



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

Profesor Co-Patrocinante:
Dr. Jaime Figueroa
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile

Homólogos de PPARs (Proliferator Peroxisome Activated Receptor) en *Caenorhabditis Elegans*

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

David Ernesto Contador Martínez

Valdivia Chile 2003

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar al Dr. Miguel Bronfman por recibirme en su laboratorio y por brindarme su apoyo en el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a Gloria Loyola y Arnaldo Gatica, por su ayuda en el desarrollo de las distintas técnicas experimentales que realicé en este trabajo, por las discusiones en torno a la ciencia y por sobre todo el valor de su amistad.

Agradezco a la Dra. Alicia Minniti por entregarme las primeras herramientas en el estudio de *Caenorhabditis elegans*.

Agradezco a Sylvia Soto y Gloria Acevedo por sus consejos y permanente preocupación.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio por entregar siempre buena onda, por su amistad y su aporte a lo largo de este trabajo. En forma especial a mis amigos, Mauricio Aguilera, José Luis Garrido y Patricio Ramos.

Agradezco a mi amigo Luis Velásquez por su apoyo, por sus consejos acerca de la ciencia y la vida.

Agradezco a Juan Muñoz por ser una excelente persona y por su eficiencia en el laboratorio

Agradezco a todos los profesores de la Universidad Austral de Chile que participaron en mi formación como Bioquímico

Por sobre todo, agradezco de manera muy especial a mis padres y mis hermanas Oriana y Elizabeth por su apoyo incondicional durante todo el tiempo que estuve en la Universidad.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el financiamiento de FONDAP13980001 e Instituto MILENIO de Biología Fundamental y Aplicada.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE FIGURAS y TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
2.1 Receptores Nucleares en <i>Caenorhabditis elegans</i>	6
2.2 PPARs (peroxisome proliferator activated receptor)	8
2.3 Hipótesis	15
2.4 Objetivos	16
3. MATERIALES Y METODOS	17
3.1 Materiales y Reactivos	17
3.1.1 Cepa <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
3.1.2 Medios de cultivos	17
3.1.3 Bacterias	18
3.1.4 Enzimas	18
3.1.5 Marcadores de peso molecular	18
3.1.6 Material radiactivo	18
3.1.7 Columnas	18
3.1.8 Membranas Northern	18
3.1.9 Reactivos Generales	19
3.1.10 Programas computacionales	19

3.2 Métodos	20
3.2.1 Alineamiento de Secuencias	20
3.2.2 Cultivo, Mantención y Tratamientos	20
3.2.2.1 Cultivo medio sólido agar NMG	20
3.2.2.2 Agar NMG	20
3.2.2.3 Sembrado en placas Petri	21
3.2.2.4 Tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona	21
3.2.3 Extracción de ARN total	22
3.2.3.1 Método de trizol para obtención de ARN total	22
3.2.3.2 Determinación de la concentración de ARN	23
3.2.3.3 Electroforesis de ARN en geles de agarosa	23
3.2.4 Reacciones enzimáticas con ácidosnucleicos	23
3.2.4.1 Transcripción reversa (RT)	23
3.2.4.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	24
3.2.4.3 Diseño de partidores para PCR	24
3.2.4.4 Estandarización de las reacciones de PCR	26
3.2.4.5 Electroforesis en geles de agarosa	26
3.2.5 Northern Blot	26
3.2.5.1 Obtención de sondas	26
3.2.5.2 Fraccionamiento de ARN en gel de agarosa	27
3.2.5.3 Marcación de sondas	27
3.2.6 Inspección visual	28
3.2.6.1 Letalidad embrionaria	28

3.2.6.2 Efecto fenotípico	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Alineamiento de proteínas	29
4.1.1 Resumen de alineamiento de proteínas seleccionadas	31
4.2 Efecto del Ciprofibrato y Ciglitazona en letalidad embrionaria	38
4.2.1 Letalidad embrionaria en tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona	39
4.3 Efecto fenotípico en tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona	40
4.3.1 Efectos de agonistas farmacológicos de PPARs en <i>C. elegans</i>	41
4.4 Efecto de Ciprofibrato sobre la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs	42
4.4.1 Expresión relativa del gen <i>sex-1</i> en gusanos tratados con Ciprofibrato	43
4.4.2 Expresión relativa del gen <i>nhr-23</i> en gusanos tratados con Ciprofibrato	44
4.4.3 Expresión relativa del gen <i>nhr-85</i> en gusanos tratados con Ciprofibrato	45
4.5 Efecto de Ciglitazona sobre la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs	46
4.5.1 Expresión relativa del gen <i>sex-1</i> en gusanos tratados con Ciglitazona	47
4.5.2 Expresión relativa del gen <i>nhr-23</i> en gusanos tratados con Ciglitazona	48
4.5.3 Expresión relativa del gen <i>nhr-85</i> en gusanos tratados con Ciglitazona	49
4.6 Efecto de Ciprofibrato sobre la expresión de la enzima Acyl-CoA oxidasa, gen blanco de PPAR α	50
4.6.1 Homologías entre proteínas de Acyl-CoA oxidasa	51
4.6.2 Expresión relativa del gen F08A8.1 en gusanos tratados con Ciprofibrato	53
4.6.3 Expresión relativa del gen F59F4.1 en gusanos tratados con Ciprofibrato	54

5. DISCUSIÓN	55
5.1 Alineamiento de secuencias	56
5.2 Efectos de agonistas farmacológicos específicos de PPARs en <i>C. elegans</i>	57
5.3 Efecto de Ciprofibrato sobre la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs en <i>C. elegans</i>	58
5.4 Efecto de Ciglitazona sobre la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs en <i>C. elegans</i>	58
5.5 Gen blanco de PPAR α : Acyl-CoA oxidasa	59
5.6 Receptores nucleares en <i>Caenorhabditis elegans</i>	62
BIBLIOGRAFÍA	65

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura N° 1	Esquema general de la anatomía de <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
Figura N° 2	Estructura general de receptores nucleares de la sub-familia PPARs (Peroxisome Proliferator- Activated Receptor)	9
Figura N° 3	Visión actual de la acción de los PPARs y sus efectos sobre la expresión génica	14
Figura N° 4A	Efecto de Ciprofibrato en la letalidad embrionaria	39
Figura N° 4B	Efecto de Ciglitazona en la letalidad embrionaria	39
Figura N° 5	Efecto de Ciprofibrato en el lumen intestinal de <i>C. elegans</i>	41
Figura N° 6	Efecto de Ciprofibrato en la expresión del gen <i>sex-1</i> de <i>C. elegans</i>	43
Figura N° 7	Efecto de Ciprofibrato en la expresión del gen <i>nhr-23</i> de <i>C. elegans</i>	44
Figura N° 8	Efecto de Ciprofibrato en la expresión del gen <i>nhr-85</i> de <i>C. elegans</i>	45
Figura N° 9	Efecto de Ciglitazona en la expresión del gen <i>sex-1</i> de <i>C. elegans</i>	47
Figura N° 10	Efecto de Ciglitazona en la expresión del gen <i>nhr-23</i> de <i>C. elegans</i>	48
Figura N° 11	Efecto de Ciglitazona en la expresión del gen <i>nhr-85</i> de <i>C. elegans</i>	49
Figura N°12	Efecto de Ciprofibrato en la expresión del gen F08A8.1 de <i>C. elegans</i>	53
Figura N° 13	Efecto de Ciprofibrato en la expresión del gen F59F4.1 de <i>C. elegans</i>	54
Tabla N° 1	Partidores utilizados en las reacciones de PCR	25
Tabla N° 2	Resultados del rastreo en base de datos de las secuencias de proteínas de <i>C. elegans</i> y PPARs	29
Tabla N° 3	Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR α de <i>Homo</i>	31

	<i>sapiens</i> y las secuencias de proteínas de <i>C. elegans</i>	
Tabla N° 4	Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR β de <i>Homo sapiens</i> y las secuencias de proteínas de <i>C. elegans</i>	32
Tabla N° 5	Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR γ de <i>Homo sapiens</i> y las secuencias de proteínas de <i>C. elegans</i>	33
Tabla N° 6	Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR α de <i>Mus musculus</i> y las secuencias de proteínas de <i>C. elegans</i>	34
Tabla N° 7	Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR β de <i>Mus musculus</i> y las secuencias de proteínas de <i>C. elegans</i>	35
Tabla N° 8	Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR γ de <i>Mus musculus</i> y las secuencias de proteínas de <i>C. elegans</i>	36
Tabla N° 9	Homología entre la proteína de <i>C. elegans</i> (CE:17633=F08A8.1) y proteínas de <i>Homo sapiens</i>	51
Tabla N° 10	Homología entre la proteína de <i>C. elegans</i> (CE: 17633=F08A8.1) y proteínas de <i>Mus musculus</i>	52
Tabla N° 11	Homología entre la proteína de <i>C. elegans</i> (CE: 11546=F59F4.1) y proteínas de <i>Homo sapiens</i>	52
Tabla N° 12	Homología entre la proteína de <i>C. elegans</i> (CE: 11546=F59F4.1) y proteínas de <i>Mus musculus</i>	52

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
CGC	Caenorhabditis Genetic Center
Cig	Ciglitazona
CiP	Ciprofibrato
dATP	2' desoxiadenosina 5'trifosfato
dCTP	2' desoxicitidina 5'trifosfato
dCTP $\alpha^{32}\text{P}$	2' desoxicitidina 5'trifosfato $\alpha^{32}\text{P}$
DBD	DNA binding domain (dominio de unión a ADN)
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	2'desoxiguanosina 5'trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleótidos
DR1	Direct repeat 1 (repetición directa 1)
dTTP	2'desoxitimidina 5'trifosfato
DTT	ditiotreitol
Fig	Figuras
FATP	Fatty acid transport protein (proteína transportadora de ácidos grasos)
GFP	Green fluorescent protein (Proteína fluorescente verde)
h	Horas

LBD	ligand binding domain (dominio de unión a ligando)
LPL	lipoproteinlipasa
MOPS	(3-(N-morfolino) ácidopropanosulfónico
NHR	Nuclear hormone receptor (receptor de hormona nuclear)
NGM	Nematode growth medium (medio de crecimiento de nemátodo)
Pb	pares de bases
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PPARs	Proliferator Peroxisome Activated Receptor (receptor activado por proliferadores peroxisomales)
PPs	Proliferadores Peroxisomales
PPREs	Peroxisome proliferators response elements (elementos de respuesta a PPARs)
RN	Receptores nucleares
RT	Transcriptasa reversa
RXR	Receptor del ácido 9-cis retinoico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Amortiguador citrato salino
TZDs	Tiazolinedionas
YAC	Yeast artificial crhomosome (Cromosoma artificial de levadura)

1. RESUMEN

Un sistema modelo para el estudio de los factores de transcripción del tipo PPARs es el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. La secuenciación completa del genoma de este gusano muestra un alto número de genes de receptores nucleares (270 genes de RN). En este trabajo se describe la identificación de genes putativos homólogos a PPARs, un receptor nuclear clave en la regulación del metabolismo lipídico celular en vertebrados.

Los PPARs son factores de transcripción que se activan por ligandos (ácidos grasos y sus metabolitos (eicosanoides) y activadores farmacológicos), de los cuales se han descrito tres isoformas ($\alpha, \beta/\delta, \gamma$), que cumplen distintas funciones en el metabolismo lipídico. La estrategia utilizada en la búsqueda de un homólogo a PPARs, se basó en alineamientos entre secuencias de proteínas de las distintas isoformas de PPARs de humano y ratón, con secuencias de proteínas de *C. elegans*, contenidas en una base de datos. Esta búsqueda reveló que existe una alta homología en la región del dominio de unión a ADN de PPARs con las secuencias de proteínas de receptores nucleares NHR-85, NHR-23 y SEX-1. Luego realizamos ensayos con activadores farmacológicos clásicos de PPAR α y γ , los cuales revelaron que en tratamientos con ciprofibrato, un agonista clásico de PPAR α , existe un aumento en la expresión del ARNm del receptor nuclear *nhr-85*, así como también se observa un aumento en la expresión del ARNm del gen F08A8.1, el cual codifica para una proteína en *C. elegans* que es homóloga a la enzima Acyl-CoA oxidasa de humanos y roedores, la cual cataliza la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga en los peroxisomas y cuyo gen es un blanco clásico de PPAR α en vertebrados.

En base a los resultados obtenidos, sugerimos la existencia de un receptor nuclear del tipo PPAR α en *Caenorhabditis elegans*.

SUMMARY

A model system for the study of transcription factors of the PPAR type is the nematode *Caenorhabditis elegans*. The complete genome sequence of this nematode shows an elevated number of nuclear receptor genes (270 genes). This work describes the identification of putative homologous genes of PPARs, a key nuclear receptor in the regulation of cellular lipid metabolism in vertebrates.

PPARs are transcription factors activated by ligands (fatty acids and their metabolites (eicosanoids) and pharmacological activators), among which three isoforms have been described (α , β/δ , γ), all participating in different functions of lipid metabolism. The strategy used for the search of a PPAR homologue was based on alignments between the protein sequences of the different human and mouse PPAR isoforms and protein sequences of *C. elegans*, contained in a data base. This search revealed a high homology between the protein sequences of the PPAR DNA-binding domain and those of the nematode's nuclear receptors *nhr-85*, *nhr-23*, and *sex-1*. We then performed assays with classic PPAR α and γ activators, which revealed that the treatment with ciprofibrate, a classic PPAR α agonist, caused an increase in the expression of the mRNA of *nhr-85*, as well as on the expression of the mRNA of the gene F08A8.1, which codes for a *C. elegans* protein that is homologous to the human and murine Acyl-CoA oxidase enzyme, which catalyses the oxidation of very long chain fatty acids within peroxisomes, and whose gene is a classic target of PPAR α in vertebrates.

Based on the results obtained we suggest the existence of a nuclear receptor of the PPAR α type in *Caenorhabditis elegans*.

2. INTRODUCCION

En 1965 Sydney Brenner selecciona el nemátodo *Caenorhabditis elegans* como un modelo experimental, para estudiar y comprender el desarrollo animal y los principios fundamentales del sistema nervioso. (Brenner. 1974)

Caenorhabditis elegans es un nemátodo de cuerpo transparente de 1mm de largo con un diámetro máximo de aproximadamente 80 μm (dimensiones de un hermafrodita adulto) (Fig.1) Este animal ofrece como modelo muchas ventajas experimentales. Entre ellas encontramos un fácil crecimiento sobre un medio de agar en placas Petri, con una dieta en base a *Escherichia coli*. Tiene un corto ciclo de vida (3.5 días a 20°C) y un alto número de progenie (>300) que es obtenida a partir de un hermafrodita adulto por auto fertilización. El hermafrodita adulto de *C. elegans* posee 959 células somáticas de las cuales 302 son neuronas. El número de células es invariable, lo cual ha facilitado el establecimiento de un complejo linaje celular, así como también una completa relación del Sistema Nervioso Central y conexiones sinápticas entre células nerviosas y musculares. (White y cols. 1986)

A pesar de tener una organización aparentemente rudimentaria, muchos de los distintos tipos de células asociadas con funciones complejas en mamíferos, tales como; células musculares, neuronas, células intestinales y del sistema excretor, pueden ser reconocidas e identificadas inequívocamente en *C. elegans*. Otra ventaja de este modelo es la disponibilidad de un mapa genético preciso que contiene mas de 2000 loci. La construcción de un mapa físico fue lograda en un comienzo por sub clonamiento en cósmidos y cromosomas artificiales de levaduras (YACs), completando casi todo el ADN genómico del *C. elegans*. Posteriormente estos clones genómicos fueron ordenados uno respecto del otro y alineados con el mapa genético, con lo cual el análisis molecular de los genes de *C. elegans* se ha facilitado considerablemente. Es una tarea

relativamente simple para la selección de un pequeño número de clones genómicos para el uso en la transformación de animales mutantes por microinyección (Mello y cols. 1991)

El número de estudios científicos usando *C. elegans* como un sistema modelo ha aumentado en forma exponencial en las pasadas tres décadas. El interés por esta especie está sustentado en respuestas a los sucesos del proyecto genoma de *C. elegans*. Este proyecto fue terminado en diciembre del año 1998, haciendo de éste nemátodo el primer organismo multicelular para el cual el genoma ha sido secuenciado. Una sorpresa resultó el hallazgo de que el 65% de las enfermedades asociadas a genes en humanos tienen una contraparte en el gusano (Sonnhammer y Durbin 1997). La información obtenida de la secuenciación del genoma ha enfatizado la considerable conservación de mecanismos biológicos. Esta observación confirma el valor de *C. elegans* como un sistema modelo el cual ha contribuido significativamente a nuestros conocimientos biológicos de todos los animales incluyendo el humano y podría continuar aportando nuevos conocimientos. (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998)

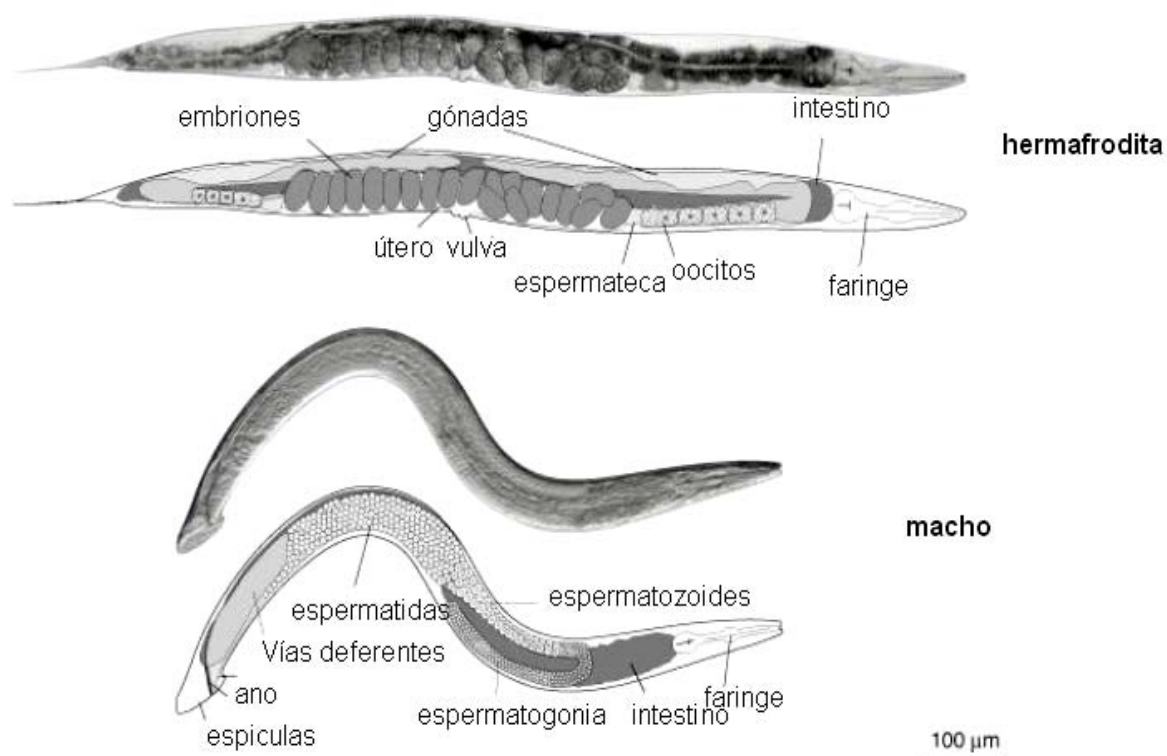


Figura 1. Esquema general de la anatomía de *Caenorhabditis elegans*

La figura muestra dos fotos de un hermafrodita y un macho con sus respectivos esquemas, identificando los órganos principales de cada uno de ellos. (Muhlrad. 2001)

2.1 Receptores nucleares en *Caenorhabditis elegans*

Los receptores nucleares (RN) forman una gran super-familia de factores de transcripción que son importantes en la regulación del metabolismo, desarrollo y reproducción celular (Mangelsdorf y cols. 1995). Un receptor típico contienen principalmente 4 dominios (Fig. 2) de los cuales el más conservado es el dominio de unión a ADN (DBD). Este está formado por dos dedos de Zn que han permanecido a través de la evolución (Laudet y cols 1992). Un segundo dominio menos conservado, es el dominio de unión a ligando (LBD) localizado en el extremo carboxilo terminal de la molécula e involucra la unión de pequeñas moléculas hidrofóbicas, hormonas de la clase esteroideas, hormona tiroidea, estero isómeros de ácido retinoico, farnesoides, terpenoides y prostaglandinas (Mangelsdorf y cols. 1995). La clasificación generalmente aceptada de los RN se basa en la homología de ambos dominios, dominio de unión a ADN y dominio de unión a ligando y en los ligandos específicos si se conocen. La mayoría de los receptores tienen ligandos no conocidos y usualmente se les denomina receptores huérfanos.

Los receptores nucleares comprenden el mayor número de clases de reguladores transcripcionales codificado en el genoma de *C. elegans* con al menos, 270 genes de RN identificados al término de la secuenciación del genoma (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998). Aparentemente, numerosas duplicaciones de genes han contribuido a esta abundancia (Sluder y cols. 1999) de RN, algunos de estos son no funcionales (pseudogenes). Sin embargo, varias observaciones sugieren que la mayoría de los genes de RN predichos son funcionales. En primer lugar, experimentos basados en secuencias que expresan (EsT) confirman la expresión de 79 (29%) de los 270 genes predichos. Segundo, estudios de promotores de estos genes fusionados con Proteína Fluorescente Verde (GFP), revelan la expresión en animales transgénicos para 21 de

los 28 genes de RN estudiados, lo cual sugiere que la mayoría de los genes de RN predichos son transcripcionalmente funcionales (Miyabayashi y cols. 1999).

Entre los organismos multicelulares para los cuales la secuenciación del genoma ha sido efectivamente terminada, solo *C. elegans* muestra tal extravagancia en genes de RN. Otros genomas, como el de *Drosophila* y el de Humano contienen 21 genes de RN y 50 genes de RN respectivamente.

A pesar de la cantidad de genes de RN reportados en *C. elegans*, sólo 15 de estos reguladores transcripcionales poseen ortólogos u homólogos en insectos y vertebrados. Los restantes 255 genes de RN no pueden ser clasificados dentro de esta súper-familia de RN de acuerdo a los análisis filogenéticos realizados hasta la fecha (Sluder y cols. 1999).

El gran número de genes de RN encontrado en *C. elegans* ha generado un gran interés en la comunidad científica mundial por dilucidar la función que éstos cumplen en el nemátodo. Sin embargo, poco se sabe al respecto. Desde que finalizó el proyecto genoma de *C. elegans* (Diciembre 1998), diferentes científicos se han avocado a la investigación de los factores de transcripción, alcanzándose grandes avances en explicar su relevancia en el gusano. A pesar de ello se desconoce la existencia de un RN homólogo a PPARs en *C. elegans*. Nuestro objetivo en este trabajo es estudiar estos factores de transcripción en el nemátodo empleando programas computacionales de alineamiento y modelamiento de secuencias de proteínas, análisis de la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs (*nhr-85*, *nhr-23* y *sex-1*) en condiciones normales y dependiente de drogas. La presencia de homólogos a PPARs en el nemátodo facilitaría considerablemente el estudio de estos factores nucleares los cuales se encuentran involucrados en una amplia gama de procesos biológicos relevantes en vertebrados. Básicamente,

este trabajo trazará las primeras líneas en la búsqueda de un gen putativo homólogo a PPARs en *C. elegans*.

2.2 PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor)

Los receptores nucleares mas recientemente descubiertos son los PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), cuya existencia se demostró a comienzos de la década de los 90 por Issemann y Green (Issemann y Green. 1990). Estos autores notaron que estos nuevos receptores nucleares se activaban por diversas clases de hepatocarcinógenos, que causaban proliferación de los peroxisomas en roedores.

Los Proliferadores Peroxisomales (PPs) son un grupo diverso de compuestos químicos que incluyen drogas hipolipemiantes, herbicidas y plastificantes industriales. La administración de estos químicos a roedores resulta tanto en la proliferación de peroxisomas hepáticos, como de hiperplasia hepática (Reddy y cols. 1979 y Styles y cols. 1998). Además, se observa transcripción activa de genes requeridos para la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga (Reddy y cols. 1986), y de genes de la familia del citocromo P-450 (Hardwick y cols. 1987). Los PPs actúan como carcinógenos no genotóxicos, ya que no causan daño directo al ADN (Warren y cols. 1980). El aumento de la β -oxidación peroxisomal de ácidos grasos en respuesta a los proliferadores peroxisomales resulta en una gran producción de peróxido de hidrógeno, el que generaría estrés oxidativo conducente a un daño al ADN y posiblemente a la iniciación de tumores (Conway y cols. 1989)

A nivel molecular, los PPARs actúan de manera similar a otros receptores nucleares (Fig. 3) Primero, son factores de transcripción activados por ligandos que controlan la expresión

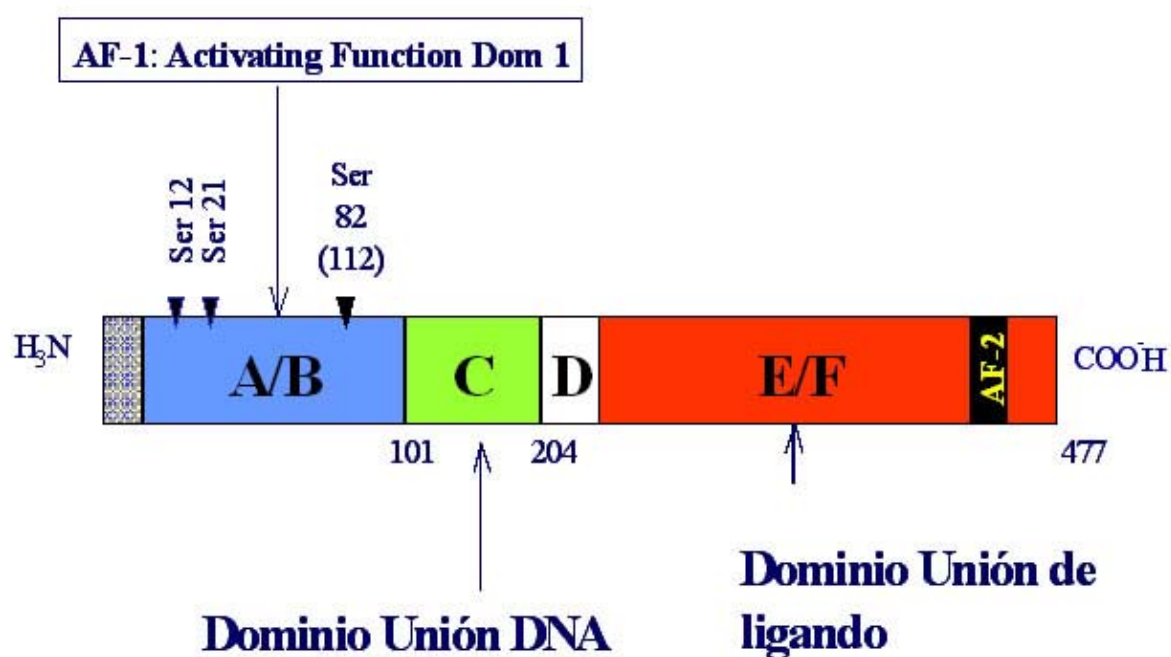


Figura 2. Estructura general de los receptores nucleares de la sub-familia PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors).

Los receptores nucleares presentan tres dominios principales: A/B: dominio de trans-activación independiente de ligandos, con sitios de activación dependientes de fosforilación. C: dominio de unión a ADN, (altamente conservado). E/F: dominio de unión a ligando, (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).

génica a través de la interacción con elementos de respuesta ADN específicos, denominados PPREs (Peroxisome Proliferators Response Elements), estos se ubican en la región promotora de los genes blanco. El sitio PPRE es virtualmente idéntico para los tres isotipos de PPARs, lo cual implicaría que muchas de las diferencias entre las funciones de los PPARs son derivadas tanto de la expresión tejido-específica, como del tipo de activadores. El sitio reconocido por los PPARs contiene dos copias de una secuencia consenso AGGTCA con un nucleótido de separación entre ellos, denominado DR-1. Los PPARs y otros receptores nucleares se unen al promotor sólo como un heterodímero con el receptor para el ácido 9-cis retinoico, RXR (retinoid X receptor). Segundo, los PPARs activan la transcripción en respuesta a unión del "ligando". Para el heterodímero PPAR: RXR, la unión de un ligando a cualquiera de los receptores activa el complejo, pero la unión simultánea de ambos ligandos potencia aún más el complejo (Desvergne y Whali. 1999).

Se han identificado tres isotipos de PPARs : α , β (también llamado δ) y γ . PPAR α se expresa mayoritariamente en el tejido adiposo marrón e hígado, siguiendo después el riñón , corazón y músculo esquelético. PPAR γ se expresa principalmente en tejido adiposo y en menor grado en el colon, sistema inmune y retina. Este factor existe en dos distintas isoformas $\gamma 1$ y $\gamma 2$, lo que determina diferentes sitios de transcripción. PPAR β se encuentra en muchos tejidos encontrando los niveles mas altos en el sistema nervioso, intestino, riñón y corazón (Desvergne y Whali. 1999). La distribución diferencial de los distintos isotipos de este receptor nuclear explica en muchos casos los diversos roles biológicos que ellos poseen.

En general se acepta que los PPARs son factores de transcripción dependientes de ligando, es decir, la activación de la transcripción de los genes blanco depende de la unión de un ligando al receptor. Algunos ligandos son compartidos por los tres isotipos, tales como ácidos

grasos poliinsaturados y probablemente ácidos grasos oxidados. Muchos compuestos se unen con alta afinidad a PPAR α , incluyendo ácidos grasos de cadena larga tales como ácido linoleico conjugado y eicosanoides tales como 8S-HETE y leucotrieno B-4 (Desvergne y Whali. 1999; Lim y cols. 1999). Para PPAR γ , el ligando natural más potente es la 15-deoxy γ -prostaglandina J2. Análisis estructurales de los LBDs de PPAR γ y PPAR β revelan que sus bolsillos de unión a ligando son tres veces más grandes que aquellos de otros receptores nucleares, para permitir que los ácidos grasos se unan en diversas conformaciones. Estos descubrimientos sugieren que los PPARs pueden desenvolverse preferencialmente como sensores lipídicos y reconociendo diversos ácidos grasos y sus metabolitos, más que una determinada hormona de alta afinidad. Sin embargo, esta idea permanece especulativa, y la búsqueda de un ligando natural de alta afinidad continúa.

Muchas de las funciones de los PPARs pueden ser extrapoladas a partir de la identidad de sus genes blanco, los cuales pertenecen casi todos al metabolismo lipídico. PPAR α ha sido principalmente estudiado en células parenquimáticas del hígado, donde es altamente expresado. Los genes blanco de PPAR α son un grupo relativamente homogéneo de genes que participan en el catabolismo lipídico, tales como salida de ácidos grasos de la membrana, unión de ácidos grasos dentro de las células, oxidación de ácidos grasos en microsomas, peroxisomas y mitocondria, además del ensamblaje y transporte de lipoproteínas. El ratón nulo para PPAR α , exhibe anormalidades en el metabolismo de los triglicéridos y colesterol, no respondiendo a fibratos y convirtiéndose en un ratón obeso (Costet y cols. 1998), lo que ha llevado a la conclusión que PPAR α es un regulador clave del metabolismo lipídico intra y extracelular.

PPAR γ está involucrado en el almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo. Junto a los factores de transcripción C/EBP, PPAR γ es parte del programa de diferenciación de adipocitos (Rosen y cols. 1999), siendo el efector final limitante. La mayoría de los genes blanco están directamente implicados en vías lipogénicas, incluyendo la lipoproteinlipasa (LPL), Acyl-CoA sintasa y proteínas de unión y transporte de ácidos grasos.

PPAR β ha recibido poca atención, probablemente a causa de la falta de una conexión con manifestaciones clínicas importantes. Sin embargo, PPAR β está ligado al cáncer de colon y regula la expresión de Acyl-CoA sintasa 2 en el cerebro, lo cual ligaría a este isotipo del receptor al metabolismo lipídico (Basu-Modak y cols. 1999). Por otra parte estaría participando en la implantación del embrión y la decidualización (Lim y cols. 1999). Por ende, con estos datos en la actualidad hay mayor interés por el estudio de este isotipo del receptor.

En la actualidad, en países desarrollados, los desórdenes metabólicos como hiperlipidemia, aterosclerosis, diabetes y obesidad, raramente ocurren separadas, siendo parte de un complejo fenotípico de anormalidades llamadas Síndrome X. Agonistas sintéticos de PPAR α (fibratos) y PPAR γ (tiazolinedionas (TZDs)) son muy usados en el tratamiento de éstas enfermedades. Los fibratos son drogas hipolipidémicas potentes, estructuralmente similares a los ácidos grasos, endógenos y dietarios, y sus metabolitos contienen un grupo funcional carboxílico y un tallo hidrofóbico. Entre estas drogas tenemos al Ciprofibrato, Gemfibrozil, Bezafibrato y Fenofibrato, los cuales se unen a PPAR α con mediana afinidad y se cree que la mayoría de sus efectos son mediados por este RN. Los fibratos bajan marcadamente los niveles de triglicéridos plasmáticos y aumentan los niveles de HDL en humanos.

Los ligandos sintéticos de PPAR γ son usados por sus potentes efectos antidiabético. En los Estados Unidos, tres TZDs, Troglitazona (Resulin), Rosiglitazona (Avandia) y Pioglitazona

(Actos) fueron aprobados para el uso en pacientes de diabetes tipo II. Ellos se unen a PPAR γ con afinidad moderada (Troglitazona) o alta (Rosiglitazona), modo por el cual se cree que ejercen su efecto hipoglicemiante. Con respecto a la aterosclerosis, las acciones de agonista de PPAR α y PPAR γ podrían ser benéficas en el tratamiento de esta enfermedad. PPAR α además de regular las concentraciones de lipoproteínas plasmáticas, decrece las concentraciones plasmáticas de proteínas pro-ateroscleróticas, tales como fibrinógeno y la proteína C reactiva (Kock y cols. 1999). Ratones nulos para PPAR α despliegan respuestas prolongadas a estímulos inflamatorios, indicando que este isotipo del receptor tiene una acción antiinflamatoria (Devchand y cols. 1999). Los fibratos pueden modular la inflamación por inhibir la producción de citoquinas controladas por PPAR α (Delerive y cols. 1999). Al igual que PPAR α , PPAR γ también ha sido implicado en la inflamación. En monocitos y macrófagos se ha propuesto que PPAR γ reduce la producción de citoquinas por inhibir la actividad de factores de transcripción pro-inflamatorios, tales como AP-1, STAT y NF- κ . Además puede reducir la expresión de metaloproteínas tales como MMP-9, las cuales están implicadas en la desestabilización de la placa aterosclerótica. Con respecto al cáncer, PPAR α media los efectos hepatocarcinogénicos de ciertos proliferadores peroxisomales en roedores. Sin embargo, este efecto de los PPs no ha sido encontrado en humanos, posiblemente a causa de que la expresión de PPAR α es mucho más baja en el hígado humano que en el de roedores, ó debido más bien a diferencias específicas entre especies.

PPAR γ tiene un efecto antiproliferativo en pre adipocitos y posiblemente en muchos tipos celulares tumorales.

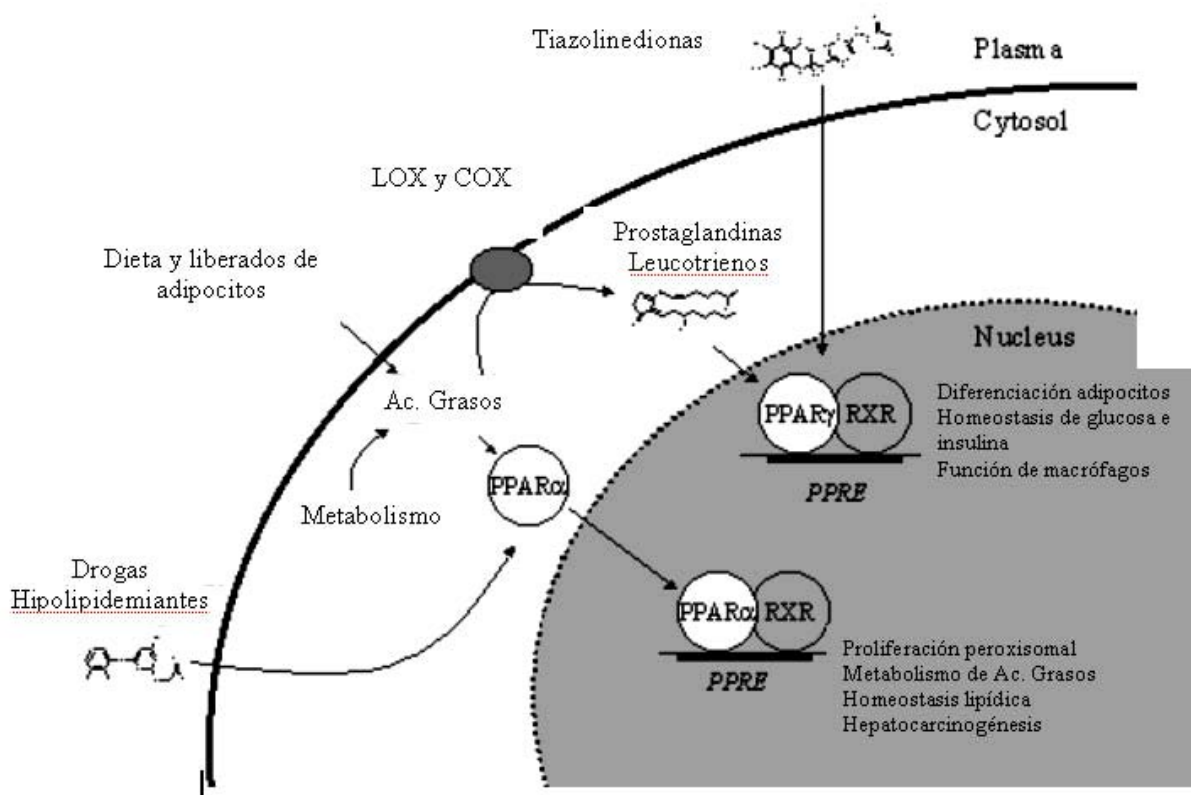


Figura 3. Visión actual de la acción de los PPARs y sus efectos sobre la expresión génica.

La asociación de los ligandos con el receptor permite la heterodimerización con RXR y la asociación del heterodímero al ADN en las secuencias PPRE, formadas por dos repeticiones directas del hexámero AACTGG separadas por un nucleótido X, activándose de éste modo la maquinaria transcripcional. Cabe señalar que en la figura se omite PPAR β , ya que aún no es clara su función, siendo sin embargo su activación similar a α y γ .

2.3 HIPOTESIS

En función de los antecedentes planteados en la introducción en base a la importancia de *Caenorhabditis elegans* como un modelo experimental, y al rol que cumplen los PPARs en el metabolismo celular planteamos como hipótesis central que existe un receptor nuclear homólogo a PPARs en *Caenorhabditis elegans*.

2.4 OBJETIVOS

Objetivo específico

Determinar la existencia de un factor nuclear homólogo a PPARs (Proliferator Peroxisome Activated Receptor) en *Caenorhabditis elegans*.

Objetivos generales

1. Realizar un alineamiento entre las secuencias de proteínas de los distintos isotipos de PPARs (α , β , γ) y las secuencias de proteínas de *C. elegans* contenidas en una base de datos (wormbase).
2. Determinar el posible efecto de los agonistas sintéticos de PPAR α y γ en los diferentes estados larvales del gusano.
3. Evaluar la expresión de los putativos genes homólogos a PPARs en tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona a través de RT-PCR.
4. Evaluar la expresión de un gen blanco de PPAR α (Acyl-CoA oxidasa) en tratamientos con Ciprofibrato a través de Northern Blot.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Cepa *Caenorhabditis elegans*

Se utilizará una cepa *him-5* número de alelo (e-1490). Esta cepa fue obtenida del laboratorio del Dr. Samuel Ward Universidad Arizona y del *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC)

3.1.2 Medios de cultivos

- **Medio de cultivo sólido: agar NGM**

Agar-agar, cloruro de calcio, colesterol, sulfato de magnesio, K_2PO_4 pH 6.0:

Merck (Darmstad, Alemania)

Peptone Bacteriological Grade : ICN Biomedicals (Costa mesa CA, EEUU)

- **Medio de cultivo líquido: S-Medium**

Cloruro de sodio, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , citrato de potasio, ácido cítrico monohidratado, tri-potasio de citrato monohidratado, EDTA, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, cloruro de magnesio tetra-hidratado, sulfato de zinc hepta-hidratado, sulfato de cobre penta-hidratado, cloruro de calcio, sulfato de magnesio: Merck (Darmstad , Alemania)

3.1.3 Bacteria

- *Escherichia coli* cepa OP50

3.1.4 Enzimas

- Transcriptasa reversa SuperScript II: Gibco. BRL (LIFE Technologies, Gaithersburg, EEUU)
- Tag DNA polimerasa, DNA polimerasa I Klenow: Promega Corp. (Madison, WI EEUU)

3.1.5 Marcadores de peso molecular

- Marcadores de peso molecular "100 pb Ladder" para electroforesis de ADN en geles de agarosa: Gibco. BRL (LIFE Technologies, Gaithersburg, EEUU)
- "1Kb plus ADN Ladder" marcador de peso molecular para electroforesis de ADN en geles de agarosa: Gibco. BRL (LIFE Technologies, Gaithersburg, EEUU):
- Marcador de concentración ADN escala 100 pb: Winkler. Ltda. (Santiago Chile)

3.1.6 Material radiactivo

- dCTP α -³²P: NEN. (Life Science Products, Boston, MA, EEUU)

3.1.7 Columnas

- "Mini quick DNA purification columns": CALBIOCHEM. (San Diego California EEUU)
- "Concert rapid gel extraction system" kit para la purificación de sondas: Gibco. BRL (LIFE Technologies, Gaithersburg, EEUU)

3.1.8 Membranas Northern

- Gene Screen plus, WHATMAN 3MM: NEN. (Life Science Products, Boston, MA EEUU):

3.1.9 Reactivos generales

- Ultra hyb, líquido de hibridización: AMBION. INC (Austin Texas EEUU):
- Oligo dT: Bios Chile. Ingeniería genética S.A. (Santiago Chile)
- Ciglitazona: BIOMOL. Research laboratories INC (Phymount Meeting :PA EEUU):
- Bromuro de etidio, trizol, first buffer strand, agarosa (low melting point), agarosa, DTT: Gibco. BRL (LIFE Technologies, Gaithersburg , EEUU):
- Formaldehído, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, glicerol, tris, cloroformo, isopropanol, DMSO, etanol: Merck (Darmstad , Alemania)
- Cloruro de magnesio, dNTPs, Mg free buffer, kit para la marcación de sondas (Prime-a- GENE Labeling Sistem): Promega. Corp (Madison , WI EEUU)
- EDTA, isoamylalcohol,: Sigma Chemical Co. (St Louis , MO, EEUU)
- Ciprofibrato: Sterling Organics (Dudley, Cramlington Inglaterra):
- DEPC, MOPS 10x, acetato de sodio, formamida, SDS: Winkler Ltda (Santiago Chile)

3.1.10 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)
- Alineamiento de proteína: Wormbase, Sanger Center, ACeDB

3.2 METODOS

3.2.1 Alineamiento de Secuencias: Se realizó un alineamiento entre secuencias de proteínas de los distintos isotipos de PPARs de dos especies diferentes (*Homo sapiens* y *Mus musculus*) y una base de datos que contenía las secuencias de proteínas de *C. elegans* (Wormbase, Sanger Center, AceDB) a través de programas computacionales que se encuentran en Internet (LALING ch EMBnet, Clustalw).

3.2.2 Cultivo, Mantención y Tratamientos

3.2.2.1 Cultivo medio sólido agar NMG: Esta cepa fue mantenida en medio de cultivo sólido agar NMG con una dieta en base a *Escherichia coli* cepa OP50. Fueron cultivados en una incubadora a 20 °C en placas Petri estériles, de 100 mm de diámetro hasta alcanzar el número de población esperado. En este momento se realizaron pasajes a nuevas placas o se seleccionaron para los tratamientos. Los pasajes de las placas se hacen, con un escalpelo o espátula estéril se corta, un trozo pequeño de agar y se traslada a una placa nueva que contenga bacterias (*E. coli* cepa OP50)

3.2.2.2 Agar NMG: Se mezclan los reactivos (cloruro de sodio, Bacto-Peptona, agar, agua bi destilada) en un matraz cuyo volumen es el doble del volumen a preparar, se autoclava el primer litro del total de líquidos más cinco minutos por cada litro adicional (ciclo líquido) se deja que el agar se enfríe hasta aproximadamente 55° C, se agregan los nutrientes (cloruro de calcio, sulfato de magnesio, fosfato ácido de potasio) usando

técnicas asépticas, se autoclava y luego se agrega colesterol (5mg/ml) en 100 % de etanol. La preparación de las placas se lleva a cabo bajo una campana de presión positiva, utilizando una pro-pipeta de 25ml. El matraz se mantiene en una placa calefactora (calor medio/ bajo) mezclando suavemente mientras se preparan las placas, estas se dejan secar en la campana (ventilación apagada) hasta el día siguiente, y se guardan en contenedores plásticos bien cerrados a 4° C.

3.2.2.3 Sembrado placas Petri: Usando técnicas estériles, se siembra la bacteria (*Escherichia coli* cepa OP50 en cultivo líquido) en forma de gotas a través de la superficie del agar, con pipeta Pasteur (cuidando de no dañar el agar) se deja crecer la bacteria toda la noche a temperatura ambiente o a 37° C por 8 h. Las placas se guardan a 4° C y se llevan a temperatura ambiente antes de añadir los gusanos.

3.2.2.4 Tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona: Una vez que los gusanos hayan alcanzado el número de población esperado (inspección visual) se lavan las placas con medio líquido S-MEDIUM (S-Basal: cloruro de sodio, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , colesterol, agua bi destilada), citrato de potasio 1M pH: 6.0, solución de trazas de metal, cloruro de calcio 1M, sulfato de magnesio 1M). Usando técnicas estériles, estos se traspasan a matraces de 25ml que contienen 10ml de medio líquido S-MEDIUM. Se agregan alícuotas de bacteria concentrada (*E. coli* cepa OP50) y las drogas a utilizar a distintas concentraciones. Estos agentes fueron pre-disueltos en 1% de DMSO (Epstein and Shakes 1995), utilizando como control el vehículo en el cual se disolvió. Finalmente se incubó a 25° C con agitación constante (Shaker) durante 24 horas.

3.2.3 Extracción de ARN total

3.2.3.1 Método de Trizol para obtención de ARN total: Una vez finalizado el período de tratamiento por 24 horas, se procede a lavar los gusanos, traspasándolos desde los matraces a tubos falcón de 15ml. Se centrifuga por 1 minuto y se extrae el líquido sobrenadante, el sedimento de gusanos obtenido se lava con buffer M9 (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl , MgSO_4 , agua bi destilada). Este procedimiento se repite cuatro veces por cada tratamiento. Por cada ml de sedimento de gusanos obtenidos se agregan 4 ml de Trizol, los tubos son sumergidos en un termo que contiene nitrógeno líquido por 10 segundos, luego son trasladados a un baño a 37°C por 2 min y finalmente se llevan a vortex, por no más de 1 min, repitiéndose este proceso 4 veces. Se agregan 2 ml más de Trizol por cada ml de sedimento de gusanos obtenidos al comienzo. Una vez finalizada esta etapa se homogeniza la solución con jeringas de tuberculina. El homogenizado total es traspasado a tubos eppendorf de 1.5 ml y se dejan 5 minutos a temperatura ambiente. Se agrega 200 μl de cloroformo:isoamilalcohol 49:1, se mezclan bien para la separación de las fases y se dejan 2 min a temperatura ambiente. Se centrifuga por 15 minutos a 14000 rpm a 4°C y la fase acuosa se transfiere a otro tubo eppendorf (el DNA y las proteínas permanecen en la interfase fenólica). Se agrega 0.5 ml de isopropilalcohol, se mezcla bien y se deja precipitar el ARN durante 5 min en hielo. Transcurrido este 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 por 5 min a 14000 rpm a 4°C , se remueve el etanol y

se deja secar. Finalmente el sedimento se resuspende en agua tratada con DEPC 0.1% y se deja 10 min en un baño a 60°C para que solubilice el ARN.

3.2.3.2 Determinación de la concentración de ARN: La cantidad de ARN se determina por espectrofotometría tomando 2 µl de ARN y llevándolo a 1ml de agua con DEPC, usando como blanco agua DEPC. Se mide absorbancia a 260 y 280 nm y la cantidad de ARN se determina mediante la fórmula $A_{260} * 40 \text{ mg/ml} * 500/1000 = X \text{ µg ARN/µl}$. El ARN obtenido se guarda a -80° C.

3.2.3.3 Electroforesis de ARN en geles de agarosa: Para verificar la integridad del ARN extraído se preparan geles de agarosa/formalina disolviendo 1g de agarosa en 72ml de agua DEPC y agregando 18 µl de formaldehído y 10 µl de tampón MOPS 10X. 1.5 µg de ARN, se resuspende en tampón de carga (100µl MOPS 10X, 179µl formaldehído 37%, 100µl de solución de glicerol (30% glicerol + 0.025% de azul de bromo fenol), 5ml de bromuro de etidio (10mg/ml), 116ml de agua DEPC, 500µl de formamida). Las muestras son cargadas y corridas a 80 volts.

3.2.4 Reacciones enzimáticas con ácidos nucleicos

3.2.4.1 Transcripción reversa (RT): la transcripción reversa para generar el cDNA de los receptores nucleares y enzimas (*sex-1*, *nhr-23*, *nhr-85*, Acyl-CoA oxidasa (F59F4.1, F08A8.1)) se realizó utilizando 0.5µg de ARN en un volumen final de 20µl, conteniendo

50U de SuperScript II en el tampón suministrado para la enzima (250mM Tris-HCL pH 8.3, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM), 2μl DTT 0.1M , 1μl de una mezcla 10mM de dNTPs (10mM de dATP, dTTP, dGTP, dCTP) y 495ng de oligo dT. La reacción fue incubada a 42° C durante 1 hora y se detuvo mediante denaturación de la enzima al subir la temperatura a 72° C por 15 min. Para controlar la presencia de ADN contaminante.

3.2.4.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR): *nhr-85*, *CeiF*, *nhr-23*, *sex-1*, F08A8.1, F59F4.1: La reacción de amplificación se realizó utilizando 2μl del producto de RT, en un volumen final de 22.5μl, conteniendo 5U de Taq ADN Polimerasa en el tampón suministrado por la enzima (Tris – HCl 20mM pH 8.0, KCl 100mM, EDTA 0.1mM, 0.5% Tween 20 y 0.5% Nonidet-P40), 0.5 μl de los desoxinucleótidos 10mM de cada uno, 2μl de partidores específicos de cada gen, 10pmol cada uno y 1μl de MgCl₂ 25mM. El programa para amplificar *nhr-85*, consiste en denaturación inicial 95° C por 5min, una amplificación de 95° C por 1min, 58° C por 1 min. y 72° C por 1min durante 28 ciclos y una extensión final a 72° C por 10 min. Para la amplificación de *nhr-23*, *sex-1* y F08A8.1, se determinaron 23 ciclos en la reacción y 27 ciclos para F5954.1, en las mismas condiciones de temperatura anteriormente descritas

3.2.4.3 Diseño de partidores para PCR:

Se diseñaron partidores para una región específica de los genes seleccionados a través del programa Jellyfish

Tabla 1. Partidores utilizados en las reacciones de PCR

Gen constitutivo	Partidores	F= partidor río arriba R= partidor río abajo	Tamaño amplificado
CeIF	5'-CGGAATCTACGGATTCGGT-3' 5'-GTGGAGGCAAGAGACTGTC-3'	F R	907 pb

Putativos genes homólogos a PPARs	Partidores	F= partidor río arriba R= partidor río abajo	Tamaño amplificado
<i>Sex-1</i>	5'-CGCTTCCCACTCTACTTG-3' 5'-GTTGTTGATTTGCGCTTGG-3'	F R	580 pb
<i>nhr-23</i>	5'-GCAGTCAATCATCCATCGTC-3' 5'-TGAATTCGGTGAATCCTGTC-3'	F R	1399 pb
<i>nhr-85</i>	5'-TGGAGCACTTGAAGGCAGTA-3' 5'-CTGCAATCGCTGTGAGAATC-3'	F R	795 pb

Genes homólogos a Acyl-CoA oxidasa	Partidores	F= partidor río arriba R= partidor río abajo	Tamaño amplificado
F08A8.1	5'-GAACTTACATTGCTCCGGCT-3' 5'-GGATGACTTGTTCCAGGCGA-3'	F R	989 pb
F59F4.1	5'-GAACTTACATTGCTCCGGCT-3' 5'-CAGCCGAGCAACATCGAAG-3'	F R	872 pb

3.2.4.4 Estandarización de las Reacciones de PCR

Para la estandarización de las reacciones de PCR se realizaron curvas de 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. Además se realizaron curvas de tiempo de tratamientos y concentración de drogas para los genes, *nhr-85*, *nhr-23* y *sex-1*.

3.2.4.5. Electroforesis en geles de Agarosa

Los productos de RT-PCR obtenidos se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE, utilizando un estándar de tamaño molecular de 1000pb. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 75 volts por aproximadamente 90 minutos. El gel se tiñó con bromuro de etidio y la fluorescencia emitida se observó en un transluminador UV.

3.2.5 Northern blot

3.2.5.1 Obtención de sondas: Las sondas para (*nhr-85*, *CeIF*, F08A8.1, F54F4.1) fueron obtenidas como producto de PCR utilizando los partidores descritos en tabla 1. Posteriormente las sondas fueron purificadas desde un gel de agarosa 2% de bajo punto de fusión, utilizando el kit de purificación de sonda (Concert rapid gel extraction system) según protocolo recomendado por fabricante.

3.2.5.2 Fraccionamiento de ARN en gel de agarosa: Se preparó un gel de agarosa al 1.5%, se cargaron 10µg de ARN de cada muestra. Previamente estas se secaron bajo un flujo constante de nitrógeno y se resuspendieron en 10µl de tampón de carga de ARN (100µl MOPS 10X, 179µl formaldehído 37%, 100µl de solución de glicerol (30% glicerol + 0.025% de azul de bromo fenol), 5µl de bromuro de etidio (10mg/ ml), 116ml de agua DEPC, 500µl de formamida). Luego las muestras se llevaron a un baño a 60° C por 10 min y se corrieron a 80 volts. El gel fue lavado con agua DEPC utilizando 2 volúmenes de gel por 10 min con agitación, luego se hizo un lavado con NaOH 0.05N utilizando 2 volúmenes de gel por 20 min con agitación constante, con el fin de fijar el ARN al gel. Finalmente se volvió a lavar con 2 volúmenes de agua DEPC por 10 min con agitación. Una vez finalizada esta etapa se procedió a hacer la transferencia durante toda la noche. Posteriormente se realizó un “cross-linking” con el fin de fijar el ARN a la membrana. Esta última se pre-hibridó a 42° C con (líquido de hibridización, Ultra hyb) durante 4 h.

3.2.5.3 Marcación de sondas: Se marcaron 25 ng de sonda utilizando el kit (Prime –a-GENE Labeling Sistem Promega) con 25µCi de ^{32}P - α -dCTP, luego se purificó la sonda en columnas Sephadex G-25, se separaron las hebras calentando 5 min a 100° C y se inició el proceso de hibridación durante toda la noche a 42° C. Finalmente la membrana marcada se lavó dos veces con 20 ml de tampón SSC 2X, SDS 0.1 % por 10 min cada vez a 42° C y dos veces con 20 ml de tampón SSC 0.1X, SDS 0.1% por 15 min cada vez a 42° C. Posteriormente la membrana se cubrió con plástico y se dejó exponiendo en film Kodak por tiempo relativo a –80° C, en un cassette con pantalla intensificadora

3.2.6 Inspección visual

3.2.6.1 Letalidad embrionaria: Una vez finalizado el período de tratamiento con las drogas (ciprofibrato y ciglitazona) por 24 h se seleccionaron al azar hermafroditas adultos de los distintos matraces y fueron trasladados a placas Petri de 60mm de diámetro que contenían bacteria (*E.coli* cepa OP50). Se depositaron 10 gusanos por cada placa, y se incubaron a 20° C por 8 h. Terminado el período de incubación se retiraron los gusanos (hermafroditas adultos) y se contó el número total de huevos. Se incubaron las placas nuevamente a 20° C por 14 h. Finalmente se contaron los huevos no eclosionados

3.2.6.2 Efecto fenotípico: una vez finalizado el período de tratamientos por 24 h se tomaron alícuotas de los distintos matraces y se agregaron a placas Petri de 60mm de diámetro sin bacteria. Se observaron los gusanos bajo lupa (Wild M5 Hettrugg, Suiza) para verificar si existe algún cambio morfológico en la población, los gusanos fueron seleccionados y trasladados a portaobjetos que contienen en su superficie una capa de agarosa, posteriormente los gusanos fueron inmovilizados con azida y fotografiados bajo el microscopio (Zeiss Axioplan Alemania)

4. RESULTADOS

4.1. Alineamiento de proteínas.

Como primer paso para la identificación de un homólogo de PPARs en *Caenorhabditis elegans*, se realizó un alineamiento entre las secuencias de proteínas de PPARs y las secuencias de proteínas de *C. elegans* almacenadas en una base de datos como se describe en materiales y métodos

Tabla 2. Resultados del rastreo en base de datos de las secuencias de proteínas de *C. elegans* y PPARs

Secuencia	Descripción	Puntaje	Valor-e
W05B5.3 *	CE26023 locus nhr-85	321	5.2e-30
F44A6.2 *	CE03323 locus sex-1	265	1.5e-19
C01H6.5 *	CE24775 locus nhr- 23	272	8.3e-27
K10C3.6	CE12084 locus nhr-49	228	1.9e-21
B0280.2	CE00185 locus nhr-10	248	4.7e-20
T23H4.2	CE14120 locus nhr- 69	232	5.0e-20
F55D12.4	CE05597 locus unc-55	220	3.4e-18
F56E3.4	CE23784 locus fax-1	230	5.6e-18
F11C1.6	CE0319 locus nhr-25	225	1.4e-17
C32F10.6	CE08543 locus nhr-2	225	1.6e-17

C45E1.1	CE16926 locus nhr-64	219	1.6e-17
T01B10.4	CE21131 locus nhr-14	228	1.9e-17
H01A20.1	CE18798 locus nhr-3	228	2.1e-17
C26B2.3	CE17474 locus nhr-68	228	5.2e-17
C07A12.3	CE03791 locus nhr-35	209	1.3e-17

El puntaje asignado por el alineamiento se relaciona con la mayor homología que presentan dos secuencias y por los arreglos efectuados por la matriz del software empleado, por lo tanto los mayores puntajes indican homologías mas cercanas entre secuencias de proteínas.

Una de las primeras revelaciones al finalizar la secuenciación del genoma de *C. elegans* fue conocer el número de genes de RN cuya suma total es de 270. Sin embargo sólo 15 de estos genes son aparentes ortólogos u homólogos cercanos en insectos y vertebrados los cuales pueden ser clasificados en las 6 mayores sub-familias de RNs definidas por análisis filogenéticos de RNs (Sluder y cols. 2001). Una vez realizado el Blast se seleccionaron 8 secuencias con el fin de realizar un análisis más detallado relacionado con la estructura, función, y secuencias consenso que pudieran presentar estas proteínas. Los criterios de selección fueron:

- Puntaje asignado por el Blast
- Que estas secuencias de proteínas pertenecieran a las 15 secuencias que fueron clasificadas como miembros de la súper-familia de RNs descrita para insectos y vertebrados.
- Que estas secuencias de proteínas en el mejor de los casos formen parte de la sub familia de PPARs (tres primeras proteínas con asterisco)

4.1.1 Resumen de alineamiento de proteínas seleccionadas

Las siguientes tablas muestran un resumen del alineamiento obtenido entre las secuencias de los tres distintos isotipos de PPARs (*Homo sapiens* y *Mus musculus*) con las secuencias de proteínas de *C. elegans*, alineando por separado la proteína total, DBD y LBD de PPARs

Tabla 3. Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR α de *Homo sapiens* y las secuencias de proteínas de *C. elegans*

PPAR α	Amino ácidos	% identidad	Amino ácidos	Valor-e	Puntaje	Proteína <i>C. elegans</i>
		57.4	101	2.1e-30	423	W05B5.3 = NHR-85*
		25.5	423	3.1e-28	399	F44A6.2a = SEX-1 *
		50.5	91	1.6e-25	369	C01H6.5 = NHR-23 *
Proteína total	468	47.4	76	4.8e-19	296	F11C1.6 = NHR-25
		51.9	77	1.4e-19	301	K10C3.6 = NHR-49
		37.6	117	1.6e-18	288	T23H4.2 = NHR-69
		40.2	117	8.5e-21	314	F56E3.4 = FAX-1
		44.2	86	1.2e-18	290	F55D12.4 = UNC-55
		62.7	67	2.1e-30	330	W05B5.3 = NHR-85 *
		62.7	67	1.8e-23	331	F44A6.2a = SEX-1 *
		55.2	67	3.8e-20	294	C01H6.5 = NHR-23 *
DBD	65	48.5	66	4.2e-18	271	F11C1.6 = NHR-25
		53.0	66	2.9e-18	268	K10C3.6 = NHR-49
		48.5	66	5.0e-18	272	T23H4.2 = NHR-69
		50	66	1.7e-18	274	F56E3.4 = FAX-1
		53	66	2.2e-19	284	F55D12.4 = UNC-55
		30	30	53	65	W05B5.3 = NHR-85 *
		22.5	187	1.5e-5	139	F44A6.2a = SEX-1 *
		36.7	49	0.038	101	C01H6.5 = NHR-23 *
LBD	188	24.5	53	1.3e+02	61	F11C1.6 = NHR-25
		25	60	4.2	77	K10C3.6 = NHR-49
		44.8	29	12	71	T23H4.2 = NHR-69
		23.9	67	1.3e+03	48	F56E3.4 = FAX-1
		30.6	49	5.2e+03	40	F55D12.4 = UNC-55

DBD = Dominio de unión a ADN

LBD = Dominio de unión a ligando

Tabla 4. Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR β de *Homo sapiens* y las secuencias de proteínas de *C. elegans*

PPAR β	Amino ácidos	% identidad	Amino ácidos	Valor -e	Puntaje	Proteína <i>C. elegans</i>
		50.4	113	1.6e-30	424	W05B5.3 = NHR-85 *
		27.4	409	1.6e-28	404	F44A6.2a = SEX-1 *
		52.9	87	6.2e-25	362	C01H6.5 = NHR-23 *
Proteína total	441	50	76	1.7e-20	312	F11C1.6 = NHR-25
		50.6	81	8.8e-20	303	K10C3.6 = NHR-49
		45.8	83	1.3e-19	300	T23H4.2 = NHR-69
		39.5	124	6.0e-19	293	F56E3.4 = FAX-1
		44.8	87	5.8e-18	268	F55D12.4 = UNC-55
		65.7	67	2.7e-24	338	W05B5.3 = NHR-85 *
		62.5	67	6.4e-28	340	F44A6.2a = SEX-1 *
		58.2	67	9.1e-21	297	C01H6.5 = NHR-23 *
DBD	65	51.5	66	1.6e-19	279	F11C1.6 = NHR-25
		53.0	66	2.4e-18	272	K10C3.6 = NHR-49
		50.0	66	5.7e-19	271	T23H4.2 = NHR-69
		51.5	68	5.8e-18	268	F56E3.4 = FAX-1
		54.5	66	1.2e-19	287	F55D12.4 = UNC-55
		37.1	35	19	70	W05B5.3 = NHR-85 *
		21.3	188	1.2e-6	140	F44A6.2a = SEX-1 *
		22.2	189	0.13	95	C01H6.5 = NHR-23 *
LBD	188	37.9	29	73	64	F11C1.6 = NHR-25
		20.9	191	12	72	K10C3.6 = NHR-49
		51.7	29	1.5	81	T23H4.2 = NHR-69
		50.0	20	1.6e+03	47	F56E3.4 = FAX-1
		23.9	88	3.3e+02	5	F55D12.4 = UNC-55

DBD = Dominio de unión a ADN

LBD = Dominio de unión a ligando

Tabla 5. Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR γ de *Homo sapiens* y las secuencias de proteínas de *C. elegans*

PPAR γ	Amino ácidos	% identidad	Amino ácidos	Valor-e	Puntaje	Proteína <i>C. elegans</i>
		57.0	100	7.8e-30	417	W05B5.3 = NHR-85 *
		26.1	371	1.3e-20	415	F44A6.2a = SEX-1 *
Proteína total	505	48.5	97	3.9e-25	97	C01H6.5 = NHR-23 *
		50	76	1.5e-19	302	F11C1.6 = NHR-25
		54.3	81	3.0e-20	309	K10C3.6 = NHR-49
		46.9	96	3.6e-20	307	T23H4.2 = NHR-69
		46.8	94	6.1e-21	316	F56E3.4 = FAX-1
		42.1	107	5.7e-19	294	F55D12.4 = UNC-55
		64.2	67	8.9e-23	323	W05B5.3 = NHR-85 *
		65.7	67	2.7e-25	329	F44A6.2a = SEX-1 *
DBD	65	53.7	67	2.4e-19	285	C01H6.5 = NHR-23 *
		51.5	66	1.2e-18	277	F11C1.6 = NHR-25
		57.6	66	1.0e-18	277	K10C3.6 = NHR-49
		51.5	66	1.3e-18	275	T23H4.2 = NHR-69
		55.9	68	4.1e-19	281	F56E3.4 = FAX-1
		57.6	66	3.3e-19	282	F55D12.4 = UNC-55
		31.4	35	19	70	W05B5.3 = NHR-85 *
		20.3	187	1.3e-17	162	F44A6.2a = SEX-1 *
LBD	188	44.4	45	0.004	112	C01H6.5 = NHR-23 *
		37.9	29	1.3e+02	61	F11C1.6 = NHR-25
		22.2	194	0.82	85	K10C3.6 = NHR-49
		47.1	34	1.8	80	T23H4.2 = NHR-69
		19.7	66	7.4e+03	37	F56E3.4 = FAX-1
		23.9	88	65	63	F55D12.4 = UNC-55

DBD = Dominio de unión a ADN

LBD = Dominio de unión a ligando

Tabla 6. Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR α de *Mus musculus* y las secuencias de proteínas de *C. elegans*

PPAR α	Amino ácidos	% identidad	Amino ácidos	Valor-e	Puntaje	Proteína <i>C.elegans</i>
		47.7	128	4.1e-31	431	W05B5.3 = NHR-85 *
		25.9	424	2.5e-28	400	F44A6.2a = SEX-1 *
Proteína total	468	50.5	91	1.6e-25	369	C01H6.5 = NHR-23 *
		47.4	76	4.8e-19	296	F11C1.6 = NHR-25
		51.9	77	1.4e-19	301	K10C3.6 = NHR-49
		38.5	117	8.8e-19	291	T23H4.2 = NHR-69
		39.3	117	3.7e-21	318	F56E3.4 = FAX-1
		49.3	73	1.8e-18	288	F55D12.4 = UNC-55
		62.7	67	2.1e-23	330	W05B5.3 = NHR-85 *
		62.7	67	1.8e-23	331	F44A6.2a = SEX-1 *
DBD	65	55.2	67	3.8e-20	294	C01H6.5 = NHR-23 *
		48.5	66	4.2e-18	271	F11C1.6 = NHR-25
		53.0	66	2.9e-18	272	K10C3.6 = NHR-49
		48.5	66	5.5e-18	268	T23H4.2 = NHR-69
		50.0	68	1.7e-18	274	F56E3.4 = FAX-1
		53.0	66	2.2e-19	284	F55D12.4 = UNC-55
		28.6	35	43	66	W05B5.3 = NHR-85 *
		23	187	7.8e-6	142	F44A6.2a = SEX-1 *
LBD	188	34.7	41	0.047	100	C01H6.5 = NHR-23 *
		24.5	53	2.5e+02	58	F11C1.6 = NHR-25
		25	60	4.2	77	K10C3.6 = NHR-49
		44.8	29	12	71	T23H4.2 = NHR-69
		22.4	67	3.2e+03	43	F56E3.4 = FAX-1
		28.6	49	8.1e+03	36	F55D12.4 = UNC-55

DBD = Dominio de unión a ADN

LBD = Dominio de unión a ligando

Tabla 7. Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR β de *Mus musculus* y las secuencias de proteínas de *C. elegans*

PPAR β	Amino ácidos	% identidad	Amino ácidos	Valor-e	Puntaje	Proteína <i>C. elegans</i>
		50.4	113	3.6e-30	420	W05B5.3 = NHR-85 *
		26.5	408	4.2e-28	397	F44A6.2a = SEX-1 *
Proteína total	441	52.9	87	1.4e-24	358	C01H6.5 = NHR-23 *
		48.7	76	8.7e-20	304	F11C1.6 = NHR-25
		50.6	81	1.1e-19	302	K10C3.6 = NHR-49
		36.8	117	4.4 ^e -19	294	T23H4.2 = NHR-69
		44.8	87	1.6 ^e -18	288	F56E3.4 = FAX-1
		50.7	73	2e-18	287	F55D12.4 = UNC-55
		65.7	67	4.1e-24	338	W05B5.3 = NHR-85 *
		62.7	67	2.8e-24	340	F44A6.2a = SEX-1 *
DBD	65	58.2	67	2.1e-20	297	C01H6.5 = NHR-23 *
		50.0	66	8.1e-19	279	F11C1.6 = NHR-25
		53	66	2.9e-18	272	K10C3.6 = NHR-49
		48.5	66	3.1 ^e -18	271	T23H4.2 = NHR-69
		51.1	68	2.0 ^e -17	262	F56E3.4 = FAX-1
		54.5	66	2.7e-19	283	F55D12.4 = UNC-55
		34.3	35	53	65	W05B5.3 = NHR-85 *
		22.9	188	2.3e-6	148	F44A6.2a = SEX-1 *
LBD	188	27.7	101	0.083	86	C01H6.5 = NHR-23 *
		41.4	29	26	69	F11C1.6 = NHR-25
		21.8	191	6.3	75	K10C3.6 = NHR-49
		48.3	29	3.4	77	T23H4.2 = NHR-69
		45	20	5.4 ^e +3	40	F56E3.4 = FAX-1
		25	88	65	63	F55D12.4 = UNC-55

DBD = Dominio de unión a ADN

LBD = Dominio de unión a ligando

Tabla 8. Homología de secuencias de proteínas del receptor PPAR γ de *Mus musculus* y las secuencias de proteínas de *C. elegans*

PPAR γ	Amino ácidos	% identidad	Amino ácidos	Valor-e	Puntaje	Proteína <i>C. elegans</i>
		57.0	100	7.8e-30	417	W05B5.3 = NHR-85 *
		25.6	371	4.2e-29	409	F44A6.2a = SEX-1 *
Proteína total	505	48.5	97	3.9e-25	365	C01H6.5 = NHR-23 *
		50.0	76	1.5e-19	302	F11C1.6 = NHR-25
		54.3	81	3.2e-20	309	K10C3.6 = NHR-49
		46.9	96	3.6e-20	307	T23H4.2 = NHR-69
		48.3	88	9.2e-21	314	F56E3.4 = FAX-1
		42.1	107	5.7e-19	294	F55D12.4 = UNC-55
		64.2	67	8.9e-23	323	W05B5.3 = NHR-85 *
		65.7	67	2.7e-23	329	F44A6.2a = SEX-1 *
DBD	65	53.7	67	2.4e-19	285	C01H6.5 = NHR-23 *
		51.5	66	1.2e-18	277	F11C1.6 = NHR-25
		57.6	66	1.8e-18	277	K10C3.6 = NHR-49
		51.1	66	1.3e-18	275	T23H4.2 = NHR-69
		55.9	68	4.1e-19	281	F56E3.4 = FAX-1
		57.6	66	3.3e-19	282	F55D12.4 = UNC-55
		28.6	35	35	67	W05B5.3 = NHR-85 *
		19.3	187	4.4e-7	156	F44A6.2a = SEX-1 *
LBD	188	42.2	45	0.0074	109	C01H6.5 = NHR-23 *
		41.4	29	49	66	F11C1.6 = NHR-25
		21.6	194	0.82	85	K10C3.6 = NHR-49
		44.1	34	5.1	75	T23H4.2 = NHR-69
		33.3	12	8.7e+03	35	F56E3.4 = FAX-1
		48.3	89	65	63	F55D12.4 = UNC-55

DBD = Dominio de unión a ADN

LBD = Dominio de unión a ligando

Conclusiones

A la luz de los resultados obtenidos a través de los diferentes alineamientos realizados entre las secuencias de proteínas de *C. elegans* y las secuencias de proteínas de los distintos isotipos de PPARs de *Homo sapiens* y *Mus musculus* y los análisis filogenéticos de receptores nucleares ya descritos (Sluder y cols. 2001), podemos concluir que de los 270 genes de RN predichos hasta la fecha en *C. elegans*, sólo tres de estos genes podrían ser clasificados como probables homólogos a PPARs. Según el alineamiento realizado, SEX-1, NHR-23 y NHR-85 presentan los mayores porcentajes de identidad no sólo en el alineamiento total de la proteína, si no también en la región que corresponde al dominio de unión a ADN con porcentajes de identidad que superan el 57%, además del puntaje asignado por el alineamiento donde estos poseen los más altos valores. Estos tres factores de transcripción pertenecen a los 15 genes de RN en *C. elegans* que son clasificados como ortólogos u homólogos en insectos y vertebrados por análisis filogenéticos, además estos son miembros de la sub-familia NR1 que es a la cual pertenecen los PPARs en la clasificación general de RN en insectos y vertebrados (Sluder y cols. 2001).

Si bien con estos antecedentes no podemos asegurar la existencia de un homólogo a PPARs en el nemátodo, sí podemos afirmar que estos tres RN son los candidatos más seguros para ser calificados como genes putativos homólogos de PPARs en *Caenorhabditis elegans*.

4.2 Efecto del Ciprofibrato y Ciglitazona en letalidad embrionaria.

Con el objetivo de evaluar la letalidad embrionaria y establecer algunos parámetros en tratamientos con Ciprofibrato, un activador farmacológico de PPAR α (Keller y cols. 1997) y Ciglitazona, un ligando farmacológico específico de PPAR γ (Caro y cols. 1989) ensayamos diferentes concentraciones de estas drogas utilizando una cepa de *C. elegans* llamada *him-5* (e-1490). Esta cepa contiene una mutación que produce una nodisjunción meiótica del cromosoma X, lo que se traduce en un mayor porcentaje de machos. La cepa silvestre (N2) utilizada generalmente posee un 0.05% de macho en una población determinada, *him-5* (e-1490) posee un 30 % de machos en la misma población (The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Wood. 1988) Este mayor porcentaje nos permitirá evaluar el efecto de esta droga en un mayor número de machos en una población determinada. Esto es importante para mantener una población lo más homogénea posible.

En la figura 4A y 4B, se muestra el efecto de los tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona en la muerte de los huevos de gusanos, traducidos en letalidad embrionaria. **Letalidad embrionaria se define como: *huevos no eclosionados* / *huevos totales*** (Shim y cols. 2002). Si bien se observa un aumento en la muerte de los huevos en tratamientos con 500 μ M y 5mM de Ciprofibrato y 50 μ M y 500 μ M de Ciglitazona, estos no son significativos respecto a su control según análisis estadísticos (prueba t), lo que indicaría que a las concentraciones empleadas las drogas no son tóxicas para *C. elegans*

4.2.1 Letalidad embrionaria en tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona

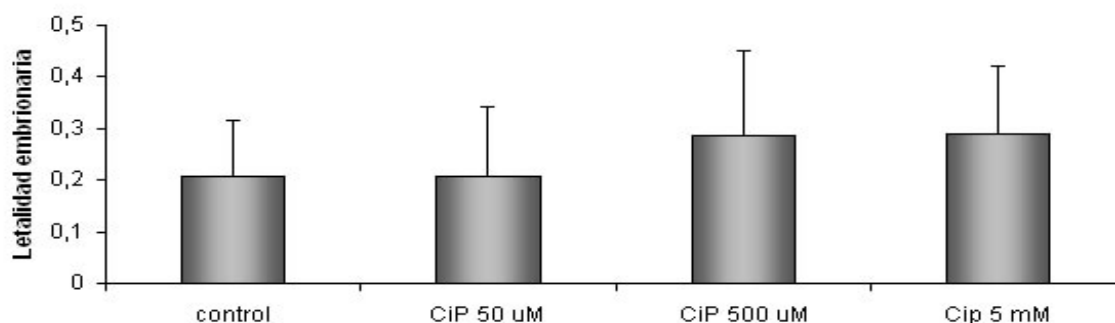


Fig. 4A. Efecto de Ciprofibrato en la letalidad embrionaria

Los huevos de los gusanos no son afectados en tratamientos con Ciprofibrato en medio de cultivo líquido por 24 horas, según análisis estadísticos prueba t. 10 experimentos independientes

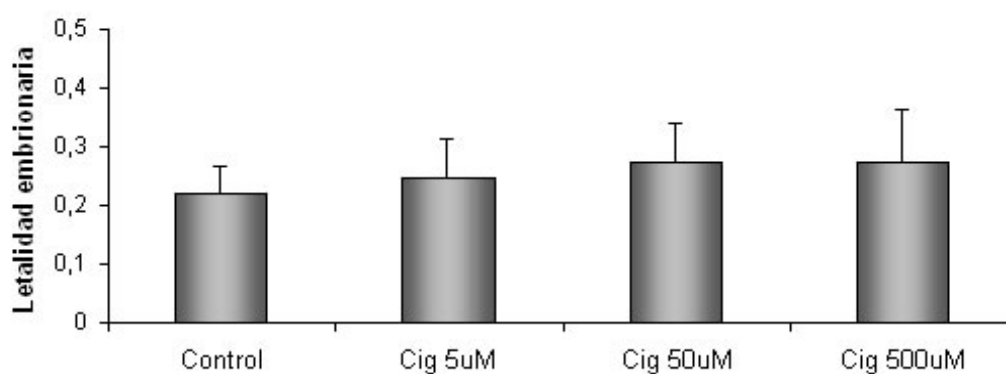


Fig. 4B. Efecto de Ciglitazona en la letalidad embrionaria

Los huevos de los gusanos no son afectados en tratamientos con Ciglitazona en medio de cultivo líquido por 24 horas, según análisis estadísticos prueba t. 10 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

4.3 Efecto fenotípico en tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona

Con el objetivo de evaluar el efecto que podría causar Ciprofibrato y Ciglitazona ligandos farmacológicos de PPAR α y γ respectivamente, en los gusanos y aprovechando una de las características que hacen del gusano un buen modelo (transparencia del cuerpo) observamos bajo lupa el comportamiento y estructura anatómica del nematodo. El tratamiento con Ciprofibrato revela un cambio anatómico transiente que fue visible a través de la lupa. El cuál se traducía en un aumento en el volumen del lumen intestinal del gusano a una concentración 5mM como muestra la figura 5C. En tratamientos con Ciglitazona no se observaron cambios anatómicos visibles figura 5D, al igual que en los controles, figuras 5A y 5B lo que nos indicaría que el DMSO, agente en el cual se resuspendieron las drogas, no causaría efecto sobre el gusano en tratamientos por 24 horas en medio de cultivo líquido.

4.3.1 Efecto de agonistas farmacológicos de PPARs en *C. elegans*

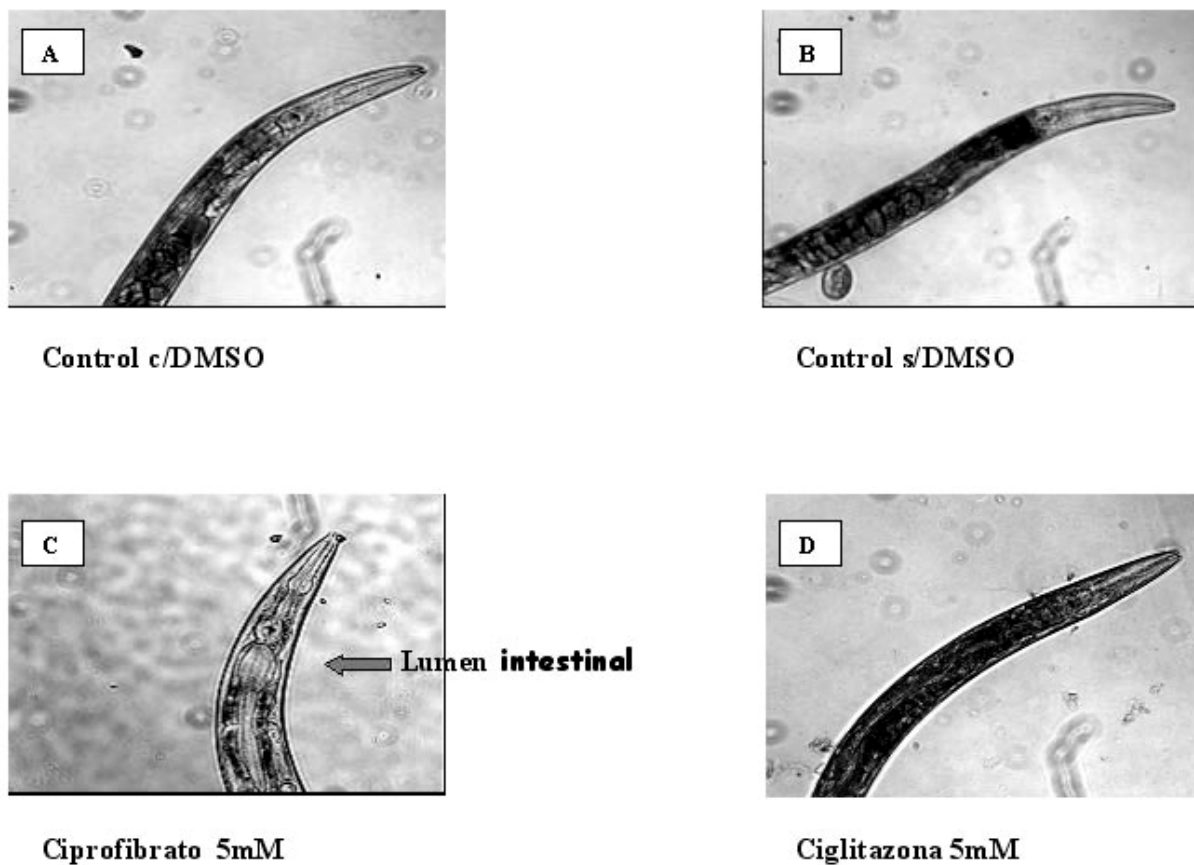


Fig.5. Efecto de Ciprofibrato en el lumen intestinal de *C. elegans*

Los gusanos fueron incubados por 24 horas en medio de cultivo líquido. El tratamiento con Ciprofibrato muestra un aumento de volumen en el lumen intestinal del gusano. Se trabajó con un aumento 20× en todas las preparaciones.

4.4 Efecto de Ciprofibrato sobre la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs.

En la búsqueda de un homólogo de PPARs en *C. elegans*, evaluamos la expresión de los genes que fueron seleccionados a través del alineamiento de secuencias (*nhr-85*, *nhr-23*, *sex-1*).

El Ciprofibrato es un PP y ha demostrado ser un ligando específico de PPAR α . Este isotipo de PPAR está altamente expresado en tejidos catabólicos de lípidos (hígado, corazón, y mucosa intestinal) y regula la expresión de varios genes de la β -oxidación (Acyl-CoA oxidasa; Dreyer y cols. 1992; enzima bifuncional, Bardot y cols. 1993 y tiolasa, Lee y cols. 1995), además de genes que regulan el transporte y captación de lípidos por parte de las células (proteína transportadora de ácidos grasos: FATP, CD36, proteína de unión de ácidos grasos en el hígado: L-FABP; Motojima y cols. 1998), el metabolismo mitocondrial de ácidos grasos (Mascaro y cols. 1998; Brandt y cols. 1998), la formación de cuerpos cetónicos (Rodríguez y cols. 1994) y es responsable del proceso de proliferación peroxisomal generada por PP en hígado de roedores (Gonzalez y cols. 1995 ; Lee y cols. 1995). Como ya se mencionó, se utilizó Ciprofibrato para evaluar el efecto en la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs.

En las figura 6 y 7 se puede observar que gusanos tratados por 24 h con Ciprofibrato a una concentración 5mM, no se altera la expresión de los genes *sex-1* y *nhr-23*, genes putativos homólogos a PPARs. Sin embargo, se puede ver una inducción en la expresión del gen *nhr-85* respecto a su control en las mismas condiciones experimentales recientemente mencionadas (Fig. 8).

4.4.1 Expresión relativa del gen *sex-1* en gusanos tratados con Ciprofibrato

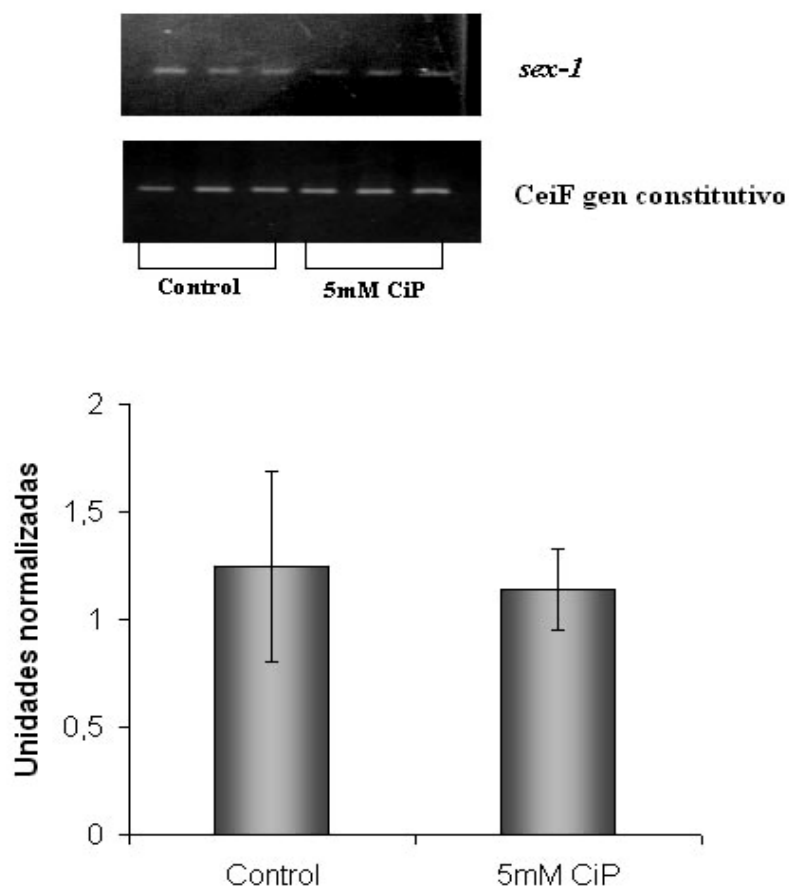


Fig. 6. Efecto del Ciprofibrato en la expresión del gen *sex-1* de *C. elegans*

Mediante un RT-PCR semicuantitativo se determinó la expresión del ARNm de *sex-1*. Las bandas se cuantificaron por densitometría con respecto al control de carga CeIF. Se observa que los gusanos tratados con CiP presentan una inhibición que no es significativa respecto al control (tratados con DMSO) según análisis estadísticos (prueba t). Se realizaron 3 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

4.4.2 Expresión relativa del gen *nhr-23* en gusanos tratados con Ciprofibrato

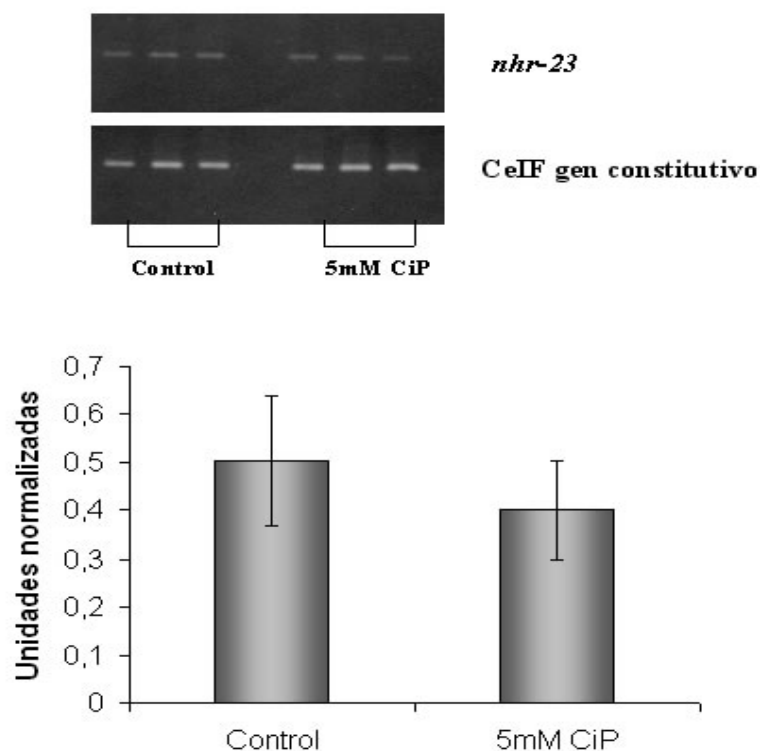


Fig. 7. Efecto de Ciprofibrato en la expresión del gen *nhr-23* de *C. elegans*

Mediante un RT-PCR semicuantitativo se determinó la expresión del ARNm de *nhr-23*. Las bandas se cuantificaron por densitometría con respecto al control de carga CeIF. Se observa que los gusanos tratados con CiP presentan una inhibición que no es significativa respecto al control (tratados con DMSO) según análisis estadísticos (prueba t). Se realizaron 3 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

4.4.3 Expresión relativa del gen *nhr-85* en gusanos tratados con Ciprofibrato

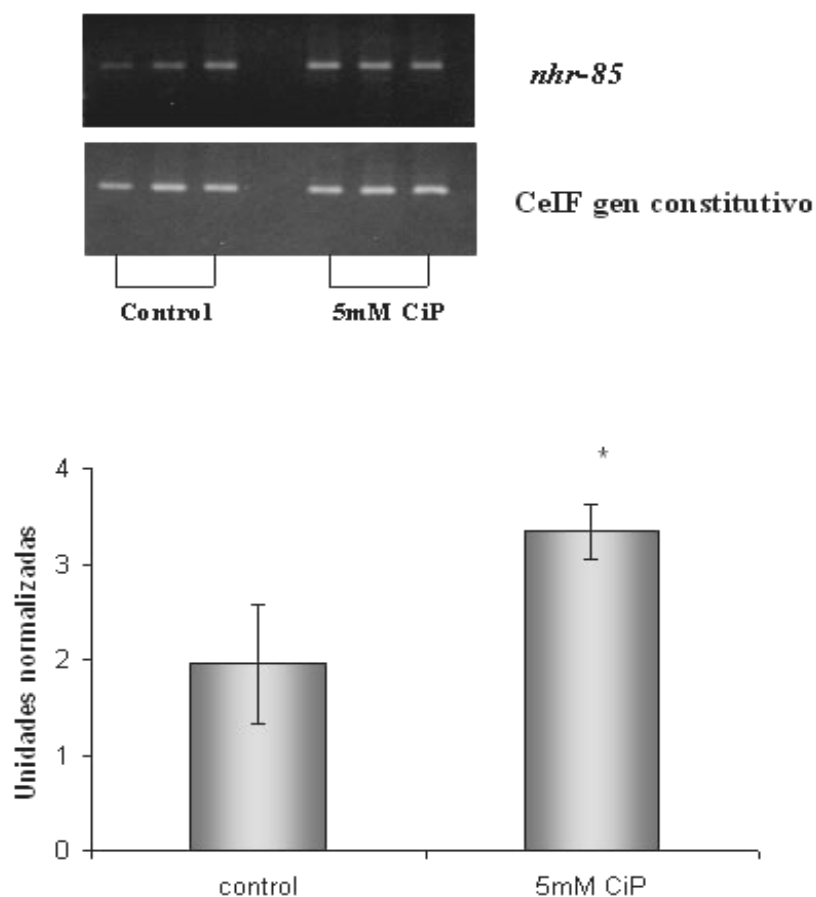


Fig. 8. Efecto de Ciprofibrato en la expresión del gen *nhr-85* de *C.elegans*

Mediante un RT-PCR semicuantitativo se determinó la expresión del ARNm de *nhr-85*. Las bandas se cuantificaron por densitometría con respecto al control de carga CeIF. Se observa que los gusanos tratados con CiP presentan una inducción que es significativa respecto al control (tratados con DMSO) según análisis estadísticos (prueba t) * $p < 0.05$. Se realizaron 3 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

4.5 Efecto de Ciglitazona sobre la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar la expresión de los genes de RN seleccionados a través del alineamiento (*sex-1*, *nhr-23* y *nhr-85*) en tratamientos con Ciglitazona, un ligando farmacológico específico de PPAR γ (Hofmann y cols. 1992), con el objetivo de comenzar a establecer parámetros que permitieran determinar la presencia de un putativo gen homólogo a PPARs en *C. elegans* y poder así clasificarlo como un isotipo específico de este RN.

PPAR γ es un isotipo de PPAR que se expresa principalmente en tejido adiposo (Tontonoz y cols. 1994) y en menor grado en el intestino grueso, sistema inmune y retina. Los ligandos sintéticos de PPAR γ son conocidos como tiazolinedionas y son usados por sus potentes efectos antidiabéticos, entre ellos se encuentran, Troglitazona, Rosiglitazona, Pioglitazona y Ciglitazona (Hofmann y cols. 1992). PPAR γ fue inicialmente identificado como un regulador para la diferenciación de adipocitos en roedores (Tontonoz y cols. 1994). Estudios posteriores realizados en células 3T3-L1 (pre-adipocitos de ratón) en tratamientos con tiazolinedionas revelaron un aumento en el ARNm de PPAR γ (Takamura y cols. 2001). Como ya se mencionó se evaluó la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs de *C. elegans*, en tratamientos con Ciglitazona.

En las figuras 9,10 y 11 se puede observar que la Ciglitazona a una concentración de 100 μ M no altera la expresión de los genes *sex-1*, *nhr-23* y *nhr-85* en tratamientos de 24 h en medio de cultivo líquido.

4.5.1 Expresión relativa del gen *sex-1* en gusanos tratados con Ciglitazona

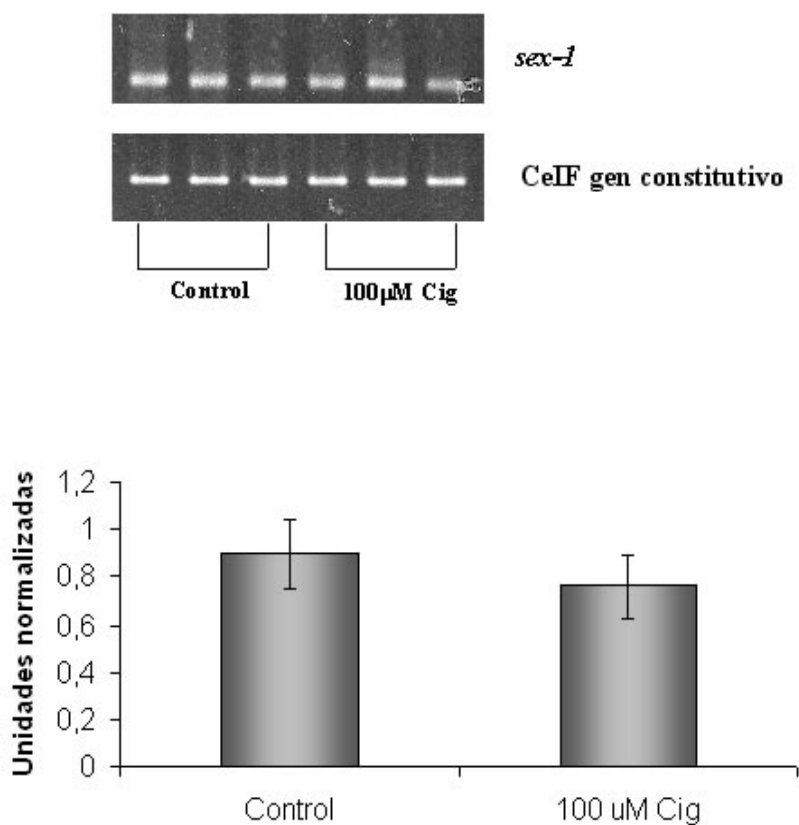


Fig. 9 Efecto de Ciglitazona en la expresión del gen *sex-1* de *C. elegans*

Mediante un RT-PCR semicuantitativo se determinó la expresión del ARNm de *sex-1*. Las bandas se cuantificaron por densitometría con respecto al control de carga CeIF. Se observa que los gusanos tratados con Ciglitazona presentan una inhibición que no es significativa respecto al control (tratados con DMSO) según análisis estadísticos (prueba t). Se realizaron 3 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

4.5.2 Expresión relativa del gen *nhr-23* en gusanos tratados con Ciglitazona

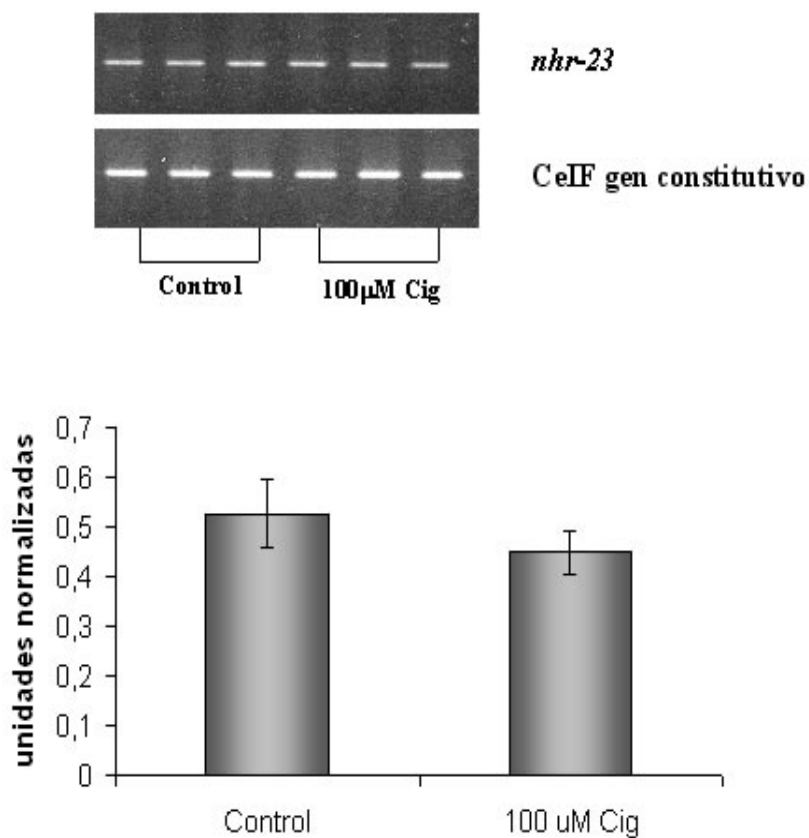


Fig. 10 Efecto de Ciglitazona en la expresión del gen *nhr-23* de *C. elegans*

Mediante un RT-PCR semicuantitativo se determinó la expresión del ARNm de *nhr-23*. Las bandas se cuantificaron por densitometría con respecto al control de carga CeIF. Se observa que los gusanos tratados con Ciglitazona presentan una inhibición que no es significativa respecto al control (tratados con DMSO) según análisis estadísticos (prueba t). Se realizaron 3 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

4.5.3 Expresión relativa del gen *nhr-85* en gusanos tratados con Ciglitazona

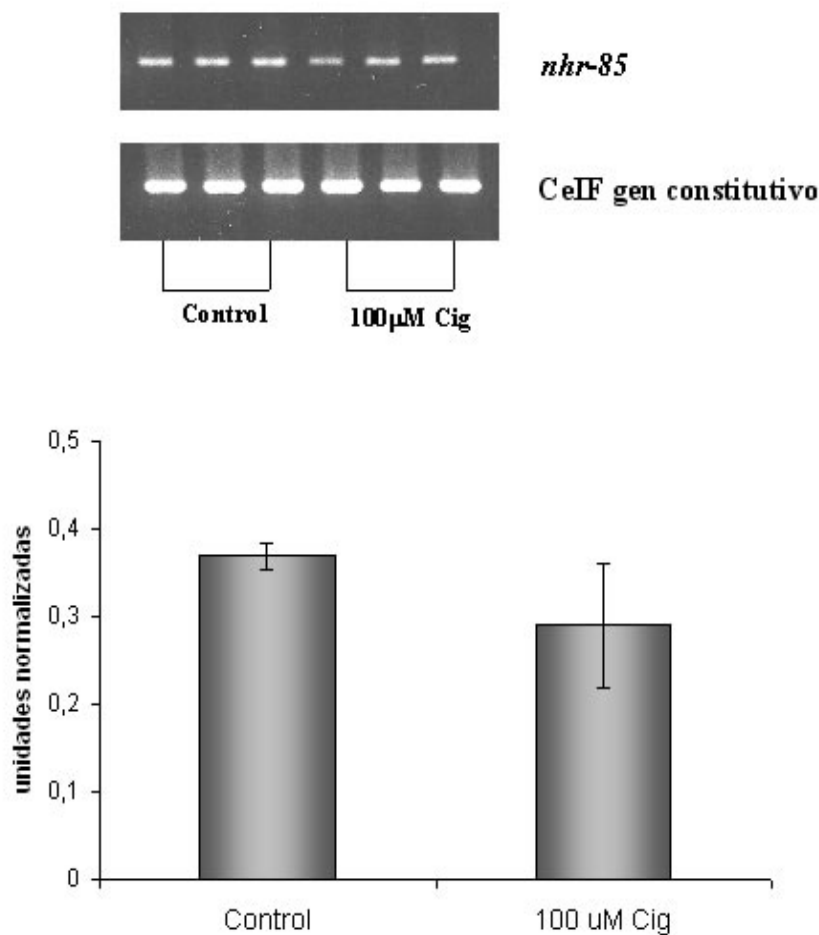


Fig. 11 Efecto de Ciglitazona en la expresión del gen *nhr-85* de *C. elegans*

Mediante un RT-PCR semicuantitativo se determinó la expresión del ARNm de *nhr-85*. Las bandas se cuantificaron por densitometría con respecto al control de carga CeIF. Se observa que los gusanos tratados con Ciglitazona presentan una inhibición que no es significativa respecto al control (tratados con DMSO) según análisis estadísticos (prueba t). Se realizaron 3 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

4.6 Efecto de Ciprofibrato sobre la expresión de la enzima Acyl-CoA oxidasa, gen blanco de PPAR α

Con el fin de comprobar la existencia de un gen homólogo a PPARs en *C. elegans*, comenzamos a ensayar en genes blanco de estos receptores nucleares, específicamente del isotipo α , entre los cuales se encuentra el gen que codifica para la enzima Acyl-CoA oxidasa. Esta participa en la β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos de cadena muy larga, catalizando la deshidrogenación de los ésteres de Acyl-CoA a su correspondiente trans-2-Enoyl-CoA, en la primera etapa de la reacción de la β -oxidación (Dreyer y cols. 1992). En estudios realizados por el grupo de J K. Reddy en 1989 (Thangada y cols. 1989) se describe que los niveles del ARNm de la enzima Acyl-CoA oxidasa aumentan 7 a 26 veces respecto a su nivel basal en roedores tratados con Ciprofibrato. Basados en estos antecedentes se evaluó la expresión de genes que codifican para la enzima Acyl-CoA oxidasa de *C.elegans* en tratamientos con Ciprofibrato, con el objetivo de conocer si estos genes responden a PPs, como se ha descrito en vertebrados. La secuenciación del genoma del nemátodo ha revelado la existencia de 4 genes que codifican para 7 proteínas distintas de Acyl-CoA oxidasa, las cuales presentan homología con los diferentes tipos de Acyl-CoA oxidasa, tanto en roedores como en humanos. Se confeccionaron partidores para los cDNAs de 2 de las 7 proteínas que están presentes en *C. elegans*.

F08A8.1 = Identificado como Acyl-CoA oxidasa peroxisomal

F59F4.1= Identificado como Acyl-CoA oxidasa I de rata

4.6.1 Homologías entre proteínas de Acyl-CoA oxidasa

Las siguientes tablas contienen un resumen de las homologías que presentan las proteínas seleccionadas en *C.elegans* con proteínas de *Homo sapiens* y *Mus musculus*

Tabla. 9 Homología entre la proteína de *C. elegans* (CE: 17633 = F08A8.1) y proteínas de *Homo sapiens*

Gen	Descripción	Amino ácidos	% Identidad	Valor-e
ACOX 1	Acyl-CoA oxidasa peroxisomal	670	43	1e-146
AXCO 2	Acyl-CoA oxidasa de Cadena ramificada	683	38	1e-115
AXCO 3	Putativa Pristanoil-CoA oxidasa	567	32	2e-63
ACADS	Acyl-CoA dehidrogenasa de cadena corta	340	21	5e-05

Tabla. 10 Homología entre la proteína de *C. elegans* (CE:17633 = F08A8.1) y proteínas de *Mus musculus*.

Gen	Descripción	Amino ácidos	% Identidad	Valor-e
ACOX	Acyl-CoA oxidasa	670	43	1e-150

Tabla. 11 Homología entre la proteína de *C. elegans* (CE:11546 = F59F4.1) y proteínas de *Homo sapiens*.

Gen	Descripción	Amino ácidos	% Identidad	Valor-e
ACOX 1	Acyl-Coa oxidasa peroxisomal	670	39	1e-144
ACOX 2	Acyl-Coa oxidasa de Cadena ramificada	683	35	1e-112

Tabla. 12 Homología entre la proteína de *C. elegans* (CE:11546 = F59F4.1) y proteínas de *Mus musculus*

Gen	Descripción	Amino ácidos	% Identidad	Valor-e
ACOX 1	Acyl-CoA oxidasa Palmitoyl	670	40	1e-120

4.6.2 Expresión relativa gen F08A8.1 en gusanos tratados con Ciprofibrato

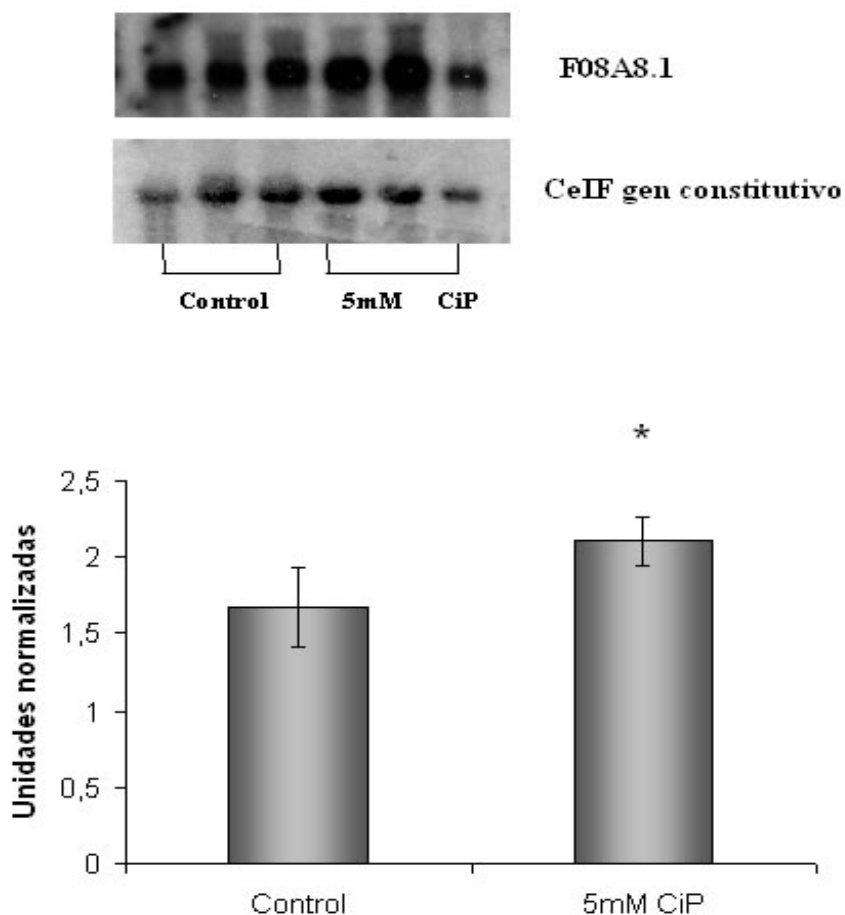


Fig. 12. Efecto de Ciprofibrato en la expresión del gen F08A8.1 de *C. elegans*

Mediante Northern Blot se determinó la expresión del ARNm de F08A8.1. Las bandas se cuantificaron por densitometría con respecto al control de carga CeIF. Se observa que los gusanos tratados con CiP presentan una inducción pequeña pero que es estadísticamente significativa (prueba t) * $p < 0.05$. Se realizaron 3 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

4.6.3 Expresión relativa gen F59F4.1 en gusanos tratados con Ciprofibrato

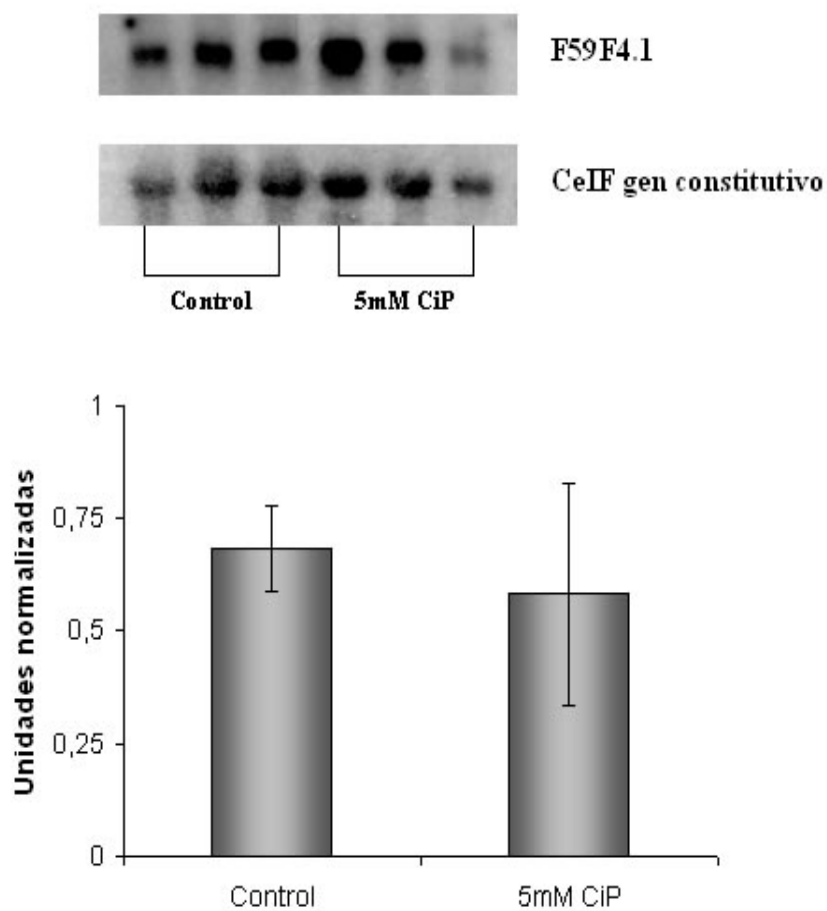


Fig. 13. Efecto del Ciprofibrato en la expresión del gen F59F4.1 de *C. elegans*

Mediante Northern Blot se determinó la expresión del ARNm de F59F4.1. Las bandas se cuantificaron por densitometría con respecto al control de carga CeIF. No se observan diferencias significativas (prueba t). Se realizaron 3 experimentos independientes, los valores son expresados como el promedio $\pm$ DS.

5. DISCUSION

El rol que cumplen los PPARs en la regulación del metabolismo lipídico (Dreyer y cols. 1992), procesos inflamatorios, hepatocarcinogénesis (Roberts y cols. 1998) y la alta incidencia que han tenido los ligandos sintéticos de estos receptores nucleares, (fibratos y tiazolinedionas) en el tratamiento de enfermedades como hipertrigliceridemia (Lehmann y cols. 1995), efecto antiinflamatorio (Devchand y cols. 1996) y efectos anti-ateroescleróticos (Tontonoz y cols. 1998), resaltan el importante papel que cumplen estos RN en la coordinación de estos procesos biológicos. Bajo este contexto, encontrar un homólogo a PPARs en *Caenorhabditis elegans* facilitaría enormemente el estudio de este factor de transcripción, no sólo como una forma de evaluar el efecto de ligandos sintéticos específicos de PPARs en el nemátodo, sino que además para dilucidar otras vías de señalización por la cual este RN podría estar actuando en el gusano y de esta forma es posible responder a incógnitas que han surgido, respecto de la regulación de diferentes vías metabólicas en las cuales se encuentran involucrados los PPARs. El trabajo en *C. elegans* es entonces relevante, ya que como se mencionó anteriormente, demuestra ser un sistema modelo altamente ventajoso por el alto número de genes que codifican para RN y la facilidad del manejo en el laboratorio.

Este trabajo de Tesis se concentró en la búsqueda de un gen putativo homólogo a PPARs en *C. elegans*. Esta investigación es pionera en el estudio de los RN en el gusano y de alguna manera, descriptiva en el análisis general. La estrategia de trabajo comenzó con un alineamiento entre las secuencias de proteínas de los distintos isotipos de PPARs (α, β, γ) de dos especies diferentes (*Homo sapiens* y *Mus musculus*) y las secuencias de proteínas de *C. elegans* contenidas en la base de datos “ Wormbase, Sanger Center, AceDB”. Como segundo paso, se

evaluó los efectos producidos por los agonistas farmacológicos de PPARs α y γ , Ciprofibrato y Ciglitazona, en el fenotipo de los gusanos, la muerte embrionaria y su efecto en la expresión de los genes putativos homólogos a PPARs (*sex-1*, *nhr-23* y *nhr-85*). Además, se evaluó el efecto de Ciprofibrato en la expresión de genes blanco clásicos mediados por PPAR α , como lo es la enzima Acyl-CoA oxidasa. Con relación a PPAR β , existen pocos datos en la literatura que nos permitan analizar con claridad la función de este isotipo, esto es debido a la falta de ligandos sintéticos específicos para este receptor y al desconocimiento del rol que este cumple en vertebrados.

5.1 Alineamiento de secuencias

A la luz de los resultados obtenidos a través de los diferentes alineamientos realizados entre las secuencias de proteínas de *C.elegans* y las secuencias de proteínas de los distintos isotipos de PPARs de *Homo sapiens* y *Mus musculus* y los análisis filogenéticos de receptores nucleares ya descritos (Sluder y cols. 2001), podemos concluir que entre los 270 genes de RN identificados hasta la fecha en *C. elegans*, sólo tres de estos genes podrían ser clasificados como probables homólogos a PPARs. Los resultados muestran que los genes *sex-1*, *nhr-23* y *nhr-85* presentan los mayores porcentajes de identidad no sólo en el alineamiento total de la proteína, si no también en la región que corresponde al dominio de unión a ADN, con porcentajes de identidad que superan el 57%, y en el puntaje asignado por el alineamiento, donde estos poseen los más altos valores. Estos tres factores de transcripción pertenecen a los 15 genes de RN de *C. elegans* que son clasificados como ortólogos u homólogos a RN de insectos y vertebrados, según los resultados del análisis filogenético. Además estos son miembros de la sub-familia NR1, a la

cual pertenecen los PPARs en la clasificación general de RN en insectos y vertebrados (Sluder y cols. 2001).

Si bien con estos antecedentes no se puede asegurar la existencia de un homólogo a PPARs en el nemátodo, sí podemos afirmar que estos tres RN son los candidatos mas próximos para ser calificados como genes putativos homólogos a PPARs en *Caenorhabditis elegans*.

5.2 Efectos de agonistas farmacológicos específicos de PPARs en *C. elegans*

Un punto central en esta tesis era comprobar el efecto que podrían causar tratamientos con agonistas farmacológicos clásicos de PPAR α y γ (Ciprofibrato y Ciglitazona respectivamente) en los gusanos. En primer lugar se evaluó el efecto de Ciprofibrato y Ciglitazona en la muerte de los huevos (letalidad embrionaria) y la respuesta de los gusanos adultos traducida en cambios visibles en la anatomía general (efecto en el fenotipo). Según nuestros resultados, podemos concluir que Ciprofibrato y Ciglitazona no afectan el desarrollo normal del gusano, ya que no se observaron diferencias significativas en la muerte de los huevos en tratamientos de 500 μ M y 5mM de Ciprofibrato y 50mM y 500mM de Ciglitazona. Cabe señalar que el uso del medio de cultivo líquido S-Medium disminuye la fertilidad de los hermafroditas, básicamente por encontrarse en un medio que no es el óptimo para el crecimiento de los gusanos (*C. elegans*. A Practical Approach. Hope. 1999).

Con respecto al efecto fenotípico producido en tratamientos con Ciprofibrato y Ciglitazona, se observa que Ciprofibrato a una concentración de 5mM produce un cambio anatómico transiente, visible a través de la lupa, el cual se caracteriza por un aumento de volumen del lumen intestinal del gusano (Fig. 5C). Comparativamente, en el tratamiento con Ciglitazona no se produjo cambios morfológicos visibles como se muestra en la figura 5D.

5.3 Efecto de Ciprofibrato sobre la expresión de genes putativos homólogos a PPARs en *C. elegans*

El tercer objetivo del trabajo es responder a una pregunta que surge de manera espontánea pensando, en que los PPs son ligandos sintéticos activadores de PPAR α , según estudios realizados por el grupo F.J. Gonzalez (Peters y cols. 2000). En este trabajo se demuestra que el tratamiento de hepatocitos de rata con WY-14,643 produce un aumento del ARNm y de la proteína de PPAR α . Por lo cual, la pregunta a responder es ***¿El tratamiento con Ciprofibrato, un proliferador peroxisomal, afectará la expresión de los putativos genes homólogos a PPARs en C. elegans como ocurre en roedores?***. Basados en los resultados de F.J. Gonzalez nosotros pretendemos comprobar si un PP puede activar la expresión de los genes seleccionados del gusano como se ha descrito en roedores. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el tratamiento con Ciprofibrato 5mM no altera la expresión de los genes *sex-1* y *nhr-23* respecto a su control según análisis estadístico (prueba t) como muestran las figuras 6 y 7. No obstante se observó una inducción en la expresión del gen *nhr-85* respecto a su control ((prueba t) $p=0.022$) como muestra la figura 8 a través de RT-PCR semicuantitativo. Este es el primer antecedente que sugiere la activación de un gen de RN en *C. elegans* mediada por PPs.

5.4 Efecto de Ciglitazona sobre la expresión de los putativos genes homólogos a PPARs en *C. elegans*

Ciglitazona pertenece al grupo de fármacos llamados tiazolinedionas, los cuales son empleados en medicina clínica por sus potentes efectos antidiabéticos (Caro y cols. 1989). Esta droga es un ligando específico para PPAR γ . En consecuencia, permite responder a la

interrogante planteada *¿Ciglitazona al igual que Ciprofibrato puede inducir la expresión de al menos uno de los tres genes candidatos a ser un homólogo de PPARs en C.elegans?, ¿ciglitazona podrá inducir ó alterar la expresión del gen nhr-85?* Responder a estas preguntas resulta clave en el diseño de futuros experimentos ya que podríamos centrar nuestros esfuerzos en el estudio de un isotipo específico de PPARs.

Los resultados de los experimentos realizados con Ciglitazona revelan que a una concentración de 100µM, en tratamientos por 24 horas en medio de cultivo líquido, no se observa inducción de los genes putativos homólogos a PPARs en *C. elegans*, (Fig. 9,10 y 11) a través de RT-PCR semicuantitativo. Estos resultados podrían sugerir que en el gusano no existen RN que respondan a drogas de la familia de las tiazolinediona y más aún se podría descartar la presencia de un homólogo de PPAR γ en el nemátodo.

5.5 Gen blanco de PPAR α : Acyl-CoA oxidasa

Para identificar la presencia de un gen homólogo a PPARs en *C. elegans*, se comprobó la existencia de genes blanco de estos RN en el gusano, sustentado en la base de datos del nematodo “Wormbase, AceBD, Sanger Center”. En base a los resultados anteriores, donde se observó inducción en la expresión del gen *nhr-85* en tratamientos con Ciprofibrato, se rastreo en primer lugar, genes blanco de PPAR α . Un gen blanco clásico de este RN es la enzima Acyl-CoA oxidasa que participa en el proceso de β -oxidacion peroxisomal en roedores. La búsqueda reveló la existencia de 4 genes que codifican para 7 proteínas diferentes de Acyl-CoA oxidasa . Se diseñaron partidores para los cDNA de 2 de las 7 proteínas que están presentes en *C. elegans*. Las (tablas 9-11) muestran un resumen de las homologías de las proteínas del nemátodo

(F08A8.1: CE 17633) y (F59F4.1: CE11546) respecto a Acyl-coA oxidasa encontradas en *Homo sapiens* y *Mus musculus*. Estos resultados indican que los más altos porcentajes de identidad corresponden a Acyl-CoA oxidasa peroxisomal y Acyl-coA oxidasa de cadena ramificada. Cabe resaltar que el efecto en la expresión de genes que corresponden a Acyl-CoA oxidasa en tratamientos con Ciprofibrato nos permitirá no sólo evaluar la expresión del gen si no que además nos permitirá discriminar entre los distintos isotipos de PPARs. Se ha descrito en la literatura que en tratamientos con Ciprofibrato a una concentración de 0.1mM, los niveles del ARNm del gen de Acyl-CoA oxidasa aumenta entre 7 a 26 veces respecto a su control en hepatocitos de rata (Tangada y cols. 1989). Comparativamente, los resultados obtenidos en *C. elegans* muestran que la expresión del gen F59F4.1 (Acyl-CoA oxidasa del nemátodo), evaluada por ensayos de Northern blot, no es alterada en tratamiento con Ciprofibrato 5mM por 24 h en medio de cultivo líquido, según análisis estadísticos (prueba t), (Fig. 13). En cambio, sí se observó un aumento en la expresión del gen F08A8.1 (Acyl-CoA oxidasa del nemátodo) en tratamientos con Ciprofibrato 5mM por 24 h en medio de cultivo líquido, (prueba t con un valor $P= 0.0399$) evaluados con experimentos de Northern blot (Fig. 12). Si bien estos resultados se correlacionan, el orden de magnitud observada en la inducción del gen de la enzima Acyl-CoA oxidasa, en roedores, es mucho mayor comparada con nuestros resultados. Este hecho puede tener varias explicaciones. **Primero:** La extracción de ARN total en roedores se realizó exclusivamente de cultivos de hepatocitos de rata, donde se ha descrito una alta expresión de Acyl-CoA oxidasa. Por el contrario, la extracción de ARN total del nemátodo se realizó a partir de un cultivo de gusanos donde convergían todos los estados larvales. Se ha descrito que existen estados larvales donde el metabolismo lipídico es más elevado (larva L1) (Liu F y cols. 1997) y por ende podría existir mayor expresión y actividad de las enzimas involucradas en el

catabolismo de lípidos. Estas observaciones sugieren que el efecto final del Ciprofibrato pudo haberse diluído en las condiciones experimentales antes descritas. **Segundo:** Es necesario recordar que en la anatomía del gusano existe una cutícula que cubre todo el largo del cuerpo y que es bastante impermeable, por lo cual la captación de droga en el medio de cultivo líquido está sujeta sólo a la cantidad de comida que cada gusano ingiere en el período de incubación. En consecuencia, se necesitan altas cantidades de drogas en los tratamientos (Methods in Cell Biology. Epstein. 1995). Este es otro factor de dilución en el efecto final del Ciprofibrato. **Tercero:** como ya se mencionó antes, la enzima Acyl-CoA oxidasa es altamente expresada en hepatocitos de rata. Es probable que esta localización presente en roedores tenga su contraparte en el nemátodo y sólo se exprese en un tipo celular, por ende el efecto final de la droga sea aún menor.

Con respecto a los resultados observados en la expresión de los genes de Acyl-CoA oxidasa de *C. elegans* tratados con Ciprofibrato, surge una pregunta interesante ***¿ por qué sólo existe la inducción del ARNm de sólo uno de los dos genes evaluados si ambos presentan una homología muy cercana respecto a genes de Acyl-CoA oxidasa de humano y roedores?***. En la literatura se ha descrito que existen al menos dos proteínas distintas de Acyl-CoA oxidasa en humanos que utilizan sustratos específicos diferentes (Van Veldhoven y col 1992). La primera de ellas cataliza la β -oxidación de ácidos grasos saturados de cadena larga, lineal y ácidos grasos de cadena muy larga, preferentemente en peroxisomas, Mientras que la segunda vía actúa sobre Acyl-coA de cadena ramificada, la cual no es inducida por PPs (Reddy y cols. 1986). Al analizar las tablas 9-11 podemos constatar que las principales homologías respecto de Acyl-CoA oxidasa del gusano con Acyl-CoA oxidasa de humano y roedores recaen sobre Acyl-CoA oxidasa tipo I y Acyl-CoA oxidasa de cadena ramificada. Esto podría sugerir que el gen no inducido en *C.*

elegans (F59F4.1 gen homólogo a Acyl-CoA oxidasa en humano y roedores) participaría en la segunda vía de la β -oxidación peroxisomal oxidando Acyl-CoA de cadena ramificada la cual no es inducida por PP lo que concuerda con la no inducción del gen F59F4.1 (gen homólogo a Acyl-CoA oxidasa en el gusano) en el tratamiento con Ciprofibrato.

5.6 Receptores nucleares en *Caenorhabditis elegans*

El estudio de RN en el nemátodo ha avanzado considerablemente con el término del proyecto del genoma de *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998). Este estudio reveló la existencia de aproximadamente 270 genes de RN, un número nunca antes observado en organismos multicelulares (Sluder y cols. 2001). Las investigaciones han sido orientadas en una primera etapa a explicar el rol de estos RN en el gusano. Entre estas investigaciones encontramos trabajos que han descrito la función de dos de los tres genes candidatos a ser probables homólogos a PPAR en *C. elegans*. La primera de ellas relaciona al RN *nhr-23* como un regulador de la muda y del desarrollo epidermal del gusano (Kostrouchova y cols. 2001). La segunda investigación relaciona al gen *sex-1* como un gen clave en la determinación del sexo en *C. elegans* (Carmi y cols. 1998). Estos resultados nos entregan nuevas herramientas para comprender aun más la funciones de estos RN en el nemátodo y al mismo tiempo nos permitirían suponer que estos dos RN aparentemente no se relacionan con las funciones de PPARs que están ampliamente descritas en la literatura. Lo que nos permite comenzar a seleccionar entre nuestros genes candidatos. Además, cabe señalar que a pesar de los avances significativos en el estudio de RN en el nemátodo, aún no existe evidencia que relacione a *nhr-85* con una función en particular en el gusano, más aún no hay trabajos que relacionen a un RN de *C. elegans* con PPARs, lo que demuestra la relevancia de esta investigación como una idea pionera en el área de RN. Es

importante señalar que existen estudios que describen la existencia de peroxisomas en el gusano (Motley y cols. 2000; Petriv y cols. 2002; Togo y cols. 2000) y del proceso de β -oxidación mitocondrial (O’Riordan y cols. 1990). Al respecto el trabajo del grupo de Maeubuchi es el más cercano a nuestra investigación ya que ha tratado los gusanos con un PPs (Clofibrato), demostrando que existe un aumento de tamaño y de número en los peroxisomas (Maebuchi y cols. 1999; Yokota y cols. 2002) del intestino del nemátodo. En cierta manera, estos trabajos respaldan la idea de la existencia de un RN en *C. elegans* que cumpliría una función similar a PPAR α .

Finalmente los antecedentes ya descritos con relación a la función y acción de los ligandos sintéticos de PPARs, específicamente de la clase fibratos, conjuntamente con los resultados obtenidos en esta investigación nos permitirían sugerir que el gen *nhr-85* podría corresponder a un gen homólogo a PPAR α en *Caenorhabditis elegans*. Sin embargo creemos que este es un trabajo preliminar en el área y que obviamente está sujeto a nuevas técnicas experimentales que permitan definir que el gen *nhr-85* específicamente actuaría como un regulador lipídico en el gusano y se relaciona con las funciones de PPAR α antes mencionadas.

Conclusiones

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis indican que

- Según alineamiento de secuencias de proteínas de los distintos isotipos de PPARs (α , β y γ) de dos diferentes especies *Homo sapiens* y *Mus musculus* y las secuencias de proteínas de *C. elegans*, más los estudios filogenéticos de RN antes descritos, clasifican a *nhr-23*, *sex-1* y *nhr-85*, en la misma sub familia NR1 a la cual pertenece PPARs en la clasificación general de los RN de insectos y vertebrados.
- Ciprofibrato y Ciglitazona a las concentraciones utilizadas, no son letales para *C. elegans*. Sin embargo Ciprofibrato podría estar generando un fenotipo distinto en el gusano.
- Ciprofibrato induce la expresión del gen *nhr-85*, gen homólogo a PPAR α de gusanos a una concentración de 5mM.
- Ciglitazona no altera la expresión de los genes homólogos a PPARs en *C. elegans* a una concentración de 100 μ M en tratamientos por 24 horas.
- Ciprofibrato induce la expresión del gen F08A8.1, gen homólogo a Acyl-CoA oxidasa en el gusano, a una concentración de 5mM.

BIBLIOGRAFIA

Bardot, O., Aldridge, T. C., Latruffe N. and Green S. (1993) PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 192 (1):37-45

Basu-Modak, S., Braissant, O., Escher, P., Desvergne, B., Honegger, P. and Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J Biol Chem* 274 (50):35881-8

Brandt, J. M., Djouadi, F and Kelly, D. P. (1998) Fatty acids activated transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator – activated receptor alpha. *J. Biol. Chem* 273 (37):23786-92

Brenner, S. (1974) The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77 (1):71-94

Carmi, I., Kopczynski, J. B and Meyer, B. J. (1998) The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex. *Nature* 396:168-173

Caro, J. F., Dohm, L. G., Pories, W. J and Sinha, M. K. (1989) Cellular alterations in liver, skeletal muscle and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity an type II diabetes. *Diabetes. Metab. Rev* 5(8):665-89

Conway, J. G., Tomaszewski, K. E., Olson, M. J., Cattley, R. C., Marsman, D. S. and Popp J. A. (1989) Relationship of oxidative damage to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di (2-ethylhexyl) phthalate and Wy-14,643. *Carcinogenesis* 10 (3): 513-9.

Costet, P., Legendre, C., More, J., Edgar, A., Galtier, P. and Pineau, T. (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J. Biol.Chem* 273 (45):29577-85

Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Van den Berghe, W., Peters, J. M., Gonzalez, FJ., Fruchart, J. C., Tedgui, A., Hageman, G. and Staels, B. (1999) Peroxisome proliferator – activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappa B and AP-1. *J. Biol.Chem* 274 (45):32048-54.

Desvergne, B. and Whali, W. (1999) Peroxisome proliferator activated receptor: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 20 (5):649-88

Devchand, P. R., Hihi, A. K., Perroud, M., Scheleuning, W. P., Spiegelman, B. M. and Whali, W. (1999) Chemical probes that differentially modulate peroxisome proliferator activated receptor alpha and BLTR, nuclear and cell surface receptors for leukotriene B4. *J. Biol.Chem.* 274 (33):23341-8

Devachand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J. and Wahli, W. (1996) The PPAR alpha –leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384 (6604):39-43

Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. (1992) Control of the peroxisomal beta oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 68 (5): 879-87.

Epstein, H. F. and Shakes, D. C. (1995) Methods in Cell Biology: *Caenorhabditis elegans* Modern Biological Analysis of an Organism. Volumen (48): 187-201

Gonzalez, F. J., Fernandez-Salguero, P., Lee, SS., Pineau, T. and Ward JM. (1995) Xenobiotic receptor knockout mice. *Toxicol Lett.* 82 -83:117-21

Hardwick, J. P., Song, B. J., Huberman, E. and Gonzalez, F. J. (1987) Isolation, complementary DNA sequence, and regulation of rat hepatic lauric acid omega-hydroxylase (cytochromeP-450 LA omega) Identification of a new P-450 gene family. *J.Biol.Chem.* 15:262 (2):801-10.

Hope, I. A. (1999) *C. elegans* A Practical Approach. Edited Hope I.A School of biology University of Leeds: 1-95

Hofmann, C. A. and Colca, J. R. (1992) New oral thiazolidinedione antidiabetic agents act as insulin sensitizers. *Diabetes Care* 15 (8):1075-8

Issemann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by proliferators peroxisome. *Nature* 347 (6294):645-50

Keller, H., Devchand, P. R., Perroud, M and Wahli, W. (1997) PPAR alpha structure-function relationships derived from species-specific differences in responsiveness to hypolipidemic agents. *Biol Chem.* 378 (7):651-5

Kockx, M., Gervois, P. P., Poulain, P., Derudas, B., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Princen, H. M., Kooistra, T. and Staels B. (1999) Fibrates suppress fibrinogen gene expression in rodents via activation of the peroxisome proliferator- activated receptor-alpha. *Blood.* 93 (9):2991-8

Kostrouchova, M., Krause, M., Kostrouch, Z. and Rall JE. (1998) CHR3: *Caenorhabditis elegans* orphan nuclear hormone receptor required for proper epidermal development and molting. *Development* 125:1617-26

Kostrouchova, M., Krause, M., Kostrouch, Z. and Rall J. E. (2001) Nuclear hormone receptor CHR3: is a critical regulator of all four larval molts of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* 98(13):7360-65

Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. and Stehelin, D. (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 11(3):1003-1013

Lee, SS., Pineau, T., Drago, J., Lee, E. J., Owens, J. W., Kroetz, D. L., Fernandez-Salguero, P. M., Westphal, H. and Gonzalez, F. J. (1995) Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator –activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol.Cell.Biol* 15 (6):3012-22.

Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M. and Kliewer, SA. (1995) An antidiabetic Thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma). *J.Biol.Chem.* 270 (22):12953-12956

Lim, H., Gupta, R. A., Ma, W. G., Paria, B. C., Moller, D. E., Morrow, J. D., DuBois, R. N., Trzaskos, J. M. and Dey, S. K. (1999) Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR delta. *Genes Development.* 13 (12):1561-74

Liu, F., Thatcher, J. D. and Epstein, H. (1997) Induction of Glyoxylate Cycle Expression in *Caenorhabditis elegans* : A fasting response throughout larval development. *Biochemistry.* 36: 255-260

Maebuchi, M., Togo, S. H., Yokota, S., Ghenea, S., Bun-ya, M., Kamiryo, T. and Kawahara, A. (1999) Type-II 3-oxoacyl-CoA thiolase of the nematode *Caenorhabditis elegans* is located

in peroxisomes, highly expressed during larval stages and induced by clofibrate. *Eur.J. Biochem.* 264:509-15

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-39

Mascaro, C., Acosta, E., Ortiz, J. A., Marrero, P. F., Hegardt, F. G and Haro, D. (1998) Control of human muscle-type carnitinepalmitoyl-transferaseI gene transcription by peroxisome proliferator- activated receptor. *J.Biol.Chem.* 273 (15):8560-3

Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. and Ambros, V. (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* (12):3959-70

Miyabayashi, T., Palfreyman, M. T., Sluder, A. E., Slack, F. and Sengupta, P. (1999) Expression and function of members of a divergent nuclear receptor family in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 215 (2):314-31

Motley, A. M., Hetteima, E. H., Ketting, R., Plasterk, R. and Tabak, H. F. (2000) *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO Reports.* (1) :40-6

Motojima, K., Passilly, P., Peters, J. M., Gonzalez, F. J. and Latruffe, N. (1998) Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue and inducer specific manner. *J.Biol.Chem.* 273 (27):16710-4

Muhlrad, P. J. (2001) A genetic and molecular analysis of spermiogenesis initiation in *Caenorhabditis. elegans*. thesis. Doctor of Philosophy. Department of Molecular and Cellular Biology. The University of Arizona, 23pp.

O'Riordan, V. B. and Burnell, A. M. (1990) Intermediary metabolism in the larva dauer of the nematode *Caenorhabditis elegans*---II. The Glyoxylate cycle and fatty- acid oxidation. *Comp. Biochem Physiol* 95B;(1):125-130

Peters, J. M., Rusyn, I., Rose, M. L., Gonzalez, F. J. and Thurman R. G. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor α is restricted to hepatic parenchymal cells, not Kupffer cells: implications for the mechanism of action of peroxisome proliferator in hepatocarcinogenesis *Carcinogenesis* 21(4):823-826

Petriv, O. I., Pilgrim, D. B., Rachubinski, R. A. and Titorenko, V. I. (2002) RNA interference of peroxisome-related genes in *C. elegans*: a new model for human peroxisomal disorders. *Physiol Genomics* 10:79-91

Reddy, J. K., Goel, S. K., Nemali, M. R., Carrino, J. J., Laffler, T. G., Reddy, M. K., Sperbeck, S. J., Osumi, T., Hashimoto, T., Lalwani, N. D. and Rao, MS. (1986) Transcriptional regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc.Nat.Acad.Sci USA* (6):1747-51

Reddy, J. K., Rao, M. S., Azarnoff, D. L. and Sell, S. (1979) Mitogenic and carcinogenic effects of a hypolipidemic peroxisome proliferator, [4- chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid (Wy-14,643) in rat and mouse liver. *Cancer. Res.* 39 (1):152-61.

Roberts, R. A., James, N. H., Woodyatt, N. J., Tugwood, J. D. and Macdonald, N. (1998) Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha). *Carcinogenesis* 19(1):43-8

Rodriguez, J. C., Gil-Gomez, G., Hegardt, F. G. and Haro, D. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J.Biol.Chem.* 269 (29):18767-72.

Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., More, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M. and Mortensen, R. M. (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4 (4):611-7

Shim, Y., Chun, J., Lee, E. and Paik, Y. (2002) Role of cholesterol in germ-line development of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular reproduction and development* 61:358-366

Sluder, A. E. and Maina, C. V. (2001) Nuclear receptors in nematodes themes and variations. *TRENDS in Genetics* 17 (4):206-13

Sluder, A. E., Mathews, S. W., Hough, D., Yin, V. P. and Maina, C. V. (1999) The Nuclear Receptor Superfamily has Undergone extensive proliferation and diversification in Nematodes. *Genome Res.* 9:103-120

Sonnhammer, E. L. and Durbin, R. (1997) Analysis of protein domain families in *Cenorhabditis elegans*. *Genomics* 46(2):200-16

Styles, J. A., Kelly, M., Pritchard, N. R. and Elcombe, C. R. (1988) A species comparison of acute hyperplasia induced by the peroxisome proliferator methyleclofenapate: involvement of the binucleated hepatocyte. *Carcinogenesis*. 9 (9):1647-55.

Takamura, T., Nohara, E., Nagai, Y. and Kobayashi, K. (2001) Stage-specific effects of a thiazolidinedione on proliferation, differentiation and PPAR gamma mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol.* 422(1-3):23-9.

Thongada, S., Alvares, K., Mangino, M., Mohammed, I., Usman, M., Rao, S. and Reddy. J. K. (1989) An in vitro demonstration of peroxisome proliferation and increase in peroxisomal

β -oxidation system mRNAs in cultured rat hepatocytes treated with ciprofibrate. *FEBS* 250 (2):205-10

Togo, S. H., Maebuchi, M., Yokota, S., Bun-ya, M., Kawahara, A. and Kamiryo, T. (2000). Immunological detection of alkaline-diaminobenzidine-negative peroxisomes of the nematode *Caenorhabditis elegans*. purification and unique pH optima of peroxisomal catalase. *Eur J Biochem.* 267:1307-1312

The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998) Genome Sequence of Nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282 (5396):2012-18.

Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblast by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 79 (7):1147-56.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A. and Evans, R. M. (1998) PPAR gamma Promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*; 93(2):241-252

Van Veldhoven, P. P., Vanhove, G., Asselberghs, S., Eyssen, H. J. and Mannaerts, G. P. (1992) Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase(inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase) and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J. Biol. Chem.* 267 (28): 20065-74

Yokota, S., Togo, SH., Maebuchi, M., Bun-ya, M., Haraguchi, C. M. and Kamiryo, T. (2002) Peroxisome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: distribution and morphological characteristics. *Histochemistry and Cell Biology* 118:329-336

Warren, J. R., Simmon, V. F. and Redddy, J. K. (1980) Properties of hypolipidemic peroxisome proliferators in the lymphocyte [3] thymidine and salmonella mutagenesis assays. *Cancer. Res.* 40 (1):36-41.

White, J. G., Southgate, R., Thomson, J.,N. and Brenner, S. (1986) The structure of the nervous system of the nematode *C .elegans*. *Philos.Trans R: Soc Lond B.Biol.Sci*; 341:1-340

Wood, W. B. (1988) The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Hambor Laboratory: 1-281