



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
División De Ciencias Biológicas Y De La Salud
Posgrado en Biología Experimental

“Análisis del promotor de *romo 1* y su evaluación en respuesta a la sobrecarga de colesterol en un modelo de carcinoma hepatocelular”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

Biol.Exp. Luis Ángel Rodríguez Rojas
Matricula: 2223803112
Correo: luisrodjaspsy@gmail.com

Comité tutorial

Co-directora interna: Dra. Roxana Uri Miranda Labra
Co-director externo: Dr. Moisés Vergara Mendoza
Asesora: Dra. Verónica Souza Arroyo

Jurado:

Presidente: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Secretaria: Dra. Mónica Viveros Rogel
Vocal: Dra. Monserrat Gerardo Ramírez
Vocal: Dra. Verónica Souza Arroyo

Iztapalapa, Ciudad de México, 2 de octubre de 2024.

Declaración de originalidad

El que suscribe Luis Ángel Rodríguez Rojas, con número de matrícula 2223803112 alumno del posgrado Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Análisis del promotor de *romo 1* y su evaluación en respuesta a la sobrecarga de colesterol en un modelo de carcinoma hepatocelular”**

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante la comisión de posgrado para lo obtención del grado de doctor es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en Iztapalapa, Ciudad de México el 1 de octubre de 2024.

Atentamente



Luis Ángel Rodríguez Rojas

Carta de confidencialidad

Ciudad de México, a 25 de septiembre del 2024

Comisión Académica del Posgrado

Presente

El que suscribe Luis Angel Rodríguez Rojas alumno con número de matrícula 2223803112, del posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Análisis del promotor de *romo1* y su evaluación en respuesta a la sobrecarga de colesterol en un modelo de carcinoma hepatocelular” a desarrollar en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavéz” y en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios



Luis Angel Rodríguez Rojas

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 839893. CVU: 1090798.

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la tesis titulada “Análisis del promotor de *romo1* y su evaluación en respuesta a la sobrecarga de colesterol en un modelo de carcinoma hepatocelular”, que presenta Luis Ángel Rodríguez Rojas con fecha de examen 2 de octubre del 2024.



Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa, CDMX



Dra. Verónica Souza Arroyo

Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa, CDMX.



Dra. Mónica Viveros Rogel

Depto. de Infectología,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, CDMX.



Dra. Monserrat Gerardo Ramírez Universidad
de Virginia, EEUU.

Miembros del Comité Tutorial



Co-directora: Dra. Roxana Uri Miranda Labra
Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa, CDMX



Co-director: Dr. Moisés Vergara Muñoz
Depto. de Infectología,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, CDMX.



Asesora: Dra. Verónica Souza Arroyo
Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa, CDMX.

RESUMEN

Introducción: El carcinoma hepatocelular es el principal cáncer primario de hígado a nivel mundial, y su progresión y agresividad están relacionados con la ingesta de una dieta alta en colesterol. ROMO1 es un modulador de ROS que se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias, y su sobreexpresión se ha relacionado con mal pronóstico en pacientes con HCC, por lo que este proyecto se enfoca en estudiar si *romo1* está afectado por el colesterol, esto a nivel transcripcional, y si es así, determinar cuál o cuales son los posibles factores de transcripción que están involucrados.

Metodología: En un modelo de sobrecarga de colesterol en la línea celular Huh7, se realizaron experimentos de RT-qPCR, análisis *In Silico*, WB, cuantificación de superóxido mitocondrial por MitoSOXRed y ensayo de gen reportero (mCherry) para evaluar la respuesta a nivel transcripcional, y funcional de **ROMO1**.

Resultados:

El colesterol aumento la expresión de ROMO1 sólo a nivel transcripcional y no de proteína, pero se encontró un aumento la producción de superóxido mitodocondrial. El ensayo de gen reportero demostró que la región que regula a ROMO1 se encuentra entre la base -2000 y -4000 upstrem del promotor (extremo 5').

Conclusión: La sobrecarga de colesterol induce la expresión del gen *romo1*, provocando un incremento de superóxido mitocondrial que pueden activar rutas involucradas en la proliferación y resistencia a apoptosis, encontrando una región importante del promotor en su regulación transcripcional.

ABSTRACT

Introduction: Hepatocellular carcinoma is the main primary liver cancer worldwide, and its progression and aggressiveness are related to the intake of a high cholesterol diet. ROMO1 is a ROS modulator found in the inner membrane of mitochondria, and its overexpression has been linked to poor prognosis in patients with HCC, so this project focuses on studying whether romo1 is affected by cholesterol, at the transcriptional level, and if so, determining which are the possible transcription factors that are involved.

Methods: In a cholesterol overload model in the Huh7 cell line, RT-qPCR experiments, In Silico analysis, WB, quantification of mitochondrial superoxide by MitoSOXRed and reporter gene assay (mCherry) were performed to evaluate the response at the transcriptional and functional level of ROMO1.

Results:

Cholesterol increased ROMO1 expression only at the transcriptional level and not at the protein level, but an increase in mitochondrial superoxide production was found. The reporter gene assay showed that the region that regulates ROMO1 is located between the -2000 and -4000 base upstream of the promoter (5' end).

Conclusion: Cholesterol overload induces the expression of the romo1 gene, causing an increase in mitochondrial superoxide that can activate pathways involved in proliferation and resistance to apoptosis, finding an important region of the promoter in its transcriptional regulation.

Índice	
Declaración de originalidad	2
Carta de confidencialidad	3
Miembros del jurado	5
Miembros del Comité Tutoral	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
Índice	9
INTRODUCCIÓN	11
Señalización del colesterol	12
ROMO1 (Modulador de especies reactivas de oxígeno)	14
ANTECEDENTES	14
JUSTIFICACIÓN	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos	18
Material y métodos	19
Análisis <i>in silico</i>	19
Búsqueda de la región promotora del gen <i>romo1</i>	19
Predicción de posibles factores de transcripción que regulan a <i>romo1</i>	19
Cultivo celular y tratamiento con colesterol.	20
Determinación del colesterol (OPA).	21
Extracción de proteína para Western blot.	21
Western blot de ROMO1.	21
Extracción de ADN.	22
Extracción de ARN.	23
Plásmidos.	23
pmCherry-1	23
Diseño de primers para la clonación y para medir la expresión de <i>romo1</i>	24
PCR para obtener promotor	26
Clonación de promotores en vector pmCherry-1	26
Transformación.	27

PCR de colonia	27
Ensayo de gen reportero	28
PCR EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)	29
Determinación de ROS	30
Microscopia de contraste de fases y fluorescencia.....	30
Secuenciación	30
Citometría de flujo	30
Análisis estadísticos	31
RESULTADOS.....	32
Ensayo de OPA: Cuantificación del colesterol en células Huh7	32
Análisis de la Expresión de <i>romo1</i>	32
Western Blot ROMO1	33
Producción de ROS del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial y la proteína ROMO1.	34
Identificación y análisis del promotor de <i>romo1</i>	35
Extracción de ADN y amplificación de promotores.	39
Clonación y comprobación de plásmidos	39
Ensayo de gen reportero	41
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIÓN.....	48
Bibliografía.....	50
Anexos	56

INTRODUCCIÓN

El carcinoma hepatocelular (HCC) es la forma más común de cáncer de hígado, representando aproximadamente el 90% de los casos de cáncer hepático. Existen diversos factores de riesgo asociados con el desarrollo de HCC, como las infecciones por los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), edad, sexo, el consumo excesivo de alcohol y desórdenes metabólicos, como enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MAFLD) y la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH) (Llovet et al., 2021), particularmente impulsadas por dietas ricas en grasa, las cuales se han reconocido como desencadenantes importantes en la progresión del HCC.

Los eventos moleculares involucrados tanto en la aparición como en la progresión a partir de estadios menos agresivos (como MAFLD y MASH), hacia el desarrollo del HCC no se comprenden completamente. Si bien, los estudios metabólicos previos del HCC se han centrado principalmente en el metabolismo de la glucosa, se ha prestado menos atención a las características específicas del tumor en términos del metabolismo de los lípidos (Berndt et al., 2019). Sin embargo, existe evidencia creciente de que la acumulación de colesterol y otros lípidos pueden desempeñar un papel crucial en la progresión del HCC. Datos de nuestro grupo sugieren que la sobrecarga de colesterol y de lípidos se asocia con un pronóstico desfavorable en pacientes con HCC; y que la expresión elevada de proteínas relacionadas con la lipogénesis está vinculada a un fenotipo tumoral más agresivo (Enríquez-Cortina et al., 2017).

El colesterol es fundamental para la vida, es el precursor de muchas hormonas y sales biliares que son necesarias para una buena digestión, es un componente importante de las balsas lipídicas, por lo que los cambios en sus niveles afectan la señalización celular, especialmente porque es donde se encuentran inmersos muchos de los factores de crecimiento o receptores de citocinas (Xu et al., 2005). No obstante, su acumulación excesiva en los hepatocitos puede inducir estrés oxidante, deterioro metabólico y disfunción celular, lo cual puede contribuir a

la carcinogénesis hepática (Maxfield & van Meer, 2010; Simoni-Nieves et al., 2021) (Enríquez-Cortina et al., 2017). Estos hallazgos resaltan la importancia de comprender mejor el papel del colesterol en la regulación de los mecanismos celulares implicados en el HCC (Simoni-Nieves et al., 2021).

Señalización del colesterol

Rutas de señalización y el papel del colesterol

Se ha reportado que en la aparición y el deterioro del carcinoma hepatocelular inducido por diversos factores como el colesterol intervienen diversas vías de señalización reguladora. En particular, las transducciones clave en la diferenciación celular (por ejemplo, la vía de señalización mTOR , la vía de señalización RAS/MAPK, la vía de señalización Hippo/YAP, la vía de señalización Hedgehog (HH) y la vía de señalización Notch) se modifican con frecuencia en el carcinoma hepatocelular (García-Lezana et al., 2021)

Receptores Nucleares

La superfamilia de receptores nucleares (NR) es el grupo más grande de reguladores transcripcionales y consta de 48 miembros en humanos y 49 en ratones. Los ligandos para NR incluyen moléculas endógenas y exógenas como hormonas, ácidos grasos (AG), ácidos biliares (AB), fármacos, toxinas y moléculas intermediarias en el metabolismo. Por lo tanto, estos NR funcionan para muestrear el medio intracelular de los hepatocitos en busca de moléculas para provocar una respuesta. La unión del agonista a NR causa un cambio conformacional en el dominio de unión al ligando (LBD) coordinado con la disociación de correpresores y/o asociación de coactivadores, lo que finalmente conduce a la activación de la transcripción génica. Estos eventos contribuyen a la regulación de las vías de transducción de señales en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Por lo tanto, los NR se consideran objetivos terapéuticos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos contra una variedad de enfermedades metabólicas (Rudraiah et al., 2016).

Los NR proporcionan un marco para una mejor comprensión de la fisiología y patobiología del hígado y para desarrollar nuevas terapias para tratar varias enfermedades hepáticas. La mayoría de los miembros de la familia NR tienen una estructura multidominio con regiones distintas involucradas en la unión del ADN, la unión del ligando y la transactivación. Una estructura común de los NR consiste en un dominio de activación independiente del ligando NH₃ terminal, llamado AF-1, un dominio de unión al ADN central, una región bisagra y un LBD C-terminal. Mientras que el AF-1 interactúa con cofactores, el LBD es exclusivo de los NR y permite la unión del ligando, la dimerización del receptor y las interacciones correguladoras distintas. Por ejemplo, se cree que FXR está unido en un estado no ligado a elementos promotores objetivo, ya sea como un monómero o como un heterodímero con RXR α . La unión del ligando da como resultado la disociación de los correpressores coligados y el reclutamiento de proteínas coactivadoras, lo que promueve así la expresión del gen objetivo (Rudraiah et al., 2016).

También se ha informado que los receptores nucleares humanos actúan como nuevos objetivos terapéuticos en el HCC. El receptor de estrógeno (ER) se expresa predominantemente entre células hepáticas malignas y normales, mientras que la expresión de ER difiere entre hombres y mujeres, y ER podría ser el objetivo para diseñar una terapia para el HCC (Sun et al., 2021). El receptor de estrógeno alfa (ER α) y el receptor de estrógeno beta (ER β), que pertenecen a una familia de receptores nucleares que pueden regular la expresión de muchos genes. El ER es un factor de transcripción activado por ligando, que se compone de un dominio de unión de estrógeno y un dominio de unión de ADN. ER α y ER β están codificados por genes distintos ESR1 y ESR2, respectivamente, y se encuentran en cromosomas diferentes. Ambos subtipos de ER se expresan en el HCC e interactúan entre sí. Los subtipos de ER ejercen una variedad de funciones en muchas etapas de la enfermedad hepática y pueden desempeñar un papel en el proceso de transducción de señales. Sin embargo, las múltiples funciones de los subtipos de ER en las enfermedades hepáticas, en especial del ER β , aún están por esclarecer y han sido objeto de estudios durante mucho tiempo (Baldissera et al.,

2016). También se ha reportado el incremento de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidante relacionado con la activación de los ER, lo que se plantean como unos posibles factores de transcripción que regulan la expresión del gen *romo1* (Baldissera et al., 2016).

ROMO1 (Modulador de especies reactivas de oxígeno)

En este contexto, el modulador de especies reactivas de oxígeno 1 (ROMO1, proteína, por sus siglas en inglés) emerge como un componente clave en la modulación del estrés oxidante en las células tumorales. ROMO1, es una proteína de 79 aminoácidos localizada en la membrana interna mitocondrial, regula la producción de ROS (Chung et al., 2012). Estudios recientes sugieren que ROMO1 podría estar implicado en la respuesta celular a la sobrecarga de colesterol, dado que en modelos de HCC inducidos por dietas ricas en colesterol, se observó una elevada expresión de *romo1* junto con un aumento significativo de ROS y consecuentemente de estrés oxidante (Lyu et al., 2022; Simoni-Nieves et al., 2021).

ANTECEDENTES

El HCC ha sido ampliamente investigado a través de diversos modelos animales. En 2017, Enríquez-Cortina et al. desarrollaron un modelo en ratones C57BL/6 para examinar la relación entre la sobrecarga de colesterol y el desarrollo de HCC. En este modelo, los ratones fueron alimentados con una dieta alta en colesterol y posteriormente tratados con el carcinógeno N-dietilnitrosamina (DEN), que induce HCC. Los resultados demostraron un aumento en la producción de especies ROS y daño oxidativo en el ADN. Además, este daño se asoció con una disminución en la expresión de genes clave relacionados con los mecanismos de reparación del ADN a los 7 días postratamiento con DEN. En los hepatocitos, se observó una respuesta de supervivencia celular, con una disminución en la proporción de Bax/Bcl2, lo que indica una inhibición de la apoptosis. Ocho meses después de la administración de DEN, los ratones alimentados con una dieta alta en colesterol mostraron un crecimiento tumoral significativamente mayor en comparación con los

controles. Estos hallazgos sugieren que la sobrecarga de colesterol induce estrés oxidante y promueve el desarrollo de HCC (Enríquez-Cortina et al., 2017).

Estudios adicionales han reforzado la conexión entre el colesterol y la progresión del HCC. En 2016, Gómez-Quiroz et al. realizaron un análisis transcriptómico global en un modelo de ratones deficientes en el receptor c-Met, los cuales fueron alimentados con una dieta rica en colesterol. Se observó una sobreexpresión del gen *romo1*, acompañada de un incremento significativo en los niveles de estrés oxidante (EOX) (Gomez-Quiroz et al., 2016). De manera similar, en hígados de cerdos con hipercolesterolemia, se reportó una sobreexpresión de *romo1*, lo que sugiere una posible relación entre el metabolismo del colesterol y la expresión de este gen (Lyu et al., 2022).

ROMO1 (ROS Modulator-1), fue descrito por primera vez por Chung et al. en 2006. El gen *romo1*, ubicado en el cromosoma 20q11.22, regula la producción de ROS en la mitocondria. Su sobreexpresión se ha relacionado con el aumento del estrés oxidante, lo que puede contribuir en el desarrollo de diversas enfermedades, incluido el cáncer (Chung et al., 2012; Chung et al., 2006). Hasta la fecha, no se ha reportado cómo el colesterol afecta la expresión de *romo1* en el HCC, lo que resalta la importancia de explorar este eje en el contexto de la carcinogénesis hepática.

La regulación transcripcional de *romo1* también ha sido estudiada en relación con el factor de transcripción USF1 (Upstream Stimulatory Factor 1), el cual tiene una función reguladora bidireccional. USF1 puede activar o reprimir la expresión de genes diana al unirse a sus promotores, como se ha demostrado en genes como APOBEC3G, Chi3L1 y hTERT (Rada-Iglesias et al., 2008; Zeng et al., 2023). Este factor participa en vías de señalización clave, como la mediada por NF- κ B y la señalización inflamatoria (Song et al., 2018; Zhang et al., 2007).

Además, USF1 regula la expresión de RNA largos no codificantes (lncRNA) y microARN que son cruciales en la progresión de enfermedades como el cáncer. Por ejemplo, Wei et al. (2020) demostraron que USF1 se une a la región promotora

de lncRNA GAS6-AS2, promoviendo su sobreexpresión y favoreciendo la progresión del osteosarcoma. En el contexto del HCC, Liu et al. (2020) mostraron que el lncRNA TUG1 recluta a USF1, lo que incrementa la expresión de *romo1* y favorece el crecimiento y metástasis de las células Huh-7. Adicionalmente, USF1 regula la expresión de lncRNA FASRL, lo que exagera la biosíntesis de ácidos grasos de novo y promueve la progresión del HCC (Zeng et al., 2023). Estos estudios sugieren que USF1 podría desempeñar un papel clave en la regulación de *romo1* y en la progresión del HCC.

JUSTIFICACIÓN

El aumento en el consumo de alimentos con alto contenido de colesterol ha generado un incremento preocupante en la obesidad, que a su vez afecta al hígado y provoca enfermedades como MAFLD y MASH. México enfrenta una crisis de salud pública, ocupando el segundo lugar mundial en obesidad en adultos y el primer lugar en obesidad infantil (Aceves-Martins et al., 2016). Estas enfermedades hepáticas son consideradas factores de riesgo para el desarrollo de HCC, uno de los cánceres cuya incidencia va en aumento.

De hecho, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI/NIH) reportó en su "Informe anual sobre el estado del cáncer 1975-2012" que, aunque la mortalidad general por cáncer ha disminuido, las tasas de cáncer de hígado están aumentando a un ritmo alarmante, lo que constituye una alerta internacional (Ryerson et al., 2016)- Se prevé que en los próximos 20 años se registre un incremento significativo en los casos de HCC, con una mayor preocupación por su aparición en edades tempranas.

En este contexto, la sobrecarga de colesterol ha cobrado relevancia por su impacto en la señalización celular, contribuyendo al estrés oxidante, la inflamación crónica y el daño hepático. La proteína Romo1, que regula la liberación ROS desde las mitocondrias, ha sido identificada como un mediador clave en estos procesos. Se ha demostrado que un aumento en la expresión de Romo1 puede generar un exceso de ROS, lo que conlleva a daño oxidativo en biomoléculas, mal

funcionamiento celular y, finalmente, la aparición de cáncer. Sin embargo, aún no se ha explorado en profundidad cómo el colesterol regula la expresión de *romo1*, particularmente en el contexto del HCC.

Este proyecto tiene como objetivo llenar ese vacío en el conocimiento al estudiar la regulación transcripcional de *romo1* en respuesta a la sobrecarga de colesterol. Comprender este mecanismo no solo permitiría esclarecer cómo el metabolismo del colesterol influye en el desarrollo del HCC, sino que podría abrir la puerta a nuevas estrategias terapéuticas para modular la producción de ROS en pacientes con esta patología. La identificación de elementos reguladores en el promotor de *romo1* podría proporcionar blancos moleculares específicos para intervenciones terapéuticas, especialmente en individuos con acumulación de lípidos hepáticos. Asimismo, evaluar la producción de ROS mitocondriales en respuesta al colesterol contribuirá a un mejor entendimiento de cómo el metabolismo lipídico agrava el estrés oxidante en el HCC. Esto no solo es relevante para el tratamiento del cáncer de hígado, sino también para otras enfermedades hepáticas relacionadas con el metabolismo de los lípidos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será el efecto de la sobrecarga de colesterol sobre la expresión de *romo1* en el HCC?

HIPÓTESIS

El colesterol aumentará la expresión de *romo1* en el carcinoma hepatocelular a nivel de mensajero (mRNA) y de la proteína.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la sobrecarga de colesterol sobre la regulación transcripcional del gen *romo1*.

Objetivos Especificos

1. Determinar el efecto de la sobrecarga de colesterol sobre la expresión de *romo1* tanto a nivel de proteína como a nivel transcripcional en la línea celular Huh-7 (de HCC).
2. Evaluar el efecto de la sobrecarga de colesterol sobre la producción de ROS en la línea celular Huh7.
3. Estudiar e identificar en el promotor del gen *romo1*, la región regulada por la presencia de colesterol en la línea celular Huh-7.

Material y métodos

Análisis *in silico*

Búsqueda de la región promotora del gen *romo1*.

Para la búsqueda del promotor del gen *romo1*, se inició con la página de la National Center for Biotechnology Information (NCBI), ubicada en el sitio: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

En la parte de “Genes”, localizamos al gen *romo1* humano (*Homo sapiens*) con el número de ID 140823. El gen tiene otros nombres, como C20orf52, MTGM, MTGMP, bA353C18.2.

Una vez que accedimos al “Full Report”, identificamos la sección GenBank, para encontrar las coordenadas en las cuales el gen está codificado en el cromosoma 20, ubicamos la sección “Change región shown” para poder movernos en el cromosoma, y observamos que el gen inicia en la posición 35,699,405 y termina en la posición 35,700,980. A partir de ahí, nos recorrimos 4000 pb hacia la izquierda para tomarlo como el promotor que analizamos, por lo que el rango lo modificamos y quedó, de inicio la posición 35,695,405 y de posición final 35,700,980.

Predicción de posibles factores de transcripción que regulan a *romo1*.

Una vez localizadas las pb para analizar, se trabajó con 2 programas ubicados en línea, y son:

JASPAR (<https://jaspar.elixir.no>): El análisis de la región promotora del gen *romo1* se realizó utilizando la base de datos de perfiles de unión de factores de transcripción de JASPAR. Se ingresó la secuencia del promotor de *romo1* para identificar posibles sitios de unión de factores de transcripción. JASPAR proporciona una lista de factores de transcripción que pueden unirse a la secuencia basada en su modelo de matriz de peso de posición (PWM), permitiendo predecir los elementos reguladores que controlan la expresión del gen en diferentes condiciones.

NSITE (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=nsite>): Para un análisis más detallado de los elementos cis-reguladores en la región promotora de *romo1*, se utilizó NSITE. Este software permite la identificación de varios tipos de sitios reguladores, incluyendo cajas TATA, enhancers (potenciadores) y otros elementos *cis* relevantes para la regulación génica. Al ingresar la secuencia del promotor, NSITE proporciona una predicción de sitios reguladores que pueden estar implicados en la regulación transcripcional de *romo1*.

Todos los probables sitios de unión a factores de transcripción se indicaron en la región promotora, esto con ayuda del software ApE (A plasmid Editor, <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>).

Cultivo celular y tratamiento con colesterol.

Para estudiar el efecto del colesterol, se trabajó con la línea celular Huh7 (carcinoma hepatocelular humano), obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en medio William's suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Hy-Clone), 100 U/ml de ampicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Thermo Fisher Scientific), mantenidas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de humedad, y sembradas en frascos de cultivo de plástico (Sigma-Aldrich). La línea celular Huh7 estaba libre de micoplasma.

Para el tratamiento con colesterol, se utilizó ciclodextrina como vehículo y se añadió colesterol a una concentración de 400 µg/ml, dosis previamente reportada por nuestro grupo de investigación. Se establecieron tiempos cortos de tratamiento (0, 30, 60, 90 y 180 minutos) para la extracción de ARN y su subsecuente análisis de expresión de *romo1*. También, se establecieron tiempos largos (0, 12, 24 y 48 horas) para analizar los niveles de proteína mediante Western Blot (WB).

Determinación del colesterol (OPA).

Se resuspendió el pellet de células en 100 μ L de PBS se saponificaron con KOH alcohólico en un bloque de calentamiento a 60°C durante 15 min. Después de que la mezcla se había enfriado, se añadieron 2 ml de hexano y 600 ml de agua destilada y se agitaron para asegurar la mezcla completa. Las alícuotas apropiadas de la capa de hexano se evaporaron usando el concentrador SpeedVac y se usaron para la medición del colesterol con reactivo de O-ftalaldehído (OPA) (Sigma-Aldrich) disuelto en ácido acético; después se añadió ácido sulfúrico y luego se leyó a 550 nm en el espectrofotómetro. como se reportó anteriormente (Domínguez-Pérez et al., 2016). En el siguiente diagrama se puede observar el diseño experimental planteado:

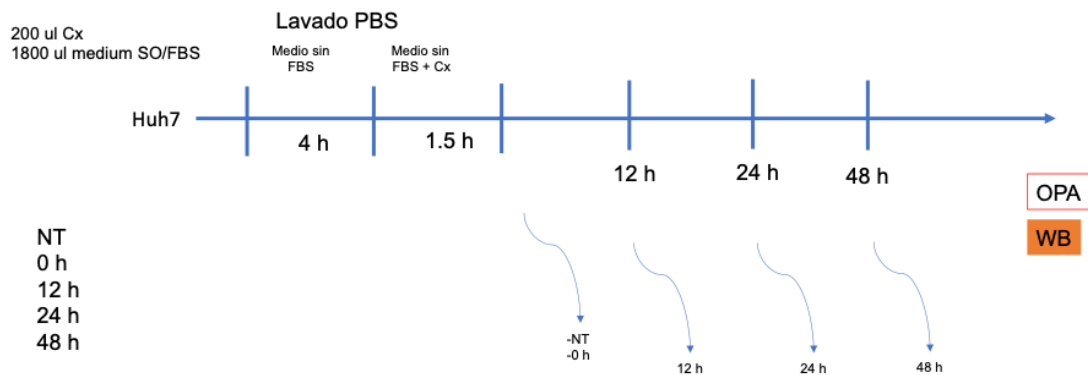
Extracción de proteína para Western blot.

Posterior al tiempo del tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS frío y después se agregaron 200 μ L de PBS frío y las células fueron despegadas usando un gendarme estéril, la suspensión celular se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se le agregó de 30-60 μ L de buffer de lisis celular Rippa adicionado con 0.01% de ácido desoxicólico dependiendo del tamaño del botón celular. Para completar la lisis, la suspensión celular fue agitada 15 segundos cada 5 minutos durante media hora, manteniendo en hielo. Para obtener la proteína, la suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y la proteína se alicuoteó y cuantificó mediante Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

Western blot de ROMO1.

Para determinar la expresión de Romo1, se utilizaron 100 μ g de proteína, la cual se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS al 0.1%, usando un voltaje de 120 V durante 1.5 horas. Posteriormente la proteína se transfirió a una membrana PVDF durante 1 hora en transferencia húmeda a 120 V. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS-Tween durante

1 hora en agitación suave y constante. Para la detección de la proteína, la membrana se incubó con el anticuerpo primario Anti-ROMO1 TA505611, Clon OTI5G8 (Origene) 1:2,000 diluido en TBS-Tween, durante toda la noche en agitación suave y constante a 4 °C, tiempo después del cual se lavó 2 veces con TBS-Tween por 15 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario antimouse acoplado a peroxidasa (Amersham™ ECL™ Anti-Mouse IgG, Horseradish PeroxidaseLinked Species-Specific Whole Antibody (from sheep) 1:8000, diluido en TBS-Tween. Después se lavó 2 veces más en TBS-Tween por 15 minutos. La membrana se reveló con 2 ml de sustrato luminiscente (SuperSignal® West Pico Substrate, Pierce). Como control de carga se marcó actina (santa cruz sc-13065 42 kDa). Las bandas se cuantificaron por densitometría usando el programa ImageJ (NIH).



Cx 400µg/ml and Cdx 10 mM
Cx: Ciclodextrina
Cdx: Complejo Cx/Colesterol

Diagrama 1. Diseño experimental para analizar la proteína por Western Blot y la cuantificación del colesterol a tiempos largos.

Extracción de ADN.

Para la búsqueda del promotor del gen *romo1*, se utilizó la página de la National Center for Biotechnology Information (NCBI), ubicada en el sitio: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

En la parte de “Genes”, se localizó al gen *romo1* humano (*Homo sapiens*) con el número de ID 140823. El gen tiene otros nombres como C20orf52, MTGM, MTGMP,

bA353C18.2. Una vez que se accedió al “Full Report”, se identificó la sección GenBank, para encontrar las coordenadas en las que el gen está codificado en el cromosoma 20, se ubicó la sección “Change region shown” para localizar la posición del gen en el cromosoma y se observó que el gen inicia en la posición 35,699,405 y termina en la posición 35,700,980. A partir de la localización del gen, se contaron 4000 pb hacia la izquierda para incluir al promotor analizado y se definió la secuencia de nucleótidos para estudio comprendida entre la posición inicial 35,695,405 y de posición final 35,700,980.

Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN de células Huh7, se utilizó el reactivo TRIzol® (Invitrogen, Cat. #15596026). Las células se cultivaron hasta alcanzar el 80-90% de confluencia y, tras eliminar el medio, se lavaron con PBS. Posteriormente, se añadieron 1000 µL de TRIzol® por pozo, se lisaron las células y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. A continuación, se añadieron 200 µL de cloroformo, se agitó la mezcla y se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa resultante se recuperó y se añadió un volumen equivalente de isopropanol para precipitar el ARN. Luego de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, el ARN fue centrifugado a 12,000 x g por 10 minutos, lavado con etanol al 75%, y secado brevemente al aire. Finalmente, el ARN fue resuspendido en agua libre de ARNasa y cuantificado utilizando el espectrofotómetro NanoDrop®, almacenándose a -80°C para su uso posterior.

Plásmidos.

pmCherry-1

El plásmido **pmCherry-1** es un vector de expresión *promoterless* diseñado para producir proteínas de fusión con la proteína fluorescente roja *mCherry*. Al no contener un promotor en su secuencia, este plásmido requiere la inserción de un

promotor específico en el sitio de clonación múltiple (MCS) para permitir la expresión del gen de interés junto con *mCherry*. Este diseño permite estudiar la localización y dinámica de proteínas de fusión bajo la regulación de promotores personalizados, lo que lo hace útil para diversos tipos de análisis de expresión génica en sistemas celulares (figura 1).

El vector contiene un MCS en el extremo 5' del gen de *mCherry*, lo que permite la fusión en marco de genes de interés. También incluye un marcador de resistencia a la kanamicina para la selección de bacterias transformadas y un origen de replicación (Ori) que asegura una alta copia del plásmido en bacterias. Este plásmido es particularmente útil para estudios en los que se desea controlar la expresión génica mediante la inserción de promotores específicos (Inc., n.d.).

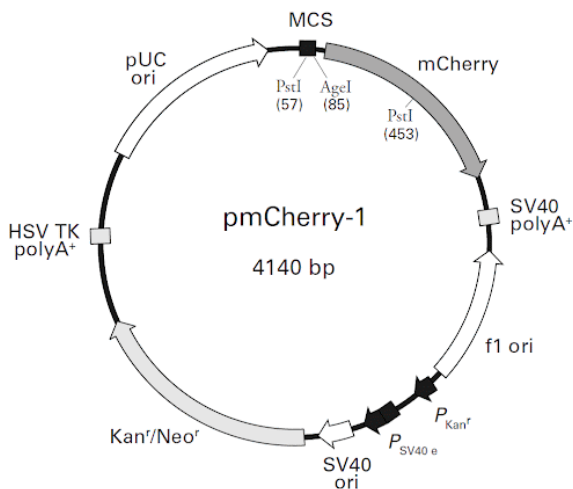


Figura 1 Mapa del plásmido de gen reportero *mCherry*.

Diseño de primers para la clonación y para medir la expresión de *romo1*.

Considerando el análisis *in silico*, se diseñaron oligonucléotidos específicos para amplificar por PCR las 4000 pb correspondientes a la región promotora de *romo1*, asegurándose de no interferir con los posibles sitios de unión de factores de transcripción (FTs). Para analizar diferentes regiones del promotor, se diseñaron

varios juegos de oligonucleótidos en sentido (*forward*, *fwd*) y antisentido (*reverse*, *rev*) que permiten fragmentar las 4000 pb en tamaños de 4000, 200 y 600 pb, basados en los resultados del análisis *in silico*. Se utilizó el promotor del citomegalovirus (CMV) como control positivo. Se añadió un sitio de restricción para las enzimas *KpnI* y *AgeI* (Promega) en el extremo 5' de los oligonucleótidos *forward* para facilitar la clonación de los productos amplificados. Para medir la expresión de *romo1* con la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR), se diseñó un juego de oligonucleótidos que amplificó una región de la CDS de 200 pb. Los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT, www.idtdna.com) y se enlistan en la tabla 1.

Todos los primer's utilizados en este proyecto, se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 1 Lista de primers usados para la amplificación de los promotores y evaluación de la expresión de *romo1*.

Oligo o primer	Secuencia	Sitio de corte
Para construcción del sistema reportero:		
Romo1-3968	<u>GGTACCC</u> CACCAAATTGCCCTGGATGA	<i>KpnI</i>
Romo1-1910	<u>GGTACC</u> CATAAGCATGTGTCCGGGAGTGTGG	<i>KpnI</i>
Romo1-598	<u>GGTACCC</u> GGGGACCCGCCTAAGAAAGTT	<i>KpnI</i>
Romo1-rev	<u>GGATCCC</u> CCATCACGAAGCCCATT	<i>AgeI</i>
Control positivo del sistema reportero:		
CMV-fwd	<u>GGTACCC</u> CGCGTTGACATTGATTATTGACT	<i>KpnI</i>
CMV-rev	<u>GGATCC</u> ATTTCGATAAGCCAGTAAGCAG	<i>AgeI</i>
Para medir la expresión de <i>romo1</i> bajo tratamiento de colesterol:		
F-Romo1exp	GCACCTTTGGCACATTCAT	---
R-Romo1exp	GTACATGGGCTGGGATTGAT	---

Se realizaron diferentes PCR's para obtener los diferentes amplicones para poder realizar las construcciones con el gen reportero

PCR para obtener promotor

Se realizó PCR utilizando ADN de Huh7 como molde para amplificar y obtener el promotor de *romo1*, así como los diferentes fragmentos de este, utilizando la enzima de alta fidelidad CloneAmp HiFi PCR Premix (#cat 639298, Takara) para minimizar la tasa de error.

Clonación de promotores en vector pmCherry-1

Se realizó la clonación de los productos de PCR correspondientes al promotor completo y sus fragmentos, así como del promotor de CMV (figura 2). Se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *AgeI* (ambas de Promega), tanto para los productos de PCR como en el plásmido pmCherry-1, por una parte, para generar los extremos cohesivos y por otra, para linearizar el vector, generando los extremos compatibles para la ligación.

Una vez concluida la digestión, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V durante 40 minutos. Posteriormente, se visualizaron los productos en un transiluminador UV y se cortaron las bandas correspondientes a los fragmentos y al plásmido linearizado utilizando un cutter estéril. Los fragmentos fueron purificados individualmente con el kit Wizard® DNA Gel de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tras la purificación, se cuantificaron las concentraciones de los insertos y del plásmido pmCherry-1 utilizando un espectrofotómetro NanoDrop®. Para la ligación de cada fragmento, se utilizó una proporción de 3:1 entre el inserto y el vector, añadiendo 1 µL de buffer 10X, 2 µL de inserto, 5 µL de agua grado biología molecular, 1 µL del vector pmCherry-1 y 1 µL de T4 DNA Ligasa. La mezcla se incubó a 22 °C durante 5 minutos.

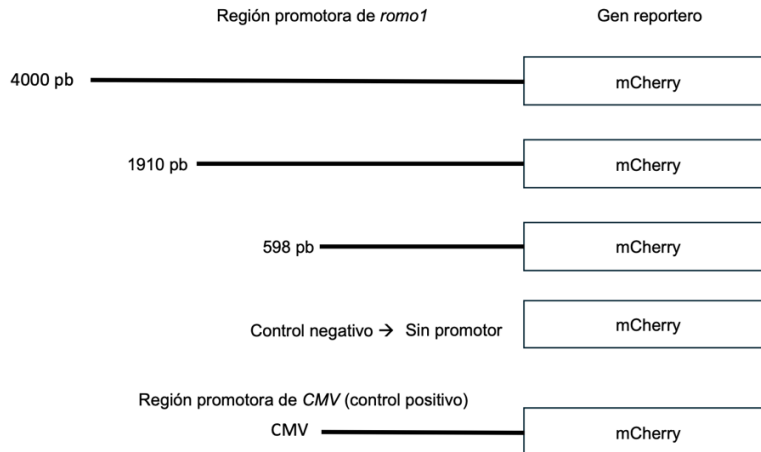


Figura 2 Esquematización de los promotores usados para evaluar la expresión de *romo1* mediante *mCherry*, se muestra además el control positivo construido con el promotor de CMV y control negativo (*mCherry* vacío)

Transformación.

Para obtener la construcción del vector con el inserto, el producto de la ligación se transformó en células competentes de *E. coli* cepa DH5 α , mediante el método de transformación por choque térmico. A un vial con 50 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α se le añadieron 5 μ L de la mezcla de ligación, incubándose en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, las células a un choque térmico, sometiéndose a 42°C por 2 minutos y luego se volvieron a colocar en hielo por 5 minutos. Después de este tiempo, se añadió 1 mL de medio Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación a 150 rpm. Finalmente, se tomaron 100 μ L del cultivo y se sembraron en placas de LB con kanamicina (50 μ g/mL). Las placas se incubaron durante al menos 18 horas a 37°C para observar el crecimiento de colonias.

PCR de colonia.

Para corroborar las colonias contenían el inserto, se realizó la técnica de PCR de colonia. Se preparó una mezcla que incluía agua, buffer 10X, dNTPs y los primers correspondientes al fragmento de interés. En lugar de ADN molde, se utilizó material de una colonia individual obtenida de las placas de LB con ampicilina, utilizando una punta estéril. La PCR se llevó a cabo empleando el mismo programa que se usó

para amplificar el fragmento original. Posteriormente, se realizó una electroforesis para identificar las colonias que mostraron amplificación del fragmento deseado.

Ensayo de gen reportero

Una vez obtenidas las construcciones en el plásmido pmCherry-1, se transfectaron en células Huh7, las cuales fueron previamente tratadas con colesterol, para evaluar la activación del gen reportero *mCherry*. La transfección se llevó a cabo utilizando Lipofectamina 3000 (Cat. #L3000015, Invitrogen), un reactivo conocido por su alta eficiencia en la entrega de ácidos nucleicos a células eucariotas.

Para realizar el ensayo del gen reportero y evaluar el efecto del colesterol sobre la expresión de *romo1* en las células Huh7, se establecieron dos grupos de trabajo:

1. Grupo Control: Este grupo consistió en células Huh7 que no recibieron tratamiento con colesterol. Se utilizó para establecer una línea base de expresión del gen reportero *mCherry* y para evaluar la actividad basal del promotor en ausencia de estímulos externos. Este control es crucial para determinar el efecto específico del colesterol en la activación del gen reportero.
2. Grupo de Interés: Este grupo consistió en células Huh7 que fueron tratadas con colesterol a una concentración de 400 µg/ml, como se describió previamente. El objetivo de este grupo fue evaluar cómo la sobrecarga de colesterol afecta la expresión del gen reportero *mCherry* y, por ende, la actividad transcripcional del promotor de *romo1*.

Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia para cuantificar la expresión del gen reportero en ambos grupos, utilizando un citómetro de flujo y microscopia de fluorescencia, permitiendo una comparación directa entre las condiciones control y tratada.

PCR EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

El ARN total fue extraído de la línea celular Huh7 tratada a diferentes tiempos (0, 1, 1.5 y 3 horas), así como de células no tratadas (NT), utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) siguiendo el protocolo estándar. La síntesis de cDNA a partir del ARN extraído se llevó a cabo utilizando el kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad, Cat. #170-8891), siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante: 5 minutos a 25°C para la hibridación, 20 minutos a 46°C para la transcripción inversa, 1 minuto a 95°C para la inactivación de la enzima, y una última incubación a 4°C.

La amplificación por qPCR del gen *romo1* se realizó utilizando el kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Cat. #1725270). Los datos obtenidos se normalizaron con respecto a los niveles del gen constitutivo *Rps18s*, empleado como control endógeno. La cuantificación relativa de la expresión génica se llevó a cabo utilizando el método de doble delta Ct ($\Delta\Delta C_t$), permitiendo así la comparación precisa de los niveles de expresión entre las muestras tratadas y no tratadas.

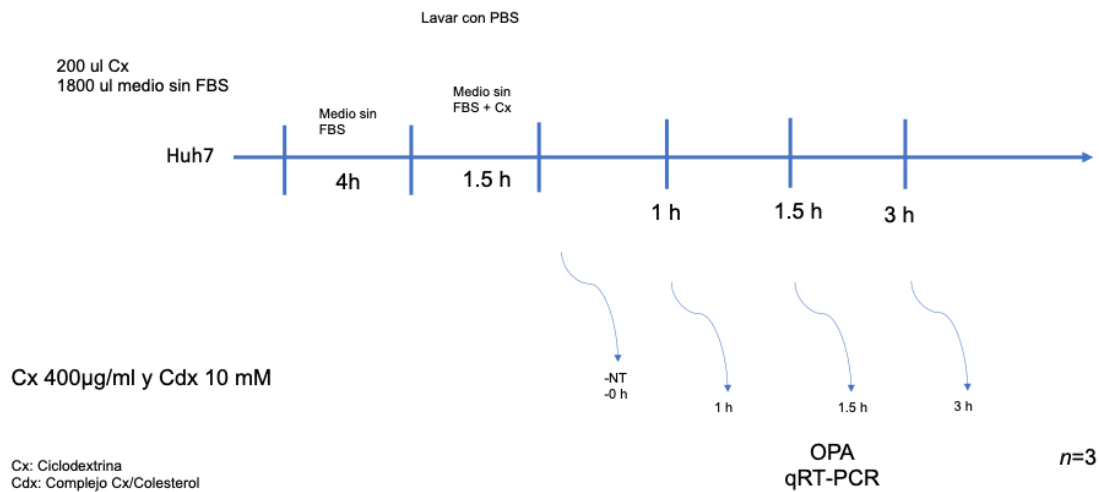


Diagrama 2. Diseño experimental para el análisis de la expresión de *romo1* y cuantificación de colesterol (Tiempos cortos).

Determinación de ROS

El contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS) se determinó mediante MitoSOX (#Cat M360008, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fluorescencia derivada del MitoSOX se observó mediante microscopía de fluorescencia y fue analizada con el software ImageJ.

Microscopia de contraste de fases y fluorescencia.

Se utilizó el microscopio invertido Carl Zeiss Axiovert.a10 para observar los experimentos de cultivo celular.

Secuenciación

Se llevó a cabo la secuenciación del promotor 4 kb mediante el marcaje con el estuche BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems® EE.UU y con los mismos primers con que se amplificaron los promotores. La secuenciación se realizó en el equipo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, EE.UU.) y se realizó el alineamiento y la obtención de las secuencias consenso con el programa SeqScape (ABI Prism® versión 2.1, EE.UU.), para validar el promotor.

Citometría de flujo

La expresión de mCherry y la viabilidad de células Huh7 se cuantificó usando el citómetro de flujo FACS ACCURI. El día del análisis, se cosecharon las células Huh7 mediante la adición de tripsina-EDTA, la cual posteriormente se inactivó con 500 µl de medio de cultivo D-10. Las células se lavaron dos veces con 500 µl de PBS 1X por centrifugación a 805 xg durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 µl de PBS 1X y se mantuvieron a 4°C protegidas de la luz hasta ser procesadas en el citómetro. Para determinar la viabilidad celular se probaron también células Huh7 sin transfectar y transfectadas con mCherry/CMV para tener células GFP+; ambos cultivos se tomaron como control transfección. Se

analizaron 1×10^4 células Huh7 de cada muestra. Se utilizó el canal FL-3 para excitar y detectar la fluorescencia de mCherry. Los datos fueron analizados con el software FlowJo v.10.

Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 8. Las diferencias entre los diferentes grupos se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

RESULTADOS

Ensayo de OPA: Cuantificación del colesterol en células Huh7

Para evaluar la respuesta de la expresión de *romo1* las células Huh7 se trataron con colesterol y se realizó el ensayo de OPA para corroborar la sobrecarga de del mismo sobre Huh7 a tiempos cortos (NT, 0, 1, 1.5 y 3 h) y tiempos largos (NT, 0, 12, 24 y 48 h) (Figura 9), para los experimentos de RT-qPCR y Western blot, respectivamente.

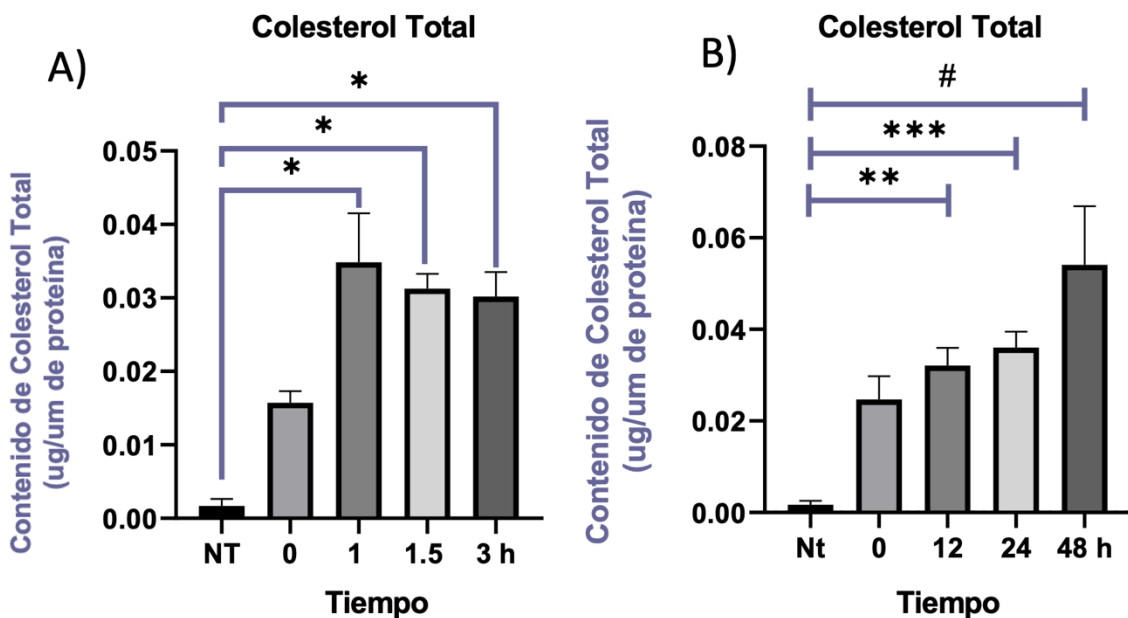


Figura 3 **Sobrecarga de colesterol** A) Ensayo de OPA para determinar la sobrecarga de colesterol sobre Huh7 en tiempos cortos (NT, 0, 1, 1.5 y 3 h). SEM, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ ANOVA 2-ways. $n=4$). B) Ensayo de OPA para determinar sobrecarga de colesterol sobre Huh7 en tiempos largos (NT, 0, 12, 24 y 48 h). SEM, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ ANOVA 1 vía. $n=3$

Análisis de la Expresión de *romo1*.

Una vez realizados los tratamientos con sobrecarga de colesterol a tiempos cortos (NT, 0, 1, 1.5 y 3 h) se determinó el efecto sobre la expresión de *romo1* a nivel de transcrito por RT-qPCR y se encontró que en los tiempos 1.5-3 h los niveles de ARNm aumentan significativamente con respecto al NT (figura 4). En la figura 7 se puede observar la gráfica correspondiente al análisis de la expresión de *romo1*.

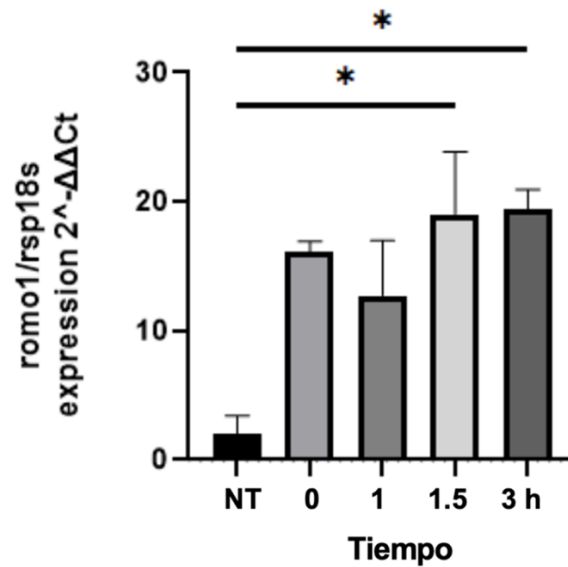


Figura 4 Expresión de romo1. Resultados de RT-qPCR de romo1 a tiempos cortos se muestran resultados normalizados al NT y a tiempos de 1, 1.5 y 3 h. Dosis de Cx-Chol 400 ug/ml. El gen de Rps18s se usó como gen de referencia. $p < 0.05^*$, $n = 3$.

Western Blot ROMO1

Para determinar el efecto sobre la cantidad de proteína de ROMO1, se analizaron las células con el tratamiento de colesterol a tiempos largos (NT, 0, 12, 24 y 48 h) (Figura 8), sin embargo, no se observa un aumento significativo en la cantidad de proteína respecto al NT para todos los tiempos.

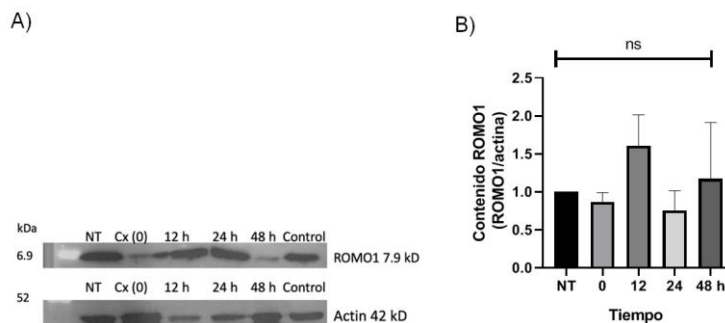


Figura 5 Evaluación de la proteína ROMO1 A) Western Blot de la proteína ROMO1, se muestra la proteína extraída de Huh-7 tratadas con sobrecarga de colesterol a diferentes tiempos (NT, 0, 12, 24 y 48 h), se utilizó actina para normalizar (Imagen representativa). B) Densitometría correspondiente a los tiempos de NT, 0, 12, 24 y 48 h ($n = 2$). Dosis de Cx-Chol 400 ug/ml.

Producción de ROS del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial y la proteína ROMO1.

Para corroborar el efecto del estímulo del colesterol en las células Huh7 se analizó la producción de SOX mitocondrial (SOXmit) utilizando una sonda específica (MitoSOX red), para determinar si hay una correlación entre la producción de SOXmit y la cantidad de proteína de ROMO1 (figura 6). Se observó que la producción de SOX está incrementada significativamente 12 horas después del tratamiento con colesterol y decae a niveles basales respecto al control de 24-48 horas (figura 7B).

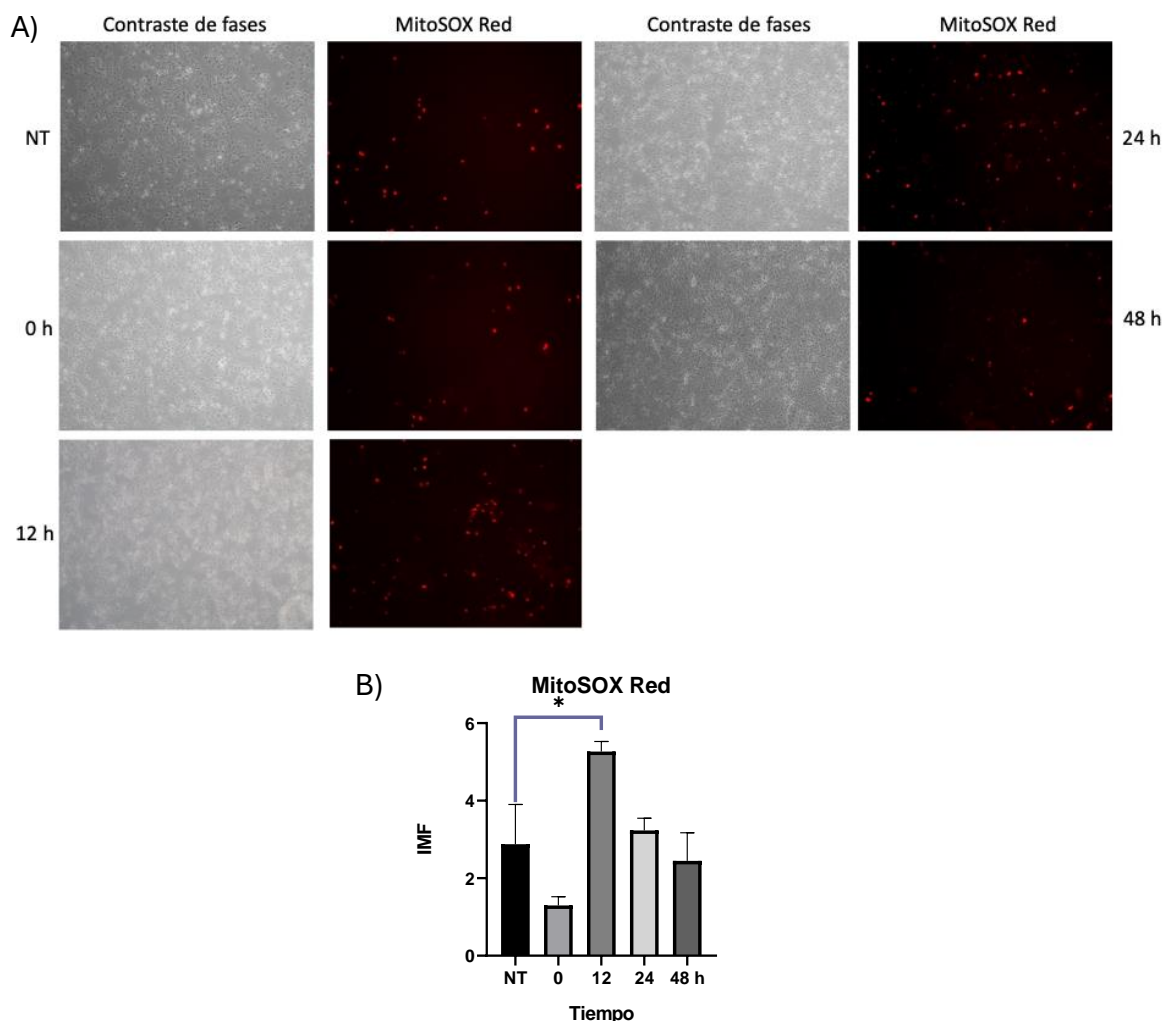


Figura 6 Determinación de superóxido utilizando MitoSOX Red en línea celular Huh7 tratadas con sobrecarga de colesterol. A) Imágenes de microscopía de fluorescencia, a la izquierda se muestran la el campo claro y la densidad celular; las imágenes columna derecha muestran el SOXmit marcado con MitoSOX Red respectivamente. Las imágenes se observan a un aumento de 100x utilizando una cámara CCD conectada al

microscopio. B) Densitometría correspondiente de las imágenes utilizando el software ImageJ, IMF; Intensidad Media de Fluorescencia. $p > 0.05$ $n=3$, por duplicado. Aumento 100X

Identificación y análisis del promotor de *romo1*

Finalmente para determinar los sitios reguladores que controlan la expresión génica de *romo1* se tomaron 4,000 nucleótidos río arriba de este gen tomando en cuenta la base de datos de NCBI, posterior a esto se realizó el análisis *In silico* en el software en línea NSITE de softberry(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=nsite&group=programs&subgroup=promoter>) para predecir los posibles sitios de unión de factores de transcripción los cuales pueden estar regulando la transcripción/expresión. Los resultados se enlistan en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Resultado del análisis in silico con los programas NSITE donde se especifica el nombre del probable factor de transcripción, su ubicación en el promotor y la función descrita en la literatura

FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN	SECUENCIA DE UNIÓN	FUNCIÓN(ES)
AP-2	3587 GgCCCCAGGCTC 3598	Activa genes implicados en el desarrollo adecuado de ojos, cara, extremidades y tubo neural (D. Eckert et al., 2005). Suprime genes como <i>MCAM/MUC18</i> , <i>C/EBP alfa</i> y <i>MYC</i> . Junto con <i>CITED2</i> , estimula la activación del promotor <i>PITX2 P1</i> (Dawid Eckert et al., 2005).
Bicoid	1651 ATTTAATCCA 1660	Controla la expresión de genes embrionarios mediante activación transcripcional y represión traduccional, reconociendo motivos en el ADN y la región 3' UTR del ARNm <i>caudal</i> (Schaeffer et al., 1999).
Kruppel	2430 TTAACCCGTTT 2440	Participa en la proliferación celular, apoptosis, diferenciación y transformación neoplásica (Kaczynski et al., 2003).
PYBF	3091 CCTTCCTTCC 3082	Se une a una región rica en pirimidina 1 kb aguas arriba del gen que codifica la delta-globina humana (HBD) (Acuto et al., 1996).
Ftz	641 tAGCAATTAAGG 630	Implicado en la transcripción, desarrollo larval y sistema nervioso (Oba et al., 2000).
Nrf-2	3598 CCCGGAAGTG 3607	Regula la defensa celular contra las agresiones tóxicas y oxidativas mediante la expresión de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo y la desintoxicación de fármacos. También se participa en la regulación del metabolismo e inflamación. (He et al., 2020)
CBF/NF-Y	1771 AACCAATcAAATG 256 AGTGGCGCAA 247	Regulan la expresión génica en respuesta al estrés mecánico, retículo endoplásmico, colesterol, ciclo celular, y cáncer (Maity, 2017; Ramji & Foka, 2002).
NF-kappaB	3034 TCTCCCTCTCCcT 3022	Regula funciones críticas en la supervivencia, diferenciación, proliferación y respuesta inmune. (Silva & Postler, 2021).
GT-1	678 ATCATTTTtACT 667	Funciona en la expresión de genes regulados por luz, como <i>RBCS-1A</i> , <i>CAB2</i> , y <i>RPL21</i> en plantas. (Gourrierec et al., 2002).
GAGA	3037 CTCTCTCcCTCTC 3025	Implicado en la organización de nucleosomas, regulación génica, estructura cromosómica y mitosis en <i>Drosophila</i> . (Chetverina et al., 2021).
Sp-1	3421 GAGGCGCGGA 3412 3260 GAGGGGTGGT 3269 3423 GGGAGGCGCGGaC 3411 2586 aGGCCACTGGCA 2575	Participa en la proliferación celular, apoptosis, diferenciación y transformación neoplásica (Kaczynski et al., 2003).

	3736 CCGGCCCCGC 3727	
Sry-delta	130 gTAGAGATGGGGT 118	Regulador del desarrollo embrionario y la determinación del destino celular (Payre et al., 1997).
ROX1	1335 GGGTAACAAGAG 1346	Recluta CYC8 y TUP1 para genes hipóxicos en condiciones aeróbicas. (Martínez-Moya et al., 2022)
RAP1	542 GCAGCCATcCATC 530	Recluta CYC8 y TUP1 para regular genes hipóxicos(Mivelaz et al., 2020).
CRX	1115 GTGCTGGGATTACAGGct 1098 50 GTGCTGGGATTACAGGtG 33	Regula genes específicos de células fotorreceptoras. Esencial para el mantenimiento de los fotorreceptores (Ruzycki et al., 2018).
PPAR	3414 GGACCTGTcCCCT 3402	Regula genes del metabolismo de lípidos y glucosa asociados con riesgos cardiovasculares (Di Giacomo et al., 2017).
ER-Beta	1174 TGGTCAGGCTGGTC 1161	Media los efectos de la hormona esteroide 17 beta-estradiol ((Di Giacomo et al., 2017)).
LUN	42 TCCCAGCACTTTGGGA. 57 1107 TCCCAGCACTTTGGGA. 1122	Regulador transcripcional de <i>E-cadherina</i> con alta expresión en pulmón (Oyanagi et al., 2004)
Ets-2	3612 GGcAGCACTTCC 3601	Regula genes relacionados con el desarrollo y apoptosis, además de ser un protooncogén (Fisher et al., 2012).
MafA	1460 TGctGCCTCAGCC 1448	Regula la expresión específica de la insulina en células beta pancreáticas (Olbro et al., 2002).
Pax-6	1606 TAcTTACAGATG 1617	Involucrado en la morfogénesis ocular (Zheng et al., 2001).
Gfi-1	28 gcTCACACCTGTAATCCCAGCAcTTTGGGA 57 1227 GCgCAtGCCTGTAATCCCAGCTAcTTGGGA 1256	Desempeña un papel en la hematopoyesis y oncogénesis. Controla modificaciones de histonas. (Wang et al., 2022).
Nmp4	1574 TTCTTTTTTTTTtTTTTaT 1555	Regulador transcripcional de <i>AQP5</i> . (Rump et al., 2016).

Una vez identificados los principales sitios de unión a factores de transcripción se corroboraron y se buscaron sitios relacionados con el colesterol usando el software de JASPAR y se encontró que los factores de transcripción ER-B y el CBF/NF-Y tienen sitios de unión consenso al promotor de *romo1* (Figura 7 y 8).

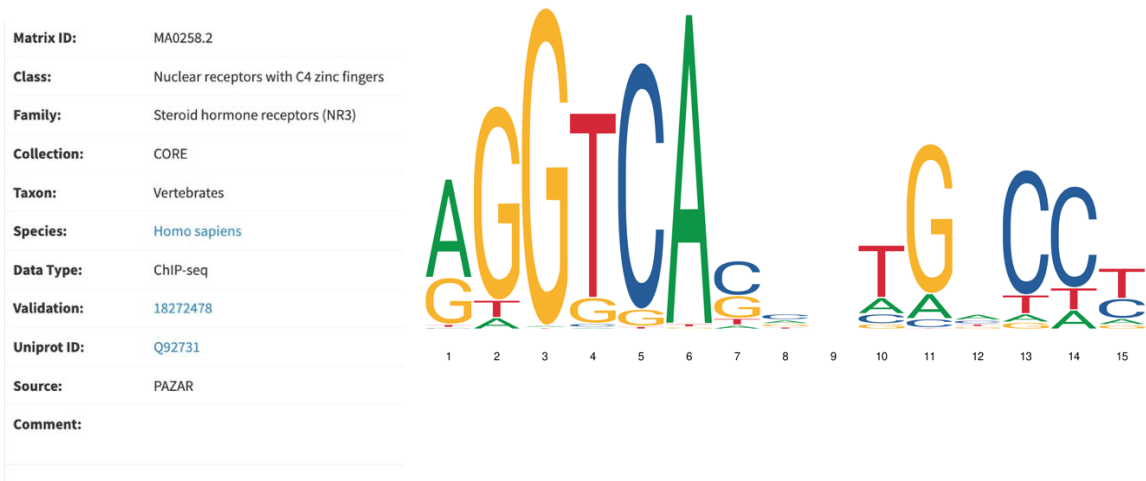


Figura 7 Resultados de JASPAR donde se muestra los sitios de unión consenso de ER-Beta.

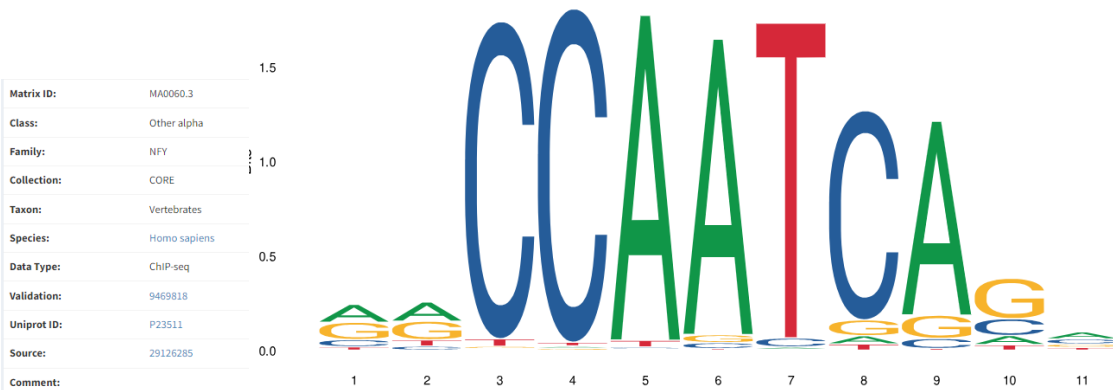


Figura 8 Resultados de JASPAR donde se muestra los sitios de unión consenso de CBF/NF-Y.

Extracción de ADN y amplificación de promotores.

Una vez determinada la región correspondiente al promotor y los sitios de unión a factores de transcripción se procedió a aislar la secuencia de los promotores, para lo cual se realizó la extracción de ADN genómico de la línea celular Huh-7, el material genético obtenido se usó como ADN molde y se usaron los primers para obtener productos correspondientes a 600 pb, 2,000 pb y 4,000 pb (figura6).

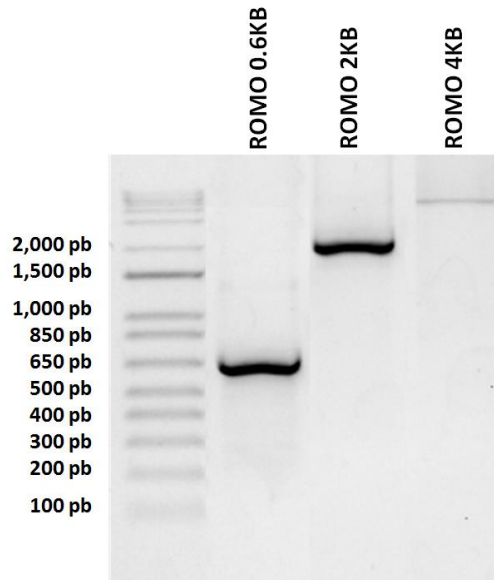


Figura 9 Amplificación de los promotores de romo1. Fotografía del Gel de agarosa en donde se muestra las bandas correspondientes a los promotores de 600 pb, 2,000 pb y 4,000 pb.

Clonación y comprobación de plásmidos

Una vez que se amplificaron los promotores correspondientes se procedió a la clonación en el vector **pmCherry** y la transformación de bacterias, se construyó el plásmido control con el promotor CMV y se seleccionaron colonias para verificarlas con PCR de colonia (Figura 11).

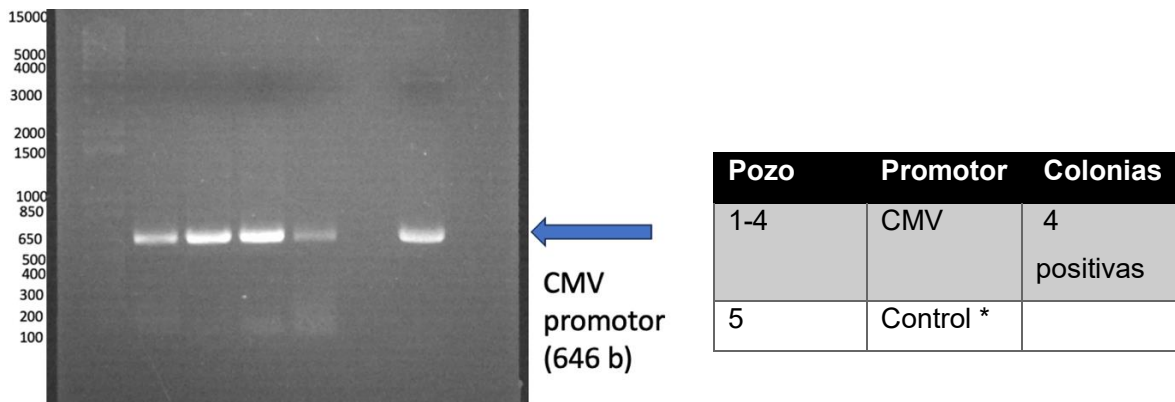


Figura 10 Gel de agarosa que corrobora la construcción de pmCherry y el promotor de CMV. La flecha azul indica el promotor de CMV. Control positivo: promotor CMV purificado

Posteriormente se realizó la misma metodología para verificar los promotores de *romo1*. Se verificaron por PCR de colonia y se validaron los plásmidos construidos (Figura 12 y 13).

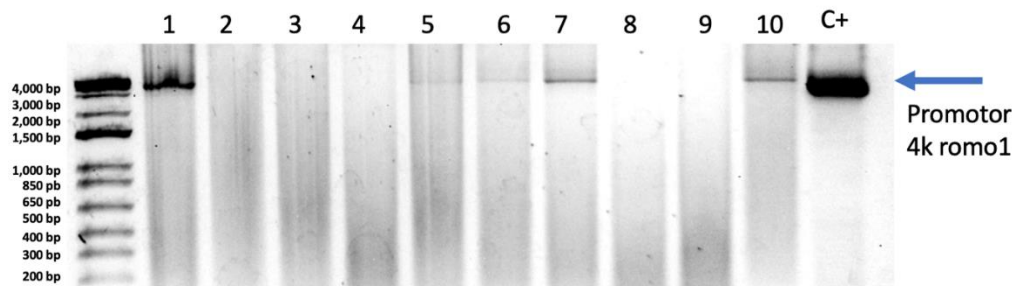


Figura 11 Gel de agarosa que muestra la amplificación del promotor completo de *romo1* (4 kb).

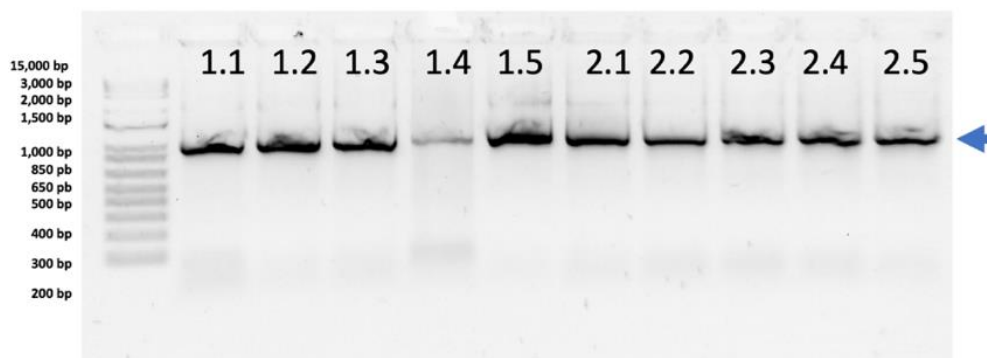


Figura 12 Gel de agarosa que muestra la validación del promotor de 2kb de *romo1*.

Finalmente, la secuencia correspondiente al promotor de *romo1* de 4 Kb fue secuenciada (figura anexa 1) y se realizó la restricción correspondiente para verificar plásmidos construidos.

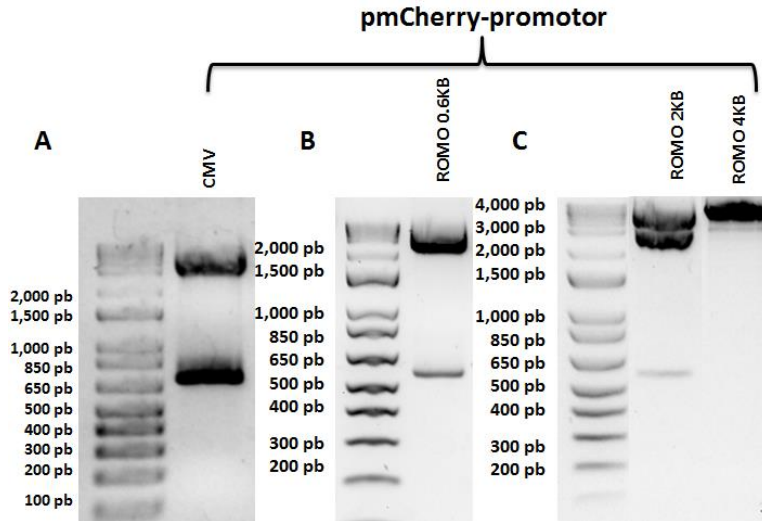


Figura 13 Construcción de los plásmidos reporteros para mCherry. **A)** Se muestra la liberación de la secuencia del promotor de CMV 646 pb **B)** Se muestra la liberación de la secuencia del promotor de *romo 1* de 600 pb **C)** Se observan la banda correspondiente al promotor de 2,000 pb y 4,000 pb (no se separó del plásmido)

Ensayo de gen reportero

Para evaluar el promotor de *romo1* y sus variantes se realizó una curva de transfección para determinar la cantidad óptima de plásmido necesario en la línea celular Huh7 usando como punto de partida el plásmido de 4 Kb este plásmido fue usado ya que es el que contiene el promotor “completo” y por ende el de referencia.

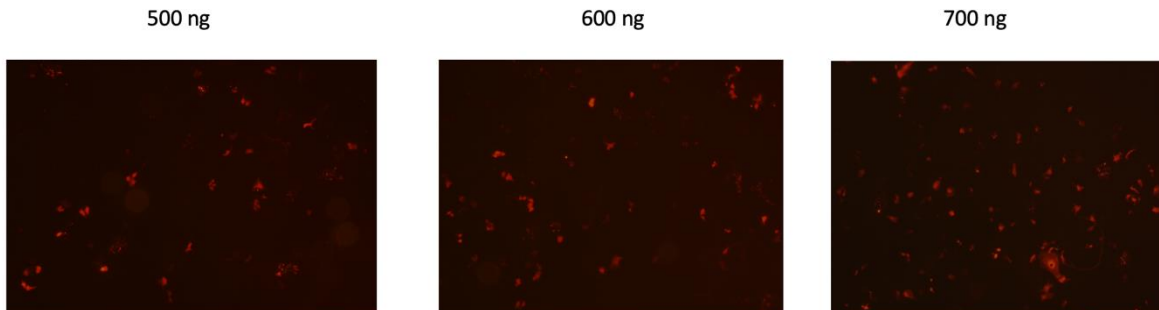


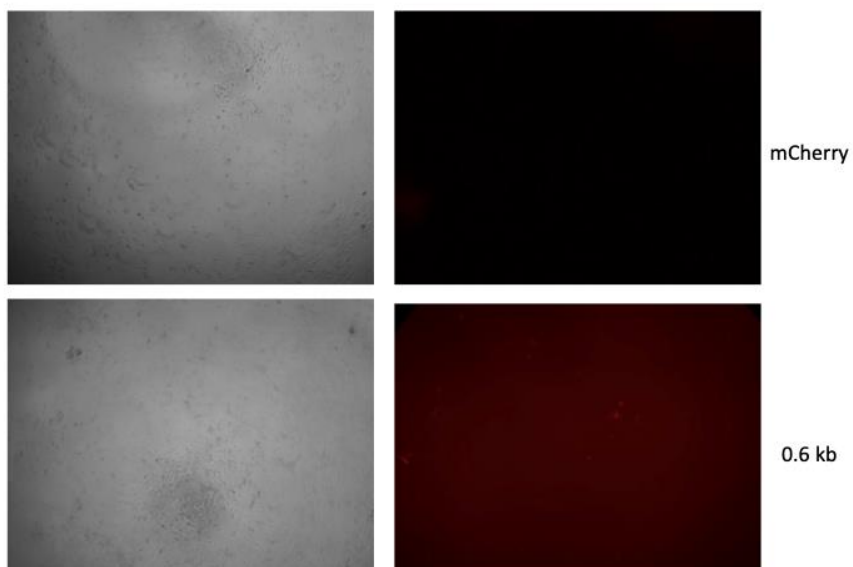
Figura 14 Curva de concentración del plásmido necesario para realizar transfección en Huh7, (500-700 ng). Aumento 50X.

Se determinó que la cantidad óptima para la transfección con el plásmido con el promotor de 4 kb fue de 700 ng (determinación por citometría, datos no mostrados), y se realizó un ajuste para realizar una transfección equimolar para cada construcción tomando en cuenta el tamaño de cada promotor como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3 Concentraciones equimolares para cada construcción respecto al promotor de 4Kb

Construcción	Cantidad
mCherry/4kb	700 ng
mCherry/2kb	534 ng
mCherry/0.6 kb	403 ng
mCherry/CMV	403 ng

Una vez definidas las condiciones y concentraciones de las 4 construcciones, se verifico la transfección por campo claro y microscopia de fluorescencia para detectar a mCherry y verificar la transfección antes de analizar los diferentes grupos de células en el citómetro de flujo (Figura 14).



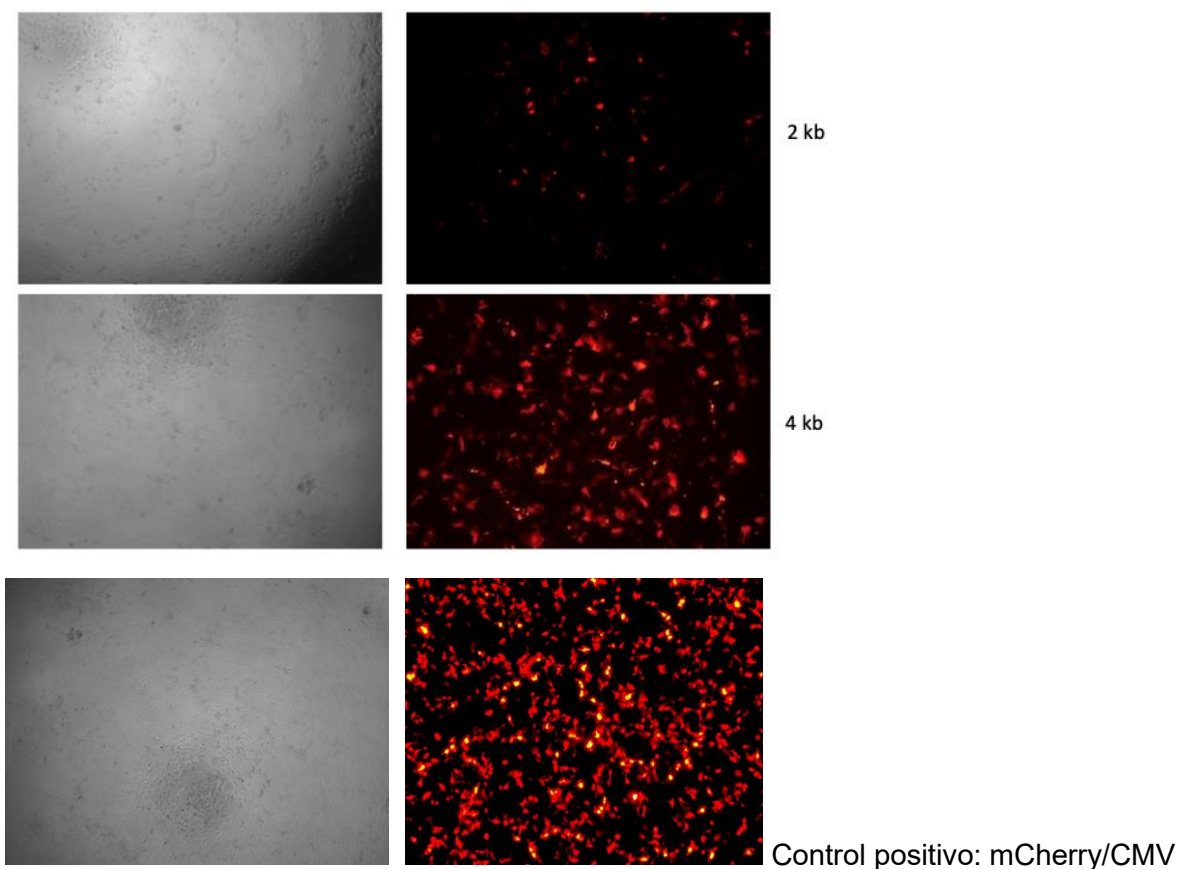


Figura 15 Fotografías representativas de campo claro y microscopía de fluorescencia de las células Huh7 transfectadas con las construcciones (plásmido vacío, promotor de 600 pb, 2,000 pb y 4,000 pb y el control con promotor de CMV). Las células fueron observadas con un aumento de 50X.

Finalmente, para realizar el análisis cuantitativo se despegaron las células y se resuspendieron en PBS para analizarlas en el citómetro ACCURI. El análisis por citometría de flujo mostro una eficiencia de transfección del plásmido control de hasta 45% (figura16A mCherryCMV) y posteriormente se procedió a evaluar la población positiva en cada una de las construcciones con el promotor de *romo1* (figura16 B).

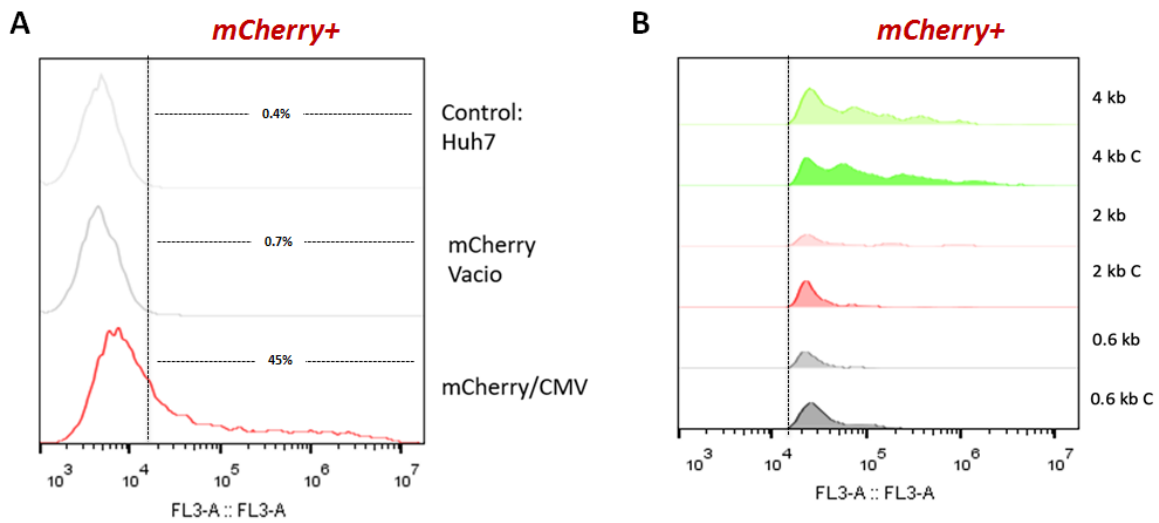


Figura 16 Cartometría de flujo, expresión de mCherry A) Histogramas que muestran los controles para validar la transfección, células Huh7 solas, células transfectadas con plásmido vacío y células transfectadas con el plásmido control (promotor de CMV), B) Histograma representativo donde se muestra la población mCherry+ para cada plásmido construido, se indica el tratamiento con colesterol con la letra C.

El análisis estadístico para el promotor de 4Kb mostro un discreto aumento en la expresión de mCherry tratado con colesterol, sin embargo, no existe diferencia significativa respecto al no tratado, los promotores de 2 Kb y 0.6 Kb no mostraron actividad significativa con o sin el estímulo de colesterol (figura 16 B y 17).

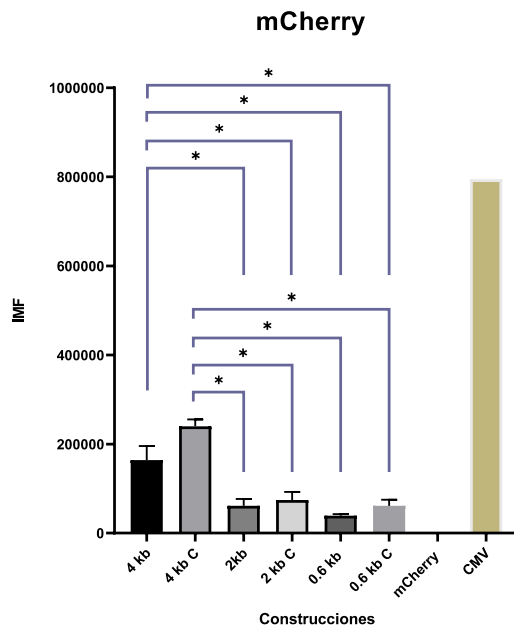


Figura 17 Gráfica que muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) obtenida del análisis de la citometría de flujo en el citómetro ACCURI. Se analizaron mCherry con promotor de *romo1* y controles. $n=3$, cada n y construcción por triplicado. $p<0.005^*$

DISCUSIÓN

Debido a que el contenido de colesterol en la dieta mexicana es alto y la acumulación de este pueden desempeñar un papel crucial en la progresión y agresividad del HCC es importante comprender el efecto del colesterol sobre la regulación génica principalmente en aquellos genes que promueven el desarrollo de cáncer como es *ROMO1* y su función como modulador del estrés oxidante (Chung et al., 2012; Chung et al., 2006). Tomando en cuenta esta asociación establecimos un modelo para poder esclarecer el efecto del colesterol sobre *ROMO1*. En nuestro modelo, la sobrecarga de colesterol en células Huh7 se logró inducir a tiempos cortos y manteniéndose constante hasta 48 horas (figura 3 A y B), permitiéndonos evaluar los efectos correspondientes. Durante estos tiempos se pudo determinar que la sobrecarga de colesterol en células hepáticas conduce al aumento de la expresión de *romo1* a tiempos tempranos (1-3 hrs figura 4) correlacionados con el ensayo de OPA (Figura 3A), y por ende sugiriendo un posterior aumento en la producción de esta proteína. Como se ha descrito la proteína *ROMO1* está involucrada en la producción **ROS** en la mitocondria como el

superóxido y es clave en la regulación del estrés oxidativo celular. Por lo que nuestra hipótesis fue respaldada la observar un aumento significativo en la producción de superóxido mitocondrial 12 hrs después del estímulo en comparación con células no tratadas con colesterol, se sabe que en células cancerosas la **sobreexpresión de ROMO1** puede ser un factor importante en la generación de **ROS** mitocondriales, lo que puede contribuir a la proliferación y supervivencia celular (Chung et al, 2012). Sin embargo, el análisis por WB, aunque mostró un discreto aumento de ROMO1 no fue significativo a las 12 hrs en células tratadas con colesterol (figura 5), pero correlacionando con la disminución de la producción de superóxido y ambas determinaciones estabilizándose niveles basales entre las 24-48 hrs (figura 3B y 5B).

Si bien en el cáncer, los niveles elevados de ROS pueden activar vías oncogénicas, como la señalización a través de la vía **PI3K/AKT** o la **MAPK/ERK**, que favorecen el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales (Lv et al., 2021), los niveles elevados de ROMO1 pueden volverse perjudiciales para la célula si no son controlados. La acumulación excesiva de ROS puede inducir **estrés oxidante severo**, daño mitocondrial y la apoptosis (Pajares et al., 2015). ROMO1, como muchas proteínas mitocondriales, puede ser degradada por las **proteasas mitocondriales**. Las **AAA+ proteasas**, como **Lon** o **ClpXP**, pueden eliminar ROMO1 cuando sus niveles son demasiado altos y la célula necesita reducir la producción de ROS para evitar el daño oxidante. Este proceso se activa en la pérdida de homeostasis mitocondrial (Kan et al., 2024). Nuestros resultados aunque congruentes con nuestra hipótesis sugieren que la producción de ROMO1 podría estar incrementada a tiempos más tempranos (posteriores a las 3 horas y hasta 12 horas después Figura4 y 5B) y estabilizándose para evitar daños en la célula.

Estas observaciones correlacionan con el ensayo de gen reportero cuyo objetivo fue identificar los sitios reguladores del promotor para esclarecer este fenómeno. Para lo cual analizamos exclusivamente la población mCherry(+) (figura16) y nos enfocamos en análisis de la intensidad media de fluorescencia en donde

observamos que el promotor de 4 Kb mostro una señal y respuesta similar al análisis de WB de ROMO1 con y sin estímulo (figura 5, figura 16B y figura 17). Los resultados de gen reportero se enfocaron en los grupos de mCherry/4kb (sin tratamiento) y mCherry/4kbC (con colesterol), sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre ellos, esto posiblemente a que se analizó 14 hrs después del tratamiento con colesterol, mostrando una correlación directa con la cantidad de proteína de ROMO1 y superóxido después de las 12 hrs los cuales iban a la baja (figura 5B y 6B). Por otra parte, el promotor completo mostro una diferencia significativa en la intensidad media de fluorescencia respecto a los otros promotores (2,000 y 600 pb, figura 17), lo que sugiere que la región involucrada en la regulación de la expresión de *romo1* se podría encontrar en esta región que no comparten las otras secuencias (figura2). El análisis *in silico* (NSITE y **JASPAR**) realizado para el promotor de 4Kb muestra que en esta región se encuentran sitios de unión a factores de transcripción importantes como **ER** y **CBP/NF-Y**, para los cuales se ha reportado que pueden incrementar la expresión por el efecto del colesterol y favorecer la carcinogénesis (Ghanbari et al., 2020; Maity, 2017).

Tomando en cuenta nuestros hallazgos y que la sobrecarga de colesterol permanece constante hasta 48 horas, sugiere que el aumento inicial de la expresión de *romo1* por la sobrecarga de colesterol (figura 3 y 4) y el estrés oxidante (figura 5) probablemente sea seguido por mecanismos de **retroalimentación negativa**, que detectan niveles excesivos de ROS y activan la degradación de ROMO1 para evitar el daño celular irreversible, lo que es congruente con nuestros datos de la caída de proteína ROMO1 (figura 5 B), el gen reportero (figura 17 promotor de 4KB) y superóxido después de 12 horas (figura 6B). Las proteínas antioxidantes y sensores de ROS, como **NRF2**, pueden ser activadas en respuesta a los altos niveles de ROMO1 y ROS, y activar genes que ayudan a la célula a restaurar el equilibrio, lo que puede incluir la degradación de ROMO1 (Vona et al., 2021), por lo que se sugiere analizar esta señalización en el modelo propuesto para corroborar nuestros datos. Es importante señalar que nuestros resultados de gen reportero en los promotores de 2,000 y 600 pb no mostraron respuesta basal o al estímulo de

colesterol lo que nos lleva a pensar que en esta región aparte de ser la base estructural del promotor, podría estar codificado un elemento regulador negativo para contrarrestar la sobreexpresión a nivel transcripcional lo cual debe ser validado.

Finalmente nuestros hallazgos muestran que existe una fuerte respuesta en la expresión del gen *romo1* con colesterol en tiempos tempranos lo que puede inicialmente ser ventajoso para el tumor ya que los niveles moderadamente elevados de ROS pueden promover la proliferación y la resistencia a la apoptosis, sin embargo, la producción de la proteína debe ser analizada en una curva de tiempo entre 3-12 hrs ya que la degradación de ROMO1 es crucial para evitar la activación de rutas apoptóticas o la disfunción mitocondrial extrema. Las células cancerosas pueden necesitar eliminar ROMO1 para evitar la acumulación de daño irreparable que pueda inducir apoptosis o senescencia celular (Chung et al., 2012). El análisis propuesto nos ayudara a determinar el pico máximo en la concentración de ROMO1 y poder llevar a cabo los análisis del gen reportero de forma adecuada y poder determinar en un análisis mucho más detallado la relevancia de los sitios a factores de transcripción sugeridos en el promotor de 4KB como son **ER** y **CBP/NF-Y**, mediante la eliminación de estos sitios y validar la hipótesis de retroalimentación negativa eliminando las regiones de los promotores menores a 2,000 pb.

CONCLUSIÓN

La regulación transcripcional de genes involucrados en diferentes patologías como el cáncer es un punto clave para la progresión y agresividad de la enfermedad, dilucidar los mecanismos por el cual se activan factores de transcripción y sitios de unión a regiones específicas de promotores de genes involucrados en procesos como la proliferación y resistencia apoptosis, son puntos clave para mejorar terapias y encontrar targets terapéuticos. En este trabajo encontramos que la expresión de ROMO1 aumenta por la sobrecarga de colesterol a tiempos cortos pero los niveles de proteína no correlacionan positivamente, aunque si el incremento de superóxido mitocondrial que es una ROS importante para activar la proliferación por diversas

rutas de señalización como PI3K/AKT/mTOR agravar el cáncer. También encontramos una posible región del promotor del gen *romo1* involucrada en su regulación transcripcional entre la base -2000 a -4000 pb, falta realizar más investigación para encontrar el factor de transcripción estrella que esté aumentando su expresión, por lo que se sugiere realizar más experimentos.

Se pudo determinar que el tratamiento con colesterol induce la sobreexpresión de *romo1* y este dato se correlacionan con el aumento de superóxido, sin embargo, es necesario establecer tiempos más cortos para determinar el pico máximo de esta proteína. Así mismo de determino que el promotor de 4 Kb contiene una posible región involucrada en su regulación transcripcional, pero es necesario replantear las condiciones óptimas de tiempo para evaluar el gen reportero.

Bibliografia

- Aceves-Martins, M., Llauroadó, E., Tarro, L., Solà, R., & Giralt, M. (2016). Obesity-promoting factors in Mexican children and adolescents: challenges and opportunities. *Global Health Action*, 9(1), 29625. <https://doi.org/10.3402/gha.v9.29625>
- Acuto, S., Urzi, G., Schimmenti, S., Maggio, A., O'Neill, D., & Bank, A. (1996). An element upstream from the human delta-globin-encoding gene specifically enhances beta-globin reporter gene expression in murine erythroleukemia cells. *Gene*, 168(2), 237-241. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)83098-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)83098-8)
- Baldissera, V. D., Alves, A. F., Almeida, S., Porawski, M., & Giovenardi, M. (2016). Hepatocellular carcinoma and estrogen receptors: Polymorphisms and isoforms relations and implications. *Medical Hypotheses*, 86, 67-70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.11.030>
- Berndt, N., Eckstein, J., Heucke, N., Gajowski, R., Stockmann, M., Meierhofer, D., & Holzhütter, H.-G. (2019). Characterization of Lipid and Lipid Droplet Metabolism in Human HCC. *Cells*, 8(5), 512. <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/5/512>
- Chung, J. S., Park, S., Park, S. H., Park, E. R., Cha, P. H., Kim, B. Y., Chung, Y. M., Woo, S. R., Han, C. J., Kim, S. B., Suh, K. S., Jang, J. J., Lee, K., Choi, D. W., Lee, S., Lee, G. Y., Hahm, K. B., Shin, J. A., Kim, B. S., . . . Yoo, Y. D. (2012). Overexpression of Romo1 promotes production of reactive oxygen species and invasiveness of hepatic tumor cells. *Gastroenterology*, 143(4), 1084-1094.e1087. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.038>
- Chung, Y. M., Kim, J. S., & Yoo, Y. D. (2006). A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 347(3), 649-655. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.140>
- Di Giacomo, E., Benedetti, E., Cristiano, L., Antonosante, A., d'Angelo, M., Fidoamore, A., Barone, D., Moreno, S., Ippoliti, R., Cerù, M. P., Giordano, A., & Cimini, A. (2017). Roles of PPAR transcription factors in the energetic

- metabolic switch occurring during adult neurogenesis. *Cell Cycle*, 16(1), 59-72. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1252881>
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jager, R., & Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol*, 6(13), 246. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-13-246>
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R., & Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biology*, 6(13), 246. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-13-246>
- Enríquez-Cortina, C., Bello-Monroy, O., Rosales-Cruz, P., Souza, V., Miranda, R. U., Toledo-Pérez, R., Luna-López, A., Simoni-Nieves, A., Hernández-Pando, R., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Calvisi, D. F., Marquardt, J. U., Bucio, L., & Gomez-Quiroz, L. E. (2017). Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, 8(61), 104136-104148. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22024>
- Ghanbari, F., Mader, S., & Philip, A. (2020). Cholesterol as an Endogenous Ligand of ERR α Promotes ERR α -Mediated Cellular Proliferation and Metabolic Target Gene Expression in Breast Cancer Cells. *Cells*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/cells9081765>
- Gomez-Quiroz, L. E., Seo, D., Lee, Y. H., Kitade, M., Gaiser, T., Gillen, M., Lee, S. B., Gutierrez-Ruiz, M. C., Conner, E. A., Factor, V. M., Thorgeirsson, S. S., & Marquardt, J. U. (2016). Loss of c-Met signaling sensitizes hepatocytes to lipotoxicity and induces cholestatic liver damage by aggravating oxidative stress. *Toxicology*, 361-362, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.004>
- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*, 21(13). <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- Inc., T. B. (n.d.). *pmCherry-1 vector information*. https://www.takarabio.com/documents/Vector%20Documents/PT3976-5_PR882569.pdf
- Kaczynski, J., Cook, T., & Urrutia, R. (2003). Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology*, 4(2), 206. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-2-206>

- Kan, K. T., Wilcock, J., & Lu, H. (2024). Role of Yme1 in mitochondrial protein homeostasis: from regulation of protein import, OXPHOS function to lipid synthesis and mitochondrial dynamics. *Biochemical Society Transactions*, 52(3), 1539-1548. <https://doi.org/10.1042/bst20240450>
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Lv, J., Wu, Y., Li, W., & Fan, H. (2021). High Expression of ROMO1 Aggravates the Malignancy of Hepatoblastoma. *J Oncol*, 2021, 2341719. <https://doi.org/10.1155/2021/2341719>
- Lyu, W., Xiang, Y., Wang, X., Li, J., Yang, C., Yang, H., & Xiao, Y. (2022). Differentially Expressed Hepatic Genes Revealed by Transcriptomics in Pigs with Different Liver Lipid Contents. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2315575. <https://doi.org/10.1155/2022/2315575>
- Maity, S. N. (2017). NF-Y (CBF) regulation in specific cell types and mouse models. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1860(5), 598-603. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.10.014>
- Martínez-Moya, P., Campusano, S., Sepúlveda, D., Paradela, A., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2022). Role of ROX1, SKN7, and YAP6 Stress Transcription Factors in the Production of Secondary Metabolites in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9282. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/16/9282>
- Maxfield, F. R., & van Meer, G. (2010). Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*, 22(4), 422-429. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.004>
- Mivelaz, M., Cao, A. M., Kubik, S., Zencir, S., Hovius, R., Boichenko, I., Stachowicz, A. M., Kurat, C. F., Shore, D., & Fierz, B. (2020). Chromatin Fiber Invasion and Nucleosome Displacement by the Rap1 Transcription Factor. *Mol Cell*, 77(3), 488-500.e489. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.025>

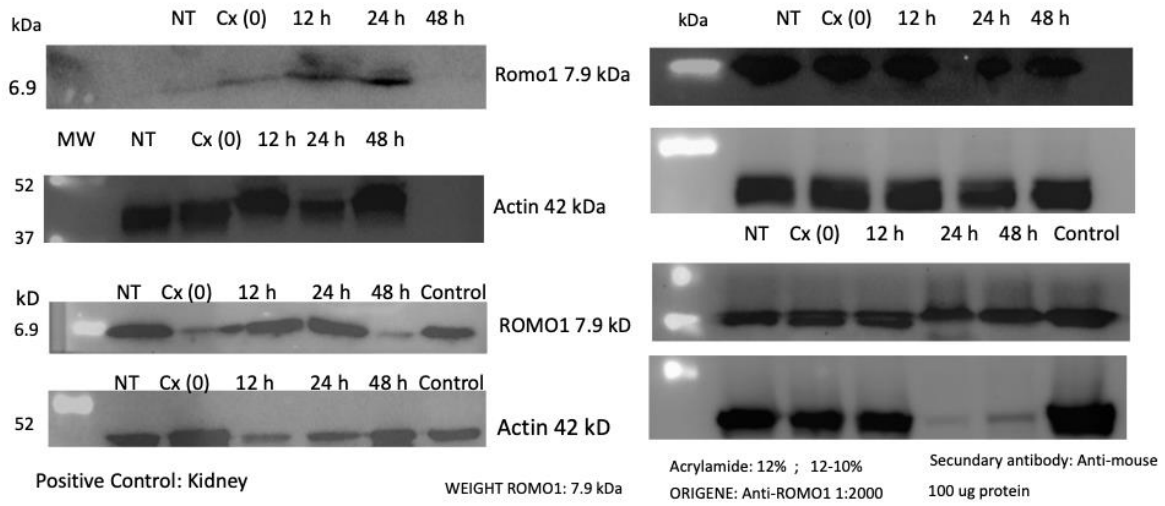
- Oba, K., Yanase, T., Ichino, I., Goto, K., Takayanagi, R., & Nawata, H. (2000). Transcriptional regulation of the human FTZ-F1 gene encoding Ad4BP/SF-1. *J Biochem*, *128*(3), 517-528.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022782>
- Pajares, M., Jiménez-Moreno, N., Dias, I. H. K., Debelec, B., Vucetic, M., Fladmark, K. E., Basaga, H., Ribaric, S., Milisav, I., & Cuadrado, A. (2015). Redox control of protein degradation. *Redox Biol*, *6*, 409-420.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.003>
- Payre, F., Buono, P., Vanzo, N., & Vincent, A. (1997). Two Types of Zinc Fingers Are Required for Dimerization of the serendipity delta Transcriptional Activator. *Molecular and cellular biology*, *17*, 3137-3145.
<https://doi.org/10.1128/MCB.17.6.3137>
- Rada-Iglesias, A., Ameer, A., Kapranov, P., Enroth, S., Komorowski, J., Gingeras, T. R., & Wadelius, C. (2008). Whole-genome maps of USF1 and USF2 binding and histone H3 acetylation reveal new aspects of promoter structure and candidate genes for common human disorders. *Genome Res*, *18*(3), 380-392. <https://doi.org/10.1101/gr.6880908>
- Rudraiah, S., Zhang, X., & Wang, L. (2016). Nuclear Receptors as Therapeutic Targets in Liver Disease: Are We There Yet? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *56*, 605-626. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103209>
- Ruzycki, P. A., Zhang, X., & Chen, S. (2018). CRX directs photoreceptor differentiation by accelerating chromatin remodeling at specific target sites. *Epigenetics & Chromatin*, *11*(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0212-2>
- Ryerson, A. B., Ehemann, C. R., Altekruse, S. F., Ward, J. W., Jemal, A., Sherman, R. L., Henley, S. J., Holtzman, D., Lake, A., Noone, A.-M., Anderson, R. N., Ma, J., Ly, K. N., Cronin, K. A., Penberthy, L., & Kohler, B. A. (2016). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer*, *122*(9), 1312-1337.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cncr.29936>

- Schaeffer, V., Janody, F., Loss, C., Desplan, C., & Wimmer, E. A. (1999). Bicoid functions without its TATA-binding protein-associated factor interaction domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(8), 4461-4466.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4461>
- Simoni-Nieves, A., Salas-Silva, S., Chávez-Rodríguez, L., Escobedo-Calvario, A., Desoteux, M., Bucio, L., Souza, V., Miranda-Labra, R. U., Muñoz-Espinosa, L. E., Coulouarn, C., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Marquardt, J. U., & Gomez-Quiroz, L. E. (2021). The Consumption of Cholesterol-Enriched Diets Conditions the Development of a Subtype of HCC with High Aggressiveness and Poor Prognosis. *Cancers*, *13*(7), 1721. <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/7/1721>
- Song, X., Zhu, M., Li, H., Liu, B., Yan, Z., Wang, W., Li, H., Sun, J., & Li, S. (2018). USF1 promotes the development of knee osteoarthritis by activating the NF- κ B signaling pathway. *Exp Ther Med*, *16*(4), 3518-3524.
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.6608>
- Sun, G., Sun, K., & Shen, C. (2021). Human nuclear receptors (NRs) genes have prognostic significance in hepatocellular carcinoma patients. *World J Surg Oncol*, *19*(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02246-x>
- Vona, R., Iessi, E., & Matarrese, P. (2021). Role of Cholesterol and Lipid Rafts in Cancer Signaling: A Promising Therapeutic Opportunity? [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.622908>
- Xu, F., Rychnovsky, S. D., Belani, J. D., Hobbs, H. H., Cohen, J. C., & Rawson, R. B. (2005). Dual roles for cholesterol in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(41), 14551-14556. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503590102>
- Zeng, Y. L., Gao, F., Zhang, C., Ren, P. P., Ma, L., Wang, X., Wang, R., Kang, Y., & Li, K. (2023). USF1 modulates transcription and cellular functions by regulating multiple transcription factors in Huh7 cells. *Oncol Lett*, *26*(6), 532.
<https://doi.org/10.3892/ol.2023.14119>
- Zhang, L., Handel, M. V., Schartner, J. M., Hagar, A., Allen, G., Curet, M., & Badie, B. (2007). Regulation of IL-10 expression by upstream stimulating factor

(USF-1) in glioma-associated microglia. *J Neuroimmunol*, 184(1-2), 188-197. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.12.006>

Todos los experimentos se realizarán siguiendo la NOM-012-SSA3-2012.

Anexos



Imágenes de los geles correspondientes al Western Blot de ROMO1.

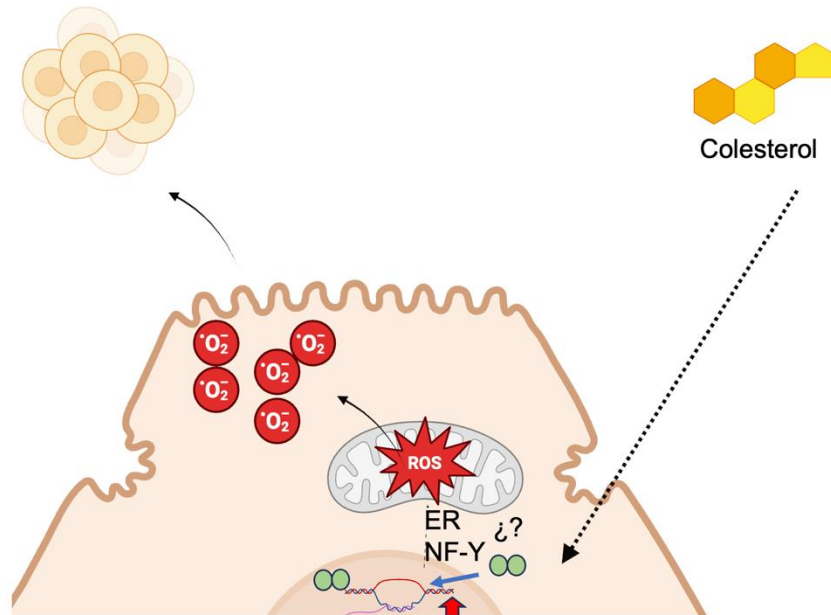
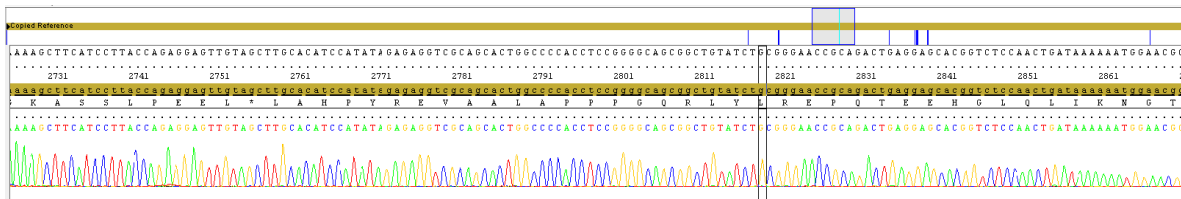


Imagen de resumen. El colesterol afecta la expresión de *romo1*, y aumenta la producción de superóxido.



Histograma de secuenciación del promotor de 4kb clonado en mCherry



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

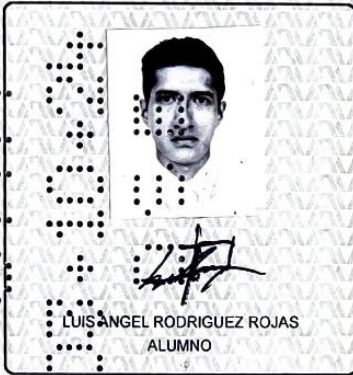
No. 00256

Matrícula: 2223803112

Análisis del promotor de romo 1 y su evaluación en respuesta a la sobrecarga de colesterol en un modelo de carcinoma hepatocelular.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 2 del mes de octubre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
DRA. VERONICA SOUZA ARROYO
DRA. MONSERRAT GERARDO RAMIREZ
DRA. MONICA VIVEROS ROGEL



LUIS ANGEL RODRIGUEZ ROJAS
ALUMNO

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


MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: LUIS ANGEL RODRIGUEZ ROJAS

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

Aprobar

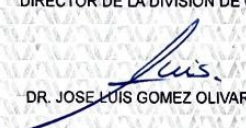
REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

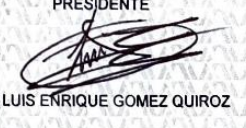
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL



DRA. VERONICA SOUZA ARROYO

VOCAL



DRA. MONSERRAT GERARDO RAMIREZ

SECRETARIA



DRA. MONICA VIVEROS ROGEL