etilo, se agitaron con vórtex por 10 seg, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min y se transfirieron 500  $\mu\text{l}$  de la capa superior a microtubos nuevos. A los tubos que contenían la capa acuosa se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de acetato de etilo y se repitió la operación anterior. El contenido de los tubos se dejó evaporar.

### **6.17.1. Cromatografía en capa fina (TLC)**

En una placa de sílica de 20 X 20 cm se marcaron las distribuciones de las muestras a 2.5 cm de la base y 1.5 cm entre muestras. Los tubos evaporados se resuspendieron en 30  $\mu$ l de acetato de etilo y se agitaron con vórtex. Se centrifugaron brevemente y se depositó el contenido de cada tubo de 3  $\mu$ l en 3  $\mu$ l dejando secar entre cada aplicación. Se depositaron 100  $\mu$ l de la mezcla de solventes de corrida (95 % cloroformo y 5% metanol) en la cámara de cromatografía, dentro de la cámara se colocó un papel watmam de 20 X 20 cm y se dejó que la mezcla de solventes migrara en el papel durante 1 hora para saturar el ambiente. Transcurrido este tiempo se colocó la placa de TLC dentro de la cámara, se dejó migrar la mezcla de solventes hasta  $\frac{3}{4}$  partes de la placa. Una vez que alcanzó esta distancia, la placa se sacó de la cámara y se dejó secar a temperatura ambiente. Cuando la placa estuvo seca se cubrió con papel plástico, se colocó en un cassette que contenía una placa fotosensible y se dejó exponiendo toda la noche. La determinación de las formas acetiladas se hizo mediante el análisis de la placa fotosensible en el Typhon.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Clonación de la región promotora del CYP3A4

Para obtener la región -1,200 pb del promotor del CYP3A4, se realizó amplificación mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y utilizando como molde el BAC D7-90. Como se puede apreciar en la figura 6 se logró amplificar el fragmento de -1,200 pb del promotor del gen del CYP3A4.

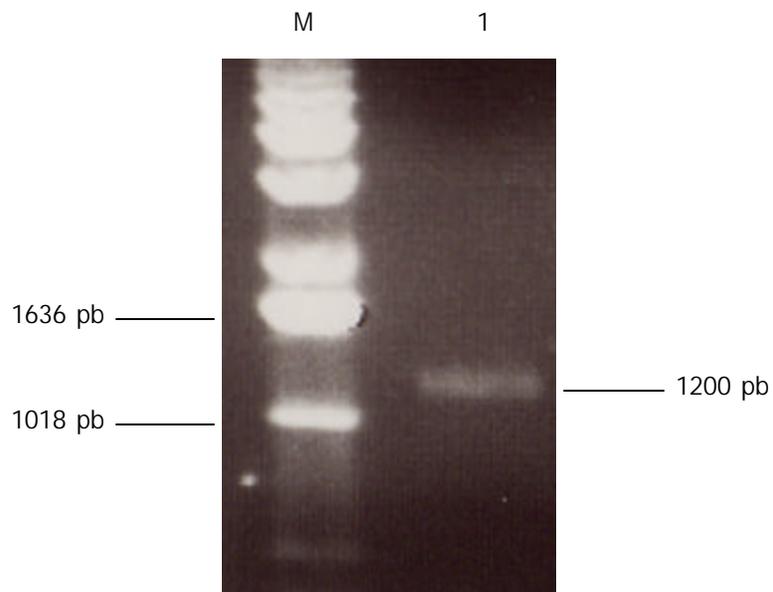


Figura 6. Amplificación del fragmento -1,200 pb del promotor del CYP3A4. Las condiciones de amplificación se describen en la Sección Materiales y Métodos. 1, fragmento amplificado. M, marcador de peso molecular. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts.

Una vez amplificado, el fragmento fue clonado en el vector pCRII TOPO, el cual se denominó p3A4\*1A. Posterior a la clonación, células DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el plásmido p3A4\*1A. Se seleccionaron 5 colonias las cuales se crecieron para obtener el DNA plasmídico (Figura 7). Como se puede observar las 5 muestras de DNA plasmídico se encontraban íntegras. También se aprecian diferentes conformaciones del plásmido correspondientes a las 3 bandas indicadas por las flechas.

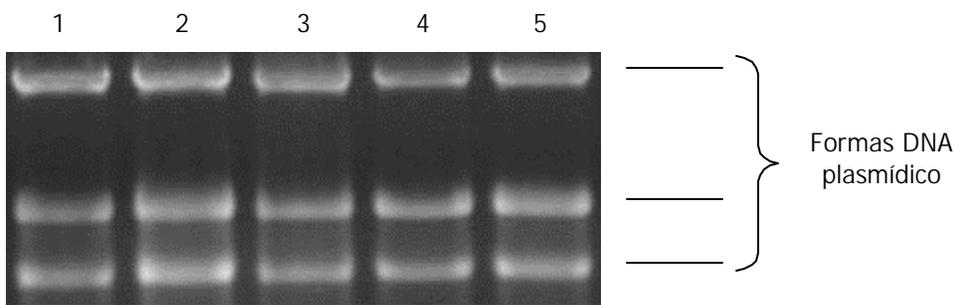


Figura 7. Aislamiento del DNA plasmídico p3A4\*1A (miniprep). 5 diferentes muestras del plásmido p3A4 (carril 1-5) se aislaron y corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts.

Para determinar si estos plásmidos contenían al fragmento -1,200 del promotor del gen CYP3A4 fueron digeridas con las enzimas de restricción XhoI y HindIII. En la figura 8 se puede observar que la digestión enzimática liberó al fragmento esperado en 3 de las 4 muestras. Por otro lado se puede apreciar una banda de alrededor de 4,000 pb correspondiente la plásmido pCRII TOPO linearizado.

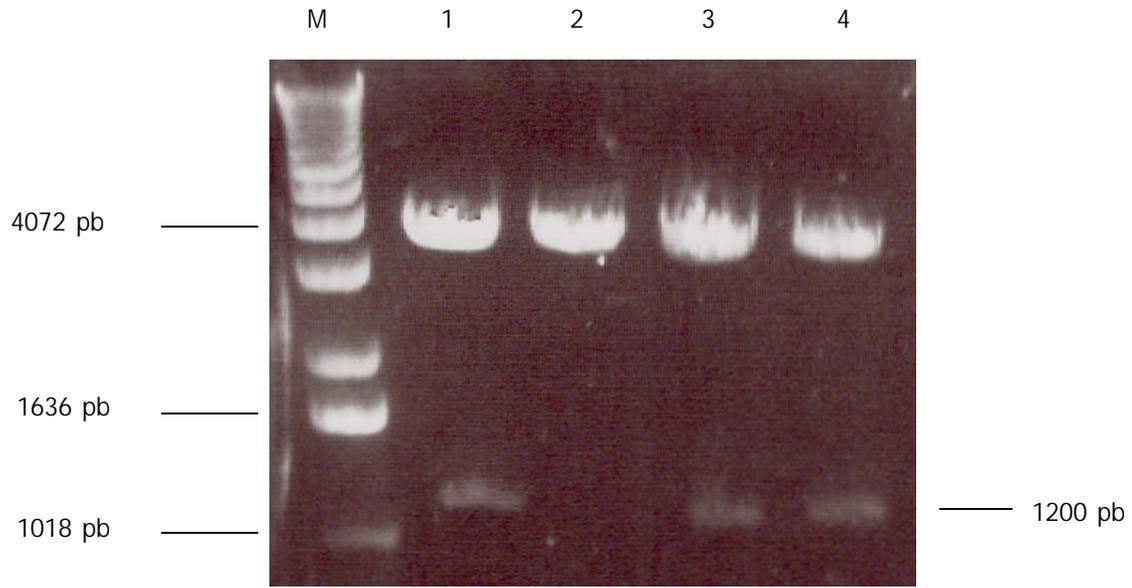


Figura 8. Digestión del DNA plasmídico p3A4\*1A. DNA plasmídico p3A4 de 4 diferentes muestras (carril 1-4) se digirieron con XhoI y HindIII y se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts. M, marcador de peso molecular.

Para la obtención del DNA plasmídico ultrapuro (midiprep), se seleccionó la colonia crecida que dio como resultado la muestra del carril 4 (Figura 8). En la figura 9 se muestra, a través de electroforesis en agarosa, el plásmido p3A4\*1A ultrapuro. El tamaño del plásmido obtenido corresponde al esperado, ya que se obtuvo una banda de ~ 5.2 Kb, la cual corresponde a la suma del plásmido pCRII TOPO (4,000 pb) y el fragmento de 1,200 pb del promotor del CYP3A4.

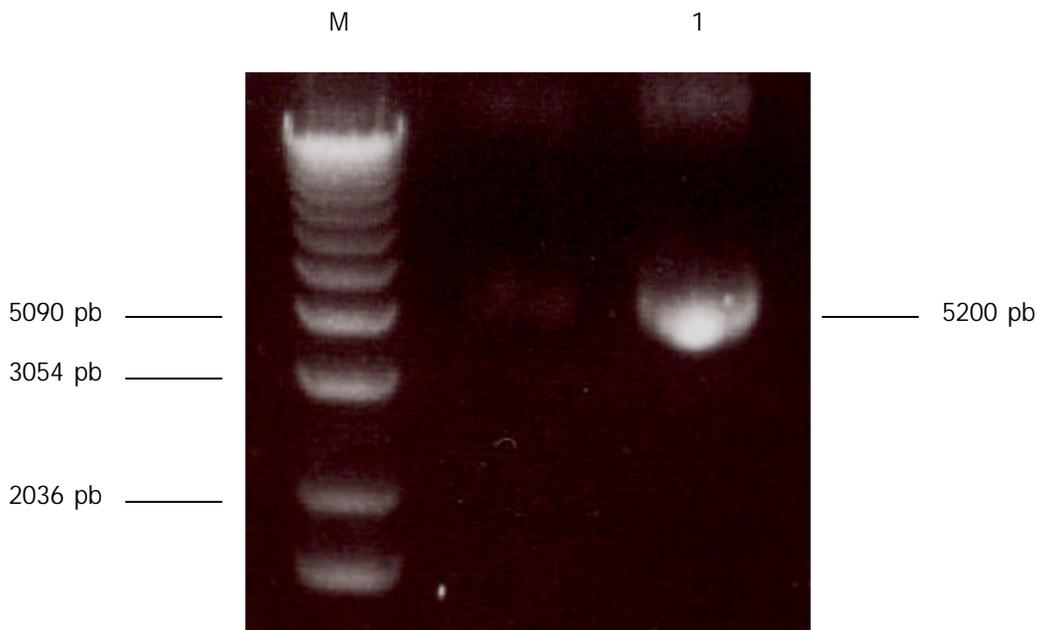


Figura 9. Obtención del plásmido p3A4\*1A ultrapuro. Mediante el uso de midipreps se obtuvo el plásmido p3A4 (carril 1). La muestra se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts. M, marcador de peso molecular.

Para verificar que el plásmido contenía a la región -1,200 del promotor del gen CYP3A4 y que ésta no presentara alguna alteración en la lectura nucleotídica, se realizó una secuenciación del plásmido p3A4\*1A. No se observaron cambios en la secuencia nucleotídica del promotor. En la figura 10 se muestra sólo la región donde se localiza el NFSE. Se puede observar que la secuencia corresponde al alelo silvestre ya que el nucleótido presente en la posición -290 es una adenina (señalada por una flecha). Estos datos indican que en el plásmido p3A4\*1A se encuentra clonada la región -1,200 pb del promotor del gen CYP3A4 sin alteraciones.

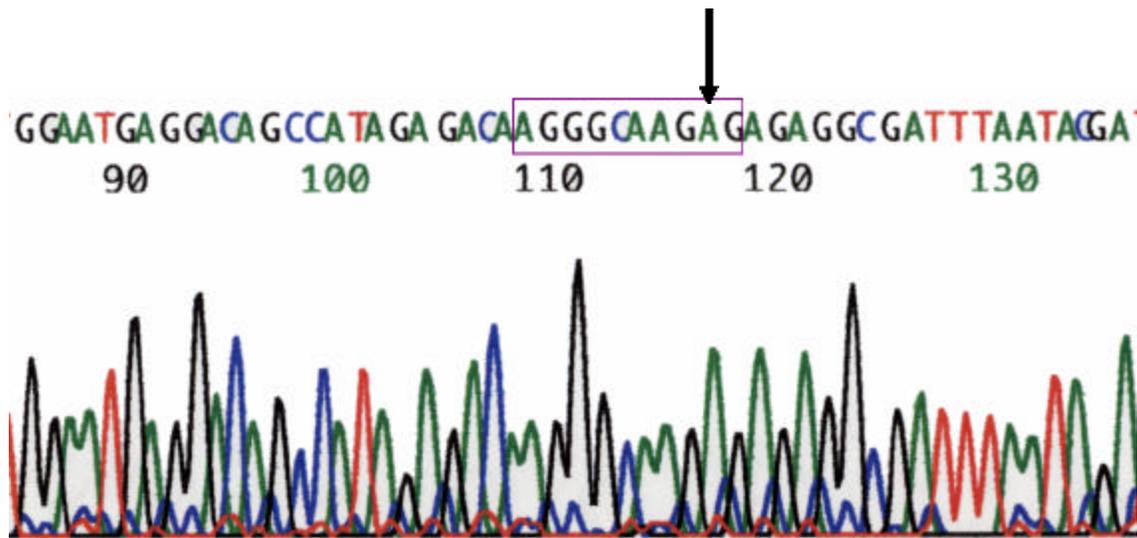


Figura 10. Secuenciación del plásmido p3A4\*1A. El plásmido p3A4\*1A se secuenció como se describe en la Sección de Materiales y Métodos. El nucleótido en la posición -290 está señalado por una flecha. La región NFSE se encuentra indicada en el recuadro.

## 7.2. Construcción del vector reportero pCAT-3A4\*1A

Una vez que se obtuvo y purificó el plásmido p3A4\*1A, se procedió con la construcción de un vector reportero que contuviera la región promotora silvestre del gen CYP3A4 (pCAT3A4\*1A). Para ello se liberó del vector pCRII TOPO a la región -1,200 pb del promotor del CYP3A4, así como la linearización del vector reportero pCAT basic. Ambas acciones se llevaron a cabo mediante la digestión con XhoI y HindIII. Posterior a la digestión se purificaron ambos fragmentos (la región -1,200 pb y el vector pCAT basic linearizado) como se describe en la Sección de Materiales y Métodos. En la figura 11 se muestra un gel con dichos fragmentos purificados.

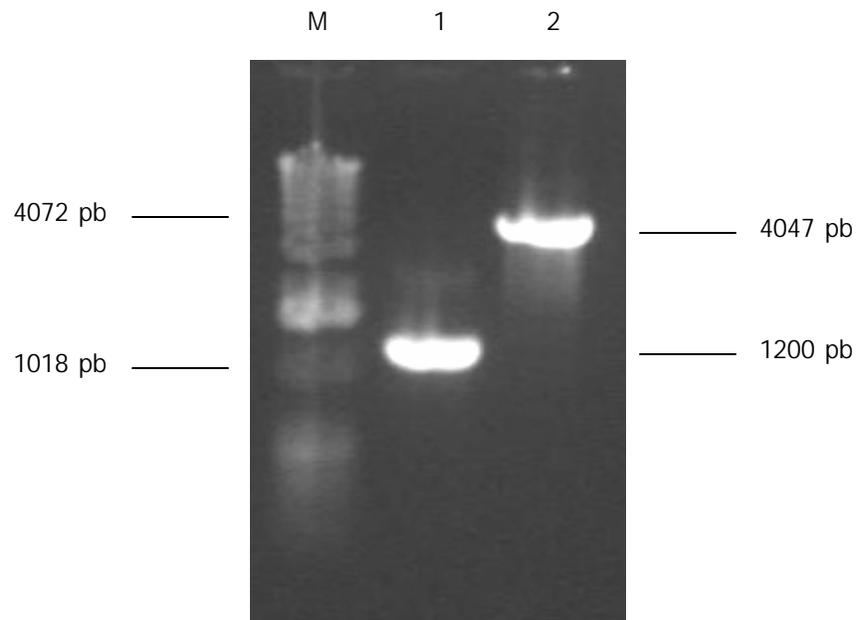


Figura 11. Purificación del vector pCAT basic y la región promotora -1,200 pb del gen CYP3A4. Carril 1, fragmento -1,200 pb; carril 2, vector pCAT basic linearizado; M, marcador de peso molecular. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts.

Una vez purificada la región -1,200 pb del promotor del CYP3A4, así como la el vector reportero pCAT basic linearizado, se ligaron y transformaron en células DH5 $\alpha$  como se indica en la Sección de Materiales y Métodos.

Ulteriormente se realizó el aislamiento del vector reportero pCAT-3A4\*1A (Figura 12 A). Como se puede observar el tamaño del vector fue de ~ 5,200 pb, correspondiente a la suma del vector pCAT basic (4,047 pb) y el fragmento de -1,200 pb. También se verificó por digestión que el vector pCAT-3A4\*1A incluía al fragmento -1,200 pb (Figura 12 B).

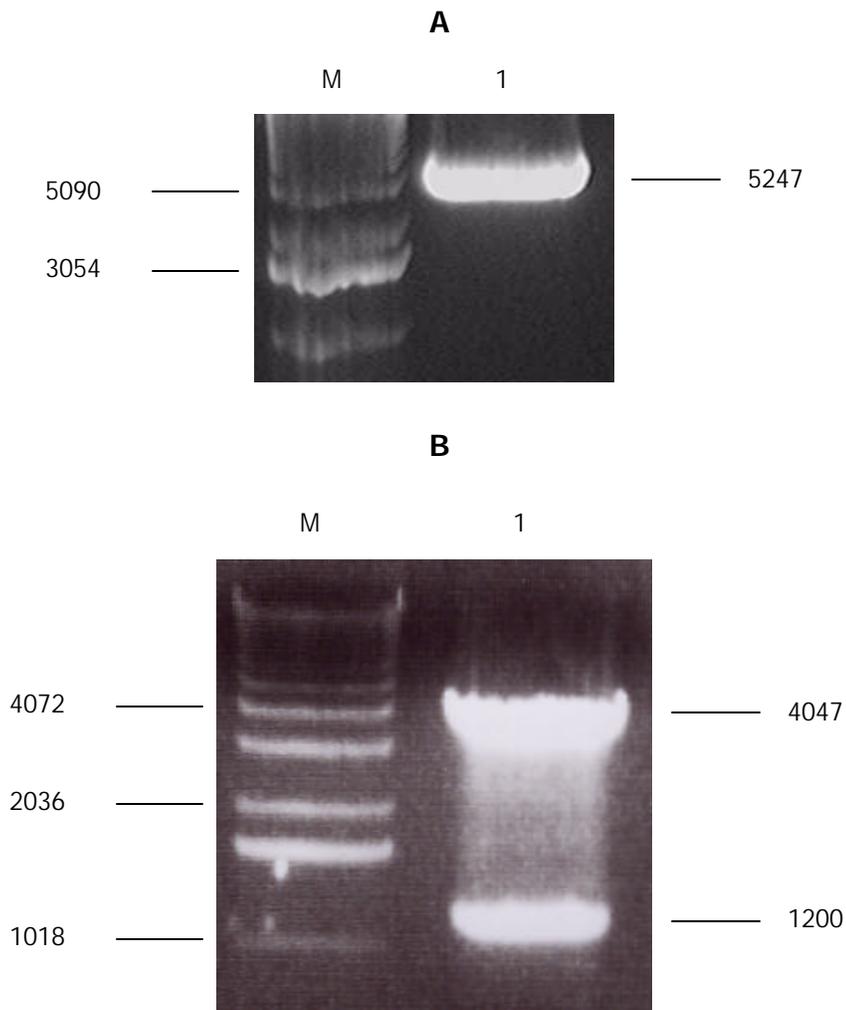


Figura 12. A) Purificación del vector pCAT-3A4\*1A. Carril 1, vector pCAT-3A4\*1A. B) Digestión del vector pCAT-3A4\*1A con XhoI y HindIII (carril 1). M, marcador de peso molecular. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts.

### 7.3. Construcción del vector reportero pCAT-3A4\*1B

Para obtener al vector reportero con el promotor del alelo CYP3A4\*1B se realizó una mutagénesis dirigida. Para ello se utilizó el plásmido p3A4\*1A, oligonucleótidos específicos con la mutación deseada y un kit de mutagénesis. El plásmido con la mutación correspondiente al alelo CYP3A4\*1B (p3A4\*1B) se transformó en células competentes DH5 $\alpha$ , y se ultrapurificó como se indicó previamente.

Para verificar que el plásmido p3A4\*1B contuviera la región -1,200 pb, se digirió con las enzimas de restricción XhoI y HindIII. Como se puede observar en la figura 13, todos los plásmidos purificados provenientes de las colonias analizadas dieron lugar a fragmentos de 1,200 y 4,000 pb, correspondientes al promotor del CYP3A4 y al plásmido pCRII TOPO, respectivamente.

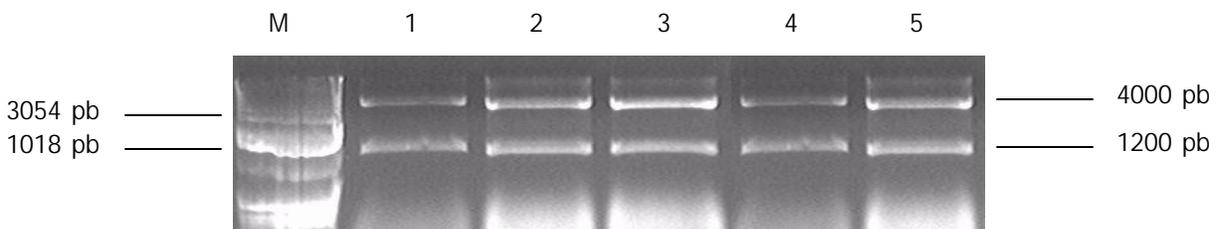


Figura 13. Digestión del DNA plasmídico p3A4\*1B ultrapuro. El DNA plasmídico p3A4\*1B de 5 diferentes muestras (carril 1-5) se digirieron con XhoI y HindIII y se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts. M, marcador de peso molecular.

Para verificar si el plásmido contenía a la región -1,200 del promotor del gen CYP3A4 y que ésta presentaba el cambio nucleotídico adenina—guanina (-290 pb) se realizó una secuenciación del plásmido p3A4\*1B. Se encontró que presentaba la guanina en la posición -290 pb sin presentar ninguna otra alteración en el resto de la secuencia nucleotídica. En la figura 14 se muestra sólo la secuencia donde se localiza la región NFSE. Se puede observar que la secuencia corresponde al alelo CYP3A4\*1B ya que el nucleótido presente en la posición -290 es una guanina (señalada por una flecha). Estos datos indican que en el plásmido p3A4\*1B se encuentra clonada la región -1,200 pb del promotor del gen CYP3A4 con la alteración esperada.

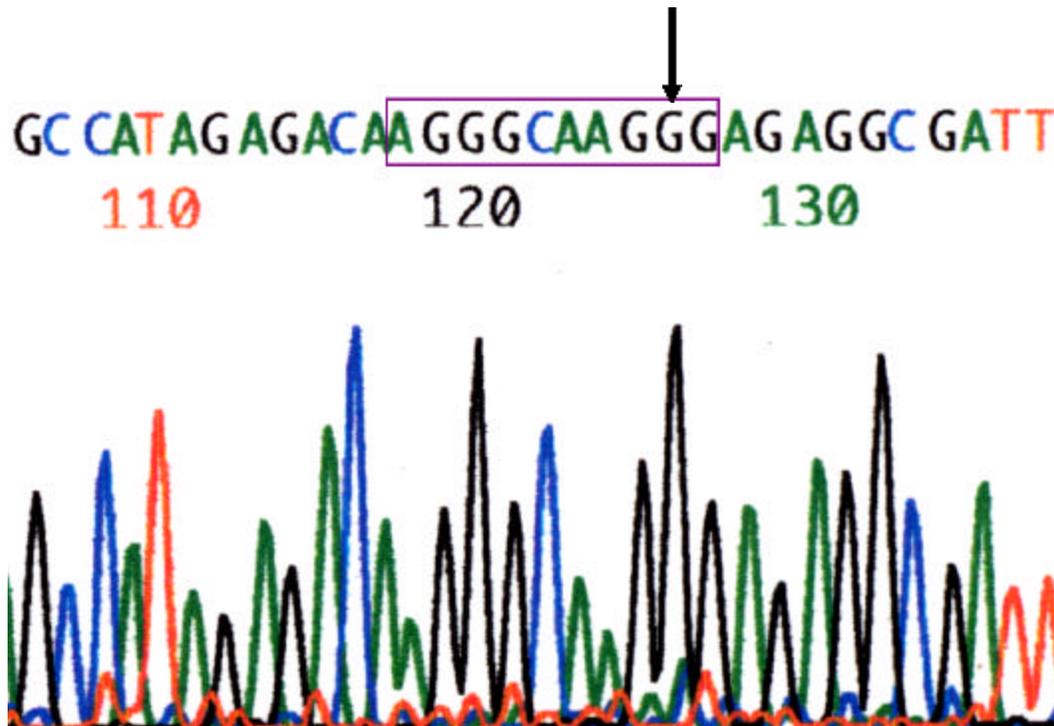


Figura 14. Secuenciación del plásmido p3A4\*1B. El plásmido p3A4\*1B se secuenció como se describe en la Sección de Materiales y Métodos. El nucleótido en la posición -290 está señalado por una flecha. La región NFSE se encuentra indicada en el recuadro.

Una vez que se obtuvo y purificó el plásmido p3A4\*1B, se procedió con la construcción de un vector reportero que contuviera la región promotora mutada del gen CYP3A4 (pCAT3A4\*1B). Para esto se procedió a liberar del plásmido p3A4\*1B a la región -1,200 pb, así como la linearización del vector reportero pCAT basic. Ambas acciones se llevaron a cabo mediante la digestión con las enzimas de restricción XhoI y HindIII. Posterior a la digestión se purificaron ambos fragmentos (la región -1,200 pb y el vector pCAT basic linearizado) como se describió anteriormente. En la figura 15 se muestra un gel con dichos fragmentos purificados.

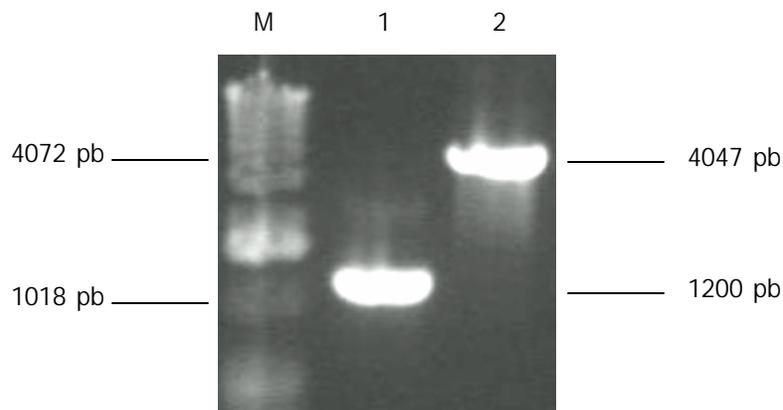


Figura 15. Purificación del vector pCAT basic y la región promotora -1,200 pb del gen CYP3A4\*1B. Carril 1, fragmento -1,200 pb; carril 2, vector pCAT basic linearizado; M, marcador de peso molecular. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 Volts.

Una vez realizada la ligazón del vector reportero pCAT basic con la región -1,200 se transformó y ultrapurificó el vector reportero pCAT-3A4\*1B y se comprobó que este efectivamente contenía la región -1,200 pb, para ello se digirió con XhoI y

HindIII como se describió anteriormente. En la figura 16 se puede apreciar que la digestión dio lugar a una banda de 4,047 y 1,200 pb, correspondientes al vector pCAT basic y al promotor del CYP3A4, respectivamente.

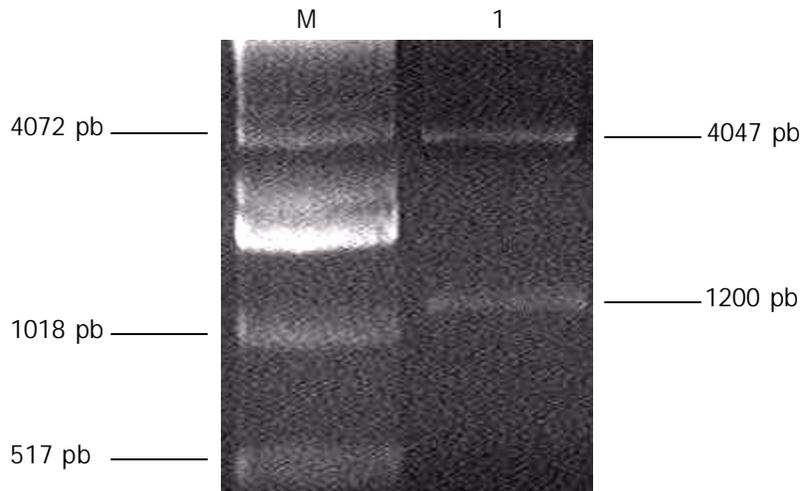


Figura 16. Digestión pCAT-3A4\*1B. El vector pCAT-3A4\*1B se digirió con XhoI y HindIII (carril 1). M, marcador de peso molecular. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts.

#### **7.4 Actividad del promotor, variantes \*1A y \*1B, del CYP3A4**

Las células fueron transfectadas, por el método de Fosfato de Calcio (ver Sección de Materiales y Métodos) con los vectores reporteros pCATbasic, pCAT-3A4\*1A y pCAT-3A4\*1B. Sin embargo, debido a que no es posible controlar y homogenizar la eficiencia de transfección, los datos que se obtuvieron de las actividades CAT fueron corregidos con la actividad reportera de otro vector. Para ello las células se

co-transfectaron con un vector de expresión para la  $\beta$ -galactosidasa. La actividad enzimática resultante de los vectores CAT se corrigió al dividir estas con los valores correspondientes de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. En la tabla 3 y figura 17 se muestran los resultados de dichos experimentos. Como se puede apreciar la variante CYP3A4\*1B disminuye la actividad del promotor en un 45% cuando se compara con la variante silvestre.

Tabla 3. Actividad Relativa de CAT normalizada con  $\beta$ -galactosidasa. Control, pCAT basic. \*p=0.02 comparado con pCAT-3A4\*1A. N=4.

GRUPO	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR
pCAT basic	242.2175	± 27.3397
pCAT-3A4*1A	287.61	± 34.8279
pCAT-3A4*1B	157.6825*	± 15.5550

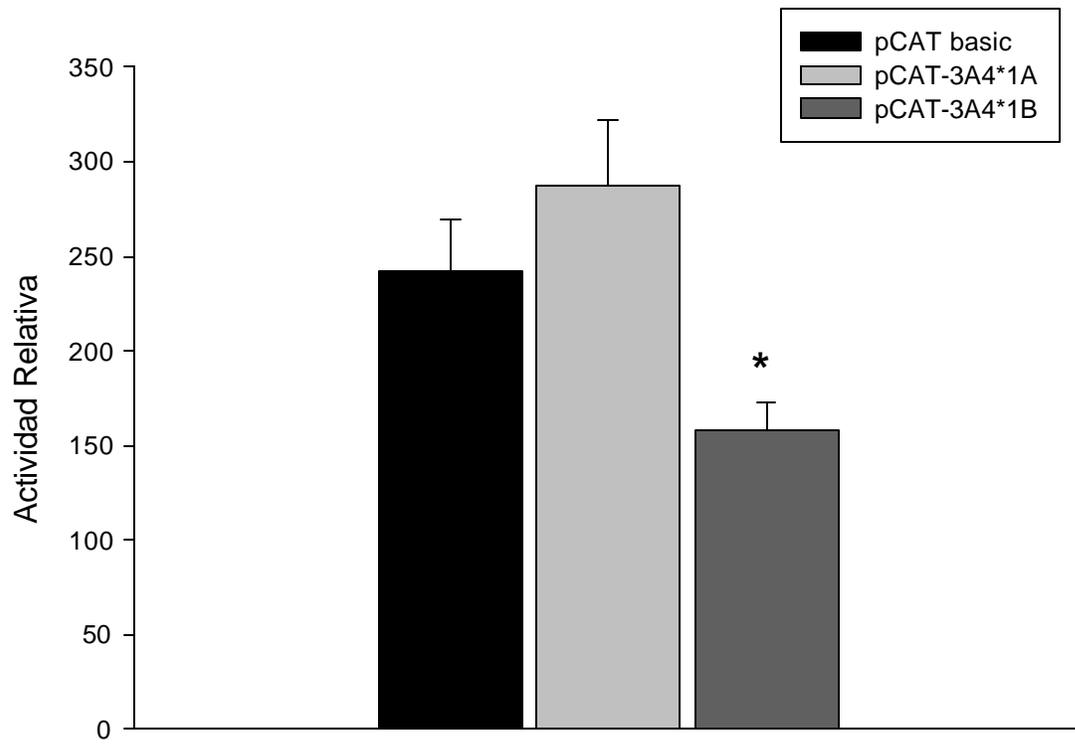


Figura 17. Actividad relativa de CAT normalizada con  $\beta$ -galactosidasa. \* $p=0.02$ , comparado con la variante silvestre (pCAT-3A4\*1A). N=4.

## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio, encontramos una disminución de la actividad del vector reportero pCAT-3A4\*1B cercana al 50% en comparación con el vector reportero que expresaba la variante silvestre. La actividad del vector reportero CAT refleja la actividad del promotor del CYP3A4. Esto nos sugiere que los portadores del alelo CYP3A4\*1B expresan una menor cantidad de CYP3A4. Este hallazgo es importante ya que la etiología del cáncer de próstata es poco entendida. Entre los factores causales de esta patología encontramos a los hormonales, como la asociación observada entre incremento de la concentración de testosterona en el organismo y el cáncer de próstata. La testosterona (sustrato endógeno del CYP3A4) se une al receptor intracelular de andrógenos, sin embargo si la testosterona no es hidroxilada puede ser transformada a DHT (reacción catalizada por la 5 $\alpha$ -reductasa) la cual también es ligando del receptor de andrógenos (Figura 5). Ambos complejos se unen al DNA iniciando la transcripción de varios genes que inducen la proliferación de células prostáticas. Un incremento en la formación de DHT puede deberse a la presencia de la variante alélica CYP3A4\*1B, ya que la testosterona es inactivada a través de la hidroxilación catalizada por el CYP3A4.

Rebbeck et al (1998) sugieren que la variante alélica CYP3A4\*1B influye en el desarrollo del cáncer de próstata ya que pacientes con cáncer de próstata

presentaron altos niveles de testosterona en combinación con una frecuencia alélica alta del CYP3A4\*1B.

La población afro - americana presenta una frecuencia cercana al 60% de esta variante alélica y tienen la mayor predisposición a desarrollar cáncer de próstata, en contraste con los caucásicos que portan este alelo con una frecuencia aproximada del 6% y los asiáticos cuya incidencia de cáncer de próstata es menor no presentaron la variante alélica CYP3A4\*1B (Tayeb *et al.*, 2000; Sata *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 1999; Paris *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1998).

Sin embargo, la relación de la variante alélica CYP3A4\*1B con una variación en la actividad del CYP3A4 no se ha reportado. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, y considerando los estudios epidemiológicos, proponemos que la presencia de la variante alélica CYP3A4\*1B podría ser un biomarcador de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de próstata.

En conclusión, en el presente trabajo se demostró, por primera vez, que la variante CYP3A4\*1B disminuye la transcripción del gen en un 50%.

Como perspectivas, consideramos importante determinar la presencia de este alelo en poblaciones con cáncer de próstata y buscar si existe una asociación con la

capacidad metabólica de dichos pacientes medida a través de la evaluación de la testosterona presente en la orina.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ball, S. E., Scatina, J., Kao, J., Ferron, G. M., Fruncillo, R., Mayer, P., Weinryb, I., Guida, M., Hopkins, P. J., Warner, N. y Hall, J. (1999). Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* **66**: 288-294.
2. Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* **56**: 335-344.
3. Boobis, A. R. (1992). Molecular basis for differences in susceptibility to toxicants. *Toxicol. Lett.* **64-65**: 109-113.
4. Calderón, A. E. R., Cespedes, Q. A. X., De la Hoz, F. C. V., Laguna, V. A. M. y Riaño, R. S. V. (2000). Citocromo P450. En: [http://www.ut.edu.co/fcsalud/asignaturas/trabajos\\_estudiantes/citocromop450/index.html](http://www.ut.edu.co/fcsalud/asignaturas/trabajos_estudiantes/citocromop450/index.html)
5. Chiu, R., Imagawa, M., Imbra, R.J., Bochoven, J. R. y Karin, M. (1987). Multiple cis-and trans-acting elements mediate the transcriptional response to phorbol esters. *Nature* **329**: 648-651.
6. Chodosh, L. A., Baldwin, A. S., Carthew, R. W. y Sharp, P. A. (1988). Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell* **53**: 11-24.
7. Dai, D., Tang, J., Rose, R., Hodgson, E., Bienstock, R. J., Mohrenweiser, H. W. y Goldstein, J. A. (2001). Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**: 825-381.

8. Daujat, M., Pichard, L., Fabre, I., Pineau, T., Fbre, G., Bonfils, C. y Maurel, P. (1991). Induction protocols for cytochromes P450I1A in vivo and in primary cultures of animal and human hepatocytes. *Methods Enzymol.* **260**: 345-353.
9. Elizondo, G. y Medina-Díaz, I.M. (2003). Induction of CYP3A4 by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxivitamin D<sub>3</sub> in Hep G2 cells. *Life Sciences.* **73**:141-149.
10. Geneser, Fin. (1988). Histología. Editorial Médica Panamericana. México D.F. pp 740.
11. Gonzalez, F.J. (1992). Human cytochromes P-450: Problems and prospects. *Tips Reviews.* **13**: 346-352.
12. Gonzalez, F.J. y Nebert, D.W. (1990). Evolution of the P450 gene superfamily: animal – plant warfare, molecular drive a human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* **6**: 182-186.
13. Gonzalez, F.J., Schmid, B.J., Umeno, M., McBride, O.W., Hardwick, J.P., Meyer, U.A., Gelboin, H.V. e Idle, J.R. (1988). Human P450PCN1: sequence, chromosome localization and direct evidence through cDNA expression that P450PCN1 is nifedipine oxidase. *DNA.* **7**: 79-86.
14. Grange, T., Roux, J., Rigaud, G. y Pictet, R. (1991). Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic Acids Res.* **19**: 131-139.

15. Hashimoto, H., Toide, K., Kitamura, R., Fuita, M., Tagawa, S., Itoh, S. y Kamataki, T. (1993). Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J Biochem.* **218**: 585-595.
16. Hsieh, K.P. , Lin, Y.Y. , Cheng, Ch.L., Lai, M.L., Lin, M.S. , Siest, J.P. y Huang, J.D. (2001). Novel Mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug. Metab. Dispos.* **29**: 268-273.
17. INEGI. (2002). Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2000. *Salud Pública Mex.* **44**: 266-282.
18. INEGI. (2002). Mortalidad en México 2001. *Salud Pública Mex.* **44**: 565-581.
19. Itoh, S., Yanagimoto, T., Tagawa, S., Hashimoto, H., Kitamura, R., Nakajima, Y., Okochi, T., Fujimoto, S., Uchino, J. y Kamataki, T. (1992). Genomic organization of human fetal specific P-450III A7 (cytochrome P-450HLFa)-related gene(s) and interaction of transcriptional regulatory factor with its DNA element in the 5´flanking region. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**: 133-138.
20. Jounaidi Y., Hyrailles V., Gervot L. y Maurel P. (1996). Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein? *Biochem Biophys Res Commun.* **221**:466-70.
21. Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. y Vagelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence specific DNA-binding protein. *Science* **252**: 1708-1711.

22. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T y Lehmann JM. (1998). An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*. **92**:73-82.
23. Kocarek, T.A., Schuetz, E.G., Strom, S.C., Fisher, R.A. y Guzelian, P.S. (1995). Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. **23**: 415-421.
24. Kolars, J.C., Lown, K.S., Schmiedllin-Ren, P., Ghosh, M. y Fang C. (1994). CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* **4**: 247-59.
25. Lazcano, P.E. (1997). Gen responsable del cáncer de próstata. *Salvia*, Revista del Instituto Nacional de Salud Pública. N° 8. Revista on line: <http://www.insp.mx/salvia/index.html>
26. Lewis, D. F. V. (1996). *Cytochromes P450*. Taylor & Francis. Great Britain. 348 pp.
27. Li, A.P., Kaminski, D.L. y Rasmussen, A. (1995). Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology*. **104**: 1-8.
28. Liddle, C., Goodwin, B.J., George, J., Tapner, M. y Farrel, G.C. (1998). Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **83**: 2411-2416.

29. Maurel, P. (1996). The CYP3A family. En: *Cytochromes P450. Metabolic and Toxicological Aspects*. Costas. I. CRC Press Inc. New York.
30. Mckinnon, R.A., Burgess, W.M., Hall, P de la M., Roberts-Thomson, S.J., Gonzalez, F.J. y McManus, M.E. (1995). Characterization of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut*. **36**: 259-67
31. Mohar, A., Frías-Mendivil, M., Suchil-Bernal, L., Mora-Macías, T. G. y de la Garza, J. (1997). Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública Mex*. **39**: 253-258.
32. Murray, M. y Reidy, G.F. (1990). Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P450 by chemical agents. *Parmacol. Rev*. **42**: 85-101.
33. Nebert, D.W. y Gonzalez. F.J. (1987). P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem*. **56**: 945-993.
34. Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. y Nebert, D. W. (1996). P450 Superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1-42.
35. Paris, P. L., Kupelian, P. A., Hall, J. M., Williams, T. L., Levin, H., Klein, E. A., Casey, G. y Witte J. S. (1999). Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. **8**: 901-905.

36. Rebbeck, T.R., Jaffe, J.M., Walker, A.H., Wein, A.J. y Malkowicz, S.B. (1998). Modification of clinical presentation of prostate tumours by a novel genetics variant in CYP3A4. *J. Natl. Cancer. Inst.* **90**: 1225-1230.
37. Salmerón-Castro, J., Franco-Marina, F., Salazar-Martínez, E. y Lazcano-Ponce, E. C. (1997). Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer en el Instituto Mexicano del Seguro Social: 1991-1995. *Salud Pública Mex.* **39**: 266-273.
38. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.
39. Sata, F., Sapone, A., Elizondo, G., Stocker, P., Miller, V., Zheng, W., Raunio, H., Crespi, C. y González, F.J. (2000). CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* **67**: 48-56.
40. Schuetz, E.G., Schuetz, J.D., Strom, S.C., Thompson, M.T., Fisher, R.A., Molowa, D.T., Li, D. y Guzelian, P.S. (1993). Regulation of human liver cytochrome P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes. *Hepatology.* **18**: 1254-1262.
41. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. y Guengerich, F. P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **270**: 414-423.

42. Sladek, F.M., Zhong, W., Lai, E. y Darnell, J.E. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* **4**: 2353-2365.
43. Sturm, R. A., Das, G. y Herr, W. (1988). The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes & Dev.* **2**: 1582-1599.
44. Tayeb, M. T., Clark, C., Ameyaw, M. M., Haites, N. E., Evans, D. A. P., Tariq, M., Mobarek, A., Ofori-Adjei, D. y McLeod, H. L. (2000). CYP3A4 promoter variant in Saudi, Ghanaian and Scottish Caucasian populations. *Pharmacogenetics.* **10**: 753-756.
45. Walker, A. H., Jaffe, J. M., Gunasegaram, S., Cummings, S. A., Huang, C. S., Chern, H. D., Olopade, O. I., Weber, B. L. y Rebbeck, T. R. (1998). Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. *Hum. Mutat.* **12**: 289-292.
46. Yamazaki, H. y Shimada, T. (1997). Progesterone and Testosterone Hydroxylation by Cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in Human Liver Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **346** : 161-169
47. Yamazaki, H., Shaw, P. M., Guengerich, F. P. y Shimada, T. (1998). Roles of Cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the Oxidation of Estradiol and Estrone in Human Liver Microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* **11**: 659-665.

48. Yanagida, A., Sogawa, K., Yasumoto, K. y Fujii-Kuriyama, Y. (1990). A novel cis-acting element required for a high level of inducible expression of the rat P-450c gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1470-1475.
49. Zhou, C., Yang, Y., y Jong, A.Y. (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques.* **8**:172-3.

LA CIENCIA ES EL ALMA DE LA  
PROSPERIDAD DE LAS NACIONES Y  
LA FUENTE DE TODO PROGRESO.

Louis Pasteur.