



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Profesor Patrocinante
Dr. Miguel Bronfman
Depto. de Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
P. Universidad Católica de Chile

Prof. co-Patrocinante
Dra. Gloria León
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile

Células HL-60 como modelo para el estudio del rol de PPARs
(receptores activados por proliferadores peroxisomales) en
diferenciación de células promielocíticas

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
grado de **Licenciado en
Bioquímica** y al Título profesional
de **Bioquímico**.

Susan Fabiola Martínez Jahnke

Valdivia Chile 2002

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar al Dr. Miguel Bronfman por aceptarme en su laboratorio y por brindarme todo su apoyo desde mi llegada a Santiago y en el transcurso de esta tesis. Además, por darme “consejos acerca de la vida”, que siempre serán bienvenidos.

Agradezco a la Dra. Gloria León, que a través de su ramo de Bioquímica Clínica despertó mi interés por el área biomédica y porque siempre tuvo tiempo para recibirme en su oficina, aunque tuviera mucho trabajo. Y por supuesto doy las gracias a todos mis profesores de la Universidad Austral que contribuyeron en mi formación como profesional.

Agradezco a todos mis amigos del laboratorio, por las conversaciones alrededor de la mesa, discutiendo resultados y publicaciones, que me enseñaron a tener ese espíritu crítico (de buena forma claro) del que necesita todo científico. Y como no todo es ciencia, les agradezco por su amistad, por las palabras en el cafecito de media tarde y por sus frases de ánimo cuando algo no salía bien.

Por sobre todo, agradezco de manera muy especial a mi familia, que me apoyó durante todo mi periodo en la Universidad y cuando tomé la decisión de venirme a Santiago, pues sabían que era lo que yo quería. Espero que ellos, al igual que yo, estén felices porque ya he terminado una etapa en la cual ellos han contribuido en gran parte.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el financiamiento de FONDECYT 1990155, FONDAP13980001 e Instituto MILENIO.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE FIGURAS y TABLAS	iv
	LISTA DE ABREVIATURAS vi
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Los receptores activados por proliferadores peroxisomales PPARs	5
2.2 CD36 como blanco directo de PPAR γ	7
2.3 ABCA1, regulador del transporte reverso de colesterol y gen blanco indirecto de PPAR γ	8
2.4 Acidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como ligandos de PPARs	9
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 MATERIALES	16
3.1.1 Cultivo celular	16
3.1.2 Reactivos químicos y enzimas	16
3.1.3 Programas computacionales	17
3.2 MÉTODOS	18
3.2.1 Cultivo celular	18
3.2.1.1 Viabilidad celular	18
3.2.1.2 Diferenciación celular de HL-60 a macrófagos	18
3.2.1.3 Diferenciación celular de HL-60 a granulocitos	19
3.2.2 Preparación de ácidos grasos y medios con ácidos grasos	19
3.2.2.1 Tratamiento de HL-60 con ácidos grasos	20
3.2.3 Extracción de ARN total	20
3.2.3.1 Método de Chomczynski para obtención de ARN total	20
3.2.3.2 Electroforesis de ARN en geles de agarosa	21
3.2.4 Estudio de expresión de genes usando la técnica RT-PCR	22

3.2.4.1 Elección y diseño de partidores	22
3.2.4.2 Reacción de transcripción reversa	22
3.2.4.3 Estandarización de las reacciones de PCR	23
3.2.4.3.1 Optimización de la reacción de PCR utilizando el kit QuantumRNA β -actin	23
3.2.4.4 Amplificación por PCR de PPAR α , PPAR δ y PPAR γ	24
3.2.4.5 Amplificación del transportador ABCA1 por PCR	25
3.2.4.6 Amplificación de CD36 por PCR	25
3.2.4.7 Electroforesis en geles de agarosa	26
3.2.5 Purificación de los fragmentos de PCR	26
3.2.6 Digestión con enzimas de restricción	26
4. RESULTADOS	28
4.1 Diferenciación celular	28
4.1.1 Diferenciación celular de HL-60 a macrófagos	28
4.1.2 Diferenciación celular de HL-60 a granulocitos	29
4.2 Las células HL-60 expresan las tres isoformas de PPAR	30
4.3 Expresión de ABCA1 y CD36 en HL-60	31
4.4 Cortes con enzimas de restricción	32
4.5 Optimización del PCR con el kit QuantumRNA β -actin	32
4.6 Expresión de los PPARs en la diferenciación celular	35
4.6.1 Diferenciación de las células HL-60 por la vía monocítica	35
4.6.2 Diferenciación de las células HL-60 por la vía granulocítica	36
4.7 Expresión de genes blanco de PPAR γ en la diferenciación monocítica de células HL-60	41
4.8 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en los niveles de expresión de PPARs y sus genes blanco	44
4.8.1 Efecto de PUFAs sobre la proliferación celular	44
4.8.2 Efecto de PUFAs sobre la diferenciación celular	45
4.8.3 Efecto de PUFAs sobre la expresión de PPARs, ABCA1 y CD36 en células HL-60	49

4.9 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados sobre la diferenciación de las células HL-60 a macrófagos	52
5. DISCUSIÓN	55
6. BIBLIOGRAFÍA	64

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura N°1	Estructura general de receptores nucleares de la subfamilia PPARs	11
Figura N°2	Mecanismo de activación de PPARs y regulación de la transcripción génica por estos receptores nucleares	12
Figura N°3	Modelo de acción de PPAR γ en aterosclerosis	13
Figura N°4	Diferenciación de HL-60 a macrófagos	28
Figura N°5	Diferenciación de HL-60 a granulocitos	29
Figura N°6	Expresión de PPARs en la línea celular HL-60	30
Figura N°7	Expresión de ABCA1 y CD36 en HL-60	31
Figura N°8	Verificación de los tamaños moleculares por corte con enzimas de restricción	33
Figura N°9	Optimización del PCR para PPARs utilizando el kit QuantumRNA β -actin	34
Figura N°10	Aumento en la expresión de PPAR δ y PPAR γ con la diferenciación celular a macrófagos	37
Figura N°11	La expresión de PPAR α no varía durante el transcurso de la diferenciación a macrófagos	38
Figura N°12	La expresión de PPAR α y PPAR δ aumenta en HL-60 diferenciadas a granulocitos	39

Figura N°13	La expresión de PPAR γ no está afectada durante la diferenciación a granulocitos	40
Figura N°14	Aumento en la expresión de ABCA1 con la diferenciación a macrófagos	42
Figura N°15	Inducción en la expresión de CD36 con la diferenciación a macrófagos	43
Figura N°16	Efecto de PUFAs sobre la proliferación de células HL-60	46
Figura N°17	Efecto de PUFAs sobre la diferenciación de células HL-60 inducida por TPA	47
Figura N°18	Los PUFAs no afectan la morfología celular	48
Figura N°19	Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la expresión de PPARδ y PPARγ	50
Figura N°20	Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la expresión de ABCA1 y CD36	51
Figura N°21	Efecto de los PUFAs sobre la expresión de PPAR δ y PPAR γ en la diferenciación a macrófagos	53
Figura N°22	Efecto de los PUFAs sobre la expresión de ABCA1 y CD36 en la diferenciación a macrófagos	54
TABLA N°1	Partidores utilizados en las reacciones de PCR	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidónico
ADN	ácido desoxirribonucleico
Agarosa LMP	agarosa de bajo punto de fusión
AR	ácido retinoico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
COX	ciclooxigenasa
DEPC	dietilpirocarbonato
DHA	ácido docosahexaenoico
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleótidos
EPA	ácido eicosapentaenoico
HDL	high density lipoproteins (lipoproteínas de alta densidad)
IL	interleuquina
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
kDa	kilodalton
LDL	low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)
LXR α	liver X receptor α
NBT	nitroblue tetrazolium
oxLDL	LDL oxidada

pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción de polimerización en cadena
PPARs	Peroxisome Proliferator Activated Receptors (Receptores activados por proliferadores peroxisomales)
PPRE	PPAR response element (elemento de respuesta a PPAR)
PUFA	Polyunsaturated fatty acid (ácido graso poliinsaturado)
RT	transcripción reversa
RXR	receptor de ácido 9-cis-retinoico
SFB	suero fetal bovino
TAE	tampón Tris-acetato EDTA
TPA	forbol-12-miristato-13-acetato
15-d-PGJ ₂	15-deoxi-prostaglandina J ₂

1. RESUMEN

Las células promielocíticas humanas HL-60 han sido ampliamente utilizadas en el estudio de las vías de transducción de señales involucradas en diferenciación celular. Estas células, pueden diferenciarse tanto a macrófagos como a granulocitos. Entre las vías involucradas en la diferenciación de monocitos a macrófagos humanos, la más recientemente descubierta es la de los PPARs (peroxisome proliferator activated receptors). Entre las vías controladas por PPARs, destaca la homeostasis del colesterol en macrófagos, mediando la expresión de receptores como el receptor de lipoproteínas oxidadas (CD36) y transportadores como ABCA1, que media el transporte de colesterol. El objetivo de esta tesis fue validar las células HL-60 como modelo para el estudio de la función de estos receptores en la diferenciación de células promielocíticas. Dado que para los PPARs, tanto los ácidos grasos esenciales como diversos eicosanoides han sido propuestos como ligandos fisiológicos, estudiamos además el efecto que tiene la adición de ácido araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) al medio de cultivo en la diferenciación de HL-60, y en la expresión de genes blanco de macrófagos.

Los resultados sugieren que las células HL-60 expresan las tres isoformas de PPAR (α , β/δ y γ). La expresión de PPAR γ y PPAR δ aumenta en el proceso de diferenciación a macrófagos, no encontrándose mayor efecto por la adición de ácidos grasos esenciales. Los genes blanco como CD36 y ABCA1 están en mayores niveles en la diferenciación a macrófagos, sin embargo su expresión tampoco se ve influenciada mayormente por los ácidos grasos. En contraste, al diferenciar las células a granulocitos, aumenta la expresión de PPAR α y PPAR δ , sin cambios aparentes en PPAR γ .

SUMMARY

Human HL-60 promyelocytic cells have been extensively used in the study of signal transduction pathways involved in cell differentiation. HL-60 cells can differentiate both to macrophage-like or granulocyte-like cells. Among the signaling pathways participating in the differentiation of human monocytes to macrophages, the most recently involves the PPARs (peroxisome proliferators activated receptors). PPARs control cholesterol homeostasis in macrophages, where these nuclear receptors determine the expression of proteins such as the oxidized lipoprotein receptor (CD36) and the ABCA1 transporters, which mediate the transport of cholesterol. The main objective of this Thesis was the validation of HL-60 cells as a model for studying the role of these receptors in the differentiation of myeloid cells. Since essential fatty acids and various eicosanoids have been proposed to act as physiological ligands of PPARs, we additionally studied the effect of arachidonic (AA), eicosapentaenoic (EPA), and docosahexaenoic (DHA) acids on the differentiation of HL-60 cells and in the expression of macrophage target genes. We found that HL-60 cells express all three isoforms of PPARs (α , β/δ , and γ). The expression of PPAR γ and β/δ is increased during the differentiation to macrophages. No effect of essential fatty acids was observed on PPAR expression. Target genes such as CD36 and ABCA1 are present in higher levels in HL-60 cells differentiated to macrophages, however their expression is not affected by essential fatty acid addition. In contrast, when HL-60 cells are differentiated to granulocytes, the expression of PPAR α and β/δ is increased, without any apparent changes in PPAR γ expression.

2. INTRODUCCION

Las células promielocíticas humanas HL-60, establecidas a partir de células leucémicas, han sido extensamente usadas como modelo de diferenciación celular. Los ésteres de forbol inducen diferenciación de estas células a monocitos-macrófagos, mientras que el ácido retinoico induce su diferenciación a granulocitos. En la diferenciación de estas células a macrófagos, producida por ésteres de forbol (TPA), la activación de la isoforma b de proteína quinasa C (PKCb) parece ser necesaria y suficiente para inducir diferenciación (Macfarlane y Manzel, 1994). Poco se sabe acerca de las vías de señalización involucradas en la diferenciación granulocítica inducida por ácido retinoico, aunque existen evidencias de que el receptor RARa (receptor de ácido retinoico) estaría mediando la diferenciación de HL-60 a granulocitos (Collins et al, 1990).

La determinación de las vías de transducción de señales y de los factores involucrados en la diferenciación de células promielocíticas humanas a otros tipos celulares completamente diferenciados, como macrófagos y granulocitos, tienen una importancia fundamental en el diseño de fármacos y agonistas para el tratamiento de la leucemia. De hecho, el ácido retinoico se usa en el tratamiento clínico de las leucemias, en base a la transformación de una célula tumoral que prolifera constantemente, en una célula diferenciada terminalmente.

Recientemente se ha demostrado que en la diferenciación terminal de monocitos humanos a macrófagos hay un incremento de un nuevo tipo de receptor nuclear, el PPARg (peroxisome proliferator activated receptor gamma). Este factor de transcripción

forma heterodímeros con el receptor del ácido 9 cis-retinoico (RXR). Este factor nuclear aumenta su expresión al diferenciar las células a macrófagos, y ha sido demostrado que regula la expresión del receptor CD36, que une LDL oxidada (LDL_{ox}), estimulando tanto la unión de LDL_{ox} como su internalización (Tontonoz *et al*, 1998). Por otra parte, también se ha demostrado que PPAR_γ incrementa la expresión de otro receptor nuclear, el LXR, que a su vez aumenta la expresión del transportador ABCA1 (Chawla *et al*, 2001 (a), que transfiere colesterol intracelular a HDL. De esta manera, PPAR_γ parece ser un gen maestro en el transporte reverso de colesterol y en la expresión de genes característicos de macrófagos maduros, involucrándolo directamente en aterosclerosis. Este hecho, además de su posible vínculo con el proceso de diferenciación de células promielocíticas y su relación con el tratamiento de leucemias, ha despertado un enorme esfuerzo en la investigación sobre agonistas y antagonistas de este factor de transcripción.

No se conoce exactamente el o los ligandos de PPAR_γ aunque hay evidencia de que diversos eicosanoides como hidroxiácidos y prostaglandinas podrían ser sus ligandos naturales. Por otra parte, tampoco se sabe si este factor de transcripción o algunas de las otras isoformas de PPAR (PPAR_α y PPAR_β conocido también como PPAR_γ), están involucradas directamente en el proceso de diferenciación.

En este contexto, nos pareció de interés determinar si las células HL-60, por su capacidad de diferenciarse tanto a macrófagos como a granulocitos, podían ser un buen modelo para determinar la importancia general de los PPAR en el proceso de diferenciación, con especial énfasis en su diferenciación a macrófagos. Para ello

determinamos la presencia de PPARs y estudiamos si, de la misma forma que en monocitos humanos, su expresión aumenta en el proceso de diferenciación a macrófagos, y si sus genes blanco, tanto directos (CD36) como indirectos (ABCA1), también lo hacen.

Por otra parte, dado que los putativos ligandos naturales de PPARs (eicosanoides) se generan a partir de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) hemos considerado de interés determinar si la incorporación de PUFAs en el medio de incubación, influencia los niveles de expresión de los PPARs y si las células en presencia de PUFAs reaccionan diferencialmente a estímulos de transformación a macrófagos.

2.1 Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs)

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) son factores de transcripción activados por ligandos y miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Dentro de la superfamilia de receptores nucleares, los PPARs pertenecen al grupo que incluye al receptor de vitamina D, el receptor de hormona tiroidea y el receptor de ácido retinoico. Esta superfamilia se caracteriza por su estructura (Fig.1), compuesta de un dominio aminoterminal (A/B) con función de trans-activación independiente de ligandos y unión de correprosores, un dominio de unión a DNA (dominio C o DBD) formado por dos dedos de Zinc y un motivo α -hélice de unión a DNA y el dominio de unión a ligando (E) que realiza la función de activación dependiente de ligando, la dimerización con otros receptores y el reclutamiento de co-factores

necesarios para la transcripción (Michalik y Wahli, 1999). El dominio E de los PPARs es dos a tres veces más grande que otros receptores nucleares, lo cual explica la amplia gama de ligandos de los PPARs. Este dominio está compuesto por cuatro hojas β y trece hélices α , de las cuales la α -hélice carboxilo-terminal, denominada AF-2 (activator function 2) cierra el bolsillo de unión de ligandos al formar una estructura denominada “trampa para ratones”, cambio conformacional que permite el reclutamiento de los cofactores de activación.

Como ya se ha mencionado, existen tres subtipos o isoformas de PPAR (α , β/δ y γ), los cuales están codificados por tres genes diferentes, cada uno está altamente conservado entre diferentes especies. Los PPARs pueden ser activados por compuestos endógenos y exógenos, como eicosanoides y algunas drogas como los fibratos y WY14,643 (proliferadores peroxisomales), que activan preferencialmente a PPAR α (Devchand *et al*, 1996). PPAR γ es activado por 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J_2 y por agentes sensibilizadores a la insulina, tiazolidinedionas, como troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona y BRL $_{49653}$ (Michalik y Wahli, 1999). No se conoce mucho acerca de la función de PPAR δ , aunque recientemente se ha descrito un agonista específico, GW501516 (Oliver *et al*, 2001).

Los PPARs se encuentran en los tejidos expresados diferencialmente. Así por ejemplo, PPAR α se detecta principalmente en hígado, riñón, corazón, tejido adiposo café e intestino y regula principalmente genes involucrados en la β -oxidación peroxisomal y el

metabolismo lipoproteico (Lemberger *et al*, 1996). PPAR α también suprime la apoptosis en hepatocitos de rata en cultivo y reduce la respuesta inflamatoria (Devchand *et al*, 1996; Roberts *et al*, 1998; Staels *et al*, 1998). PPAR γ se encuentra predominantemente en tejido adiposo, intestino y macrófagos, incluyendo las células espumosas de lesiones ateroscleróticas. PPAR γ juega un rol fundamental en la adipogénesis (Tontonoz *et al*, 1995), regulando además, la activación de macrófagos (Ricote *et al*, 1998) y recientemente, se ha visto involucrado en la salida de colesterol desde este tipo celular (Chawla *et al*, 2001(a)). Por otra parte, PPAR δ se expresa en la mayoría de los tejidos y principalmente en el sistema nervioso central, pero su función no ha sido completamente dilucidada. Los PPARs forman heterodímeros con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se unen a los elementos de respuesta presentes en el DNA, también llamados PPRES, con la consiguiente modulación de genes blanco (Fig.2).

2.2 CD36 como blanco directo de PPAR γ

Un gen conocido por ser blanco directo de PPAR γ , es el receptor “scavenger” CD36. Este receptor que pertenece a la clase B de receptores “scavenger”, es una proteína de 88 kDa, altamente glicosilada. Esta proteína participa en la captación de LDLox (Tontonoz *et al*, 1998), además une ácidos grasos, fosfolípidos aniónicos (incluyendo fosfatidilinositol y fosfatidilserina) y las proteínas colágeno y tromboespondina. La distribución de CD36 favorece tejidos con alta capacidad metabólica para ácidos grasos como tejido adiposo, corazón y músculo esquelético. Ratones transgénicos que sobre-expresan CD36 en músculo esquelético muestran aumento de la oxidación de ácidos

grasos, disminuyendo los ácidos grasos circulantes y triacilgliceroles, que es acompañado por una disminución en la deposición de grasas. Además estudios *in vivo* de ratas hipertensas espontáneas, las cuales tienen un defecto en el transporte de ácidos grasos de cadena larga en adipocitos y que presentan diabetes tipo 2, se demostró que tienen un gen CD36 mutante (Fabbraio *et al*, 2001).

2.3 ABCA1, regulador del transporte reverso de colesterol y gen blanco indirecto de PPAR γ .

En recientes trabajos se ha descrito la participación conjunta de diversas moléculas en la regulación del flujo de colesterol de las células. Así, junto con PPAR γ y CD36 se ha descrito que el transportador ABCA1 estaría jugando un rol fundamental en este proceso (Fig.3), (Chawla *et al*, 2001(a); Chinetti *et al*, 2001).

Dentro de la célula los transportadores ABC están presentes en la membrana plasmática, peroxisomas, retículo endoplásmico, complejo de Golgi, mitocondria y vesículas secretorias intracelulares. Sustratos que son translocados por estos transportadores incluyen lípidos, péptidos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, iones y xenobióticos (Decottignies y Goffeau, 1997; Klein *et al*, 1999). ABCA1 es un polipéptido de 2210 aminoácidos con un peso molecular de 220KDa y representa el prototipo de transportadores ABC de la subfamilia A. La deficiencia de ABCA1 causa la enfermedad de Tangier, patología caracterizada por bajos niveles plasmáticos de HDL y acumulación de ésteres de colesterol en varios tejidos como hígado, bazo y mucosa

intestinal. Los macrófagos, presentes como células espumosas en los tejidos afectados, es el principal tipo celular que acumula este exceso de colesterol. ABCA1 está implicado en el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos, mediado por ApoA1 (Bodzioch *et al*, 1999; Brooks-Wilson *et al*, 1999; Rust *et al*, 1999), por lo tanto constituye una importante vía en procesos como la aterogénesis. Se ha mostrado que la expresión de ABCA1 en macrófagos y fibroblastos se ve inducida por la activación de otro receptor nuclear, LXR α , el cual es activado por oxisteroles. El receptor nuclear LXR α es un gen blanco de PPAR γ , por lo tanto juntos cooperan en la regulación de la expresión de ABCA1 y en el control de la salida de colesterol. Además LXR α está involucrado en la conversión metabólica de colesterol a ácidos biliares. En ratones nulos en LXR α se ha visto que fallan en inducir la expresión del gen que codifica la 7 α -hidroxilasa (Cyp7a), enzima limitante en la síntesis de ácidos biliares en respuesta al colesterol de la dieta (Peet *et al*, 1998, a y b), por lo que este receptor también tiene un importante rol en la homeostasis del colesterol.

2.4 Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como ligandos de PPARs

Los ácidos grasos son moléculas biológicas usadas como combustible metabólico, como reguladores covalentes de moléculas de señalización, y como componentes esenciales de membranas celulares. Esto implica que existen circuitos regulatorios los cuales pueden censar cambios en los niveles de ácidos grasos. Niveles alterados de ácidos grasos o de sus metabolitos están asociados con obesidad, aterosclerosis, hipertensión y diabetes (Forman *et al*, 1997). Se ha demostrado que los ácidos grasos

pueden activar a los PPARs o dar origen a metabolitos que pueden actuar como ligandos de estos receptores (Forman *et al*, 1997; Kliewer *et al*, 1997; Krey *et al*, 1997).

En este contexto nos interesó estudiar en diferenciación a macrófagos, el rol de diversos ácidos grasos como EPA y DHA, los cuales son conocidos por tener acciones protectoras en los procesos aterogénicos, además de ser cardio y neuroprotectores (Kinsella *et al*, 1990). El ácido araquidónico por medio de las ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX), puede dar origen a diversos metabolitos que sirven como ligandos de estos receptores nucleares. En nuestro laboratorio se ha determinado anteriormente que las células HL-60 al ser tratadas con ácidos grasos, éstos se incorporan a la célula. AA y EPA se incorporan preferentemente como fosfolípidos y DHA como triglicéridos, lo que también ocurre cuando las células son diferenciadas a macrófagos.

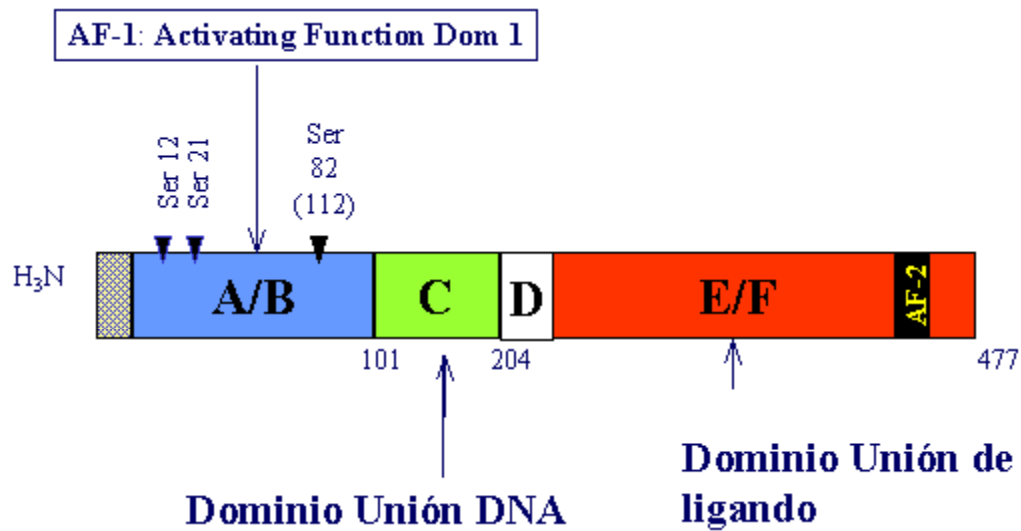


Fig.Nº1: Estructura general de receptores nucleares de la sub-familia PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors).

Los receptores nucleares presentan tres dominios principales: A/B dominio de transactivación independiente de ligandos con sitios de activación dependientes de fosforilación. C, dominio de unión a DNA, altamente conservado. E/F dominio de unión a ligando, de secuencia poco conservada, con sitios de unión a otras proteínas donde se destaca la heterodimerización con RXR y la asociación de proteínas co-activadoras de la transcripción (CREB, CBP, p160).

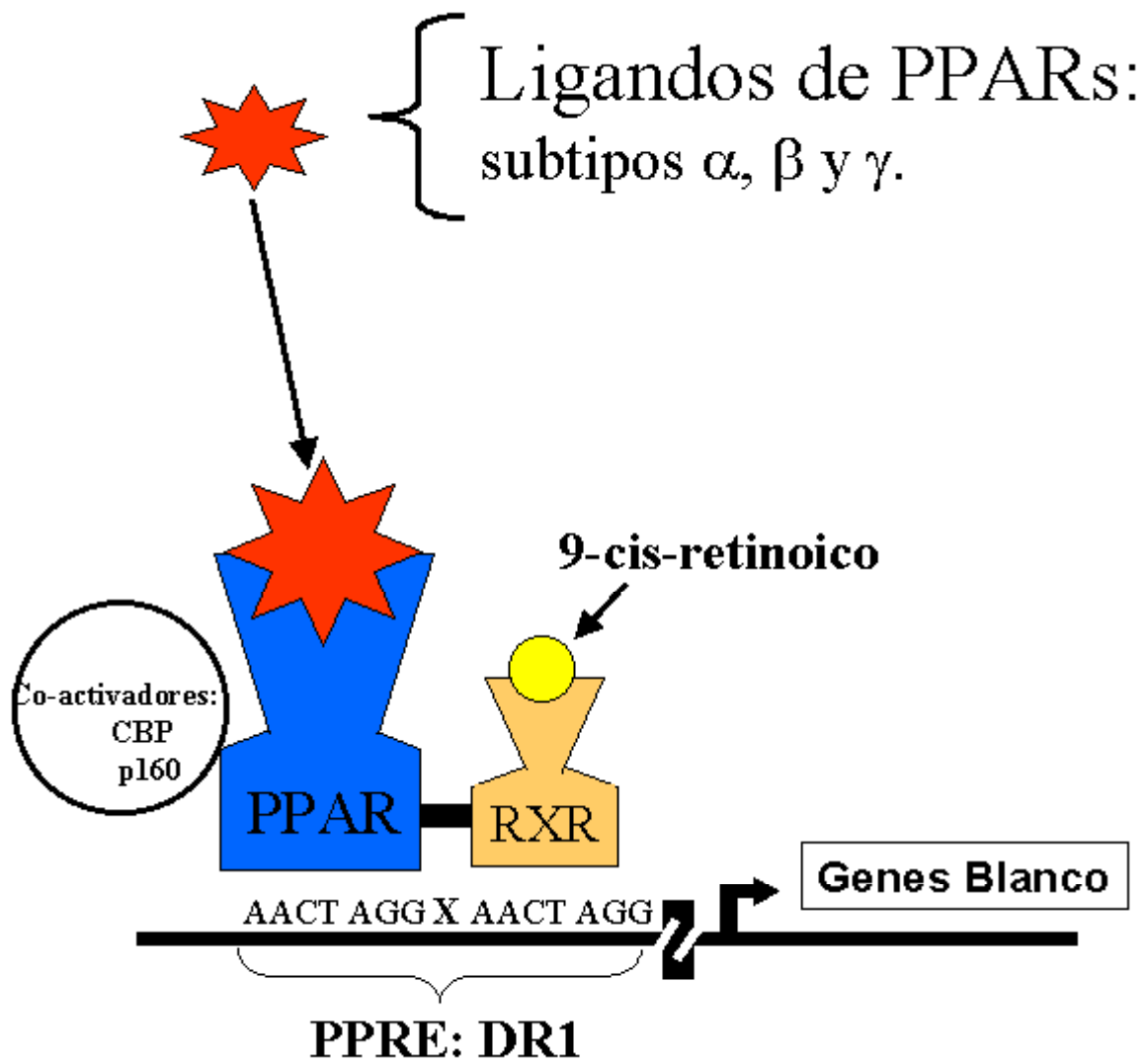


Fig.Nº2: Mecanismo de activación de PPARs y regulación de la transcripción génica por estos receptores nucleares.

La asociación de los ligandos a los PPARs permite la heterodimerización con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y su unión a los elementos de respuesta presentes en el DNA, llamados PPRES, con la consiguiente modulación de genes blanco.

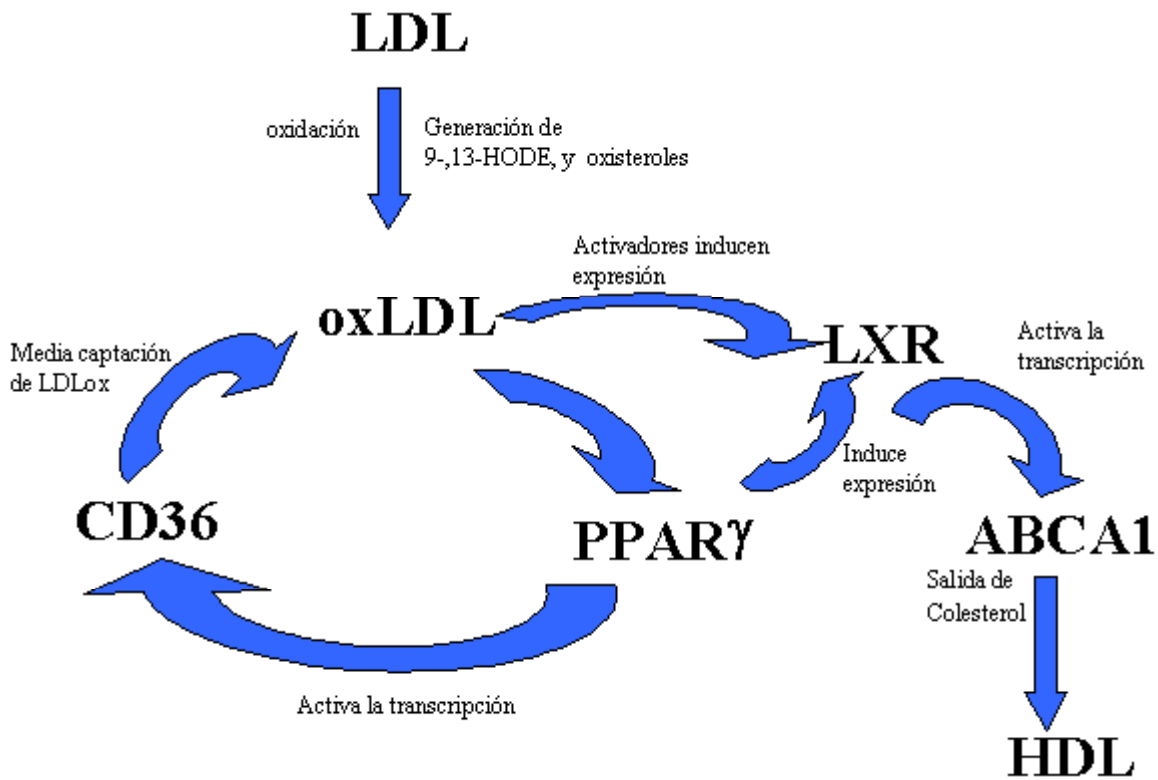


Fig.Nº3 Modelo de acción de PPAR γ en aterosclerosis.

Inicialmente la captación de LDLox por los macrófagos resulta en una inducción de PPAR γ , liberación de ligandos (como 9- y 13-HODEs), y la inducción de genes blanco como CD36 y LXR α . El incremento en la expresión de CD36 facilita la endocitosis de LDLox, resultando en más altos niveles intracelulares de oxisteroles. Estos niveles pueden estimular la salida de colesterol celular por activación de LXR α y consiguiente aumento en la expresión de ABCA1. Así PPAR γ se ha propuesto como modulador de la vía de captación de oxLDL y la vía de salida de colesterol celular (De acuerdo a Tontonoz et al, 1998.).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las células promielocíticas humanas HL-60 al diferenciarse a macrófagos incrementarían su contenido en PPAR γ y activarían los genes blancos de este factor de transcripción, constituyendo así un buen modelo para estudiar el rol de los PPARs en el proceso de diferenciación monocítica. Los ácidos grasos poliinsaturados, precursores de los putativos ligandos fisiológicos de PPAR, pueden modificar los niveles de expresión de PPARs inducidos en la diferenciación de células HL-60, y/o sus genes blanco. Dada la participación de PPARs en los procesos de diferenciación celular las células HL-60 también constituyen un buen modelo para estudiar la diferenciación hacia la vía granulocítica y la participación de estos receptores nucleares en este proceso.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de los PPARs en el proceso de diferenciación celular de la línea HL-60, tanto por la vía monocítica como granulocítica, así como la expresión de genes blanco de PPAR γ , con el objeto de validar esta línea celular como modelo de estudio de las vías de transducción de señales involucradas en la diferenciación de células promielocíticas humanas a otros tipos celulares. Estudiar el efecto de ácidos grasos poliinsaturados, precursores putativos de los ligandos de PPAR, en el proceso de diferenciación de HL-60 a macrófagos, en la expresión de PPARs y de genes blanco de PPAR γ .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Monitorear en el proceso de diferenciación de la línea celular HL-60 a macrófagos, la expresión de las tres isoformas de PPAR.
- ❖ Medir la expresión de estos receptores nucleares en el proceso de diferenciación a granulocitos.
- ❖ Establecer el patrón de expresión de CD36 y ABCA1 en el proceso de diferenciación celular monocítica de HL-60.
- ❖ Dilucidar si los ácidos grasos poliinsaturados utilizados pueden influir en el patrón de expresión de los PPARs, CD36 y ABCA1.

Estudiar si los distintos ácidos grasos utilizados pueden influenciar el proceso de diferenciación celular monocítica.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 CULTIVO CELULAR.

Se utilizó la línea celular promielocítica humana HL60, las cuales son capaces de diferenciarse a macrófagos o a granulocitos.

3.1.2 REACTIVOS QUÍMICOS Y ENZIMAS.

De Ambion se obtuvo el kit para PCR Quantum β -actin.

De Cayman Chemical se obtuvo ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA).

De Clontech se obtuvo la enzima Advantage cDNA Polymerase Mix.

De Hamilton Company se obtuvieron jeringas Hamilton.

De Life Technologies se obtuvo suero fetal bovino (SFB), medio de cultivo RPMI 1640, el antibiótico estreptomina, azul Tripán, la enzima transcriptasa reversa "SuperScript II RNasa H, DTT, agarosa, agarosa de bajo punto de fusión, el kit "Concert Rapid Gel Extraction System" para extracción de ADN desde geles de agarosa de bajo punto de fusión, bromuro de etidio, marcador de 100pb para geles de agarosa.

De Merck se obtuvo propanol, hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, etanol absoluto, metanol absoluto.

De Promega Inc. se obtuvo Taq DNA polimerasa, desoxinucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP, marcador de peso molecular "100 pb ladder" para electroforesis de ADN en geles de agarosa.

De Sigma Chemicals Co. se obtuvo isoamilalcohol, ácido retinoico (all trans), NBT, TPA

De Winkler Ltda. (Santiago, Chile) se obtuvo solución de Chomczynski con fenol.

3.1.3 PROGRAMAS COMPUTACIONALES

Trabajo de imágenes: IMAGE Express 4.0 software (Media cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Análisis de ácidos nucleicos y generación de partidores de PCR: Biowire “Jellyfish” (Biowire.com)

Cuantificación de bandas: programa Scion Image (www.scioncorp.com)

3.2. MÉTODOS

3.2.1 CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea celular HL-60, la cual es capaz de diferenciarse a macrófagos por tratamiento con el éster de forbol TPA y a granulocitos con ácido retinoico. Se cultivan a una densidad de 2 a 4×10^5 células/ml en medio RPMI 1640 5% SFB, 2mmol/L glutamina, penicilina 100U/ml y estreptomycin 100 μ g/ml.

3.2.1.1 VIABILIDAD CELULAR

Se toma una alícuota de la suspensión celular y se diluye 10 veces con azul de Tripán, realizando un conteo en cámara de Neubauer y clasificando como muertas aquellas que incorporan el colorante azul. La viabilidad fue siempre mayor al 95%.

3.2.1.2 DIFERENCIACIÓN CELULAR DE HL-60 A MACRÓFAGOS

Para la diferenciación a macrófagos las células se crecen a una densidad de 4×10^5 células/ml, las que se mantienen en su medio de cultivo por 24 o 48 hrs. Se realiza un conteo de células y se siembran 2×10^5 células/ml en cada T25 (frasco de 25cm²), en 5 ml de medio de cultivo que contiene TPA a concentración 10nM final. La diferenciación ocurre a las 24 hrs. de tratamiento. Los controles se realizan con DMSO al 0.05%. Anteriormente, en nuestro laboratorio se determinó que a este tiempo de tratamiento ocurre diferenciación celular, midiendo la expresión del receptor CD11b, reducción del NBT y cambios en la morfología (Bronfman *et al*, 1998). Por lo tanto en este estudio la diferenciación de las células se verificó sólo por medio de cambio en la morfología y por su capacidad de adherirse a la placa de cultivo.

3.2.1.3 DIFERENCIACIÓN CELULAR DE HL-60 A GRANULOCITOS

Las células HL-60 fueron sembradas a densidad de 1×10^5 células por ml e inducidas a diferenciar por tratamiento con ácido retinoico (all trans) $1 \mu\text{M}$ durante 6 días (Breitman *et al*, 1980). La diferenciación fue corroborada por reducción de NBT (nitroblue tetrazolium) y posterior tinción con Wright-Giemsa. La reducción de NBT se realiza con 2×10^6 células, las cuales se centrifugan y lavan con medio RPMI completo. Las células se resuspenden en un medio que contiene 0.1% de NBT y 100ng/ml de TPA, luego se incuban a 37°C por 20 minutos, finalmente se hace un frotis que se tiñe con la tinción de Wright-Giemsa para visualizar los granulocitos.

3.2.2 PREPARACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y MEDIOS CON ÁCIDOS GRASOS.

Los ácidos grasos utilizados se oxidan rápidamente al contacto con el aire por lo que deben ser preparados en una cámara cerrada con flujo de nitrógeno (N_2) para evitar la oxidación. Se toma una alícuota del ácido graso que viene en etanol y se seca bajo el flujo de N_2 . Una vez seco se resuspende en DMSO. Las soluciones de ácidos grasos en DMSO se guardan a -20°C .

La preparación de los medios con ácidos grasos también debe realizarse en cámara bajo flujo de N_2 . Se toma una alícuota de cada una de las soluciones preparadas en DMSO y se agrega al medio de cultivo completo preparado previamente. El medio con ácido graso se filtra bajo campana.

3.2.2.1 TRATAMIENTO DE HL-60 CON ÁCIDOS GRASOS

Para ver el efecto de los PUFAs sobre la expresión de genes se siembran 2×10^5 células/ml, para medir proliferación celular 1×10^6 cél/ml en cada frasco de 25cm^2 en 5 ml de medio de cultivo que contiene ácidos grasos y que ha sido recién preparado. Los ácidos grasos están a una concentración final de $10\mu\text{M}$, los controles se realizan con el vehículo que es DMSO al 0.05%. Los medios de cultivo con ácidos grasos se cambian cada 24 hrs.

3.2.3 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

3.2.3.1 MÉTODO DE CHOMCZYNSKI PARA OBTENCIÓN DE ARN TOTAL

Previo a la extracción de ARN se realiza el lavado de las células. Se utilizan entre $2-4 \times 10^6$ células. Cuando se encuentran en suspensión se centrifugan en tubos falcon de 15 ml a 1500 rpm por 5 minutos en centrífuga fría y se extrae el sobrenadante; el sedimento se lava con PBS 1x frío y se centrifuga nuevamente; este procedimiento se realiza dos veces. Cuando las células están adheridas a la placa, en el caso de los tratamientos con TPA, se lava con PBS 1x frío directamente a la placa.

Al sedimento obtenido o a la placa de cultivo, se agrega 1 ml de solución de Chomczynski con fenol y se homogeniza con jeringa tuberculina. Se traspasa a tubo eppendorf de 1.5 ml y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Se agrega $200\mu\text{l}$ de cloroformo:isoamilalcohol 49:1, se mezcla bien para la separación de las fases y se deja 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 15 minutos a 14000 rpm a 4°C . Se transfiere la fase acuosa (superior) a otro tubo eppendorf (el ADN y las proteínas permanecen en la interfase y en la fase fenólica), y se agrega 0.5 ml de isopropilalcohol,

se mezcla bien y se deja precipitar el ARN durante 1 hora a -20°C . Transcurrido ese tiempo se centrifuga 10 minutos a 14000 rpm a 4°C , se remueve el sobrenadante por inversión y al sedimento obtenido se agrega 1 ml de etanol 75% en agua DEPC, enfriado previamente a -20°C , se centrifuga nuevamente 5 minutos a 14000 rpm a 4°C , se remueve el etanol y se deja secar. Finalmente, el sedimento se resuspende en agua tratada con DEPC al 0.1%. Se deja 10 minutos en un baño a 50°C para que se solubilice el ARN. Luego se determina la concentración de RNA por espectrofotometría tomando 2 μl de ARN y llevándolo a 1 ml con agua DEPC, usando como blanco agua DEPC, se mide absorbancia a 260 y 280 nm. La cantidad de RNA se determina mediante la fórmula $A_{260} * 40 \mu\text{g/ml} * 500/1000 = X \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$. El RNA obtenido se guarda a -80°C .

3.2.3.2 ELECTROFORESIS DE ARN EN GELES DE AGAROSA

Para verificar la integridad del ARN extraído se preparan geles de agarosa/formaldehído disolviendo 1g de agarosa en 72 ml de H_2O y agregando 18 ml de formaldehído y 10 ml de tampón MOPS 10X. 1.5 μg de ARN se resuspenden en tampón de carga (100 μl MOPS 10X, 179 μl formaldehído 37%, 100 μl de solución de glicerol (30% glicerol+0.025% azul de bromofenol), 5 μl de bromuro de etidio (10mg/ml), 116 μl de H_2O DEPC, 500 μl de formamida. Se cargan las muestras y la corrida se realiza a 80 volts.

3.2.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES USANDO LA TÉCNICA RT-PCR

3.2.4.1 ELECCIÓN Y DISEÑO DE PARTIDORES.

Con el objetivo de amplificar PPAR α y PPAR γ la secuencia de los partidores fue obtenida de la literatura (Chinetti *et al*, 1998). Los partidores para PPAR δ y ABCA1 fueron diseñados con el programa Gellyfish disponible en internet, los cuales se verificaron que no formaran complementariedad entre ellos y que no generaran algún tipo de estructura secundaria. Todos estos partidores fueron purificados por HPLC. Los partidores para CD36 se obtuvieron de la literatura (Hirano *et al*, 1999). La secuencia de los partidores se muestra en la tabla N°1.

3.2.4.2 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

La reacción de transcripción reversa para los PPARs y ABCA1 se realizó utilizando 4 μ g de RNA en un volumen final de 20 μ l, el que contiene 50 U de SuperScript II Rnasa H y 4 μ l del tampón suministrado por la enzima (Tris-HCl 250mM pH 8.3, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM), 2 μ l DTT 0.1M, 1 μ l de los desoxinucleótidos 10mM cada uno y 495ng de oligo dT. El programa de transcripción reversa consistió en una incubación a 42°C por 60 minutos y luego a 72°C por 15 minutos.

Para la transcripción reversa de CD36 se utilizó 2 μ g de RNA, en un volumen final de 20 μ l en las mismas condiciones anteriores.

3.2.4.3 ESTANDARIZACIÓN DE LAS REACCIONES DE PCR

Para la estandarización de las reacciones de PCR se realizaron curvas de magnesio, concentración de cDNA y se determinó el número de ciclos óptimo para cada reacción de PCR, de manera de estar en la zona lineal de la curva y que sea un método semi-cuantitativo. Las especificaciones para la amplificación de cada gen se describen más adelante.

3.2.4.3.1 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR UTILIZANDO EL KIT QuantumRNA β -ACTIN

Para hacer la reacción de PCR de manera semi-cuantitativa, se debe amplificar nuestro gen de interés junto a un gen constitutivo, que en este caso fue β -actina, el cual sirve como control de carga. Debido a que los receptores nucleares se expresan a muy bajos niveles, cuando realizamos la reacción de PCR para alguno de los receptores nucleares en presencia de β -actina, amplifica sólo β -actina y no nuestro gen de interés, razón por la cual utilizamos este kit.

La tecnología de los competímeros de actina se utiliza para co-amplificar β -actina junto a otro gen de interés y consiste en que los competímeros están modificados en su extremo 3' para bloquear la extensión de la DNA polimerasa. Mezclando partidores de actina con cantidades incrementadas de competímeros de actina, la eficiencia de la amplificación de cDNA de actina puede ser reducida sin que los partidores lleguen a ser limitantes y sin pérdida de la cuantificación relativa. De esta manera este kit nos permite co-amplificar nuestro gen de interés junto a β -actina, de manera de poder después cuantificarlo. Para ello se utilizan distintas razones de partidor de β -actina y

competímero de actina, luego del cual se determina cuál es la mejor razón para nuestro gen de interés.

3.2.4.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE PPAR α , PPAR δ Y PPAR γ

La reacción de amplificación se realiza utilizando 4 μ l del producto de RT, en un volumen final de 25 μ l, el que contiene 2.5U de Taq DNA Polimerasa, 2,5 μ l del tampón suministrado por la enzima (Tris-HCl 20mM pH 8.0, KCl 100mM, EDTA 0.1mM, DTT 1mM, glicerol 50%, 0.5%Tween 20 y Nonidet-P40 0.5%), MgCl₂ 1mM, 0.5 μ l de los desoxinucleótidos 10nM cada uno, partidores específicos para cada PPAR, 1 μ l de 10 μ M cada uno, 2 μ l de la mezcla de partidor y competímero de β -actina .

Debido a que los PPARs se expresan a muy bajos niveles se utilizó el kit QuantumRNA β -actin para poder co-amplificar los PPARs y β -actina, y la relación usada de partidor: competímero fue de 1:9 para PPAR γ y PPAR δ y 2:8 para PPAR α .

El programa para amplificar PPAR α y PPAR δ consiste en desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, una amplificación de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, durante 28 ciclos, y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Para amplificar PPAR γ el programa utilizado fue: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 32 ciclos de: amplificación de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

3.2.4.5 AMPLIFICACIÓN DEL TRANSPORTADOR ABCA1 POR PCR.

Para la amplificación de ABCA1 se utilizó 5 μ l del producto de RT, en un volumen final de 25 μ l, el que contiene 2.5U de Taq DNA polimerasa, 2,5 μ l del tampón suministrado por el proveedor de la enzima (Tris-HCl 20mM pH 8.0, KCl 100mM, EDTA 0.1mM, DTT 1mM, 50% glicerol, 0.5% Tween 20 y Nonidet-P40 0.5%), MgCl₂ 1mM, 0.5 μ l de los cuatro desoxinucleótidos 10nM cada uno, partidores específicos, 1 μ l de 10 μ M cada uno y partidores de β -actina 1 μ l de 10 μ M cada uno.

El programa consiste en desnaturación inicial de 94°C por 5 minutos, amplificación consistente en 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, durante 34 ciclos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

3.2.4.6 AMPLIFICACIÓN DE CD36 POR PCR.

Para la amplificación de CD36 se utilizaron 2 μ l del producto de RT, en un volumen final de 25 μ l, el que contiene los cuatro desoxirribonucleótidos 0.2mM cada uno, los partidores para CD36 0.2 μ M cada uno y los partidores para GAPDH 0.05 μ M cada uno y 0.55 μ g de enzima Advantage cDNA polymerase mix. El programa de PCR consiste en desnaturación a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de amplificación consistente en: 94°C por 30 segundos, 68°C por 3 minutos, y una extensión final de 68°C por 3 minutos. Este experimento se realizó en colaboración con la Unidad de Citología, Bioquímica y Lípidos.

3.2.4.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

Los productos de RT-PCR obtenidos se resuelven por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE, utilizando un estándar de peso molecular de 100pb. La electroforesis se realiza a voltaje constante de 75 volts por aproximadamente 90 minutos. El gel se tiñe con bromuro de etidio y la fluorescencia emitida se observa en un transluminador UV.

3.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE PCR

El producto de PCR se resuelve por electroforesis utilizando agarosa de bajo punto de fusión, una vez identificada la banda de interés por visualización en un transluminador UV, se corta el trozo de gel y se purifica con el Kit “Concert Rapid Gel Extraction System” según las instrucciones del fabricante.

3.2.6 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para corroborar los tamaños moleculares de los amplificadores se realizaron cortes con enzimas de restricción.

Para PPAR α se utilizaron 100ng de producto de PCR purificado, y fue cortado con la enzima *Sma*I, dando origen a dos fragmentos de 156 y 795 pb. La digestión se realizó durante 2 horas a 30°C y luego una inactivación de la enzima a 65°C por 10 minutos.

Para PPAR δ y PPAR γ se utilizaron 300 ng de producto de PCR y fueron cortados con la enzima *Eco*RV. PPAR δ da origen a fragmentos de 310 y 570pb. PPAR γ da origen a fragmentos de 280 y 659pb. La digestión se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C y luego se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos. Para ABCA1 se utilizaron 150 ng de

producto de PCR purificado y fue cortado con la enzima *BanI*, dando origen a tamaños de 171 y 361 pb. La digestión se llevó a cabo durante 2 hrs. A 37°C y luego se inactivó la enzima a 65°C por 20 minutos.

TABLA N°1. PARTIDORES UTILIZADOS EN LAS REACCIONES DE PCR.

SECUENCIA 5'-----> 3'		
PPAR α	F R	GACGAATGCCAAGATCTGAGAAAGC CGTCTCCTTTGTAGTGCTGTCAGC
PPAR δ	F R	GGCATGTCACACAACGCTATCCG GCAGCGAGGTCTCGGTTTCGGTC
PPAR γ	F R	GGCAATTGAATGTCGTGTCTGTGGAGATAA AGCTCCAGGGCTTGTAGCAGGTTGTCTTGA
ABCA1	F R	GAGACTAACCAGGCAATCCG GCCGTGCCTCCTTCTCATAC
CD36	F R	TGTAACCCAGGACGCTGAGGAC GGCTGCATCTGTACCATTAATCATGT
β -actina	F R	AGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCC GCGAGGCCAGGATGGAGCCGCCG
GAPDH	F R	CACCACCATGGAGAAGGCTGG GGCAGTGATGGCATGGACTGTG

F= partidador río arriba

R= partidador río abajo

4. RESULTADOS

4.1 DIFERENCIACIÓN CELULAR

4.1.1 DIFERENCIACIÓN CELULAR DE HL-60 A MACRÓFAGOS

Las células HL-60 se indujeron a diferenciar a macrófagos usando TPA 10 nM en el medio de cultivo, por 24 h, como está descrito en Materiales y Métodos. La Fig.4 muestra microfotografías de contraste de fase representativas de células controles y tratadas. Se observa las células controles, redondeadas, que crecen en suspensión. En las células tratadas, prácticamente la totalidad de ellas están adheridas al sustrato, con un cambio morfológico evidente.

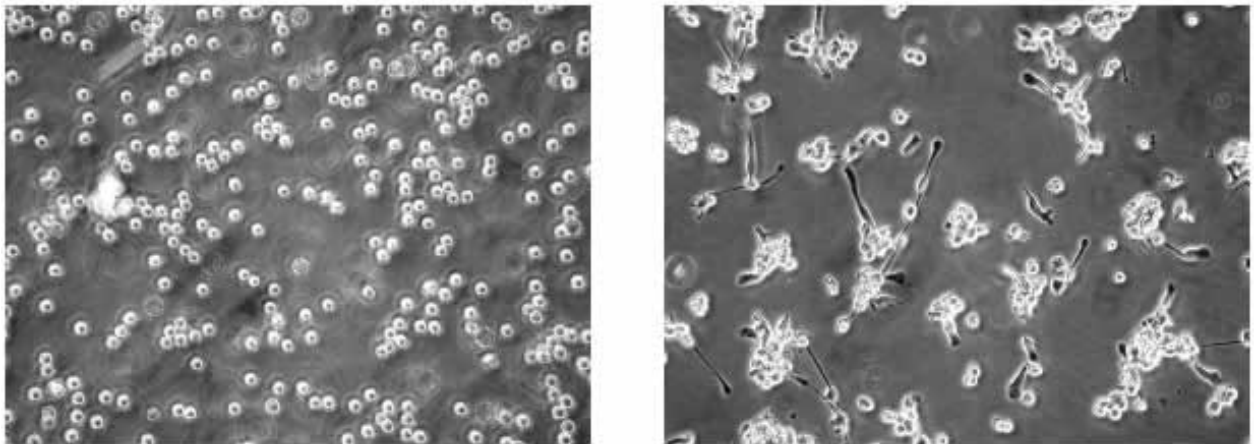


Fig.Nº4 Diferenciación de HL-60 a macrófagos

(a) células controles; (b) células tratadas por 24 h con TPA 10 nM.

4.1.2 DIFERENCIACIÓN CELULAR DE HL-60 A GRANULOCITOS

Las células HL-60 se indujeron a diferenciar a granulocitos, por tratamiento con ácido retinoico $1\mu\text{M}$ durante 6 días, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Para corroborar la diferenciación a granulocitos se realizó reducción de NBT y posterior tinción de Wright-Giemsa. Con este procedimiento aquellas células diferenciadas reducen el NBT, formando depósitos intracelulares, los que son visualizadas por la tinción, además presentan una forma irregular y un núcleo lobulado, característico de los neutrófilos. Las células controles no diferenciadas, en cambio, tienen una forma redonda muy regular y sin presencia de gránulos. La fig.5 muestra micrografías representativas de células controles y tratadas.

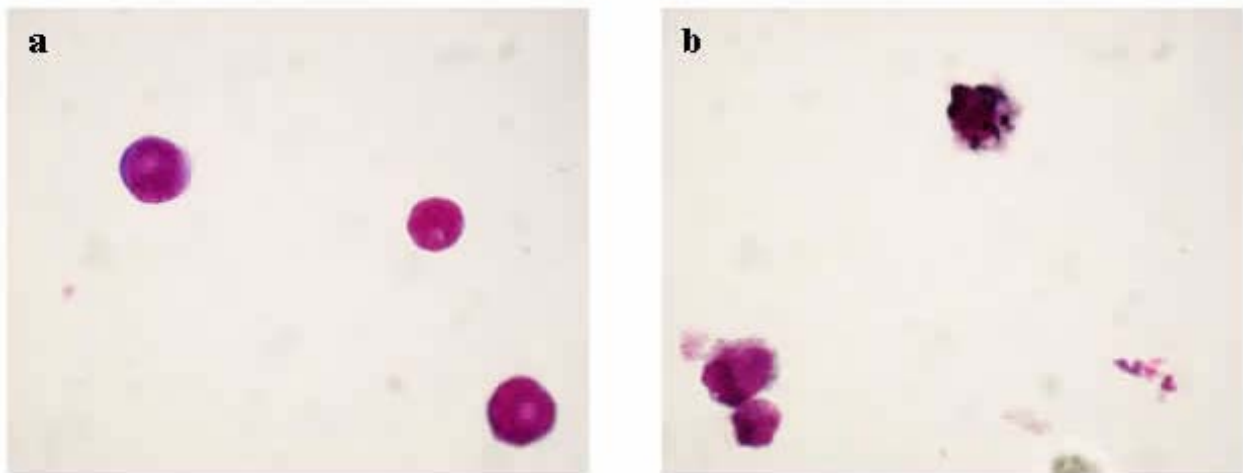


Fig.Nº5 Diferenciación de HL-60 a granulocitos

Células HL-60 controles (a) y tratadas con ácido retinoico por 6 días (b) se procesaron para reducción con NBT y tinción Wright-Giemsa. Se observa una forma irregular de las células diferenciadas con ácido retinoico y la presencia de depósitos intracelulares.

4.2 LAS CÉLULAS HL-60 EXPRESAN LAS TRES ISOFORMAS DE PPAR

Con el objetivo de utilizar la línea celular HL-60 para nuestros estudios, vimos en primer lugar el patrón de expresión de las tres isoformas de PPAR. La expresión se analizó por RT-PCR como se ha descrito en métodos. Como se muestra en la fig. 6, la línea celular HL-60 expresa las tres isoformas de PPAR. Los tamaños esperados para PPAR α , PPAR δ y PPAR γ son 951pb, 880pb y 939pb, respectivamente.

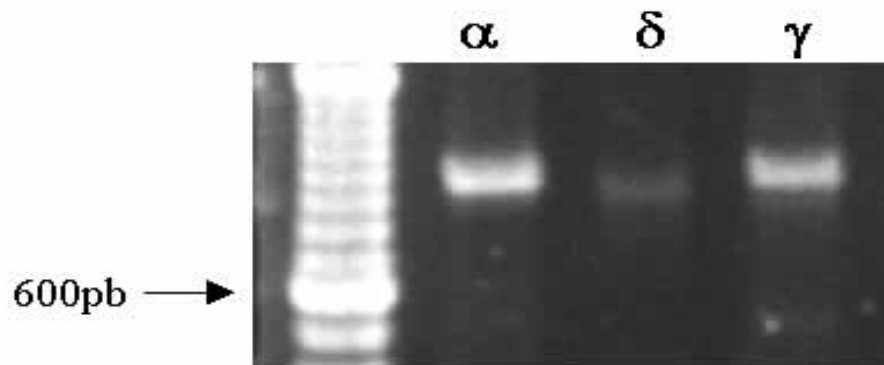


Fig.Nº6 Expresión de PPARs en la línea celular HL-60.

Las células HL-60 expresan las tres isoformas de PPAR. La expresión se determinó mediante RT-PCR, como se describe en métodos.

4.3 EXPRESION DE ABCA1 Y CD36 EN HL-60

La expresión de CD36, gen blanco directo de PPAR γ , y del transportador ABCA1, gen blanco indirecto de este factor de transcripción se determinó por RT-PCR. Pudimos constatar que el transportador ABCA1 se expresa en las células HL-60, mientras que el receptor CD36 no es detectado (Fig.7). Posteriormente, mostraremos controles positivos de expresión de CD36, el que aparece al diferenciarse las células HL-60 a macrófagos.

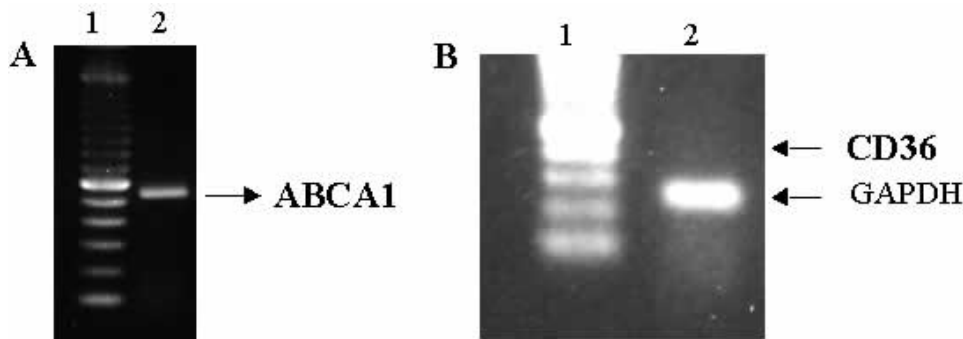


Fig.Nº7 Expresión de ABCA1 y CD36 en HL-60

La expresión se estudió mediante RT-PCR, como se describe en métodos. En (A), carril 2, vemos la expresión de ABCA1, cuyo tamaño es de 532pb, y en (B), carril 2 se muestra que CD36 (443pb) no se detecta, observándose sólo la expresión de GAPDH como control positivo. En ambos casos, el carril 1 contiene los estándares de peso molecular.

4.4 CORTES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Con el objetivo de determinar si efectivamente los productos amplificados por PCR corresponden a los genes de interés, se procedió a purificar el amplificado y luego realizar cortes con enzimas de restricción. PPAR α se cortó con la enzima *SmaI*, dando origen a los fragmentos esperados de 156 y 795 pb (Fig.8A). PPAR δ se cortó con *EcoRV*, dando origen a los fragmentos esperados de 310 y 570 pb (Fig.8B). PPAR γ se cortó con *EcoRV*, dando origen a dos fragmentos de 280 y 659 pb (Fig.8C). Finalmente, ABCA1 se cortó con *BanI*, dando origen a fragmentos de 171 y 361pb (Fig.8D).

4.5 OPTIMIZACION DEL PCR CON EL KIT QuantumRNA β -actin.

Para poder cuantificar las bandas de nuestro gen de interés debemos cuantificarlo con respecto a un gen constitutivo que sirve como control de carga, en este caso β -actina. Dado que los PPARs se expresan a muy bajos niveles utilizamos el kit QuantumRNA β -actina, para poder co-amplificar nuestro gen de interés con β -actina, y así poder hacerlo de manera semi-cuantitativa, como se explica en métodos. Se realizaron PCR con distintas proporciones de partidores de β -actina y de competímero, las proporciones utilizadas fueron 1:9, 2:8 y 3:7 (Fig.9). Para PPAR δ y PPAR γ utilizamos la relación 1:9, y para PPAR α 2:8.

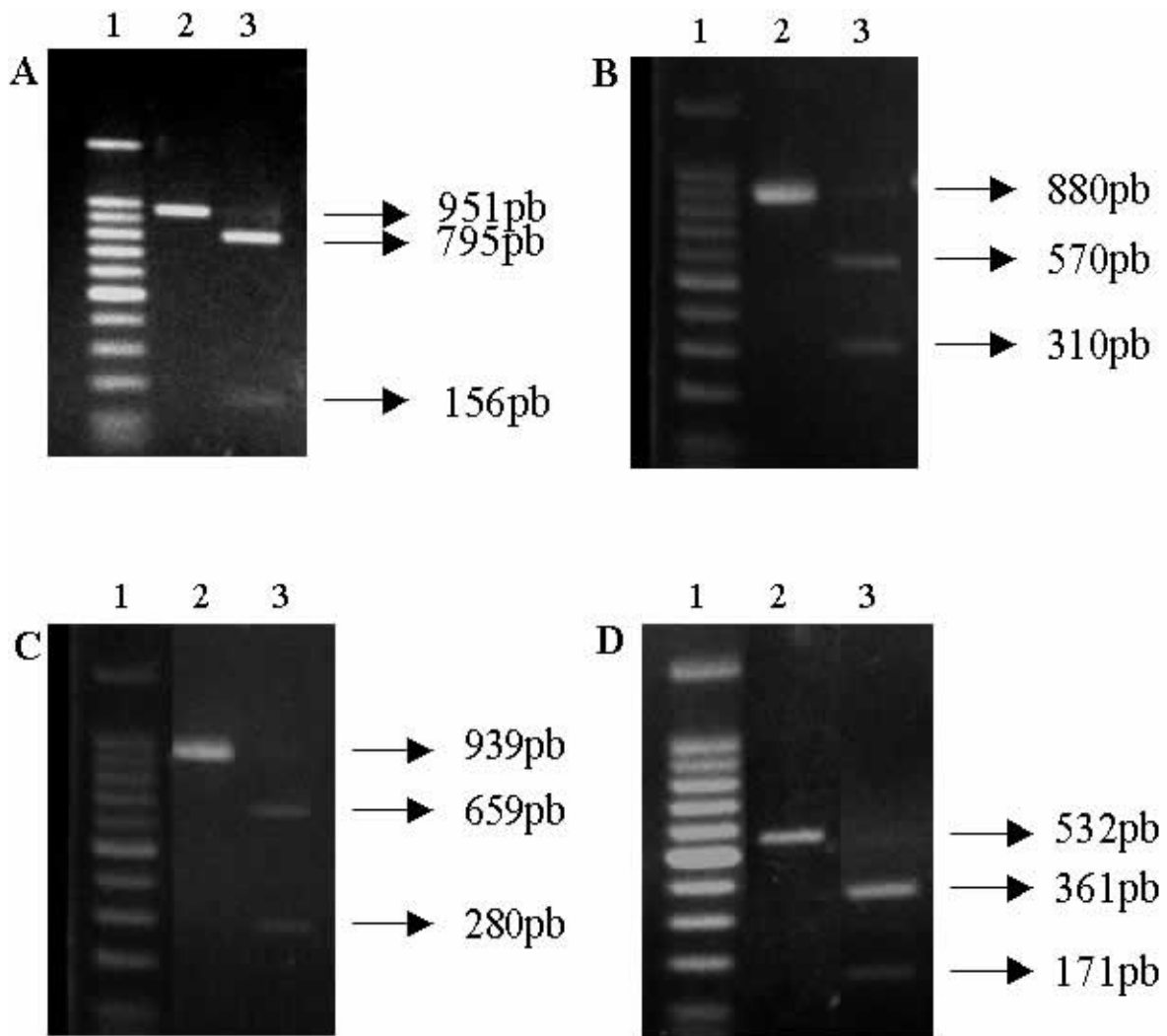


Fig.Nº8 Verificación de los tamaños moleculares por corte con enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR fueron purificados como se describe en métodos, realizando luego cortes con enzimas de restricción. En las fotos se observa en el primer carril un estándar de peso molecular de 100pb, en el segundo carril el fragmento purificado, y en el tercer carril los fragmentos obtenidos luego de la digestión con las enzimas. Se utilizó la enzima *SmaI* para *PPAR α* (A), *EcoRV* para *PPAR δ* (B) y *PPAR γ* (C), y *BanI* para *ABCA1*(D).

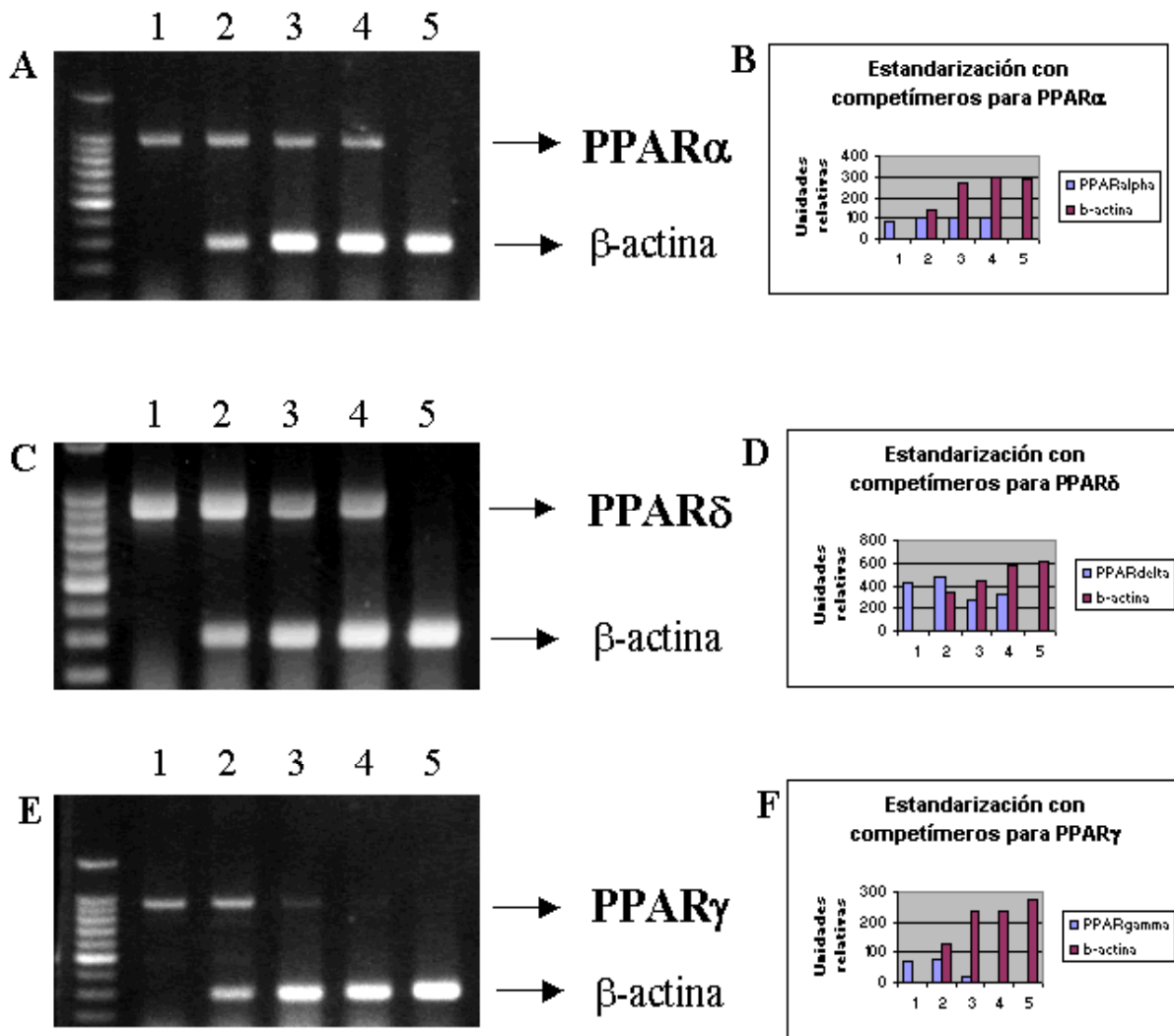


Fig.Nº9. Optimización del PCR para PPARs con el kit QuantumRNA β -actina

Se determinó la mejor proporción entre partidor de β -actina y competímero siguiendo las instrucciones del fabricante. En la figura se muestra la estandarización para PPAR α (A y B), PPAR δ (C y D) y PPAR γ (E y F). En el carril y barra 1 se observa la amplificación sólo con los partidores de PPAR adecuados para cada caso y sin partidores de β -actina, en el carril y barra 2, 3 y 4 se muestran proporciones de 1:9, 2:8 y 3:7 entre β -actina y competímero, respectivamente, más los partidores para cada PPAR, y en el carril y barra 5 se observa amplificación de β -actina con proporción 3:7, pero sin partidores de PPAR. Los gráficos muestran la cuantificación de las bandas con respecto al control de carga.

4.6 EXPRESIÓN DE PPARs EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS HL-60

4.6.1 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS HL-60 POR LA VÍA MONOCÍTICA. LA EXPRESIÓN DE PPAR β/δ Y PPAR γ AUMENTA EN LA DIFERENCIACIÓN DE CELULAS HL-60 A MACRÓFAGOS INDUCIDA POR TPA, MIENTRAS QUE LA DE PPAR α SE MANTIENE CONSTANTE.

Anteriormente se ha descrito que en macrófagos humanos existe un aumento en la expresión de PPAR γ (Tontonoz *et al*, 1998), en cuyo estudio se utilizan las células HL-60, las cuales se inducen a diferenciar en presencia de TPA 40ng/ml durante 24 hrs. En nuestro estudio vimos la expresión de las tres isoformas de PPAR en la diferenciación de células HL-60 a macrófagos, inducida por TPA 10 nM (6ng/ml) durante 24 hrs., una concentración mucho menor a la antes mencionada. Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la expresión de PPAR δ y también de PPAR γ (Fig. 10). mientras que la expresión de PPAR α se mantuvo constante.(Fig.11). Al momento de encontrar estos resultados no se había demostrado en la literatura aumento de PPAR δ en la diferenciación monocítica. Sin embargo en un artículo aparecido en noviembre del 2001 se encontró aumento de esta isoforma en la diferenciación monocítica en macrófagos humanos (Vosper *et al*, 2001), lo que confirma este resultado y justifica el uso de células HL-60 como modelo en el estudio de diferenciación de células promielocíticas. Este resultado es especialmente relevante, en función de la reciente demostración que PPAR β/δ sin ligando unido, regula la actividad transcripcional tanto de PPAR α como γ (Shi *et al*, 2002).

4.6.2 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS HL-60 POR LA VÍA GRANULOCÍTICA. LA EXPRESIÓN DE PPAR α Y PPAR β AUMENTAN, MIENTRAS QUE LA DE PPAR γ NO VARÍA.

Dado que existen pocos datos en la literatura acerca de estos receptores nucleares en los granulocitos, nos pareció de interés estudiar la expresión de los PPARs en las células HL-60 diferenciadas a granulocitos, para lo cual se trató las células con ácido retinoico 1 μ M, como se describe en métodos. Conocer la participación de estos receptores nucleares nos parece de vital interés puesto que ellos constituyen un importante mecanismo de defensa contra la invasión de microorganismos, siendo importantes por lo tanto en procesos inmunológicos; además de conocer los mecanismos moleculares por los cuales estas células se diferencian, puede llevar al desarrollo de nuevos tratamientos para las leucemias promielocíticas. En nuestros resultados observamos mediante RT-PCR que las isoformas α y δ aumentan significativamente su expresión durante este proceso (Fig.12A y 12B), mientras que la isoforma γ no se ve afectada durante la diferenciación granulocítica (Fig.13).

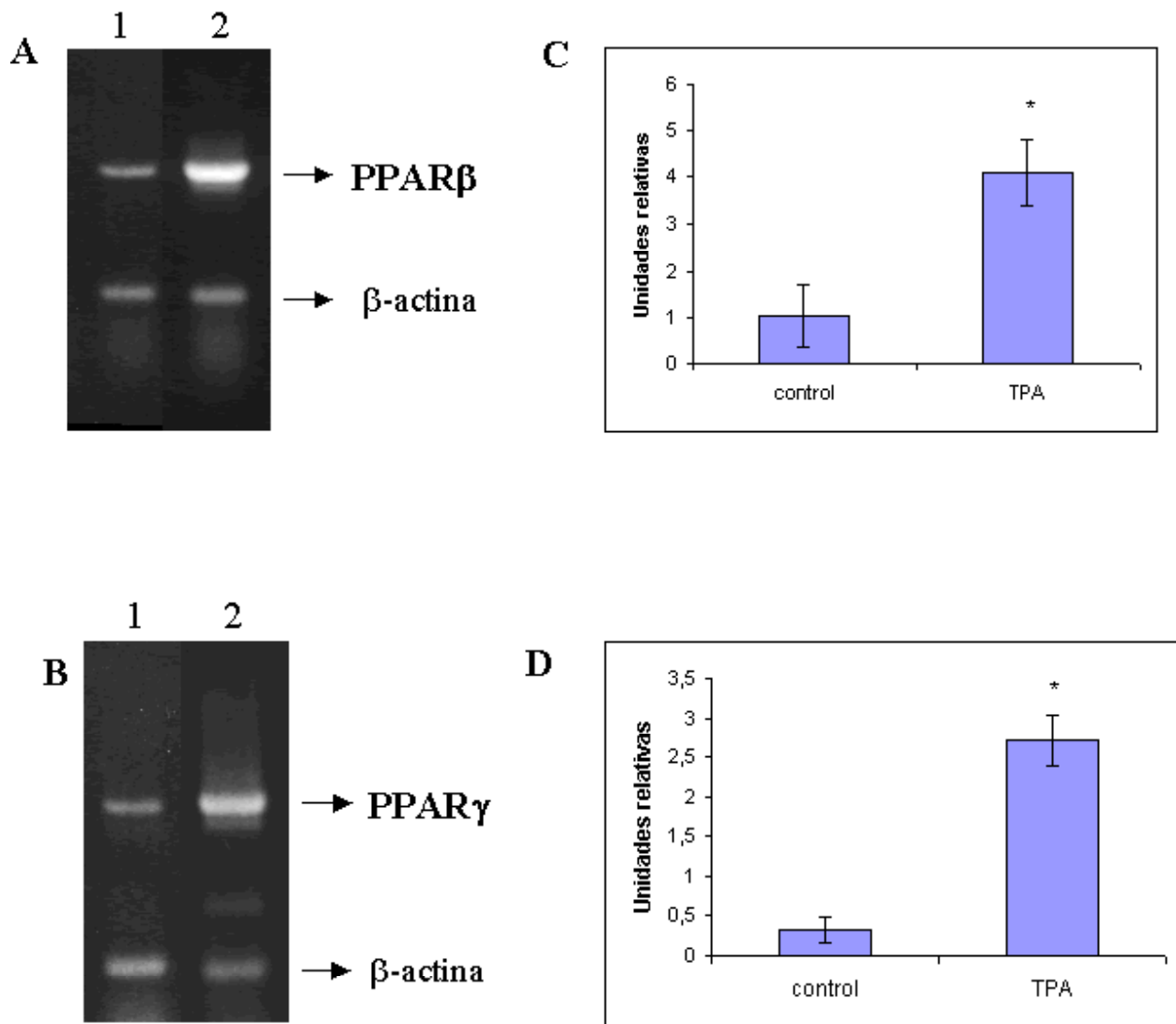


Fig.Nº10 Aumento en la expresión de PPAR δ y PPAR γ con la diferenciación celular a macrófagos.

Como se observa, la expresión de PPAR δ (A) y PPAR γ (B), se incrementa fuertemente al producirse la diferenciación a macrófagos con TPA (carriles 2), con respecto a las células controles (carriles 1). Esta figura es representativa de cuatro experimentos independientes. Los gráficos muestran la cuantificación de las bandas de PCR con respecto a β -actina. El aumento en la expresión de PPAR δ y PPAR γ son estadísticamente significativos ($p < 0.005$).

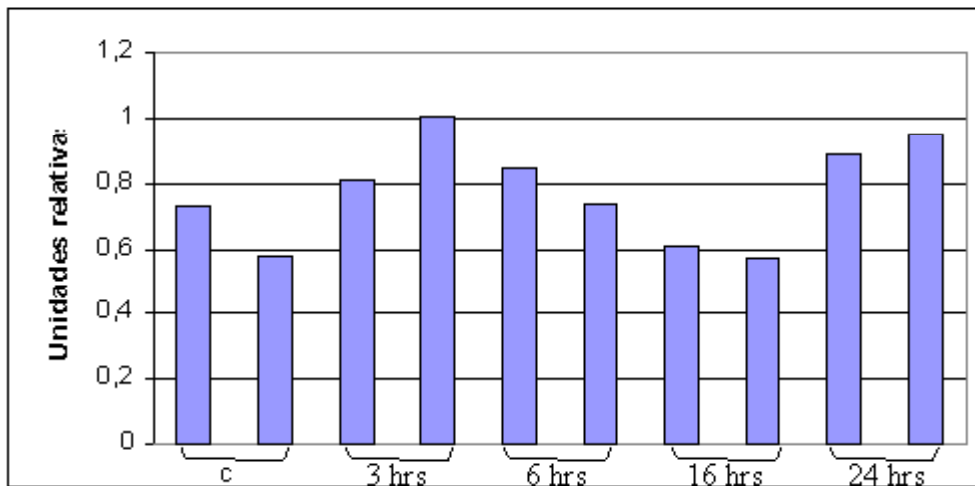
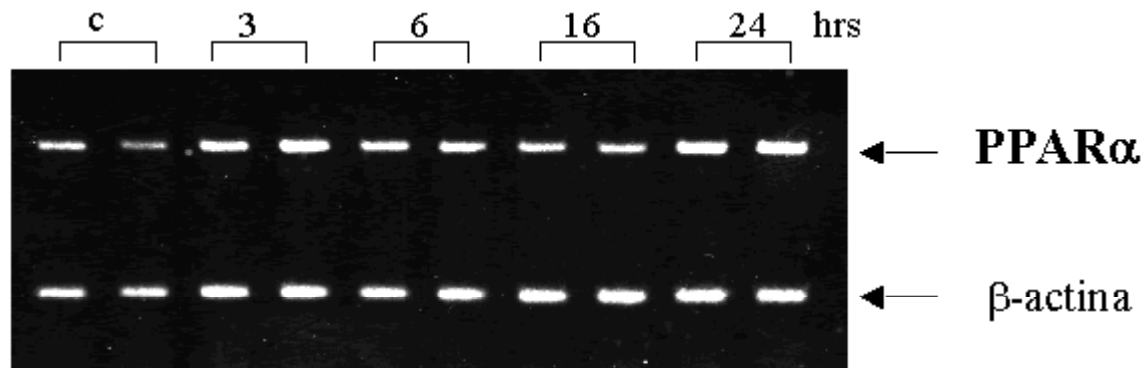


Fig.N°11 La expresión de $PPAR\alpha$ no varía durante el transcurso de la diferenciación a macrófagos.

La expresión de $PPAR\alpha$ se midió por RT-PCR a distintas horas de tratamiento con TPA 10nM, o sólo con el vehículo(c). La figura muestra dos experimentos independientes para cada tratamiento y abajo el gráfico correspondiente a la cuantificación de las bandas con respecto al control de carga.

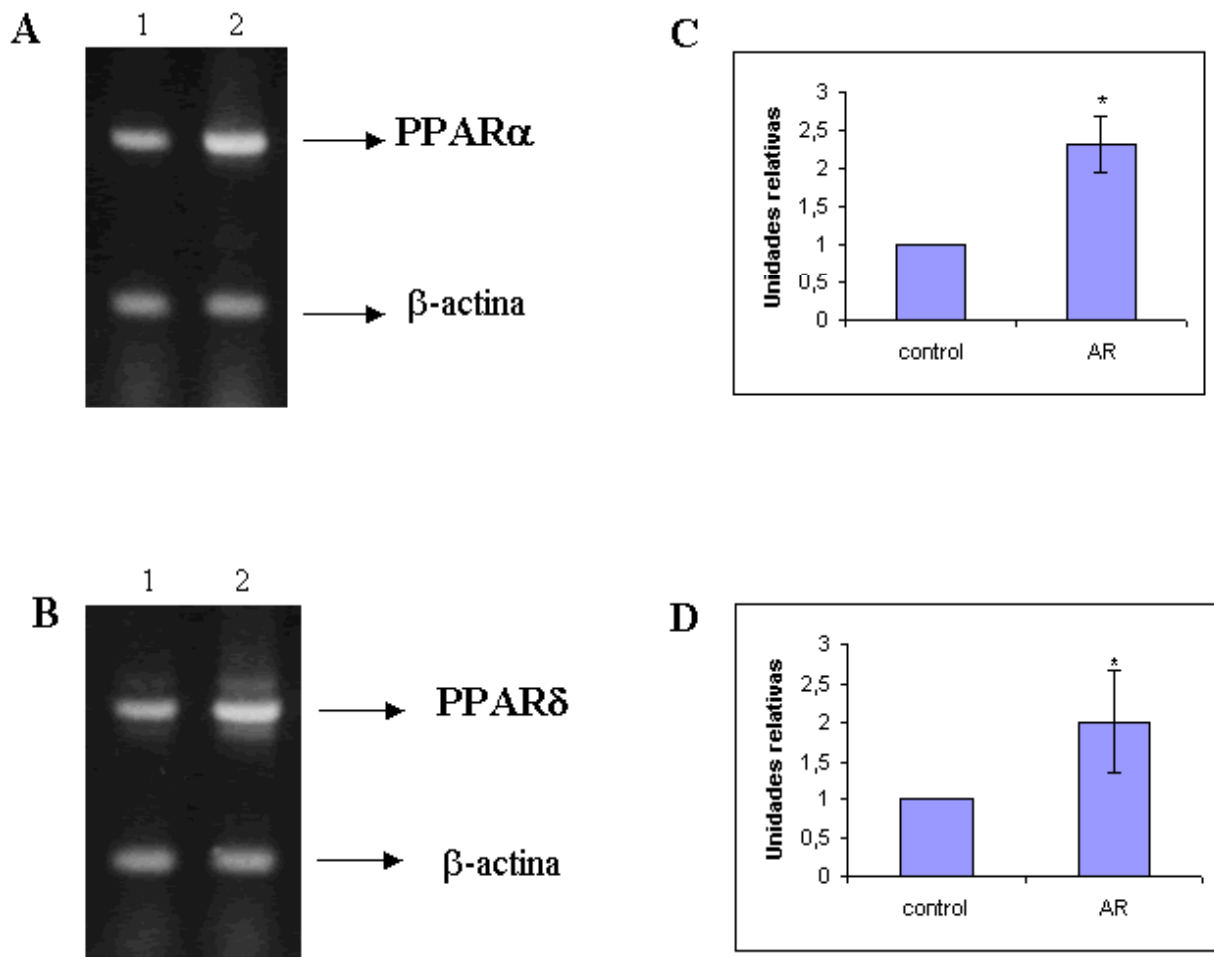


Fig.Nº12 La expresión de PPAR α y PPAR δ aumenta en HL-60 diferenciadas a granulocitos

Las células fueron tratadas durante 6 días con ácido retinoico (AR) 1 μ M para inducir diferenciación granulocítica. Su expresión se estudió por RT-PCR según métodos y luego se cuantificaron las bandas con respecto a β -actina. La expresión de PPAR α (A y C) y PPAR δ (B y D) está aumentada en los tratamientos con AR (carriles 2), con respecto a los controles, que fueron tratados sólo con el vehículo (carriles 1). La figura es representativa de dos experimentos independientes, cada uno por triplicado. El aumento en la expresión de ambos PPAR durante la diferenciación granulocítica es estadísticamente significativo ($p < 0.001$).

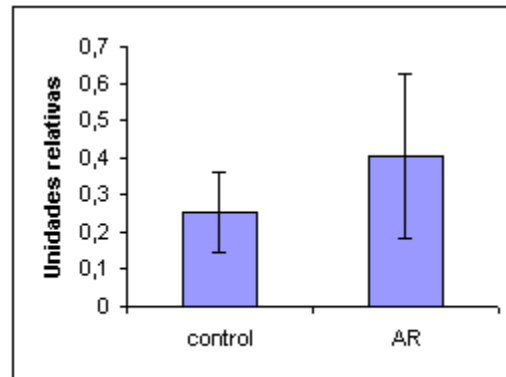
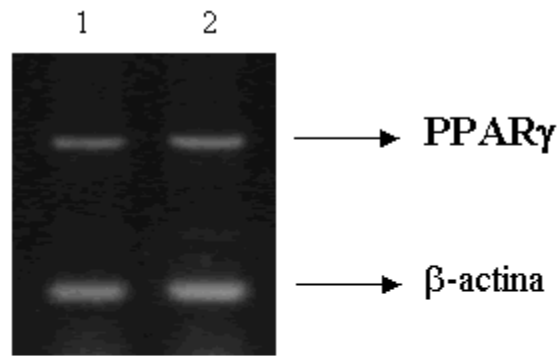


Fig.Nº13 La expresión de PPAR γ no está afectada durante la diferenciación a granulocitos

Las células fueron tratadas durante 6 días con ácido retinoico (AR) 1 μ M para inducir diferenciación granulocítica. La expresión se estudió por RT-PCR según métodos y luego se cuantificó la banda de PPAR γ con respecto a β -actina. La figura es representativa de dos experimentos independientes, cada uno por triplicado y las variaciones con los tratamientos no son significativas.

4.7 EXPRESIÓN DE GENES BLANCO DE PPAR γ EN LA DIFERENCIACIÓN MONOCÍTICA DE CÉLULAS HL-60.

Como se ha mencionado anteriormente, existen evidencias que CD36 es un gen regulado directamente por PPAR γ , mientras que ABCA1 es regulado indirectamente por PPAR γ al inducir la expresión de LXR en monocitos humanos. Esta inducción formaría parte del transporte reverso de colesterol. Con estos antecedentes determinamos si la diferenciación de células HL-60 inducida por TPA (vía monocítica), que ya hemos demostrado va acompañada de un aumento de la expresión de PPAR γ , induce la expresión de genes blanco de este factor de transcripción. Como se muestra en la Fig.15, CD36 (443pb), cuya expresión no es detectada en células indiferenciadas, aparece luego de tratamiento con TPA 10 nM. En forma similar, los niveles de expresión de ABCA1(532pb) también aumentan como respuesta al tratamiento con TPA (Fig.14).

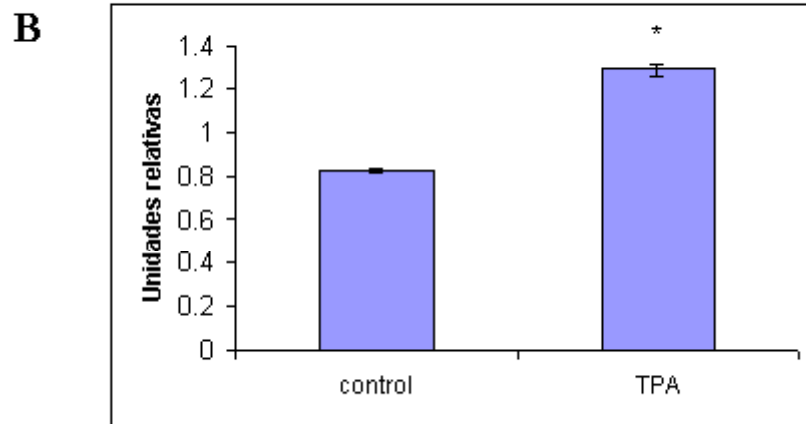
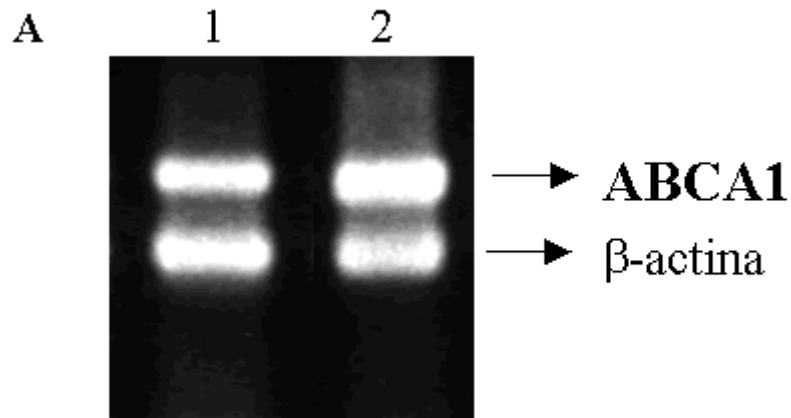


Fig.Nº14 Aumento en la expresión de ABCA1 con la diferenciación a macrófagos. La expresión de ABCA1 se midió por RT-PCR como se describe en métodos, luego de diferenciación celular con TPA 10nM por 24 hrs. Se observa que la expresión del transportador ABCA1 (A) aumenta luego de la diferenciación con TPA (carril 2) con respecto al control (carril 1). En (B) se muestra el gráfico correspondiente a la cuantificación de las bandas de PCR con respecto al control de carga β -actina. La figura es representativa de tres experimentos independientes y su aumento es estadísticamente significativo ($p < 0.001$).

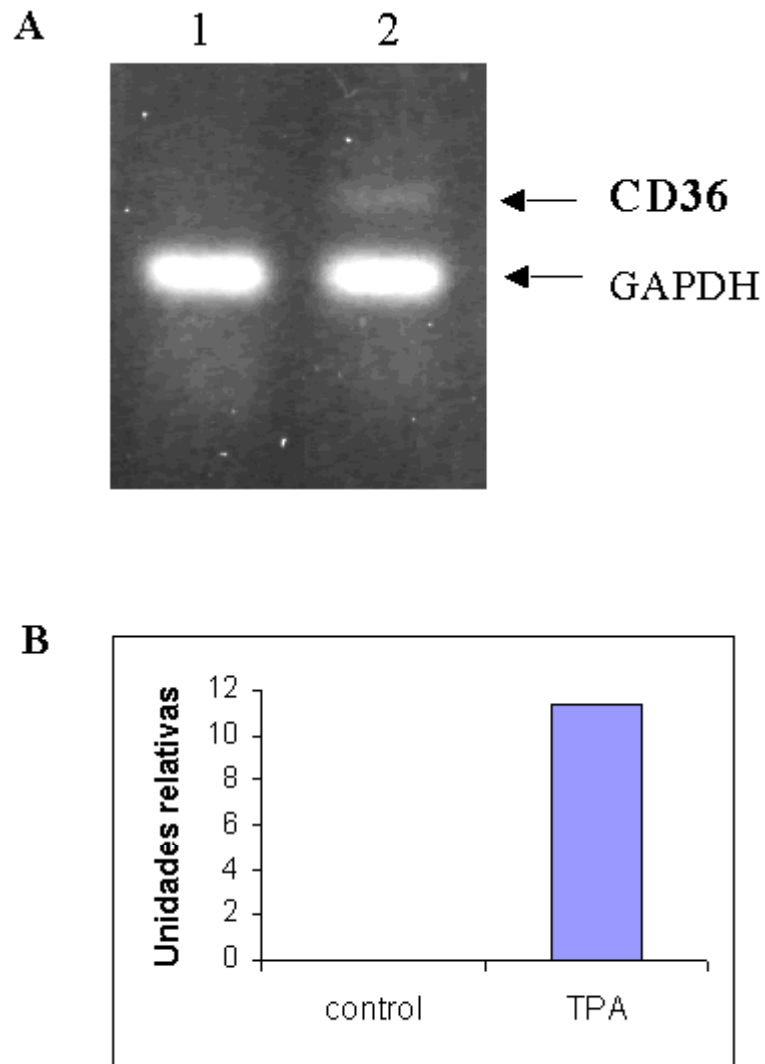


Fig.N°15 Inducción en la expresión de CD36 con la diferenciación a macrófagos. La expresión de CD36 se midió por RT-PCR como se describe en métodos, luego de diferenciación celular con TPA 10nM por 24 hrs. Se observa que en las células controles no se expresa CD36 (carril 1), sin embargo su expresión se induce luego de la diferenciación con TPA (carril 2). En (B) se muestra el gráfico correspondiente a la cuantificación de las bandas de PCR con respecto al control de carga GAPDH. La figura es representativa de dos experimentos independientes.

4.8 EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFAs) EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PPARs Y SUS GENES BLANCO

Como ya se ha mencionado en la introducción, eicosanoides generados a partir de PUFAs han sido descritos como ligandos de los PPARs. En este contexto nos interesó determinar si la suplementación del medio de incubación de HL-60 con ácidos araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) o docosahexaenoico (DHA) tenían alguna influencia en la expresión de PPARs o de sus genes blanco. Sin embargo, previamente fue necesario determinar el efecto de estos ácidos grasos sobre la proliferación y diferenciación de células HL-60.

4.8.1 EFECTO DE PUFAs SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Con el fin de determinar el efecto de la presencia de los ácidos grasos en el medio de cultivo sobre la proliferación celular, se crecieron las células por cinco días a distintas concentraciones de AA, EPA y DHA. Se observó que la presencia de los ácidos grasos tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Como se muestra en la Fig. 16, EPA y AA tienen un efecto inhibitorio a concentraciones mayores de 30 μ M, mientras que DHA ejerce una inhibición a una concentración bastante menor (5 μ M).

4.8.2 EFECTO DE PUFAs SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.

Para evaluar el efecto de PUFAs en diferenciación a macrófagos de células HL-60, inducida por TPA, se midió la diferenciación, como porcentaje de células adheridas, en función de la concentración de TPA, luego de 5 días de incubación en presencia y ausencia de PUFAs, de acuerdo a técnicas ya validadas en nuestro laboratorio (Bronfman *et al*, 1998). Como se muestra en la Fig. 17, usando una concentración 10 μ M de PUFAs no se encontró ningún efecto en la diferenciación inducida por TPA. Del mismo modo, no se observaron cambios morfológicos entre los tratamientos, como se muestra en la Fig. 18, para el AA. Estos resultados muestran que podemos estudiar el efecto de los ácidos grasos sobre la expresión de PPARs y sus genes blanco, ya que los PUFAs, a esa concentración, aparentemente no interfieren con la diferenciación inducida por TPA. Sólo el DHA parece interferir en la proliferación celular.

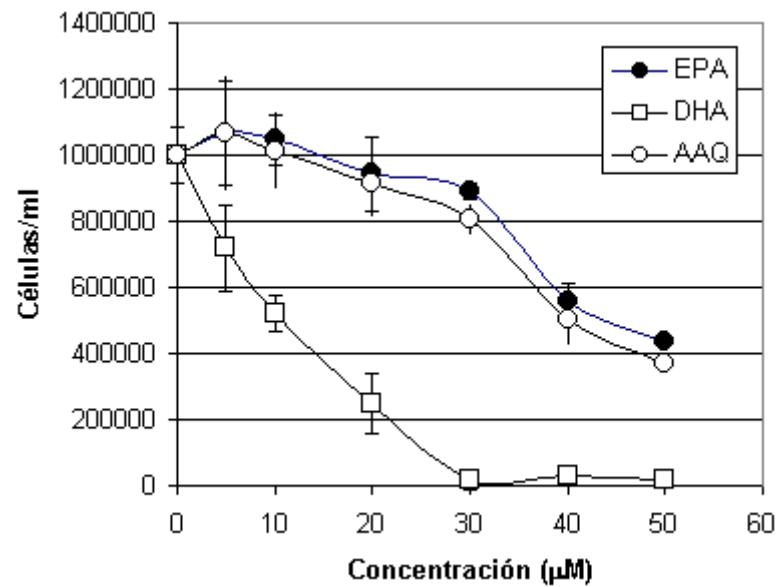


Fig.Nº16 Efecto de PUFAs sobre la proliferación de células HL-60.

Células HL-60 se crecieron por 5 días, con concentraciones crecientes de PUFAs. Se presentan promedios \pm desviación standard de tres experimentos independientes.

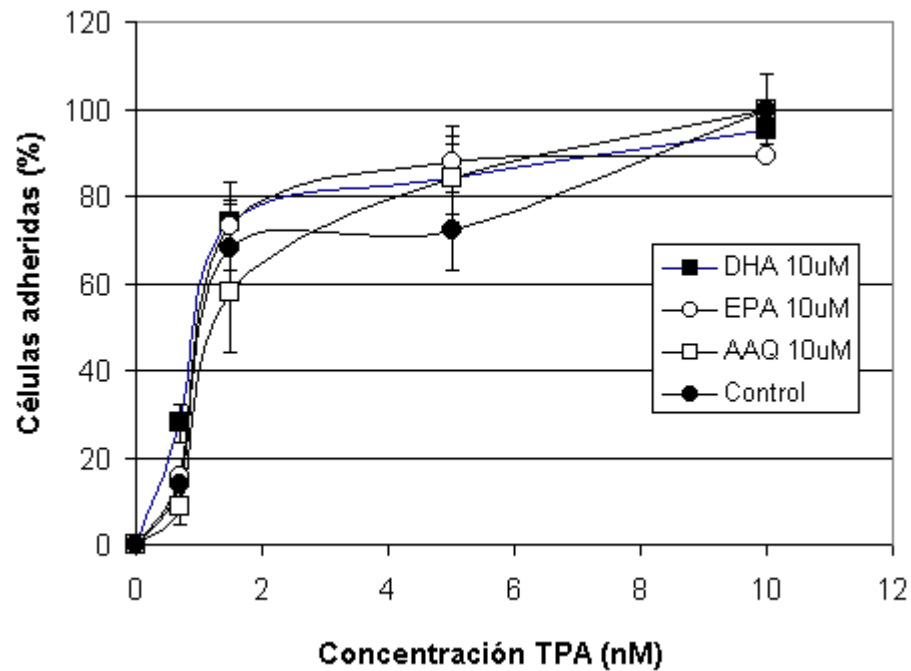


Fig.N°17. Efecto de PUFAs sobre la diferenciación de células HL-60 inducida por TPA. Las células HL-60 se crecieron por 5 días con concentraciones crecientes de TPA con y sin PUFAs. La diferenciación se midió como porcentaje de células adheridas, como se describe en métodos.

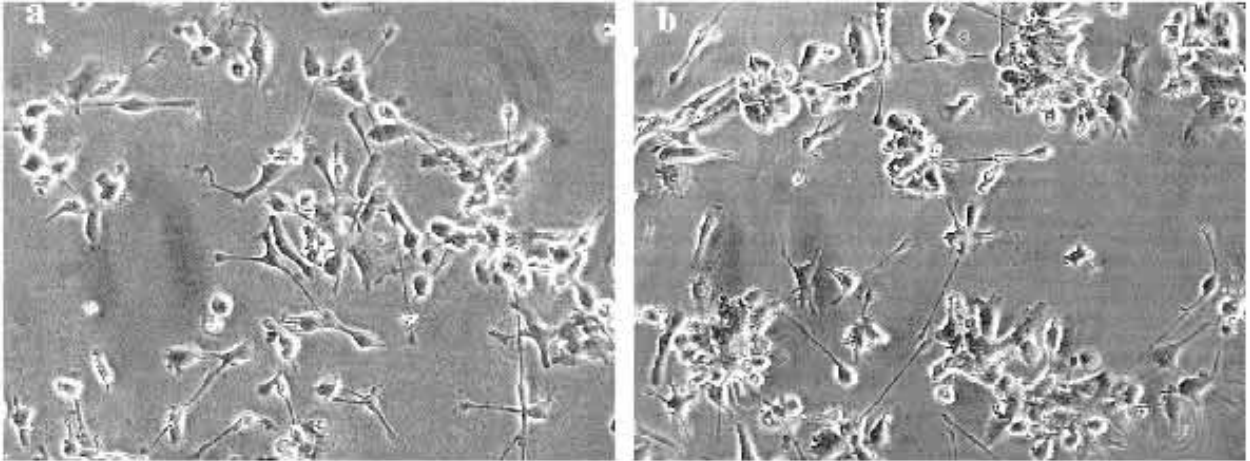


Fig.Nº18. Los PUFAs no afectan la morfología celular

Microscopía de contraste de fases de células HL-60 diferenciadas por 5 días con TPA 10 nM sin (a) y con (b) AA 10 μ M. Resultados similares se observaron con EPA y DHA.

4.8.3 EFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFAS) SOBRE LA EXPRESION DE PPARs, ABCA1 Y CD36 EN CÉLULAS HL-60.

Dada la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en su efecto protector de enfermedades aterogénicas y ya que son considerados como ligandos para los PPARs, utilizamos las células HL-60 sin diferenciar y estudiamos el efecto de los ácidos araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) sobre la expresión de PPARs y de genes blancos de $PPAR\gamma$, como ABCA1 y CD36, sabiendo que a la concentración utilizada de ácidos grasos la proliferación celular se ve afectada lo menos posible y que los ácidos grasos por sí solos no inducen diferenciación celular. El tratamiento de las células se siguió según métodos, incubando las células con medio con ácidos grasos, luego del cual se analiza la expresión de los genes mediante RT-PCR. Podemos observar que el tratamiento con ácidos grasos a concentración de $10\mu\text{M}$ no afecta la expresión de $PPAR\beta/\delta$ ni $PPAR\gamma$ (Fig.19), y tampoco afecta la expresión de ABCA1. CD36 no se expresa en las HL-60 indiferenciadas, como se mostró anteriormente y los ácidos grasos no inducen su expresión (Fig.20). Estos resultados nos muestran que los ácidos grasos por sí solos parecen no afectar la expresión de los receptores nucleares estudiados ni de sus genes blanco.

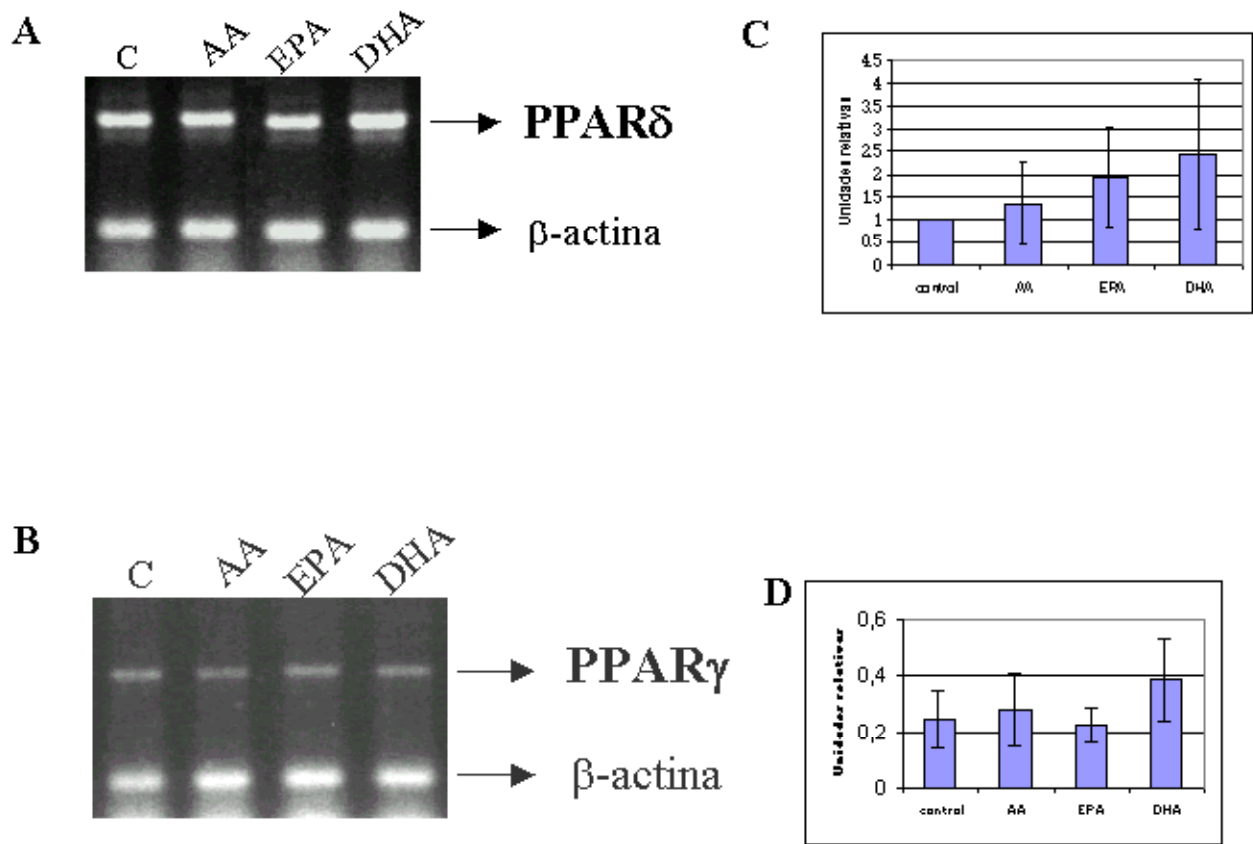


Fig.Nº19 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la expresión de PPAR δ y PPAR γ .

Las células fueron incubadas con distintos ácidos grasos poliinsaturados, AA, EPA y DHA 10 μ M por 48 hrs., luego del cual se realizó extracción de ARN y se midió la expresión de PPAR δ (A), PPAR γ (B) mediante RT-PCR. Las bandas de PCR fueron cuantificadas con respecto al control de carga para PPAR δ (C) y para PPAR γ (D). La figura es representativa de cuatro experimentos independientes, y las variaciones en los distintos tratamientos no son estadísticamente significativas.

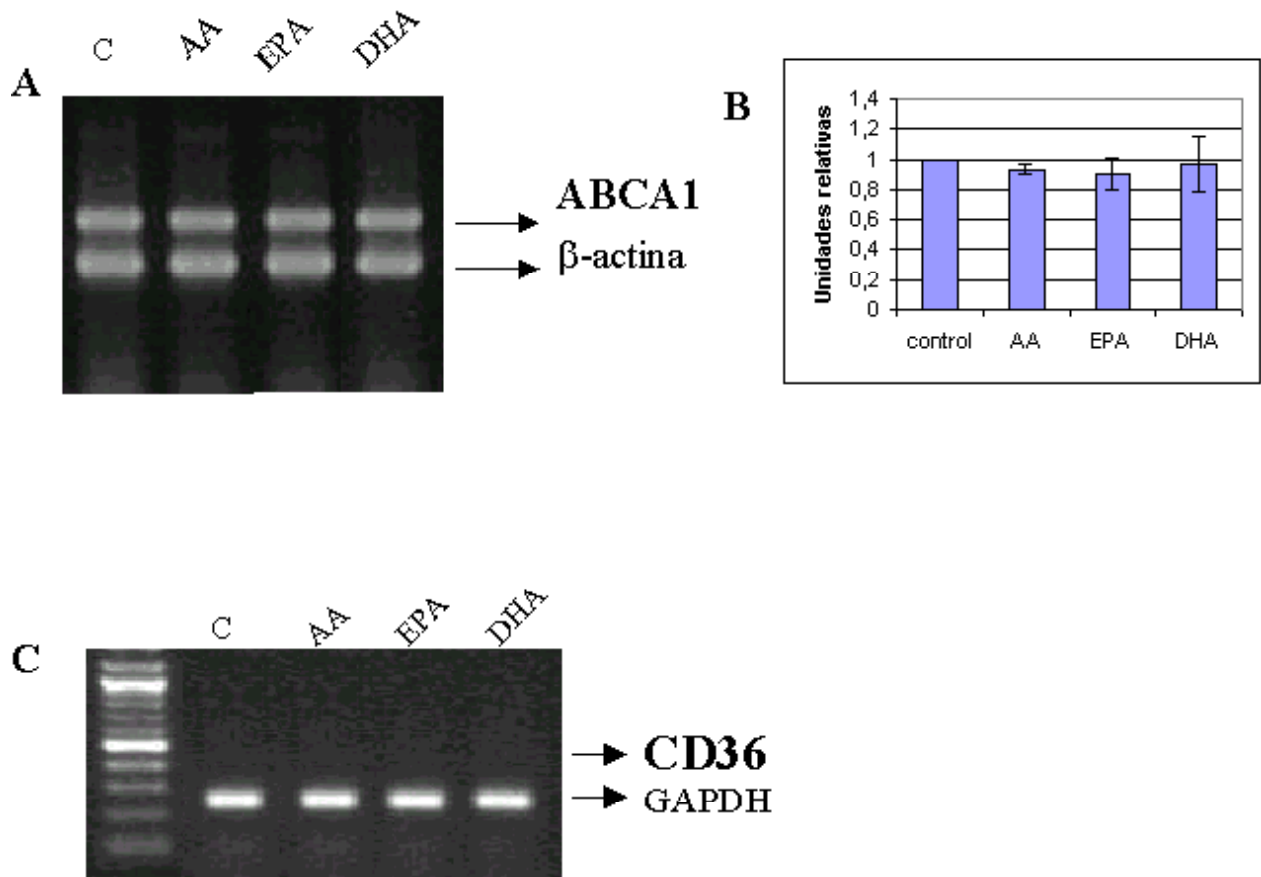


Fig.Nº20 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la expresión de ABCA1 y CD36.

Las células fueron incubadas con distintos ácidos grasos poliinsaturados, AA, EPA y DHA 10 μ M por 48 hrs., luego del cual se realizó extracción de ARN y se midió la expresión de ABCA1(A) y CD36 (C) mediante RT-PCR. β -actina y GAPDH fueron utilizadas como control de carga. Para ABCA1 la figura es representativa de tres experimentos independientes. Las bandas fueron cuantificadas con respecto a β -actina (B). En el caso de CD36 no se cuantificó pues no existe expresión. Para CD36 la figura es representativa de dos experimentos independientes.

4.9 EFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CELULAS HL-60 A MACROFAGOS

Como vimos anteriormente los ácidos grasos no tienen un efecto en la diferenciación inducida por TPA, medido como porcentaje de células adheridas, ni tampoco sobre la expresión de PPAR β , PPAR γ , ni sus genes blanco, por sí solos. Nos interesó conocer los mecanismos moleculares por los cuales los ácidos grasos están ejerciendo sus efectos. Para ello estudiamos la influencia de estos ácidos grasos sobre la expresión de PPAR δ , PPAR γ y los genes blanco de éste último durante la diferenciación a macrófagos. Para este estudio las células se someten a tratamiento de pre-incubación 24hrs con los ácidos grasos respectivos y luego otras 24 hrs en medio que contiene ácidos grasos más TPA para su diferenciación; los ácidos grasos se utilizan en concentración 10 μ M y el TPA 10nM final. Podemos observar (Fig.21 y 22) que durante la diferenciación celular los ácidos grasos utilizados no tienen mayor efecto sobre la expresión de los PPARs estudiados, ni ocurren cambios en los genes blancos de PPAR γ , como ABCA1 y CD36. Si bien se ha descrito que los PUFAs tienen un efecto protector aterogénico, esto puede deberse a que podrían haber otras vías involucradas en las cuales los ácidos grasos estén cumpliendo un rol protector.

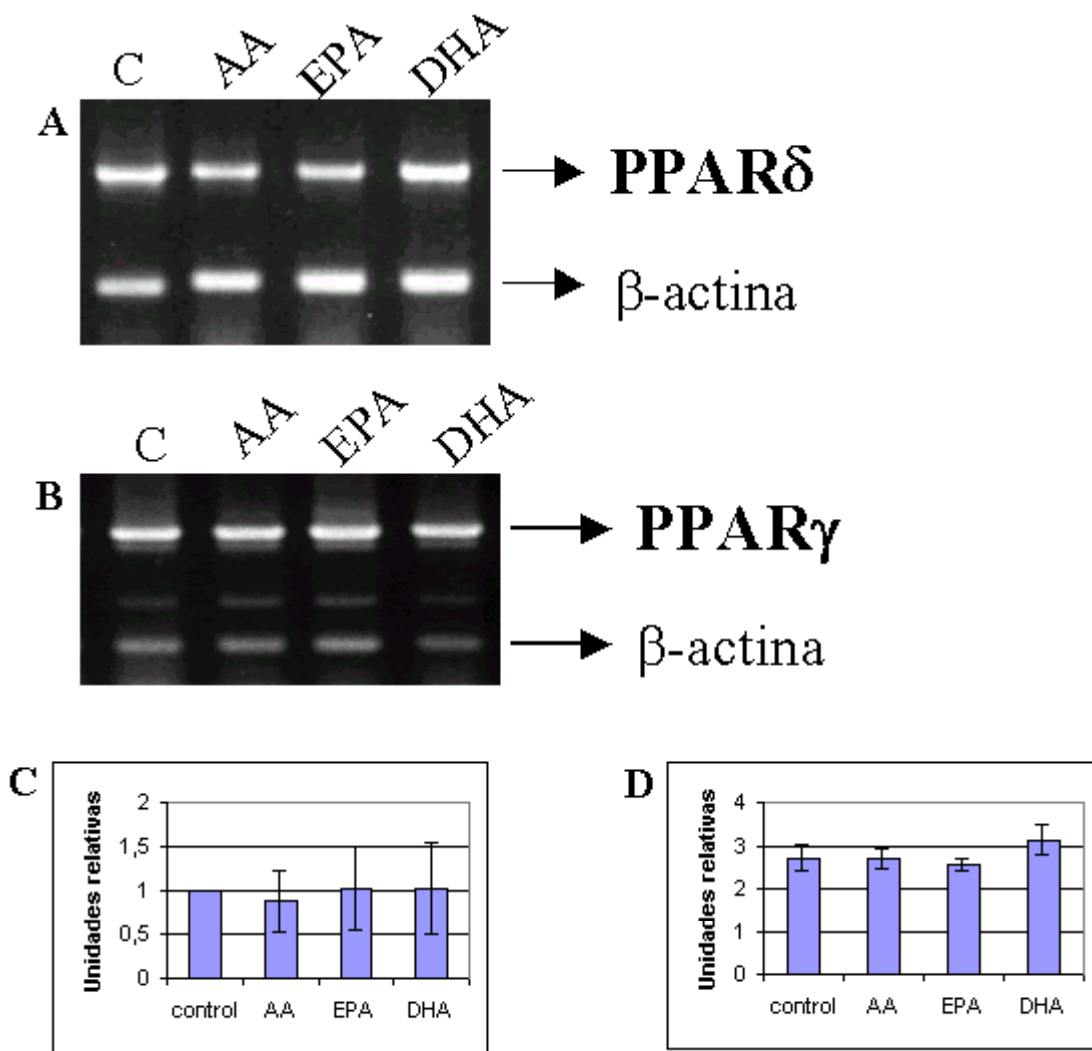


Fig.Nº21 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados sobre la expresión de PPAR δ y PPAR γ en la diferenciación a macrófagos

Las células fueron pre-incubadas con ácidos grasos 10 μ M por 24 hrs., seguido de diferenciación celular con TPA 10nM en medio con ácidos grasos por otras 24 hrs. La expresión de PPAR δ (A), PPAR γ (B) fue analizada mediante RT-PCR. β -actina fue utilizada como control de carga. Las bandas para PPAR δ (C) y para PPAR γ (D) fueron cuantificadas con el programa Scion Image. La figura es representativa de cuatro experimentos independientes para cada isoforma y las variaciones en los tratamientos no son significativas.

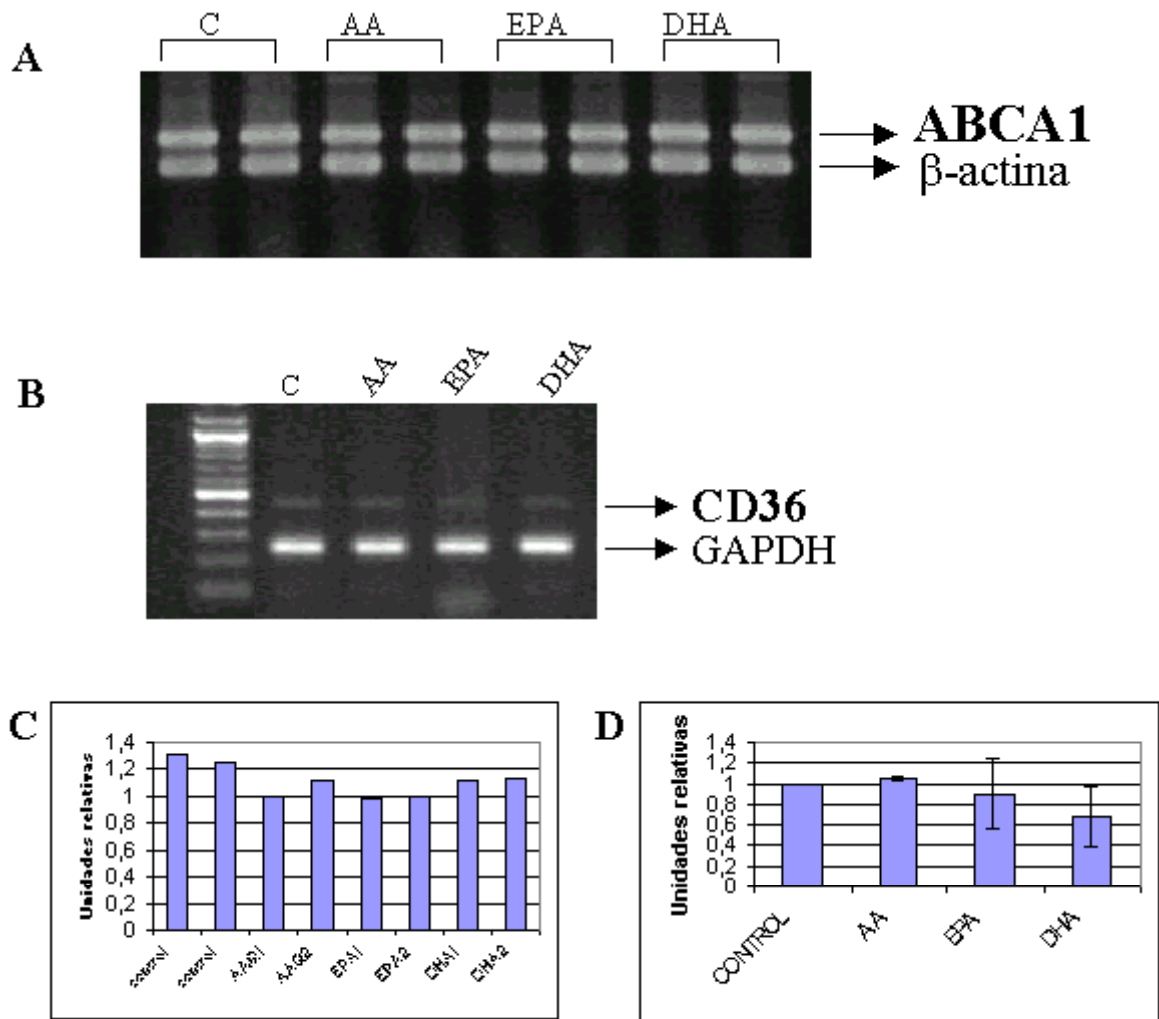


Fig.Nº22 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados sobre la expresión de ABCA1 y CD36 en la diferenciación a macrófagos

Las células fueron pre-incubadas con ácidos grasos 10 μ M por 24 hrs., seguido de diferenciación celular con TPA 10nM en medio con ácidos grasos por otras 24 hrs. La expresión de ABCA1(A y C) y CD36 (B y D) fue analizada mediante RT-PCR. β -actina y GAPDH fueron utilizadas como control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de las bandas con respecto a su control de carga. La figura representa dos experimentos independientes para ABCA1 y para CD36 la figura es representativa de tres experimentos. Las variaciones en los tratamientos con ácidos grasos no son significativas.

5. DISCUSION

El objetivo central de esta Tesis fue validar la línea celular promielocítica humana HL-60 como modelo en el estudio de la función de los PPARs, tanto en el proceso de diferenciación terminal de estas células, como en la modulación de la expresión de genes característicos de células totalmente diferenciadas. En el largo plazo, esta línea de investigación pretende poder dilucidar la posible interacción entre la vía de transducción de señales de PPARs y otras vías ya caracterizadas como importantes en la diferenciación de células promielocíticas, con el fin de determinar posibles blancos farmacológicos que puedan promover *in vivo* el proceso de diferenciación de células tumorales a células diferenciadas.

Nuestro trabajo se centró principalmente en la diferenciación de células HL-60 por la vía monocítica, ya que sobre ella había una mayor cantidad de información. Por razones de tiempo, la vía granulocítica fue menos estudiada. Sin embargo, en esta última vía se encontraron los resultados potencialmente más interesantes al encontrarse que, en contraste con la vía monocítica en que aumenta la expresión de PPAR α , en la vía granulocítica aumenta la expresión de PPAR β y γ , resultado original no descrito a la fecha.

En la diferenciación de HL-60 a granulocitos, producida por exposición al ácido retinoico, las vías de transducción de señales que participan en este proceso han sido poco estudiadas. Un receptor nuclear, RAR α (receptor de ácido retinoico), que al igual

que los PPARs, pertenece la superfamilia de receptores nucleares, parece estar participando directamente en la diferenciación granulocítica de las células HL-60 (Collins *et al*, 1990). Como ya se ha mencionado, nuestros resultados indican que al inducir diferenciación granulocítica con ácido retinoico, la expresión de PPAR α y PPAR β/δ se induce, mientras que la isoforma γ no varía. Resultados similares para PPAR γ han sido obtenidos por Tontonoz *et al* (1998), utilizando un retinoide sintético, AM580. Sin embargo, estos autores no estudiaron la expresión de PPAR α y β en el proceso. Posteriores estudios como activación o inhibición de estos receptores nos darán luces de si estos receptores nucleares están participando en los mecanismos moleculares de este proceso de diferenciación y de qué manera lo hacen. Disponemos ya de vectores de expresión de ambos con el objeto de iniciar estos estudios.

La mayor parte del trabajo de esta Tesis se centró en el proceso de diferenciación de HL-60 a macrófagos inducida por el éster de forbol TPA, y su efecto en la expresión de los PPARs y sus genes blanco. Al diferenciar estas células a macrófagos con TPA se observó que a distintos tiempos de diferenciación la expresión de PPAR α no estaba afectada, lo que concuerda con resultados anteriores del laboratorio (Bronfman *et al*, 1998). Sin embargo, existen resultados contrarios a los nuestros en los cuales se ve aumento de PPAR α en monocitos humanos diferenciados a macrófagos. Sin embargo, en este estudio las células son diferenciadas hasta 12 días (Chinetti *et al*, 1998), tiempo en el cual podrían formarse compuestos que por otras vías llevaran al aumento de este receptor.

Parte importante de los estudios de estos receptores nucleares en células monocíticas humanas se basan en su vinculación con procesos inflamatorios. PPAR α reprime la activación del promotor de IL-6, por interferir negativamente con c-jun y NF-kB (Delerive *et al*, 1999). Por otra parte ligandos de PPAR γ estarían protegiendo de la inflamación por inhibir la expresión de iNOS, gelatinasa B y receptor “scavenger” A, en parte, por antagonizar las actividades de los factores de transcripción AP-1, STAT y NF-kB (Ricote *et al*, 1998, Jiang *et al*, 1998). Otros autores han encontrado que el efecto de los ligandos de PPAR γ en la disminución de la inflamación es independiente de este receptor (Chawla *et al*, 2001(b)). Las evidencias que existen sobre la participación de PPAR γ en la diferenciación de adipocitos nos llevaron a estudiar la expresión de este receptor durante la diferenciación de las células HL-60. En nuestro estudio, se observó que PPAR γ está presente en las células HL-60 y que su expresión aumenta cuando éstas se diferencian a macrófagos con TPA 10nM, lo que concuerda con otros resultados descritos para esta misma línea celular (Tontonoz *et al*, 1998), en el que se utilizan concentraciones mucho mayores de TPA (65nM). En consecuencia, la isoforma γ es inducida sólo en la diferenciación monocítica y no en la granulocítica, del mismo modo que en monocitos humanos, resultado que valida a las células HL-60 como un buen modelo para el estudio de la función de PPARs durante la diferenciación celular, uno de los objetivos centrales de esta Tesis.

Sobre PPAR δ existen pocos datos en la literatura, principalmente debido a la falta de ligandos específicos para esta isoforma. Interesantemente en nuestro estudio vimos que la expresión de PPAR δ estaba aumentada como consecuencia de la diferenciación

celular a macrófagos, lo que nos sugiere que este receptor puede ser importante en las funciones de los macrófagos. Este resultado, original en el momento de su obtención, ha sido recientemente confirmado en macrófagos humanos diferenciados (Vosper *et al*, 2001). En este mismo estudio se muestra además la participación de este receptor en el metabolismo del colesterol, regulando los genes involucrados en la captación, transporte, almacenamiento y salida de lípidos, como CD36, FABP (proteína que une ácidos grasos), adipofilina, LXR α y ABCA1 (Vosper *et al*, 2001). En este estudio se demuestra que un ligando específico recién descrito (compuesto F), promueve el almacenamiento de colesterol dentro de los macrófagos.

Por el contrario, otros autores han encontrado, que un agonista específico de PPAR δ , GW501516, aumenta el transporte reverso de colesterol desde las células, en parte, por incrementar la expresión de ABCA1, sugiriendo así que los agonistas de PPAR δ podrían ser utilizados como drogas que disminuyan el riesgo de las enfermedades cardiovasculares (Oliver *et al*, 2001).

No existen aún datos acerca de cuál es el mecanismo por el cual aumenta la expresión de PPAR δ . Sin embargo podríamos especular en una relación entre PPAR δ y la vía Wnt, ya que el TPA usado para diferenciar las células a macrófagos activa proteína kinasa C (PKC), la cual inhibe la proteína GSK-3 β (Cook *et al*, 1996; Goode *et al*, 1992). Como resultado, se acumula β -catenina modificando la expresión de sus genes blanco, entre los que se encuentra PPAR δ .

Recientemente se ha descrito la participación de PPAR γ en el control del transporte reverso de colesterol en los macrófagos. La activación de PPAR γ induce la expresión de CD36 y éste estimula la unión e internalización de LDL oxidada. En este proceso también participa el transportador ABCA1, presente en la membrana de las células, el cual transfiere colesterol intracelular a HDL, liberando así el colesterol desde las células. La regulación positiva del gen de CD36, mediada por activadores de PPAR γ , como 15-d-PJ₂, 9- y 13-HODE, ha sido demostrada además utilizando IL-4 y activadores de PKC (proteína kinasa C). Por el contrario, inhibidores de PKC, inhiben su expresión (Feng *et al*, 2000).

En nuestros resultados mostramos que ABCA1 está presente en HL-60 y que su expresión aumenta al diferenciar a macrófagos y que CD36 se induce en este proceso. Este resultado contribuye a validar las células HL-60 como modelo, de acuerdo a lo propuesto previamente en esta Tesis. Otros autores también han demostrado que ligandos de PPAR γ , como rosiglitazona y 15-d-PGJ₂, aumentan la expresión de CD36 (Tontonoz *et al*, 1998), y de ABCA1 en macrófagos (Chinetti *et al*, 2001). Sin embargo, una publicación más reciente muestra que la diferenciación de macrófagos es independiente de PPAR γ , pero que la expresión de ABCA1 y LXR, son dependientes de este receptor (Patel *et al*, 2002). Esto sugiere que, si bien este receptor no es indispensable para la diferenciación de los macrófagos, sí lo es para el mantenimiento de la homeostasis lipídica a través de las moléculas LXR y ABCA1.

Se observa entonces, la estrecha relación que existe entre estos receptores nucleares con la regulación del metabolismo celular en macrófagos y con la modulación y expresión de genes característicos de la célula terminal. En consecuencia, el estudio de las vías de transducción involucradas en la expresión de los PPARs en células HL-60, contribuye a una mejor comprensión del fenómeno de diferenciación de las células promielocíticas y su control farmacológico.

La identificación de receptores nucleares que responden a ácidos grasos y eicosanoides establece una importante relación entre metabolismo y control transcripcional. Por esta razón, parte de esta Tesis se abocó a tratar las células HL-60 con distintos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), tales como AA, EPA y DHA.

Los ácidos grasos utilizados, si bien disminuyen la proliferación celular, demostraron que no ejercen mayor efecto sobre los niveles de expresión de PPAR β , PPAR γ . De igual forma no intervienen en la regulación de los genes ABCA1 y CD36, ni sobre la diferenciación de las células HL-60. En este trabajo se ha demostrado además que los ácidos grasos AA, EPA y DHA no tendrían influencia sobre la expresión de los receptores nucleares y sus genes blanco en el proceso de diferenciación celular de las células HL-60.

En los estudios que existen sobre este tema se muestra, mediante ensayos de transfección en células de riñón de mono, CV-1, que los ácidos grasos pueden activar los PPARs, a concentraciones elevadas de 30 μ M o mayores (Forman *et al*, 1997;

Kliwer *et al*, 1997; Krey *et al*, 1997). Previamente en nuestro laboratorio se hicieron experimentos con concentraciones de hasta 50 μ M de ácidos grasos, observándose muerte celular de la línea HL-60. Estos resultados llevaron a determinar por cromatografía de gas, que concentraciones de 10 μ M eran suficiente para que los ácidos grasos se incorporaran a la célula. Otros autores han encontrado que ligandos de PPAR α , como WY14,643 y de PPAR γ , como BRL49653 o PGJ₂ inducen apoptosis de macrófagos derivados de monocitos humanos (Chinetti *et al*, 1998), lo que concuerda con los resultados informados por nuestro laboratorio.

En un estudio reciente se muestra que los ácidos grasos insaturados, como palmitoleato, oleato, linoleato y araquidonato disminuyen el flujo de colesterol y fosfolípidos mediado por Apo-A1 y reducen la unión de Apo-A1 a la superficie celular (Wang y Oram, 2002). Así mismo hay una disminución de ABCA1 en la membrana, por lo tanto se reduce la disponibilidad de ABCA1 para interaccionar con Apo-A1. Por otro lado, en este mismo estudio se vio que linoleato tiende a inhibir el flujo más efectivamente que oleato, sugiriendo que el grado de insaturación del ácido graso también es un factor importante a considerar. Se vio además, que los ácidos grasos insaturados no afectan la abundancia del ARN mensajero de ABCA1, ni la síntesis de proteínas, lo que concuerda con nuestros resultados de RT-PCR. Esta disminución de ABCA1 por lo tanto podría explicarse por degradación de la proteína.

Los PPARs, además de estar regulados por ligandos, pueden ser regulados por fosforilación, como sucede con otros receptores nucleares, como el receptor de ácido

retinoico o receptor de estrógeno. PPAR γ 1 presenta en su secuencia un sitio de fosforilación en Ser⁸², el cual es fosforilado por MAPK, en respuesta a factores de crecimiento, como EGF o PDGF. Esta fosforilación disminuye la actividad transcripcional de PPAR γ 1 (Camp y Tafuri, 1997). También se ha visto que JNK (c-jun N-terminal kinasa) fosforila PPAR γ 1 en Ser⁸², con la consiguiente disminución en la actividad de PPAR γ .

Dentro de la compleja maquinaria transcripcional participan, además de los factores de transcripción, co-activadores o co-represores que influyen en la expresión de los genes. Datos aún más recientes muestran incluso que PPAR β/δ sin ligando puede inhibir la actividad transcripcional de PPAR γ y PPAR α , por unirse a un PPRE en asociación con co-represores, como SMRT (mediador silenciador para receptores retinoides y de hormona tiroidea), SHARP (SMRT y proteína represora asociada a histona deacetilasa), e histona deacetilasa clase I (Shi *et al*, 2002). En este estudio se muestra que la expresión estable de PPAR δ inhibe la expresión de los genes blanco de PPAR α , mientras que PPAR δ mutante, que no interactúa con SMRT, pierde esta capacidad de reprimir la expresión de genes blanco. Similares resultados se obtuvieron con PPAR γ . Juntando todos estos antecedentes tenemos que no tan sólo con ligandos podemos modular la actividad de estos factores de transcripción, sino que existen otros mecanismos, los cuales recién comienzan a descubrirse, por los cuales los PPARs pueden ser regulados.

En nuestro laboratorio recientemente se ha montado la técnica de sobreexpresión para las tres isoformas de PPAR, lo cual constituye una técnica mucho más eficaz para ver la actividad de nuestros receptores nucleares. Esperamos en un futuro cercano tratar las células con algunas drogas y también utilizar otros ácidos grasos y ver mediante la técnica de sobreexpresión la actividad de estos receptores mediante sus genes blanco. Otro aspecto importante es estudiar más profundamente la diferenciación a granulocitos, pues ha sido poco estudiada en comparación a los macrófagos y constituyen un tipo celular muy importante en procesos de inflamación, alergias, respuesta inmunológica y leucemia mieloide.

Sin duda que un mayor estudio de estos receptores y la aparición de nuevos ligandos sintéticos más específicos, junto al conocimiento de nuevos genes blanco de estos receptores, contribuirán a dilucidar las vías de transducción de señales en las cuales están participando estos receptores dentro de la célula y sus implicancias en biomedicina.

6. BIBLIOGRAFIA

Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W.E., Hahmann, H.W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K.J., Schmitz, G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.*, 22, 347-351.

Breitman, T.R., Selonick, S.E., Collins, S.J. (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 77, 2936-2940.

Bronfman, M., Ponce, C., Rojas, S., Roth, A., Loyola, G., Vollrath, V., Chianale, J. (1998) Enhanced differentiation of HL-60 leukemia cells to macrophages induced by ciprofibrate. *Eur.J. Cell. Biol.*, 77, 214-219.

Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., Van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouelette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J., Hayden, M.R. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.*, 22, 336-345.

Camp, H.S., Tafuri, S.R. (1997) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 272, 10811-10816.

Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., Evans, R.M., Tontonoz, P. (2001 a) A PPAR

gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell.*, 7, 161-171.

Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., Evans, R.M. (2001 b) PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat. Med.*, 7, 48-52.

Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I.P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.C., Chapman, J., Najib, J., Staels, B. (1998) Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.*, 273, 25573-25580.

Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A.T., Neve, B., Torra, I.P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H.B., Fruchart, J.C., Clavey, V., Staels, B. (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.*, 7, 53-58.

Collins, S.J., Robertson, K.A., Mueller, L. (1990) Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR-alpha). *Mol. Cell. Biol.*, 10, 2154-2163.

Cook, D., Fry, M.J., Hughes, K., Sumathipala, R., Woodgett, J.R., Dale, T.C. (1996) Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J.*, 15, 4526-4536.

Decottignies, A., Goffeau, A. (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.*, 15, 137-145.

Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Haegeman, G., Staels, B. (1999)

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.*, 274, 32048-32054.

Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzalez, F.J., Wahli, W. (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, 384, 39-43.

Fabraio, M., Hajjar, D., Silverstein, R. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Inv.*, 108, 785-791.

Feng, J., Han, J., Pearce, S.F., Silverstein, R.L., Gotto, A.M. Jr, Hajjar, D.P., Nicholson, A.C. (2000) Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J. Lipid. Res.*, 41, 688-696.

Forman, B.M., Chen, J., Evans, R.M. (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 4312-4317.

Goode, N., Hughes, K., Woodgett, J.R., Parker, P.J. (1992) Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J. Biol. Chem.*, 267, 16878-16882.

Hirano, K., Yamashita, S., Nakagawa, Y., Ohya, T., Matsuura, F., Tsukamoto, K., Okamoto, Y., Matsuyama, A., Matsumoto, K., Miyagawa, J., Matsuzawa, Y. (1999) Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ. Res.*, 85, 108-116.

Jiang, C., Ting, A.T., Seed, B.(1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391, 82-86.

Kinsella, J.E., Lokesh, B., Stone, R.A. (1990) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 1-28.

Klein, I., Sarkadi, B., Varadi, A. (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1461, 237-262.

Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., Lehmann, J.M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 94, 4318-4323.

Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G., Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.*, 11, 779-791.

Lemberger, T., Desvergne, B., Wahli, W. (1996) Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12, 335-363.

Macfarlane, D.E., Manzel, L. (1994) Activation of beta-isozyme of protein kinase C (PKC beta) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC beta-defective PET mutant. *J. Biol. Chem.*, 269,4327-4331.

Michalik, L. y Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 564-570.

Oliver, W.R. Jr, Shenk, J.L., Snaith, M.R., Russell, C.S., Plunket, K.D., Bodkin, N.L., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Sznaidman, M.L., Lambert, M.H., Xu, H.E., Sternbach, D.D., Kliewer, S.A., Hansen, B.C., Willson, T.M. (2001). A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 24, 5306-5311.

Patel, L., Charlton, S.J., Marshall, I.C., Moore, G.B., Coxon, P., Moores, K., Clapham, J.C., Newman, S.J., Smith, S.A., Macphee, C.H. (2002) PPAR gamma is not a critical mediator of primary monocyte differentiation or foam cell formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290, 707-712.

Peet, D.J., Janowski, B.A., Mangelsdorf, D.J. (1998 a) The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8, 571-575.

Peet, DJ., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J. (1998 b) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell.*, 93, 693-704.

Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391, 79-82.

Roberts, R.A., James, N.H., Woodyatt, N.J., Macdonald, N., Tugwood, J.D. (1998) Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha). *Carcinogenesis*, 19, 43-48.

Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Deneffe, P., Assmann, G. (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.*, 22, 352-355.

Shi, Y., Hon, M., Evans, R.M. (2002) The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99, 2613-2618.

Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebret, M., Torra, I.P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.C., Najib, J., Maclouf, J., Tedgui, A. (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPAR gamma activators. *Nature*, 393, 790-793.

Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B.M. (1995) Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5, 571-576.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., Evans, R.M. (1998) PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93, 241-252.

Vosper, H., Patel, L., Graham, T.L., Khoudoli, G.A., Hill, A., Macphee, C.H., Pinto, I., Smith, S.A., Suckling, K.E., Wolf, C.R., Palmer, C.N. (2001) The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J. Biol. Chem.*, 276, 44258-44265.

Wang, Y., Oram, J.F. (2002) Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J. Biol. Chem.*, 277, 5692-5697.

(c) <http://www.stanford.edu/%7Ernusse/pathways/targets.html>